



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
Instituto de Investigaciones Biomédicas

CAPSÓMEROS QUIMÉRICOS COMO CANDIDATOS PARA  
VACUNAS PROFILÁCTICAS Y TERAPÉUTICAS COMBINADAS  
CONTRA VPH16

**T E S I S**  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:  
**GABRIELA LÓPEZ TOLEDO**

TUTOR PRINCIPAL:  
Dr. Alejandro Manuel García Carrancá, Instituto de Investigaciones Biomédicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:  
Dra. Blanca Haydé Ruiz Ordaz, Instituto de Investigaciones Biomédicas  
Dr. Vicente Madrid Marina, Instituto Nacional de Salud Pública

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., diciembre de 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Virus y Cáncer de la División de Investigación Básica en el Instituto Nacional de Cancerología (INCan)-SS, sede externa del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Con una estancia en el laboratorio del Dr. Lutz Gissmann, División de Modificaciones del Genoma y Carcinogénesis, Centro Alemán de Investigación en Cáncer (DKFZ).

Y una segunda estancia en el Laboratorio de Inmunología y Cáncer del Dr. Alberto Monroy-García, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS.

Bajo la dirección de:

Dr. Alejandro Manuel García Carrancá (IIB-UNAM; INCan-SS).

Con el comité tutorial:

Dra. Blanca Haydé Ruíz Ordaz (IIB-UNAM)

Dr. Vicente Madrid Marina (Instituto Nacional de Salud Pública-SS).

**Créditos**

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (PDCB; estudiante con número de cuenta 506011890) del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento del proyecto (número 127722 del Dr. Alejandro M. García Carrancá), y por la beca de manutención otorgada a la sustentante durante la realización del proyecto (número de registro 199976).

Al Instituto Nacional de Cancerología (INCan, México), el Convenio México-Alemania J110.530/260, 2007-2008, y el Centro Alemán de Investigación en Cáncer (DKFZ, Alemania).

## Agradecimientos

Al Dr. Alejandro M. García Carrancá, mi más profundo agradecimiento por el apoyo que siempre me brindó.

A mis co-tutores, la Dra. Blanca H. Ruíz Ordaz y el Dr. Vicente Madrid Marina, por su valiosa asesoría durante el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Lutz Gissmann, por darme la oportunidad de conocer y trabajar con su grupo.

Al Dr. Alberto Monroy-García, por recibirme en su laboratorio y por su invaluable asesoría en las pruebas inmunológicas; así como a la Dra. María de Lourdes Mora García.

A los co-autores de este trabajo: M. en C. Miriam Cecilia Guido Jiménez, Dra. Lysann Schädlich, Dr. Ángel Josabad Alonso Castro, Dra. Rosario García Rocha.

Al personal del bioterio del IIB, particularmente, a la MVZ. Georgina Díaz Herrera, el MVZ. Jorge Omar García Rebollar y el Dr. Víctor Daniel Garzón Cortés. Al personal del bioterio del INCan.

Al Dr. Carlos Castellanos (IIB) por su ayuda en el uso del irradiador.

A la Dra. Elizabeth Langley McCarron (INCan), por siempre facilitarme sus equipos de laboratorio; y por hacer tan generosamente la corrección de estilo del artículo publicado.

Al Dr. Federico Centeno Cruz (INMEGEN) y la Dra. Elizabeth Ortiz Sánchez (INCan).

A Raquel.

A la Q.F.B. María del Carmen Fuentes Castañeda, y todo el laboratorio de Inmunología del Cáncer en el Hospital de Oncología del CMN-SXXI.

A Heriberto A. Valencia G., por su amable ayuda en el bioterio y con el análisis estadístico de datos.

Y a todos en el laboratorio de Virus y Cáncer del INCan.

# ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>1. RESUMEN .....</b>	<b>9</b>
<b>2. ABSTRACT .....</b>	<b>10</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>11</b>
<b>4. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>12</b>
4.1. VIRUS DE PAPILOMA HUMANO .....	12
<i>Clasificación.....</i>	<i>12</i>
<i>Genoma.....</i>	<i>13</i>
<i>Proteínas tempranas .....</i>	<i>14</i>
<i>Proteínas tardías y estructura del virión.....</i>	<i>17</i>
4.2. CICLO VIRAL Y CÁNCER CÉRVICO-UTERINO.....	19
<i>Entrada del virus.....</i>	<i>19</i>
<i>Infección, lesiones intraepiteliales y CaCu .....</i>	<i>21</i>
4.3. E2 EN EL CICLO VIRAL.....	25
4.4. RESPUESTA INMUNE CONTRA VPH.....	28
4.5. RESPUESTA INMUNE CONTRA E2 .....	32
4.6. RESPUESTA INMUNE HUMORAL CONTRA VPH .....	33
4.7. VACUNAS PROFILÁCTICAS.....	34
4.8. VACUNAS TERAPÉUTICAS .....	35
4.9. cVLPs Y CAPSÓMEROS QUIMÉRICOS .....	38
<b>5. HIPÓTESIS .....</b>	<b>40</b>
<b>6. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>40</b>
<b>7. OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>40</b>
<b>8. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
8.1. CONSTRUCCIÓN DE VECTORES BACTERIANOS .....	41
8.2. PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN L1Δ+E2 DE VPH16 EN ESCHERICHIA COLI.....	43
8.3. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN L1Δ+E2.....	44
<i>Cromatografía de afinidad mediante el sistema GST.....</i>	<i>44</i>
<i>Cromatografía de exclusión.....</i>	<i>44</i>
<i>Análisis mediante SDS-PAGE y Western blot .....</i>	<i>45</i>
<i>Centrifugación en gradiente de sacarosa.....</i>	<i>46</i>

<i>Microscopía electrónica</i> .....	47
<i>ELISA con distintos anticuerpos específicos contra L1 de VPH16</i> .....	47
8.4. PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN L1Δ+E2H/NC A MAYOR ESCALA.....	48
8.5. PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN L1Δ+E2H/NC A MAYOR ESCALA.....	49
8.6. CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR PCDNA4/TO-E2HPV16.....	50
8.7. LÍNEAS CELULARES .....	51
8.8. GENERACIÓN DE CÉLULAS TC-1/E2 .....	52
8.9. RATONES.....	52
8.10. INMUNIZACIÓN.....	53
8.11. RE-ESTIMULACIÓN IN VITRO PARA LOS ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD .....	53
8.12. ENSAYO DE INHIBICIÓN DE TUMOR .....	55
8.13. PREDICCIÓN DE EPÍTOPOS TEÓRICOS DE E2.....	55
8.14. ENSAYO DE AFINIDAD DE PÉPTIDOS EN RMA-S .....	55
<b>9. RESULTADOS</b> .....	<b>57</b>
9.1. PLÁSMIDOS PARA LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS L1Δ+E2 DE VPH16 EN BACTERIAS .....	57
9.2. LAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS L1Δ+E2 DE VPH16 FORMAN AGREGADOS HETEROGÉNEOS.....	59
9.3. LA PROTEÍNA QUIMÉRICA L1Δ+E2H/NC CONSERVA EL PRINCIPAL EPÍTOPO NEUTRALIZANTE DE L1 DE VPH16 .....	61
9.4. PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA L1Δ+E2H/NC A MAYOR ESCALA .....	62
9.5. CÉLULAS TC-1/E2 QUE EXPRESAN LA PROTEÍNA E2 DE VPH16.....	64
9.6. LA INMUNIZACIÓN CON LA PROTEÍNA QUIMÉRICA L1Δ+E2H/NC INDUCE RESPUESTA CELULAR CITOTÓXICA CONTRA E2 DE VPH16.....	65
9.7. LA INMUNIZACIÓN CON LA PROTEÍNA QUIMÉRICA L1Δ+E2H/NC INHIBE EL CRECIMIENTO DE TUMORES EN RATONES .....	67
9.8. IDENTIFICACIÓN DE UN EPÍTOPO DE E2 DE VPH16 IMPLICADO EN LA RESPUESTA CELULAR CITOTÓXICA .....	69
<b>10. DISCUSIÓN</b> .....	<b>71</b>
<b>11. CONCLUSIONES</b> .....	<b>78</b>
<b>12. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>79</b>
<b>13. REFERENCIAS</b> .....	<b>80</b>
<b>14. PUBLICACIONES</b> .....	<b>97</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cápside viral.....	12
Figura 2. Esquema del genoma de VPH16 .....	14
Figura 3. Estructura de los dominios de la proteína E2 de VPH 16.....	16
Figura 4. Estructura tridimensional de L1 .....	17
Figura 5. Cuello cérvico-uterino humano .....	19
Figura 6. Estratos de los epitelios escamoso y columnar del cérvix.....	20
Figura 7. Infección por Virus de Papiloma Humano, su ciclo viral y consecuencias	24
Figura 8. Expresión de E2 en células de la unión escamo-columnar .....	27
Figura 9. Esquema de las construcciones quiméricas L1 $\Delta$ +E2.....	41
Figura 10. Plásmido pGex 4T-2_L1 $\Delta$ +E2 .....	57
Figura 11. La presencia o ausencia de fragmentos producto de digestión enzimática condujo a la selección de los plásmidos para expresión de proteínas quiméricas...	58
Figura 12. Las proteínas quiméricas forman partículas de distintos tamaños.....	60
Figura 13. La proteína quimérica L1 $\Delta$ +E2H/NC presenta el epítipo neutralizante H16.V5 de L1 .....	61
Figura 14. La proteína L1 $\Delta$ +E2H/NC se encuentra en la fracción soluble del lisado bacteriano .....	62
Figura 15. La proteína quimérica L1 $\Delta$ +E2H/NC fue producida en <i>E. coli</i> JM109-DE3 y purificada mediante cromatografía de afinidad con GST-glutatión .....	63
Figura 16. La línea celular TC-1/E2 contiene y expresa el gen de E2 de VPH16. ...	64
Figura 17. Los linfocitos T CD8+ de ratones inmunizados con proteína quimérica L1 $\Delta$ +E2H/NC ejercen citotoxicidad específica contra la proteína E2 de VPH16.....	66
Figura 18. La inmunización de ratones con la proteína L1 $\Delta$ +E2H/NC tiene efecto antitumoral .....	68
Figura 19. La inmunización con proteína L1 $\Delta$ +E2H/NC induce linfocitos citotóxicos contra el péptido aa's 292-301 de la proteína E2 de VPH16.....	70



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los tipos de VPH según su oncogenicidad .....	13
Tabla 2. Iniciadores para la amplificación y clonación de fragmentos del gen E2 de VPH 16 en el plásmido pGex 4T-2_L1 $\Delta$ .....	42
Tabla 3. Iniciadores para la delección de codones mediante mutagénesis .....	43
Tabla 4. Anticuerpos empleados en el análisis por western blot .....	46
Tabla 5. Tamaño de las construcciones quiméricas L1 $\Delta$ +E2 .....	59

## 1. RESUMEN

El principal factor de riesgo para desarrollar Cáncer Cérvico-uterino lo constituyen las infecciones persistentes con Virus de Papiloma Humano de alto riesgo. Las vacunas existentes en el mercado son profilácticas y no ayudan a eliminar infecciones existentes, lesiones precursoras o cáncer. En este panorama, una vacuna con características profilácticas y terapéuticas sería idónea, ya que disminuiría las células infectadas, y prevendría nuevas infecciones. El objetivo de este trabajo fue *i)* generar una vacuna con características profilácticas y terapéuticas basada en capsómeros quiméricos, fusionando una versión modificada de la proteína L1 de VPH16 con distintos fragmentos de E2 de VPH16 o la proteína completa, y *ii)* evaluar su capacidad de inducir respuesta inmune celular citotóxica con actividad terapéutica, en un modelo tumoral murino, conservando los epítomos neutralizantes de L1. Las proteínas quiméricas se produjeron en *Escherichia coli*, y se purificaron por cromatografía de afinidad usando GST (*glutathione S-transferase*). Su estructura fue caracterizada mediante cromatografía de exclusión, centrifugación en gradiente de sacarosa, microscopía electrónica y ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) anti-L1. Todas las proteínas formaron capsómeros y partículas de tamaño heterogéneo. La proteína L1Δ+E2H/NC, que contiene parte del dominio carboxilo terminal y la bisagra de la proteína E2 (aa's 206-307), conservó el principal epítomo neutralizante de L1, H16.V5. Luego, se evaluó su capacidad de inducir respuesta celular citotóxica contra E2 mediante ensayos de citotoxicidad por liberación de <sup>51</sup>Cr, y usando citometría de flujo con carboxyfluorescein succinimidil ester (CFSE) y 7-amino-actinomicin (7AAD). Se mostró que los linfocitos CD8+ de ratones C57BL/6 inmunizados con L1Δ+E2H/NC, fueron capaces de reconocer y lisar células TC-1/E2, que expresaban la proteína E2. Además, esta citotoxicidad específica contra E2 inhibió el crecimiento de tumores en un modelo murino. Finalmente, identificamos un péptido de E2 (aa's 292-301) involucrado en esta respuesta. Concluimos que las proteínas quiméricas producidas en bacterias, son candidatas para una vacuna terapéutica y profiláctica, además de económica, que ayudaría a eliminar lesiones cervicales de bajo grado e infecciones persistentes VPH16+, impidiendo nuevas infecciones.

## 2. ABSTRACT

Development of cervical cancer is associated with persistent infections by high-risk human papillomavirus (HPV). Although current HPV L1-based prophylactic vaccines prevent infection, they do not help to eliminate prevalent infections or lesions. Our aims were (i) to generate a vaccine combining prophylactic and therapeutic properties by producing chimeric capsomers after fusion of the L1 protein to different fragments of E2 from HPV16, and (ii) to evaluate their capacity to generate an anti-tumoral cellular response, while conserving L1 neutralizing epitopes. Chimeric proteins were produced in *Escherichia coli* and purified by glutathione S-transferase (GST)-affinity chromatography. Their structure was characterized using size exclusion chromatography, sucrose gradient centrifugation, electron microscopy and anti-L1 enzyme-linked immunosorbent assay. All chimeric proteins form capsomers and heterogeneous aggregates. One, containing part of the carboxy-terminal domain of E2 and its hinge region (L1Δ+E2H/NC, aa 206-307), conserved the neutralizing epitope H16.V5. We then evaluated the capacity of this chimeric protein to induce a cytotoxic T cell response against HPV16 E2 by two cytotoxicity assays: <sup>51</sup>Cr release assay and flow cytometry using carboxyfluorescein succinimidil ester (CFSE) and 7-amino-actinomycin (7AAD). Splenocytes and CD8+ lymphocytes from C57BL/6 mice immunized with L1Δ+E2H/NC recognized and lysed TC-1/E2 cells, which express and present endogenously processed E2 peptides. Moreover, this E2-specific cytotoxic response inhibited the growth of tumors of TC-1/E2 cells in mice. Finally, we identified an epitope (aa 292-301) of E2 involved in this cytotoxic response. We conclude that the L1Δ+E2H/NC chimeric protein produced in bacteria can be an effective and economically interesting candidate for a combined prophylactic and therapeutic vaccine that could help eliminating HPV16-positive low-grade cervical lesions and persistent viral infections, thus preventing the development of lesions and, at the same time, the establishment of new infections.

### 3. INTRODUCCIÓN

El Cáncer cérvico-uterino (CaCu) sigue siendo un problema de salud pública, ya que en el 2012, a nivel mundial se registraron más de medio millón de nuevos casos; en México hubieron 13,960 nuevos casos, y 11.9% de las muertes por cáncer en mujeres fueron a causa del CaCu (42).

En el mundo, el CaCu ocupa el tercer lugar en incidencia de cáncer en mujeres, después del cáncer de mama y cáncer colorrectal; y el cuarto lugar en mortalidad, después del cáncer de mama, de pulmón y el colorrectal. En México, ocupa el segundo lugar en incidencia y mortalidad por cáncer en mujeres, después del cáncer de mama; mientras que en población adulta general, ocupa el tercer lugar, después del cáncer de mama y de próstata (42).

El factor de riesgo más importante para desarrollar CaCu es la infección persistente con Virus de Papiloma Humano (VPH) de Alto Riesgo (AR) (66,177). Se ha detectado ADN de VPH-AR en prácticamente todos los casos (99.7%) de CaCu (161) . La adquisición de VPH es muy frecuente, especialmente en población joven sexualmente activa. En mujeres sin anormalidades aparentes en tejido de cérvix, la prevalencia es de 11-12 %, encontrándose hasta 42% en algunas regiones (12,111). El tipo más común es el VPH 16, el cual se encuentra en el 22.5% de mujeres infectadas (5).

Existen 3 vacunas profilácticas contra VPH en el mercado, cuya aplicación se espera impacte en los índices de infección, y posteriormente en el desarrollo de lesiones y CaCu. Sin embargo, la ocurrencia de lesiones y CaCu continuará, mientras hayan niñas y mujeres no vacunadas, y sobre todo, mujeres que ya hayan tenido contacto con el virus.

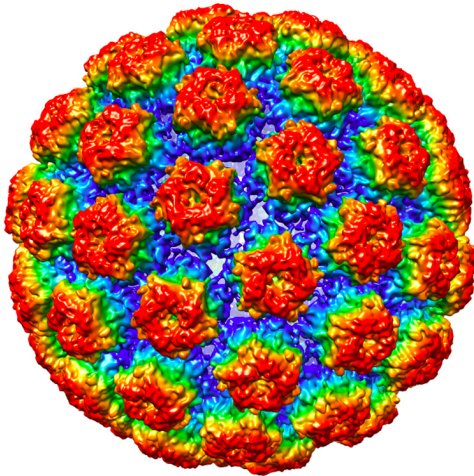
Las vacunas profiláctico-terapéuticas son una opción para cubrir la necesidad de seguir inmunizando para prevenir la infección, y al mismo tiempo, intervenir en aquellas mujeres donde ya se encuentra presente el virus.

En las páginas siguientes ahondaremos sobre el VPH, sus características, particularmente las de sus proteínas L1 y E2, su relación con el desarrollo de CaCu, así como la respuesta inmune contra el virus y contra E2, subrayando la relevancia y potencial de ésta como blanco terapéutico.

## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1. *Virus de Papiloma Humano*

El VPH pertenece a la familia *Papillomaviridae*, es un virus pequeño (diámetro de 55nm) sin envoltura; consiste en una cápside icosaédrica T=7 en cuyo interior encierra un *genoma* de ADN circular de doble cadena de aproximadamente 8 Kb (kilobases). La cápside está formada por 360 moléculas L1, arregladas en 72 capsómeros, cada uno integrado por cinco monómeros de L1 (Figura 1); además, cuenta con un número indeterminado, y menor que 72, de proteínas L2 (13).



**Figura 1. Cápside viral.** Reconstrucción de la crio-electroscopía de una cápside de L1 de VPH16 madura. Tomada de Cardone G, *et al.*, 2014 (15).

### **Clasificación**

Al 2016, el *International Human Papillomavirus Reference Center*, establecido en 1985 en el *German Cancer Research Center (DKFZ)* en Heidelberg, Alemania, y actualmente en el *Karolinska Institutet* en Estocolmo, Suecia.

tiene registrados 201 tipos de VPH, más de 150 de los cuales han sido completamente secuenciados (177); y aproximadamente 40 de ellos infectan el tracto genital (67).

Los Virus de papiloma humano se clasifican filogenéticamente en cinco géneros que se designan con las letras griegas Alfa, Beta, Gamma, Mu y Nu, seguidas de un número que indica la especie. El *género Alfa* se divide en virus *cutáneos* y *mucosos*, de acuerdo al tipo de epitelio que infectan; y los *mucosos* se clasifican de acuerdo a su oncogenicidad en tipos *de alto* y *bajo riesgo* (Tabla 1).

Luego, los distintos tipos (genotipos) son determinados de acuerdo a la secuencia de ADN (y no como serotipos) del gen L1, donde la diferencia debe ser de al menos 10% (3); y entre subespecies, 2-20% (sólo 3-4 tipos tienen subespecies); los tipos a su vez, pueden dividirse en variantes, cuando difieren en menos de 2% en las regiones conservadas y menos de 5% en las regiones menos conservadas (2).

Los virus llamados *mucosos*, infectan el tracto genital, anal y epitelios en cabeza y cuello. En el cuello cérvico-uterino, los VPHs de *alto riesgo* u oncogénicos ocasionan lesiones intraepiteliales y cáncer. Los tipos 16 y 18 se encuentran en, aproximadamente, el 60% y 10% de los casos de CaCu, respectivamente (134,148). El cáncer de vulva, vagina, pene, ano y zona orofaríngea (incluyendo orofaringe, cavidad oral y lengua), también están relacionados con VPH de alto riesgo, especialmente el VPH 16 (39,148).

Entre los VPHs mucosos de *bajo riesgo*, los tipos 6 y 11 son los más frecuentes, ocasionando el 90% de las verrugas genitales (*Condyloma acuminatum*), Papilomatosis Respiratoria Recurrente, así como el 20% de las lesiones intraepiteliales de bajo grado en cérvix. Excepcionalmente, se han encontrado en cáncer anal, vulvar y cervical (39).

Por su parte, los virus *cutáneos* son, en general, de bajo riesgo; infectan piel, ocasionando verrugas comunes en niños en edad escolar; los tipos más frecuentes son HPV1, HPV2, HPV4 y HPV27 (54). Ocasionalmente, se encuentran cáncer de piel (10).

**Tabla 1. Clasificación de los tipos de VPH según su oncogenicidad**

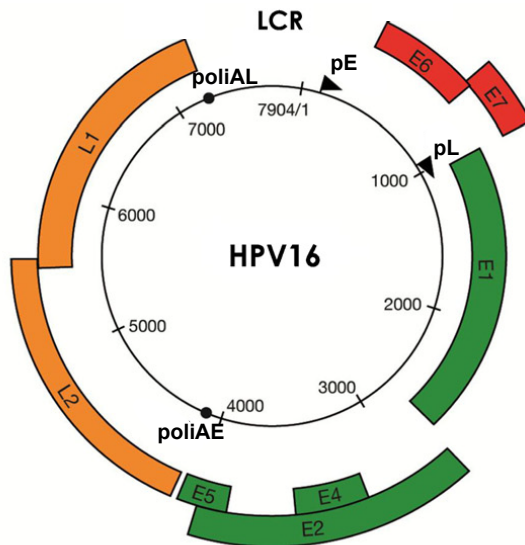
Clasificación	Tipo de VPH
Alto riesgo	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59
Bajo riesgo (mucosa)	6, 11, 40, 42, 43, 44, 81, 13, 74, 81, 91, 7, 32

Muñoz N, *et al.* 2003 (113); IARC, 2011 (66).

### **Genoma**

El genoma de VPH está integrado por tres regiones (Figura 2): la LCR (*Long Control Region*), una región no codificante de 400-1000 pares de bases (pb), donde se ubican el origen de replicación, el promotor temprano (pE) p97, sitios de unión para factores de transcripción virales y celulares, y secuencias de control post-

transcripcional; la región tardía (*Late*, L) con los genes L1 y L2, que codifican las proteínas de la cápside viral; y la región temprana (*Early*, E), con los genes E1, E2, E1^E4, E5, E6 y E7. El genoma contiene también un promotor tardío (pL) p670, y dos sitios de poliadenilación temprano (poli-AE) y tardío (poli-AL) (37).



**Figura 2. Esquema del genoma de VPH16.** Se ilustran las regiones del genoma: la región temprana (con los genes E1, E2, E3, E4, E5, E6 y E7), la región tardía (con los genes L1 y L2), y la LCR (región larga de control); así como los promotores temprano (pE) y tardío (pL), y los sitios de poliadenilación temprano (poliAE) y tardío (poliAL). Doorbar J, *et al.*, 2012 (37).

Las proteínas E1, E2, L1 y L2, se consideran centrales (*core*), ya que están presentes en todos los tipos virales, aparecieron temprano en la evolución del virus, y su secuencia y función son conservadas. Las proteínas E5, E6 y E7 se consideran proteínas accesorias; evolucionaron para adaptarse a cada nicho epitelial específico; su secuencia y función son divergentes entre los distintos tipos virales; y, en general, tienen que ver con la modificación del ambiente celular para llevar a cabo el ciclo viral, lo cual repercute en su virulencia y patogenicidad. E1^E4 también está presente en casi todos los tipos virales, al igual que las proteínas *core*, sin embargo, su secuencia y función son divergentes (39).

## **Proteínas tempranas**

### **Proteína E1**

Es una DNA helicasa dependiente de ATP específica para la replicación del genoma viral. Dímeros de E2 se unen a sus sitios de unión en la LCR viral, y guían a E1 al origen de replicación, el cual consiste de 3 sitios (en el género Alfa) de unión de E2, una región palindrómica de unión de E1 y una secuencia rica en A/T; se

forma el hexámero que constituye la helicasa, ésta abre una horquilla en el DNA viral, y se ensambla la maquinaria de replicación con factores celulares (1).

### ***Proteína E5***

Es una proteína transmembranal con el extremo carboxilo citoplásmico. Es considerada oncogénica, ya que participa en la evasión de la respuesta inmune disminuyendo la presentación en superficie de MHC I y reprimiendo genes de respuesta a interferón. También colabora indirectamente en la fase de amplificación del genoma, estabilizando en membrana el receptor de factor de crecimiento epidermal y promoviendo la acumulación de E1 en núcleo (31).

### ***Proteína E1^E4***

Tiene altos niveles de expresión en células diferenciadas con producción de viriones. Favorece indirectamente la fase de amplificación, colaborando en el arresto del ciclo celular en G2, y favoreciendo la liberación de viriones, esto a través del debilitamiento de la membrana celular y la desestabilización de sus filamentos de queratina (34).

### ***Proteína E6***

Una de las características más importantes de la proteína E6 de VPH-AR es la inhibición de la apoptosis. También inhibe la diferenciación de queratinocitos, el arresto celular inducido por daño al DNA, y la respuesta a interferón. Se une a la proteína p53, induciendo su ubiquitinación por la ubiquitin ligasa celular E6AP, lo que la lleva a degradación en el proteasoma. Promueve el mantenimiento de la integridad de los telómeros. Un dominio de unión al motivo PDZ en su extremo carboxilo terminal (sólo en VPH-AR) le permite unirse y degradar proteínas celulares involucradas en regulación de la adhesión celular, polaridad y diferenciación (144).

### ***Proteína E7***

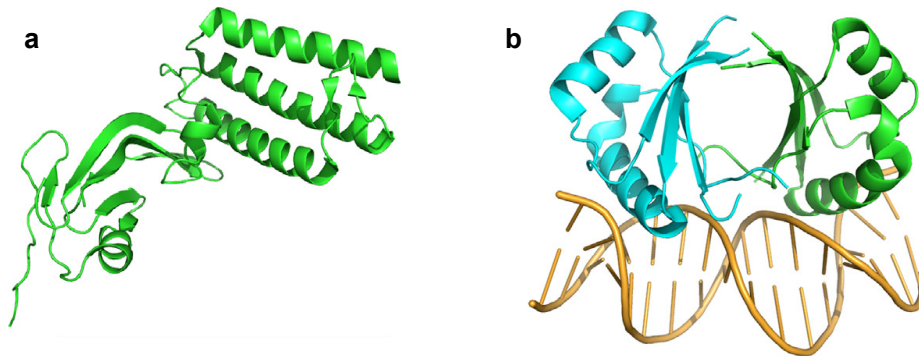
En los VPH-AR, se une y envía a degradación a las proteínas pRb p105 y p130, lo que permite la entrada en ciclo fase S de las células en la capa basal del epitelio estratificado del cérvix, y en capas intermedias, respectivamente. También favorece el ciclo celular a través de cambios epigenéticos en el genoma celular. E7



de VPH de bajo riesgo no degrada p105, pero sí a p130. E7 de VPH-AR promueve la inestabilidad genómica celular, al interferir con el ciclo del centrosoma en las células basales en proliferación. Además, inhibe la respuesta inmune bloqueando la respuesta a interferón (131).

### **Proteína E2**

E2 es una proteína de 43 KDa, con 365 aminoácidos (aa's) organizados en tres dominios. El dominio amino-terminal o de transactivación participa en la activación y represión de la transcripción, es muy conservado y está formado por dos subdominios. Los primeros 92 residuos de aminoácidos constituyen el subdominio N1, y forman tres  $\alpha$ -hélices anti-paralelas. El subdominio N2, que abarca los aa's 110-201 del extremo carboxilo-terminal, está constituido por hojas- $\beta$  anti-paralelas. Los aa's 93-109 que conectan a N1 con N2 se conocen como *fulcrum*, y forman dos hélices de dos vueltas (58,102) (Figura 3a).



**Figura 3. Estructura de los dominios de la proteína E2 de VPH 16. (a)** Dominio amino-terminal, de transactivación. **(b)** Dominio carboxilo-terminal, de dimerización y unión al ADN; se presenta el dímero en contacto con el ADN. McBride AA, *et al.*, 2013 (102).

