

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA



CLONACION Y EXPRESION DEL GEN L1 DE
PAPILOMAVIRUS TIPO 16 EN CELULAS *IN VITRO*,
TEJIDO MUSCULAR Y TRACTO GENITAL

PRESENTA:

JOSE ALBERTO VALADEZ LIRA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE

B I O L O G O

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L. OCTUBRE DEL 2001

TL

PC280

.08

V3

c.1



1080117233

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA



CLONACION Y EXPRESION DEL GEN L1 DE
PAPILOMAVIRUS TIPO 16 EN CELULAS *IN VITRO*,
TEJIDO MUSCULAR Y TRACTO GENITAL

PRESENTA:

JOSE ALBERTO VALADEZ LIRA

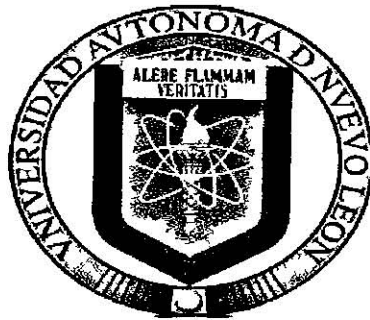
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER

EL GRADO DE

B I O L O G O

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L. OCTUBRE DEL 2001

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E INMUNOLOGIA



**CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DEL GEN L1 DE PAPILOMAVIRUS
TIPO 16 EN CELULAS *IN VITRO*, TEJIDO MUSCULAR Y TRACTO
GENITAL**

**PRESENTA
JOSE ALBERTO VALADEZ LIRA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
BIÓLOGO**

**SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L. MÉXICO
OCTUBRE DEL 2001**

TL
RC280

.08

✓3



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E INMUNOLOGIA



COMISION DE TESIS

Dr. Juan Manuel Alcocer González
Presidente

Dra. Cristina Rodriguez Padilla
Secretario

Dr. Roberto Montes de Oca Luna
Vocal

Ricardo Gómez Flores
Suplente

AREA DE TRABAJO

El presente trabajo se desarrollo en :

Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, 3er. Piso, Unidad " C ". Bajo la Dirección del Dr. Juan Manuel Alcocer González y la Co-Dirección del Dr. Reyes Tamez Guerra.

ÍNDICE GENERAL

	PÁGINA
ÍNDICE GENERAL	1
ÍNDICE DE GRAFICAS	3
INDICE DE FIGURAS	3
INTRODUCCIÓN	4
ANTECEDENTES	5
1. IMPORTANCIA EN SALUD PUBLICA DEL CANCER CERVICOUTERINO	5
1.1. Estadísticas	5
1.2. Sistemas de expresión para proteínas de la cápside	7
2. ASPECTOS GENERALES DE CANCER CERVICO-UTERINO	9
2.1. Infección	9
2.2. Patología	11
2.3. Desarrollo	12
2.4. Diagnostico	14
2.5. Tratamiento	15
3. BIOLOGIA MOLECULAR DE LOS VIRUS DEL PAPILOMA	16
3.1. Organización General del Genoma del HPV	17
3.2. Marcos de Lectura Abierta (ORF's) y Proteínas Virales	17
3.3. Proteínas Estructurales L1 y L2	19
3.4. Región Larga de Control (LCR)	19
4. CICLO DE VIDA DE LOS HPV_s GENITALES	21
5. RESPUESTA INMUNOLOGICA CONTRA HPV	22
5.1. Respuesta Inmune Humoral	23
5.2. Anticuerpos contra Proteínas de la Cápside	24
5.3. Respuesta Inmune Celular	25
6. VACUNAS CONTRA HPV	26
6.1. Vacunas Terapéuticas para evitar la Replicación Intracelular del HPV	26
6.2. Vacunas Terapéuticas para Controlar Células Tumorales	26
6.3. Vacunas Profilácticas	28

JUSTIFICACIÓN	31
HIPOTESIS	32
OBJETIVO GENERAL	32
OBJETIVOS PARTICULARES	32
MATERIAL Y METODO	33
RESULTADOS	42
DISCUSIÓN	57
CONCLUSIÓN	61
BIBLIOGRAFÍA	62

