



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# **POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Instituto de Investigaciones Biomédicas

**ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE ANTICUERPOS INDUCIDOS POR  
UNA VACUNA GÉNICA CONTRA EL VIRUS DEL PAPILOMA  
HUMANO TIPO 16 (HPV-16), PARA INHIBIR LA UNIÓN DEL HPV-16  
AL HEPARÁN SULFATO**

# **T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

P R E S E N T A

BIOL. EXP. CLOTILDE CANCIO LONCHES

**DIRECTORA DE TESIS: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA**

MÉXICO, D. F.

MARZO, 2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

**Durante la realización de este trabajo, la estudiante Clotilde Cancio Lonches fue apoyada como becaria del CONACYT con el número 183169**

**Durante la realización este trabajo, fue apoyada por los miembros del Comité tutorial:  
Dra. Leticia Rocha Zavaleta  
Dr. Rafael Saavedra Durán  
Dr. Jaime Berumen Campos**

## **AGRADECIMIENTOS:**

A mis padres por todo el apoyo incondicional que me han dado durante todos mis estudios.

A mi esposo por estar conmigo en los buenos y malos momentos durante mi maestría.

A la Dra. Leticia Rocha Zavaleta, por haber tenido confianza y haberme brindado un espacio en su laboratorio.

Muy en especial al Dr. Rafael Saavedra Durán, por haber tenido confianza, por haberme ayudado durante mi formación académica, por haberme tenido tanta paciencia durante sus enseñanzas y por haber compartido su tiempo conmigo.

**DEDICADO:**

A mis padres Guadalupe y Arturo  
A mi esposo Alejandro

Como la brisa que nos llega a la cara y nos acaricia con su manto acogedor , así la vida pasa y pasa y seguimos aprendiendo día con día experiencias cotidianas y también vamos adquiriendo conocimientos a veces más allá de lo incomprensible.....

La vida es una pequeña gota de una estrella fugaz, es como sentir como pasa el tiempo sin poderlo detener, así son los conocimientos que vamos adquiriendo....

# **INDICE GENERAL**

<b>Índice de figuras y tablas</b>	I
<b>Resumen</b>	1
<b>Introducción</b>	4
Vacunas	4
Vacunas Génicas	5
Cáncer Cervical	12
Virus del Papiloma Humano (HPV)	14
Clasificación de los HPV`s	15
Organización del Genoma	16
Ciclo de vida del HPV	19
Mecanismo de Infección	21
Receptores	23
Respuesta inmune contra el HPV	25
Tratamientos y Vacunas anti-HPV	29
<b>Antecedentes directos</b>	30
<b>Hipótesis</b>	31

<b>Objetivo General</b>	31
<b>Objetivos particulares</b>	31
<b>Metodología</b>	32
Electroforesis de ADN en geles de agarosa	32
Aislamiento de ADN plasmídico por lisis alcalina	32
Restricción enzimática de ADN	33
Purificación de ADN por electroelución	33
Purificación de ADN por congelación	34
Preparación de ADN por cromatografía	35
Reacciones de ligación	36
Transformación de células competentes	37
Preparación de células competentes	37
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	38
Reacción de secuenciación	39
Descongelamiento de células Cos-7, B16F0 y 293TT	40
Transfección en células Cos-7, B16F0 y 293TT con el plásmido pVAX16L1	40

Inmunocitoquímica de células transfectadas	41
Elisa	42
Ensayo de inhibición de la unión de VLP`s a Heparan Sulfato	43
Inmunización de ratones	44
Análisis estadísticos	45
<b>Resultados</b>	46
Clonación del gen L1 del HPV16 en el vector pCRII-TOPO	46
Subclonación del gen L1 en el vector de expresión pVAX	51
Detección por RT-PCR del gen L1 en células de mamífero transfectadas con el plásmido pVAX16L1	57
Ensayo de la expresión de la proteína L1 en células B16F0 y Cos-7 transfectadas con el plásmido pVAX16L1	59
Análisis de la presencia de anticuerpos en los ratones inmunizados a diferentes tiempos	61
Ensayo de inhibición de la unión de VLP`s a heparan sulfato con los sueros y secreciones cervicales de los ratones inmunizados	66

<b>Discusión</b>	70
<b>Conclusiones</b>	77
<b>Apéndices</b>	78
<b>Bibliografía</b>	82

## **INDICE DE FIGURAS Y TABLAS**

Tabla 1. Clasificación de vacunas.	Pag. 5
Tabla 2. Análisis comparativo de las vacunas de DNA, vacunas atenuadas y vacunas inactivadas.	Pag.11
Tabla 3. Clasificación de HPV.	Pag. 15
Figura 1. Mecanismo de activación de la respuesta inmune mediada por una vacuna de DNA.	Pag. 9
Figura 2. Organización genómica del virus de papiloma humano tipo 16 (HPV-16).	Pag. 17
Figura 3. Representación del epitelio escamoso cervical y ciclo de vida del virus del papiloma humano.	Pag.21
Figura 4. Vía de entrada del papilomavirus por endocitosis dependiente de clatrina.	Pag.22
Figura 5. Diferencias entre el Heparan Sulfato y la Heparina.	Pag. 24
Tabla 4. Concentraciones de inmunógeno aplicada a cada grupo de ratones, en cada inmunización.	Pag.44
Figura 6. Aislamiento del genoma del HPV16.	Pag. 46
Figura 7. Purificación del genoma del HPV16.	Pag. 47
Figura 8. Amplificación del gen L1 del HPV16 por PCR.	Pag. 48

Figura 9. Análisis de colonias transformadas con el producto de la ligación del gen L1 en el vector pCRII-TOPO.	Pag. 49
Figura 10. Análisis de las colonias transformadas con el producto de ligación sometidas a restricción enzimática.	Pag. 50
Figura 11. Vector de expresión pVAX cortado con las enzimas <i>HindII</i> y <i>XhoI</i> .	Pag. 51
Figura 12. Análisis de colonias transformadas con el producto del gen de L1 en pVAX.	Pag. 52
Figura 13. Análisis de colonias transformadas con el gen L1 en el vector pVAX por restricción enzimática.	Pag. 53
Figura 14. Alineación de la secuencia del plásmido pVAX16L1 (p16L1).	Pag. 56
Figura 15. Estudio del RNAm de la proteína L1 del HPV16 por RT-PCR.	Pag. 58
Figura 16. Análisis de la expresión <i>in vitro</i> de la proteína L1 a partir de pVAX16L1.	Pag. 60
Figura 17. Detección de anticuerpos séricos en ratones vacunados.	Pag. 62
Figura 18. Detección de anticuerpos de secreciones cervicales en ratones vacunados.	Pag. 65
Figura 19. Ensayo de unión de VLP`s a Heparán Sulfato con los sueros de los ratones inmunizados.	Pag. 67

Figura 20. Ensayo de unión de VLP`s a Heparán Sulfato con las secreciones cervicales de los ratones inmunizados.

Pag. 68

## RESUMEN

La infección por el Virus del Papilloma Humano Tipo 16 (HPV-16) es la causa principal de cáncer cervical en mujeres en México. Una estrategia para prevenir la infección causada por el virus son las vacunas génicas las cuales pueden inducir una respuesta inmune duradera como las vacunas tradicionales. Con el objetivo de determinar si una vacuna génica es capaz de producir anticuerpos con el potencial de inhibir la unión del HPV-16 al receptor celular heparán sulfato, en nuestro laboratorio se construyó un plásmido (pVAX16L1) que contienen al gen que codifica para la proteína L1 del HPV-16. La integridad del gen clonado fue verificada por secuenciación, mientras que la expresión de la proteína se demostró mediante la transfección del plásmido en células de mamífero *in vitro*. Cuando el plásmido fue utilizado para inmunizar ratones por vía intradérmica, se observó la producción de anticuerpos específicos contra la proteína L1, tanto a nivel sistémico como a nivel de mucosas (secreciones cervicales). El título de anticuerpos producidos por la vacunación génica fue significativamente menor al observado cuando los ratones fueron inmunizados con una vacuna recombinante comercial. Sin embargo, cuando se determinó el potencial de dichos anticuerpos para inhibir la unión del virus a su receptor celular heparán sulfato se observó un comportamiento diferente entre los anticuerpos sistémicos y los mucosos. De tal forma, los anticuerpos séricos de los ratones inmunizados con pVAX16L1 indujeron una inhibición del 40%; mientras que los sueros de los ratones inmunizados con la vacuna recombinante comercial indujeron una inhibición del 60%. Por otro lado, los anticuerpos contenidos en las secreciones cervicales de

los ratones inmunizados con la vacuna recombinante comercial no indujeron inhibición de la unión al heparán sulfato, mientras que los anticuerpos mucosos de ratones inmunizados con pVAX16L1 indujeron una inhibición del 50%. Esto nos permite concluir que la vacuna génica es capaz de generar una respuesta de anticuerpos en la mucosa cervical con potencial de inhibir la unión del virus a su receptor celular heparán sulfato.

## **ABSTRACT**

Infection by Human Papilloma Virus Type 16 (HPV-16), is the major cause of cervical cancer in women in Mexico. DNA vaccines represent a strategy to prevent viral infections, since they are able to induce long-lasting immune response. The aim of the present work was to determine if a DNA vaccine is able to induce the production of antibodies with the potential to inhibit the binding of HPV-16 to the cellular receptor heparan sulfate. We first cloned the HPV-16 L1 gene, coding the major viral capsid protein, into the pVAX1 vector to generate plasmid pVAX16L1. Integrity of the L1 gene was verified by sequencing, whereas protein expression was demonstrated by transient transfection of mammalian cells. Intradermic vaccination of mice with the plasmid induced the production of systemic and cervical mucosal specific antibodies recognizing the L1 protein. Antibody titers induced by DNA vaccination were significantly lower than the produced by vaccination with a commercial recombinant vaccine. However, interesting differences in the potential of antibodies to inhibit binding of HPV-16 to heparan sulfate were observed. Serum antibodies from mice immunized with the pVAX16L1 plasmid, induced an inhibition of 40%, whereas antibodies from mice immunized with the recombinant vaccine showed an inhibition of 60%. In contrast, antibodies in cervical secretions from mice immunized with the plasmid were able to inhibit 50% of the binding, while mucosal antibodies from mice immunized with the commercial vaccine did not induce inhibition of binding to heparan sulfate. In

conclusion, the DNA vaccine is able to generate antibodies in the cervical mucosa with the potential to inhibit the binding of HPV-16 to the cellular receptor heparan sulfate.

# ***INTRODUCCIÓN***

## **VACUNAS**

Los fundamentos básicos de las vacunas y la inmunología fueron establecidos por Edward Jenner a fines del siglo XVIII cuando desarrolló la primera vacuna antivariólica. Él se basó en observaciones empíricas analizando que mujeres que ordeñaban vacas contraían una enfermedad en los dedos de sus manos, donde aparecía primero un ampolla, luego una costra y finalmente cicatrizaba; Jenner se dio cuenta de que estas personas no eran contagiadas por el virus de la viruela, por lo que decidió inocular por contacto a personas sanas utilizando las costras de las personas que ordeñaban vacas (untando las costras en el brazo) y así nació la primera vacuna conocida y se le dio este nombre a raíz de la enfermedad que tenían las vacas. (Jenner, 1798)

Fue necesario que pasaran más de 100 años para que Luis Pasteur demostrara que cuando el organismo humano ha sufrido una infección y ha sobrevivido a ella, su memoria inmunológica la recuerda y ya no es afectado por la misma infección.

Posteriormente a este descubrimiento se comenzaron a desarrollar vacunas en contra de algunos virus y bacterias conocidos (Pasteur, 1880; Salmon, 1886). Por lo que en la actualidad existe una variedad de vacunas, como se muestra en la tabla 1.

La primera generación de vacunas son las vacunas de virus y bacterias atenuadas y vivos. Posteriormente surgieron las vacunas de microorganismos muertos y las vacunas hechas con antitoxinas.

<b>TIPO DE VACUNAS</b>	<b>VIRALES</b>	<b>BACTERIANAS</b>
<b>Organismos atenuados y vivos</b>	polio (Sabin), rubéola, paperas, varicela, fiebre amarilla, rotavirus	tuberculosis, tifoidea, cólera.
<b>Organismos muertos</b>	Polio (Salk), influenza, rabia, hepatitis A	Tifoidea, cólera
<b>Antitoxinas</b>		Difteria, tétanos.
<b>Vacunas recombinantes</b>	Hepatitis B, neumococo, meningococo, influenza, virus del papiloma humano tipo 6, 11, 16 y 18	

Tabla 1. Clasificación de vacunas.

Las vacunas recombinantes están basadas en la inoculación de proteínas inmunogénicas del patógeno, las cuales son producidas en sistemas bacterianos de expresión. Otra modalidad de vacunas recombinantes es aquella en la que se sintetizan proteínas que poseen la capacidad de autoensamblarse, este es el caso de algunas proteínas de origen viral que naturalmente forman parte de la cápside. Las formaciones estructurales que adoptan estas proteínas recombinantes se conocen como VLP's (Partículas parecidas a virus), y tienen la capacidad de presentar antígenos estructurales de los virus. Finalmente tenemos la nueva generación de vacunas utilizando plásmidos donde se les inserta el gen que codifica para la proteína del patógeno o un péptido a estas se les conoce como vacunas de DNA.

## VACUNAS GÉNICAS

En 1999 Wolf y colaboradores clonaron el gen que codifica para la hormona del crecimiento humano en un vector de expresión, y lo inocularon directamente en el músculo de un ratón vivo. Lo que observaron estos investigadores es que las células del músculo fueron capaces de internalizar el plásmido y expresar la hormona (Wolf, 1990). Dos años más tarde Tang y colaboradores demostraron que la inoculación de un plásmido con DNA en ratones no sólo inducía la expresión del transgen, sino que además provocaba el desarrollo de una respuesta inmune contra el producto protéico codificado por éste (Tang, 1992). Estas observaciones abrieron la puerta para el desarrollo de una nueva generación de vacunas, conocidas como vacunas de DNA o génicas.

Las vacunas de DNA consisten de un vector de expresión en el cual se clonan genes que codifican para antígenos de patógenos. El vector de expresión es un plásmido de DNA de doble cadena de origen bacteriano con las siguientes características: un origen de replicación para su replicación en bacterias, genes de resistencias a antibióticos para su selección en cultivos bacterianos, un sitio de clonación localizado río abajo del promotor eucariótico para la inserción de los genes de interés, un promotor eucariótico para la expresión de los genes clonados en células de mamífero y secuencias de poliadenilación para estabilizar los transcritos de RNA mensajero (Gurunathan et al., 2000).

Los plásmidos de origen bacteriano utilizados en las vacunas de DNA generan una respuesta inmunológica debido a que contienen motivos CpG que ejercen un efecto adyuvante para activar la respuesta inmune, en estudios previos se ha

observado que al inmunizar ratones por vía intradérmica con un plásmido que contiene secuencias CpG, este activa fuertemente la respuesta inmune celular y humoral, también se observó que al tener más de 50 motivos CpG incrementaba la producción de citocinas proinflamatorias (Sato 1996)

Las vacunas de DNA permiten manipular fácilmente, mediante la tecnología de DNA recombinante, los genes que codifican los antígenos de interés con el fin de generar vacunas más específicas en contra de distintos patógenos. La inoculación de un vector de expresión que contiene un gen que codifica un antígeno de interés recibe el nombre de vacunación o inmunización por DNA. Las vacunas de DNA también pueden generar una respuesta inmune adaptativa humoral y celular (Liu 2003). Las vacunas de DNA son capaces de generar una respuesta inmune protectora en los individuos inmunizados.

Esto se debe a que las respuestas primarias mediadas por células T y B hacia un antígeno codificado por una vacuna de DNA siguen principalmente las mismas vías, como en las vacunas tradicionales o un patógeno. Las proteínas que entran por la vía exógenas se captan por endocitosis o fagocitosis y entran a la vía lisosomal donde bajo la degradación de la proteína en péptidos de 11-15 aminoácidos se asocian con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II) y este complejo es reconocido a los receptores de células T correspondientes (TCRs) en la superficie de la célula, situados sobre las células T cooperadoras  $CD4^+$ , activándose y expandiéndose (Figura 1). Los linfocitos T citotóxicos (Tc) son inducidos por péptidos antigénicos de 9 aminoácidos de longitud presentados en el contexto MHC-I, el cual requiere generalmente la síntesis de novo de las proteínas (vía endógena). Algunos de los polipéptidos

traducidos recientemente son degradados en el citoplasma por complejos del proteosoma. Los péptidos resultantes son translocados a través del sistema especializado del transportador TAP dentro del retículo endoplásmico. Los péptidos con afinidad suficiente se unen al surco de determinantes de MHC-I los cuales así se estabilizan. Los complejos péptidicos MHC entran en la vía secretoria y por ende alcanzan la superficie celular para unirse con los receptores de células T en las células T CD8<sup>+</sup> (Figura 1).

En el caso de la captura del plásmido de DNA se sabe que los antígenos administrados por una vacuna de DNA se translocan al núcleo o permanecen en el citoplasma y esta tiene que ser presentada en un contexto diferente, por el cual pueda generar una respuesta de anticuerpos en contra del patógeno codificante del DNA.

Una vez que el plásmido de DNA es administrado, el vector plasmídico tiene que entrar a la célula y translocarse al núcleo donde la transcripción del transgen es iniciada. La siguiente transferencia es la de los transcritos hacia el citoplasma donde estas son traducidas; la proteína sintetizada de novo es entonces procesada y presentada hacia el sistema inmune. Los mecanismos exactos que tienen que ver con la captura del DNA y translocación no están completamente entendidos. Sin embargo se sabe que al inmunizar mediante un plásmido de DNA mediante la técnica del "Gene Gun" fuerza a las proteínas cubiertas de DNA a través de la membrana celular; otros sistemas tales como los liposomas cationicos entregan al DNA al citoplasma mediante la fusión con la membrana celular. El DNA desnudo puede ser tomado inespecíficamente por células a través de la

fagocitosis o pinocitosis o más específicamente mediante la unión a los receptores scavenger en los macrófagos (Kimura et la, 1994).

La secuencia codificante para el antígeno puede ser fusionado a secuencia líder o señales que permiten la inserción de la proteína dentro del retículo endoplásmico y ser exportada a la superficie celular (Thomson 1998 y li 1999).

Estos mecanismos anteriores promueven la presentación MHC-II e inducción de células T  $CD4^+$ . Las proteínas asociadas a la membrana celular pueden ser cambiadas hacia una forma secretada mediante la inserción de un codón de paro río arriba del dominio transmembranal.

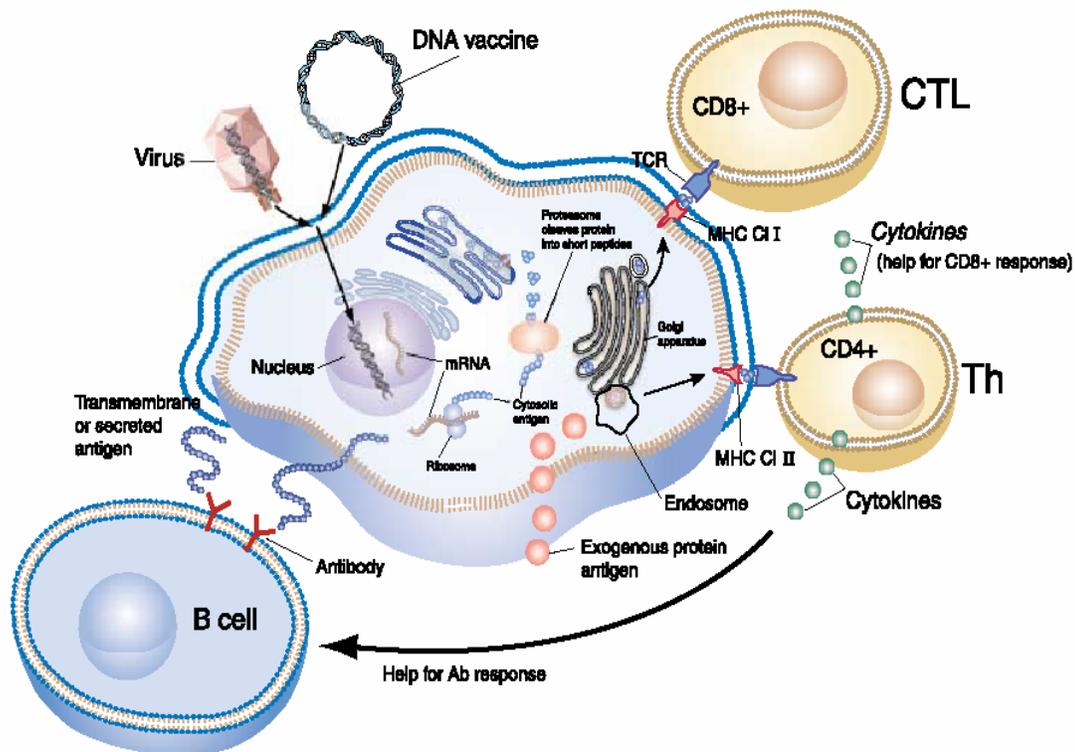


Figura 1. Mecanismo de activación de la respuesta inmune mediada por una vacuna de DNA. (Tomada de MA Liu. 2003).

Las proteínas secretadas o en la superficie celular pueden ser retenidas en el citoplasma mediante la remoción de secuencias líder o mediante cambios que afecten las modificaciones postraduccionales tales como la glicosilación. Las proteínas nucleares pueden ser retenidas en el citoplasma mediante la adición de secuencias líder que traslapen los dominios de localización nuclear.

Sin embargo acerca de la presentación antigénica de un plásmido de DNA se conoce muy poco; algunos experimentos sugieren que los antígenos codificados por plásmidos de DNA requieren la presentación de células presentadoras de antígenos profesionales (APCs) tales como las células dendríticas. Un estudio demostró que la inmunizar por vía intradérmica con un plásmido de DNA transfirió directamente a células dendríticas (Condon 1996 y Porgador 1998). Por otro lado se sabe que las células dendríticas residentes pueden presumiblemente moverse mientras que el antígeno es sintetizado y migrar hacia los nódulos linfáticos y presentar al antígeno a las células T y B naive (Porgador 1998).

Liu y colaboradores propusieron que la activación de células T y B después de una inmunización con DNA ocurre en varias etapas. La primera etapa está relacionada con las células dendríticas transfectedas directamente por el plásmido las cuales tienden a activar a las células T y B, considerando que la carga antigénica adquirida por las células dendríticas transfectedas es pequeña, la siguiente etapa es cuando algunas citocinas secretadas por la activación de las células dendríticas, activan a los linfocitos T CD8<sup>+</sup> efectoras y éstas una vez activadas lisaran a las células que expresan el antígeno asociado con el determinante MHC. A continuación, se describen las ventajas y desventajas de las vacunas de DNA con respecto a las vacunas atenuadas e inactivadas (Tabla 2).