El dominio de unión al DNA y dimerización de E2 de VPH 16, está constituido por los 86 aa's del extremo carboxilo terminal. Al dimerizarse, forman un barril altamente estable, con interior hidrofóbico, donde cada monómero contribuye con una hoja- $\beta$  conformada por cuatro hebras anti-paralelas, unidas mediante puentes de hidrógeno; cada monómero tiene, además, dos hélices  $\alpha$  (Figura 3b). Los residuos de la interfase y de la hélice  $\alpha$ 1 son muy conservados. Las hélices  $\alpha$ 1 del dímero conforman la superficie de contacto con secuencias consenso específicas,

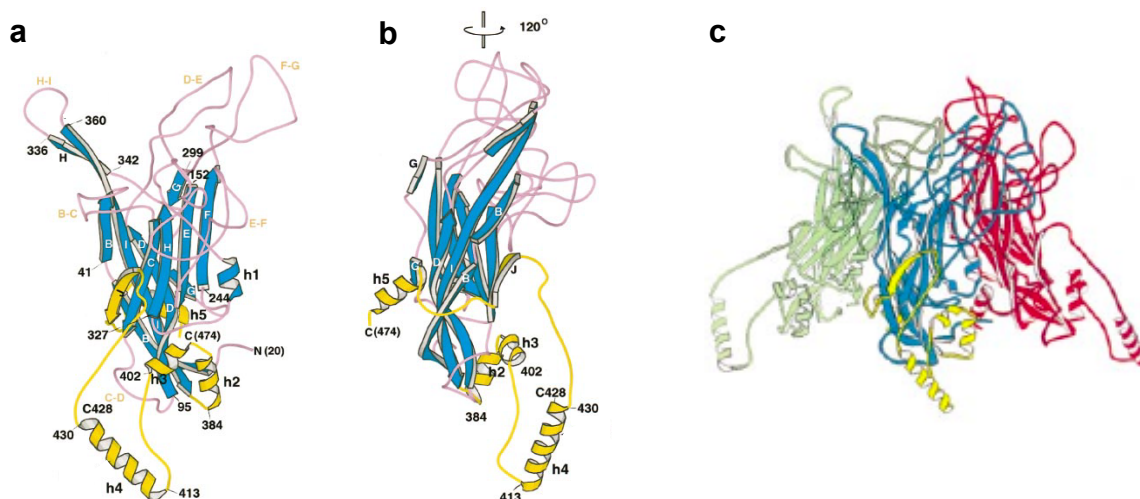
de aproximadamente 12 pb (ACCGN<sub>4</sub>CGGT ó ACCN<sub>6</sub>GGT), que se encuentran principalmente en la LCR del DNA viral (58,102).

La región de bisagra, de 78 aa's en E2 de HPV 16 (202-279), conecta los dominios N- y C-terminal; es una secuencia flexible, poco conservada, de longitud y secuencia variables entre los distintos géneros de VPH; no es indispensable para la transcripción ni replicación, sin embargo, en algunos tipos de papilomavirus (VPB-1, VPH 11) participa en la regulación de E2, y coadyuva en otras de sus funciones importantes, como la localización intracelular, unión a la cromatina y estabilidad de la proteína; además, se le ha encontrado asociada con factores de *splicing* y diversas proteínas celulares (58,102).

### **Proteínas tardías y estructura del virión**

#### **Proteína L1**

Forma mayoritariamente la cápside viral; tiene una estructura *jelly-roll*  $\beta$ -*sandwich*, con dos hojas- $\beta$  cuerpo central (CHEF Y BIDG) constituidas por las cadenas B1, B2, C, D, E, F, G1, G2, H1, H2, I y J; 5 bucles (BC, DE, EF, FG, HI) en su región apical que conectan las cadenas; una base con 5 hélices  $\alpha$  (h1, h2, h3, h4, h5), y una cola de 30 aa's carboxi-terminal desordenada y flexible (Figura 4) (20).



**Figura 4. Estructura tridimensional de L1.** (a) Monómero L1 de VPH16. La estructura comprende los aminoácidos 20-474, se indican el primero N(20) y el último C(474). Las cadenas  $\beta$  están denotadas con letras B a J; los bucles en la parte superior; y las hélices  $\alpha$  en la parte inferior saliente. (b) Monómero en (a) girado 120°. (c) Pentámero de L1; vista lateral, se muestran sólo los tres monómeros del frente. Chen XS, *et al.*, 2000 (20)

Los monómeros en un capsómero se unen entre sí mediante puentes de hidrógeno. La cadena G de la hoja BIDG de un monómero interactúa con la cadena F de la hoja CHEF del monómero vecino (en el sentido de las manecillas del reloj), antes de regresar al monómero original. En la parte superior del capsómero, cada bucle HI, pasa a través de los bucles del monómero vecino (en sentido contrario a las manecillas del reloj) y contacta el bucle FG del siguiente, estableciéndose 5 puentes en el capsómero (20).

El contacto entre capsómeros en las VLPs T=7 es mediante *invading arm*, según el modelo de Modis. Desde la base de un capsómero se proyecta lateralmente el brazo carboxilo terminal constituido h2, h3, h4, hoja- $\beta$  J y h5, que invade el cuerpo central de otro monómero en el capsómero vecino. Cada capsómero establece contacto con 5 ó 6 capsómeros a su alrededor, según sea pentavalente ó hexavalente (107).

Cuando se ensamblan VLPs pequeños (T=1), el único contacto es mediante las hélices h2, h3 y h4, que se proyectan lateralmente, contactando mediante interacciones hidrofóbicas con las correspondientes hélices del capsómero vecino; luego, la hoja- $\beta$  J y h5 retornan al capsómero original (20). En el VLP pequeño, los primeros 20 aa's en el extremo amino-terminal de L1, son desordenados y flexibles (19); sin embargo, en el VLP T=7, Modis propone que están estructurados y se insertan en los espacios interpentaméricos (107). En los VLPs T=7, además se establecen enlaces disulfuro entre la cisteína C428 del extremo carboxilo del capsómero que invade y la cisteína C175 del bucle EF del capsómero invadido (91,136).

### ***La proteína L2***

Es la proteína minoritaria de la cápside viral; consta de 500 aa's. Tiene motivos de unión a L1, con la que se cree hace interacciones hidrofóbicas, y en el virión se le ha encontrado en proporción 1:5 (L2:L1), aunque suele ser menor. No se conoce exactamente su distribución en la cápside, pero hay consenso en que es principalmente interna, con una parte expuesta en la superficie, ya que sí se generan anticuerpos contra ella. Se ha visto que se integra a la cápside durante su formación, y no después. *In vitro*, se han detectado dominios de unión a ADN,

constituidos por aminoácidos cargados positivamente, en sus extremos amino y carboxilo, mediante los que puede establecer interacciones iónicas (162).

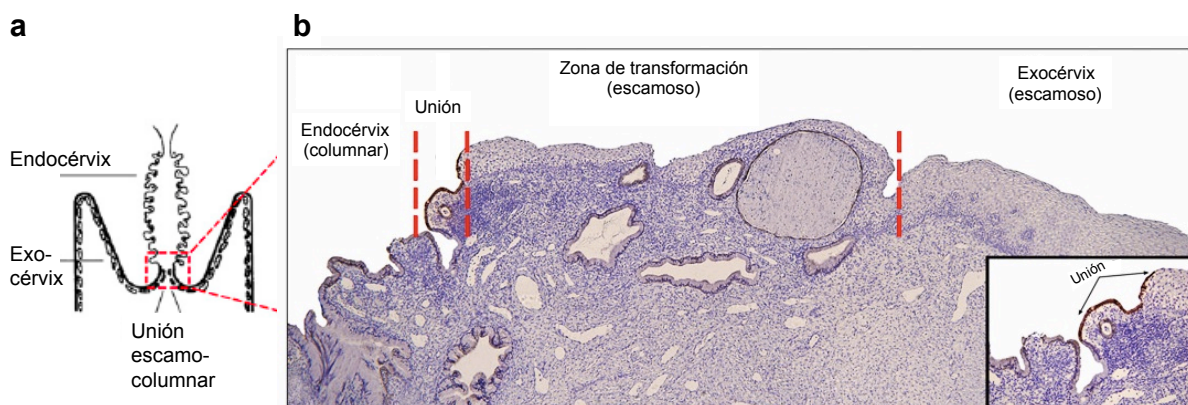
L2 se expresa en capas superiores a superficiales del epitelio con infección productiva. Tiene funciones importantes en el ciclo viral: durante el establecimiento de la infección en la entrada del virus a la célula, en el tráfico en vesículas a través del citoplasma, en la salida del genoma de las vesículas y la entrada de éste al núcleo; así como en el empaquetamiento de viriones (162).

## 4.2. Ciclo viral y cáncer cérvico-uterino

### Entrada del virus

En general, los distintos tipos de VPH en el epitelio cérvico-uterino, siguen un ciclo similar a través del epitelio. El cuello uterino o cérvix, tiene dos tipos de epitelio, el exocervical que es estratificado con células escamosas, y el endocervical, que es columnar mucoso constituido por una sola capa de células cilíndricas; la transición entre éstos es la zona de transformación; y el punto donde contactan las células escamosas con las columnares, es llamado unión escamo-columnar (Figura 5). Las células de la unión escamo-columnar (células SCJ) tienen forma cuboidal, expresan los marcadores Krt7, AGR2, CD63, MMP7 y GDA (61), y también forman una sola capa que es contigua a las células basales del epitelio escamoso. Bajo la membrana basal se encuentra el estroma o dermis.

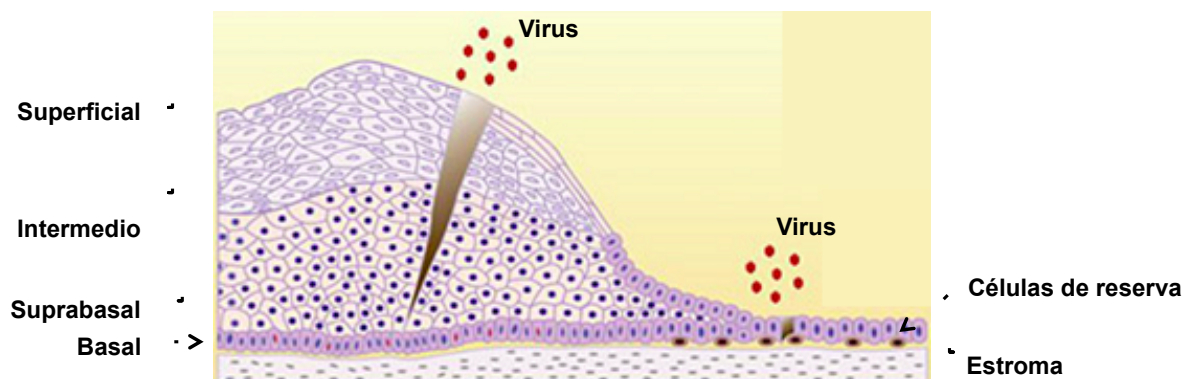
En el epitelio escamoso pueden observarse distintos estratos: basal,



**Figura 5. Cuello cérvico-uterino humano. (a)** Esquema de la anatomía del cérvix. **(b)** Histología del cérvix adulto. Modificada de Herfs M, *et al.*, 2012 (61).

suprabasal, intermedio y superficial. Bajo y/o entre las células basales, se encuentran las células de reserva, que les dan origen, tienen una tasa de proliferación menor y también son susceptibles de infección (Figura 6).

La infección por VPH requiere células con capacidad de dividirse, por lo que ocurre en las basales o en las de reserva que se encuentran en la zona de transformación o en la unión escamocolumnar. En el epitelio escamoso, el virus ingresa a través de una herida (142), mientras que en las células SCJ lo hace directamente, ya que están expuestas (61).



**Figura 6. Estratos de los epitelios escamoso y columnar del cérvix.** Se muestran los posibles sitios de entrada del virus. Modificada de Doorbar J, *et al.*, 2012 (33).

El viri6n se une a la membrana basal del epitelio a trav6s de HSPG (Heparan Sulfato Proteoglicano), y, probablemente, laminina-332 (antes laminina-5). La isomerasa ciclofilina B genera cambios conformacionales en el viri6n, que exponen un sitio de corte para la furina-convertasa en el extremo amino-terminal de L2, corte que m6s tarde tambi6n servir6 a L2 para salir de los endosomas. Luego, el virus se une al queratinocito a trav6s de un segundo receptor del cual no se tiene certeza, pero se han propuesto: la prote6na transmembranal  $\alpha 6\beta 4$  integrina, heterotetr6meros de anexina A2, as6 como tetraspanina CD151 que se une a integrinas (25).

La internalizaci6n del viri6n es mediante endocitosis; la polimerizaci6n de actina separa la ves6cula de la membrana plasm6tica, proceso que involucra mol6culas ricas en microdominios de tetraspanina (CD151), es independiente de

clatrina, caveolina y parches lipídicos (*lipid-rafts*) (141), aunque se han descrito mecanismos distintos para distintos tipos de VPH y células.

Tras la endocitosis, el virus es transportado a través de endosomas tempranos, multivesciculares, y tardíos; el VPH evita ir tempranamente a degradación en lisosomas mediante la unión de la proteína L2 a la proteína SNX17 (*Sortin Nexin 17*), la cual es importante en el reciclaje de endosomas; en los endosomas tardíos, la isomerasa ciclofilina B (CyPB) ayuda a desensamblar el virión, separando al genoma viral en complejo con L2 a otra vesícula (162); L1 va a degradación en lisosomas, y el complejo ADN/L2 va al aparato de Golgi, y posteriormente al núcleo celular, donde se dirige al ND10 (*Nucleo domain 10*) para llevar a cabo su transcripción y replicación, y establecer la infección, proceso que es favorecido por la mitosis (25).

### ***Infección, lesiones intraepiteliales y CaCu***

Para establecer la infección, el virus debe llevar a cabo la replicación inicial de su genoma, para lo que son indispensables las proteínas E1 y E2 (154). En esta fase, la transcripción va del pE al sitio poli-AE (37). Se ha propuesto que este proceso requiere que la célula entre en mitosis (121), la cual puede ser promovida por la herida en el epitelio. En esta fase, la proliferación celular ocurre de forma simétrica para repoblar la capa basal (35).

La siguiente fase es de mantenimiento de un número estable de episomas virales en las células de la capa basal; al dividirse éstas, el genoma viral debe replicarse y repartirse equitativamente entre las hijas. Posteriormente, con la división asimétrica, la célula hija sube a la capa suprabasal e inicia su recorrido hacia la superficie del epitelio, mientras se diferencia (102).

Luego, en el caso de una *infección productiva por VPH de bajo riesgo*, cuando las células en diferenciación no proliferativas alcanzan los estratos intermedios del epitelio escamoso, se lleva a cabo la amplificación del genoma viral; para esto, las células deben entrar nuevamente en ciclo celular. E7 se une a la proteína Rb p130, que controla la entrada en ciclo en estratos intermedios, con lo que los factores transcripcionales E2F son liberados para activar la expresión de proteínas involucradas con ciclo celular. La célula entra en una fase pseudo-S en la

que pueden detectarse marcadores de diferenciación a la vez que marcadores de proliferación. El ambiente permite la transcripción a partir del pL (dependiente de diferenciación) al poli-AE, con lo que se expresan abundantemente E1 y E2, las cuales son requeridas en la amplificación exponencial del genoma, además de E1<sup>E4</sup> y E5, que cooperan indirectamente modificando el ambiente. El transcrito del pE al poli-AE (que incluye E6 y E7) continúa produciéndose (37). Las células continúan e intensifican la amplificación de episomas en la fase G2, pero no completan el ciclo, no proliferan.

Cuando se trata de una *infección productiva por VPH de alto riesgo (NIC1)*, E7 se asocia y degrada a Rb p105 y p107, desde los estratos basales/parabasales, induciendo la entrada en ciclo y proliferación; mientras que E6 de VPH-AR, a diferencia de a E6 de VPH-BR, induce la ubiquitinación y degradación de p53, con lo que se evita la apoptosis. Las células continúan proliferando mientras avanzan a las capas intermedias, donde comienzan su diferenciación; sin embargo, en este estrato E7 degrada a Rb p130, y E6 induce la degradación de p53; la diferenciación se inhibe y las células re-entran en fase pseudo-S para llevar a cabo la amplificación del genoma, la cual continúa más intensamente en la fase G2, con la sobre-expresión de E1 y E2 (37,125).

En los estratos superiores, la célula sale de ciclo, ocurre un *splicing* que lleva a transcribir del pE al poli-AL, con lo que se expresan E1<sup>E4</sup>, L1 y L2 (36). L2 y E2 van al sitio replicación del genoma viral en el núcleo, luego ocurre la sobreexpresión de L1, para llevar a cabo el ensamblaje de viriones en el núcleo. En cultivos celulares se ha visto que los viriones pueden producirse en ausencia de L2, sin embargo, su presencia aumenta 10 veces la cantidad de ADN encapsulado, y 100 veces la infectividad del virión (65).

Finalmente, los viriones empiezan su maduración en los queratinocitos de la capa más superficial, los cuales van perdiendo integridad; el ambiente celular es cada vez más oxidante, lo que favorece la formación gradual de enlaces disulfuro entre las cisteínas de proteínas L1 vecinas, estabilizando la cápside viral (9). La proteína E1<sup>E4</sup> favorece el proceso de liberación, y las células son descamadas. Los viriones liberados son infecciosos, pero inmaduros y frágiles, es hasta después

de algunas horas en el ambiente externo, que completan su maduración con la formación de todos sus puentes de disulfuro, volviéndose más rígidos y resistentes (15).

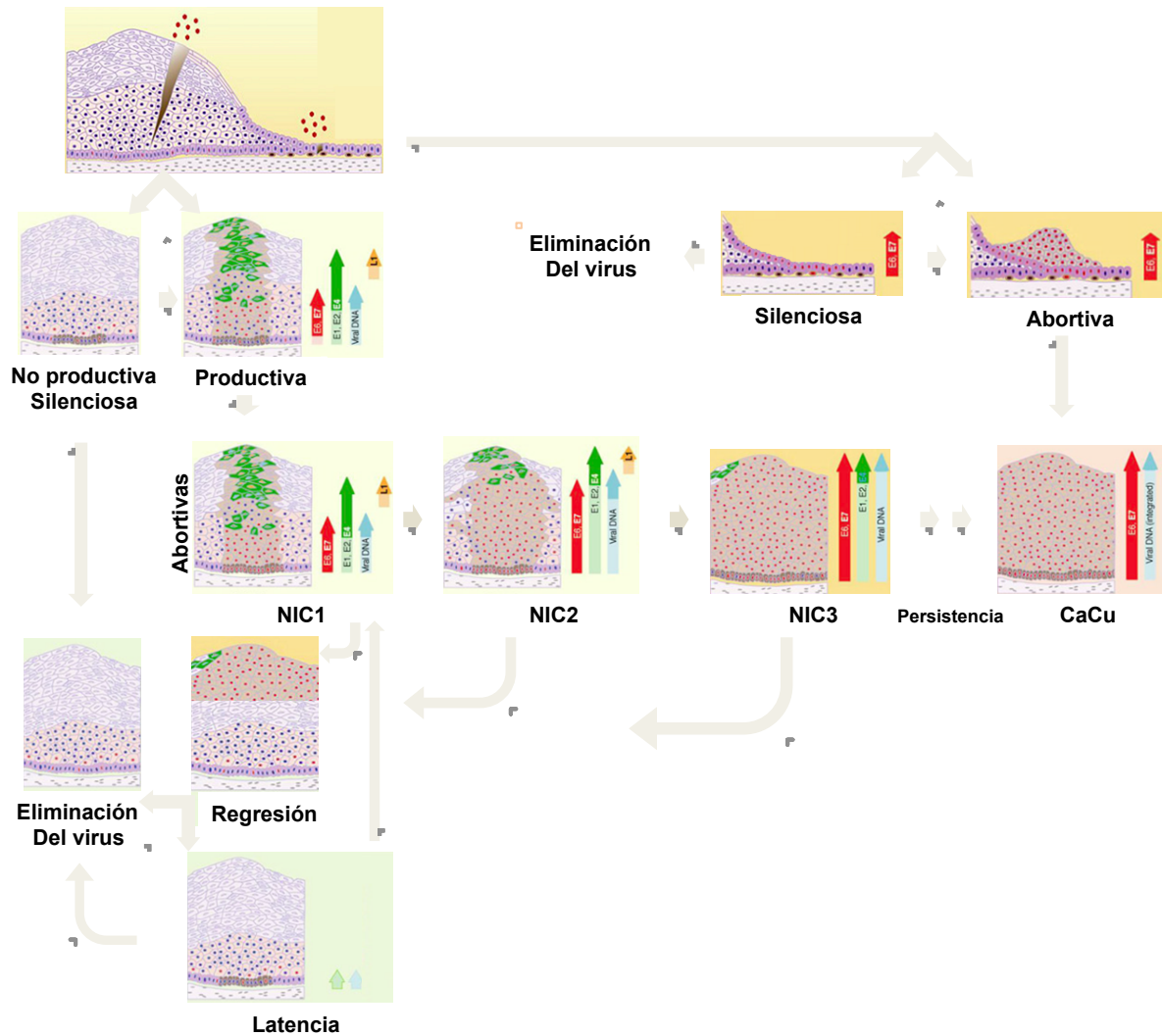
Cuando una infección productiva *persiste*, pueden ocurrir mutaciones, desregularse el ciclo del centrosoma llevando a la segregación anormal de los cromosomas y aneuploidía, perderse los puntos de control del ciclo celular, de manera que se acumulan alteraciones y prevalece la inestabilidad genómica. Las células son forzadas a proliferar más allá de los estratos suprabasales, su diferenciación es inhibida y pierden la inhibición por contacto (6,68). En estas condiciones, el ciclo viral ya no puede completarse, por lo que las infecciones son llamadas *abortivas*, las cuales constituyen las *neoplasias intraepiteliales cervicales* (NIC) (Figura 7).

Las NICs se clasifican en grados 1, 2 y 3, de acuerdo con la proporción de epitelio estratificado que está ocupado por células proliferativas. En NIC1, tales células abarcan el primer tercio del epitelio; en NIC2, aproximadamente dos tercios, y en NIC3, casi todo el epitelio; cuando éste está completamente poblado por células proliferativas, se le llama *carcinoma in situ* o *cáncer cérvico-uterino* (74).

La progresión de la neoplasia es promovida por el aumento de la expresión de E6 y E7, con lo que se acumulan más alteraciones genéticas; en la mayoría de los casos, el genoma viral se integra, lo que desregula la expresión de los oncogenes al perderse E2 (166); otros factores, como las hormonas (47), y la metilación de la LCR y genes celulares, también contribuyen en el proceso de malignización (156).

En un escenario muy distinto, tras la entrada del virus al epitelio escamoso, una infección puede permanecer asintomática, *silenciosa*, lo cual puede deberse a un bajo número de copias virales, o a que las células infectadas no estaban en condiciones de llevar a cabo el ciclo viral. A partir de esto, el virus puede ser eliminado, o activarse más tarde.





**Figura 7. Infección por Virus de Papiloma Humano, su ciclo viral y consecuencias.** La infección comienza con el acceso del virus a la membrana basal del epitelio del cérvix; cuando es en epitelio escamoso, se puede originar una infección silenciosa o productiva; la primera puede ser eliminada o pasar a ser productiva. Las infecciones productivas pueden convertirse en abortivas, generando neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) de grados crecientes (1, 2 y 3), que al persistir pueden evolucionar a cáncer cérvico uterino (CaCu). La respuesta inmune puede ocasionar la regresión de las NICs, mayormente en las de menor grado; ésto puede llevar a la eliminación completa de la infección o a latencia, la cual puede reactivarse generando nuevamente NICs que pueden progresar a CaCu. Por otro lado, si el virus entra en células de la unión escamo-columnar, se cree que permanece silencioso, y que eventualmente puede eliminarse por el sistema inmune, o activarse como una infección abortiva, cuyo siguiente paso sería el CaCu. Las flechas indican las principales proteínas que se expresan en la sección del epitelio que flanquean. En el tejido, los núcleos rojos son células en proliferación. Modificada de Doorbar J, *et al.*, 2012 (33).

Por otro lado, Herfs *et al.* (2012) proponen que si la entrada del virus ocurre en células SCJ, hay mayor posibilidad de desarrollar una neoplasia, debido a que este epitelio no es capaz de mantener la expresión ordenada de los genes virales; y en cambio, se genera una infección que es abortiva desde el principio, cuyo siguiente estadio puede ser el CaCu (61). Tras la entrada del virus, también existe la posibilidad de que no se induzca proliferación celular, la infección permanezca silenciosa, y eventualmente sea eliminada por el sistema inmune (Figura 7).

En los casos en que se dan las infecciones productivas (en epitelio escamoso), comúnmente son revertidas por el sistema inmune hasta *limpiar la infección*. Sin embargo, se ha visto que las infecciones pueden no eliminarse completamente, sino permanecer *latentes*, con ADN viral en las células de la capa basal, sin alteraciones evidentes ni producción de viriones (Figura 7). En epitelio donde hubo una lesión, pero en ese momento se encontraba asintomático, el grupo del Dr. Maglennon GA (2011) detectó, mediante microdissección láser, ADN viral específicamente y sólo en células de la capa basal, así como transcritos tempranos de E1, E2, E6 y E7 (99). Entre otros factores como la vigilancia por el sistema inmune (97) y la metilación de los episomas virales (156), la duración de la latencia parece depender en gran medida de la longevidad de tales células. Por ejemplo, con el modelo de ROPV (*Rabbit Oral Papillomavirus*) se detectó ADN viral un año después de la regresión (99,176).

La infección latente puede eliminarse después de un tiempo, o *reactivarse*. La inmunosupresión, los cambios hormonales, factores de crecimiento y/o citocinas, irritación mecánica crónica, heridas, luz UV (que en modelos experimentales induce respuesta a daño al ADN), son posibles inductores de la proliferación celular en la reactivación (98).

### **4.3. E2 en el ciclo viral**

E2 es crucial en el ciclo del VPH. Es el factor de transcripción viral, es importante en la replicación del genoma, en el control del número de copias, en la segregación de episomas virales en células en división, y tiene participación en el

empaquetamiento del genoma en viriones. Para todo ello interactúa con proteínas y DNA, virales y celulares.

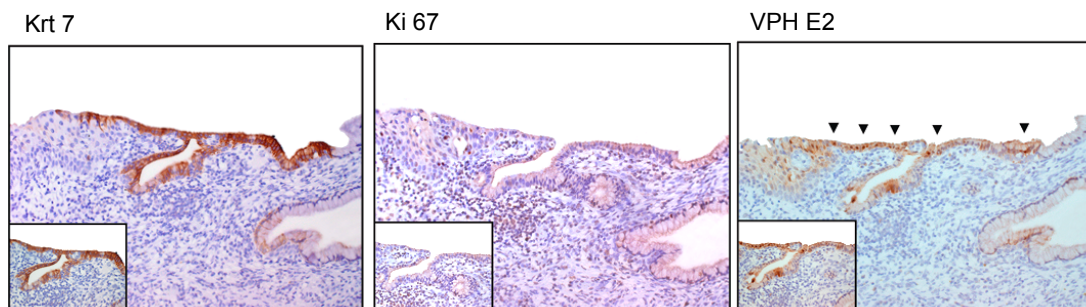
Como factor de transcripción, actúa reclutando factores celulares para ensamblar el aparato de transcripción sobre la LCR del genoma viral. Controla la transcripción de E6 y E7, y al integrarse el episoma a los cromosomas celulares, el gen E2 se pierde, permitiendo la sobre-expresión de los oncogenes (102).

Durante el ciclo viral el genoma se replica, con la participación de E2, en tres distintos momentos: la replicación inicial, la de mantenimiento y la vegetativa. La primera ocurre tras la entrada del virus a la célula hospedera en la capa basal, donde el episoma es replicado un número limitado de veces. En papiloma oral se ha reportado que se establecen 50-100 copias por célula basal, y 200 copias en líneas celulares derivadas de lesiones de cérvix (99). La replicación se lleva a cabo en *foci* o centros de replicación formados en el núcleo, donde E2 dirige a E1 al origen de replicación y aumenta su especificidad por el mismo. Los *foci* previenen que la helicasa E1 corte indiscriminadamente el ADN celular para evitar que se active la respuesta celular a daño severo al ADN, que podría llevar a apoptosis; en cambio, la célula activa la vía de respuesta a estrés en la replicación, lo que recluta factores de reparación que son usados por el virus (126). El proceso es dependiente de E1 y E2, siendo éstas las únicas proteínas virales que participan (154). La replicación inicia en la fase S del ciclo celular con un mecanismo bidireccional que requiere del origen de replicación, luego se suma el mecanismo de recombinación homóloga; la replicación continúa sólo con la última en la fase G2 (125).

La replicación de mantenimiento ocurre en las células basales que entran en división. El genoma viral extra-cromosómico se replica y distribuye en las células hijas para mantener un número estable de copias por célula. Se lleva a cabo sólo durante la fase S, en sincronía con la replicación del ADN celular. La proteína E1 es dispensable (40), pero E2 se requiere para la correcta segregación y equitativa distribución de los episomas durante la mitosis (125). E2 acarrea los episomas uniéndose a ellos a través de los sitios de unión de E2 en la LCR, y al mismo tiempo se une a proteínas celulares como ChIR1 y Brd4 para asirse a los cromosomas celulares y/o husos mitóticos (24,101,117).