INTRODUCCIÓN

La infección del virus del papiloma humano (HPV) se limita a epitelios escamosos (piel y mucosa), se inicia en las células basales del epitelio. La replicación del virus se encuentra aparentemente relacionada con el programa de diferenciación de las células epiteliales, posiblemente a través de proteínas celulares específicas que se unen al DNA viral y regulan la transcripción. Los papilomavirus pertenecen a la familia **Papovaviridae**, estos virus se han encontrado en varias especies animales, principalmente en mamíferos. Existen más de 75 tipos de virus de papilomavirus humanos (HPV), aquellos capaces de infectar mucosas genitales se dividen en dos grandes grupos, de acuerdo con la malignidad de las lesiones en que se encuentran. El HPV presentan un genoma de DNA de doble cadena de una longitud aproximada de 8000 pares de bases (PB). Miden aproximadamente 50 nm de diámetro, carecen de membrana, su cápside tiene forma icosaédrica y esta compuesta por 72 capsómeros, los cuales están formados por 2 proteínas la L1 y la L2. Su peso molecular es de aproximadamente de 5.2×10^6 daltones. Este DNA se encuentra combinado con histonas para formar un cromosoma pequeño. Una estrategia de vacunación profiláctica debe superar problemas de inmunogenicidad y establecer una barrera inmunológica en el epitelio anogenital dirigida a las proteínas estructurales L1 y L2 de la cápside viral. Dos de las grandes dificultades para producir antígenos de la cápside viral para vacuna profiláctica radica esencialmente en que los viriones de HPV no pueden ser propagados fácilmente *in vitro* y tampoco se pueden obtener en grandes cantidades razonables de viriones de las lesiones. Aunque parecen existir diferencias antigénicas entre estas partículas virales (VLP'S) producidas en sistemas de expresión de proteínas y los viriones nativos, los VLP pueden representar una fuente adecuada de epitopes conformacionales naturales para estimular una respuesta inmune contra las proteínas de la cápside viral. Datos experimentales muestran que las VLP formadas por proteínas de cápside L1 y L2 de papilomavirus usadas como antígenos vacúnales son efectivas en producir inmunidad sistémica y en mucosas que confiere protección a las lesiones inducidas por papilomavirus infecciosos.

ANTECEDENTES

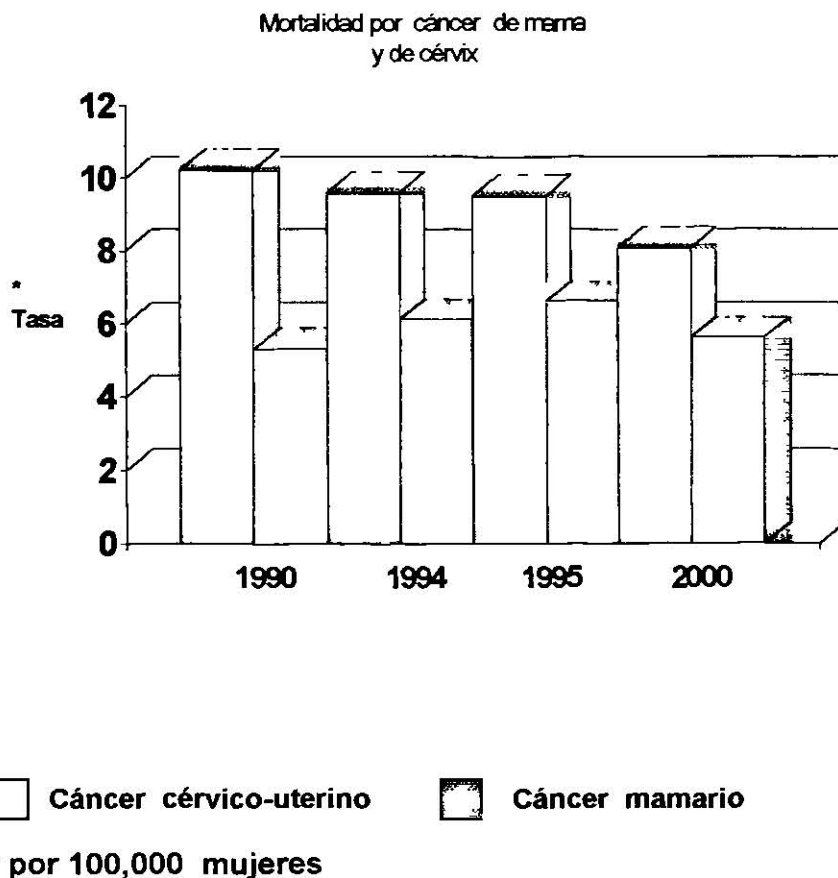
1. IMPORTANCIA EN SALUD PUBLICA DEL CANCER CERVICOUTERINO.

En salud pública el cáncer constituye un problema de salud pública. En nuestro país constituyó la segunda causa de muerte en el año de 1995, con 48,222 decesos, el 11.2% del total de muertes. El cáncer cervico - uterino (CaCU) es la enfermedad neoplásica más frecuente en la población femenina de los países subdesarrollados [1]. A nivel mundial el CaCU ocupa el segundo lugar como causa de muerte por neoplasias, superado solo por el carcinoma mamario [2,3]. Según la Organización Mundial de la Salud cada año se registran al menos 450000 casos de los cuales cerca del 45 por ciento fallece [4]. Los países de América Latina se han caracterizado por notificar las mayores tasas de incidencia en todo el orbe. Se estima que en esta región, una de cada 1000 mujeres de 35 a 55 años padece cáncer del cuello uterino, enfermedad que es precedida durante meses o años de una lesión premaligna in situ . En México el panorama es coincidente y en el último cuarto de siglo la mortalidad ha mostrado una tendencia ascendente [5].