Al igual que las vacunas atenuadas y a diferencia de las vacunas inactivadas, las vacunas de DNA simulan una infección natural ya que producen y procesan los antígenos activamente. El procesamiento activo de los antígenos favorece la generación de una respuesta inmune humoral y celular. En cambio en las vacunas inactivadas, los antígenos no son procesados activamente por lo que solo se favorece una generación de respuesta inmune humoral. Al igual que las vacunas atenuadas, las vacunas de DNA no alteran la conformación antigénica nativa.

Al igual que las vacunas de microorganismos muertos y a diferencias de las vacunas atenuadas, las vacunas de DNA son estables y no son infecciosas por lo tanto no presentan el riesgo de reversión a la forma virulenta del patógeno. Al igual que las vacunas atenuadas e inactivadas, las vacunas de DNA tienen una vida media que permite la generación de una memoria inmunológica.

También los avances en la administración de la vacuna han permitido modificar y dirigir la respuesta inmune del individuo vacunado de acuerdo al tipo de respuesta requerida (Gurunathan, 2000).

	<b>Vacunas de DNA</b>	<b>Vacunas atenuadas</b>	<b>Vacunas con microorganismos muertos</b>
<b>Infección</b>	Simulan la infección natural	Simulan la infección natural	No simulan la infección natural
<b>Conformación antigénica</b>	Nativa	Nativa	No nativa
<b>Reversión</b>	Imposible	Posible	Imposible
<b>Respuesta inmune</b>			
Humoral Células B	+++	+++	+++
Celular CD4 <sup>+</sup>	+++ Th1, Th2 <sup>a</sup>	+/- Th1	+/- Th1
CD8 <sup>+</sup>	++	+++	-
Presentación de antígeno	MHC clase I y II	MHC clase I y II	MHC clase I y II
<b>Memoria inmune</b>			
Humoral	+++	+++	+++
Celular	++	+++	+/-
<b>Seguridad</b>	+++ <sup>b</sup>	++ <sup>c</sup>	++++
<p>a Respuesta Th1 o Th2 inducida dependiendo de la vía de administración.</p> <p>b Información obtenida de estudios clínicos fase I.</p> <p>c En las condiciones adecuadas pueden revertir a la forma virulenta</p>			

Modificado de Gurunathan et al., 2000.

Tabla 2. Análisis comparativo de las vacunas de DNA, vacunas atenuadas y vacunas inactivadas.

Las vacunas de DNA presentan algunos riesgos como la integración de los genes de la vacuna de DNA al genoma del individuo vacunado, la generación de autoinmunidad y la generación de estados de tolerancia. La probabilidad de que

los eventos anteriores sucedan es extremadamente baja y no se ha reportado que ocurra en individuos vacunados (Liu 2003).

## **CÁNCER CERVICAL**

El cáncer cérvico-uterino continúa siendo un problema de salud pública a nivel mundial ya que es la segunda causa de muertes por neoplasias en el mundo. (Parkin, 2001; Pisan, 2002).

En México es el tipo de cáncer más común y representa la segunda causa de muerte en mujeres. En el 2002 la Agencia Internacional para la investigación del Cáncer (IARC), registró 12,516 nuevos casos y 5,777 muertes por este padecimiento en nuestro país, es decir, 12 mujeres mueren diariamente por cáncer cervicouterino en nuestro país.

El cáncer es el resultado de la pérdida del control del crecimiento de las células normales. En el caso del cáncer cervicouterino el factor de riesgo más importante es la infección por el virus del papiloma humano de alto riesgo, ya que estos son capaces de alterar el mecanismo de crecimiento normal y división de las células epiteliales.

Los tipos virales que infectan el tracto genital se pueden dividir en 2 categorías: los de alto y bajo riesgo. Los de alto riesgo son los tipos asociados con el desarrollo de cánceres anogenitales incluyendo los del cérvix, entre ellos los más comunes son HPV-16, 18, 31, 33 y 45. Por otra lado los de bajo riesgo inducen crecimientos benignos conocidos como condilomas; los más comunes son HPV-6 y 11. Los HPV's son virus de transmisión sexual y se estima que 2 terceras

partes de individuos que han tenido relaciones sexuales han sido infectados (Singer, 1995).

En 1995 Bosch y colaboradores, demostraron que la infección por HPV es la causa principal de tumores cervicales en la mujer. Ellos realizaron un estudio con 1035 pacientes de todo el mundo que se encontraban diagnosticadas con cáncer cervical invasivo. Biopsias de estos tumores fueron analizadas por PCR con oligonucleótidos que amplifican una secuencia interna del gen que codifica para la proteína L1 de la cápside viral de los HPV's. Los resultados mostraron que el 93% de tumores fueron positivos para diferentes tipos de HPV's, de los cuales el 50% tenía el HPV-16 y el resto diferentes tipos de HPV. Esto sugiere que los HPV genitales están íntimamente relacionados con el cáncer cervical.

Con las muestras negativas del estudio antes mencionado Walboomers y colaboradores en 1999, realizaron un estudio con diferentes oligonucleótidos que amplifican secuencias de los genes E6 y E7 de los HPV's. Ellos demostraron que de las muestras negativas (72 pacientes) obtenidas del estudio realizado por Bosch y col. fueron positivas a la presencia de E6 y/o E7 de HPV's, de alto riesgo lo que indica que estas muestras tenían deletado la secuencia del gen de la proteína L1. Estos datos mostraron que el 97.7% del cáncer cervical invasivo mundial está relacionado con los HPV's.

En México los tipos de HPV's que predominan son el tipo 16 y 18. Datos moleculares han demostrado que el tipo que más predomina en México es el tipo 16. Además se sabe que de cada 100 mujeres con lesiones genitales causadas por este tipo el 92 % presenta lesiones que pueden ser progresivas a cáncer y sólo el 8% pertenece al tipo 18 (Sanchez, 2006).

Normalmente la infección del tracto genital por HPV's de alto riesgo induce la formación de lesiones de bajo grado denominadas neoplasia intraepitelial cervical (NIC) grado I. Cuando estas lesiones no son tratadas adecuadamente pueden desarrollar neoplasias avanzadas (NIC II y III), que finalmente pueden generar un tumor maligno. (Zur-Hausen, 1996).

## **VIRUS DEL PAPILOMAVIRUS HUMANO (HPV)**

Históricamente al virus del papiloma se le agrupó junto con los poliomavirus para formar la familia *papoviridae*, término que se deriva a partir de las dos primeras letras de los primeros virus agrupados en esta familia: papilomavirus de conejo (PA), poliomavirus de ratón (PO) y "simian vacuolating virus" SV40. Las propiedades mostradas por estos virus incluían un tamaño pequeño, virus que carece de envoltura, cápside icosaédrica, DNA geonómico circular de doble cadena, replicación y ensamblamiento viral en el núcleo celular. Con respecto al diámetro de estos virus, la familia se dividió en los géneros poliomavirus (45nm) y papilomavirus (55nm) (Kremsdorf, 1984). Sin embargo estudios comparativos de biología molecular han mostrado que el genoma de papillomavirus es más grande que el de poliomavirus (8000 vs 5000 pb) y presenta un mayor número de genes (open reading frames) que se transcriben en la misma hebra de DNA, mientras que en poliomavirus los genes se transcriben de ambas hebras (Crawford, 1963). Por estas diferencias significativas actualmente se les considera como familias diferentes.

## CLASIFICACIÓN DE LOS HPVs

El virus del papiloma humano se ha clasificado en función del tipo de tejido que infecta y de acuerdo a su potencial para transformar a la célula infectada. Por el tejido que infectan existen dos grandes grupos: I) Los cutáneos que infectan a epitelios secos y II) aquéllos que infectan a las mucosas, los cuales pueden infectar principalmente el tracto genital y en ocasiones el tracto respiratorio, la cavidad oral o conjuntiva. Con respecto a la actividad transformante: los tipos virales de bajo riesgo son aquéllos que pueden provocar papilomas o verrugas, los de alto riesgo son aquéllos que están clasificados por las modificaciones en el epitelio cervical y los dividimos en Lesiones Escamosas Intraepiteliales de bajo grado y de alto grado (SILs) (Kurman, 1994). Previamente las lesiones preinvasivas fueron clasificadas como Neoplasias Intraepiteliales Cervicales Grados 1, 2 y 3. En la tabla 3 se ejemplifican los tipos virales más comunes asociados a distintos tipos de lesiones.

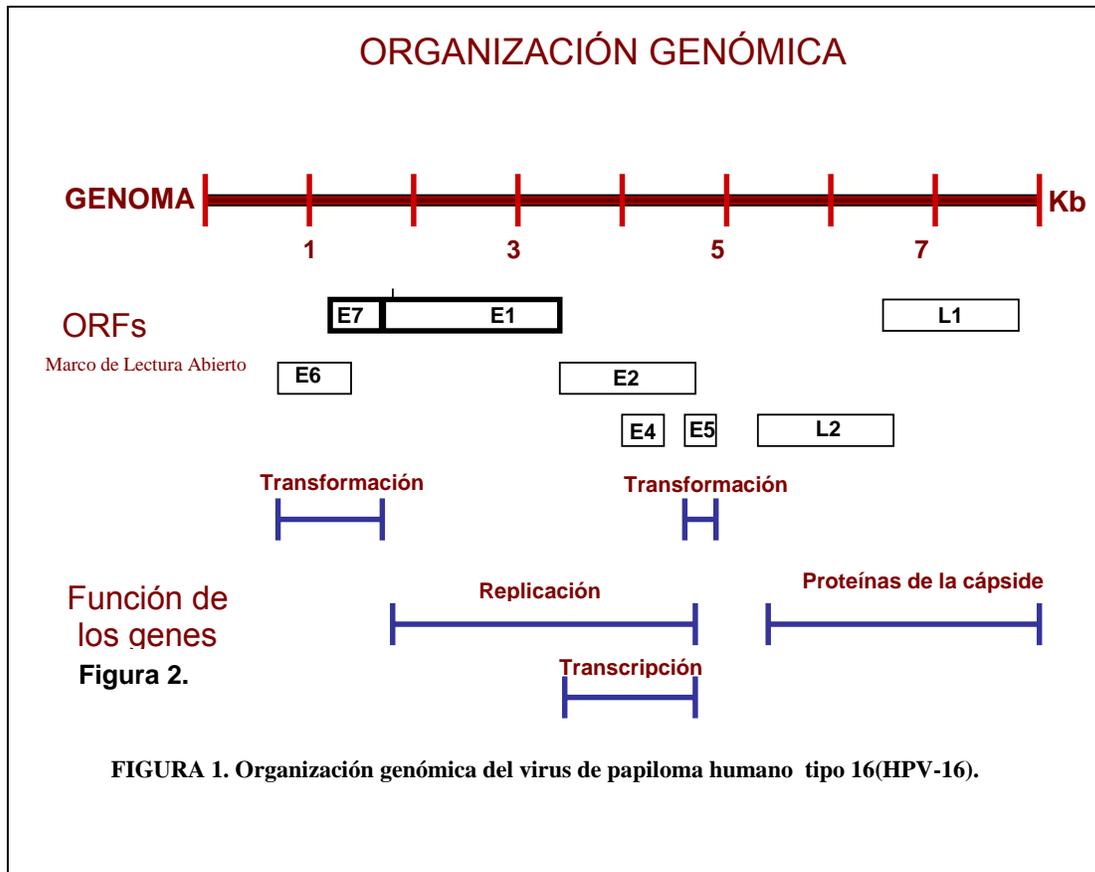
GRADO DE LESIÓN	TIPO VIRAL
Bajo riesgo	<b>6, 11, 42, 43 y 44</b>
Alto riesgo	<b>16, 18, 21, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58,</b> <b>59, 66, 68 y 70</b>

Tabla 3: clasificación de HPV. Tipos virales más frecuentes en cada tipo de lesión. Los marcados en negritas son las más comunes en mujeres de México.

## **ORGANIZACIÓN DEL GENOMA**

Los HPV están constituidos por un virión de forma icosaédrica, no envuelto, de aproximadamente 55nm. Su ADN es circular y, tiene un peso de 7.9 Kb. El genoma contiene una región regulatoria, que controla la expresión de las proteínas virales, y una región codificante, que codifica ocho proteínas. Está constituida por seis genes tempranos que son E1, E2, E4, E5, E6 y E7 y dos genes tardíos que codifican para las proteínas de la cápside viral L1 y L2 (Fig. 2). La proteína L1 constituye el 95% de la cápside viral y pesa aproximadamente 50 KDa. Los monómeros de la proteína forman pentámeros, la cápside viral está formada por 72 pentámeros aproximadamente. La proteína L1 puede autoensamblarse y dar lugar a una cápside vacía conocida como VLP (virus like particle). El papel de L2 es unirse a una copia del genoma del virus y empaquetarlo en el interior de la cápside, dando así lugar al virión maduro; la proteína L2 constituye únicamente el 5% de la capsida viral, se encuentra localizada en la parte interna del virión y pesa 70 KDa. (Pfister, 1977).

El gen E1 codifica una proteína multimérica con actividad de ATPasa y Helicasa, capaz de reconocer sitios específicos en el ADN viral, llamadas regiones de origen de replicación (ori), formando un complejo de iniciación con la proteína E2 (Wilson, 1991).



El gen E2 es un regulador importante de la transcripción y replicación viral. Fue descrito inicialmente como un activador transcripcional (Spalholz, 1985), capaz de activar la transcripción viral a través de elementos de respuesta a E2 localizados dentro del genoma viral. La proteína E2 está compuesta por dos dominios: un dominio de dimerización y unión al DNA específico de secuencia localizado en la región carboxilo terminal de la proteína, y un dominio transactivador localizado en la mitad de la región amino terminal de la proteína. Estos dos dominios están separados por una región bisagra interna, la cual no está bien conservada en tamaño, ni forma en su composición de aminoácidos entre los diferentes virus de papilomas (Law, 1979).

La proteína E4 se expresa en células que tienen una replicación del DNA viral vegetativo progresivo; aunque las proteínas E4 están expresadas en altos niveles en los tejidos infectados su papel precoz en el ciclo de vida viral no es claro (Gaillard, 1993). En cultivos de células de epitelio las proteínas E4 se encuentran asociadas con el citoesqueleto de actina. Se ha demostrado que E4 del HPV-16 induce el colapso de la red de citoqueratina sugiriendo que esta proteína puede intervenir en la salida del virus de la célula. Los datos existentes concuerdan con la posibilidad de que E4 pueda contribuir a la replicación del DNA vegetativo y para alterar el ambiente celular de una determinada manera que pueda favorecer la síntesis del virus o quizás su liberación. (Scherffner, 1993)

E5 es una proteína que se localiza principalmente en la membrana plasmática. La proteína E5 no posee actividad enzimática intrínseca y es probable que funcione mediante la alteración de la actividad de las proteínas de membranas celular involucradas en la proliferación. Se sabe que hay un aumento en los niveles de fosforilación en tirosina del receptor endógeno PDGF- $\beta$  (factor de crecimiento derivado de plaquetas) en las células transformadas promovido por E5. El mecanismo de activación de E5 del receptor PDGF- $\beta$  parece involucrar la formación de un complejo, resultando en la activación del receptor en una manera independiente del ligando. Este modelo sugiere que las subunidades individuales del dímero E5 puede en cada una unir una molécula del receptor PDGF- $\beta$ , resultando en la dimerización del receptor y activación. El receptor activado puede entonces iniciar una cascada de eventos intracelulares resultando en la estimulación mitogénica (Petti, 1991).

La proteína E6 es una proteína de 151 aminoácidos y contiene 4 motivos de Cys-X-X.Cys que se unen a moléculas de Zinc. E6 se expresa de manera temprana en el curso de la infección. Se sabe que esta proteína es capaz de immortalizar las células epiteliales de mamíferos, y los queratinocitos humanos (HFK) en presencia de la proteína E7. Sus funciones son: aumentar la vida celular por activación de la telomerasa, bloquear la apoptosis por inducción de la degradación de la p53, alterar la transcripción de genes e interacción con otras proteínas. (Barbosa, 1989 y Grossman, 1989).

E7 es una proteína nuclear de 98 aminoácidos con tres dominios, CR1, CR2 y CR3, que interactúa con varias proteínas que regulan el crecimiento celular. También se asocia con proteínas de la familia de proteínas supresoras del retinoblastoma (Rb), el complejo histona-deacetilasa, factores de transcripción (AP-1), ciclinas, ciclinas dependientes de cinasas (cdks) e inhibidores de cdks, estas asociaciones contribuyen a la capacidad de la E7 de inducir la proliferación celular y los procesos de immortalización y transformación. (Gage, 1990).

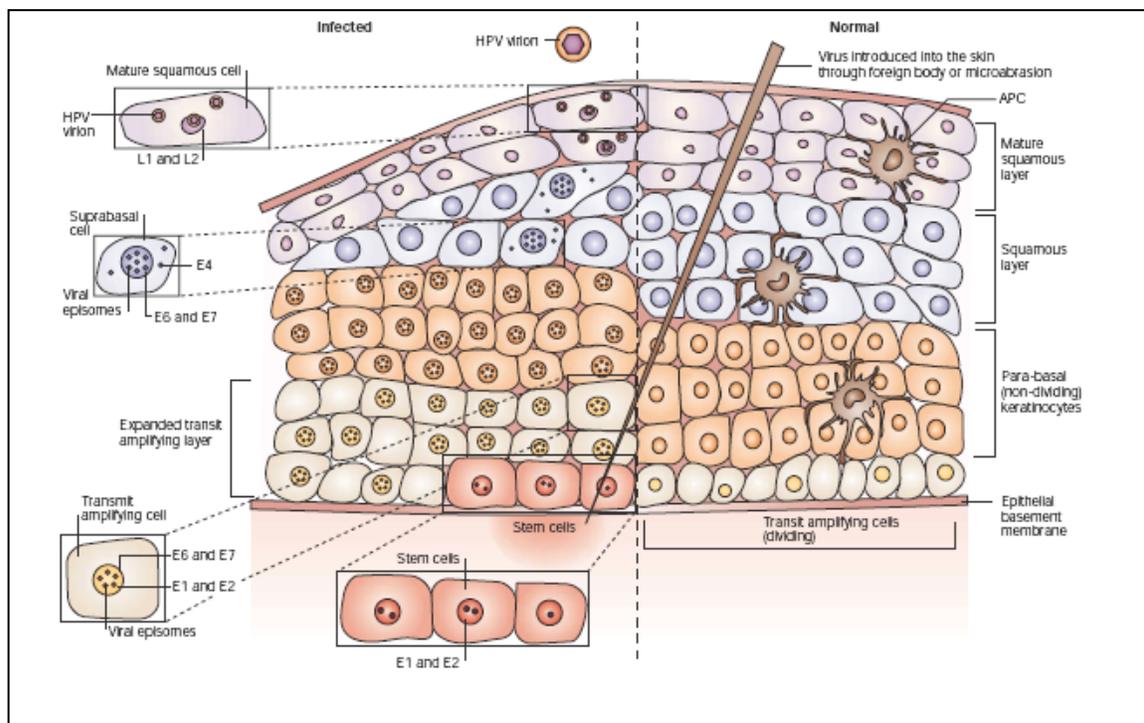
## **CICLO DE VIDA DEL HPV**

El ciclo de vida del HPV está enlazado al programa de diferenciación de las células que se encuentran en los estratos diferenciados (granuloso-córneo), mientras que el genoma viral se mantiene en las células no diferenciadas del estrato basal. Se piensa que la infección por papiloma virus ocurre a través de lesiones del epitelio que exponen células de la capa basal para la entrada del

virus. Las investigaciones que se han realizado hasta el momento sugieren a la  $\alpha$ -6 integrina como posible receptor para el virus (Yoon, 2001). Además se sabe que el heparan sulfato coopera para el anclaje inicial de viriones a las células (Joyce, 1999). Las células en la placa basal consisten en células madre y células en amplificación transitoria que están dividiéndose continuamente y proveen un reservorio de células para las regiones suprabasales. La infección de estas células lleva a la activación de una cascada de expresión de genes virales que resultan en la producción de aproximadamente 20 a 100 copias extracromosomales del DNA viral por célula. Este promedio en el número de copias es mantenido establemente en células basales sin diferenciar a través del curso de la infección (Hummed, 1992).

En la fase temprana de la infección, cuando el genoma viral llega al núcleo celular, los primeros genes que se expresan son E1 y E2. Estas proteínas forman un complejo que se une a secuencias en el origen de replicación viral y actúan para reclutar polimerasas y proteínas accesorias celulares para mediar la replicación. E2 es una proteína de unión al DNA con un sitio específico que ayuda a reclutar a E1 al origen, pero también juega un papel en la regulación de la transcripción viral a partir del promotor temprano. Cuando la proteína E2 se expresa en bajos niveles se une a su secuencia de reconocimiento y activa al promotor temprano, mientras que en altas concentraciones reprime mediante el bloqueo de la unión de factores de transcripción celular (Solinas, 1997). En el estrato espinoso, inicia la expresión de los genes E4 y E5 que participan en la liberación del virión y en la pérdida de la comunicación intercelular, respectivamente. Cuando estas células

alcanzan el estrato granuloso se presentan células vacuoladas o Koilocitos que expresan abundantemente a los genes E1 y E2, para mantener una tasa muy alta de replicación del genoma viral. Así mismo se expresan los genes tardíos que codifican para las proteínas de la cápside (Laimins, 1998). En los koilocitos se lleva a cabo el ensamblaje de los viriones y cuando las células llegan al estrato córneo por descamación se desprenden y se liberan los viriones (Fig 3).

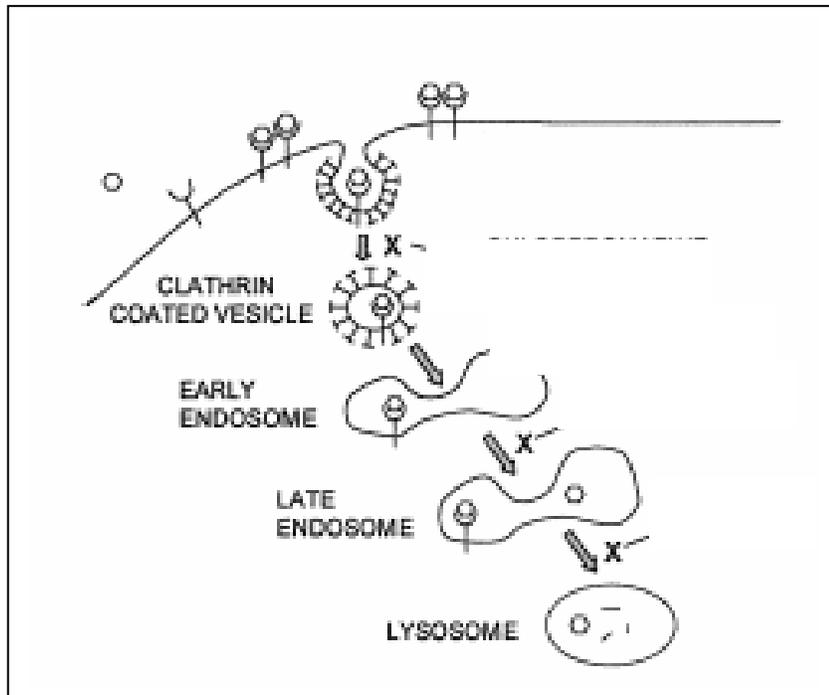


**FIGURA 3. Representación del epitelio escamoso cervical y ciclo de vida del virus del papiloma humano. (Tomada de Frazer IH. 2004.)**

## MECANISMO DE INFECCIÓN

Los HPV infectan al estrato basal de un epitelio simple y estratificado, lo cual les permite infectar órganos como la piel, la laringe, la tráquea y diferentes tipos de mucosas.