La replicación vegetativa, ocurre en las células diferenciadas de las capas intermedias y superiores del epitelio estratificado, que han re-entrado en fase pseudo-S inducidas por el VPH. El número de copias del genoma viral aumenta exponencialmente 2 a 5-log (99). E1 y E2 son necesarias en esta fase de replicación, que ocurre mediante recombinación homóloga tras la activación de la respuesta de reparación del daño al ADN celular vía (109). Mediante inmunohistoquímica, se ha detectado la expresión abundante de E2 en las capas intermedias y superiores durante una infección productiva como NIC1; en NIC2, E2 se observa en capas superiores; y en NIC3 ya no se observa, o es escasa (174).

En infecciones silenciosas, también se ha encontrado proteína E2 y ADN viral en células de la unión escamo-columnar. En mujeres con historial de infección/lesión por VPH, pero que ya no presentan lesión (Ki 67 negativas), se encontró presencia de ADN de VPH, y expresión de la proteína E2 (detectada mediante inmunohistoquímica), específicamente en las células SCJ (marcador Krt 7 positivas). Según el modelo propuesto por Mirkovic, *et al.* (2015), en lesiones originadas en SCJ, las células infectadas aún sin cambios morfológicos, inician expresando E2, y posteriormente comienza la proliferación celular, que es el punto de partida del desarrollo de lesiones (Figura 8) (105).



**Figura 8. Expresión de E2 en células de la unión escamo-columnar.** Células SCJ de cérvix humano con historial de infección/lesión por VPH, pero sin lesión actual. Se localizan las células SCJ mediante inmunohistoquímica usando el marcador Krt 7 (izq.). El epitelio tiene apariencia normal; no expresa Ki 67, no hay hiperproliferación (centro). Hay expresión de E2 en las células SCJ (der.) Modificada de Mirkovic, *et al.* 2015 (105).

Por otro lado, se ha observado que cuando existe una lesión intraepitelial en epitelio escamoso, las células SCJ contiguas aparentemente normales, también presentan ADN viral y expresan E2 (174).

Lo anterior ha señalado a las células SCJ como uno de los sitios preferentes de inicio de la infección, y como potencial reservorio de ADN viral en las infecciones latentes (61). Además, al detectarse más células con marcadores de SCJ en lesiones de alto grado y CaCu que en lesiones de menor grado o asociadas a VPHs no carcinogénicos, se sugiere que las lesiones originadas en SCJ son más proclives a malignización (100).

Dado que E2 está presente en las células SCJ de mujeres sin lesión aparente, así como en estadios tempranos del desarrollo de lesiones intraepiteliales (NIC1, NIC2), su expresión ha sido señalada como la manifestación más temprana de la infección, un marcador para la detección de la infección por VPH que puede observarse aún antes de la aparición de cambios morfológicos (174).

Todo lo anterior apunta a la proteína E2 como un blanco terapéutico muy atractivo para el desarrollo de vacunas, que atacarían células donde el CaCu puede o está germinando.

#### **4.4. Respuesta inmune contra VPH**

El sistema inmune tiene un papel importante en el control de la infección por VPH y sus consecuencias. Más de la mitad de las mujeres jóvenes que inician vida sexual, tienen contacto con el virus en los primeros 2-3 años (64,111); sin embargo, el 80-90% limpia la infección sin haber generado síntomas (64,73,111). De las que desarrollan LSIL, en un año, sólo una parte progresa (24%) a HSIL (170), y de éstas, se ha reportado que pueden regresar hasta 75% de regresión (9). Por otro lado, cuando la sistema inmune está comprometido, como en pacientes inmunosuprimidos por trasplantes (137) o por infección con VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana), la incidencia de infecciones por VPH y su progresión, son mayores (110).

Para entender la respuesta inmune ante el virus de papiloma, se han utilizado diversos modelos animales. En un modelo de conejo-CRPV (*Cottontail Rabbit*

*Papillomavirus*), la regresión y eliminación del virus se encontró relacionada con la infiltración de linfocitos T CD8+ y macrófagos en las capas basal y suprabasales del epitelio, y en el estroma subyacente (147). En perros, la regresión correlacionó con infiltrados de linfocitos CD4+ (114). Wilgenburg B (2005) y su grupo caracterizaron la respuesta inmune durante la regresión de papilomas orales en conejos; en los no-regresores observaron producción de viriones (L1+ y L2+) y mínima infiltración de células del sistema inmune; mientras que en papilomas en regresión observaron muy baja detección de L1+ y L2+, y alta infiltración de células dendríticas (DC) CD11+, seguidas de linfocitos CD3+, CD4+, CD8+, CD25+, así como MHCII+, invadiendo la membrana basal; hacia el final de la regresión, los niveles de células CD+ y MHCII+ disminuyeron, con L1 y L2 negativos (169). Ésto evidencia el papel decisivo que juegan los linfocitos CD4+ y CD8+ en el curso de una lesión.

En pacientes, también se ha visto mayor densidad de macrófagos, y linfocitos T CD4+ y CD8+ infiltrados en las verrugas genitales que regresan respecto a las que no lo hacen (22). Sin embargo, se ha reportado que el VPH puede inhibir la infiltración y activación de monocitos, ya que inhibe la transcripción de MCP-1 (*Monocyte Chemotactic Protein-1*) y MIP $\alpha$ 3 (*Macrophage Inflammatory Protein*) (29).

El epitelio escamoso del canal cérvico-uterino está poblado de células del sistema inmune. En epidermis, se encuentran las DCs de Langerhans (LC), células T vírgenes y de memoria en las capas basal y suprabasal. En dermis, los linfocitos T que predominan, linfocitos B, células NK, NKT, DCs dérmicas Langerina+ y DCs migratorias. Cuando ocurre la infección, la herida a través de la que el virus alcanza la membrana basal, induce inflamación, con lo que concurren neutrófilos, macrófagos y células T (62).

La primera señal de infección por VPH ocurre a través de PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Pattern*). Los queratinocitos, que expresan constitutivamente TLRs 1-6, y 9-10 (87), y pro-IL1b (41), al igual que las DCs, pueden reconocer al virus como PAMP a través de los PRR (*Pattern Recognition Receptors*). El genoma de VPH es reconocido a través de TLRs (*Toll-like Receptors*), RLRs (*Receptor RIG-1-like*) y NLRs (*Nucleotide oligomerization domain-like receptor*); induciendo la expresión de IFNs tipo 1 y citocinas proinflamatorias, y maduración de IL-1b e IL-18.

Los motivos CpG del ADN viral son reconocidos a través de TLR9 (57).

La producción de interferones tipo 1 por los queratinocitos dispara la expresión de múltiples citocinas para las respuestas innata y adaptativa. El VPH, a través de E6/E7 inhiben la producción de IFN $\kappa$ ; E7 inhibe la producción de IFN $\alpha$ , y E6, de IFN $\beta$ . Se ha correlacionado también, la expresión elevada de TLR3, 7, 8, 9 y 2, con la eliminación del virus. Sin embargo, E6 y E7 de VPH-AR inhiben la expresión de distintos receptores, como TLR9, TLR3, RIG-1 y MDA5 (79).

Por otro lado, las células NK que son efectoras citotóxicas de la respuesta innata, detectan la baja en presentación de MHCI en superficie, y liberan TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , granzimas y perforinas; para activarse requieren IFNs tipo 1 y citocinas pro-inflamatorias como IL-12 e IL-18, los cuales serían producidas por los queratinocitos; sin embargo, el VPH inhibe tal producción. En lesiones de bajo grado hay infiltración de NKs en el epitelio estratificado, mientras que en CaCu, que ya ha evadido el sistema inmune, sólo se observan en el estroma (127); además, en CaCu y HSIL, los receptores de activación NKp30 y NKp45 de las NKs están disminuidos, lo cual afecta su citotoxicidad y se correlaciona con progresión (52).

Un mecanismo más de evasión, es la disminución de la molécula de superficie CD1d en los queratinocitos, ocasionada por E5 de VPH16, lo cual inhibe la activación de células NKT, que sólo reconocen antígenos presentados en CD1d (106).

La segunda línea de defensa es la activación de la respuesta adaptativa. Los queratinocitos presentan antígenos virales en MHCI, pero no moléculas co-estimuladoras, por lo que no pueden activar linfocitos T efectoras; en el caso de VPH, las células profesionales presentadoras de antígenos (CPA) que participan, son DCs dérmicas langerina<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup>. Las CPA no son infectadas por VPH, pero llevan a cabo presentación cruzada (*cross-priming*): obtienen los antígenos virales a través de exosomas provenientes de los queratinocitos infectados, viajan a nódulos linfáticos regionales mientras maduran y allí presentan péptidos tumorales en MHCI y II para activar a los linfocitos T CD8<sup>+</sup> vírgenes y T CD4<sup>+</sup> vírgenes, respectivamente. Los linfocitos CD8<sup>+</sup> específicos proliferan, viajan al epitelio infectado para reconocer mediante TCR (Receptor de células T) antígenos virales

presentados en MHC1 por los queratinocitos, y descargar sobre ellos granzimas y perforinas. Los CD4+ se diferencian en linfocitos Th1 o Th2, dependiendo de las citocinas en el ambiente; IL-12 e IFN $\gamma$  llevan a Th1, los cuales producen citocinas como IFN $\gamma$ , IL-2, IL-12 y TNF, que favorecen la activación de la respuesta mediada por células; y en presencia de IL-4 e IL-5, se favorece la diferenciación a Th2, que induce la activación de linfocitos B para la producción de anticuerpos (148).

Una vez eliminadas las células infectadas, abundantes células T de memoria permanecerían en la epidermis, para activarse y expandirse inmediatamente tras un nuevo encuentro con el virus (62). Sin embargo la proteína E7 de VPH-AR interfiere en el reconocimiento inicial de los queratinocitos infectados, ya que reprime la expresión de TAP-1 (*Transporter associated with Antigen Processing 1*), LMP2 (*Low molecular weight protein 2*) y MHC1 (49); y E5 inhibe la expresión de MHC1 y su presentación en superficie, reteniendo la molécula en el aparato de Golgi (14).

La participación de células Th1 es importante en la respuesta antitumoral; se ha reportado que en mujeres sanas y con LSIL, prevalece un perfil de citocinas tipo Th1 (IFN $\gamma$ , IL-2, IL-12, TNF $\alpha$ ), mientras que en HSIL es Th2 (IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1), y en CaCu los linfocitos TCD4+ que predominan son T reguladores (Tregs) (120).

Linfocitos T reguladores (Tregs) infiltrados en el estroma, tienen efectos anti-inflamatorios e inmunosupresores; liberan IL-10, que inhibe la maduración de las DCs; y su presencia correlaciona con la severidad de la lesión, como se vio al comparar HSIL respecto a LSIL (69), y no-regresoras contra regresoras (84).

En los queratinocitos infectados, también está disminuida la expresión de E-caderina, molécula que mantendría la unión con las LC, y de quimiocina MIP3 $\alpha$ , que las atraería; como resultado, la cantidad de éstas en la epidermis disminuye (90); aunque, no se conoce la relación que guardan las LCs epidermales con las DCs estromales langerina+ CD103+, que son estromales.

Las naturaleza del virus en general, favorece la evasión del sistema inmune: el ciclo viral es sólo intraepitelial, no genera viremia, no hay lisis celular, no induce inflamación, la cual es clave en el inicio de la infección, ya que su ausencia puede favorecer la persistencia y progresión. El VPH-AR desregula la señalización a través



de TLRs; inhibe la infiltración y activación de macrófagos y DCs; la presentación en MHC de antígenos por las células infectadas es obstruida, así como su producción de citocinas quimiotácticas y pro-inflamatorias. La infiltración y actividad de los linfocitos T citotóxicos y CD4+ Th1 es disminuida, así como de las DCs; los CD4+ tienden a Th2. Las NKs y NKTs son disfuncionales. Concurren Tregs. La disfuncionalidad del sistema inmune genera un ambiente tolerante donde la infección/lesión puede persistir, y ésto es pre-requisito para la progresión a CaCu (62,149).

#### **4.5. Respuesta inmune contra E2**

Existen diversas evidencias de que la respuesta celular contra E2 es importante en el control de las infecciones y lesiones por VPH-AR.

En un modelo de conejo-CRPV, se correlacionó la regresión de tumores con la respuesta celular contra E2 (146). En otro, indujeron la regresión de papilomas de CRPV, inmunizando con E1 y E2 (145).

En el modelo de perro-COPV (*Canine Oral Papillomavirus*), mostraron a E2 como principal blanco de la respuesta inmune celular natural contra VPH, y que esta respuesta tiene su máximo en el comienzo de la regresión. Por otra parte, al vacunar con E2 acarreado por adenovirus, indujeron respuesta anti-E2 (medida mediante DTH y ELISPOT-IFN $\gamma$ ), y la completa inhibición de papilomas (72,76,146).

En mujeres, también se ha visto una clara diferencia en la respuesta inmune contra E2, como la presencia de linfocitos T (mediante detección de IFN $\lambda$ ) específicos contra E2 en las sanas, mientras que en pacientes con CaCu, fue escasa (27,28). El mismo escenario se ha observado mediante la prueba DTH (*Delayed type hypersensitivity*) tras la administración de péptidos de E2 VPH16: prueba positiva en mujeres sanas, y negativa en mujeres con CaCu (60).

Cuando se comparó la respuesta de linfoproliferación celular específica contra E2 VPH16, en tres grupos de mujeres: persistentes, de reciente resolución y controles sanas, se observó que las que resolvieron su lesión, tuvieron mucha mayor respuesta que el resto (30). En otro estudio realizado con 125 mujeres con

LSIL, el resultado fue en el mismo sentido; se monitorearon durante un año, y se detectó fuerte respuesta celular T específica contra E2 (mediante ELISPOT-IFN $\gamma$ ) en aquellas que regresaron la lesión, no así en las que progresaron (170).

En neoplasia intraepitelial de vulva (VIN) asociada a VPH, también se ha observado respuesta celular Th-1 (IFN $\gamma$ /IL-2) anti-E2 en pacientes, que tras tratamiento tópico o cirugía, eliminaron el virus, y no en las persistentes (71).

Todo lo anterior subraya el potencial de la inducción de respuesta inmune celular contra E2, para el tratamiento o como adyuvante en el tratamiento de lesiones cervicales intraepiteliales.

#### **4.6. Respuesta inmune humoral contra VPH**

La respuesta humoral no tiene implicaciones en la eliminación de las infecciones por VPH. El porcentaje de pacientes con lesión que tienen anticuerpos anti-VLPs de L1 de VPH-16, aumenta con la severidad de la neoplasia, de aproximadamente 25% en LSIL a 60% en CaCu (150).

En 46-59% de las mujeres VPH16+, citológicamente normales, se ha reportado presencia de anticuerpos anti-VLPs (*Virus Like Particles*) de VPH16 (83,157) en sangre. Tras la infección, la seroconversión puede llevarse a cabo dentro de los 8-14 meses siguientes, y permanecer 36 meses o más si hay persistencia, o el nivel inicial de anticuerpos fue alto. (63).

A pesar de la alta prevalencia de seropositividad en mujeres sanas, la presencia de anticuerpos naturales contra VPH16, 18 y 31, no se refleja en menor riesgo de reinfección (159), lo cual puede estar relacionado con títulos insuficientes, que son 50-100 veces menores que los generados mediante vacunación (56,86).

Por otro lado, también se han detectado anticuerpos contra las proteínas tempranas, encontrando mayor porcentaje de seropositividad para E7 y E6 en pacientes con CaCu que con lesión de menor grado y citología normal. En pacientes con CaCu, 43% y 56%, para anti-E7 y anti-E6, respectivamente; y con citología normal, 4.1% y 1.7% (158). Ésto llevó a proponer su presencia como marcador del grado de lesión.

En cuanto a la proteína E2 de VPH 16, se han reportado niveles de anticuerpos IgA altos en controles, menores en NIC, y mínimos en CaCu (129); lo cual puede estar reflejando la visibilidad de la proteína E2 ante el sistema inmune en estadios incipientes o tempranos de la lesión.

#### **4.7. Vacunas profilácticas**

Actualmente, existen en el mercado tres vacunas profilácticas; las cuales consisten en VLPs (*Virus Like Particle*) de L1, partículas parecidas a virus que no contienen el genoma viral ni la proteína L2, no son infecciosas (86). Generalmente, el pico en el título de anticuerpos es máximo en el mes siete después de la primera dosis, seguido de una disminución hacia los meses 18-28, y mantenimiento durante años. Prácticamente 100% de mujeres de distintas edades seroconvierten, y en las de menor edad, los títulos son más elevados (143).

Gardasil® fue aprobada por la FDA USA en junio de 2006, es una vacuna recombinante cuadrivalente indicada para mujeres de 9-26 años; incluye como antígenos la proteína L1 de los tipos 6, 11, 16 y 18. Las proteínas son producidas en *Saccharomyces cerevisiae*. Requieren refrigeración. Cada dosis de 0.5 ml contiene 20 µg de proteína L1 de VPH 6, 40 µg de VPH 11, 40 µg de VPH 16 y 20 µg de VPH 18, adsorbidos en 225 µg de adyuvante Sulfato Hidroxifosfato de aluminio amorfo. Se aplica por vía intramuscular en el brazo, en tres dosis (0, 2 y 6 meses) de 500µl (96); aunque, recientemente, la OMS recomendó la aplicación de sólo dos dosis en pre/adolescentes de 9-14 años (32). La eficacia reportada de Gardasil® en la prevención de infecciones incidentes es de 95%, 100% contra infecciones persistentes, 95-100% contra el desarrollo de NIC1 y NIC 2/3; y cerca de 100% contra VIN1 (Neoplasia Intraepitelial vaginal), VaIN1 (Neoplasia Intraepitelial vulvar) y condiloma acuminado asociados a VPH 16, 18, 6 y 11 (78).

Cervarix™ se aprobó en 2007. Es producida con el sistema baculovirus en células de insecto *Trichoplusia ni*. Cada dosis de 0.5 ml contiene 20 µg de proteína L1 de VPH 16 y 20 µg de VPH 18, adsorbidos en el sistema adyuvante ASO4 (500 µg hidróxido de aluminio, 50 µg 3-O-deacilado-4'-monofosforil lípido A (AML)). Se aplica en tres dosis, 0, 1 y 6 meses. Es estable hasta por tres años almacenada a 2-

8 C. Reporta una eficacia de más de 95% contra infección incidente, y 100% contra infección persistente, NIC1 y NIC2/3 VPH16/18+ (18). Confiere protección cruzada contra VPH 31, 33, 45 y 51 (167).

Actualmente, en más de 129 países, al menos una de las vacunas contra VPH ha sido aprobada; y se ha implementado en más de 60 países. En general en la población, el porcentaje de reducción de infecciones por VPH 16/18/6/11 es de hasta 90%; 90% de verrugas genitales; 45% de LSIL y 85% de HSIL (48).

En 2014, en Estados Unidos de América se aprobó una vacuna de segunda generación de la compañía Merk SA de CV. Incluye VLPs de los tipos 16/18/31/33/45/52/58. Se aplica en tres dosis (mes 0, 2 y 6) en mujeres de 16-26 y hombres de 9-15 años. La eficacia contra lesiones alto grado en cérvix, vulva, vagina o ano, relacionadas con los tipos 31/33/45/52/58 fue de 96.7%. Los títulos de anticuerpos contra los tipos 6/11/16/18 no fueron menores que con la vacuna cuadrivalente (77).

Estas tres vacunas profilácticas son muy efectivas para prevenir infecciones y están marcando una nueva era en el manejo del VPH ; sin embargo, no tienen efecto sobre infecciones o lesiones intraepiteliales ya existentes, las cuales en muchos países siguen siendo un problema de salud pública.

#### **4.8. Vacunas terapéuticas**

Los tratamientos actuales contra CaCu incluyen histerectomía, quimioterapia (*cis*-platino, paclitaxel) y radioterapia, y en el caso de lesiones pre-malignas, electrocirugía, criocirugía, cirugía láser, cirugía de escisión, entre otros (132,151). Estos tratamientos suelen tener buenos resultados en el corto plazo, sin embargo, generan efectos secundarios adversos y no controlan la recurrencia; las vacunas terapéuticas, en cambio, están diseñadas específicamente contra las células tumorales, y pueden generar respuesta inmune de memoria para controlar las recaídas.

Dado que el VPH permanece intracelular, se requiere una respuesta inmune citotóxica que elimine a las células infectadas, lo cual requiere la presentación en superficie de antígenos. Las proteínas tempranas del VPH son intracelulares y,

sobre todo E6 y E7, se han usado como blanco terapéutico en diversas estrategias terapéuticas; sin embargo, aún no se tiene una con suficiente eficacia en pacientes.

### **Vectores virales**

Los virus se introducen eficientemente en las células hospederas, de manera que el antígeno puede ser procesado intracelularmente y presentado en la vía MHC I; sin embargo, el potencial infeccioso de los virus es una desventaja (104). Se han usado Vaccinia Ankara modificado (MVA), Virus Semliki Forest y lentivirus. Por ejemplo, vacunas de MVA con E6/E7 se han probado en pacientes con NIC2/3 (11) y con CaCu (8), obteniendo 48% de pacientes con regresión, y 28% con disminución de la severidad de la lesión, respectivamente. Aunque en otros estudios la respuesta observada ha sido pasajera (81).

### **Vectores bacterianos**

*Lactobacillus casei*, es una bacteria relativamente segura que podría administrarse por vía oral. Una vacuna de este tipo, que acarrea a E7 de VPH fue administrada a pacientes con NIC3, y el 70% de los pacientes mostraron alguna disminución de la severidad de su lesión (82). *Listeria monocytogenes* también fue usada como acarreadora de E7 VPH16 en un modelo murino, sin resultados concluyentes (53); y un ensayo clínico reportó efectos secundarios adversos (95). Se ha empleado BCG (*Bacille Calmette-Guérin*) como acarreador de E7 de VPH16; la respuesta en ratones fue muy débil (70).

### **Vacunas de ADN**

Vacunas que acarrean las secuencias nucleotídicas de E6 y E7 han inducido regresión de tumores en ratones, pero no significativamente en ensayos clínicos. La inoculación de ADN desnudo tiene baja eficiencia de expresión. Se ha usado ADN encapsulado en micropartículas o en conjunto con la secuencia de calreticulina o proteínas de choque térmico para tratar de aumentar su eficacia (55). Por ejemplo, pacientes con NIC 2/3 inmunizados con tres dosis intramusculares de ADN con E6/E7 encapsulado, mostraron mayor regresión que el grupo placebo, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa (46). En otro estudio, pacientes con LSIL inmunizados también con ADN encapsulado, se observó aumento de la

respuesta de células T CD8+, pero ésta no repercutió en disminución de la lesión (153).

### ***Vacunas basadas en péptidos sintéticos***

Los péptidos son relativamente económicos y seguros, sin embargo son inmunógenos muy débiles y están restringidos al haplotipo de MHC (89). Se han probado péptidos de E7 de VPH16, administrados a pacientes con CaCu VPH16+ sin generar respuesta de linfocitos T citotóxicos (128). En otros estudios se han probado péptidos largos sobrelapados de E6 y E7 de VPH16 en pacientes con LSIL o CaCu, detectando respuesta celular pero sin repercusión clínica (160).

### ***Vacunas basadas en células dendríticas***

Los monocitos del paciente son extraídos para generar DCs *ex-vivo*, activarlas, cargarlas con antígenos virales, y luego re-introducirlas al paciente. Se ha observado inducción de respuesta T citotóxica CD8+ y CD4+ específica tras la inoculación de células cargadas con E7 en pacientes con CaCu, pero no ha sido suficiente para reducir el tamaño de tumor (135). Además, el procedimiento es personalizado, laborioso y costoso.

### ***Vacunas basadas en proteínas***

Su ventaja es que contienen todos los péptidos potencialmente inmunogénicos, tras su procesamiento por las células presentadoras de antígenos; sin embargo, las proteínas tempranas de VPH, por sí solas, son poco inmunogénicas, por lo que se han probado con distintos adyuvantes, o en fusión con otras proteínas. En estudios con pacientes con NIC3, se ha administrado proteína E7 fusionada con Hsp (*Heat Shock Protein*), registrándose 22% de regresión a NIC1, aunque la diferencia no fue significativa respecto al placebo (135); Palefsky JM, *et al.* (2006), mostraron regresión del 35% de CaCu (116). En otro estudio, al inmunizar con proteína E6 fusionada con E7 registraron respuesta celular pero no regresión de la lesión (44).

El uso de adyuvantes y/o proteínas acarreadoras parece ser importante en la inducción de una respuesta eficiente; por lo que estructuras complejas como los VLPs, son una opción para aumentar la inmunogenicidad.

#### 4.9. cVLPs y Capsómeros Quiméricos

Los VLPs se han usado como acarreadores de antígenos, mediante la construcción de VLPs quiméricos (cVLP), donde una proteína o péptido es fusionado a L1 (52,173). Los cVLPs conservan la capacidad de auto-ensamblarse, mantienen los epítomos conformacionales para la inducción de anticuerpos neutralizantes, y llevan al antígeno a la ruta de MHCI para inducir respuesta celular citotóxica, ejerciendo actividad terapéutica (50,75,112).

En ensayos pre-clínicos, se han probado diversas construcciones de cVLPs, donde la proteína L1 es fusionada a péptidos o segmentos de las proteínas E6 y/o E7, mostrando que además de anticuerpos neutralizantes, se genera respuesta citotóxica contra estas proteínas, y actividad antitumoral contra células que las expresan (51,108,119,140). Estos trabajos han reportado resultados alentadores, sin embargo, las proteínas E6 y E7 parecen no ser suficientemente inmunogénicas.

Los cVLPs también han sido probados en ensayos clínicos, donde mostraron ser seguros e inmunogénicos, aunque la diferencia en su efecto antitumoral no fue estadísticamente significativa respecto al grupo control (80).

Como alternativa, se ha propuesto el uso de capsómeros, ya que se les puede fusionar un segmento protéico de mayor tamaño (112), manteniendo la estructura básica de la proteína L1, lo que permite la conservación de sus características inmunogénicas; son más estables en un mayor rango de temperaturas y se pueden producir de manera relativamente más sencilla, con mejor rendimiento y menor costo, en bacterias (19,20,138).

La presencia de los epítomos de L1 para la respuesta humoral en capsómeros como en VLPs, se ha evaluado *in vitro*, usando anticuerpos con reactividad es conocida para L1. Luego, la actividad *neutralizante* (4,43,133,138) de los anticuerpos generados en animales inmunizados, se determina mediante ensayos de neutralización con pseudoviriones, donde cápsides de L1 acarrean plásmidos que expresan GFP (*Green Fluorescence Protein*) o SEAP (*Secreted alkaline Phosphatase*) al llevarse a cabo la infección *in vitro*; cuando los pseudoviriones son pre-incubados con antisuero, estas proteínas no se expresan.

El efecto profiláctico de los anticuerpos neutralizantes ha sido mostrado por diversos grupos. Yuan F, *et al.* (2001), usando el modelo de COPV en perros, inmunizaron con proteína L1, y retaron con COPV infecciosos en la mucosa oral excoriada, observando que ningún individuo resultó infectado (175). Wu WH, *et al.* (2011), por su parte, mostraron que al aplicar pseudoviriones en el epitelio vaginal de ratones previamente inmunizados con capsómeros de L1, éstos no fueron internalizados (172).

Por otro lado, se ha mostrado que los capsómeros, al igual que los VLPs, pasan a la vía de procesamiento de antígenos intracelulares, para presentar péptidos en MHCI, desencadenando la respuesta celular citotóxica (115,139). Para la prueba de concepto, Ohlschläger P, *et al.*, inmunizaron ratones C57BL/6 con capsómeros de L1 de VPH16, y mostraron la generación de niveles de linfocitos T citotóxicos similares a los inducidos por VLPs (115). Schadlich L, *et al.*, por su parte, detectaron el mismo efecto mediante ELISPOT anti-IFN $\lambda$  (139). Además, se vio que tal respuesta citotóxica específica, en este caso, contra L1, tiene efecto antitumoral en un modelo murino (50,115,139), donde las células blanco expresaban L1.

La incorporación de E2 a capsómeros, podría acarrearla para ser presentada como antígeno intracelular en MHCI, mientras L1 seguiría induciendo anticuerpos.



## **5. HIPÓTESIS**

Los capsómeros quiméricos de proteína L1 fusionada a E2 de VPH16, producidos en bacteria, inducirán una respuesta inmune celular citotóxica contra E2, con actividad terapéutica, sin afectar la antigenicidad profiláctica de L1.

## **6. OBJETIVO GENERAL**

Generar una vacuna con características profilácticas y terapéuticas, produciendo en bacterias, capsómeros quiméricos de proteína L1 fusionada a distintos fragmentos de la proteína E2 de VPH16; y evaluar su capacidad de inducir respuesta inmune celular citotóxica específica contra E2 con actividad anti-tumoral, conservando los epítomos neutralizantes de L1.

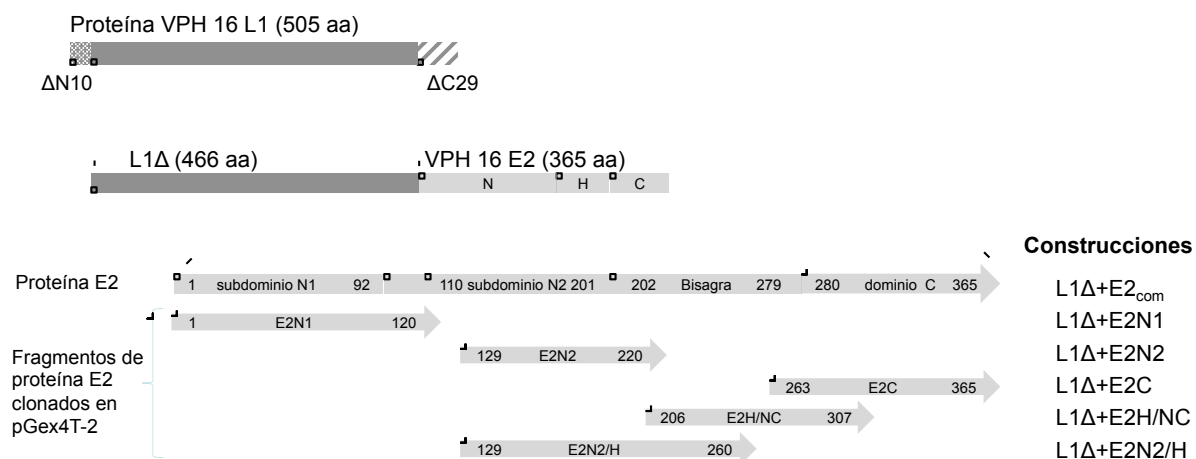
## **7. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Construir vectores de expresión en bacterias pGex 4T-2, que incluyan L1 de VPH16 fusionado a distintos fragmentos de E2.
- Producir en bacterias, y purificar capsómeros quiméricos L1+E2 de VPH16.
- Analizar la estructura de las proteínas quiméricas obtenidas.
- Establecer un modelo tumoral murino, generando células que expresen la proteína E2 de VPH16.
- Evaluar la capacidad de las proteínas quiméricas de inducir respuesta celular citotóxica contra E2, en ratones.
- Evaluar el efecto antitumoral de la inmunización con proteínas quiméricas en el modelo tumoral murino HPV positivo.

## 8. MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1. Construcción de vectores bacterianos

Fragmentos del gen E2 de VPH16, así como el gen completo, fueron clonados en el plásmido pGex 4T-2\_L1 $\Delta$  (descrito previamente por, Schadlich L, *et al.* (2009) (138)), usando los sitios de restricción *NsiI/HindIII*, y río abajo de los genes de GST y L1. La proteína glutatión S-transferasa (GST, *Glutathione S-transferase*) fue usada como bandera en la purificación). La proteína L1 de VPH16 expresada a partir de este vector, L1 $\Delta$ N10 $\Delta$ C29 (a la que nos referiremos desde ahora como L1 $\Delta$ ), tiene deleciones respecto a L1 nativa en ambos extremos: 10 aminoácidos en el extremo amino-terminal y 29 en el carboxilo-terminal. Las construcciones generadas expresan los siguientes fragmentos de E2 (Figura 9):



**Figura 9. Esquema de las construcciones quiméricas L1 $\Delta$ +E2.** La proteína L1 de VPH16 modificada (L1 $\Delta$ ), con deleciones de 10 aminoácidos en el extremo amino-terminal ( $\Delta$ N10) y 29 aa's en el carboxilo-terminal ( $\Delta$ C29), se unió a cada uno de cinco diferentes fragmentos de la proteína E2 de VPH16 o a la proteína completa (E2<sub>com</sub>). Se esquematizan los dominios nativos de la proteína E2. Las flechas representan los fragmentos clonados, indicando el primero y último de los aa's de E2 que abarcan. N, amino; C, carboxilo.

L1 $\Delta$ +E2N1 (incluye del primero al aminoácido 120), L1 $\Delta$ +E2N2 (aa's 129-220), L1 $\Delta$ +E2H/NC (aa's 206-307), L1 $\Delta$ +E2C (aa's 263-365), L1 $\Delta$ +E2N2/H (aa's 129-260), así como la proteína completa (aa's 1-365) en L1 $\Delta$ +E2<sub>com</sub>. La secuencia nucleotídica de estos fragmentos fueron obtenidos mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*), a partir del plásmido pBR322-HPV16 (generosamente donado por

los Dres. EM de Villiers y H zur Hausen (38), el cual contiene el genoma completo de VPH 16, y usando los oligonucleótidos iniciadores listados en la Tabla 2. El gen completo de E2 se obtuvo mediante PCRs sobrelapadas. Con el fin de eliminar el sitio *NsiI* natural del gen ubicado en el dominio N2, se emplearon iniciadores sobrelapados en dicho sitio; para la PCR 1, E2N1F y E2NsiIMut3; para la PCR 2, E2NsiIMut5 y E2CR; luego, los amplicones resultantes de las PCR 1 y 2, se mezclaron y usaron como molde en una tercera PCR, usando los iniciadores E2N1F y E2CR. Cada iniciador agrega los sitios de restricción *NsiI* y *HindIII* en 5' y 3', respectivamente, excepto E2NsiIMut3 y E2NsiIMut5. Las plásmidos resultantes se verificaron mediante digestión con *NsiI/HindIII*, y secuenciación de ADN.

**Tabla 2. Iniciadores para la amplificación y clonación de fragmentos del gen E2 de VPH 16 en el plásmido pGex 4T-2\_L1Δ**

Construcción	Iniciador	
	Nombre	Secuencia
L1Δ+E2N1	E2N1F	aaa gat gca tga gac tct ttg cca acg ttt aaa tgt g
	E2N1R	acg gaa gct tct aca ctt cca ctg tat atc cat gtt ttt t
L1Δ+E2N2	E2N2F	aaa gat gca tac tgc acc aac agg atg tat aaa aaa a
	E2N2R	acg gaa gct tct agg cgg ggt ggt tgg cca agt gct gcc t
L1Δ+E2H/NC	E2H/NCF	aaa gat gca ttc ctc tcc tga aat tat tag gca gca c
	E2H/NCR	acg gaa gct cta ctt ttt aaa tct ata tct taa aca ttt
L1Δ+E2C	E2CF	aaa gat gca tga cag tgc tcc aat cct cac tgc att t
	E2CR	acg gaa gct tct atc ata tag aca taa atc cag tag aca c
L1Δ+E2N2/H	E2N2/HF	a aag atg cat tat aca aac tgg aca cat ata tat att
	E2N2/HR	a cgg aag ctt cta gtc tct gtg caa caa ctt agt ggt gtg
L1Δ+E2 <sub>com</sub>	E2N1F	Anotado arriba
	E2NsiIMut3	ata tgt gtc cag ttt gta tag tgc att gta ttg cat atg tc
	E2NsiIMut5	gac ata tgc aat aca atg cac tat aca aac tgg aca cat at
	E2CR	Anotado arriba

Luego, los codones agregados debido la estrategia de clonación entre L1Δ y el segmento de E2 (sitio *NsiI*, ATGCAT), se removieron mediante mutagénesis

dirigida (QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se removió el segundo codón (CAT) de los insertos E2N1 y E2full, usando el iniciador Mut1; y los primeros dos codones (ATGCAT) de E2H/NC y E2C, usando los iniciadores Mut1-2H/NC y Mut1-2C, respectivamente (Tabla 3). Los plásmidos se replicaron transformando *E. coli* DH5<sup>®</sup> $\alpha$  (Invitrogen, 18258-012), y se corroboraron mediante digestión enzimática con *Nsil* y *HindIII*; y mediante secuenciación de ADN (pGex3-RP 5'-TCAAGAATTATACACTCCG-3').

**Tabla 3. Iniciadores para la delección de codones mediante mutagénesis**

Construcción	Iniciador	
	Nombre	Secuencia
L1 $\Delta$ +E2N1	<b>Mut1</b>	aag cag gat tga agg cca tgg aga ctc ttt gcc aac gtt t
L1 $\Delta$ +E2com		
L1 $\Delta$ +E2H/NC	<b>Mut1-2H/NC</b>	tac aag cag gat tga agg cct cct ctc ctg aaa tta tta g
L1 $\Delta$ +E2C	<b>Mut1-2C</b>	tac aag cag gat tga agg ccg aca gtg ctc caa tcc tca c

## **8.2. Producción de proteínas de fusión L1 $\Delta$ +E2 de VPH16 en *Escherichia coli***

Bacterias *E. coli* Rossetta fueron transformadas mediante choque eléctrico, con los plásmidos mencionados arriba; plaqueadas en TRB-agar (triptona 12g/L, extracto de levadura 24g/L, glicerol 0.4% v/v, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 17 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 72 mM; 15 g/L agar) con ampicilina 100  $\mu$ g/ml (amp) y cloranfenicol 34  $\mu$ g/ml (cam), e incubadas a 37°C toda la noche. Se tomó una colonia para iniciar el pre-inóculo con 20 ml de medio líquido TRB amp/cam; después de 12-16 horas de cultivo a 37°C y 200 rpm de agitación, se tomaron 5 ml para inocular 400 ml de medio TRB amp/cam, contenidos en un matraz Erlenmeyer con baffles con capacidad de 2 litros; se incubó a 37°C, 200 rpm, durante aproximadamente 4 horas; una vez alcanzada la densidad óptica de 0.4 a 600 nm, el cultivo se enfrió hasta 25°C, se le agregó IPTG (0.2 mM concentración final), y se incubó toda la noche a 25°C con agitación a

200 rpm. Finalmente, se cosechó mediante centrifugación a 5000 rpm, 10 min a 4°C; y los pellets se almacenaron a -70°C hasta su purificación.

### **8.3. Purificación y caracterización de proteínas de fusión L1Δ+E2**

#### ***Cromatografía de afinidad mediante el sistema GST***

Los pellets del cultivo bacteriano fueron resuspendidos en 40 ml (por cada 100 ml de cultivo) de buffer L frío [50 mM Tris (pH 8.2), 0.2 M NaCl] con 2mM DTT y una mezcla de inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics, 11836170001); luego se lisaron usando un homogenizador a alta presión (prensa de French; Avestin, Ottawa, Canada). Posteriormente, los lisados fueron clarificados centrifugando a 17000 rpm, 1 hora (F28/50) a 4°C, antes de ser aplicados a las columnas GSTrap de 5 ml (GE Healthcare 17513102, München, Germany). Las columnas se equilibraron con 10 volúmenes de buffer L con 2mM DTT, los cuales se hicieron circular a través de la columna durante 10 min a una velocidad de flujo de 5 ml/min, con la ayuda de una bomba peristáltica. Las muestras clarificadas se hicieron recircular a 2 ml/min, toda la noche a 4°C. Después de lavar la columna con 10 volúmenes de buffer L con 2mM DTT (5 ml/min), y 5 volúmenes (5 ml/min) de buffer L sin DTT, se agregaron 80 unidades de proteasa de trombina (GE Healthcare, 27-0846-01) en 5 ml de buffer L, y se incubó durante 12 h a 23°C. Las proteínas de fusión se eluyeron con 5 ml de buffer L con 2 mM DTT (5ml/min), y fueron analizadas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE) y Western Blot, con el anticuerpo anti-L1 (CamVir-1, PharMingen).

#### ***Cromatografía de exclusión***

El eluido con proteína de fusión obtenido en las columnas GSTrap (5 ml), se ajustó al buffer de corrida para cromatografía de exclusión (5mM DTT, 50mM Tris, 0.5M NaCl, 0.01% Tween80, pH 8.2); para ésto, se agregó a cada 5 ml de eluido: 350 µl de NaCl 5M, 17.5 µl de DTT 1M, 5.5 µl de Tween 80 al 10% y 127 µl de H<sub>2</sub>O. Para concentrar el eluido, se usaron tubos para centrifuga con filtro (Ultracel 100K, Amicon, UF910024), los cuales fueron previamente hidratados (10 min de incubación a temperatura ambiente con 2-3 ml de buffer de corrida para

cromatografía); el eluido se colocó en los tubos con filtro y se centrifugó a 4000 rpm, 2 min o más, 4°C, hasta obtener un volumen final de 1-1.5 ml, los cuales fueron recuperados en nuevos tubos de 1.5 ml (Protein LoBind, Eppendorf, 022431081) y almacenados a -80°C. Se empleó una columna pre-empacada con matriz de agarosa y dextrano (Superdex 200, GE Healthcare), operada con el sistema AKTA (Amersham Pharmacia Biotech), y equilibrada con 24 ml de buffer (flujo de 0.5 ml/min). La solución de proteínas, ajustada y concentrada, se inyectó en la columna a 0.5 ml/min, y durante aproximadamente 30 min, se fueron recuperando fracciones de 1 ml, las cuales se mantuvieron en hielo. Posteriormente, fueron analizadas mediante SDS-PAGE y WB anti-L1; y se eligió la fracción con mayor cantidad de proteína, para la caracterización estructural.

### ***Análisis mediante SDS-PAGE y Western blot***

Los eluidos de la cromatografía de afinidad, las fracciones de la cromatografía de exclusión y del gradiente de sacarosa, así como extractos de los cultivos de la línea celular TC-1/E2 generada, fueron analizados mediante SDS-PAGE y/o WB.

Los cultivos celulares, fueron lisados en frío con buffer RIPA (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Deoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1%), y se cargaron 50 µg de proteína total por carril. Alícuotas de cada procedimiento fueron mezcladas con buffer de carga 6X (Tris-HCl pH 6.8 0.35 M, SDS 10.28% p/v, glicerol 36% v/v, DTT 0.6 M, azul de bromofenol 0.06%), y desnaturalizadas 5 min a 95°C. Para el PAGE, se prepararon 10 ml de gel separador al 12%: 4 ml de Bis:acrilamida al 30%, 1,66 ml de Tris 1.5 M pH 8.8, 100 µl de SDS al 10% p/v, 100 µl de persulfato de amonio (APS) al 10% p/v, 4 µl de *N,N,N',N'* Tetrametiletilendiamina (TEMED), y 4.136 ml de agua bidestilada. Para el gel concentrador (5ml al 5%): 850 µl de Bis:acrilamida al 30%, 1.25 ml de Tris 0.5 M pH 6.8, 50 µl de SDS al 10% p/v, 50 µl de APS al 10% p/v, 5 µl de TEMED, y 2.8 ml de agua bidestilada. En la separación, se aplicó un voltaje constante de 100 Volts en buffer de corrida (Glicina 39 mM, Tris base 48 mM, SDS 0.1% p/v). El gel se tiñó con azul de Coomassie (R-250, Bio-Rad, California, USA), o para WB, se hizo transferir a una membrana de nitrocelulosa. La transferencia se realizó a 200 Amperes constantes en buffer de transferencia (En

cámara húmeda: 25 mM Tris base, 192 mM glicina, 0.025% SDS, pH 8.5, 20% metanol; en cámara semi-seca: Tris base 48 mM, 39 mM glicina, 0.025% SDS, pH 8.5, 20% metanol). La membrana se incubó con buffer de bloqueo [6% p/v leche descremada en PBS (NaCl 137 mM, KCl 3 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, pH 7.4) con 0.05% v/v Tween 20], en agitación suave, durante una hora a temperatura ambiente, o toda la noche a 4°C. Luego, se incubó con el anticuerpo primario en solución de bloqueo diluida 1:10 en PBS-T (PBS con 0.05% v/v Tween 20), se le dio un lavado de 5 min con PBS-T, y tres lavados de 10 min en agitación suave, seguidos (excepto en el caso de anti-GST-HRP) de la incubación con anticuerpo secundario de cabra anti-ratón-HRP en solución de bloqueo diluida. Después de otro lavado de 5 min con PBS-T y tres lavados de 10 min con PBS, se reveló por quimioluminiscencia (Western blotting Luminol Reagent, Santa Cruz Biotechnology, Sc-2048). Los anticuerpos usados se indican en la Tabla 4.

**Tabla 4. Anticuerpos empleados en el análisis por western blot**

<b>Anticuerpo</b>	<b>Dilución</b>	<b>Incubación</b>	<b>Marca</b>
anti-GST-HRP	1:20000	1h a temperatura ambiente	Amersham Bioscience, RPN1236V
Anti-L1 HPV16 (CamVir-1)	1:12000	2 h a temperatura ambiente	PharMingen
Anti-E2 HPV16 (clona TVG271)	1:1500	1 h a temperatura ambiente	Abcam, ab17190
Anti-mouse-HRP	1:30000	1 h a temperatura ambiente	Zymed, 81-6520

### ***Centrifugación en gradiente de sacarosa***

Los gradientes de sacarosa se montaron en tubos de centrifuga (Beckman ultra-clear 142x889mm, No. 344059, 9/16x3 ½ pulgadas) con la ayuda de un mezclador; la cámara frontal del éste se llenó con 5.8 ml de solución de sacarosa al 50% p/v, y la cámara trasera con 5.8 ml de solución de sacarosa al 5%. Las soluciones fueron preparadas en el mismo buffer que las proteínas. Cada tubo se

colocó diagonalmente bajo la manguera de salida del mezclador y se dejó gotear muy suavemente por la pared del tubo, dejando espacio para la proteína (300-500  $\mu$ l). El mezclador se lavó con agua abundante entre cada tubo. Como controles se incluyeron VLPs L1 (100-200S), capsómeros L1 $\Delta$  (10S) y catalasa (11S); el primero se preparó en buffer para VLPs (Hepes 50 mM, NaCl 0.5 M, Tween80 0.01%, pH 7.2); y el resto, así como las proteínas de fusión, en buffer para capsómeros (Tris 50 mM, NaCl 0.5 M, DTT 5 mM, Tween80 0.01%, pH 8.2), manteniendo el mismo volumen de muestra. Después de colocar suavemente 300  $\mu$ l (10-100  $\mu$ g) de proteína en la parte superior del gradiente, los tubos se balancearon con la respectiva solución de sacarosa al 5%, y se centrifugaron a 36000 rpm, 3h, 4°C, sin fricción en el paro, usando un rotor SW41 (Beckman, Palo Alto, Calif.) previamente enfriado. Posteriormente, se colectaron 17 fracciones de 700  $\mu$ l (aproximadamente 10.6 ml en total) desde el extremo inferior del tubo, con ayuda de una aguja, y se mantuvieron en hielo; después de la última fracción, se drenó el resto del líquido y el pellet se resuspendió en 500  $\mu$ l de PBS. Las fracciones obtenidas se analizaron mediante SDS-PAGE y WB con anticuerpo anti-L1 VPH16 CamVir-1. La densidad del gradiente se corroboró midiendo el índice de refracción de las fracciones.

### ***Microscopía electrónica***

Tres microlitros de cada proteína de fusión a 0.03  $\mu$ g/ $\mu$ l, fue depositada sobre una cuadrícula revestida con carbón, a la que se agregó acetato de uranilo al 2%, como tinción negativa. Las muestras fueron observadas con un microscopio de transmisión electrónica CM200 FEG (FEI) a 200 kV.

### ***ELISA con distintos anticuerpos específicos contra L1 de VPH16***

Una placa de 96 pozos fondo plano (Nunc) se cubrió con 0.5  $\mu$ g/pozo de cada proteína purificada, diluida en 50  $\mu$ l PBS, por duplicado; y se incubó a 4°C toda la noche. El día siguiente se lavó cuatro veces con 200  $\mu$ l por pozo de PBS-0.05% Tween 20, y se incubó 1 hora a 37°C con 100  $\mu$ l/pozo de solución de bloqueo (5% leche en PBS-0.05% Tween 20). Luego, se aplicaron 50  $\mu$ l/pozo de anticuerpos específicos contra L1 de VPH16, diluidos 1:1000 en solución de bloqueo, y se incubó 1 hora a 37°C. Se usaron cuatro distintos anticuerpos: H16.V5, H16.U4 y



MD2H11 (sobrenadantes de hibridomas donados por el Dr. N. D. Christensen, College of Medicine, Pennsylvania State University) y Cam-Vir. Después de cuatro lavados, se agregaron 50 µl/pozo de anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con HRP 1:5000 (diluido en solución de bloqueo), e incubó otra hora a 37°C. Luego se lavó cuatro veces y se agregaron 50 µl/pozo de sustrato ABTS (2,2'-Azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]-diammonium; Sigma). Finalmente, se cuantificó la absorción en lector de ELISA a 405 nm. Los datos se presentan como el promedio de duplicados y su error estándar (SEM, *Standard Error of the Mean*).

#### **8.4. Producción de la proteína de fusión L1Δ+E2H/NC a mayor escala**

Para obtener mayor cantidad de proteína L1+E2H/NC para los ensayos de inmunización, se ajustaron los protocolos de producción y purificación. Bacterias JM109DE3 competentes fueron transformadas por choque térmico con el plásmido de L1Δ+E2H/NC; las transformantes se plaquearon en LB-agar (peptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 5 g/L, pH 7, con 15 g/L agar) con 100 µg/ml amp, y se incubaron toda la noche a 37°C. Posteriormente, se tomaron cuatro a seis colonias para iniciar pre-cultivos de 2 ml de LB líquido con ampicilina; y se incubaron a 30°C, 200 rpm, toda la noche. Luego, se inocularon tubos con 2 ml de LB con ampicilina, en relación 1:20 (100 µl para 2 ml de LB); se incubaron una hora a 30°C y 200 rpm, antes de agregar IPTG (concentración final 0.2 mM) e incubaron dos horas más. Finalmente, se tomó una alícuota (50-100 µl) de cada cultivo, a la que se agregó directamente el buffer de carga, se desnaturalizó y cargó (30 µl por pozo) en un gel de poliacrilamida al 12%, luego transferido para WB (anticuerpo anti-GST-HRP), para seleccionar la colonia con mayor expresión de L1+E2H/NC. Con esa colonia se realizó un pre-cultivo de 20 ml, que fue incubado toda la noche a 30°C y 200 rpm; con éste se inocularon (1:100) 600 ml de medio LB con amp 100 µg/ml, que continuaron en cultivo a 30°C con 200 rpm, en un matraz Erlenmeyer bafleado con capacidad de 2L; una vez alcanzada la densidad óptica de 0.4 a 600 nm, se agregó IPTG a una concentración final de 0.2 mM, y se incubó 2 h más. El

cultivo se cosechó enfriando 5 min en hielo, antes de centrifugarse 10 min a 5000 rpm y 4°C; la pastilla se congeló a -80°C hasta iniciar el proceso de lisis.

Para lisar las células, la masa bacteriana se resuspendió en 3 ml (por cada 0.5 L de cultivo) de buffer L frío con DTT 2 mM, lisozima 50 µg/ml e inhibidores de proteasas; se dejó 30 min en hielo; y se sonicó (Ultrasonic Processor, Cole Parmer) en 5 ciclos de 30 s de lisis con un min de enfriamiento en hielo. El sonicado se centrifugó a 14000 rpm, 10 min a 4°C; se recuperó el sobrenadante, y se realizó un WB (usando el anticuerpo anti-GST-HRP) para evidenciar la presencia de la proteína GST+L1Δ+E2H/NC, así como la eficiencia de recuperación, comparando el clarificado (sobrenadante) con el sonicado total.

### **8.5. Purificación de la proteína de fusión L1Δ+E2H/NC a mayor escala**

La proteína de fusión fue purificada mediante cromatografía de afinidad, usando el sistema *GST-glutathione Sepharose*<sup>MR</sup> 4B (GE Healthcare, 17-0756-01). Para equilibrar las perlas de *Sepharose*<sup>MR</sup> (sefarosa, fase estacionaria), se tomaron 1.33 ml de la suspensión original, por cada mililitro de perlas requerido; se lavaron 2 veces con 10 ml de PBS frío, y una vez con buffer L frío, centrifugando 3 min a 500 g (3000 rpm); finalmente, se agregó 1 ml de buffer L frío, con lo que se obtuvieron 2 ml suspensión al 50%. Luego, se tomaron 0.5 ml de la suspensión, se mezclaron con 3 ml del clarificado obtenido en la producción de proteína y 22 ml de buffer L con 2mM DTT e inhibidores de proteasas; se incubó durante 3 h a 4°C con agitación rotatoria suave; se centrifugó 2 min a 3000 rpm, retirando el sobrenadante (FT). Las perlas recuperadas (cama seca), se lavaron tres veces con 10 volúmenes (por volumen de cama seca) de buffer L con 2mM DTT sin inhibidores de proteasas, seguidas de un lavado con 10 volúmenes de PBS. Posteriormente, se agregaron 80 U de proteasa de trombina (Amersham Biosciences, 27-0846-01) en 1.5 ml de PBS, por cada ml de cama seca de perlas; se incubaron a 23°C durante 12 h, en rotación suave. Para recuperar la proteína de fusión escindida de las perlas, se centrifugó 5 min a 3000 rpm, se obtuvo el eluido, y se le agregó PMSF 1mM (phenylmethylsulfonyl fluoride) para inactivar la trombina. Para retirar los LPSs (lipopolisacáridos), se agregó 1% de Tritón X-114<sup>®</sup> (Sigma, X114-100ML), se

mezcló vigorosamente, se incubó 5 min en hielo y 5 min a 37°C; se centrifugó 5 min a 18000xg (14000 rpm en microcentrífuga), se recuperó el sobrenadante y se repitió el procedimiento una vez más. El sobrenadante final se almacenó a -80°C hasta su análisis por SDS-PAGE y WB (usando los anticuerpos anti-L1 HPV16 y anti-GST-HRP). Por otro lado, para liberar la GST, las perlas de *Sepharose*<sup>MR</sup> se lavaron dos veces con 10 volúmenes de PBS frío, se centrifugaron 2 min a 3000 rpm, se agregaron 2 volúmenes de buffer de elución (Tris-HCl 50 mM pH 8, glutatión reducido 10 mM), se incubaron 30 min a temperatura ambiente con agitación suave, y se centrifugaron (3000 rpm, 2 min) para recuperar el sobrenadante. Luego, las perlas se lavaron dos veces con 2 volúmenes de PBS.

La concentración y pureza de la proteína purificada fue determinada por comparación con una curva de BSA (Albúmina sérica bovina) en el SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie, usando el programa ImageJ (National Institutes of Health, USA). Finalmente, la proteína obtenida fue esterilizada mediante radiación gamma con 9000 rads (usando una fuente de <sup>137</sup>Cs), para ser utilizada como antígeno.

## **8.6. Construcción del vector pcDNA4/TO-E2HPV16**

El gen completo de E2 de VPH16 se clonó en el vector de expresión para eucariontes pcDNA<sup>TM</sup>4/TO (Invitrogen, V1020-20), usando los sitios de restricción *Bam*HI y *Eco*RI; el inserto se obtuvo mediante PCR, a partir del plásmido de L1Δ+E2<sub>com</sub> (pGex 4T-2\_L1Δ+E2<sub>com</sub>), agregando los sitios de reconocimiento *Bam*HI y *Eco*RI, en sus extremos 5' y 3', respectivamente. El producto de PCR, así como 10 µg de vector pcDNA4/TO, fueron digeridos con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI, incubando a 37°C durante 12 horas. Los amplicones digeridos se limpiaron por columna de sílica (QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN, cat. 28104), y el vector se purificó de gel de agarosa (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN, cat. 28704). Posteriormente, vector e inserto fueron ligados con la enzima Ligasa T4, incubando 1 hora a 22°C (*Rapid Ligation Kit*, Fermentas #K1421). Luego, se transformaron bacterias *E. coli* DH5<sup>®</sup>α competentes; las transformantes se seleccionaron en placas de LB-agar con ampicilina 100 µg/ml, y PCR de colonia (30 ciclos, con 60°C

de temperatura de alineamiento, iniciadores CMV-FP (5'-cgcaaatgggcggtaggcgtg-3') y BGH-RP (5' -tagaaggcacagtcgagg-3'); las colonias positivas, se secuenciaron, usando los mismos iniciadores. Finalmente, 10 µg del plásmido resultante pcDNA4/TO-E2, así como de pcDNA4/TO- (vector sin el inserto E2), fueron linearizados con la enzima de restricción *BcgI* (Biolabs New England, cat. RO5455) y purificados mediante extracción de gel de agarosa. Este ADN fue usado posteriormente en la transfección de células TC-1.

### **8.7. Líneas celulares**

La línea celular TC-1 (donada por el Dr. Lutz Gissmann del Centro Alemán de Investigación en Cáncer, Alemania) derivan de células epiteliales primarias de pulmón de ratón C57BL/6, transformadas con E6/E7 de VPH16 y c-Ha-ras (92). Fueron cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma, 17633) suplementado con 7% de SBF (Suero bovino fetal) inactivado (56°C, 30min), 400 µg/ml de geneticina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin; son adherentes y fueron cosechadas con verseno (Tris base 3.04 g/L, NaCl 8 g/L, KCl 0.4 g/L, EDTA 0.2 g/L, pH 7.7).

La línea celular RMA-S (donadas amablemente por el Dr. V. Ortiz Navarrete, CINVESTAV), es una modificación de la línea RMA (células de timoma inducido por el virus Rauscher), es deficiente en el transportador asociado al procesamiento de antígenos (TAP, Transporter associated with Antigen Processing) y singénica a la cepa de ratón C57BL/6.