La entrada del virus a la célula requiere que el virus atraviese la membrana plasmática y que la partícula viral se desensamble para que el genoma viral pueda penetrar la membrana nuclear. Una vez que el virus interactúa con su receptor de forma específica, se inicia el proceso de endocitosis, con la formación de pequeñas vesículas membranosas que pueden estar cubiertas con una proteína llamada clatrina o caveolina (Huan, 2002). (figura 4).



**Fig. 4: Vía de entrada del papillomavirus por endocitosis dependiente de clatrina. (Tomada Day P.M. 2003).**

Generalmente los virus de DNA no envueltos son internalizados por vesículas cubiertas de clatrina. Se ha observado que VLP's de los tipos 16, 33 penetran por endocitosis, con la formación de vesículas cubiertas de clatrina que migran desde el citoplasma hasta el núcleo (Volpers, 1995). También se ha visto que las VLP's

del tipo 31 penetran por endocitosis con la formación de vesículas cubiertas de caveolina, las cuales migran hacia el retículo endoplásmico (Day, 2003).

## RECEPTORES

Actualmente algunos autores proponen a  $\alpha_6$ -Integrina como receptor del HPV-16 y como receptor de captura al heparán sulfato para llevar a cabo la infección del virus a la célula (Yoon, 2001).

Las integrinas son receptores de membrana que interaccionan con componentes de la matriz extracelular tales como la fibronectina, colágena y laminina. Las integrinas son glicoproteínas heterodiméricas constituidas de dos subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  con un peso molecular de 120 a 140 KDa. La  $\alpha_6$ -integrina forma dímeros con las subunidades  $\beta_1$  y  $\beta_4$ .

La subunidad  $\alpha$  tiene varias funciones, por ejemplo participa en la migración y adhesión celular. Por otro lado algunos estudios sugieren que las subunidades  $\alpha_6\beta_1$  y  $\alpha_6\beta_4$  pueden actuar como receptores del HPV (Yoon, 2001). También se sabe que anticuerpos dirigidos contra  $\alpha_6$ -Integrina son capaces de reducir la unión de VLP's en células epiteliales (Yoon, 2001 y Evander, 1997).

Keramat y colaboradores demostraron que en ausencia del receptor en células de keratinocitos deficientes en alfa-6 integrina, el HPV-11 era capaz de infectar a la célula, por lo que estos resultados apoyan la hipótesis de que existe otro receptor para la entrada del virus a la célula (Keramat, 2003).

Por otro lado se sabe que el Heparan Sulfato (HS) es utilizado como receptor por varios tipos virales. Algunos virus que utilizan al HS como receptor de captura

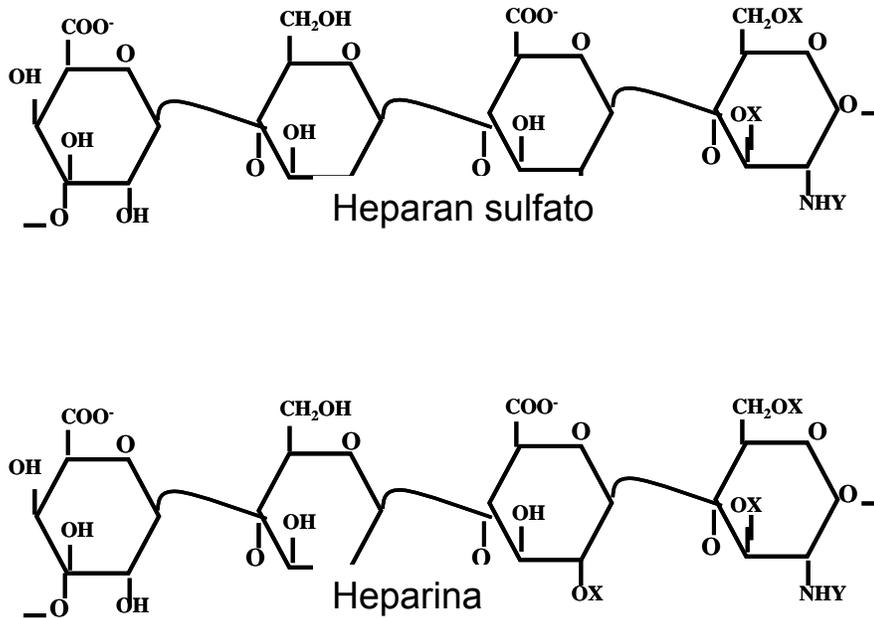
para facilitar la entrada a la célula son: el virus del Herpes tipo I y II, el Adenovirus, Citomegalovirus, el virus del Dengue y el virus de la Varicela principalmente (Wudunn, 1989, Chen, 1997 y Marks, 2001).

El HS provee un anclaje para los virus mientras que otros receptores median la entrada del patógeno en la célula huésped (Bernfield, 1999). Algunos autores sugieren que el Heparan Sulfato actúa como receptor de captura del HPV y es necesario para la internalización a la célula blanco (Combita, 2001).

El HS es un proteoglicano que pertenece a la familia de los glicosaminoglicanos; tiene una secuencia de aproximadamente 20 a 100 unidades repetidas de N-acetil-glucosamina, la cual puede ser modificada por la adición de grupos sulfatos y también está compuesto de ácido idurónico (Figura 5).

El HS se encuentra en la célula como molécula de superficie celular conocida como Glipicano o como molécula transmembranal conocida como Sindecano. (Bernfield, 1999).

En la actualidad se sabe que el HPV-16 se une al HS cuando este último se encuentra en la célula como sindecano (Jeyce, 1999., Combita, 2001 y Giroglu, 2001a).



**Figura 5. Diferencias entre el Heparan Sulfato y la Heparina. X = H ó  $\text{SO}_3^-$ , Y= Ac, H ó  $\text{SO}_3^-$ .**

El HS tiene una estructura relativamente parecida a la Heparina. La heparina es un polisacárido altamente sulfatado (trisulfato) (Ishan, 2002). (Fig 5). El HS tiene menos grupos sustituibles para sulfatos, lo que hace que el HS sea una molécula menos ácida que la heparina. La heparina ha sido utilizada como análoga del HS en diversos ensayos de unión de VLP's (Keramat, 2003).

## **RESPUESTA INMUNE CONTRA EL HPV**

Se sabe que la respuesta inmune antiviral está compuesta de 2 elementos, el celular y el humoral, y ambos son determinantes para la persistencia de las infecciones virales (Scout, 2001). La respuesta de anticuerpos está íntimamente asociada con la inmunidad medida por células. El cambio de clase de inmunoglobulinas y la producción de inmunoglobulinas G (IgG) están asociados

con la producción de citocinas de las células T cooperadoras tipo 1 o 2 (Th1, Th2) (Kawano, 1994).

Hasta la fecha se sabe que la infección por HPV induce una respuesta inmune humoral y celular que se manifiesta por la presencia de anticuerpos IgG e IgA. Se ha visto que sólo las mujeres con infecciones persistentes infectadas por HPV-16 generan anticuerpos IgG a nivel sistémico en contra la proteína L1 de la cápside viral; estos estudios fueron realizados por ELISA, utilizando como antígenos a las VLP's (Kirunbauer, 1994., Giroglou, 2001 y Sasagawa, 1998).

Muchos estudios previos han mostrado que la respuesta de anticuerpos en suero dirigidos contra las cápsides intactas del HPV-16 juegan un papel importante como marcadores específicos para las infecciones por HPV. (Giroglou, 2001).

Por otra parte, en otros estudios se ha demostrado que IgG e IgG1 son marcadores que indican una exposición acumulativa del HPV-16, mientras que IgA puede ser un marcador de infección reciente o en inicios. (Giroglou, 2001).

Adicionalmente existen pocos estudios relacionados con la generación de anticuerpos en mucosas de pacientes infectadas por HPV. Sin embargo, estos estudios indican que se ha detectado una prevalencia de IgG en mucosas que va del 10 hasta un 25% en pacientes infectadas (Bontkes 1999, Sasawaga 2003 Rocha 2003, Bierl, 2005), mientras que se ha observado una prevalencia de IgA en mucosas de un 12 hasta un 30% en este tipo de pacientes (Wang 1996, Bontkes 1999, Sasawaga 2003 y Rocha 2003)

Además se ha encontrado que los anticuerpos cervicales de tipo IgA e IgG correlacionan de manera inversamente con la presencia del DNA del HPV-16 (Bierl 2005).

Mientras que el conocimiento de la respuesta inmune humoral hacia la infección con HPV puede ser de gran ayuda para el entendimiento del curso natural de la infección, la respuesta inmune celular, se piensa que juega un papel importante para mediar la respuesta efectiva en contra del HPV.

Aparentemente la infección natural en humanos por el HPV no provoca una respuesta humoral sistémica, por lo que es importante estudiar la respuesta inmune en el punto de la infección, que normalmente es una superficie mucosal del tracto genital femenino.

En forma general, los linfocitos T citotóxicos (CTL) expresan el receptor CD8 en su superficie y juegan un papel importante en la eliminación de células infectadas por virus. Los antígenos virales son presentados en la superficie de la célula infectada en forma de péptidos cortos unidos a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I (que en humanos se llaman antígenos leucocitarios humanos o HLA). Estos péptidos de 8-11 aminoácidos, son generados por proteólisis en el citoplasma de una célula infectada y son transportadas al citoplasma del retículo endoplásmico. Después el complejo de MHC-I junto con el péptido viral y la  $\beta$ 2-microglobulina ( $\beta$ 2m), migran a la superficie celular en donde son reconocidos por el CTL mediante el receptor de célula T (TCR) de la especificidad apropiada. La activación de los CTL's requiere del reconocimiento de antígenos sobre células presentadoras de antígeno profesionales (APCs) tales como los macrófagos, linfocitos B y células dendríticas, las cuales expresan altos niveles de MHC-I y MHC-II. En el caso de una infección por HPV, se puede considerar que las proteínas tempranas E1-E7 dentro del

citoplasma de las células infectadas puedan generar péptidos capaces de unirse a moléculas de HLA clase I. En los queratinocitos del cérvix infectados con HPV, se asume que la expresión constitutiva de las proteínas E6 y E7 pueden resultar en la presentación de péptidos derivados de estas mismas proteínas, mediante moléculas HLA-I en la superficie del queratinocito. Sin embargo no es claro si los queratinocitos infectados con HPV o transformados con HPV son capaces de activar CTLs específicos para HPV, debido a que estas células han mostrado ser APC no profesionales para linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Zur-Hausen 1994, Syrjanen 1999 y Man 1998).

Por otra parte existe también la respuesta e linfocitos T cooperadores (THL) los cuales son CD4<sup>+</sup> y tienen un papel importante en la inducción de la respuesta inmune. Este tipo de linfocitos proveen de citocinas que son mediadores químicos proteicos para la comunicación intracelular. Estas citocinas puede activar a los linfocitos B para la producción de anticuerpos y también pueden activar y sostener la respuesta citotóxica de los linfocitos CD8<sup>+</sup>. A diferencia de los linfocitos CD8<sup>+</sup>, los CD4<sup>+</sup> reconocen antígenos exógenos, los cuales son tomados del medio que rodea a las APCs por medio de endocitosis o fagocitosis. Estos antígenos son procesados en endosomas en donde son degradados en fragmentos peptídicos de 11-15 aminoácidos. Estos endosomas de bajo pH, contienen moléculas MHC clase II unen a estos péptidos. A diferencia de las moléculas MHC-I, las cuales se presentan en todas las células nucleadas, las moléculas MHC-II se presentan sólo en APC profesionales tales como macrófagos, linfocitos B y células dendríticas, las cuales además de contener altos niveles de MHC-II, también son ricas en

moléculas coestimuladoras como B7-1 que son importantes para la activación celular (June 1994).

La mayoría de los epítopes peptídicos que han sido definidos para las células T CD4<sup>+</sup> son derivados de proteínas exógenas o unidas a membrana, por que éstas tienen acceso a la vía MHC-II. El procesamiento y presentación de antígenos de HPV por moléculas HLA clase II puede ocurrir por diferentes vías. Teóricamente puede ocurrir una presentación directa de antígenos de HPV debido a que la mayoría de los carcinomas de cérvix expresan HLA-II (Glew 1992), sin embargo esto es poco probable, debido a que las proteínas de genes tempranos de HPV pueden ser expresados en el citoplasma o en el núcleo, por lo cual son más factibles de presentarse por MHC clase I. Pero existe la posibilidad de las proteínas de HPV puedan ser liberadas al espacio extracelular como resultado de la muerte del queratinocito y así, estos antígenos pueden ser tomados por APCs residentes y presentados a los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. (Coleman 1994).

## **TRATAMIENTOS Y VACUNAS ANTI-HPV**

Existen diferentes tratamientos para controlar la infección por HPV. Los más comunes son la electrocirugía y la cirugía con laser. Desafortunadamente ninguno de estos tiene un 100% de éxito en la erradicación del virus. En el caso del HPV no es posible desarrollar vacunas con virus inactivados o atenuados ya que el HPV no puede ser propagado *in vitro*. Sin embargo, actualmente se está probando

una vacuna recombinante basada en el uso de VLP's, producidas a través de modelos de expresión eucarióticos.

Actualmente existe en el mercado una vacuna tetravalente con el nombre comercial de GARDASIL compuesta de la proteína recombinante L1 de los HPV de los tipos 6, 11, 16 y 18. Las proteínas L1 se producen por separado en levaduras recombinantes *Saccharomyces cerevisiae* CANADE 3C-5 (cepa 1895) y se autoensamblan para formar las partículas parecidas a virus. Las VLP's de cada tipo se purifican y se adsorben en adyuvante de aluminio.

Esta vacuna es indicada para la prevención del cáncer, de lesiones precancerosas o displásicas, de verrugas genitales y las infecciones causadas por el HPV de los tipos contenidos en la vacuna. También está indicada para la prevención de cáncer cervicouterino, vulvar y vaginal, adenocarcinomas cervicouterinos *in situ*, neoplasia intraepitelial cervical, neoplasia intraepitelial vulvar y neoplasias intraepitelial vaginal de grados 1, 2 y 3.

Esta vacuna previene la infección del HPV solamente en mujeres que no han tenido contacto con el virus, por lo que es recomendada para niños y adolescentes de 9 a 17 años y mujeres de 18 a 26 años de edad, en tres dosis individuales, donde la segunda dosis debe de ser dos meses después de la primera dosis y la tercera seis meses después de la primera dosis. Finalmente esta vacuna protege por aproximadamente 4 años y 6 meses. (MERCK & CO, 2005).

## **ANTECEDENTES DIRECTOS**

Es importante mencionar que está por salir al mercado una vacuna bivalente compuesta de la proteína recombinante L1 de los HPV de los tipos 16 y 18 que tendrá una protección mayor a los seis años.

Desafortunadamente el proceso de producción, purificación y almacenaje de este tipo de vacunas tienen un costo elevado, por lo que su aplicación a gran escala en países como el nuestro podría llegar a ser complicada.

Por lo consiguiente en nuestro laboratorio se ha venido trabajando en una vacuna de ADN contra el HPV-16 basada en el gen que codifica para la proteína L1 de la cápside del HPV-16. (Rocha, 2002).

En un trabajo preliminar la vacuna fue probada en ratones. Los resultados obtenidos mostraron que la vacunación induce la generación de anticuerpos (Rocha, 2002). Sin embargo, no se estudió la capacidad de los anticuerpos generados para bloquear la unión del HPV-16 a su célula blanco, por lo que se desconoce su potencial para inhibir la infección por HPV-16. Es por esta razón que en el presente trabajo se analizará si los anticuerpos generados por una vacuna de ADN son capaces de unirse a la cápside viral inhibiendo así la unión del HPV-16 al receptor de captura celular heparán sulfato.

## **HIPÓTESIS**

Dado que la vacuna génica que contiene al gen L1 del HPV-16 induce anticuerpos que reconocen la cápside del virus, se espera que dichos anticuerpos inhiban la unión de HPV-16 al receptor celular de captura Heparán Sulfato.

## **OBJETIVO GENERAL**

Analizar si los anticuerpos generados por la vacuna de ADN son capaces de unirse a la cápside viral inhibiendo así la unión del HPV-16 al receptor celular de captura Heparán Sulfato.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- I. Clonar del gen que codifica para la proteína L1 del HPV-16 en el vector de expresión pVAX para generar el plásmido pVAX16L1.
- II. Caracterizar del plásmido pVAX16L1 por restricción enzimática, PCR y secuenciación.
- III. Analizar la expresión *in vitro* de la proteína L1 en las células Cos-7 y B16FO con el plásmido pVAX16L1.
- IV. Inmunizar ratones con pVAX16L1 por la vía intradérmica.
- V. Evaluar la presencia de anticuerpos producidos por la vacunación con pVAX16L1,
- VI. Evaluar la capacidad de anticuerpos inducidos por la vacunación génica de inhibir la unión de VLP's a Heparan Sulfato.

# METODOLOGÍA

## ***Electroforesis de ADN en geles de agarosa***

Los geles de agarosa fueron preparados disolviendo la concentración requerida de agarosa en TBE/10  $\mu\text{g/ml}$  de bromuro de etidio (Apéndice 1). Para disolver la agarosa la mezcla fue calentada usando un horno de microondas, hasta que la agarosa estuviese completamente disuelta. La solución fue vertida en una base para geles, colocando el peine para la formación de pozos, permitiendo que la solución se gelificara. Las muestras de ADN para el análisis fueron diluidas con buffer de carga (Apéndice 2) y cargadas en el gel junto con 2  $\mu\text{l}$  (100 ng) de marcador de peso molecular. La electroforesis fue llevada a cabo en buffer TBE a 35 mA hasta que el frente del marcador migrará hasta el 75% del gel. La presencia de las bandas de ADN fue detectada por iluminación UV usando un transiluminador. (Fto/Analist Visionary) y fotografiado usando un documentador de geles ( Fotodine/Mitsubishi).

## ***Aislamiento de ADN plasmídico por lisis alcalina***

Las bacterias recombinantes fueron inoculadas en tubos con 5 ml de medio de cultivo e incubadas, a 37°C, en agitación constante toda la noche. El cultivo de bacterias se centrifugó en tubos Eppendorf estériles, para empastillarlo. El pellet se resuspendió en 200  $\mu\text{l}$  de solución I [50 mM glucosa, 25 mM Tris HCl (pH 8), 10mM de EDTA (pH 8)] y se incubó en hielo por 5 min. Se añadieron 400  $\mu\text{l}$  de la solución II (0.2 N NaOH, 1% SDS), se mezcló de 5 a 6 veces y se incubó por 5 min a

temperatura ambiente (TA). Se adicionó 300  $\mu$ l de solución III (7.5 M Acetato de Potasio) y se incubó por 10 min en hielo.

Posteriormente los tubos se centrifugaron a 13000 rpm / 5 min, el sobrenadante se pasó a otro tubo y se le adicionó 500  $\mu$ l de isopropanol. Los tubos fueron mezclados e incubados por 10 min a TA, para posteriormente centrifugarlos a 13000 rpm /5 min. Se retiró el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 200  $\mu$ l de TE (Apéndice 3) y en 100  $\mu$ l de acetato de amonio 7.5 M. Los tubos fueron mezclados e incubados en hielo por 20 min. Se centrifugó a 13000 rpm / 5 min y se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo. Se adicionaron 600  $\mu$ l de etanol al 95% y se incubó en hielo seco durante una hora. Posteriormente se centrifugaron los tubos a 13000 rpm /15 min, se decantó el sobrenadante, y se secó el pellet dejando los tubos invertidos a TA. El pellet se resuspendió en 50  $\mu$ l de agua ultra pura. (Libre de DNasa y RNasa. Invitogen).

### ***Restricción Enzimática de ADN***

El ADN fue digerido con endonucleasas de restricción diluido 1:10 en el buffer correspondiente 10X acorde a las instrucciones del fabricante. En general se usó 1U/1 $\mu$ g ADN a 37° C, toda la noche. La reacción de restricción fue analizada por electroforesis en geles de agarosa.

### ***Purificación de ADN por electroelución.***

Se cortaron las bandas de ADN a partir de un gel de agarosa. Los fragmentos se transfirieron a una cámara de electroelución (Unidirectional Electroelutor,

Internacional Biotechnologies), previamente equilibrada con buffer TBE. En los canales en forma de V de la cámara se colocaron 100µl de una solución de acetato de amonio 10M con ayuda de una micropipeta, procurando que no se formen burbujas. Las muestras se corrieron a 100 volts por 90 min y transcurrido el tiempo se retiró la solución de acetato de amonio la cual lleva el ADN, diluyéndose la muestra en TBE hasta bajar la molaridad del acetato a 2.5M. Las muestras se transfirieron a tubos eppendorf, para añadirles 1ml de etanol absoluto e incubar a -20°C toda la noche. Después se centrifugaron las muestras a 14000 rpm/30min, y la pastilla se lavó con etanol al 70%. Se centrifugó la muestra a 14000 rpm/30min y se decantó el sobrenadante, para posteriormente dejar secar la pastilla sobre una pieza de papel absorbente. Una vez eliminadas las trazas de etanol, la pastilla se resuspendió en agua ultrapura.

### ***Purificación de ADN por congelación.***

Se cortaron las bandas de ADN a partir de un gel de agarosa. Los fragmentos se transfirieron a tubos falcon de 15 ml y se incubaron a -20° C toda la noche. El líquido condensado se transfirió a un tubo eppendorf y se añadió un volumen de acetato de amonio 7.5M, las muestras se mezclaron en un vortex por 15 seg y se le añadió un volumen de etanol absoluto, se volvieron a mezclar en un vortex por 15 seg. Se incubaron las muestras toda la noche a -20 °C. Después se centrifugaron las muestras a 13000 rpm/30min, y la pastilla se lavó con etanol al 70%. Se centrifugó la muestra a 13000 rpm/30min y se decantó el sobrenadante, para posteriormente dejar secar la pastilla sobre una pieza de papel absorbente.

Una vez eliminadas las trazas de etanol, la pastilla se resuspendió en agua ultrapura.

### ***Preparación y purificación de ADN por cromatografía***

Para el análisis de secuenciación se utilizó ADN plasmídico aislado por la técnica “Fast Plasmid” (Eppendorf), usando las soluciones incluidas en el Kit, como se describe a continuación:

Se partió de un cultivo bacteriano de 1.5 ml de medio LB (Apéndice 4) selectivo crecido toda la noche a 37 °C en agitación constante. El cultivo se centrifugó a 13000 rpm/15 min, se decantó el sobrenadante y se le adicionó 400 µl de Solución de lisis, posteriormente se mezcló en un vortex por 30 seg y se incubó por 3 min a TA. Se transfirió a una columna ensamblada al tubo eppendorf y se lavó el ADN con 400 µl de buffer de lavado y se centrifugó por 1 min, posteriormente se decantó, y se volvió a reensamblar la columna al tubo eppendorf y se centrifugó por 1 min. Se transfirió la columna a un nuevo tubo eppendorf y se le adicionaron 50 µl de buffer de elución en el centro de la columna y se centrifugó por 1 min. El sobrenadante (ADN) recuperado se guardó a -20 °C.

El ADN plasmídico a ser usado para la vacunación de ratones fue purificado usando columnas Qiagen (Plasmid Mega, Qiagen-tip 2500), como se indica a continuación:

Se partió de un cultivo bacteriano de 1000 ml de medio LB selectivo crecido toda la noche a 37°C en agitación constante. El cultivo se centrifugó a 6000 rpm/15 min en una centrifuga Sorvall usando un rotor GSA a 4°C, removiéndose

todo el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 50 ml de Buffer P1 [50mM Tris HCl (pH 8); 10 mM EDTA, 100 ug/ml RNAsa A]. Se añadió 50 ml de Buffer P2 (200 mM NaOH, 1% SDS), se mezcló gentilmente y se incubó a TA por 5 min. Se añadió después 50 ml de Buffer P3 frío [3 M Acetato de Potasio (pH 5.5)], invirtiendo los tubos de 4 a 6 veces e incubando en hielo por 30 min. Se centrifugó a 11500 rpm/30 min en una centrifuga Sorvall usando un rotor GSA a 4°C, transfiriéndose el sobrenadante a un tubo nuevo. Se centrifugó a 11500 rpm/15 min en una centrifuga Sorvall usando un rotor GSA a 4°C. Se equilibró una columna Qiagen-tip 2500 colocando 35 ml de Buffer QBT [750 mM NaCl; 50 mM MOPS, (pH 7), 15% de isopropanol; 0.15% Triton X-100], permitiendo que la columna se vaciara por gravedad. Se aplicó el sobrenadante sobre la columna equilibrada. Se lavó la columna 2 veces con 100 ml de Buffer QC [1 M de NaCl, 50 mM MOPS (pH 7), 15 % isopropanol]. Se eluyó el ADN con 35 ml de Buffer QF [1.25 M NaCl; 50 mM Tris Cl pH 8.5, 15% isopropanol], en un tubo de 25 ml de policarbonato. El ADN fue precipitado añadiendo 24.5 ml de isopropanol a TA, se mezcló y centrifugó a 11000 rpm/30 min a 4°C en una centrifuga Sorvall con un rotor SS-34. Se lavó el pellet con 7 ml de etanol al 70% a TA y se volvió a centrifugar a 11000 rpm/10 min a 4°C en una centrifuga Sorvall con un rotor SS-34. Se decantó el tubo y se dejó secar el pellet dejando el tubo invertido, el ADN fue resuspendido en 1500 µl de agua ultrapura.

## ***Reacciones de ligación***

La reacción de ligación enzimática se realizó como sigue:

Antes de la ligación entre el inserto de ADN y el vector, estos fueron preparados por digestión enzimática, descritas anteriormente.

La ligación del vector e inserto de ADN se llevó a cabo en 20  $\mu$ l de volumen de ligación, con un ratio de 1:3 (vector –inserto) usando 100 ng del vector digerido, para la reacción de ligación se usó 1U de T4 ADN ligasa, buffer de ligación 5X y agua.

La mezcla de reacción fue incubada a 16 °C toda la noche. Estas ligaciones fueron usadas para transformar células DH5-  $\alpha$  competentes.

La reacción de ligación del producto de PCR en el vector TOPO TA CLONING (Invitrogene) se realizó como sigue:

En un tubo Eppendorf de 0.5 ml se colocaron: 4  $\mu$ l del producto de PCR, 1  $\mu$ l del VECTOR, 1  $\mu$ l de buffer de ligación (1.2 M de NaCl y 0.06 M de MgCl<sub>2</sub>) y 6  $\mu$ l de agua para PCR, la mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos, posteriormente 2  $\mu$ l de la reacción se usaron para transformar células DH5- $\alpha$  competentes.

## ***TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES.***

Las reacciones de ligación fueron utilizadas para transformar células competentes, preparadas de la siguiente manera:

## **Preparación de células competentes**

Se inoculó una colonia de células DH5 $\alpha$  en 4 ml de medio LB, las células se incubaron por 16 horas a 37° C en agitación. Después se transfirió todo el cultivo de bacterias a 400 ml de medio LB y se incubó a 37° C en agitación por un lapso de 2 a 4 horas, o hasta que la densidad óptica del cultivo alcanzó una absorbancia de 0.7 a una longitud de onda de 600 nm. Las células fueron transferidas a tubos de polipropileno de 50 ml estériles y puestas en hielo por 10 min. Los tubos fueron centrifugados a 4000 rpm/10 min a 4°C. Los pellet se resuspendieron en 200 ml de CaCl<sub>2</sub> 50 mM frío. Se colocaron los tubos en hielo por 15 min, se centrifugó a 4000 rpm/10 min a 4°C y los pellets nuevamente fueron resuspendidos en la solución de CaCl<sub>2</sub>, añadiendo 6 ml de glicerol. Se hicieron alícuotas de 1 ml y fueron almacenados a -70°C.

## **Transformación de células competentes**

Las alícuotas conservadas a -70°C se colocaron en hielo; una vez descongelada la muestra se añadieron de 1 a 5  $\mu$ l de la mezcla de ligación, se agitó en vortex por unos segundos y se incubó en hielo por 30 min. Como siguiente paso se les dio un choque térmico a 42° C por 90 s y las células fueron transferidas a tubos eppendorf con 1 ml de medio LB. Los tubos se incubaron a 37 ° C por 1 h en agitación constante. Las células fueron espatuladas en cajas con LB-Kanamicina (10mg/ml) o Ampicilina (50mg/ml), complementadas con 40  $\mu$ l de una solución X-gal (40mg/ml en dimetilformamida) para la selección de las transformantes. Las cajas se incubaron a 37°C durante toda la noche. Se tomaron las colonias blancas

y se sembraron en placas LB-Ampicilina o Kanamicina, y se incubaron durante toda la noche. A partir de las colonias crecidas se tomó una asada que se usó para inocular un cultivo de 3 ml de medio LB-ampicilina, el cual se incubó a 37 ° C en agitación constante durante toda la noche. Posteriormente a partir de este cultivo se obtuvo el plásmido por la técnica antes mencionada.

### ***Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).***

La secuencia del gen que codifica para la proteína L1 del HPV16 fue amplificada por PCR usando técnicas estándar. Los oligonucleótidos utilizados contaban con las siguientes características:

El oligonucleótido Forward: L1*Hind*III, contiene un sitio de corte para la enzima *Hind*III en el 5' (Secuencia : **CAA GCT TTA GTT CCA GGG TCT CCA C**).

El oligonucleótido Reverse: L1*Sal*I, contiene un sitio de corte para la enzima *Sal*I en el 3' (Secuencia: **CGT CGA CAT ATA CAC AAC AAA CAA C**).

y corresponden a los sitios 5524 y 7180 del genoma del HPV-16 respectivamente, por lo que se espera obtener un fragmento de aproximadamente 1650 pb.

La reacción de amplificación del gen que codifica para la proteína L1 se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl, junto con 100 ng de ADN plasmídico, 5 µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM, MgCl<sub>2</sub>), 1µl dNTPs (25 mM, dNTPs) , buffer 10X y 0.5U Taq Polimerasa, con 1µl (98 µM) del oligonucleótido forward y 1µl (130 µM) del oligonucleótido reverse, bajo las siguientes condiciones: 94° C 5 min, posteriormenete 30 ciclos con las siguientes especificaciones 95°C 30 seg, 66°C 60 seg, 72°C 90 seg y finalmente 72°C 10 min.

### ***Reacción de secuenciación***

El gen que codifica para la proteína L1 clonada en el vector de expresión pVAX fue sometido a una secuenciación automática en el extremo 5' del inserto con los oligonucleótidos **CAA GCT TTA GTT CCA GGG TCT CCA C**, **CGT CGA CAT ATA CAC AAC AAA CAA C**, **ATG CAG CAA ATG CAG GTG TGG**, **CCT CCC CAT GTC GTA GGT ACT** y en el extremo 3' del inserto con el oligo **TAG AAG GCA CAG TCG AGG** con el kit Dye Deoxy Terminator cycle sequencing (Perkin Elmer), bajo las siguientes condiciones: 94°C/5min.; 94°C/30, 55°C/30s, 60°C/10s, 35 ciclos; 60°C 5 min. La lectura del producto amplificado se realizó en el secuenciador automático ABI PRISM 310 (Perkin Elmer, modelo 3100, Versión 3.7 ). La secuenciación fue analizada por alineamiento con el programa Clustal X.

### ***Descongelamiento de células Cos-7, B16F0 y 293TT***

Los experimentos se realizaron en células Cos-7 (células de riñón de mono verde), B16FO (línea derivada de melanoma de ratón C57Bl/6 {H-2<sup>b</sup>}) y 293TT (derivadas de riñón fetal humano). Las células fueron crecidas y mantenidas en Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM (Invitro S.A. de C.V.) complementado con 10 % de suero fetal bovino](SFB) (Gibco BRL, Life Technology y antibióticos (10,000 U/μg/ml de mezcla de penicilina-estreptomicina) (In vitro). Las células fueron crecidas a 37°C en una atmósfera con 95% O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>. Cuando las monocapas celulares alcanzaron el 80% de confluencia fueron subcultivadas utilizando tripsina al 1% (Gibco BRL) en PBS. (Apéndice 5)

## ***Transfección en células Cos-7, B16F0 y 293TT con el plásmido pVAX16L1***

Células Cos-7, B16F0 y 293TT fueron transfectadas transitoriamente con el plásmido pVAX16L1. La transfección se realizó utilizando el agente de transfección lipídico lipofectamina™ 2000 (Invitrogen Life Technologies) como se describe a continuación:  $1 \times 10^6$  células fueron sembradas 24 horas antes de la transfección en DMEM complementado. 5  $\mu$ l de lipofectamina fueron diluidos en 250  $\mu$ l de Medio Optimen; a la par 2.5  $\mu$ g de DNA plasmídico fueron diluidos en 250  $\mu$ l de Medio Optimen y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionó el tubo que contiene el DNA plasmídico al tubo que contiene la lipofectamina y se dejó incubando por media hora a temperatura ambiente. Posteriormente se le adicionó 500  $\mu$ l de Medio Optimen a cada tubo y se dejó incubando por 15 minutos y finalmente el volumen total fue añadido a las células. Las células fueron incubadas por 5 horas para posteriormente cambiar el medio de transfección con medio fresco.

### ***Inmuncitoquímica de células transfectadas***

Los reactivos utilizados excepto los anticuerpos, se obtuvieron del Kit Histotain – DS (Zymed).

Monocapas transfectadas con pVAX16L1 y sin transfectar fueron crecidas en cubreobjetos. Las monocapas fueron lavadas 3 veces con PBS y fueron fijadas

con acetona por 10 minutos a 4 °C; se retiró la acetona y posteriormente se le adicionó peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 3% en metanol por 10 minutos a temperatura ambiente; las monocapas fueron lavadas 3 veces con PBS y fueron incubadas con 100 µl de solución bloqueadora (PBS-BSA 2% -Tween 0.05%) y se dejó incubando por 20 minutos a temperatura ambiente.

Después se preparó una cámara húmeda para colocar los cubreobjetos en donde se encontraban las monocapas y se adicionó el anticuerpo monoclonal anti-HPV K1H8 (dilución 1:50) en solución bloqueadora; (Dako). Se incubó por 2 horas a 37 °C en una incubadora.

Posteriormente se lavó 3 veces con PBS-Tween 0.05% y se adicionó el anticuerpo secundario cabra anti-ratón acoplado a biotina (dilución 1:500) (Dako); se incubó 1.5 horas y se lavó 3 veces con PBS-Tween 0.05% y se añadió estreptavidina-HRP diluida 1:100 en solución bloqueadora y se dejó incubando 45 minutos a 37 °C. Se lavó 3 veces con PBS y se añadió 100 µl de sustrato AEC (3-Amino-9-etil-carbazol), para revelar la señal del anticuerpo secundario. Se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente. Se lavó con agua-Tween 0.05% y finalmente las monocapas fueron contrateñidas con una gota de hematoxilina por 5 minutos y se lavó con agua, y se fijó con el medio de montaje COVER care (Biocare Medical).

## ***ELISA***

Se utilizaron placas de ELISA (Maxisorp; Nalge Nunc). Las placas se cubrieron con 50 ng de VLP's por pozo en PBS a 4 °C toda la noche. Posteriormente las

placas fueron lavadas con 100  $\mu$ l de TBS-Tween 20- 0.05% (Apéndice 6) 4 veces. Posteriormente se bloquearon con 200  $\mu$ l de TBS-Tween 20 -0.05%-BSA-2% para inhibir sitios inespecíficos por 2 horas a 37 °C; después se hicieron 4 lavados como antes se mencionó y se adicionó el anticuerpo primario (100  $\mu$ l de suero diluido 1:100 o secreciones cervicales diluidas 1:4) y se incubaron 2 horas a 37 °C. Posteriormente las placas se lavaron como se indicó y se adicionó 100  $\mu$ l del anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón o anti-IgA e IgG de ratón (secreciones cervicales) acoplado a Fosfatasa Alcalina (Zymed) diluido 1:500, incubándose a 37 °C por 1.5 horas. Después se hicieron 6 lavados y se le adicionó el sustrato para la fosfatasa alcalina (4-Nitrofenol Fosfatasa 0.03g/5ml) (Sigma 104) diluida en dietanolamina al 10% (pH de 9.8) (Sigma) por 30 minutos y posteriormente se llevó a cabo la lectura a una longitud de 405 nm en un lector de Elisa BioTek.

### ***Ensayo de inhibición de la unión de VLP's a Heparan Sulfato***

Día 1:

Se utilizaron placas de 96 pozos (Nalge Nunc). Las placas se cubrieron con 200 ng de Heparan sulfato (HS proteoglycan Sigma) diluido en PBS y se incubó a temperatura ambiente toda la noche.

Día 2:

Se prepararon tubos eppendorf (de 1.5 ml) adicionándoles 50 ng de VLP's (diluidas en BSA al 2% en PBS-T) y 1  $\mu$ l de suero de los ratones inmunizados y se dejó incubando una hora a 4°C.

Pasado el tiempo la placa fue lavada 2 veces con 100  $\mu$ l de PBS-T. Posteriormente se bloqueó la placa con 200  $\mu$ l de PBS-BSA 2% para inhibir sitios inespecíficos por 2 horas a 37 °C, después se hicieron 2 lavados de 100  $\mu$ l de TBS-T y posteriormente se adicionaron las VLP's con el anticuerpo y se dejó incubando 1 hora a 4°C; posteriormente se realizaron 2 lavados de 100  $\mu$ l de TBS-T y se adicionó el anticuerpo primario diluido 1:100 en BSA al 2% con TBS Tween 20 al 0.05% (TBS-T-BSA) utilizando un anticuerpo K1H8 monoclonal anti-HPV-16 (Dako) y se incubó por 2 horas a 37 °C. Posteriormente la placa se lavó como se indicó anteriormente 4 veces y se adicionó 100  $\mu$ l del anticuerpo de cabra anti- IgG e IgM de ratón acoplado a Fosfatasa Alcalina (Zymed) diluido 1:500 en TBS-T-BSA para los sueros y para las secreciones cervicales se utilizó un anticuerpo secundario policlonal de cabra anti-IgA de-ratón acoplado a fosfatasa Alcalina y se incubó a 37 °C por 1.5 horas. Después se realizaron 6 lavados como se indicó anteriormente y se le adicionó el sustrato para la fosfatasa alcalina (4-Nitrofenol Fosfatasa 0.03g/5ml) (Sigma 104) diluido en dietanolamina al 10% (pH de 9.8) (Sigma) y se dejó incubando 1 hora a 37° C y posteriormente se llevó a cabo la lectura a una longitud de 405 nm en un lector de Elisa BioTek.

## ***Inmunización de ratones***

Se realizaron 4 inmunizaciones a ratones hembras de 4 a 6 semanas de edad de la cepa C57BL/6 {H-2<sup>b</sup>} por vía intradérmica a intervalos de 14 días. Antes de cada inmunización se obtuvieron muestras de sangre y las secreciones cervicales de cada uno de ellos se recolectaba con 4 lavados en 30  $\mu$ l de PBS. Las inmunizaciones se llevaron a cabo como se muestra en la tabla 4.

El primer grupo de ratones fue inoculado con el plásmido pVAX16L1. Un segundo grupo de ratones fue inoculado con pVAX vacío. Como un control positivo para el desarrollo de inmunidad humoral se incluyó un grupo de ratones que fue inmunizado con VLP's de HPV16. Un cuarto grupo de animales fue inmunizado con un péptido (p10) derivado de la región carboxilo terminal de L1, como un control estructural negativo. Finalmente se incluyó un grupo de animales a los que se administró sólo PBS.

Inmunógeno administrado	Ratones	1ª Inmunización ( $\mu$ g de inmunógeno)	2ª Inmunización ( $\mu$ g de inmunógeno)	3ª Inmunización ( $\mu$ g de inmunógeno)	4ª Inmunización ( $\mu$ g de inmunógeno)
PBS	5	0.0	0.0	0.0	0.0
P10	5	250	50	50	50
VLP's	5	50	10	10	10
pVAX	5	300	100	100	100
<b>pVAX16L1</b>	<b>5</b>	300	100	100	100

Tabla 4: Concentraciones de inmunógeno aplicado a cada grupo de ratones, en cada inmunización.

## **Análisis Estadístico**

Los datos fueron analizados utilizando la prueba *t-student*, considerándose una  $p$  mayor o igual a 0.05 como el valor de significancia.

# RESULTADOS

## 1) Clonación del gen L1 del HPV16 en el vector pCRII-TOPO.

El genoma del HPV16 prototipo fue obtenido a partir del plásmido pUCHPV16, donde se encuentra clonado en un sitio *Bam*HI único. El genoma viral se aisló mediante su corte con *Bam*HI y posterior separación por electroforesis en un gel de agarosa (Figura 6).

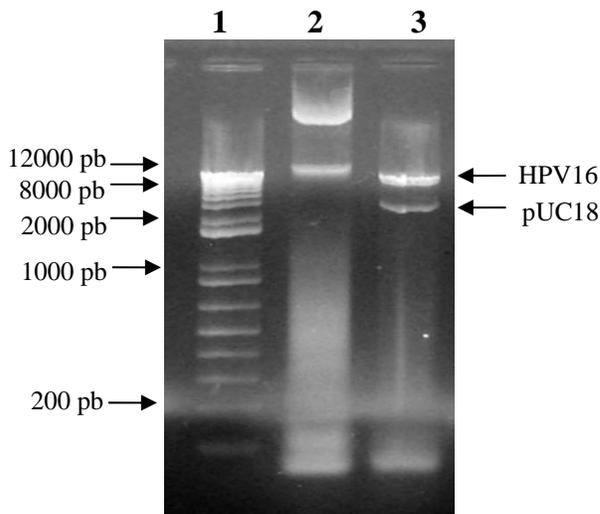


Figura 6: Aislamiento del genoma del HPV16. El genoma completo del HPV16 (8000 pb) fue obtenido a partir del plásmido pUCHPV16, mediante su corte con *Bam*HI. La imagen muestra una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carriles: 1.- marcador de peso molecular, 2.- pUCHPV16 sin cortar y 3.- pUCHPV16 cortado con la enzima *Bam*HI.

Como se puede observar el corte con la enzima *Bam*HI produjo 2 fragmentos, uno de 8000 pb que corresponde al genoma del HPV16 y uno de 2000 pb correspondiente con el peso esperado del vector pUC18.

Una vez cortado el plásmido, se procedió a purificar el genoma viral por la técnica de electroelución. El resultado de la misma se muestra en la figura 7.

El genoma del HPV16 posee un sitio único para la enzima *Bam*HI, localizado en el sitio 6150, dentro del marco de lectura del gen L1. Por lo tanto,

con la finalidad de recobrar la integridad del mismo, el fragmento aislado fue re-ligado, utilizando la enzima T4 ADN ligasa.

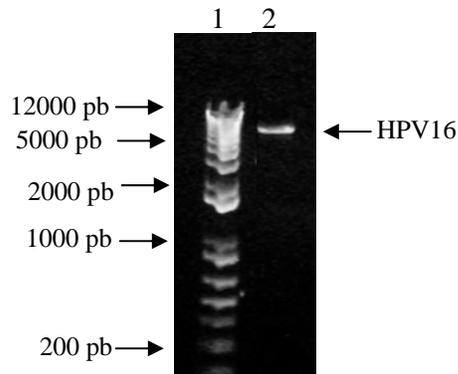


Figura 7. Purificación del genoma del HPV16. El fragmento *Bam*HI - *Bam*HI de 8000 pb, fue separado electroforéticamente y purificado por la técnica de electroelución. En la imagen se muestra el análisis electroforético (agarosa al 0.8%) del producto purificado. Carriles: 1.- marcador de peso molecular, 2.- producto purificado.

Una vez re-ligado el genoma del HPV16 se utilizó como templado para llevar a cabo una PCR con los oligonucleótidos que amplifican el gen L1 como se describió en la sección de metodología. Esto nos permitió introducir 2 sitios de restricción (*Hind*III y *Sal*I) para una manipulación adecuada.

En la figura 8 se muestra el resultado de la PCR, como control positivo para la reacción se utilizó el plásmido pEGFP-L1, que contiene el gen L1 del HPV16. Como se puede observar la PCR del HPV16 re-ligado produjo una banda del mismo peso molecular que la producida con pEGFP-L1, y que corresponde al peso esperado para el fragmento que contiene a L1 (1650 pb). Por otro lado, en el control negativo que contenía agua en lugar de DNA templado, no se observó amplificación. Estos resultados indican que la re-ligación del HPV16 en el sitio *Bam*HI fue satisfactoria recuperándose la integridad del gen L1.