K562 (ATCC®CCL-243™), originarias de leucemia mieloide crónica, son células con alta sensibilidad a células NKs.

K562 y RMA-S son no adherentes; se cultivaron en medio RPMI (Hyclone) suplementado con 10% de SBF inactivado, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. Todas las líneas celulares se cultivaron a 37°C en atmósfera con 5% CO<sub>2</sub>.

### **8.8. Generación de células TC-1/E2**

Primero, se determinó la sensibilidad de las células TC-1 a la zeocina (Invitrogen, R250-01), probando distintas concentraciones (0, 50, 100, 200, 400, 600, 800 y 1000 µg/ml) y registrando confluencia de los cultivos, durante 15-20 días, con recambio de medio cada 4-5 días. Posteriormente, se realizó la transfección con lipofectamina (Invitrogen, 18324-112) en placas de 6 pozos con cultivos al 40% de confluencia; se usaron 4 µg de ADN de los vectores pcDNA4/TO-E2 y TC-1/TO-linearizados con *BcgI*; tras la incubación durante 24-72 horas a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>, las células se resembraron 1:10 en nuevos pozos, con medio de selección (DMEM SBF 7%, estreptomycin 100 µg/ml, bencilpenicilina 100 U/ml, geneticina 400 µg/ml y zeocina 200 µg/ml), se incubaron a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, durante aproximadamente 3 semanas, recambiando el medio cada 4-5 días. Las células resistentes fueron cosechadas; para aislarlas se diluyeron y sembraron (100 y 1000 células) en placas de 100 mm de diámetro (p100), se cultivaron durante 10 días y se recogieron los focos de crecimiento para expandirlos. Finalmente, se les extrajo ADN y proteína para seleccionar las clonas positivas.

Mediante PCR se amplificó el gen E2, empleando 300 ng de ADN por reacción y los oligonucleótidos iniciadores CMV-FP y BGH-RP. Luego, mediante WB (con el anticuerpo anti-E2) se evaluó la expresión de la proteína E2 en las clonas identificadas como positivas al inserto E2; las células TC-1/TO- se usaron como control negativo. La clona TC-1/E2 con mayor expresión de proteína E2, así como una clona TC-1/TO-, se expandieron para almacenar suficientes crioviales para los ensayos de citotoxicidad y crecimiento tumoral.

### **8.9. Ratones**

Se usaron ratones C57BL/6, hembras, de 10-12 semanas de edad, haplotipo H2-Db. Los animales fueron mantenidos en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM bajo condiciones libres de patógenos. Se manejaron observando la Norma Oficial Mexicana NOM 062-ZOO-1999.

## **8.10. Inmunización**

El esquema de inmunización consistió en tres dosis de 5 µg de proteína de fusión L1Δ+E2H/NC, en 100 µl de emulsión, por vía intraperitoneal. Para preparar la emulsión, la proteína, diluida en un volumen de PBS, se mezcló con un volumen de adyuvante completo de Freund (Sigma, F-5881-6X10ML) para la primera dosis (día 1), y con adyuvante incompleto de Freund (Sigma, F-5506-6X10ML) para la segunda (día 10), y la tercera (día 25) dosis. Los componentes acuoso y oleoso, se emulsificaron usando dos jeringas con capacidad de 3 ml, conectadas por una válvula, haciéndolos pasar hasta obtener una mezcla estable. La inyección se realizó con aguja calibre 25Gx16mm. Un grupo control recibió PBS con adyuvante; y, en su caso, otro grupo control recibió 5 µg de proteína L1 (empleando la vacuna comercial Gardasil<sup>®</sup>, bajo mismo protocolo.

## **8.11. Re-estimulación *in vitro* para los ensayos de citotoxicidad**

Para los ensayos de citotoxicidad, un grupo de ratones fue inmunizado con L1+E2H/NC; tres semanas después de la última dosis, los ratones fueron sacrificados mediante sobredosis de anestésico (sevoflorano, Abbott Laboratories), y se les extrajo el bazo, cuyas células fueron disgregadas usando una malla metálica estéril y el émbolo de una jeringa de 5 ml, en PBS frío. Células del mismo grupo de inmunización se reunieron, centrifugaron (1800 rpm, 4 min) y resuspendieron en 5 ml de solución de lisis de eritrocitos (NH<sub>4</sub>Cl 150 mM, KHC0<sub>3</sub> 10 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.2) incubando a 37°C en baño maría durante 5 min; posteriormente, se lavaron, resuspendieron y colocaron 10x10<sup>6</sup> células por pozo (placa de 6 pozos) en 3 ml de medio IMDM enriquecido [10% SBF inactivado, piruvato de sodio 1mM (Sigma, S8636), aminoácidos no esenciales (Sigma, M7145), L-glutamina (GlutaMAX<sup>™</sup>, Gibco, 35050) y 2-mercaptoetanol 55 nM (Gibco, 21985-023)] con 30 ng/ml de IL-2 (R & D systems, 1081-1L/CF) y 1 µg/ml de proteína L1+E2H/NC. El cultivo se mantuvo durante 10 días a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>; después de dos re-estímulos, se realizó el ensayo de citotoxicidad.

Para los ensayos de citotoxicidad mediante liberación de <sup>51</sup>Cr, las células se cosecharon y ajustaron a 1x10<sup>7</sup>/ml en IMDM suplementado; por otro lado, se

dispusieron células K562 a la misma densidad, y 50  $\mu$ l se mezclaron 1:1 con las primeras; se incubaron en 200  $\mu$ l totales por pozo, durante 2 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>; y se prepararon diluciones 1:2 en IMDM enriquecido. Como células blanco, se usaron células TC-1/E2 y TC-1/TO-, así como RMA-S, las cuales fueron previamente cargadas con 50  $\mu$ M de péptidos en RPMI-10%SBF, incubando a 37°C toda la noche; como control, se usaron RMA-S sin péptidos. Las células se cosecharon, centrifugando a 1500 rpm durante 3 min, y resuspendieron en 50  $\mu$ l de SBF; luego se les agregaron 50  $\mu$ l de Na<sup>251</sup>CrO<sub>4</sub>, y se incubaron durante una hora a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>; posteriormente, se lavaron tres veces con 4 ml IMDM-10% SBF y se resuspendieron en IMDM enriquecido, ajustando a 5x10<sup>4</sup>/ml células. En una placa p96, se colocaron 5000 células/pozo y se incubaron, con distintas proporciones de células efectoras, a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>. Después de 4 horas, se resuspendieron y centrifugaron 3 min a 2000 rpm, para coleccionar 100  $\mu$ l de sobrenadante. Este sobrenadante se conservó a 4°C, en 1 ml de agar al 2% en agua bidestilada (a 40°C), hasta su lectura en el contador de centelleo gamma (Packard). El porcentaje de lisis específica se calculó con la fórmula: %C = [(cpm experimental-cpm espontáneo)/(cpm máximo-cpm espontáneo)] x 100. Los centelleos por minuto (cpm) máximos corresponden a células blanco (sin efectoras) lisadas con Tritón X-100 al 10% en IMDM; y los cpm espontáneos, corresponden a células blanco solas en IMDM. Los datos se presentan como el promedio de triplicados, con la correspondiente desviación estándar.

Para el ensayo de citotoxicidad mediante citometría de flujo con CFSE (Carboxifluoresceína succinimidil ester) y 7AAD (7-Amino-actinomicina), las células re-estimuladas fueron cosechadas y sometidas a separación para obtener los linfocitos T CD8+ (usando el sistema EasySep Mouse CD8+ T Cell Isolation Kit, StemCell 19853), los cuales se dispusieron como células efectoras en distintas diluciones (2 and 1 x10<sup>5</sup>) contra 5x10<sup>4</sup> células TC-1/E2 o TC-1/TO- previamente marcadas con CFSE, en un volumen total de 200  $\mu$ l en tubos de 5 ml con fondo redondo. Después de incubar 4 horas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, las células se cosecharon, lavaron y tiñeron con 7AAD (Via-Probe Cell Viability Solution, BD Bioscience 555816). Finalmente, fueron analizadas y contabilizadas en un citómetro de flujo

(FACSCalibur, BD Bioscience); los datos adquiridos fueron analizados usando el programa Summit V4.3.

### **8.12. Ensayo de inhibición de tumor**

Los ratones recibieron en el dorso, por vía subcutánea, 60 000 células TC-1/E2 en 200  $\mu$ l de DMEM sin suero ni antibióticos. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 20-30 mm<sup>3</sup> (día 0), el lote fue dividido en grupos y se inició el esquema de inmunización; un grupo recibió 100  $\mu$ l de emulsión con 5  $\mu$ g de proteína L1+E2H/NC, otro 100  $\mu$ l de emulsión con PBS (día 1), y en su caso, un tercer grupo, 5  $\mu$ g proteína L1. El tamaño del tumor se monitoreó usando un vernier electrónico. El volumen de tumor (V) se calculó usando la fórmula  $V = ( D \times d \times h ) / 2$ , donde D es el diámetro mayor, d el diámetro menor, y h el grueso. Los datos se presentan como el volumen promedio del grupo, y su desviación estándar (SEM). La diferencia entre grupos se evaluó mediante la prueba exacta de Fisher de dos colas, usando la programa GraphPad Prism 6. Valores de p menores a 0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

### **8.13. Predicción de epítomos teóricos de E2**

Para la búsqueda de posibles epítomos con afinidad por las moléculas H2-D<sup>b</sup>, en la secuencia de E2H/NC (aa's 206-307) de HPV16, se usaron tres algoritmos informáticos: BIMAS (118), SYFPEITH (123) y RANKPEP (124). Este último estima también la posibilidad del péptido de ser generado por el proteosoma celular. Los péptidos fueron sintetizados y purificados por Invitrogen mediante síntesis en fase sólida, y HPLC (High Performance Liquid Chromatography), respectivamente.

### **8.14. Ensayo de afinidad de péptidos en RMA-S**

Para evaluar la capacidad de los péptidos sintéticos de estabilizar las moléculas MHC I (haplotipo H2-D<sup>b</sup>), se usaron células RMA-S con distintas concentraciones de cada péptido. Primero, se cosecharon las células RMA-S (1500 rpm, 5 min) y resuspendieron en medio RPMI suplementado con 10% de SBF

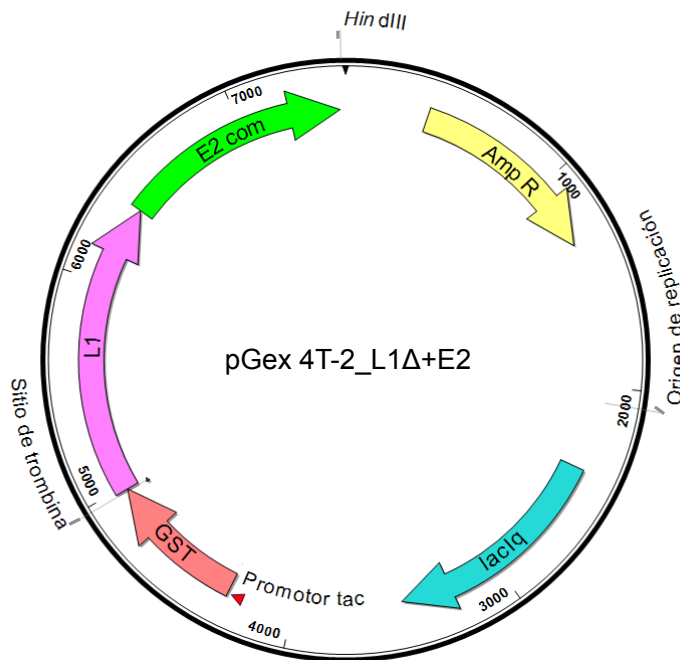


(Suero bovino fetal) inactivado, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina, ajustándolas a  $2 \times 10^6$  células por ml. Luego, se prepararon diluciones de cada péptido, colocando 100 µl con 0 a 50 µM por pozo, en una placa de 96 pozos de fondo redondo. A cada pozo se agregaron 100 µl de células RMA-S, se incubó durante toda la noche a 37°C. El día siguiente, las células se lavaron con PBS-2% SBF y resuspendieron en 100 µl por pozo de sobrenadante de hibridoma anti-H2D<sup>b</sup> (28-8-6S (ATCC® HB-51™), donado por el Dr. V. Ortiz Navarrete); se incubaron 30 min en hielo; después de dos lavados con PBS-2% SBF, se agregaron 100 µl de anticuerpo secundario (1:100 en PBS-2%SBF) anti-ratón de cabra conjugado con FITC (*Fluorescein isothiocyanate*), y se incubó en hielo 30 min; finalmente, dos lavados con PBS-2% SBF antes de fijar con 200 µl de paraformaldehído al 2% en PBS. Las células se analizan en el citómetro de flujo (FACSCalibur, Beckton Dickinson), leyendo 25 000 eventos, para registrar la intensidad media de fluorescencia (IMF) y calcular el índice de fluorescencia (IF) de cada muestra:  $IF = (\text{IMF de la muestra con péptido} / \text{IMF del control sin péptido})$ .

## 9. RESULTADOS

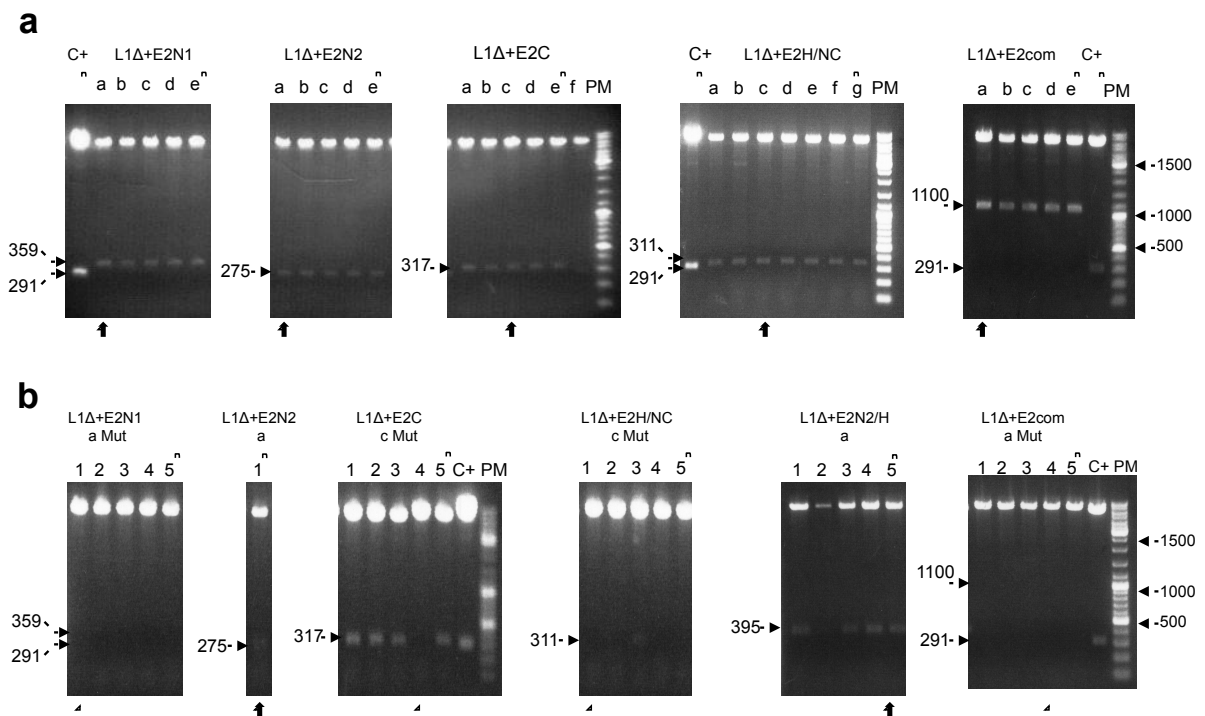
### 9.1. Plásmidos para la expresión de proteínas quiméricas L1Δ+E2 de VPH16 en bacterias

Se construyeron seis plásmidos pGex-4T-2\_L1Δ+E2 para la expresión en bacterias de distintas proteínas quiméricas. La proteína L1Δ de VPH 16, con una bandera de GST en el extremo amino terminal, se fusionó con cada uno de los cinco fragmentos de la proteína E2 de VPH 16, o con la proteína completa (ilustrados en la Figura 9), en su extremo carboxilo-terminal. La proteína L1Δ tiene dos deleciones, 10 aa's en el extremo amino-terminal, y 29 aa's en el carboxilo-terminal; se clonaron las secuencias nucleotídicas de E2 correspondientes en el plásmido pGex-4T-2\_L1Δ (Figura 10) usando los sitios de restricción *HindIII* y *NsiI*; los insertos se amplificaron mediante PCR a partir del plásmido pBR322, agregando dichos sitios en sus extremos 5' y 3', respectivamente. Las construcciones generadas se corroboraron mediante digestión enzimática con *HindIII* y *NsiI*, y secuenciación; la Figura 11a, muestra los fragmentos liberados en cada caso, que corresponden al tamaño del segmento de E2 insertado.



**Figura 10. Plásmido pGex 4T-2\_L1Δ+E2.** Esquema del plásmido en que fueron clonados E2 de VPH16 y

Debido a la estrategia de clonación, fueron agregados nucleótidos ajenos a la secuencia de E2, por lo que fue necesario retirarlos; ésto se realizó mediante mutagénesis dirigida. Se removió el triplete CAT del extremo 5' de los fragmentos de E2 en las construcciones L1Δ+E2N1 y L1Δ+E2com; y la secuencia ATGCAT (correspondiente al sitio *Nsi*I) en las construcciones L1Δ+E2H/NC y L1Δ+E2C, ésta secuencia no fue removida de L1Δ+E2N2 y L1Δ+E2N2/H debido que es parte de la proteína nativa. Para corroborar la mutagénesis, se hizo una nueva digestión *Nsi*I/*Hind*III (Figura 11b). Se seleccionaron las construcciones L1Δ+E2N1, L1Δ+E2H/NC, L1Δ+E2C y L1Δ+E2com, que ya no liberaron el inserto, y en el caso de L1Δ+E2N2 y L1Δ+E2N2/H, las que sí lo hicieron. La secuenciación corroboró su identidad. En la Tabla 5 se resume el tamaño de cada construcción, así como su peso molecular esperado.



**Figura 11. La presencia o ausencia de fragmentos producto de digestión enzimática condujo a la selección de los plásmidos para expresión de proteínas quiméricas. (a)** Fragmentos de E2 y E2 completa de VPH16 se clonaron en el vector pGex 4T-2\_L1Δ usando los sitios de restricción *Nsi*I y *Hind*III agregados mediante PCR. La electroforesis en gel de agarosa al 1% muestra los productos de digestión de cada construcción; la flecha inferior indica la clona seleccionada en cada caso. **(b)** Los sitios *Nsi*I en (a) se retiraron mediante mutagénesis dirigida, excepto en dos casos (flecha negra inferior); los plásmidos mutados (Mut) se seleccionaron por la ausencia de productos de digestión (flecha blanca). PM, Marcador de peso molecular; las flechas laterales indican el peso en pares de bases; C+, control L1Δ+E7.

**Tabla 5. Tamaño de las construcciones quiméricas L1Δ+E2\***

Construcción	GST+L1Δ+E2			L1Δ+E2			E2		
	pb	aa	KDa	pb	aa	KDa	pb	aa	KDa
L1Δ+E2com	3171	1057	120	2499	833	93.9	1095	365	41.8
L1Δ+E2N1	2436	812	92.4	1764	588	66.2	360	120	14.1
L1Δ+E2N2	2352	784	88.9	1680	560	62.7	276	92	10.6
L1Δ+E2C	2385	795	89.9	1713	571	63.8	309	103	11.6
L1Δ+E2H/NC	2382	794	89.5	1710	570	63.4	306	102	11.2
L1Δ+E2N2/H	2472	824	93.3	1800	600	67.1	396	132	15.0

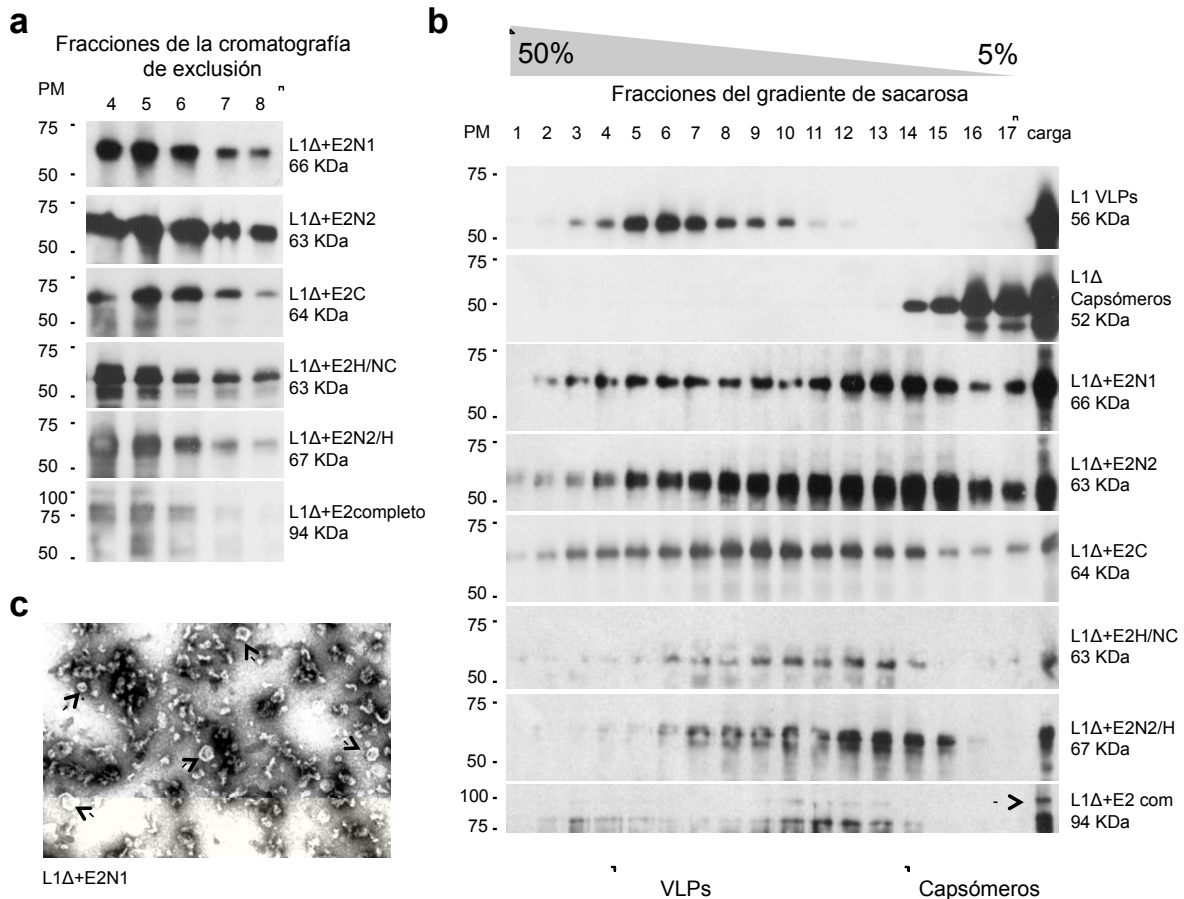
\*Tamaño en pares de bases (pb), número de residuos de aminoácido (aa) y peso molecular estimado (KDa) de los fragmentos de E2 de VPH16 clonados en pGex 4T-2\_L1Δ; y de las proteínas quiméricas correspondientes, con (GST+L1Δ+E2) y sin la bandera GST (L1Δ+E2).

## 9.2. Las proteínas quiméricas L1Δ+E2 de VPH16 forman agregados heterogéneos

Cada una de las seis distintas proteínas quiméricas fueron producidas en bacterias *E. coli* Rossetta, y purificadas mediante cromatografía de afinidad con el sistema *GST-Glutathione Sepharose*, como se detalla en Materiales y Métodos.

Con el objetivo de averiguar si la estructura tridimensional de las proteínas quiméricas permitía la formación de pentámeros, fueron analizadas mediante cromatografía de exclusión en condiciones no desnaturizantes. En el cromatograma de elución, el pico de proteínas estuvo en la fracción #4, la cual contenía la mayor cantidad de proteína, como se vio también en el análisis por WB anti-L1 de las fracciones eluidas (Figura 12a); ésto indica que las proteínas quiméricas adoptan arreglos que corresponden a pesos moleculares de 2000 KDa y más, lo cual es mayor al PM de los capsómeros (260 KDa), por lo que se especula que se forman polímeros heterogéneos, con 30 o más monómeros.

Luego, para continuar analizando la estructura cuaternaria de las proteínas, se tomó la fracción enriquecida (#4) para examinar su coeficiente de sedimentación en un gradiente de sacarosa del 50% al 5%, usando como controles VLPs de L1 VPH16 y capsómeros de L1Δ VPH16, cuyos coeficientes de sedimentación son conocidos (100-200S y 10S, respectivamente), así como la catalasa (11S). Después de la centrifugación durante 3 h a 36000 rpm, y el fraccionamiento del gradiente, se ratificó el índice de refracción de las 17 fracciones obtenidas, y se les analizó mediante WB anti-L1 (Figura 12b). Se observó que, excepto por L1Δ+E2com, las



**Figura 12. Las proteínas quiméricas forman partículas de distintos tamaños. (a)** Las proteínas purificadas fueron analizadas mediante cromatografía de exclusión; en western blot anti-L1, se observan las fracciones (4, 5, 6, 7, 8) obtenidas. **(b)** La fracción #4 de cada proteína en (a), fue analizada mediante centrifugación en gradiente de sacarosa 50%-5%, usando VLPs, capsómeros y catalasa como controles; se muestra el western blot anti-L1 de las fracciones obtenidas. A la derecha de cada panel se indican nombre y PM de las proteínas. **(c)** Microscopía electrónica de una fracción #4; las flechas señalan partículas de distintos tamaños. PM, peso molecular.

proteínas sedimentaron principalmente entre las fracciones 10 a 15; aunque también se encontraron en menor medida en las fracciones 5-7, que corresponden a los VLPs, y en las fracciones 14-17, que corresponden a los capsómeros. Este resultado está en concordancia con lo observado anteriormente en la cromatografía de exclusión: las proteínas quiméricas forman una mezcla heterogénea de partículas de distintos tamaños, que pueden contener desde uno hasta 72 capsómeros (VLPs).

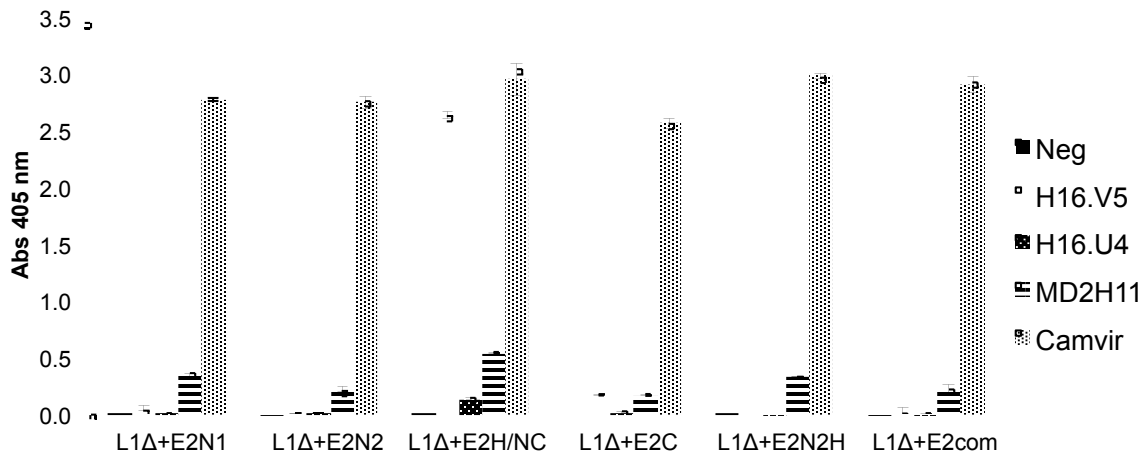
Continuando con el análisis estructural, las proteínas se contra-tiñeron con acetato de uranilo al 2% y se observaron al microscopio electrónico, donde se vio

que efectivamente, estaban formando partículas de diferentes tamaños (Figura 12c).

### 9.3. La proteína quimérica L1Δ+E2H/NC conserva el principal epítipo neutralizante de L1 de VPH16

Como siguiente objetivo, quisimos averiguar si las partículas heterogéneas permitían conservar la conformación de la proteína L1, de manera que mantuviera sus epítipos neutralizantes. Para ésto se realizó un ensayo ELISA con distintos anticuerpos específicos contra L1 de VPH16, dos de ellos que identifican epítipos lineales (CamVir-1, MD2H11), y otros dos, epítipos conformacionales (H16.V5, H16.U4). El H16.V5, en particular, reconoce el epítipo neutralizante más importante de L1 (168).