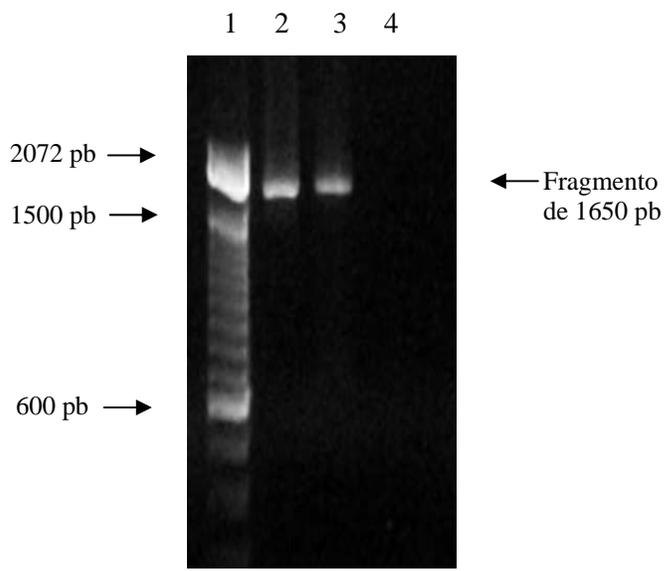


Figura 8. Amplificación del gen L1 del HPV16 por PCR. El gen L1 fue amplificado usando los oligonucleótidos L1*Hind*III y L1*Sal*I. Como control positivo se utilizó el plásmido pEGFP-L1. Los productos de la reacción fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.2%. Carriles: 1.- marcador de peso molecular, 2.- control positivo, 3.-producto amplificado, 4.- control negativo.

Una vez obtenido el fragmento de 1650 pb, se ligó directamente en el vector pCRII- TOPO. El producto de la ligación se utilizó para transformar células DH5- $\alpha$  competentes, que fueron posteriormente sembradas en placas de agar con ampicilina a las que se adicionó X-gal. El vector pCRII-TOPO linearizado posee residuos simples de deoxitimidina (T) expuestos en dirección 3', contenidos dentro del gen LacZ. Estos residuos permiten la ligación directa de productos de PCR. Sin embargo, cuando la ligación es exitosa el gen LacZ es interrumpido por el inserto, de tal forma que la expresión de la enzima  $\beta$ -Galactosidasa se bloquea. De esta manera, al sembrar las bacterias transformadas en placas con X-gal, aquéllas que no presenten el inserto serán capaces de expresar la enzima y transformar el substrato adquiriendo un color azul, mientras que las bacterias que tengan el inserto no producirán la enzima y permanecerán blancas. Se obtuvieron colonias de color azules y blancas. Los análisis posteriores se llevaron a cabo solo en las colonias blancas.

Se seleccionaron 6 colonias blancas, se extrajo el ADN y se analizó por restricción con las enzimas *Hind*III y *Sal*I. *Hind*III corta en el sitio 5523 y *Sal*I corta en el sitio 7196 del genoma del HPV-16, por lo que se espera obtener un fragmento de aproximadamente 1650 pb.

Como se observa en la figura 9 la restricción del ADN de las colonias 1,2,3,5 y 6 produjo 2 fragmentos, uno que corresponde a 1650 pb y otro de 4000 pb que corresponde al peso del vector. En la colonia 4 no se observó la liberación de tales fragmentos. Esto muestra que en 5 de las 6 colonias analizadas ocurrió una ligación exitosa del fragmento de PCR en el vector.

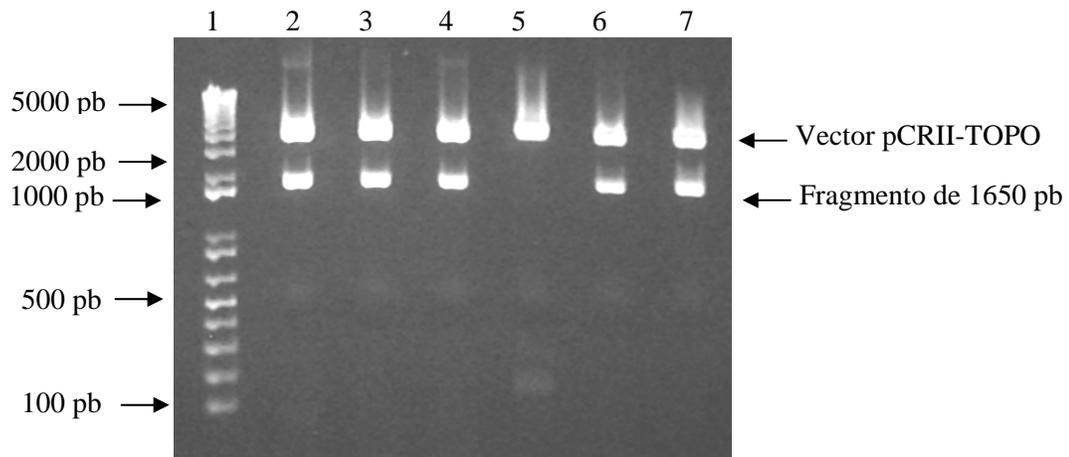


Figura 9: Análisis de colonias transformadas con el producto de la ligación del gen L1 en el vector pCRII-TOPO. El ADN de las colonias fue sometido a una doble restricción con *Hind*III y *Sal*I, y analizado en un gel de agarosa al 1%. Carriles 1.- marcador de peso molecular, 2-7.- colonias 1-6 cortadas enzimáticamente.

Para corroborar si el fragmento se había insertado en la dirección correcta se procedió a realizar una restricción enzimática con la enzima *Bam*HI. Debido a que

esta enzima tiene un sitio de corte en el sitio 6150 de L1 y otro en el vector pCRII-TOPO, si el fragmento se encuentra insertado 5' a 3' se esperarían dos fragmentos liberados, uno de 1050 pb y otro de 3600 pb, pero sí el fragmento se insertó de 3' a 5' se obtendría dos fragmentos de 670 pb y otro de 4980 pb.

Como se observa en la figura 10, cinco de las seis colonias analizadas (1,2,3,5 y 6) presentaron el patrón de bandas esperado para una ligación del inserto en dirección de 5' a 3'. Estos resultados nos sugieren que el fragmento está en fase. A partir de estas colonias se obtuvo el plásmido pTOPOL1. Una vez obtenido el gen de la proteína L1 se purificó por el método de electroelución y se llevó a cabo su subclonación en el vector de expresión pVAX.

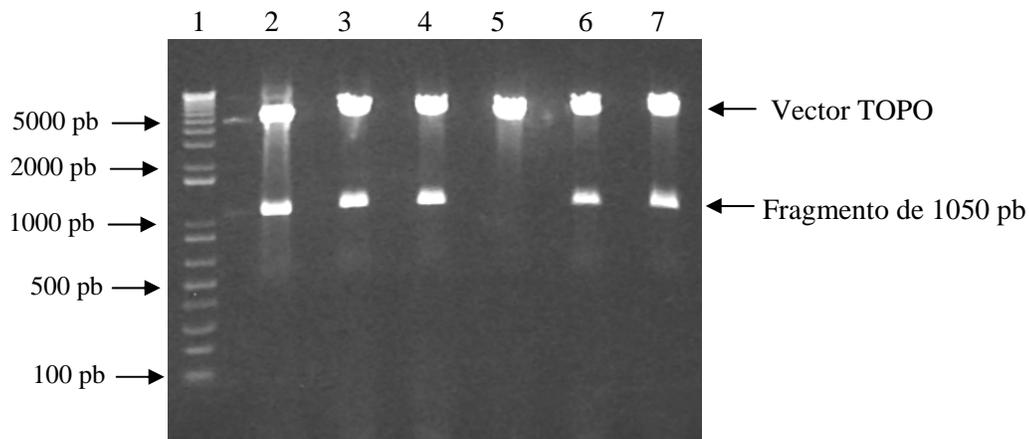


Fig 10: Análisis de las colonias transformadas con el producto de ligación del gen L1 en el vector pCRII-TOPO. El ADN de las colonias fue sometido a una restricción enzimática con la enzima *Bam*HI, para corroborar que el fragmento se había insertado de 5' a 3' y fue analizado en un gel de agarosa al 1%. Carriles: 1.- marcador de peso molecular, carriles.- 2-7 colonias 1-6 cortadas enzimáticamente.

## 2) Subclonación del gen L1 en el Vector de expresión pVAX.

El vector de expresión pVAX se sometió a una doble restricción con las enzimas *Hind*III y *Xho*I (figura 11), con la finalidad de subclonar el fragmento que contiene a L1 y que está flanqueado por los sitios *Hind*III y *Sal*I. Las enzimas *Sal*I y *Xho*I generan fragmentos homólogos entre sí por lo que se puede llevar a cabo una clonación dirigida entre el vector y el inserto. Este último se obtuvo mediante el corte con dichas enzimas del plásmido pTOPOL1.

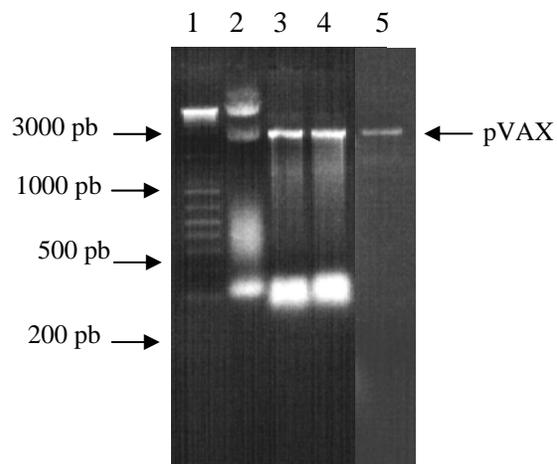


Fig 11: Vector de expresión pVAX cortado con las enzimas *Hind*III y *Xho*I. Gel de agarosa al 1%. Carriles: 1.- marcador de peso molecular 2.- Vector pVAX sin cortar, 3.- vector pVAX cortado con *Hind*III, 4.- vector pVAX cortado con *Xho*I, 5.- pVAX cortado con *Hind*III y *Xho*I purificado por la técnica de congelación.

En la figura 11 se muestra al vector de expresión cortado con ambas enzimas y purificado por la técnica de congelación. El vector pVAX obtenido se sometió a una reacción de ligación con el fragmento y posteriormente se usó el producto de la ligación para transformar células competentes DH5- $\alpha$ .

Se seleccionaron 4 colonias y su ADN fue sometido a un análisis de restricción con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III, debido a que el gen que codifica para la proteína L1 tiene un sitio de corte único para la enzima *Bam*HI, y por otro lado la

región 5' del gen L1 fue clonado en el sitio *HindIII* de pVAX; este análisis permitirá por lo tanto definir la presencia del inserto así como el que se encuentre clonado en dirección 3' a 5', en tal caso se espera obtener un fragmento de aproximadamente 590 pb y otro de 4010 pb.

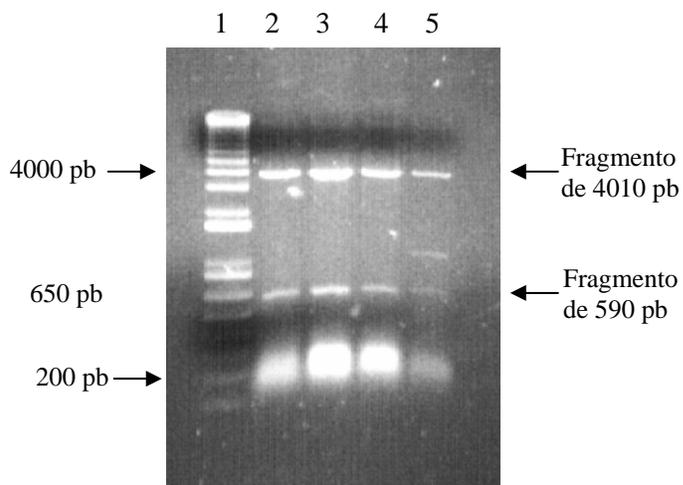


Figura 12: Análisis de colonias transformadas con el producto del gen de L1 en pVAX. El ADN de las colonias fue sometido a una doble restricción con las enzimas *BamHI* y *HindIII*. Gel de agarosa al 1%. Carriles 1.- marcador de peso molecular, carriles 2-5.- colonias 1-4 cortadas enzimáticamente.

El resultado del análisis de restricción de las 4 colonias se muestra en la figura 12. Como se puede observar, en 3 de las colonias analizadas se liberaron los dos fragmentos antes mencionados, lo que muestra que el gen L1 se encuentra clonado en fase en el vector pVAX.

Para corroborar que el gen de L1 se encontraba íntegro en el plásmido se procedió a realizar una doble restricción con las enzimas *HindIII* y *XbaI*, se decidió cortar con esta última enzima debido a que se encuentra flanqueando el sitio 3' del fragmento insertado en el vector pVAX. El resultado de la restricción se muestra en la figura 13.

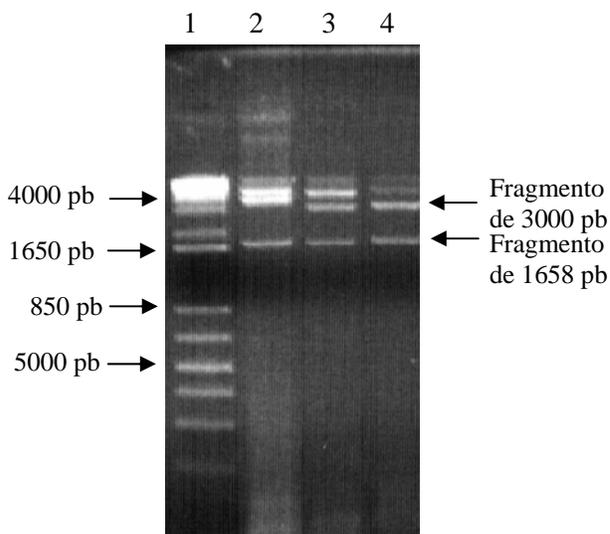


Figura 13: Análisis de colonias transformadas con el gen L1 en el vector pVAX. El ADN de las colonias fue sometido a una doble restricción con *Hind*III y *Xba*I. Gel de agarosa al 1%. Carriles: 1.- marcador de peso molecular, carriles: 2-4.- colonias 1-3 cortadas enzimáticamente.

Como se observa en la figura 13 las enzimas *Hind*III y *Xba*I liberaron dos fragmentos, uno de 3000 pb aproximadamente, que corresponde al vector pVAX, y otro de 1658 pb que contiene al gen de la proteína L1. Estos datos indican que el fragmento completo de 1650 pb está clonado en el vector pVAX. El plásmido obtenido fue designado pVAX16L1.

Con la finalidad de verificar la integridad del gen L1 en pVAX, se procedió a secuenciarlo utilizando los oligos:

L1*Hind*III: **CAA GCT TTA GTT CCA GGG TCT CCA C**

pVL1F: **ATG CAG CAA ATG CAG GTG TGG**

pVL1R: **CCT CCC CAT GTC GTA GGT ACT**

pBGH: **TAG AAG GCA CAG TCG AGG**

El uso de estos oligonucleótidos permitió secuenciar todo el gen que codifica para la proteína L1.

Por otro lado se generó una secuencia prototipo del vector pVAX con el inserto del gen L1 con ayuda del programa DNAclub, la secuencia prototipo abarca tanto el vector pVAX como el gen de L1.

A continuación se presenta la alineación de las secuencias prototipo (p16L1) y las obtenidas con los diferentes oligonucleótidos:

```

P16L1          ATGCAGGTGACTTTTATTTACATCCTAGTTATTACATGTTACGAAAACGACGTAAACGTT
hind3          ATGCAGGTGACTTTTATTTACATCCTAGTTATTACATGTTACGAAAACGACGTAAACGTT
               *****

p16L1          TACCATATTTTTTTCAGATGTCTCTTTGGCTGCCTAGTGAGGCCACTGTCTACTTGCCT
hind3          TACCATATTTTTTTCAGATGTCTCTTTGGCTGCCTAGTGAGGCCACTGTCTACTTGCCT
               *****

P16L1          CCTGTCCCAGTATCTAAGGTTGTAAGCACGGATGAATATGTTGCACGCACAAAATATAT
hind3          CCTGTCCCAGTATCTAAGGTTGTAAGCACGGATGAATATGTTGCACGCACAAAATATAT
               *****

P16L1          TATCATGCAGGAACATCCAGACTACTTGCAGTTGGACATCCCTATTTTCTATTAAAAAA
hind3          TATCATGCAGGAACATCCAGACTACTTGCAGTTGGACATCCCTATTTTCTATTAAAAAA
               *****

PVAXL1         CCTAACAAATAACAAAATATTAGTTCCTAAAGTATCAGGATTACAATACA
hind3          CCTAACAAATAACAAAATATTAGTTCCTAAAGTATCAGGATTACAATACA
               *****

P16L1          GGGTATTTAGAATACATTTACCTGACCCCAATAAGTTTGGTTTTCCTGACACCTCATTTT
hind3          GGGTATTTAGAATACATTTACCTGACCCCAATAAGTTTGGTTTTCCTGACACCTCATTTT
               *****

p16L1          ATAATCCAGATACACAGCGGCTGGTTTGGGCCTGTGTAGGTGTTGAGGTAGGTCGTGGTC
hind3          ATAATCCAGATACACAGCGGCTGGTTTGGGCCTGTGTAGGTGTTGAGGTAGGTCGTGGTC
               *****

p16L1          AGCCATTAGGTGTGGCATTAGTGCCATCCTTTATTAATAAAATTGGATGACACAGAAA
hind3          AGCCATTAGGTGTGGCATTAGTGCCATCCTTTATTAATAAAATTGGATGACACAGAAA
               *****

P16L1          ATGCTAGTGCTTATGCAGCAAATGCAGGTGTGG
hind3          ATGCTAGTGCTTATGCAGCAAATGCAGGTGTGG
               *****

p16L1          TAATAGAGAATGTATATCTATGGATTACAAACAAACA
p16R          TAATAGAGAATGTATATCTATGGATTACAAACAAACA
               *****

p16F           CAATTGTGTTTAATTGGTTGCAAACCACCTATAGGGGAACACTGGGGCAAAGGATCCCC
pbgh          -----
p16L1         CAATTGTGTTTAATTGGTTGCAAACCACCTATAGGGGAACACTGGGGCAAAGGATCCCC
p16R         CAATTGTGTTTAATTGGTTGCAAACCACCTATAGGGGAACACTGGGGCAAAGGATCCCC
               *****

p16F           ATGTACCAATGTTGCAGTAAATCCAGGTGATTGTCCACCATTAGAGTTAATAAACACAGT
pbgh          -----
p16L1         ATGTACCAATGTTGCAGTAAATCCAGGTGATTGTCCACCATTAGAGTTAATAAACACAGT

```

p16R ATGTACCAATGTTGCAGTAAATCCAGGTGATGTCCACCATTAGAGTTAATAAACACAGT  
\*\*\*\*\*

p16F TATTCAGGATGGTGATATGGTTCATACTGGCTTTGGTGCTATGGACTTTACTACATTACA  
pbgh -----TACATTACA  
p16L1 TATTCAGGATGGTGATATGGTTCATACTGGCTTTGGTGCTATGGACTTTACTACATTACA  
p16R TATTCAGGATGGTGATATGGTTCATACTGGCTTTGGTGCTATGGACTTTACTACATTACA  
\*\*\*\*\*

p16F GGCTAACAAAAGTGAAGTTCCTACTGGATATTTGTACATCTATTTGCAAATATCCAGATTA  
pbgh GGCTAACAAAAGTGAAGTTCCTACTGGATATTTGTACATCTATTTGCAAATATCCAGATTA  
p16L1 GGCTAACAAAAGTGAAGTTCCTACTGGATATTTGTACATCTATTTGCAAATATCCAGATTA  
p16R GGCTAACAAAAGTGAAGTTCCTACTGGATATTTGTACATCTATTTGCAAATATCCAGATTA  
\*\*\*\*\*

p16F TATTAANAATGGTGTGTCAGAGCCATATGGCGACAGCTTATTTTTTTTATTTACGAAGGGAACA  
pbgh TATTAANAATGGTGTGTCAGAGCCATATGGCGACAGCTTATTTTTTTTATTTACGAAGGGAACA  
p16L1 TATTAANAATGGTGTGTCAGAGCCATATGGCGACAGCTTATTTTTTTTATTTACGAAGGGAACA  
p16R TATTAANAATGGTGTGTCAGAGCCATATGGCGACAGCTTATTTTTTTTATTTACGAAGGGAACA  
\*\*\*\*\*

p16F AATGTTTGTAGACATTTATTTAATAGGGCTGGTACTGTTGGTGAAAATGTACCAGACGA  
pbgh AATGTTTGTAGACATTTATTTAATAGGGCTGGTACTGTTGGTGAAAATGTACCAGACGA  
p16L1 AATGTTTGTAGACATTTATTTAATAGGGCTGGTACTGTTGGTGAAAATGTACCAGACGA  
p16R AATGTTTGTAGACATTTATTTAATAGGGCTGGTACTGTTGGTGAAAATGTACCAGACGA  
\*\*\*\*\*

p16F TTTATACATTAAGGCTCTGGGTCTACTGCAAATTTAGCCAGTTCAAATTTATTTTCCTAC  
pbgh TTTATACATTAAGGCTCTGGGTCTACTGCAAATTTAGCCAGTTCAAATTTATTTTCCTAC  
p16L1 TTTATACATTAAGGCTCTGGGTCTACTGCAAATTTAGCCAGTTCAAATTTATTTTCCTAC  
p16R TTTATACATTAAGGCTCTGGGTCTACTGCAAATTTAGCCAGTTCAAATTTATTTTCCTAC  
\*\*\*\*\*

p16F ACCTAGTGGTTCTATGGTTACCTCTGATGCCCAAATACTCAATAAACCTTATTGGTTACA  
pbgh ACCTAGTGGTTCTATGGTTACCTCTGATGCCCAAATACTCAATAAACCTTATTGGTTACA  
p16L1 ACCTAGTGGTTCTATGGTTACCTCTGATGCCCAAATACTCAATAAACCTTATTGGTTACA  
p16R ACCTAGTGGTTCTATGGTTACCTCTGATGCCCAAATACTCAATAAACCTTATTGGTTACA  
\*\*\*\*\*

p16F ACGAGCACAGGGCCACAATAATGGCATTGTTGGGGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGT  
pbgh ACGAGCACAGGGCCACAATAATGGCATTGTTGGGGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGT  
p16L1 ACGAGCACAGGGCCACAATAATGGCATTGTTGGGGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGT  
p16R ACGAGCACAGGGCCACAATAATGGCATTGTTGGGGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGT  
\*\*\*\*\*

p16F TGATACTACACGCAGTACAAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAAACTA  
pbgh TGATACTACACGCAGTACAAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAAACTA  
p16L1 TGATACTACACGCAGTACAAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAAACTA  
p16R TGATACTACACGCAGTACAAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAAACTA  
\*\*\*\*\*

p16F CATATAAAAATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAG  
pbgh CATATAAAAATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAG  
p16L1 CATATAAAAATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAG  
p16R CATATAAAAATACTAACTTTAAGC-----  
\*\*\*\*\*

p16F TTTATTTTTCAACTGTGCAAAAACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATTCT  
pbgh TTTATTTTTCAACTGTGCAAAAACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATTCT  
p16L1 TTTATTTTTCAACTGTGCAAAAACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATTCT  
p16R -----

```

*****
p16F      ATGAATTCCACTATTTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCAGGGAGGCAC
pbgh      ATGAATTCCACTATTTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCAGGAGGCAC
p16L1     ATGAATTCCACTATTTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCAGGAGGCAC
p16R      -----
*****

p16F      ACTAGAAGATACTTATAGGTTTGTATCCCAGCCAAGTGCTTGTCAAAAACATACACC
pbgh      ACTAGAAGATACTTATAGGTTTGTATCCCAGGCAATTGCTTGTCAAAAACATACACC
p16L1     ACTAGAAGATACTTATAGGTTTGTATCCCAGGCAATTGCTTGTCAAAAACATACACC
p16R      -----
*****

p16F      TCCAGCACCTAAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACACTTTTGGGAAGTAAATTTAAA
pbgh      TCCAGCACCTAAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACACTTTTGGGAAGTAAATTTAAA
p16L1     TCCAGCACCTAAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACACTTTTGGGAAGTAAATTTAAA
p16R      -----
*****

p16F      GGGAAA-----
pbgh      GGAAAAGTTTTCTGCAGACCTAGATCAGTTTCCTTTAGGACGCAAATTTTACTACAAGC
p16L1     GGAAAAGTTTTCTGCAGACCTAGATCAGTTTCCTTTAGGACGCAAATTTTACTACAAGC
p16R      -----
*****

p16F      -----
pbgh      AGGATTGAAGGCCAAACCAAATTTACATTAGGAAAACGAAAAGCTACACCCACCACCTC
p16L1     AGGATTGAAGGCCAAACCAAATTTACATTAGGAAAACGAAAAGCTACACCCACCACCTC
p16R      -----
*****

p16F      -----
pbgh      ATCTACCTCTACAAGTAAACGCAAAAAACGTAAGCTGTAAGTATTGTATGTATGTTG
p16L1     ATCTACCTCTACAAGTAAACGCAAAAAACGTAAGCTGTAA-----
p16R      -----
*****

```

Fig. 14. Alineación de la secuencia del plásmido pVAX16L1 (p16L1) con las secuencias obtenidas de los oligonucleótidos L1HindIII (hind3), pVL1F (p16F), pVL1R (p16R) y pBGH (pbgh) . Los sitios de inicio y terminación de la transcripción se presenta en letras negras.

Al comparar la secuencia analizada con la secuencia del gen L1 prototipo (figura 14) se observó lo siguiente:

La reacción con el oligonucleótido T7 permitió secuenciar a partir de 26 pb de la región de policlonación río arriba del inserto, mostrando una concordancia del 98% con la secuencia prototipo. Por otro lado, los oligonucleótido pV16L1F y pV16L1R y pBGH permitieron terminar de secuenciar al gen que codifica para la proteína L1.

En el sitio 868 se detectó un cambio de base de una Guanina por una Adenina, generando un cambio de aminoácido de una Asparagina por una Serina, sin embargo ambos aminoácidos son no polares y es probable que el cambio no afecte la estructura de la proteína. Por otra parte se detectó la sustitución de una Citosina por una Timina en el sitio 1097, sin embargo esta mutación es silenciosa ya que el nuevo codón codifica para una Tirosina, al igual que el codón original.

### ***3) DETECCIÓN POR RT-PCR DEL GEN L1 EN CÉLULAS DE MAMÍFERO TRANSFECTADAS CON EL PLASMIDO pVAX16L1***

Una vez que se obtuvo la secuenciación completa del inserto y se verificó su integridad, se procedió a analizar la expresión del gen de la proteína L1 a nivel de RNAm transfectando células 293TT derivadas de riñón fetal humano utilizando el plásmido pVAX16L1, posteriormente se obtuvo el RNAm de las células transfectadas y se procedió a realizar una RT-PCR utilizando los oligonucleótidos MY09 y MY11 que amplifican un fragmento del gen de la proteína L1 de aproximadamente 450 pb.

En la figura 15 se muestra el cDNA obtenido de la RT-PCR, en el carril 1 se utilizó el RNA total de células sin transfectar, observándose solamente el control de  $\beta$ -actina. En el carril 3 se analizó el RNAm de células transfectadas con el vector vacío pVAX, donde se observó nuevamente solo el control de  $\beta$ -actina.

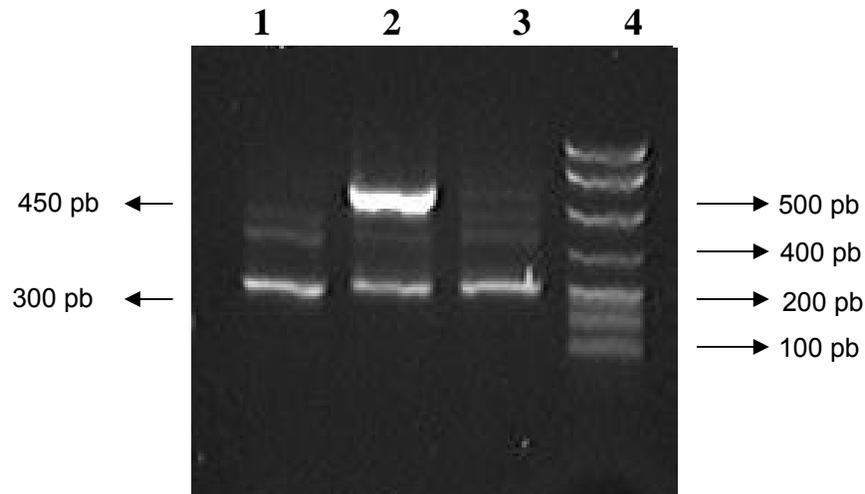


Figura 15. Estudio del RNAm de la proteína L1 del HPV16 por RT-PCR. El gen L1 fue amplificado usando los oligonucleótidos MY09 y MY11. Los productos de la reacción fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 3%. Carriles: 4.- marcador de peso molecular, como control negativo RNA total obtenida de células 293TT sin transfectar y células transfectadas con el vector vacío pVAX carril 1 y 3, producto amplificado carril 2,

En contraste, cuando se analizó el RNA de las células transfectadas con pVAX16L1, se pudo observar la amplificación de un fragmento del tamaño esperado (carril 2) y el control de  $\beta$ -actina. Esta observación indica claramente que el gen clonado está siendo transcrito en las células humanas.

**4) ENSAYO DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA L1 EN  
CÉLULAS B16F0 Y COS-7 TRANSFECTADAS CON EL PLÁSMIDO  
pVAX16L1**

Una vez demostrado que el gen era capaz de transcribirse se procedió a analizar la expresión *in vitro* de la proteína L1 a partir de pVAX16L1 en células de mono (Cos-7) y ratón (B16F0), mediante inmunocitoquímica. Esto se realizó en monocapas de células transfectadas transitoriamente con el plásmido pVAX16L1 utilizando el agente de transfección Lipofectamina 2000. El ensayo de inmunohistoquímica se realiza 48 horas después de la post.transfección.

Las células transfectadas fueron estudiadas por inmunocitoquímica utilizando un anticuerpo que reconoce a la proteína L1. Como se puede observar en la figura 16 las células transfectadas mostraron una tinción citoplasmática, lo que indica la presencia de la proteína L1. En contraste, el anticuerpo anti-L1 no reaccionó con los cultivos de células no transfectados. Estos resultados demuestran que la proteína L1 puede ser expresada en células de mamífero a partir del plásmido construido.

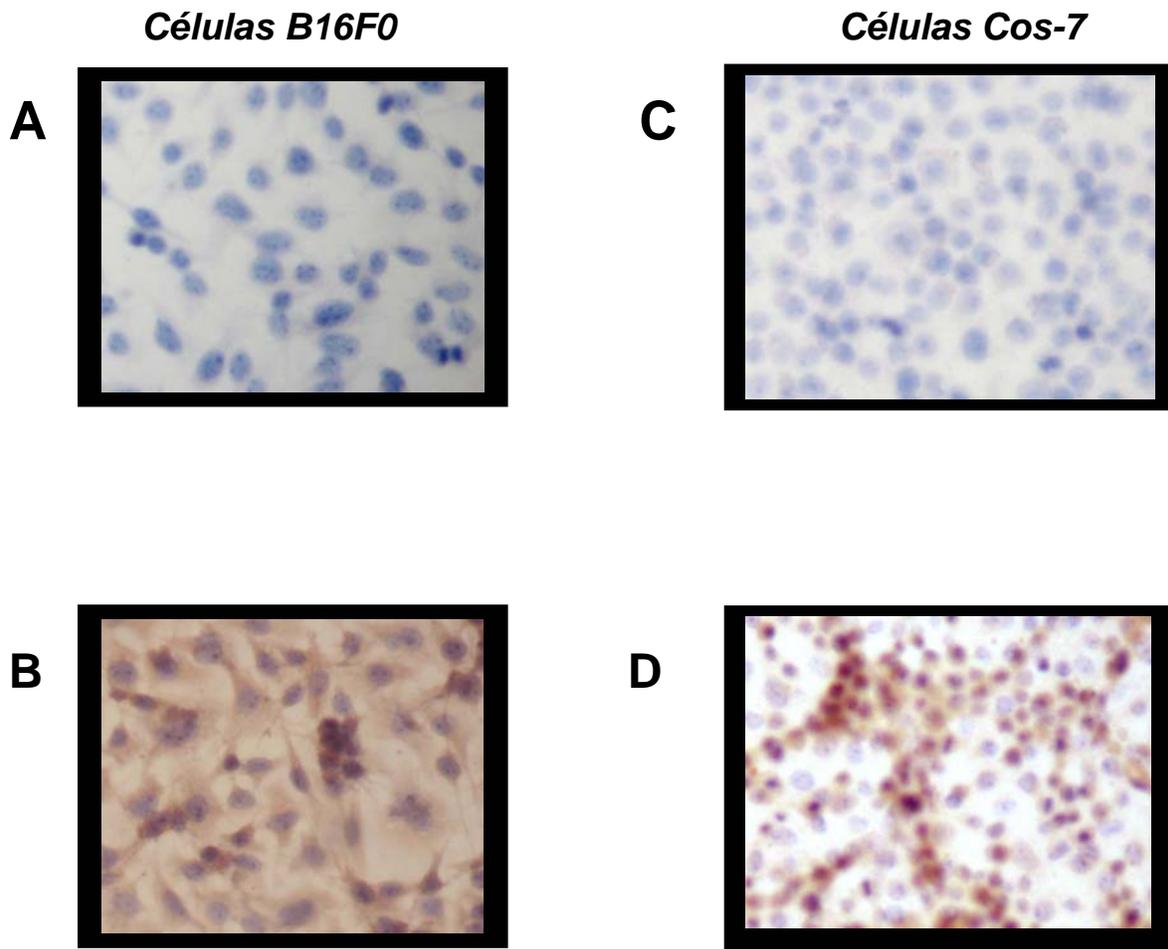


Fig. 16: Análisis de la expresión *in vitro* de la proteína L1 a partir de pVAX16L1. Células B16FO y Cos-7 fueron transfectadas con pVAX16L1. La expresión de la proteína fue analizada 48 hrs después utilizando el anticuerpo K1H8 anti-HPV (dilución 1:50) (Dako), anticuerpo secundario cabra anti-ratón acoplado a biotina (dilución 1:500) (Dako) y se añadió estreptavidina-HRP para posteriormente revelar con el sustrato AEC. Células B16FO transfectadas con pVAX observadas a un aumento de 40X (A) y transfectadas con pVAX16L1 observadas a 40X (B). Células Cos-7 transfectadas con el vector vacío observadas a un aumento de 40 X (C) y transfectadas con el plásmido pVAX16L1 a un aumento de 40X (D).

Una vez corroborado que la proteína L1 se expresa en células de mamífero se procedió a inmunizar ratones de la cepa C57BL/6.

## **5) ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS EN LOS RATONES INMUNIZADOS A DIFERENTES TIEMPOS**

Se realizaron 4 inmunizaciones (como se describió anteriormente) por la vía intradérmica a intervalos de 14 días. Antes de cada inmunización se obtuvieron muestras de sangre y secreciones cervicales de cada ratón. El primer grupo de ratones fue inoculado con el plásmido pVAX16L1 en las concentraciones que se muestran en la tabla 3. Con la finalidad de estudiar si el vector de expresión es capaz de generar anticuerpos en contra del HPV-16, un segundo grupo de ratones fue inoculado con pVAX vacío. Como un control positivo para el desarrollo de inmunidad humoral se incluyó un grupo de ratones que fue inmunizado con VLP's de HPV16. Un cuarto grupo de animales fue inmunizado con un péptido (p10) derivado de la región carboxilo terminal de L1, como un control negativo. Finalmente, se incluyó un grupo de animales inoculados con PBS como control negativo.

Posteriormente se realizó la detección de anticuerpos sistémicos por ELISA generados por cada uno de los grupos de ratones inmunizados, utilizando como antígeno VLP's, como se muestra en la Figura 17.

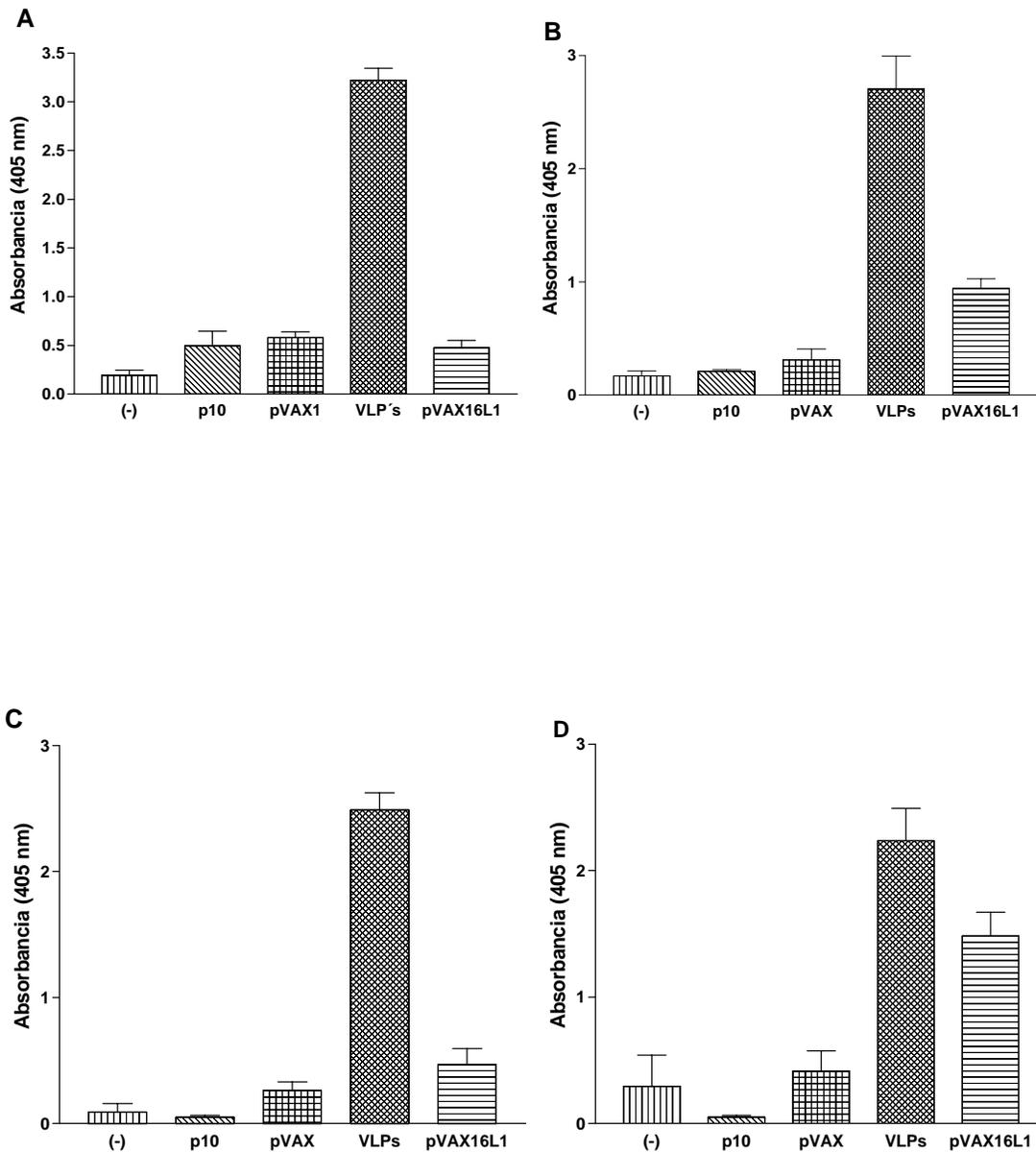


Figura 17.- Detección de anticuerpos séricos en ratones inmunizados con DNA. Grupos de 5 ratones fueron inmunizados con VLP's de HPV16, el plásmido pVAX16L1, el vector pVAX vacío, o un péptido derivado de la región carboxilo terminal de L1 del HPV-16 (p10). Como control negativo (-) un grupo de ratones fue inoculado con PBS. Se realizaron 4 inmunizaciones a intervalos de 14 días. A) 1ª inmunización, B) 2ª inmunización, C) 3ª inmunización y D) 4ª inmunización y se midió la presencia de anticuerpos (dilución 1:100) por ELISA, utilizando VLP's como antígeno blanco. Cada barra representa el valor de absorbancia promedio de cinco ratones. Para cada una se muestra la desviación estándar.

Después de la primera (Figura 17A) inmunización no se observó una respuesta sistémica en los ratones que fueron inmunizados con el plásmido pVAX16L1. Los ratones inmunizados con VLP's presentaron una respuesta sistémica de anticuerpos significativamente mayor a la que se presentó en el control sin inmunizar ( $p= 0.03$ ). Como se esperaba, los ratones inmunizados con p10 o con el vector pVAX vacío no mostraron una respuesta de anticuerpos, presentando valores estadísticamente similares a los controles no inmunizados ( $p> 0.05$ ).

En la segunda inmunización (Figura 17B) se pudo observar que los ratones inmunizados con el plásmido pVAX16L1 produjeron una respuesta sistémica mayor que a los grupos controles. Los ratones inmunizados con VLP's presentaron una respuesta sistémica de anticuerpos significativamente mayor a la que se presentó en el control sin vacunar ( $p = 0.04$ ). De igual forma los ratones inmunizados con p10 o con el vector pVAX vacío no mostraron una respuesta de anticuerpos, presentando valores estadísticamente similares a los controles no inmunizados ( $p> 0.05$ ). Todos los ratones fueron inmunizados en una tercera ocasión (Figura 17C). Por otro lado en esta tercera etapa de vacunación los animales que recibieron el plásmido pVAX16L1 presentaron una respuesta de anticuerpos séricos significativamente mayor a la observada en los animales del grupo control negativo ( $p = 0.007$ ). Los ratones inmunizados con p10, o con el vector pVAX vacío mostraron respuestas similares a las observadas en el grupo control negativo ( $p > 0.05$  y  $p = 0.18$  respectivamente), mientras que el grupo vacunado con VLP's mantuvo una respuesta significativamente más alta que la observada en los animales sin inmunizar ( $p< 0.005$ ). Estas observaciones sugieren que para desarrollar una respuesta de anticuerpos sistémica son

necesarias, por lo menos, dos inmunizaciones con el plásmido pVAX16L1. Finalmente se realizó la cuarta inmunización, De igual forma el grupo de ratones inmunizados con pVAX16L1 muestra un nivel de anticuerpos significativamente mayor ( $p= 0.04$ ), con respecto al grupo de ratones no inmunizados. Los ratones inmunizados con p10 y pVAX vacío se mantuvieron negativos a la presencia de anticuerpos en sangre con respecto al grupo de ratones no inmunizados ( $p= 0.6$  y  $p=0.18$  respectivamente) (Figura 17D). Por otro lado, se pudo observar que el valor registrado para los ratones inmunizados con VLP's fue significativamente mayor ( $p = 0.004$ ) con respecto al grupo de ratones no inmunizados.

Se analizaron los anticuerpos presentes en las secreciones cervicales de los animales inmunizados después de cada inmunización, con la intención de observar si el plásmido pVAX16L1 era capaz de inducir anticuerpos a nivel local. Como se observa en la figura 18A, después de la primera inmunización con respecto a los experimentales se logró detectar anticuerpos en los grupos de ratones inmunizados con VLP's y pVAX16L1 aunque fue mínima, sin embargo no fue posible detectar anticuerpos cervicales en ninguno de los grupos controles. Después de la segunda inmunización se observó un ligero incremento en los anticuerpos de los ratones inmunizados con VLP's, y pVAX16L1, sin embargo la diferencia con el grupo control negativo no fue estadísticamente significativa ( $p = 0.108$ ) para ambos (figura 18B).

Posteriormente a la tercera inmunización, los ratones inmunizados con pVAX16L1 y VLP's se pudo observar que el valor registrado para los ratones inmunizados disminuyó con respecto al observado después de la segunda inmunización. con

respecto a los ratones inmunizados con p10 o pVAX vacío se mantuvieron negativos a la presencia de anticuerpos cervicales (Figura 18C).

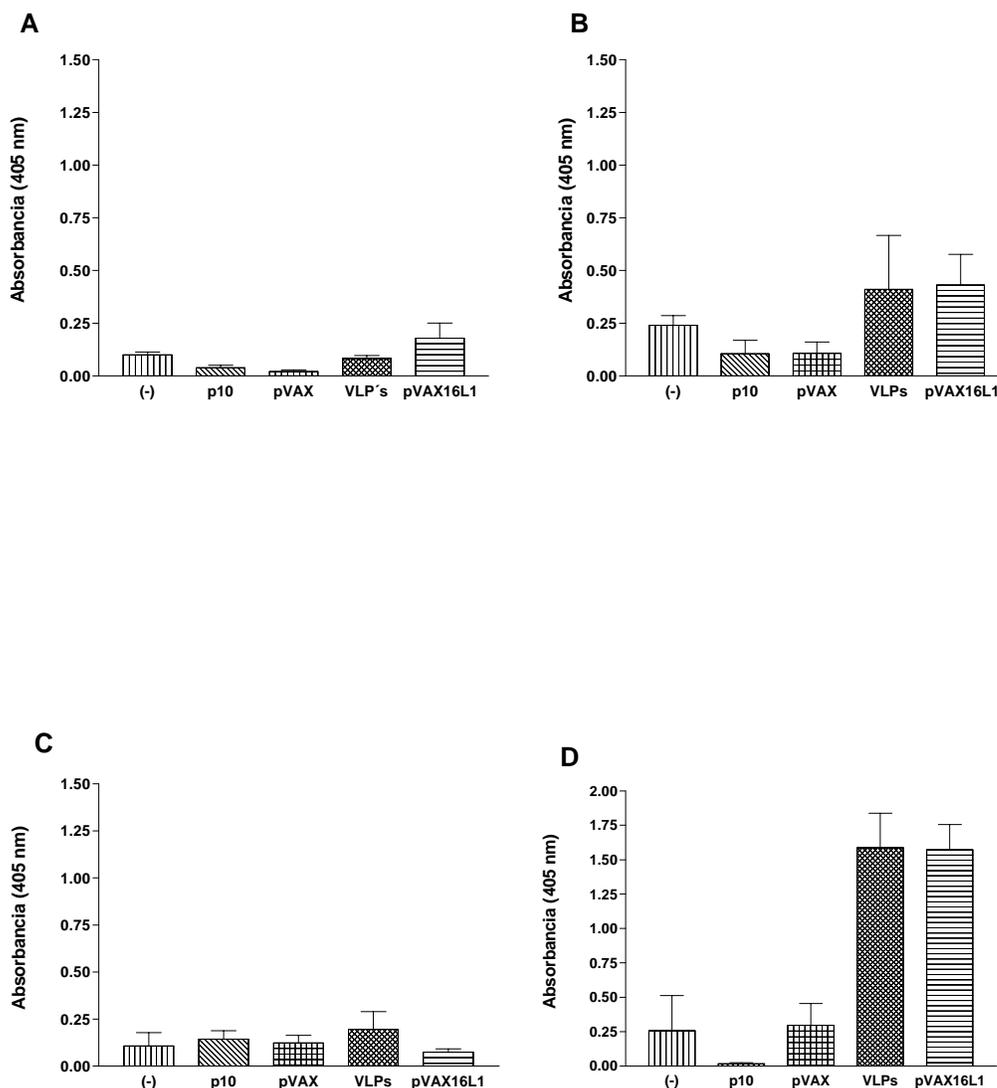


Figura 18.- Detección de anticuerpos de secreciones cervicales en ratones inmunizados con DNA. Grupos de ratones fueron inmunizados con VLP's de HPV16, el plásmido pVAX16L1, el vector pVAX vacío, o un péptido derivado de la región carboxilo terminal de L1 del HPV-16 (p10). Como control negativo (-) un grupo de ratones fue inoculado con PBS. Se realizaron 4 inmunizaciones a intervalos de 14 días cada uno. A) 1ª inmunización, B) 2ª inmunización, C) 3ª inmunización y D) 4ª inmunización y se midió la presencia de anticuerpos (dilución 1:100) por ELISA, utilizando VLP's como antígeno blanco. Cada barra representa el valor de absorbancia promedio de cinco ratones. Para cada una se muestra la desviación estándar.