Como se observa en la Figura 13, todas las proteínas tuvieron reacción positiva al anticuerpo comercial CamVir-1, y muy baja al anticuerpo MD2H11. Sin embargo, en cuanto al epítipo H16.V5, sólo las proteínas L1Δ+E2H/NC y L1Δ+E2C arrojaron un resultado positivo, siendo la primera la que mostró mucha mayor



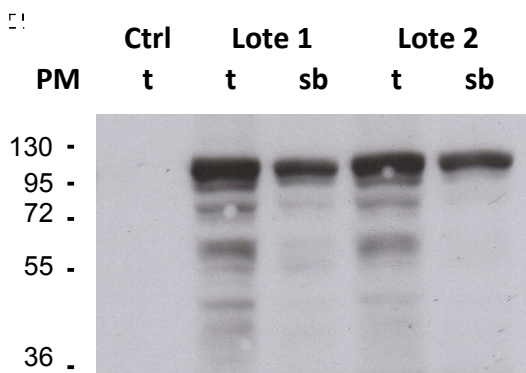
**Figura 13. La proteína quimérica L1Δ+E2H/NC presenta el epítipo neutralizante H16.V5 de L1.** La fracción #4 de las distintas proteínas obtenidas en la cromatografía de exclusión fue analizada mediante ELISA usando distintos anticuerpos monoclonales específicos contra epítipos lineales (MD2H11, CamVir-1) y conformacionales (H16.V5, H16.U4) de L1 de VPH16.

reactividad. La presencia del epítipo H16.V5 en la proteína L1Δ+E2H/NC sugiere que ésta podría inducir la producción de anticuerpos neutralizantes capaces de

prevenir infecciones, por lo que se decidió continuar el análisis de la inmunogenicidad celular sólo con esta proteína L1Δ+E2H/NC.

#### 9.4. Producción de la proteína L1Δ+E2H/NC a mayor escala

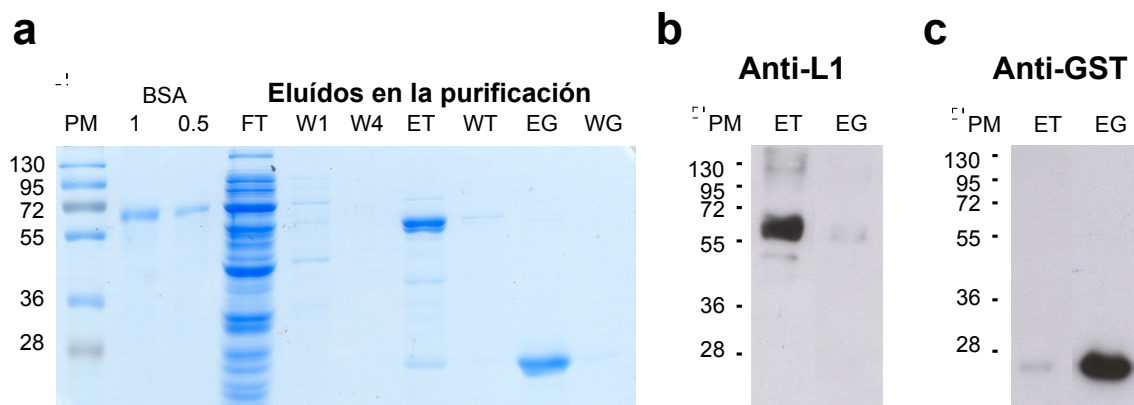
Para tener la cantidad suficiente de inmunógeno L1Δ+E2H/NC para los ensayos de inmunización, se optimizaron los procesos de producción y purificación de la proteína, a mayor escala. Se evaluó la producción de proteína en distintas cepas de *E. coli*; se eligió JM109DE3 debido a que se observó menor degradación y mayor recuperación de proteína. Se fijó el tiempo óptimo de inducción en 2 horas. Para extraer la mayor cantidad de proteína soluble en la lisis de la bacterias cosechadas, se eligió el buffer L con 2mM de DTT y 50 µg/ml de lisozima. También se estableció la temperatura de 30°C como óptima para obtener mayor producción sin menoscabar la solubilidad de la proteína, comparando con 20°C y 37°C; así como una densidad óptica de 0.4 para iniciar la inducción con IPTG (2 mM). En la Figura 14, se muestra la recuperación de proteína en la fracción soluble, después de centrifugar el sonicado total.



**Figura 14. La proteína L1Δ+E2H/NC se encuentra en la fracción soluble del lisado bacteriano.** La biomasa obtenida en la producción de L1Δ+E2H/NC en *E. coli* JM109-DE3 (lotes 1 y 2), se sonicó y centrifugó; luego se separó la fracción soluble (sb) del sonicado total (t). Se muestra un western blot con anticuerpo anti-GST-HRP. Ctrl, corresponde al lisado de bacterias JM109-DE3 no transformadas. PM, marcador de peso molecular.

Con dicha fracción, se inició el proceso de purificación mediante cromatografía de afinidad en lote, donde las proteínas con cola de GST fueron atrapadas en perlas de *Sepharose*<sup>TM</sup> 4B a través de moléculas de glutatión. Después de probar distintos tiempos (1, 3 y 16 horas) y temperaturas de incubación (4°C y temperatura ambiente). La fracción soluble se incubó en agitación rotatoria con las perlas, durante 3 horas a 4°C; posteriormente, se centrifugó y retiró la fase

móvil (FT, Figura 15a); las perlas se lavaron cuatro veces (W1, primer lavado; W4, cuarto lavado, Figura 15a) con buffer L, y se incubaron con proteasa trombina para eluir la proteína L1+E2H/NC escindida de la GST, que en el PAGE teñido con azul de Coomassie se observa como una banda de aproximadamente 63 KDa (ET, Figura 15a). Tras otro lavado (WT, Figura 15a), las perlas se incubaron con 10 mM de glutatión reducido, con lo que se eluyó una única banda correspondiente a la proteína GST, de 26 KDa (EG, Figura 15a); ésto muestra la eficiencia de la digestión con trombina, ya que sólo se observa una banda de 26 KDa, y no una de



**Figura 15. La proteína quimérica L1Δ+E2H/NC fue producida en *E. coli* JM109-DE3 y purificada mediante cromatografía de afinidad con GST-glutatión. (a)** PAGE teñido con azul de Coomassie mostrando los eluidos obtenidos en la purificación: efluente (FT) tras la captura de proteínas en la fase sólida; primer lavado de ésta (W1); cuarto lavado (W4); eluido de la proteína L1Δ+E2H/NC de 63 KDa (ET); lavado siguiente (WT); eluido de la bandera GST de 26 KDa (EG); y lavado final (FW).

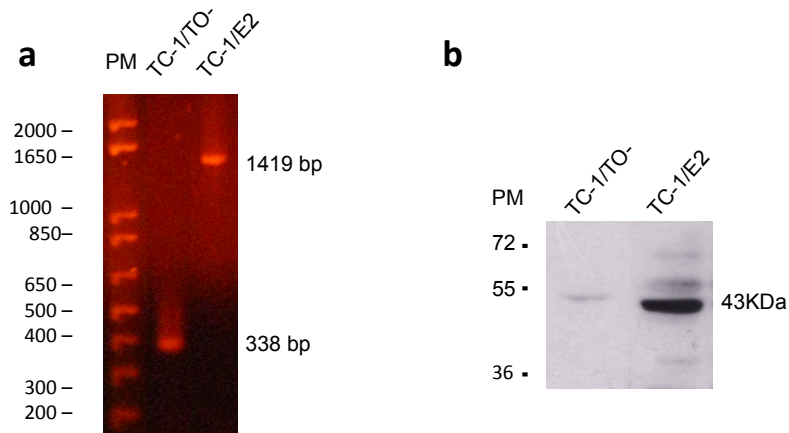
90 Kda, que correspondería a la proteína quimérica sin escindir (GST+L1+E2H/NC). Finalmente, se realiza un último lavado (WG, Figura 15a) para asegurar que se hubiera arrastrado toda la proteína. La proteína eluida con la digestión con trombina, se trató con PMSF, y Tritón X100 para retirar los LPSs; luego, se cuantificó, y mediante WB con anticuerpos anti-L1 HPV16 y anti-GST-HRP, se corroboró que las bandas observadas en el PAGE correspondieran a L1Δ+E2H/NC (Figura 15b) y GST (Figura 15c), respectivamente. A partir de 3.5 L de cultivo bacteriano, se obtuvo proteína L1Δ+E2H/NC a una concentración de 0.36 µg/µl, rendimiento de 270 µg/L y pureza de 97%.



Finalmente, la proteína se esterilizó mediante radiación gamma para ser usada como inmunógeno.

### 9.5. Células TC-1/E2 que expresan la proteína E2 de VPH16

Para la evaluación de la inmunogenicidad y efecto antitumoral de la proteína L1Δ+E2H/NC, fue necesario adaptar un modelo tumoral con ratones C57BL/6 y células singénicas TC-1 que expresaran la proteína E2 de VPH16. Se establecieron células TC-1/E2, transfectando la línea celular TC-1 con el vector pcDNA<sup>TM</sup>4/TO-E2HPV16 (Figura 16), el cual se construyó clonando la secuencia nucleotídica de E2 en el vector pcDNA<sup>TM</sup>4/TO, que es para expresión en eucariontes, con promotor de citomegalovirus y resistencia a zeocina.



**Figura 16. La línea celular TC-1/E2 contiene y expresa el gen de E2 de VPH16.** Se analizan ADN y proteína de las células TC-1/E2 obtenidas mediante transfección con el vector pcDNA4/TO-E2VPH16; y células TC-1/TO- transfectadas con el vector vacío pcDNA4/TO-, como control. (a) Gel de agarosa 1% con los productos de PCR correspondientes a E2 y el vector vacío. (b) Expresión de E2 en células transfectadas; western blot con anticuerpo primario anti-E2 1:1500 y secundario anti-ratón-HRP 1:30000. PM, peso molecular. A la derecha de cada panel se indica el peso en pares de bases (pb) y en KDa, respectivamente.

Se determinó la concentración de zeocina requerida para la selección de transfectantes de TC-1, eligiendo 200 µg/ml. Se llevó a cabo la transfección con los vectores pcDNA4/TO-E2 HPV16 y pcDNA4/TO- linearizados; las células resistentes se aislaron, expandieron y analizaron mediante PCR (amplificando el gen E2) y WB con anticuerpo anti E2 de VPH16. En la Figura 16a se muestran las clonas elegidas, donde el amplicón de 1419 pb obtenido de la PCR, revela la presencia de la

secuencia de E2 en las células TC-1/E2, y el amplicón de 338 pb su ausencia en las células control TC-1/TO-. Por su parte, el WB anti-E2 muestra la proteína E2 como una banda de 43 KDa en las células TC-1/E2, y ninguna en las células TC-1/TO- (Figura 16b).

### **9.6. La inmunización con la proteína quimérica L1Δ+E2H/NC induce respuesta celular citotóxica contra E2 de VPH16**

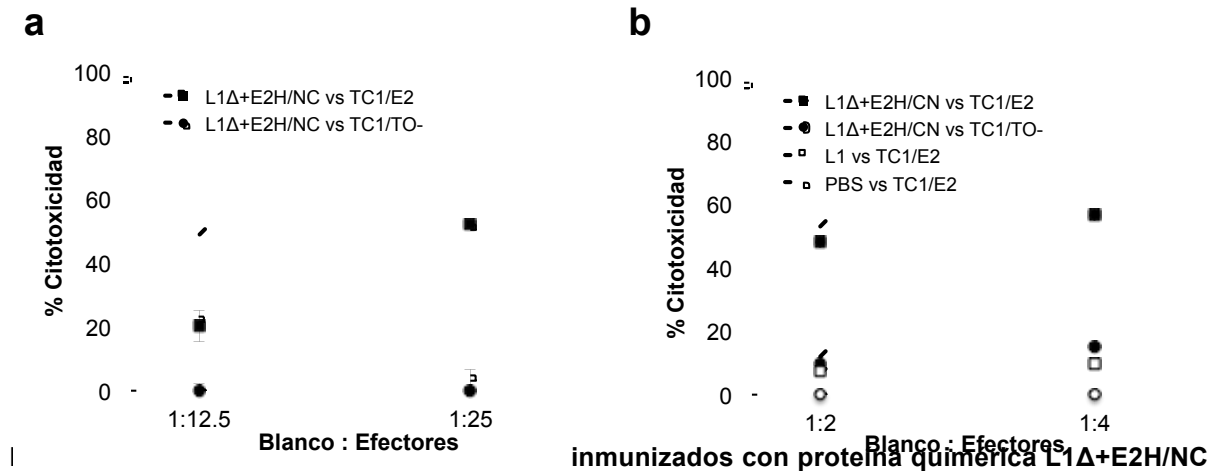
El siguiente objetivo fue evaluar la capacidad de la proteína L1Δ+E2H/NC para inducir respuesta inmune celular contra E2, en ratones. Se evaluó la citotoxicidad contra células que expresan y procesan endógenamente la proteína E2, mediante ensayos de liberación de <sup>51</sup>Cr y usando citometría de flujo con 7AAD/CFSE.

Un grupo de tres ratones fue inmunizado con 3 dosis de 5 µg de proteína L1Δ+E2H/NC en adyuvante de Freund (como se detalla en Materiales y Métodos); después de la última dosis, los ratones fueron sacrificados y los linfocitos de bazo fueron re-estimulados *ex vivo*. Después de 10 días se cosecharon y enfrentaron, en distintas proporciones, a células blanco TC-1/E2 y TC-1/TO- previamente marcadas con Cr<sup>51</sup>. Después de cuatro horas de incubación, se registró el <sup>51</sup>Cr liberado. Se encontró que los linfocitos lisaron a las células TC-1/E2, que expresan la proteína E2, aproximadamente en un 50%, mientras que dejaron intactas a las células TC-1/TO-, que no la expresan (Figura 17a).

Por otro lado, la citotoxicidad también fue evaluada mediante citometría de flujo con CFSE/7AAD. En este caso se inmunizaron tres grupos de ratones: un grupo recibió tres dosis de 5 ug de proteína L1Δ+E2H/NC en adyuvante de Freund (n=4), otro grupo recibió 5 ug de proteína L1 (Gardasil®; n=3), y otro, PBS en adyuvante (n=3). Tres semanas después de la última dosis de inmunización, los ratones fueron sacrificados; se extrajeron los bazos, y sus células fueron re-estimuladas *ex vivo* durante 7 días. Luego, los linfocitos CD8+ se separaron y enfrentaron contra distintas proporciones de células blanco, las cuales fueron previamente marcadas con CFSE; después de cuatro horas de co-cultivo, las células se cosecharon y tiñeron con 7AAD. Como se muestra en la Figura 17b, la

citotoxicidad de los linfocitos T CD8+ obtenidos de ratones inmunizados con proteína L1Δ+E2H/NC, lisaron el 56% de las células que expresaban E2 (TC-1/E2), mientras que contra las células sin proteína E2 (TC-1/TO-) hubo mucha menor lisis. Los linfocitos de ratones inmunizados con proteína L1 o PBS, en cambio, no lisaron a las células TC-1/E2.

Con estos resultados, mostramos que la inmunización con proteína quimérica



ejercen citotoxicidad específica contra la proteína E2 de VPH16. **(a)** Ensayo de citotoxicidad contra la proteína E2 endógenamente procesada, mediante liberación de <sup>51</sup>Cr. Los linfocitos (Efectores; 1.25x10<sup>5</sup> y 0.65x10<sup>5</sup>) de tres ratones C57BL/6 inmunizados con 5 μg de proteína L1Δ+E2H/NC (como se detalla en Materiales y Métodos) fueron retados contra 5x10<sup>3</sup> células blanco TC-1/E2 (L1Δ+E2H/NC vs TC1/E2) o células control TC-1/TO- marcadas con <sup>51</sup>Cr (L1Δ+E2H/NC vs TC1/TO-); se registró la liberación de cromo después de 4 horas a 37°C. **(b)** Ensayo de citotoxicidad mediante citometría de flujo usando CFSE/7AAD. Los linfocitos CD8+ obtenidos de células de bazo de ratones inmunizados con proteína L1Δ+E2H/NC, fueron enfrentados contra células blanco TC-1/E2 (L1Δ+E2H/NC vs TC1/E2) o TC-1/TO- marcadas con CFSE (L1Δ+E2H/NC vs TC1/TO-); tras cuatro horas de co-cultivo, se tiñeron con 7AAD. Otro grupo de ratones fue inmunizado con proteína L1 de VPH16 (L1 vs TC1/E2), y un tercer grupo con PBS (PBS vs TC1/E2); sus linfocitos CD8+ se enfrentaron contra células TC-1/E2 marcadas con CFSE. El % citotoxicidad es el porcentaje de células lisadas (7AAD+) entre las células blanco (CFSE+). Se muestra el promedio de duplicados de un ensayo representativo en cada caso.

L1Δ+E2H/NC induce una respuesta celular citotóxica capaz de reconocer y lisar específicamente, células tumorales que expresan la proteína E2 de VPH16.

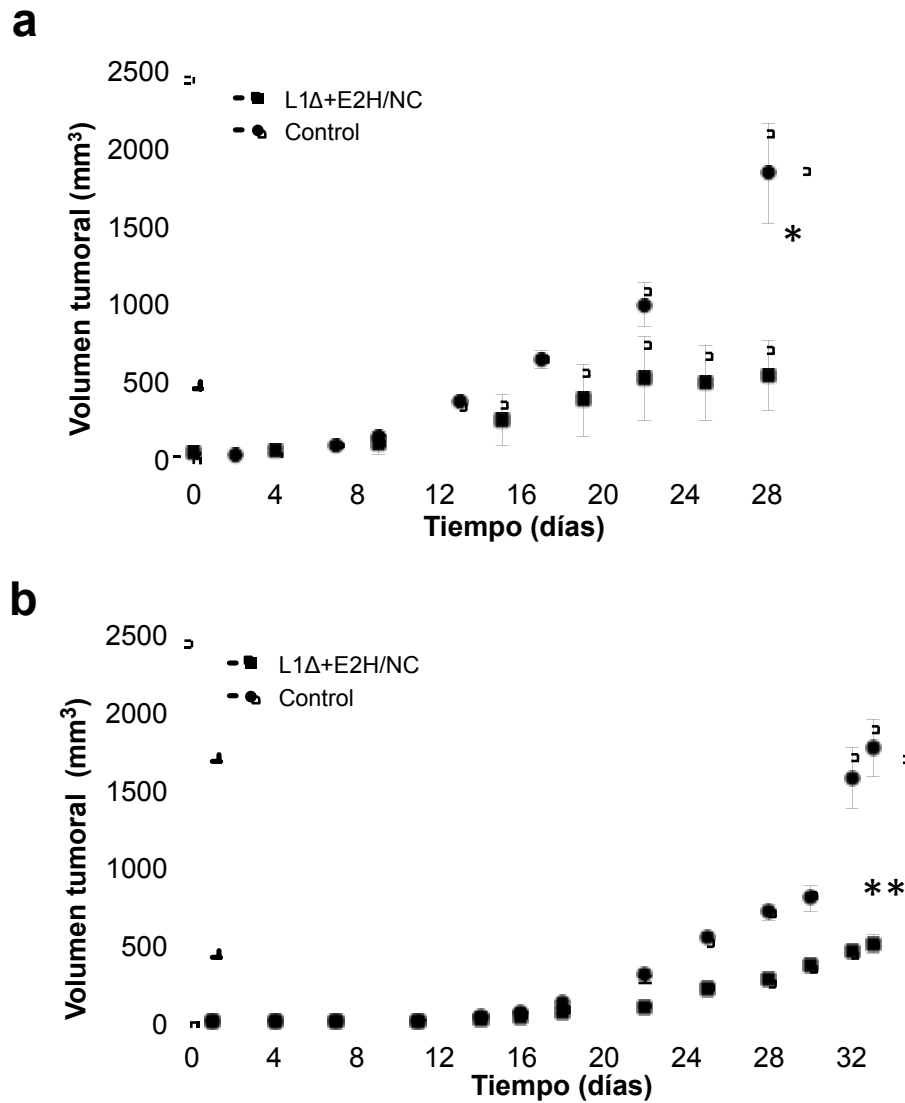
### **9.7. La inmunización con la proteína quimérica L1Δ+E2H/NC inhibe el crecimiento de tumores en ratones**

Posteriormente, quisimos averiguar si la respuesta celular inducida por la inmunización con proteína L1Δ+E2H/NC que se observó *in vitro*, podía repercutir en el crecimiento de tumores en ratones. Para ello, se realizó el ensayo de reto tumoral en el modelo murino de células tumorales TC-1/E2 y ratones C57BL/6 inmunocompetentes.

Se implantaron por vía subcutánea 60 000 células TC-1/E2 en el dorso de trece ratones; una vez que la masa tumoral alcanzó un volumen de 20-30 mm<sup>3</sup>, se inició el referido protocolo de inmunización; un grupo de siete ratones fue inmunizado con proteína L1Δ+E2H/NC en adyuvante, y otro grupo, con seis ratones, recibió PBS en adyuvante; se monitoreó el volumen tumoral durante 33 días. Al día 33, los ratones inmunizados con proteína L1Δ+E2H/NC tuvieron un volumen tumoral promedio de 505 mm<sup>3</sup>, mientras que el grupo control tuvo 1776 mm<sup>3</sup> (Figura 18a). Aunque el crecimiento tumoral no fue completamente abatido, la inmunización con L1Δ+E2H/NC inhibió el volumen tumoral en aproximadamente 70%; lo cual representa una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.0210$ ).

Se realizó otro experimento independiente, donde cuatro ratones fueron inmunizados con L1Δ+E2H/NC, y otros cuatro con PBS en adyuvante. Al día 28, el tamaño promedio de los tumores en el primer grupo fue 535 mm<sup>3</sup>, mientras que en el grupo control fue de 1835 mm<sup>3</sup> (Figura 18b). De nuevo se observó una inhibición de aproximadamente 70% ( $p=0.0286$ ). Además, un grupo de tres ratones fue inmunizado con proteína L1 (Gardasil®), observándose al día 31 un volumen tumoral promedio de 1559 mm<sup>3</sup>, similar al del grupo que recibió PBS.

Con estos resultados, concluimos que la inmunización con la proteína quimérica L1Δ+E2-H/NC induce una respuesta citotóxica de linfocitos T específica contra E2 de VPH16, que inhibe el crecimiento de tumores VPH16-positivos en ratones.



**Figura 18. La inmunización de ratones con la proteína L1Δ+E2H/NC tiene efecto antitumoral.** (a) Se inyectaron  $6 \times 10^4$  células tumorales TC-1/E2 en el dorso de ratones C57BL/6; cuando la masa tumoral alcanzó 20-30 mm<sup>3</sup>, cuatro ratones recibieron la primera inmunización con 5 µg de proteína L1Δ+E2H/NC en adyuvante completo de Freund (día 0), y la segunda (día 10) y tercera dosis (día 25) en adyuvante incompleto de Freund (L1Δ+E2H/NC). Cuatro ratones en el grupo control recibieron PBS en el adyuvante correspondiente (Control). El tamaño del tumor se midió usando un vernier electrónico. \* $p=0.0286$ . (b) Ensayo independiente bajo el mismo protocolo que en (a), empleando siete ratones en el grupo inmunizado con proteína química (L1Δ+E2H/NC), y seis en el grupo que recibió PBS (Control). \*\* $p=0.0210$ .

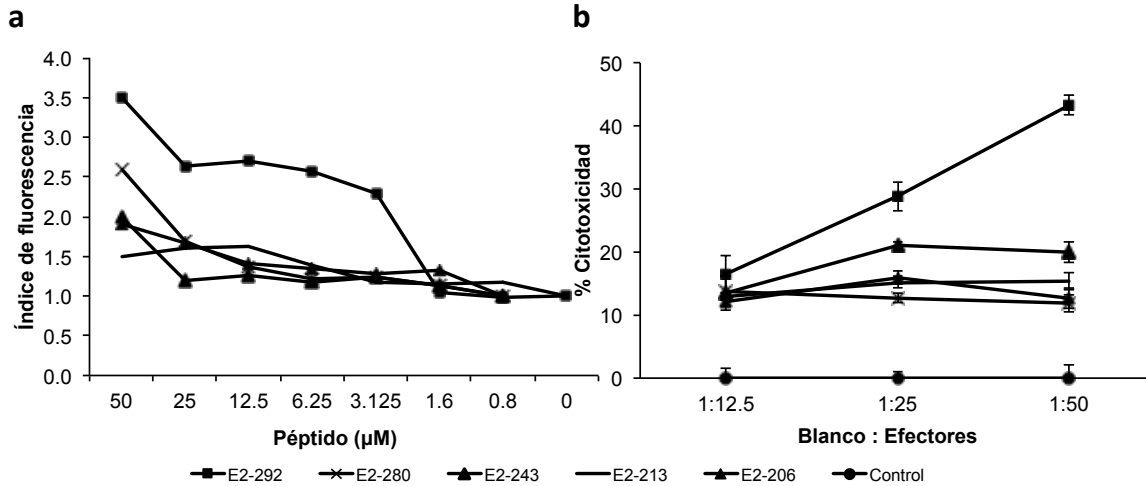
### **9.8. Identificación de un epítopo de E2 de VPH16 implicado en la respuesta celular citotóxica**

Finalmente, quisimos definir los epítopes de E2 dentro de la proteína quimérica L1Δ+E2-H/NC, la cual contiene los aminoácidos 206-307 de E2 de VPH16. Se realizó una búsqueda *in silico* de epítomos teóricos, usando herramientas informáticas de predicción. Se encontraron cinco péptidos con probable afinidad por la molécula H2-D<sup>b</sup>: péptido E2-206 (que incluye los aminoácidos 206 al 215 de E2, con la secuencia SSPEIIRQHL), péptido E2-213 (aa's 213-221, QHLANHPAA), péptido E2-243 (aa's 243-252, SEPDTGNPCH), péptido E2-280 (aa's 280-288, NCNSNTTPI) y péptido E2-292 (aa's 292-301, KGDANTLKCL). La afinidad *in vitro* de estos péptidos se evaluó mediante ensayos de afinidad en células RMA-S; cada péptido se incubó a concentraciones crecientes con una cantidad fija de células, y la capacidad del péptido para estabilizar en superficie la molécula H2-D<sup>b</sup> se midió mediante citometría de flujo. El péptido E2-292 mostró mayor afinidad por la molécula H2-D<sup>b</sup>, mientras que el resto sólo se unió sólo estando a la concentración de 50 µM (Figura 19a). Ésto sugiere que el péptido E2-292 constituye un posible epítopo en la inducción de la respuesta celular específica contra E2 observada en ratones. Para determinarlo, evaluamos si los linfocitos obtenidos de ratones inmunizados con proteína L1Δ+E2-H/NC, podían reconocer el péptido en la superficie de células blanco.

Se realizó otro ensayo de citotoxicidad por liberación de cromo. Tres ratones C57BL/6 fueron inmunizados tres veces con 5 µg de proteína L1Δ+E2-H/NC (bajo el mismo protocolo empleado anteriormente), los linfocitos de bazo obtenidos, fueron re-estimulados y posteriormente colocados en placas de 96 pozos, donde también se agregaron, como células blanco, células RMA-S previamente cargadas con 50 µM de cada péptido, independientemente, y marcadas con <sup>51</sup>Cr; luego de la incubación durante cuatro horas a 37°C, se midió la liberación de cromo en el sobrenadante. Contra las células RMA-S cargadas con los péptidos E2-206, -213, -243 y -280, los linfocitos tuvieron una citotoxicidad baja de aproximadamente 15%, congruentemente con la baja afinidad por H2-D<sup>b</sup> vista anteriormente; mientras que al enfrentarlos contra células RMA-S cargadas con el péptido E2-292, se registró un

porcentaje de citotoxicidad de hasta 45%, similar al obtenido contra células que expresan la proteína E2 completa (Figura 19b).

Estos resultados muestran que el péptido con aa's 292-301 de E2 es un epítipo importante involucrado en la respuesta celular citotóxica, en ratones H2-D<sup>b</sup>, contra células y tumores que expresan la proteína E2 de VPH16.



**Figura 19. La inmunización con proteína L1Δ+E2H/NC induce linfocitos citotóxicos contra el péptido aa's 292-301 de la proteína E2 de VPH16. (a)** Afinidad de distintos péptidos de E2 de VPH16, identificados *in silico*, por la molécula H2-D<sup>b</sup> en células RMA-S. Los péptidos sintéticos se incubaron con  $2 \times 10^5$  células RMA-S; después de agregar sobrenadante de hibridoma anti-H2-D<sup>b</sup> y anticuerpo anti-ratón-FITC (Floresceína isotiocianato), se midió la intensidad de fluorescencia en citómetro de flujo. **(b)** Ensayo de citotoxicidad mediante liberación de <sup>51</sup>Cr. Tres ratones fueron inmunizados con 3 dosis de 5 µg de proteína L1Δ+E2H/NC; los linfocitos de bazo obtenidos fueron re-estimulados *in vitro* y enfrentados (Efectores; 2.5, 1.25 y 0.625x10<sup>5</sup>) contra 5x10<sup>3</sup> células RMA-S (Blanco) cargadas con 50 uM de péptidos y marcadas con <sup>51</sup>Cr. Después de 4h, se midió la liberación de cromo usando un contador de centelleo gama. Control, células blanco no cargadas con péptidos.

## 10. DISCUSIÓN

El CaCu es un problema que se acentúa en países en vías de desarrollo, debido en gran medida, a los sistemas de salud pública. En muchos países, incluido México, se ha empezado a aplicar una de las vacunas profilácticas a niñas de 9-12 años, con lo que ésta población queda protegida contra la infección por los tipos de VPH que incluye la vacuna. Sin embargo, en las mujeres que han estado expuestas al virus, la profilaxis no es suficiente, y ésto aunado a la insuficiente cobertura de los programas de detección de infección por VPH, las deja en riesgo de desarrollar lesiones cervicales y, eventualmente, CaCu. En este panorama, se requiere una vacuna con características terapéuticas para eliminar células con presencia de VPH, y preferentemente, también con características profilácticas para evitar, al mismo tiempo, nuevas infecciones.

El objetivo de este trabajo fue generar capsómeros quiméricos capaces de inducir una respuesta inmune celular citotóxica contra E2, con efecto terapéutico sobre tumores VPH16-positivos, y que mantuvieran la antigenicidad profiláctica de la proteína L1; siendo producidos en un sistema económico, como lo son las bacterias.

En estudios previos, se ha mostrado que los capsómeros de proteína L1 inducen la producción de anticuerpos neutralizantes (43,133,138,152) que son capaces de prevenir la infección por VPH (172,175); y además, como prueba de principio, se mostró que pueden inducir respuesta inmune celular citotóxica contra L1 e inhibir el crecimiento de tumores en ratones (115).

Además, la producción de capsómeros puede hacerse en bacterias, las cuales ofrecen un proceso más económico; de esta manera se han obtenido capsómeros que conservan su estructura (19,20) y son capaces de inducir anticuerpos neutralizantes (115,118) de una manera similar a los VLPs producidos en células de insecto (112). El riesgo que representan los LPSs en el uso de bacterias, puede ser eficientemente disminuido mediante el tratamiento con Tritón X-114 (139). De hecho, recientemente, una vacuna profiláctica bivalente producida en *E. coli*, probó ser segura e inmunogénica en el estudio clínico fase 2 (171).



Además, se ha mostrado que la inmunogenicidad de L1 se conserva cuando es unida a otra proteína (segmento de E7) para formar capsómeros quiméricos (4).

Por otro lado, la respuesta inmune celular inducida por la proteína E2, ha mostrado potencial terapéutico en modelos animales (75,145,146) y también parece tener un papel importante en la respuesta contra el virus en seres humanos (7,27,28,30,60,71,85,155,170). Específicamente contra E2 de VPH16, también han habido esfuerzos para producir vacunas terapéuticas (146). Se ha mostrado que la proteína sola como inmunógeno en ratones, induce proliferación de linfocitos y citotoxicidad *in vitro*, aunque este grupo no probó su efecto en el desarrollo de tumores (59). El segmento de proteína L1Δ+E2H/NC que empleamos, además va en un acarreador estructurado, complejo y estable, como lo son la cápside del VPH y sus subunidades capsoméricas, que tienen comprobada capacidad de introducirse en las vías de la respuesta inmune celular (115).

Otros grupos han usado vectores virales como el virus vaccinia Ankara (45) y adenovirus (163), con buenos resultados terapéuticos, pero con el riesgo que conlleva el uso de vector virales. También se han probado quimeras con E2, sin embargo, éstas fueron producidas en células de insecto, y aunque sí vieron citotoxicidad *in vitro*, su efecto *in vivo* tampoco fue evaluado (122).

Por otro lado, se ha criticado que las vacunas que emplean la cápside viral, están expuestas al bloqueo por la respuesta humoral debido a los anticuerpos inducidos tras la primera dosis contra la cápside. Para averiguar ello, podríamos evaluar los anticuerpos generados tras la primera dosis; aunque se sabe por las vacunas profilácticas que existen en el mercado, que para alcanzar títulos neutralizantes, se requieren al menos dos dosis (32). Una estrategia para sortear esto sería la inmunización heteróloga; podría probarse un protocolo donde la primera o las primeras dos dosis fueran capsómeros L1Δ+E2H/NC, y la tercera el péptido E2-292.

La respuesta inmune celular contra E2 ayudaría a mujeres con lesiones cervicales de bajo grado, debido a que la proteína E2 se expresa abundantemente en las capas intermedias del epitelio estratificado cervical (174). Ayudaría también a eliminar infecciones latentes e incipientes, así como lesiones de bajo grado que

persisten o reinciden después de tratamiento, ya que E2 también es expresada en células basales y para-basales, donde es indispensable, junto con E1, para establecer la infección y mantener el genoma viral (37).

En este trabajo, se produjeron seis capsómeros quiméricos fusionando L1 $\Delta$ N10 $\Delta$ 29 con la proteína E2 completa y con distintos fragmentos de ella, en cultivos bacterianos. La proteína L1 $\Delta$ N10 $\Delta$ 29 es más soluble en bacterias, debido a la deleción de 10 residuos de aminoácido en su extremo amino-terminal (19); y la deleción de 29 aa's permite la fusión de otro polipéptido en su extremo carboxilo-terminal sin afectar la estructura, estabilidad y capacidad de formación de capsómeros, como tampoco la inmunogenicidad de la proteína L1 (19,20,112,138). La proteína L1 $\Delta$ N10 $\Delta$ 29 fue caracterizada por Schädlich, *et al.*, 2009 (138).

Las seis proteínas quiméricas se purificaron mediante cromatografía de afinidad, y analizaron mediante cromatografía de exclusión, sedimentación en gradiente de sacarosa, microscopía electrónica y ELISA específica contra distintos epítomos de L1 de VPH16.

De la cromatografía de exclusión obtuvimos proteínas quiméricas de distintos tamaños por arriba del de capsómeros. Cuando se analizó la fracción con mayor cantidad de proteína centrifugando en gradiente de sacarosa, el perfil de sedimentación observado, mostró que se forman partículas de distintos tamaños. Y ésto fue visto también en imágenes de microscopía electrónica. Schädlich, *et al.* (2009) habían mostrado que la proteína L1 $\Delta$ N10 $\Delta$ 29 se ensambla en capsómeros, y que puede formar VLPs pequeños (138) tras un tratamiento de ensamblaje con solución de Acetato de sodio 40 mM pH 5.4, NaCl 1M, 0.01% Tween80, incubando 2 horas a temperatura ambiente. Sin embargo, en nuestras proteínas quiméricas el polipéptido de E2 parece estar alterando la estructura del monómero, de manera que se forman capsómeros y otras partículas de distintos y mayores tamaños, que pueden ser VLPs pequeños o T=7.

Entre los factores que influyen en la estructura cuaternaria de L1, están las condiciones del medio. Las interacciones entre monómeros para formar capsómeros son fuertes, son puentes de hidrógeno en el cuerpo y parte superior; mientras que los contactos entre capsómeros para formar VLPs pequeños T=1 o

VLPs T=7 son más débiles, son interacciones hidrofóbicas (20,91,136). Diversos trabajos han mostrado que el pH, la fuerza iónica, los agentes reductores, y la temperatura afectan el grado de ensamblaje y desensamblaje de L1. La formación de los VLPs T=7 se favorece a pH bajo (16,17,19) y fuerza iónica alta (0.5-1 M NaCl); mientras que un pH mayor a 8.2 y una menor concentración de NaCl, en presencia de agentes reductores, los desensambla hasta capsómeros. Por ejemplo, McCarthy, *et al.* (1998) desensambló VLPs en condiciones fisiológicas de pH y fuerza iónica (0.1 M NaCl), incubando con una alta concentración del agente reductor  $\beta$ -mercaptoetanol (0.64 M), durante largo tiempo (16 h) a 4°C; y re-ensambló dializando 24 h contra PBS y 0.5 M NaCl (103). Mach, *et al.* (2006), por su parte, empleó relativamente baja concentración del agente reductor DTT (2-20 mM) para desensamblar VLPs, pero subió el pH a 8.2 y bajó la fuerza iónica (0.6 M NaCl), incubando 1 h a temperatura ambiente; y re-ensambló dializando contra una solución con 0.5-1 M NaCl y pH 6-7 (94). Bishop, *et al.* (2007), también ensambló VLPs T=7 incubando 30 min a 25°C con NaCl 1M, 40 mM acetato de sodio a pH 5.4 (5). En el caso de la proteína L1 $\Delta$ N10, que sólo tiene delección de los primeros 10 aa's, la formación de capsómeros no se ve afectada, y pueden ensamblarse VLPs pequeñas T=1 con 12 capsómeros pentavalentes, pero no se forman VLPs T=7, aún a pH 4 (19). Modis (2006), propone que la importancia del extremo N-terminal en la formación de VLPs T=7 radica en que estabiliza la unión intercapsomérica insertándose en espacios en la base de la estructura, que quedan tras la invasión por el extremo carboxilo-terminal del capsómero vecino (107). Quizá el polipéptido de E2 en L1 $\Delta$ +E2H/NC esté ocupando estos espacios

El hecho de que las proteínas quiméricas tengan íntegra la hélice h4, permitiría que ésta interactuara con h2 y h3 de otro capsómero, pudiendo establecer la unión intercapsomérica que es necesaria en los VLPs pequeños, como ocurre con la proteína L1 $\Delta$ N10 $\Delta$ 29 sola; en cambio, proteínas L1 a las que les fue deletada h4, ya no forman VLPs pequeños (138). Tales interacciones podrían favorecer que nuestras proteínas formen agregados.

Por otro lado, los puentes disulfuro no son indispensables en la formación de VLPs T=1, pero son importantes en la estabilización de VLPs T=7 (91,136). Las

cisteínas C428 y C175 entre las que se establece el puente, no están mutadas en L1 $\Delta$ N10 $\Delta$ 29, y aunque usamos 0.5 M NaCl y pH 8.2, quizá el 2 mM DTT no fue suficiente para evitar la formación de dichos puentes, dando lugar a la unión entre varios capsómeros, y así la generación de partículas de mayor tamaño que las VLPs T=1.

Luego, al evaluar la estructura de la proteína L1 $\Delta$ N10 $\Delta$ 29 en las seis construcciones producidas, buscando epítomos característicos de la L1 nativa mediante ELISA con los anticuerpos CamVir-1, MD2H11, H16.U4 y H16.V5, sobresale que sólo la construcción L1 $\Delta$ +E2H/NC exhibió el epítomo H16.V5, el cual es un epítomo conformacional tipo-específico, necesario y suficiente para la inducción de anticuerpos neutralizantes (168); y contra el que se genera la mayor proporción de anticuerpos neutralizantes en las personas vacunadas (164). El hecho de que la proteína L1 $\Delta$ +E2H/NC conserve este epítome evidencia que se ensambla, al menos, en capsómeros, ya que el epítomo comprende 17 aminoácidos distribuidos en 5 bucles apicales entrelazados entre dos monómeros vecinos dentro de un capsómero (los bucles BC, FG y DE de un monómero, y HI y DE del monómero vecino) (88). Con este resultado, decimos que la proteína quimérica L1 $\Delta$ +E2H/NC tiene potencial profiláctico; sin embargo, para demostrarlo sería necesario evaluar su inmunogenicidad *in vivo*.

Tratando de explicar porqué el anticuerpo H16.V5 se unió sólo a la proteína con el segmento E2H/NC, especulamos que pudo deberse a que éste contiene la parte del extremo carboxilo de E2 precedida por la región bisagra, la cual es una estructura flexible, que habría permitido a L1 tomar su estructura (102); mientras que en el resto, la proteína L1 $\Delta$ N10 $\Delta$ 29 se unió directamente a un dominio o parte de un dominio amino- o carboxilo-terminal de E2, los cuales tienen estructuras no flexibles, y definidas como hojas beta y hélices alfa (58), las pudieron obstruir el ensamblaje o desestabilizar a L1.

En cuanto al epítomo H16.U4, que también es un anticuerpo conformacional tipo-específico, no detectamos reactividad contra ninguna de las construcciones. La ubicación del epítomo (aa's 427-445) podría explicar este resultado, ya que se encuentra en el extremo carboxilo terminal de L1, entre la hélice h4 (aa's 413-430) y

la cadena bJ (16), las cuales son parte del brazo protuberante que conecta a los capsómeros. En los capsómeros solubles, el epítipo se encuentra en las salientes laterales de su base; y en los VLPs, se encuentra inmerso en el canal intercapsomérico (20,107). Es en el extremo de este brazo donde fusionamos los fragmentos de la proteína E2; quizá estén obstruyendo o distorsionando el epítipo dada su cercanía, lo cual aunado a la baja afinidad del anticuerpo, que es 10 veces menor que la de H16.V5 (26,165), pudo resultar en la no reactividad.

Al parecer, en la proteína L1Δ+E2H/NC, el fragmento E2H/NC unido al extremo carboxilo-terminal de L1, no afecta la estructuración del cuerpo principal y más rígido de la proteína, en cuyos bucles apicales se encuentra el epítipo H16.V5 (17,21), pero sí alcanza a afectar su brazo saliente que tiene cierta flexibilidad. La capacidad neutralizante del anticuerpo H16.U4 es menor que la de H16.V5 (26,130); se ha mostrado que la ausencia del epítipo no interfiere con la capacidad de la partícula de generar respuesta humoral neutralizante, como sí ocurre en ausencia del epítipo de H16.V5 (168). Así pues, podemos decir que la proteína quimérica L1Δ+E2H/NC tiene potencial profiláctico.

Luego, para evaluar la capacidad de L1Δ+E2H/NC de inducir respuesta inmune celular, la estrategia fue inmunizar ratones y tomar los linfocitos de bazo para evaluar su reactividad específica contra E2 de VPH16. Observamos que las proteínas quiméricas L1Δ+E2H/NC activaron linfocitos T CD8+ capaces de lisar específicamente células tumorales que expresan y procesan endógenamente la proteína E2. Mediante ensayos de citotoxicidad por liberación de <sup>51</sup>Cr, se detectó 52% de citotoxicidad, y mediante citometría de flujo usando CFSE/7AAD, 56%. Aunque las proporciones de células efectoras respecto a las blancas fueron diferentes (1:25 y 1:4, respectivamente), se obtuvieron valores de citotoxicidad similares, lo cual atribuimos a que en los ensayos con cromo se emplearon los linfocitos totales obtenidos del bazo, mientras que para los ensayos con citometría se purificaron los linfocitos T CD8+.

Y aún más importante, observamos que la respuesta citotóxica de linfocitos T CD8+ inducida mediante la inmunización con L1Δ+E2H/NC, tuvo efecto terapéutico, ya que inhibió en 70% el crecimiento de tumores VPH positivos previamente

desarrollados en ratones, lo cual simula el escenario en mujeres con presencia de lesiones de bajo grado o incipientes, para quienes está dirigida la vacuna. Sin embargo, no se pueden dejar de lado las limitaciones del modelo, ya que el tumor fue implantado en el dorso de los ratones, y no iniciado en el cérvix, como sería la vía natural. Aunque no logramos la inhibición total del tumor, sí hubo un efecto importante, que puede sumarse a otras estrategias.

Continuando, proponemos que un alto porcentaje de la población de linfocitos T inducidos por la inmunización con L1 $\Delta$ +E2H/NC, son específicos contra el péptido E2-292, ya que la citotoxicidad registrada contra células cargadas con este péptido fue mayor. Además, este péptido se encuentra en el dominio carboxilo-terminal, el cual se ha reportado como el más inmunogénico de la proteína (7,59).

Con los resultados obtenidos, concluimos que las proteínas quiméricas L1 $\Delta$ +E2H/NC producidas en un sistema económico como son las bacterias, inducen una respuesta inmune celular citotóxica específica contra E2 de VPH16, capaz de inhibir el crecimiento de tumores VPH-positivos en ratones, mostrando así actividad terapéutica; y que también podrían tener actividad profiláctica, ya que conservan el principal epítipo neutralizante de la proteína L1 de VPH16. Además, encontramos un péptido de E2 (aa's 292-301) que induce actividad citotóxica fuerte (93), y proponemos podría evaluarse si también la induciría en humanos, para ser incluido en la generación de nuevas vacunas terapéuticas.

## 11. CONCLUSIONES

- En este trabajo fusionamos una proteína L1 modificada (L1 $\Delta$ N10 $\Delta$ C29, con delección de 10 aminoácidos en su extremo amino terminal y 29 en su extremo carboxilo-terminal) con distintos segmentos o la proteína completa E2 de VPH16, y generamos capsómeros quiméricos. Mostramos que los capsómeros quiméricos forman partículas de tamaño heterogéneo.
- Encontramos que la proteína quimérica L1 $\Delta$ +E2H/NC, que contiene los aminoácidos 206-307 de la proteína E2, conserva el epítipo neutralizante más importante de L1, H16V5, por lo que esta construcción tiene potencial profiláctico.
- Mostramos que la inmunización con proteína quimérica L1 $\Delta$ +E2H/NC induce la activación de linfocitos citotóxicos CD8+, capaces de reconocer y lisar células tumorales que expresan la proteína E2 de VPH16.
- Además, la respuesta citotóxica específica contra E2 generada por la inmunización con proteína L1 $\Delta$ +E2H/NC, inhibe el crecimiento de tumores en un modelo murino.
- Finalmente, encontramos que el péptido E2 292-301 es un epítipo H2D<sup>b</sup> importante en la respuesta citotóxica contra E2.

Con los resultados obtenidos en el desarrollo de este trabajo pudimos mostrar que la proteína quimérica L1 $\Delta$ +E2H/NC, producida en bacterias, puede ser candidata para una vacuna económica combinada, terapéutica y profiláctica, que ayude a eliminar lesiones cervicales de bajo grado positivas a VPH16 e infecciones persistentes, previniendo el desarrollo de lesiones y, al mismo tiempo, impidiendo nuevas infecciones.

## 12. PERSPECTIVAS

- Para mejorar el efecto terapéutico mostrado en este trabajo, podrían probarse otros protocolos de inmunización, variando la dosis de antígeno y del adyuvante, incluyendo inmunomoduladores, aplicando protocolos heterólogos donde la primera dosis consistiría en capsómeros quiméricos, y el refuerzo, en péptidos E2 292-301.
- Sería interesante evaluar la respuesta citotóxica y el efecto antitumoral que tendría la inmunización sólo con el péptido E2 292-301. También, evaluar la afinidad de este péptido por distintos haplotipos de HLA-I, y podrían realizarse ensayos de afinidad *in vitro* como el descrito en este trabajo, pero empleando células T2, las cuales son deficientes en el transportador asociado al procesamiento de antígenos en humanos.
- Convendría realizar ensayos de neutralización para determinar la inducción de anticuerpos neutralizantes en el ratón, tras la inmunización con proteína quimérica L1Δ+E2H/NC, para corroborar su actividad profiláctica.
- Para mejorar los tratamientos terapéuticos contra lesiones ocasionadas por VPH, proponemos que nuestra proteína quimérica podría conjugarse con otras vacunas que han sido producidas con el mismo objetivo, por ejemplo, con la que actualmente trabaja el grupo del Dr. Monroy-García (108), donde VLPs quiméricos contienen varios péptidos inmunogénicos de la proteína E7 de VPH16 unidos en tándem a la proteína L1; nuestras proteínas quiméricas L1Δ+E2H/NC podrían simplemente mezclarse con estos cVLPs, generando una vacuna bivalente; o alternatively, podría incluirse el péptido E2-292 en el tándem de péptidos de E7. La citotoxicidad y actividad antitumoral inducidas podrían evaluarse en el modelo murino que empleamos en este trabajo, ya que las células TC-1/E2, expresan E7, además de E2.
- Para eficientar la producción de la proteína quimérica L1Δ+E2H/NC, el proceso podría escalarse a planta piloto, para producir con mayor facilidad más de 10 litros de cultivo.



### 13. REFERENCIAS

1. Bergvall M, Melendy T, Archambault J. The E1 proteins. *Virology* 2013;445:35–56.
2. Bernard H, Calleja-macias IE, Dunn ST. Genome variation of human papillomavirus types: Phylogenetic and medical implications. *Int J Cancer* 2006;118:1071–1076.
3. Bernard H, Burk R, Chen Z, *et al.* Classification of Papillomaviruses (PVs) Based on 189 PV Types and Proposal of Taxonomic Amendments. *Virology* 2010;4011:70–79.
4. Bian T, Wang Y, Lu Z, *et al.* Human papillomavirus type 16 L1E7 chimeric capsomeres have prophylactic and therapeutic efficacy against papillomavirus in mice. *Mol Cancer Ther* 2008;7:1329–1335.
5. Bishop B, Dasgupta J, Chen XS. Structure-based engineering of papillomavirus major capsid I1: controlling particle assembly. *Viol J* 2007;4:3.
6. Bodily J, Laimins LA. Persistence of human papillomavirus infections: keys to malignant progression. *Trends Microbiol* 2011;19:33–39.
7. Bontkes HJ, Gruijl TD de, Bijl A, *et al.* Human papillomavirus type 16 E2-specific T-helper lymphocyte responses in patients with cervical intraepithelial neoplasia. *J Gen Virol* 1999;80:2453–2459.
8. Borysiewicz L, Fiander A, Nimako M, *et al.* A recombinant vaccinia virus encoding human papillomavirus types 16 and 18, E6 and E7 proteins as immunotherapy for cervical cancer. *Lancet* 1996;347:1523–1527.
9. Bosch FX, Broker TR, Forman D. Comprehensive Control of Human Papillomavirus Infections and Related Diseases. *Vaccine* 2013;31:11–31.
10. Bouwes Bavinck JN, Feltkamp M, Struijk L, *et al.* Human papillomavirus infection and skin cancer risk in organ transplant recipients. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2001;6:207–211.
11. Brun J, Dalstein V, Leveque J, *et al.* Regression of high-grade cervical intraepithelial neoplasia with TG4001 targeted immunotherapy. *Am J Obs Gynecol* 2011;204:169.e1-8.
12. Bruni L, Diaz M, Castellsagué X, *et al.* Cervical Human Papillomavirus

- Prevalence in 5 Continents: Meta-Analysis of 1 Million Women with Normal Cytological Findings. *J Infect Dis* 2010;202:1789–1799.
13. Buck CB, Day PM, Trus BL. The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology* 2013;445:169–174.
  14. Campo MS, Graham S V., Cortese MS, *et al.* HPV-16 E5 down-regulates expression of surface HLA class I and reduces recognition by CD8 T cells. *Virology* 2010;407:137–142.
  15. Cardone G, Moyer A, Cheng N. Maturation of the Human Papillomavirus 16 Capsid. *MBio* 2014;5:e01104-14.
  16. Carter JJ, Wipf GC, Benki SF, *et al.* Identification of a Human Papillomavirus Type 16-Specific Epitope on the C-Terminal Arm of the Major Capsid Protein L1. *J Virol* 2003;77:11625–11632.
  17. Carter JJ, Wipf GC, Madeleine MM, *et al.* Identification of Human Papillomavirus Type 16 L1 Surface Loops Required for Neutralization by Human Sera. *J Virol* 2006;80:4664–4672.
  18. Carvalho N De, Teixeira J, Roteli-Martins C, *et al.* Sustained efficacy and immunogenicity of the HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine up to 7.3 years in young adult women. *Vaccine* 2010;28:6247–6255.
  19. Chen XS, Casini G, Harrison SC, *et al.* Papillomavirus capsid protein expression in *Escherichia coli*: purification and assembly of HPV11 and HPV16 L1. *J Mol Biol* 2001;307:173–182.
  20. Chen XS, Garcea RL, Goldberg I, *et al.* Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol Cell* 2000;5:557–567.
  21. Christensen ND, Dillner J, Eklund C, *et al.* Surface conformational and linear epitopes on HPV-16 and HPV-18 L1 virus-like particles as defined by monoclonal antibodies. *Virology* 1996;223:174–184.
  22. Coleman N, Birley HDL, Renton AM, *et al.* Immunological events in regressing genital warts. *Am J Clin Pathol* 1994;102:768–774.
  23. Conway MJ, Meyers C. Replication and assembly of human papillomaviruses. *J Dent Res* 2009;88:307–17.

24. Dao LD, Duffy A, van Tine BA, *et al.* Dynamic localization of the human papillomavirus type 11 origin binding protein E2 through mitosis while in association with the spindle apparatus. *J Virol* 2006;80:4792–800.
25. Day PM, Schelhaas M. Concepts of papillomavirus entry into host cells. *Curr Opin Virol* 2014;4:24–31.
26. Day PM, Thompson CD, Buck CB, *et al.* Neutralization of human papillomavirus with monoclonal antibodies reveals different mechanisms of inhibition. *J Virol* 2007;81:8784–8792.
27. de-Jong A, van der Burg SH, Kwappenberg KMC, *et al.* Frequent Detection of Human Papillomavirus 16 E2-specific T-helper Immunity in Healthy Subjects. *Cancer Res* 2002;62:472–479.
28. De-Jong A, Poelgeest MIE van, Hulst JM van der, *et al.* Human Papillomavirus Type 16-Positive Cervical Cancer Is Associated with Impaired CD4 + T-Cell Immunity against Early Antigens E2 and E6. *Cancer Res* 2004;64:5449–5455.
29. Deligeoroglou E, Giannouli A, Athanasopoulos N, *et al.* HPV infection: Immunological aspects and their utility in future therapy. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2013;2013.
30. Dillon S, Sasagawa T, Crawford A, *et al.* Resolution of cervical dysplasia is associated with T-cell proliferative responses to human papillomavirus type 16 E2. *J Gen Virol* 2007;88:803–813.
31. DiMaio D, Petti L. The E5 Proteins. *Virology* 2013;445:99-114.
32. Dobson SRM, McNeil S, Dionne M, *et al.* Immunogenicity of 2 doses of HPV vaccine in younger adolescents vs 3 doses in young women: A randomized clinical trial. *Jama* 2013;309:1793–1802.
33. Doorbar J, Quint W, Banks L, *et al.* The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine* 2012;30S:F55–F70.
34. Doorbar J. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology* 2013;445:80–98.
35. Doorbar J. Latent papillomavirus infections and their regulation. *Curr Opin Virol* 2013;3:416–421.
36. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical

- cancer. *Clin Sci (Lond)* 2006;110:525–541.
37. Doorbar J, Quint W, Banks L, *et al.* The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* 2012;30:F55–F70.
  38. Dürst M, Gissmann L, Ikenberg H, *et al.* A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80:3812–3815.
  39. Egawa N, Egawa K, Griffin H, *et al.* Human papillomaviruses; Epithelial tropisms, and the development of neoplasia. *Viruses* 2015;7:3863–3890.
  40. Egawa N, Nakahara T, Ohno S-I, *et al.* The E1 protein of human papillomavirus type 16 is dispensable for maintenance replication of the viral genome. *J Virol* 2012;86:3276–83.
  41. Feldmeyer L, Keller M, Niklaus G, *et al.* The Inflammasome Mediates UVB-Induced Activation and Secretion of Interleukin-1 $\beta$  by Keratinocytes. *Curr Biol* 2007;17:1140–1145.
  42. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, *et al.* GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11. Lyon, Fr Int Agency Res Cancer 2013.
  43. Fligge C, Giroglou T, Streeck RE, *et al.* Induction of type-specific neutralizing antibodies by capsomeres of human papillomavirus type 33. *Virology* 2001;283:353–357.
  44. Frazer IH, Quinn M, Nicklin JL, *et al.* Phase 1 study of HPV16-specific immunotherapy with E6E7 fusion protein and ISCOMATRIX adjuvant in women with cervical intraepithelial neoplasia. *Vaccine* 2004;23:172–181.
  45. García-Hernández E, González-Sánchez JL, Andrade-Manzano A, *et al.* Regression of papilloma high-grade lesions (CIN 2 and CIN 3) is stimulated by therapeutic vaccination with MVA E2 recombinant vaccine. *Cancer Gene Ther* 2006;13:592–597.
  46. Garcia F, Petry K, Muderspach L, *et al.* ZYC101a for treatment of high-grade cervical intraepithelial neoplasia: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol* 2004;103:317–326.
  47. Gariglio P, Gutiérrez J, Cortés E, *et al.* The role of retinoic deficiency and

- estrogens as cofactors in cervical cancer. *Arch Med Res* 2009;40:449–465.
48. Garland SM, Kjaer SK, Muñoz N, *et al.* Impact and Effectiveness Of the Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine: A Systematic Review of Ten Years of Real-World Experience. *Clin Infect Dis* 2016;63:519–527.
  49. Georgopoulos NT, Proffitt JL, Blair GE. Transcriptional regulation of the major histocompatibility complex (MHC) class I heavy chain, TAP1 and LMP2 genes by the human papillomavirus (HPV) type 6b, 16 and 18 E7 oncoproteins. *Oncogene* 2000;19:4930–4935.
  50. Gissmann L, Osen W, Müller M, *et al.* Therapeutic vaccines for human papillomaviruses. *Intervirology* 2001;44:167–175.
  51. Greenstone HL, Nieland JD, Visser KE de, *et al.* Chimeric papillomavirus virus-like particles elicit antitumor immunity against the E7 oncoprotein in an HPV16 tumor model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:1800–1805.
  52. Grgacic EVL, Anderson DA. Virus-like particles: passport to immune recognition. *Methods* 2006;40:60–5.
  53. Gunn GR, Zubair A, Peters C, *et al.* Two *Listeria monocytogenes* vaccine vectors that express different molecular forms of human papilloma virus-16 (HPV-16) E7 induce qualitatively different T cell immunity that correlates with their ability to induce regression of established tumors immortal. *J Immunol* 2001;167:6471–6479.
  54. Haalen FM Van, Bruggink SC, Gussekloo J, *et al.* Warts in primary schoolchildren: Prevalence and relation with environmental factors. *Br J Dermatol* 2009;161:148–152.
  55. Han KT, Sin J-I. DNA vaccines targeting human papillomavirus-associated diseases: progresses in animal and clinical studies. *Clin Exp Vaccine Res* 2013;2:106-114.
  56. Harro CD, Pang YY, Roden RB, *et al.* Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:284–92.
  57. Hasan UA, Bates E, Takeshita F, *et al.* TLR9 Expression and Function Is Abolished by the Cervical Cancer-Associated Human Papillomavirus Type 16 .