Una vez realizada la cuarta inmunización, interesantemente se pudo observar que el grupo de ratones inmunizados con pVAX16L1, muestra un nivel de anticuerpos significativamente mayor ( $p= 0.004$ ), con respecto al grupo de ratones no inmunizados. Por otro lado, se pudo observar que el valor registrado para los ratones inmunizados con VLP's fue significativamente mayor ( $p = 0.006$ ) con respecto al grupo de ratones no inmunizados.

Los ratones inmunizados con p10 y pVAX vacío se mantuvieron negativos a la presencia de anticuerpos cervicales con respecto al grupo de ratones no inmunizados ( $p= 0.5$  y  $p=0.18$  respectivamente) (Figura 18D).

## ***6) ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA UNIÓN DE VLP's A HEPARÁN SULFATO CON SUEROS Y SECRECIONES CERVICALES DE LOS RATONES INMUNIZADOS CON DNA***

Con la finalidad de determinar si los anticuerpos inducidos por la inmunización génica son capaces de inhibir la unión del HPV-16 al heparán sulfato se realizaron los ensayos de inhibición de la unión de VLP's a heparán sulfato con los sueros y secreciones cervicales de los ratones de la cuarta inmunización. Los resultados de este ensayo se muestran en la figura 19.

El efecto de los anticuerpos sobre la unión de VLP's a HS fue comparado en todos los casos con un control positivo de adherencia, en el cual se pre-incubaron las VLP's libres con BSA en lugar de sueros. La lectura de absorbancia obtenida en este ensayo se consideró como el 100% de adherencia.

Como se puede observar los sueros de ratones inoculados con PBS no mostraron efecto alguno sobre la adherencia de VLP's a HS. De igual manera los sueros de ratones inmunizados con p10 o pVAX vacío no afectaron la unión de VLP's a HS. Por el contrario, los sueros de los ratones inmunizados con VLP's redujeron el nivel de unión en un 85%, lo cual sugiere que estos anticuerpos son capaces de inhibir la unión de VLP's al HS. Por otro lado, los sueros de los ratones inmunizados con pVAX16L1 indujeron una reducción de la unión de 35%, lo que indica que estos anticuerpos también poseen la capacidad de inhibir la unión VLP's a HS, aunque esta es significativamente menor a la presentada por los anticuerpos inducidos por la vacunación con VLP's. Por lo tanto el plásmido pVAX16L1 es capaz de inhibir la unión del virus al receptor HS parcialmente.

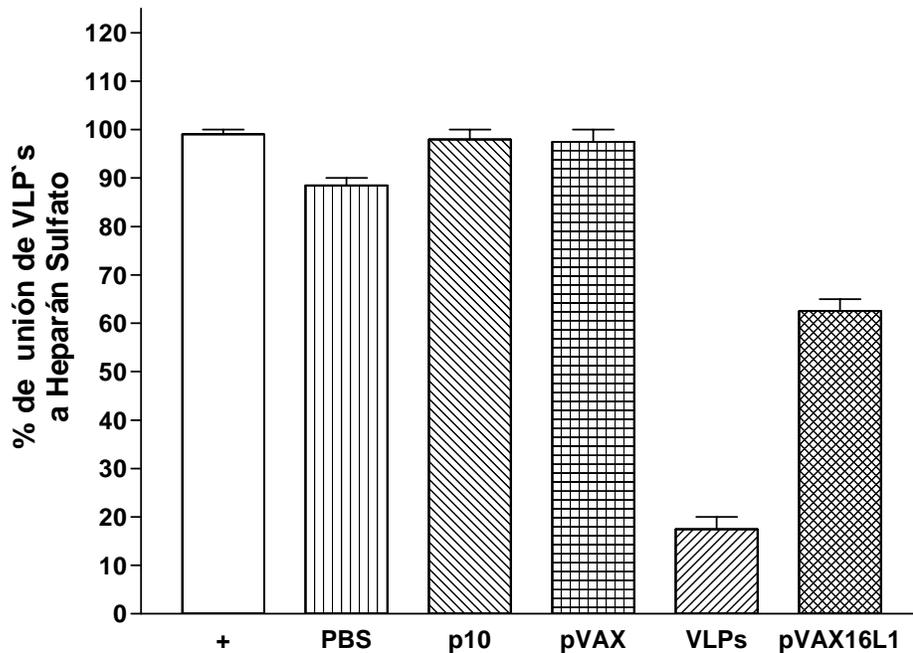


Figura 19.- Ensayo de inhibición de la unión de VLP's a Heparán Sulfato. VLP's fueron pre-incubadas con sueros de ratones inmunizados (cuarta inmunización) con péptido 10 (p10), el vector pVAX vacío, VLP's o el plásmido pVAX16L1. Como control negativo se utilizó suero de ratones inoculados con PBS. Como control positivo se incluyó un ensayo en que las VLP fueron pre-incubadas con BSA en lugar de sueros (+). Posteriormente se realizó el ensayo de inhibición de la unión de VLP's al receptor HS, utilizando un anticuerpo K1H8 anti-HPV (dilución 1:100) (Dako), un anticuerpo de cabra anti-IgM e IgG de ratón acoplado a fosfatasa alcalina (diluido 1:500), para posteriormente revelar con (4-NPP).

Finalmente se procedió a analizar la capacidad de los anticuerpos contenidos en las secreciones cervicales, de inhibir la unión de VLP's a HS. Los resultados se muestran en la figura 20.

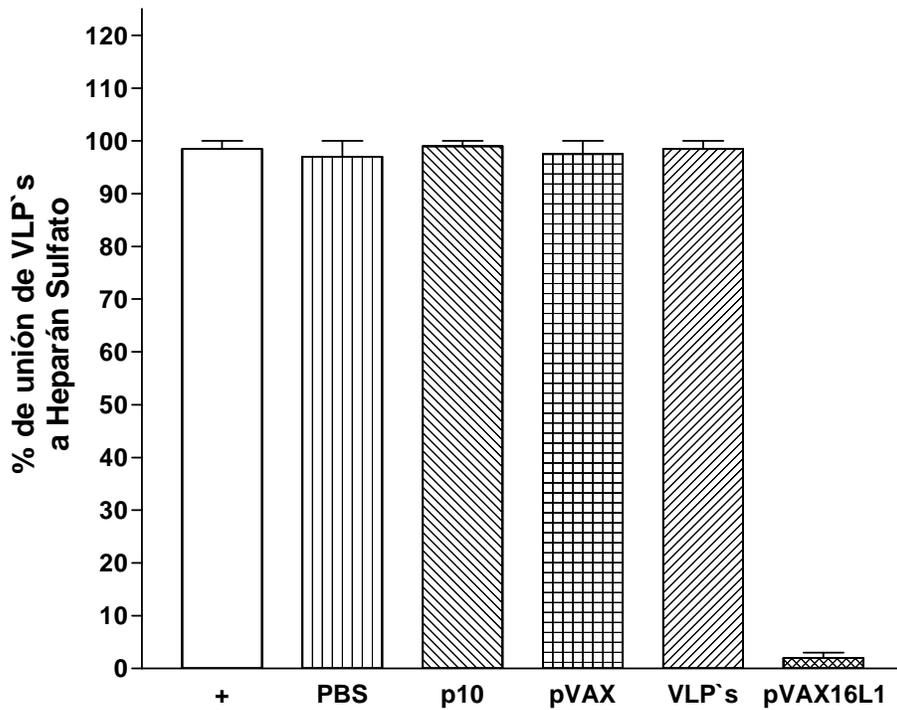


Figura 20.- Ensayo de inhibición de la unión de VLP's a Heparán Sulfato. VLP's fueron pre-incubadas con secreciones cervicales de ratones inmunizados (cuarta inmunización) con péptido 10 (p10), el vector pVAX vacío, VLP's o el plásmido pVAX16L1. Como control negativo se utilizó suero de ratones inoculados con PBS. Como control positivo se incluyó un ensayo en que las VLP fueron pre-incubadas con BSA en lugar de secreciones cervicales (+). Posteriormente se realizó el ensayo de inhibición de la unión de VLP's al receptor HS, utilizando un anticuerpo K1H8 anti-HPV (dilución 1:100) (Dako), un anticuerpo de cabra anti-IgA de ratón acoplado a fosfatasa alcalina (diluido 1:500), para posteriormente revelar con (4-NPP).

Como podemos observar las secreciones cervicales de ratones inoculados con PBS no mostraron un efecto de inhibición de la unión de VLP's al HS. De igual forma las secreciones cervicales de ratones inmunizados con p10, pVAX vacío no inhibieron la unión de VLP's al HS. Sorprendentemente las secreciones cervicales de ratones inmunizados con VLP's no mostraron efecto inhibitorio de la unión de VLP's a HS. Esto contrasta fuertemente con lo observado en los

anticuerpos sistémicos. Ahora bien, las secreciones cervicales de los ratones inmunizados con pVAX16L1 redujeron el nivel de unión casi en un 100%, lo cual indica que estos anticuerpos son capaces de inhibir la unión de VLP's al HS en su totalidad. De manera colectiva nuestros resultados muestran que la vacunación génica induce la formación de anticuerpos inhibitorios de la unión de VLP's al HS tanto en secreciones cervicales como en suero. Sin embargo, en este trabajo se observó que el potencial inhibitorio es mayor en anticuerpos mucosos que en anticuerpos sistémicos.

## ***DISCUSIÓN***

En la actualidad existe una gran variedad de virus que afectan al organismo del ser humano, es por eso que desde siglos pasados se han ido generando alternativas para inhibir el efecto del patógeno en nuestro organismo. La estrategia de control más exitosa ha sido, sin duda, el desarrollo de vacunas profilácticas que tienen la finalidad de generar anticuerpos específicos con la capacidad de protección en contra de diversos patógenos, inhibiendo de tal forma el proceso infeccioso. Sin embargo el costo de algunas de estas vacunas, en particular el de las vacunas recombinantes, es elevado, por lo que su accesibilidad a poblaciones en riesgo en países pobres se vuelve muy limitado. Una posible alternativa a este problema podrían ser las vacunas de DNA, pues una de las principales ventajas que tienen estas vacunas con respecto a las antes mencionadas es que son fáciles de producir, no son muy costosas y su almacenaje es sencillo. Al igual que las vacunas atenuadas e inactivadas, las vacunas de DNA tienen una vida media que permiten la generación de una memoria inmunológica. Además los avances realizados en las formas de administración de la vacuna han permitido modificar y dirigir la respuesta inmune del individuo inmunizado de acuerdo al tipo de respuesta requerida (Gurunathan et al., 2003).

El plásmido utilizado en este proyecto fue construida utilizando el vector pVAX1. Los estudios preliminares que sirvieron como base para el presente proyecto, fueron realizados con una construcción hecha en el vector pCDNA3, donde se observó la generación de anticuerpos tanto a nivel sistémico como en mucosas e

induciendo una respuesta celular. El cambio de vector se debe a que pVAX1 es un vector diseñado específicamente para ser usado en el desarrollo de vacunas de DNA. pVAX1 contiene el promotor de Citomegalovirus (CMV) para la inducción de un nivel alto de expresión en células de mamífero y una señal de poliadenilación para dar estabilidad al RNAm. Este vector no posee secuencias innecesarias para su replicación de *E. coli* o para la expresión de la proteína recombinante en mamíferos, estos fueron removidos para limitar secuencias de DNA con posible homología en el genoma humano y minimizar la posibilidad de la integración cromosomal.

Existen reportes que demuestran la utilidad de pVAX1 como vector de expresión en el desarrollo de diversos tipos de vacunas génicas (He 2005, Wu 2005, Zhou 2003). Adicionalmente pVAX1 es el único vector autorizado por la FDA para ser usado en pruebas clínicas con seres humanos (Ma 2004). De hecho, una vacuna génica construida en pVAX1 que expresa en antígeno prostático específico, está siendo probada en seres humanos y se encuentra en la fase 1 de estudio (Pavlenko 2004).

Una vez realizada la construcción del plásmido pVAX16L1 se analizó la integridad del gen L1 clonado por secuenciación y al comparar los resultados obtenidos con datos teóricos de la secuencia del HPV-16 se observó que había una homología del 98%. Esto se debió a que se detectó la sustitución de una Citosina por una Timina en el sitio 1097, sin embargo este cambio fue silencioso ya que el nuevo codón codifica para una Tirosina, al igual que el codón original. Por otra parte se detectó que en el sitio 868 hubo un cambio de base de una Guanina por una Adenina, generando un cambio de una Asparagina por una Serina. Ambos

pertenecen al grupo de aminoácidos no polares. El cambio descrito se localiza en el residuo 475 de la proteína L1, el cual se encuentra en la región carboxilo terminal (la cual abarca del residuo 383 al 505). Esta región es importante para la unión de los pentámeros que forman los capsómeros (Xiaojiang 2000). Por otra parte, estudios cristalográficos determinaron que las 5 regiones hipervariables de la proteína L1 se localizan de los residuos de aminoácidos 49 al 362 (Xiaojiang 2000 y Olcese 2004). Asimismo los epitopos más importantes se localizan en los aminoácidos 234 al 244, 342 al 360, 395 al 413, y 413 al 446 y dos residuos importantes de cisteína que estabilizan al virión se localizan en los residuos 175 y 428, (Xiaojiang 2000). Finalmente estudios utilizando péptidos sintéticos demostraron que el sitio de unión a Heparán Sulfato se encuentra localizado en una zona de la región carboxilo terminal de L1 (aminoácidos 492 al 505) (Bousarghin 2003).

En conjunto estos datos sugieren que el cambio de aminoácido detectado en nuestra proteína recombinante probablemente no provocará un cambio significativo en la antigenicidad de la proteína. Esta hipótesis fue corroborada indirectamente por la observación de que los ratones inmunizados con el plásmido produjeron anticuerpos que reconocen específicamente a las VLP's recombinantes.

Durante este proyecto se demostró que la inmunización con el plásmido pVAX16L1 indujo la producción de anticuerpos IgG a nivel sistémico. Esta observación coincide con los datos reportados por otros grupos en los cuales se utilizan diferentes vacunas génica, administradas tanto por la vía intradérmica (Argani 2005, Hunsaker 2002, Raz 1994 y Wa 1986) como por la subcutánea

(Bhom 1998) y la intramuscular (Ruiz 2005, Raz 1994, Bhom 1998, y Argani 2005) y en todos ellos se observa la inducción de anticuerpos del tipo IgG sericos. Es interesante hacer notar que el nivel de la respuesta mediada por IgG inducida por la inmunización con VLP's fue significativamente más alta a la inducida por el plásmido. Es conocido que las VLP's son un fuerte inmunógeno para la producción de anticuerpos. (Ruiz 2005, Nardelli-Haefliger 2005, Sasagawa 2003 y 2005). Por otro lado la inmunización con el plásmido requiere de la transcripción del gen clonado, su traducción y probablemente el autoensamblaje de las partículas virales para poder desencadenar una respuesta inmunologica. Si a esto se adiciona el hecho de que solamente el 1-2% del plásmido inoculado es incorporado en la células (Davis 1993), se incrementa la probabilidad de que la disponibilidad de antígeno circulante sea mucho menor en el modelo de vacunación génica, lo cual podría explicar el bajo nivel de anticuerpos generados. Lo anterior podría ser definido a través de un ensayo de ELISA de captura (Sandwich) donde se podría detectar y medir el antígeno en sangre de los ratones inmunizados. Este ensayo consiste en inmovilizar al anticuerpo primario en un placa de ELISA, para posteriormente añadir el suero de los ratones que contienen el antígeno específico para el anticuerpo y finalmente adicionar un anticuerpo secundario acoplado a una enzima que reconozca un epítipo distinto del antígeno.

También se demostró que la inmunización con el plásmido pVAX16L1 indujo la producción de anticuerpos IgA a nivel de la mucosa genital. Este resultado coincide con datos reportados por otros grupos de investigación en los cuales se han usado plásmidos de DNA por diferentes vías y se ha observado la

generación de IgA a nivel de mucosas. Por ejemplo, la inoculación de cerdos por vía intradérmica e intramuscular con un plásmido que contiene el gen de la Adhesina de la enterotoxina de *Escherichia coli* indujo producción de IgA en el intestino (Melkebeek 2006). Por otro lado, una vacuna de DNA que contiene el gen de la proteína VP6 del rotavirus humano fue inoculada en cerdos y ratones por vía intramuscular, nasal y oral, observándose la generación de anticuerpos tipo IgA en el tracto intestinal (Yuan 2005, Díaz 2004). En otro estudio, un plásmido que contenía al gen de la proteína H1N1 del virus de la influenza, fue administrado por vía intranasal e intramuscular y se observó la inducción de anticuerpo IgA en la mucosa broncoalveolar de ratones (Wang). Adicionalmente en un estudio de prueba de una vacuna de DNA que contiene la glicoproteína B del virus Herpes Simple Tipo 1, se observó la inducción de anticuerpos IgA en secreciones cervicales en ratones (Kuklin 1997). Es interesante mencionar que en ese trabajo se realizó una comparación de los anticuerpos tipo IgA inducidos en la mucosa genital, por la inmunización con VLP's y la vacuna génica. Los resultados mostraron que ambos tipos de vacunas indujeron una respuesta mediada por IgA a nivel de la mucosa cervical.

Es muy probable que este tipo de respuesta se deba a la activación inicial de células presentadoras de antígeno profesionales residentes de la epidermis y de la dermis (macrófagos y células dendríticas) (Romani 1989). En estudios recientes se ha revelado que las células dendríticas de la piel cuando son activadas por inmunización intradérmica pueden migrar hacia los tejidos de las mucosas (Enioutina 2000), induciendo una respuesta inmune a ese nivel.

Cabe mencionar que la respuesta inducida por una inmunización intradérmica requiere ser investigada más a fondo, debido que se sabe poco acerca de la activación de la respuesta inmune en mucosas a través de esta vía de administración. Así mismo, aún existen interrogantes acerca de cómo una vacuna génica activa el sistema inmunológico de mucosas. Sin embargo, se tienen varias hipótesis, dependiendo del tipo de célula que internaliza al plásmido en las regiones dérmicas. Si las células transfectadas son presentadoras de antígenos no profesionales (melanocitos y queratinocitos), éstas tienen la capacidad de expresar al antígeno, procesarlo y presentarlo en el contexto del MHC-I a los linfocitos T. También se ha demostrado que estas células pueden secretar al antígeno producido hacia el medio extracelular, induciendo la producción de anticuerpos a través de dos vías posibles: A) la primera vía es la independiente de Linfocitos T, donde la célula B con su inmunoglobulina de membrana reconoce al antígeno y genera anticuerpos específicos en contra del antígeno, y B) la vía dependiente de linfocitos T, donde la célula B capta al antígeno, ella misma la procesa y la presenta a un linfocito T, este linfocito T cooperador produce y secreta al medio interleucinas (IL 2, 4 y 5) necesarias para la maduración de la célula B para que ésta se transforme en célula plasmática productora de anticuerpos.

Ahora bien, si el plásmido es captado por células presentadoras de antígeno profesionales (células dendríticas, macrófagos o células B) será procesado y presentado tanto por la vía MHC I y como MHC-II, para el desarrollo de una respuesta celular.

Finalmente en este trabajo se estudió la capacidad de los anticuerpos generados por la vacuna génica para inhibir la unión de VLP's al HS. Los ensayos realizados muestran un efecto inhibitorio por parte de los anticuerpos, tanto sistémicos como mucosos. Es importante mencionar que el efecto inhibitorio de los anticuerpos contenidos en las secreciones cervicales fue significativamente mayor a lo observado en los anticuerpos sistémicos.

Cabe mencionar que ésta es la primera vez que se explora la capacidad específica de los anticuerpos para bloquear la unión de VLP's al receptor celular HS. Estos resultados indican que a través de la inmunización con el plásmido pVAX16L1, las células transfectadas tienen la capacidad de expresar a la proteína, exponiendo adecuadamente sus epitopos conformacionales para generar anticuerpos que específicamente reconocen el epitopo viral a través del cual el virus se une al HS.

Sin embargo, consideramos que estos resultados deben tomarse con precaución, debido a que se sabe que el HPV-16 tiene dos posibles receptores para reconocer a su célula blanco. Debido a lo anterior el hecho de que se presenten anticuerpos con capacidad para bloquear la unión a uno de estos receptores no implica que sean suficientes para neutralizar al virus. Teóricamente para lograr tal neutralización sería necesario tener poblaciones de anticuerpos capaces de inhibir la unión a ambos. En este trabajo no se determinó la capacidad de anticuerpos para inhibir la unión a  $\alpha$ -6-integrina, por lo que consideramos importante continuar con la investigación en este sentido.

# CONCLUSIONES

- 1) Los ratones inmunizados con el plásmido pVAX16L1 son capaces de desarrollar anticuerpos a nivel sistémico (IgG) y a nivel de mucosas (IgA) a partir de la tercera inmunización.
- 2) La inmunización con el plásmido pVAX16L1 genera un menor nivel de anticuerpos sistémicos que la inmunización con la proteína L1 recombinante.
- 3) La inmunización con el plásmido pVAX16L1 induce niveles similares de anticuerpos en secreciones cervicales que la inmunización con la proteína L1 recombinante.
- 4) Los anticuerpos séricos inducidos por la inmunización con pVAX16L1 son capaces de inhibir parcialmente la unión de VLP's al receptor HS.
- 5) Los anticuerpos contenidos en las secreciones cervicales, que fueron inducidos por la inmunización con pVAX16L1, son capaces de inhibir totalmente la unión de VLP's al receptor HS.

# APÉNDICES

## APÉNDICE 1

### **TBE 5X (1 lt)**

54 gr. Tris base

27.5 gr. Ácido bórico,

10 mM EDTA

#### **Para preparar un litro:**

A 800 ml de agua bidestilada se le adicionaron 54 gr. de tris base y 27.5 gr. de ácido bórico, se mantuvo en agitación constante para posteriormente agregarle 3.72 g de EDTA para una concentración final de 10 mM, una vez llevado a cabo lo anterior se aforó y se vació en recipientes para su posterior almacenaje a 4°C.

### **BROMURO DE ETIDIO (10 mg/ml)**

#### **Para preparar 100 ml**

Se adicionó 1gr. de bromuro de etidio en 100 ml de agua bidestilada, se mantuvo en agitación constante durante varias horas hasta que estuviera totalmente disuelto. Posteriormente se vació a un recipiente que estuviera envuelto con papel aluminio o color ambar y se almacenó a temperatura ambiente.

## **APÉNDICE 2**

### **BUFFER DE CARGA**

0.25 % de azul de bromofenol

0.25% de xilen cianol

30% de glicerol en agua

#### **Para preparar 10 ml**

Se adicionó 25 ug de Azul de bromofenol, posteriormente 25 ug de xilen cianol y finalmente 3 ml de glicerol y se aforo a 10 ml con agua bidestilada. Durante el tiempo de preparación estuvo en constante movimiento la solución. Se vació en un recipiente color ambar y se envolvió en aluminio y se almacenó a temperatura ambiente.

## **APÉNDICE 3**

### **Tris-EDTA (TE)**

Tris-HCl 25 mM pH 8

EDTA 10 mM pH 8

Para prepara 100 ml:

Se adicionó en 80 ml de agua bidestilada, Tris-HCl, EDTA, para una concentración final de 25 mM y 10 mM respectivamente, se mantuvo en agitación constante para posteriormente finalmente se aforo a 100 ml, se vació en un recipiente y se mantuvo a temperatura ambiente.

## **APÉNDICE 4**

### **Medio LB**

Para preparar un litro de LB:

Bacto-Tryptona 10 g

Extracto de levadura 5 g

NaCl 10 g

En un matraz se adicionó bacto-tryptona, extracto de levadura y NaCl, se agitó el soluto hasta que se disolvió y se ajusto el pH a 7.0 con NaOH, posteriormente se ajusto el volumen a un litro con agua bidestilada, se esterilizó por autoclave durante 20 minutos y se dejó enfriar. Para su posterior almacenamiento a 4°C.

### **Preparación de placas de agar-Ampicilina o Kanamicina**

Al medio LB se le agregó 2.5 gr. de agar bacterológico, para posteriormente esterilizarse en autoclave por 20 minutos, y se dejó enfriar a 50 °C, para agregar Ampicilina o Kanamicina: ampicilina (50 mg/ml) o kanamicina (10mg/ml), en un matraz y se vaciaron en cajas petrí para dejar solidificar. Las cajas se almacenaron a 4°C.

## **APÉNDICE 5**

### **PBS 1X**

Para preparar un litro de PBS:

A 950 ml de agua bidestilada se le adicionó:

8 gr. de NaCl

0.2 gr. de KCl

1.44 gr. de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0.24 gr. de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Se agitó el soluto hasta que se disolvió, se ajustó el pH a 7.2 con HCl concentrado, posteriormente se ajustó el volumen a un litro con agua bidestilada, se esterilizó por autoclave durante 20 minutos y se dejó enfriar para su posterior almacenaje a 4°C.

## **APÉNDICE 6**

### **TBS 1X**

Para preparar un litro de TBS:

Tris Base 6.5 g.

NaCl 8.7 g.

KCl 0.2 g.

Se agitó el soluto hasta que se disolvió, se ajustó el pH a 7.6 con HCl concentrado, posteriormente se ajustó el volumen a un litro con agua bidestilada y se almacenó a 4°C.

Nota: Para preparar TBS-Tween al 0.05% en 100 ml se adiciona 50 ul de Tween 20 (Sigma)

## BIBLIOGRAFÍA

1. Argani H and Akhtarishojaie E. Levamisole enhances immune responsiveness to intra-dermal and intra-muscular hepatitis B vaccination in chronic hemodialysis patients. *J. Immune Therap. Vacc.* 4: 1476-1480. 2005.
2. Barbosa MS, Lowry DR, Schiller JT. Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc binding proteins. *J. Virol.* 63:1404-1407. 1989.
3. Bernfield M, Gôtte M, Park W., et al. Functions of Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans. *Annu. Rev. Biochem.* 68: 729-777. 1999.
4. Bierl C, Karem K, Poon C., et al. Correlates of cervical mucosal antibodies to human papillomavirus 16 : Result from a case control study. *Gynecol. Onco.* 99: S262-S268. 2005.
5. Bohm W, Mertens T, Schirmbeck R., et al. Routes of plasmid, DNA vaccination that prime murine humoral and cellular immune responses. *Vaccine.* 16:949-954. 1998.
6. Bontkes HJ. Grujil TD, Van den Muysenberg AJ., et al. Human papillomavirus type 16 E6/E7 specific cytotoxic Y lymphocytes in women with cervical neoplasia. *Int. J. Cancer.* 88:92-98. 2000.

7. Bontkes HJ, Grujil TD, Walboomers JM., et al. Immune responses against human papillomavirus (HPV) type 16 virus-like particles in a cohort study of women with cervical intraepithelial neoplasia. *J. Gen Virol.* 80:409-417. 1999.
8. Bosch XF, Manos MM, Muñoz N., et al, Prevalence of HPV in cervical cancer: a worldwide perspective. *J. Natl. Cancer. Inst.* 87: 797-802. 1995.
9. Bousarghin L, Touzé A, Combita AL., et al. Positively charged sequences of human papillomavirus type 16 capsid proteins are sufficient to mediate gene transfer into target cells via the heparan sulfate receptor. *J. Gener. Virol.* 84:157-164. 2003.
10. Bouvet JP, Belee, L, Pires, R., et al. Immunoglobulin G antibodies in human vaginal secretions after parental vaccination. *Infect. Immun.* 62. 3957-3961. 1994.
11. Capila I. and Linhardt J. Heparin- Protein Interactions. *Reviews. Angew. Chem. Int.* 41:390-412. 2002.
12. Carter JJ, Wipf CG, Benki FS., et al. Identification of a human papillomavirus type 16-specific epitope on the C-terminal arm of the major capsid protein L1. *J. Virol.* 77:11625-11632. 2003.

13. Christiansen ND and Kreider JW. Neutralization of CRPV infectivity by monoclonal antibodies that identify conformational epitopes on intact virions. *Virus Res.* 21:169-179. 1991.
14. Coleman N and Stanley MA. Analysis of HLA-DR expression on keratinocytes in cervical neoplasia. *Int. J. Cancer.* 52:314-319. 1994.
15. Combita AL, Touza A, Bousarhhin L., et al. Gene Transfer using human Papillomavirus pseudovirions varies according to virus genotype and requires cell surface heparan sulfate. *FEMS Microbiol Lett.* 204: 183-188. 2001.
16. Combita AL, Touzé LB, Bousarghin, ND., et al. Identification of two cross-neutralizing linear epitopes within the L1 major capsided protein of human papillomavirus. *FEMS Microbiol.* 76: 6480-6486. 2002.
17. Condon C, Watkins SC, Celluzzi CM., et al. DNA-based immunization by vivo transfection of dendritic cells. *Nat. Med.* 2(10):1122-1128. 1996.
18. Crawford LV. and Crawford EM. A comparative study of polyoma and papilloma viruses. *Viol.* 21:258-263. 1963.
19. Chen Y, Maguire T, Hileman R., et al. *Nat. Med.* 3 :866-871. 1997.

20. Day MP, Lowy LD, Schiller TJ. et al. Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology*. 307:1-11. 2003.
21. Davis HL, Demeneix B, Quantin J., et al. Plasmid DNA is superior to viral vectors for direct gene transfer in adult mouse skeletal muscle. *Hum. Gene Ther.* 4:733-740. 1993.
22. Díaz GA, Andújar LP, Díaz RJ., et al. Nasal immunization of mice with a rotavirus DNA vaccine that induces protective intestinal IgA antibodies. *Vaccine*. 23:489-498. 2004.
23. Enioutina EY, Visic D and Daynes RA. The induction of systemic and mucosal immune responses to antigen-adjuvant compositions administered into the skin: alterations in the migratory properties of dendritic cells appears to be important for stimulating mucosal immunity. *Vaccine*. 18:2753–2767. 2000.
24. Evander M, Frazer IH, Pet E, et al., Identification of alpha6-integrin as a candidate for papillomaviruses. *J. Virol.* 13: 2449-2456. 1997.
25. Frazer IH. Prevention of cervical cancer through Papillomavirus vaccination. *Review Immunol.* 4:46-54. 2004.

26. Gage JR, Meyers C, Wettstein F. The E7 proteins of the nononcogenic human papillomavirus type 6b and of the oncogenic HPV-16 differ in retinoblastoma protein binding and other properties. *J. Virol.* 4:723-730. 1990.
27. Gaillard RC, Pehau AG, Breitburd F., et al. Cytopathic effect in human papillomavirus type 1 induced inclusion warts: in vitro analysis of the contribution of two forms of the viral E4 protein. *J. Invest. Dermatol.* 101:843-851. 1993.
28. Giroglu T, Flourin L, Shafer F., et al. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J. Virol.* 75:1565-1570. 2001a.
29. Giroglou T, Sapp M, Lane, C., et al. Immunological analyses of human papillomavirus capsids. *Vaccine.* 19:1783-1793. 2001.
30. Glew SS. HLA class II antigen expression in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Cancer. Res.* 52:4009-4016. 1992.
31. Grossman SR and Laimins LA. E6 protein human papillomavirus type 18 binds zinc. *Onco.* 4:1089-1093. 1989.
32. Gurnathan S, Kliman DM, Sedee R.A., et al., DNA vaccines: Immunology application and optimization. *Annu Rev Immunol.* 18:927-974. 2000.

33. He Y, Sun SH, Chen R., et al. Effects of epitope combination and adjuvants on immune responses to anti-Alzheimer disease DNA vaccines in mice. *Alzheimer dis Assoc Disord.* 19 (4):171-177. 2005.
34. He H, Tang Y, Qin X., et al. Construction of a eukaryotic expression plasmid encoding partial S gene fragments of the SARS-CoV and its potential utility as a DNA. *DNA Cell Biol.* 24(8): 516-520. 2005.
35. Huan TC and Mettenleiter L. Brief overview on cellular virus receptors. *Virus Reserch.* 82: 3-8. 2002.
36. Hummed M, Hudson JB. And Laims A. Differentiation induced and constitutive transcription of human papillomavirus type 31b in cells lines containing viral episomes. *J. Virol.* 66:6070-6080. 1992.
37. Hunsaker BD and Perino L. Efficacy of intradermal vaccination. *Vet. Immunol. Immunolpat.* 79: 1-13. 2002.
38. Jenner E. An inquiry into the cause and effects of the varioloe. *Vaccine.* Low London, 1798.
39. Joyce JG, Tung CT, Przysiecki JC., et al. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus like particles interacts with

- heparin and cell surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 274:5810-5822. 1999.
40. June C, Bluestone J, Nadler L., et al. The B7 and CD28 receptor families. *Immunol Today.* 15(7): 322-331. 1994.
41. Kawano Y, Noma T, Yata J., et al. Regulation of human IgG subclass production by cytokines. *J. Immunol.* 153:4948-4958. 1994.
42. Keramat S-Shafti S, Handisurya A, Kriehuber E., et al. Different Heparan Sulfate Proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomavirus. *J. Virol.* 77: 13125-13135. 2003.
43. Kimura Y, Sonehara, K Kuramoto, E Makino, T et al. *J. Biochem. (Tokyo)*, **116**, 991-994. 1994.
44. Kirunbauer 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 Int.* 86:494-499. 1994.
45. Kremsdorf D, Favre M, Jabloska S. et al., Molecular cloning and characterization of the genomes of nine newly recognized human

papillomavirus types associated with epidermodysplasia verruciformis. J. Virol. 52:1013-1018. 1984.

46. Kuklin N, Daheshia M, Karem K., et al. Induction of mucosal immunity against Herpes Simplex Virus by plasmid DNA Immunization. J. Virol. 71:3138-3145. 1997.

47. Kurman RJ and Solomon D. The Bethesda system for Reporting Cervical Vaginal Cytology Diagnoses. Springer-Verlag. NY. 1994.

48. Laimins LA. Regulation of trnscription and replication by human papillomavirus. Human tumor viruses. American Society for Microl. 201-223. 1998.

49. Law MF, Lancaster WD. Howley PM., et al. Conservad sequence among the genomias of papillomavirus. J. Virol. 32:199-207. 1979.

50. Liu MA. DNA vaccines: a review. L. Intern Med. 253:402-410. 2003.

51. Liz Z, Howard A, Kelley C., et al. Immunogenicity of DNA vaccines expressing tuberculosis proteins fused to tissue plasminogen activator signal sequences. Infect. Immun. 67(9): 4780-4786. 1999.

52. Ma CH, Zhang Y, Wang XY., et al. Human endostatin gene transfer, either naked or with liposome, has the same inhibitory effect on growth of mouse liver tumor cells in vivo. *World J. Gastroenterol.* 10(19):2874-2878. 2004.
53. Man S. Human cellular immune responses against human papillomaviruses in cervical neoplasia. *Exert. Rev. Mol. Med.* ISSN. 1462-1470. 1998.
54. Marks MJ, Lu H, Sundaresen T., et al. Probing the interaction of dengue virus envelope protein with heparin: assessment of glycosaminoglycan-derived inhibitors. *J. Med. Chem.* 44:2178-2187. 2001.
55. McAleer WJ, Buynank EB, Maigetter RZ., et al. Human Hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nat.* 307: 178. 1984.
56. Melkebeek V, Verdonck F, Stuyve E., et al. Plasmid-encoded GM-CSF induces priming of the F4(K88)-specific serum IgA response by FaeG DNA vaccination in pigs. *Vaccine.* 24:4592-4594. 2006.
57. Merck Sharp & Dohme. 2005. <http://www.msd.com.mx>
58. Nardelli-Haeffliger D, Wirthner D, Lurati F., et al. Immune responses induced by lower airway mucosal immunisation with a human papillomavirus type 16 virus-like particle vaccine. *Vaccine.* 23:3634-3641. 2005.

59. Olcese AV, Chen Y, Schlegel R., et al. Characterization of HPV 16 L1 loop domains in the formation of a type-specific, conformation epitope. *BMC. Microbiol.* 4(29): 1-11. 2004.
60. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Estimating the world cancer burden: Globocan. *Int. J. Cancer.* 94:153-156. 2000.
61. Pasteur L. De l'attenuation du virus du cholera des poules. *C.R. Acad. Sci. Paris.* 91:673-680. 1880.
62. Pavlenko M, Ross AK, Lundqvist A., et al. A phase I trial vaccination with a plasmid expressing prostate-specific antigen in patients with hormone refractory prostate cancer. *Br J Cancer.* 9 (14): 688-694. 2004.
63. Petti I, Nilson I, DiMaid D., et al. Activation of the platelet-derived growth factor receptor by the bovine papillomavirus E5 protein. *EMBO J.* 10:845-855. 1991.
64. Pisani P, Bray F and Parkin DM. Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. *Int. J. Cancer.* 97:72-81. 2002.
65. Pfister H, Gissman L, Zur Hausen H., et al. Particle characterization of proteins of human papilloma viruses (HPV). *Viol.* 83:131-137. 1977.

66. Porgador a, Irvine KR, Iwasaki A., et al. Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8+ t cells after gene gun immunization. *J. Exp. Med.* 188(6): 1075-1082. 1998.
67. Raz E, Carson AD, Parker ES., et al. Intradermal gene immunization: The possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:9519-9523. 1994.
68. Rocha ZL, Alexandre JE, Garcia CA et al., Parental and oral Immunization with a plasmid DNA expressing the Human Papillomavirus 16-L1 gene induces systemic and mucosal antibodies and cytotoxic T lymphocyte responses. *J. Med. Virol.* 66:86-95. 2002.
69. Rocha ZL, Pereira-Suarez A.L, Yescas G., et al. Mucosal IgG and IgA responses to human papillomavirus type 16 capsid proteins in HPV16-infected women without visible pathology. *Viral Immunol.* 16:159-168. 2003.
70. Rodriguez, F. and Whitton, J. L. DNA immunization with minigenes: low frequency of memory cytotoxic T lymphocytes and inefficient antiviral protection are rectified by ubiquitination. *Virology.* 268: 233-238. 2000.

71. Romani N and Schuler G. Structural and functional relationships between epidermal Langerhans cells and dendritic cells. *Res. Immunol.* 140:895–898. 1989.
72. Ruiz W, McClements L, Jansen U., et al. Kinetics and isotype profile of antibody responses in rhesus macaques induced following vaccination with HPV 6, 11, 16 and 18 L1-virus-like particles formulated with or without Merck aluminum adjuvant. *J. Immunol. Therap. Vaccines.* 3:1-11. 2005.
73. Salmon DE and Smith T. On a new method of producing immunity from contagious diseases. *Am. Vet. Rev.* 10: 63-69. 1886.
74. Sanchez PP, Hernandez HD, Lopez. RR., et al. Human papillomavirus-specific viral types are common in Mexican women affected by cervical lesions. *Int. J. Gynecol. Cancer.* 16(3):1041-1047. 2006.
75. Scheffner M, Werness BA, Huibretse JM., et al. Cutaneous and mucosal human papillomavirus E4 proteins form intermediate filament-like structures in epithelial cell. *Virology.* 197:176-187. 1993.
76. Scott M, Nakagawa M, Moscicki AB. et al., Cell mediated immune response to human papillomavirus infection. *Clin. Diagn Lab Immunol.* 8:209-220. 2001.

77. Sasawaga T, Rose RC, Azar KK., et al. Mucosal immunoglobulin A and G responses to oncogenic human papillomavirus capsids. *Int. J. Cancer.* 104:328-335. 2003.
78. Sasawaga T, Yamazaki H, Dong YZ., et al. Immunoglobulin A and G responses against virus like particles (VLP) of human papillomavirus type 16 in women with cervical cancer and cervical intra epithelial lesions. *Int. J. Cancer.* 75:529-535. 1998.
79. Sato Y, Roman M, Tighe H., et al., Immunostimulatory DNA sequences necessary for reactive intradermal gene immunization. *Science* 273: 352-354. 1996.
80. Selinka HC, Giroglu T, Sapp M., et al. Papillomavirus/cell-interactions initiating the infections entry pathway. *Papillomavirus Rep.* 14:259-265. 2003.
81. Singer A, Ho G, Kwie T., et al. Association of human papillomavirus with cervical cancer and precancer. In A Mindel (ed). *Genital warts: human papillomavirus infection.* Edward Arnold, London, United Kingdom. 1995.
82. Solinas TM, Durst M and Lichter P. Specific chromosomal imbalances in human papillomavirus transfected cells during progression toward immortality. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:3854-3859. 1997.

83. Spalholz BA, Yang C, Howley PM., et al. Transactivation of a bovine papilloma virus transcriptional regulatory element by the E2 gene product. *Cell*. 42:183-191. 1985.
84. Syrjanen K and Syrjanen S. Papillomaviruses infections in human pathology. Reino Unido de la Gran Bretaña. 1999.
85. Tang DF, DeVit M and Johnston SA. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature*. 356:152. 1992.
86. Thomson SA, Sherritt MA, Medveczky J., et al. Delivery of multiple CD8 cytotoxic T cell epitopes by DNA vaccination. *J. Immunol*. 160(4): 1717-1723. 1998.
87. Townsend A, Ohlen C, Bastin J., et al. Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides. *Nature*. 340(6233): 443-448. 1989.
88. Volpers C, Unckell F, Schirmacher P., et al. Binding and internalization of human papillomavirus type 33 virus-like particles by eukaryotic cells. *J. Virol*. 69(6):3258-3264. 1995.

89. Wa LR, Kurtz MA and Jensen BJ. Intradermal vaccination against hepatitis B. *Lancet*. ii:1340. 1986.
90. Wang D, Christopher EM, Nagata PL., et al. Intranasal immunization with liposome-encapsulated plasmid DNA encoding influenza virus hemagglutinin elicits mucosal, cellular and humoral immune responses. *J. Clin. Virol.* 31S:S99-S106. 2004.
91. Wang Z, Hasson BG, Forslund O, et al., Cervical mucus antibodies against human papillomavirus type 16, 18 and 33 capsids in relation to the presence of viral DNA. *J. Clin. Microbiol.* 34:3056-3062. 1996.
92. Walboomers JM, Jacobs VM, Manos MM., et al. Human Papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* 189:12-19. 1999.
93. Wilson VG and Ludes MJ. A bovine papillomavirus E1 related protein binds specifically to bovine papillomavirus DNA. *J. Virol.* 65:5314-5322. 1991.
94. Wolff JA, Malone RW, Williams P., et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science.* 247:1465. 1990.
95. Wundunn D and Spear PG. Herpes simplex virus glycoprotein D mediates interference with herpes simplex virus infection. *J. Virol.* 263:52-58. 1989.

96. Wu L, Diao Z, Deng X., et al. DNA vaccine against *Taenia solium* cysticercosis expressed as a modified hepatitis B virus core particle containing three epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium*. *J. Nanosci Nanotechnol.* 5(8): 1204-1210. 2005.
97. Xiaojiang SC, Garcea IG, Casini G, et al. Structure of Small Virus-Like Particles Assembled from the L1 protein of human Papillomavirus 16. *Mol. Cell.* 5:557-567. 2000.
98. Yoon CS, Kim DK, Park NS, et al.  $\alpha$ -6 integrin is the Main Receptor of human papillomavirus type 16 VLP.
99. Yuan L, Azevedo SP, Gonzalez MA., et al. Mucosal and systemic antibody responses and protection induced by a prime/boost rotavirus-DNA vaccine in a gnotobiotic pig model. *Vaccine*, 23:3925-3936. 2005.
100. Zhou FJ, Hu ZL, Dai JX., et al. Protection of tree shrews by pVAX-PS DNA vaccine against HBV infection. *DNA Cell Biol.* 22 (7): 475-478. 2003.
100. Zur-Hausen H and Villiers EM. Human papillomaviruses. *Annu. Rev. Microbiol.* 48:427-447. 1994.

101. Zur Hausen H. papillomavirus infections a major cause of human cancers.  
Biochim. Biophys. 1288:F55-F48. 1996.

102. Zur Hausen H. Papillomavirus and cancer: from basic studies to clinical  
application. Nat. Rev. Cancer. 2:342-350. 2002.