- J Immunol 2007;178:3186–3197.
58. Hedge R. The papillomavirus E2 proteins: structure, function, and biology. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2002;31:343–360.
  59. Heinemann L, Woodfield L, Amer M, *et al.* Effective induction of type 1 helper IgG2a and cytotoxic T-cell responses in mice following immunization with human papillomavirus type 16 E2 in MF59. *Viral Immunol* 2008;21:225–233.
  60. Hende M van den, Poelgeest MIE van, Hulst JM van der, *et al.* Skin reactions to human papillomavirus (HPV) 16 specific antigens intradermally injected in healthy subjects and patients with cervical neoplasia. *Int J cancer* 2008;123:146–152.
  61. Herfs M, Yamamoto Y, Laury A, *et al.* A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:10516–21.
  62. Hibma MH. The immune response to papillomavirus during infection persistence and regression *Open Virol J* 2012;6:241–248.
  63. Ho GY, Studentsov YY, Bierman R, *et al.* Natural History of Human Papillomavirus Type 16 Virus-Like Particle Antibodies in Young Women *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:110–116.
  64. Ho G, Bierman R, Beardsley L, *et al.* Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998;338:423–8.
  65. Holmgren SC, Patterson N a, Ozburn M a, *et al.* The Minor Capsid Protein L2 Contributes to Two Steps in the Human Papillomavirus Type 31 Life Cycle The Minor Capsid Protein L2 Contributes to Two Steps in the Human Papillomavirus Type 31 Life Cycle. *J Virol* 2005;79:3938–3948.
  66. IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. A review of Human Carcinogens. Part B: Biological Agents, Vol 100. Lyon, Fr Int Agency Res Cancer 2011;
  67. International Human Papillomavirus Reference Center. Reference clones 2015 [actualizado: 15 Febrero 2015; citado 15 Julio 2016]. Disponible en: <http://www.hpvcenter.se/index.php>
  68. Isaacson Wechsler E, Wang Q, Roberts I, *et al.* Reconstruction of Human

- Papillomavirus Type 16-Mediated Early-Stage Neoplasia Implicates E6/E7 Deregulation and the Loss of Contact Inhibition in Neoplastic Progression. *J Virol* 2012;86:6358–6364.
69. Jaafar F, Righi E, Lindstrom V, *et al.* Correlation of CXCL12 expression and FoxP3+ cell infiltration with human papillomavirus infection and clinicopathological progression of cervical cancer. *Am J Pathol* 2009;175:1525–1535.
  70. Jabbar I, Fernando G, Saunders N, *et al.* Immune responses induced by BCG recombinant for human papillomavirus L1 and E7 proteins. *Vaccine* 2000;18:2444–2453.
  71. Jacobelli S, Sanaa F, Moyal-Barracco M, *et al.* Anti-HPV16 E2 protein T-cell responses and viral control in women with usual vulvar intraepithelial neoplasia and their healthy partners. *PLoS One* 2012;7:1–12.
  72. Jain S, Moore RA, Anderson DM, *et al.* Cell-mediated immune responses to COPV early proteins. *Virology* 2006;356:23–34.
  73. Jaisamrarn U, Castellsagué X, Garland SM, *et al.* Natural history of progression of HPV infection to cervical lesion or clearance: Analysis of the control arm of the large, randomised PATRICIA study. *PLoS One* 2013;8:1–15.
  74. Jenkins D. Histopathology and Cytopathology of Cervical Cancer. *Dis Markers* 2007;23:199–212.
  75. Jochmus I, Schäfer K, Faath S, *et al.* Chimeric virus-like particles of the human papillomavirus type 16 (HPV 16) as a prophylactic and therapeutic vaccine. *Arch Med Res* 1999;30:269–274.
  76. Johnston KB, Monteiro JM, Schultz LD, *et al.* Protection of beagle dogs from mucosal challenge with canine oral papillomavirus by immunization with recombinant adenoviruses expressing codon-optimized early genes. *Virology* 2005;336:208–218.
  77. Joura E a, Giuliano AR, Iversen O-E, *et al.* A 9-valent HPV vaccine against infection and intraepithelial neoplasia in women. *N Engl J Med* 2015;372:711–23.

78. Jt S, Castellsagué X, Sm G. A review of clinical trials of human papillomavirus prophylactic vaccines . Safety of human papillomavirus vaccines : a review . 2013;38:2012–2014.
79. Kanodia S, Fahey L, Kast W. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. *Curr Cancer Drug Targets* 2007;7:79–89.
80. Kaufmann A, Nieland J, Jochmus I, *et al.* Vaccination trial with HPV16 L1E7 chimeric virus-like particles in women suffering from high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN 2/3). *Int J Cancer* 2007;121:2794–2800.
81. Kaufmann A, Stern P, Rankin E, *et al.* Safety and immunogenicity of TA-HPV , a recombinant vaccinia virus expressing modified human papillomavirus (HPV) -16 and HPV-18 E6 and E7 genes , in women with progressive cervical cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:3676–3685.
82. Kawana K, Adachi K, Kojima S, *et al.* Oral vaccination against HPV E7 for treatment of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 (CIN3) elicits E7-specific mucosal immunity in the cervix of CIN3 patients. *Vaccine* 2014;32:6233–6239.
83. Kirnbauer R, Hubbert NL, Wheeler CM, *et al.* A virus-like particle enzyme-linked immunosorbent assay detects serum antibodies in a majority of women infected with human papillomavirus type 16. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:494–499.
84. Kojima S, Kawana K, Tomio K, *et al.* The prevalence of cervical regulatory T cells in HPV-related cervical intraepithelial neoplasia (CIN) correlates inversely with spontaneous regression of CIN. *AM J Reprod Immunol* 2013;69:134–141.
85. Koskimaa H-M, Paaso AE, Welters MJP, *et al.* Human papillomavirus 16 E2-, E6- and E7-specific T-cell responses in children and their mothers who developed incident cervical intraepithelial neoplasia during a 14-year follow-up of the Finnish Family HPV cohort. *J Transl Med* 2014;12:44.
86. Koutsky L a, Ault KA, Wheeler CM, *et al.* A controlled trial of human papillomavirus type 16 vaccine. *J Med* 2002;347:1645–1651.
87. Lebre MC, Aar AM van der, Baarsen L van, *et al.* Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9. *J Invest Dermatol* 2007;127:331–341.



88. Lee H, Brendle SA, Bywaters SM, *et al.* A Cryo-Electron Microscopy Study Identifies the Complete H16.V5 Epitope and Reveals Global Conformational Changes Initiated by Binding of the Neutralizing Antibody Fragment *J Virol* 2015;89:1428–1438.
89. Lee S, Yang A, Wu T, *et al.* Immunotherapy for human papillomavirus-associated disease and cervical cancer: review of clinical and translational research. 2016;27:1–17.
90. Leong CM, Doorbar J, Nindl I, *et al.* Loss of Epidermal Langerhans Cells Occurs in Human Papillomavirus a , c , and I but Not b Genus Infections. 2009;
91. Li M, Beard P, Estes P a, *et al.* Intercapsomeric disulfide bonds in papillomavirus assembly and disassembly. *J Virol* 1998;72:2160–2167.
92. Lin KY, Guarnieri FG, Staveley-O’Carroll KF, *et al.* Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Res* 1996;56:21–26.
93. López-Toledo G, Schadlich L, Alonso-Castro AJ, *et al.* Immunization with Human Papillomavirus 16 L1+E2 Chimeric Capsomers Elicits Cellular Immune Response and Antitumor Activity in a Mouse Model. *Viral Immunol* 2016;29:276–287.
94. Mach H, Volkin D, Troutman R, *et al.* Disassembly and reassembly of yeast-derived recombinant human papillomavirus virus-like particles (HPV VLPs). *J Pharma Sci* 2006;95:2195–2206.
95. Maciag P, Radulovic S, Rothman J. The first clinical use of a live-attenuated *Listeria monocytogenes* vaccine: a Phase I safety study of Lm-LLO-E7 in patients with advanced carcinoma of the cervix. *Vaccine* 2009;27:3975–3983.
96. Madrid-Marina V, Torres-Poveda K, López-Toledo G, *et al.* Advantages and disadvantages of current prophylactic vaccines against HPV. *Arch Med Res* 2009;40:471–477.
97. Maglennon GA, McIntosh PB, Doorbar J. Immunosuppression facilitates the reactivation of latent papillomavirus infections. *J Virol* 2014;88:710–6.
98. Maglennon GA, Doorbar J. The biology of papillomavirus latency. *Open Virol J*

- 2012;6:190–7.
99. Maglennon GA, McIntosh P, Doorbar J. Persistence of viral DNA in the epithelial basal layer suggests a model for papillomavirus latency following immune regression. *Virology* 2011;414:153–163.
  100. Marel J van der, Baars R van, Alonso I, *et al.* Oncogenic human papillomavirus-infected immature metaplastic cells and cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2014;38:470–479.
  101. McBride A a. Replication and partitioning of papillomavirus genomes. *Adv Virus Res* 2008;72:155–205.
  102. McBride AA. The Papillomavirus E2 proteins. *Virology* 2013;445:57–79.
  103. McCarthy MP, White WI, Palmer-Hill F, *et al.* Quantitative disassembly and reassembly of human papillomavirus type 11 viruslike particles in vitro. *J Virol* 1998;72:32–41.
  104. McKee SJ, Bergot A-S, Leggatt GR. Recent progress in vaccination against human papillomavirus-mediated cervical cancer. *Rev Med Virol* 2015;25:54–71.
  105. Mirkovic J, Howitt BE, Roncarati P, *et al.* Carcinogenic HPV infection in the cervical squamo-columnar junction. *J Pathol* 2015;236:265–271.
  106. Miura S, Kawana K, Schust DJ, *et al.* CD1d, a sentinel molecule bridging innate and adaptive immunity, is downregulated by the human papillomavirus (HPV) E5 protein: a possible mechanism for immune evasion by HPV. *J Virol* 2010;84:11614–11623.
  107. Modis Y, Trus BL, Harrison SC. Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO J* 2002;21:4754–4762.
  108. Monroy-García A, Gómez-Lim MA, Weiss-Steider B, *et al.* Immunization with an HPV-16 L1-based chimeric virus-like particle containing HPV-16 E6 and E7 epitopes elicits long-lasting prophylactic and therapeutic efficacy in an HPV-16 tumor mice model. *Arch Virol* 2014;159:291–305.
  109. Moody CA, Laimins LA. Human papillomaviruses activate the ATM DNA damage pathway for viral genome amplification upon differentiation. *PLoS Pathog* 2009;5:e1000605.

110. Moscicki A-B, Ellenberg JH, Vermund SH, *et al.* Prevalence of and Risks for Cervical Human Papillomavirus Infection and Squamous Intraepithelial Lesions in Adolescent Girls Impact of Infection With Human Immunodeficiency Virus. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2000;154:127–134.
111. Moscicki A, Hills N, Shiboski S, *et al.* Risks for incident human papillomavirus infection and low-grade squamous intraepithelial lesion development in young females. *JAMA* 2001;285:2995–3002.
112. Müller M, Zhou J, Reed TD, *et al.* Chimeric papillomavirus-like particles. *Virology* 1997;234:93–111.
113. Muñoz N, Bosch X, Sanjosé S, *et al.* Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *N Engl J Med* 2003;348:518–527.
114. Nicholls PK, Moore PF, Anderson DM, *et al.* Regression of canine oral papillomas is associated with infiltration of CD4+ and CD8+ lymphocytes. *Virology* 2001;283:31–9.
115. Ohlschläger P, Osen W, Dell K, *et al.* Human Papillomavirus Type 16 L1 Capsomeres Induce L1-Specific Cytotoxic T Lymphocytes and Tumor Regression in C57BL/6 Mice. *J Virol* 2003;77:4635–4645.
116. Palefsky JM, Berry JM, Jay N, *et al.* A trial of SGN-00101 (HspE7) to treat high-grade anal intraepithelial neoplasia in HIV-positive individuals. *Aids* 2006;20:1151–1155.
117. Parish JL, Bean AM, Park RB, *et al.* ChIR1 Is Required for Loading Papillomavirus E2 onto Mitotic Chromosomes and Viral Genome Maintenance. *Mol Cell* 2006;24:867–876.
118. Parker KC, Bednarek M a, Coligan JE. Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J Immunol* 1994;152:163–175.
119. Paz De la Rosa G, Monroy-García A, Mora-García MDL, *et al.* An HPV 16 L1-based chimeric human papilloma virus-like particles containing a string of epitopes produced in plants is able to elicit humoral and cytotoxic T-cell activity in mice. *Virol J* 2009;6:2.

120. Peghini BC, Abdalla DR, Barcelos ACM, *et al.* Local cytokine profiles of patients with cervical intraepithelial and invasive neoplasia. *Hum Immunol* 2012;73:920–926.
121. Pyeon D, Pearce SM, Lank SM, *et al.* Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. *PLoS Pathog* 2009;5:e1000318.
122. Qian J, Dong Y, Pang YYS, *et al.* Combined prophylactic and therapeutic cancer vaccine: Enhancing CTL responses to HPV16 E2 using a chimeric VLP in HLA-A2 mice. *Int J Cancer* 2006;118:3022–3029.
123. Rammensee H, Bachmann J, Emmerich N, *et al.* SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 1999;50:213–219.
124. Reche PA, Reinherz EL. Prediction of peptide-MHC binding using profiles. *Methods Mol Biol* 2007;409:185–200.
125. Reinson T, Henno L, Toots M, *et al.* The Cell Cycle Timing of Human Papillomavirus DNA Replication. *PLoS One* 2015;10:e0131675.
126. Reinson T, Toots M, Kadaja M, *et al.* Engagement of the ATR-dependent DNA damage response at the human papillomavirus 18 replication centers during the initial amplification. *J Virol* 2013;87:951–64.
127. Renoux VM, Bisig B, Langers I, *et al.* Human papillomavirus entry into NK cells requires CD16 expression and triggers cytotoxic activity and cytokine secretion. *Eur J Immunol* 2011;41:3240–3252.
128. Rensing ME, Driel WJ van, Brandt RM, *et al.* Detection of T helper responses, but not of human papillomavirus-specific cytotoxic T lymphocyte responses, after peptide vaccination of patients with cervical carcinoma. *J Immunother* 2000;23:255–66.
129. Rocha-Zavaleta L, Jordan D, Pepper S, *et al.* Differences in serological IgA responses to recombinant baculovirus-derived human papillomavirus E2 protein in the natural history of cervical neoplasia. *Br J Cancer* 1997;75:1144–50.
130. Roden RB, Armstrong A, Haderer P, *et al.* Characterization of a human papillomavirus type 16 variant-dependent neutralizing epitope. *J virology* 1997;71:6247–6252.

131. Roman A, Munger K. The papillomavirus E7 proteins. *Virology* 2013;445:138–168.
132. Rosales R, Rosales C. Immune therapy for human papillomaviruses-related cancers. *World J Clin Oncol* 2014;5:1002–19.
133. Rose RC, White WI, Li M, *et al.* Human papillomavirus type 11 recombinant L1 capsomeres induce virus-neutralizing antibodies. *J Virol* 1998;72:6151–6154.
134. Sanjose S de, Quint WG V, Alemany L, *et al.* Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol* 2010;11:1048–1056.
135. Santin AD, Bellone S, Palmieri M, *et al.* HPV16/18 E7-pulsed dendritic cell vaccination in cervical cancer patients with recurrent disease refractory to standard treatment modalities. *Gynecol Oncol* 2006;100:469–478.
136. Sapp M, Fligge C, Petzak I, *et al.* Papillomavirus assembly requires trimerization of the major capsid protein by disulfides between two highly conserved cysteines. *J Virol* 1998;72:6186–6189.
137. Savani BN, Stratton P, Shenoy A, *et al.* Increased Risk of Cervical Dysplasia in Long-Term Survivors of Allogeneic Stem Cell Transplantation—Implications for Screening and HPV Vaccination. *Biol Blood Marrow Transpl* 2008;14:1072–1075.
138. Schädlich L, Senger T, Gerlach B, *et al.* Analysis of modified human papillomavirus type 16 L1 capsomeres: the ability to assemble into larger particles correlates with higher immunogenicity. *J Virol* 2009;83:7690–7705.
139. Schädlich L, Senger T, Kirschning CJ, *et al.* Refining HPV 16 L1 purification from *E. coli*: Reducing endotoxin contaminations and their impact on immunogenicity. *Vaccine* 2009;27:1511–1522.
140. Schäfer K, Müller M, Faath S, *et al.* Immune response to human papillomavirus 16 L1E7 chimeric virus-like particles: Induction of cytotoxic T cells and specific tumor protection. *Int J Cancer* 1999;81:881–888.
141. Schelhaas M, Shah B, Holzer M, *et al.* Entry of human papillomavirus type 16 by actin-dependent, clathrin- and lipid raft-independent endocytosis. *PLoS Pathog* 2012;8:e1002657.

142. Schiller JT, Day PM, Kines RC. Current understanding of the mechanism of HPV infection. *Gynecol Oncol* 2010;118:S12-7.
143. Schwarz T, Spaczynski M, Schneider A, *et al.* Immunogenicity and tolerability of an HPV-16/18 AS04-adjuvanted prophylactic cervical cancer vaccine in women aged 15-55 years. *Vaccine* 2009;27:581–587.
144. Scott B VP, Klingelhutz AJ. Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology* 2013;445:115–137.
145. Selvakumar R, Borenstein LA, Lin YL, *et al.* Immunization with nonstructural proteins E1 and E2 of cottontail rabbit papillomavirus stimulates regression of virus-induced papillomas. *J Virol* 1995;69:602–605.
146. Selvakumar R, Ahmed, Wettstein FO. Tumor regression is associated with immune response to the E2 protein. *Virology* 1995;206:298–302.
147. Selvakumar R, Schmitt A, Iftner T, *et al.* Regression of papillomas induced by cottontail rabbit papillomavirus is associated with infiltration of CD8+ cells and persistence of viral DNA after regression. *J Vrology* 1997;71:5540–5548.
148. Serrano B, Sanjosé S De, Tous S, *et al.* Human papillomavirus genotype attribution for HPVs 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 and 58 in female anogenital lesions. *Eur J Cancer* 2015;51:1732–1741.
149. Stanley MA. Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. *Clin Microbiol Rev* 2012;25:215–222.
150. Steele JC, Mann CH, Rookes S, *et al.* T-cell responses to human papillomavirus type 16 among women with different grades of cervical neoplasia. *Br J Cancer* 2005;93:248–259.
151. Stern PL, Burg SH van der, Hampson IN, *et al.* Therapy of Human Papillomavirus-Related Disease. *Vaccine* 2012;29:997–1003.
152. Thönes N, Müller M. Oral immunization with different assembly forms of the HPV 16 major capsid protein L1 induces neutralizing antibodies and cytotoxic T-lymphocytes. *Virology* 2007;369:375–388.
153. Trimble CL, Peng S, Kos F, *et al.* A Phase I Trial of a Human Papillomavirus DNA Vaccine for HPV16+ Cervical Intraepithelial Neoplasia 2/3. *Clin Cancer Res* 2009;15:361–367.

154. Ustav M, Stenlund A. Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames. *EMBO J* 1991;10:449–457.
155. Van-Poelgeest MIE, Nijhuis ER, Kwappenberg KMC, *et al.* Distinct regulation and impact of type 1 T-cell immunity against HPV16 L1, E2 and E6 antigens during HPV16-induced cervical infection and neoplasia. *Int J Cancer* 2006;118:675–683.
156. Vinokurova S, Knebel Doeberitz M von. Differential Methylation of the HPV 16 upstream regulatory region during epithelial differentiation and neoplastic transformation. *PLoS One* 2011;6:e24451.
157. Viscidi RP, Kotloff KL, Clayman B, *et al.* Prevalence of antibodies to human papillomavirus (HPV) type 16 virus-like particles in relation to cervical HPV infection among college women. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997;4:122–6.
158. Viscidi RP, Sun Y, Tsuzaki B, *et al.* Serologic response in human papillomavirus-associated invasive cervical cancer. *Int J Cancer* 1993;55:780–784.
159. Viscidi R, Schiffman M, Hildesheim A, *et al.* Seroreactivity to human papillomavirus (HPV) types 16, 18, or 31 and risk of subsequent HPV infection: results from a population-based study in Costa Rica. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:324–327.
160. Vos Van Steenwijk PJ De, Ramwadhoebe TH, Löwik MJ, *et al.* A placebo-controlled randomized HPV16 synthetic long-peptide vaccination study in women with high-grade cervical squamous intraepithelial lesions. *Cancer Immunol Immunother* 2012;61:1485–1492.
161. Walboomers J, Jacobs M, Manos M, *et al.* Human Papillomavirus Is a Necessary Cause of Invasive Cervical Cancer Worldwide. *J pathol* 1999;189:12–19.
162. Wang JW, Roden RBS. L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology* 2013;445:175–186.
163. Wang W, Xia X, Wang S, *et al.* Oncolytic adenovirus armed with human papillomavirus E2 gene in combination with radiation demonstrates synergistic

- enhancements of antitumor efficacy. *Cancer Gene Ther* 2011;18:825–836.
164. Wang X, Wang Z, Christensen ND, *et al.* Mapping of human serum-reactive epitopes in virus-like particles of human papillomavirus types 16 and 11. *Virology* 2003;311:213–221.
  165. Wang Z, Christensen N, Schiller JT, *et al.* A monoclonal antibody against intact human papillomavirus type 16 capsids blocks the serological reactivity of most human sera. *J Gen Virol* 1997;78:2209–2215.
  166. Wentzensen N, Ridder R, Klaes R, *et al.* Characterization of viral-cellular fusion transcripts in a large series of HPV16 and 18 positive anogenital lesions. *Oncogene* 2002;21:419–426.
  167. Wheeler C, Castellsagué X, Garland S, *et al.* Cross-protective efficacy of HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by non-vaccine oncogenic HPV types: 4-year end-of-study analysis of the randomised, double-blind PATRICIA trial. *Lancet Oncol* 2012;13:100–110.
  168. White WI, Wilson SD, Palmer-Hill FJ, *et al.* Characterization of a major neutralizing epitope on human papillomavirus type 16 L1. *J Virol* 1999;73:4882–4889.
  169. Wilgenburg BJ, Budgeon LR, Lang CM, *et al.* Characterization of immune responses during regression of rabbit oral papillomavirus infections. *Comp Med* 2005;55:431–439.
  170. Woo YL, Hende M van Den, Sterling JC, *et al.* A prospective study on the natural course of low-grade squamous intraepithelial lesions and the presence of HPV16 E2-, E6- And E7-specific T-cell responses. *Int J Cancer* 2010;126:133–141.
  171. Wu T, Hu Y-M. Immunogenicity and safety of an E. coli-produced bivalent human papillomavirus (type 16 and 18) vaccine: A randomized controlled phase 2 clinical trial. *Vaccine* 2015;33:3940–3946.
  172. Wu WH, Gersch E, Kwak K, *et al.* Capsomer vaccines protect mice from vaginal challenge with human papillomavirus. *PLoS One* 2011;6:1–8.
  173. Xu Y, Zhang Y, Xu X, *et al.* Papillomavirus virus-like particles as vehicles for the delivery of epitopes or genes. *Arch Virol* 2006;151:2133–2148.



174. Xue Y, Bellanger S, Zhang W, *et al.* HPV16 E2 is an immediate early marker of viral infection, preceding E7 expression in precursor structures of cervical carcinoma. *Cancer Res* 2010;70:5316–5325.
175. Yuan H, Estes PA, Chen Y, *et al.* Immunization with a Pentameric L1 Fusion Protein Protects against Papillomavirus Infection. *J Virol* 2001;75:7848–7853.
176. Zhang P, Nouri M, Brandsma JL, *et al.* Induction of E6/E7 expression in cottontail rabbit papillomavirus latency following UV activation. *Virology* 1999;263:388–94.
177. Zur-Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2000;3:690–698.

## 14. PUBLICACIONES

1) Madrid-Marina V, Torres-Poveda K, López-Toledo G, *et al.* Advantages and disadvantages of current prophylactic vaccines against HPV. Arch Med Res 2009;40:471–477.

2) López-Toledo G, Schadlich L, Alonso-Castro AJ, *et al.* Immunization with Human Papillomavirus 16 L1+E2 Chimeric Capsomers Elicits Cellular Immune Response and Antitumor Activity in a Mouse Model. Viral Immunol 2016;29:276–287.

## PUBLICACIÓN 1

### **Autores:**

Vicente Madrid-Marina  
Kirvis Torres-Poveda  
Gabriela López-Toledo  
Alejandro García-Carrancá

**Título:** Advantages and disadvantages of current prophylactic vaccines against HPV.

**Revista:** Archives of Medical Research

**Año de publicación:** 2009

### **Resumen:**

Esta revisión de literatura se centra en las vacunas profilácticas Gardasil® y Cervarix™, sus características constitutivas, su capacidad de inducir respuesta inmune humoral, la protección cruzada que pueden proveer, la duración de la misma, entre otros aspectos. Las vacunas confieren protección contra la infección por los dos tipos más prevalentes de VPH de alto riesgo para el desarrollo de cáncer, 16 y 18, además de VPH 6 y 11, en el caso de Gardasil®, por lo que el impacto de la vacunación se espera sobre el 70% de los casos de CaCu, y la mayoría de verrugas genitales; sin embargo, deja un margen de riesgo de infección con otros tipos de VPH, además de la población que ya haya adquirido el virus.

Se comparan los distintos estudios clínicos multicéntricos que se han llevado a cabo en la validación de su eficacia; y se discuten los retos ante la implementación de la vacunación por los sistemas de salud pública en países en vías de desarrollo, relacionados con su costo-efectividad, la edad de aplicación más conveniente, los presuntos efectos adversos, la barrera cultural en la sociedad, y la importancia de continuar con los programas de detección de infecciones y lesiones en cérvix.

## PUBLICACIÓN 2

### **Autores:**

Gabriela López-Toledo  
Lysann Schädlich  
Ángel Josabad Alonso-Castro  
Alberto Monroy García  
Rosario García Rocha  
Miriam Cecilia Guido  
Lutz Gissmann  
Alejandro García-Carrancá

### **Título:**

Immunization with Human Papillomavirus 16 L1+E2 Chimeric Capsomers Elicits Cellular Immune Response and Antitumor Activity in a Mouse Model

**Revista:** Viral Immunology

**Año de publicación:** 2016

### **Resumen:**

En esta publicación se reportaron los resultados obtenidos en la presente tesis. Los cuales consistieron en el diseño, construcción y producción en bacterias de capsómeros quiméricos donde se fusionó una versión modificada de la proteína L1 de VPH16 con distintos fragmentos de la proteína E2 y la proteína completa. Luego, se realizó el análisis de la estructura de las seis diferentes proteínas producidas, se encontró que se forman partículas de distintos tamaños, habiendo capsómeros, VLPs, y mayoritariamente partículas de tamaños intermedios. Al evaluar la presencia de epítopos de L1 en las proteína quiméricas, se determinó que una de ellas, L1 $\Delta$ +E2H/NC, que contiene los aa's 206-307 de E2, sí conservó el principal epítipo neutralizante, lo que le significa potencial actividad profiláctica. Se eligió esta proteína para continuar el análisis de sus características inmunológicas; para ello se inmunizaron ratones inmunocompetentes C57BL/6; los linfocitos T CD8+ generados se analizaron en ensayos de citotoxicidad *ex-vivo*, y

posteriormente en ensayos *in-vivo* se evaluó el efecto de la inmunización con proteína L1Δ+E2H/NC sobre el crecimiento de tumores en ratones. Los tumores se generaron inoculando células singénicas TC-1/E2, las cuales fueron producidas transfectando células TC-1 para expresar la proteína E2. Se encontró que la inmunización con proteína L1Δ+E2H/NC, es capaz de inducir respuesta de linfocitos T CD8+ citotóxicos específicos contra E2, y que esta respuesta tiene efecto antitumoral. Además, se determinó que el péptido E2 292-301 es un epítipo inmunogénico importante de la proteína, contra el que se genera dicha respuesta.