1.1 Estadísticas

El cáncer cervical es una patología de gran importancia en salud pública en el ámbito mundial. Se estima que 400,000 mujeres de todo el mundo la desarrollan anualmente y se considera la primera causa de muerte en mujeres adultas. Además es considerado uno de los mas importantes problemas de salud pública en países en desarrollo donde se concentran cerca del 80% de los 500,000 nuevos casos mundiales . México no es la excepción en esto, 12 mujeres mueren de cáncer cervical cada 24 horas lo cual representa mas de 4,000 muertes anuales [6]. En el año de 1995 en América latina las muertes por cáncer cervical ascendieron hasta 10664 en total, siendo el país con mayor muertes estados unidos de Norteamérica con un total de

4503 muertes, seguido por México, con 4392 muertes por cáncer cervical. Los países que presentaron menos casos de mortalidad por este tipo de neoplasia fueron Bahamas, con 11 casos, y Belice con 3. En cuanto al porcentaje, según la población femenina de cada país, Barbados ocupó el primer lugar con un porcentaje de 17.0, seguido por México, que presenta el 9.6 %, siendo Canadá el país que presentó el menor porcentaje, de muertes por cáncer cervical según su población, con un 2.7 %. En México el CaCU es una de las neoplasias que ha causado mas muertes en la población femenina, alcanzando hasta 4392 muertes en el año de 1995, seguido por el cáncer de mama con 3026 muertes, siendo el cáncer de placenta el de menor mortalidad, presentando 20 muertes en este mismo año. En relación a la edad, el cáncer CaCU, en México, es la tercera causa de muerte en el grupo de 30 a 44 años y una de las primeras 10 en todos los grupos de edad hasta los 64 [7].



Gráfica No. 1 Mortalidad por cáncer cérvico-uterino y mamario México 2000.

1.2. SISTEMAS DE EXPRESIÓN PARA PROTEÍNAS DE LA CÁPSIDE

Poco se conoce acerca de la respuesta inmunológica contra el HPV en humanos, ya que no hay un sistema apropiado para la propagación de los viriones de HPV " *in vitro* ", ni tampoco un buen modelo animal. Sin embargo recientemente muchos grupos de investigadores han producido VLP's de HPV-1 y HPV-11 en sistemas de expresión usando Levaduras, vaccinia virus, baculovirus y virus de semliki forest. Estas capsides producidas " *in vitro* " parecen tener una estructura idéntica a la de los viriones auténticos, lo cual ha sido determinado por microscopia electrónica [8,9,10] .La inmunización de ratones con vaccinia virus recombinantes y/o VLP de HPV-1 genera inmunoglobulinas IgG, IgM, , y IgA, estos datos sugieren que las VLP pueden sustituirse por viriones nativos [11].

Los vectores de virus vaccinia han sido usados para expresar la proteína de la cápside mayor (L1) y menor (L2) de HPV-1,bajo la regulación de promotores tempranos (p7.5K) y tardíos (pSynth,p11K) ,todas las construcciones expresaron apropiadamente el tamaño de las proteínas de HPV para ambas proteínas L1 y L2 . Las cápsides fueron purificadas por centrifugación de un gradiente de densidad de cloruro de cesio, la línea celular BSC-1 de riñón de mono fue infectada con vaccinia virus -L1(vac-L1) recombinante y vaccinia virus-L2 (vac-L2) recombinante. El reconocimiento de la expresión de las proteínas L1 y L2 fue detectado por anticuerpos marcados con oro y la formación de viriones fue detectada por microscopia electrónica en la que se observo el diámetro de las partículas de 55 nanometros (55 nm) y la simetría icosaédrica [8].

Cepas atenuadas de *Salmonella typhimurium* son atractivos candidatos como vacunas vivas con expresión en mucosas así también induciendo una respuesta inmune sistémica [13].

Una nueva estrategia para producir inmunidad específica en mucosas contra las proteínas de cápside viral de papilomavirus radica en la inyección de plásmidos que controlan la expresión de proteínas heterólogas en el sitio de inoculación, esta estrategia ha recibido el nombre de "inmunización con DNA" y ha demostrado que induce

protección contra lesiones inducidas por papilomavirus[10]. El primer reporte de inyección a células de músculo con plásmidos de DNA en solución salina , con la subsecuente expresión de genes reporteros , y dos años después se realizaron trabajos que inducían una respuesta inmune en ratones con plásmidos que codificaban para la proteína de hormona de crecimiento humana . Después se trato de encontrar una protección eficaz contra la nucleoproteína de Influenza A mediante la inyección intramuscular de plásmidos de 10 a 100 microgramos (10-100 µg) que codificaran para esta nucleoproteína (NP) ,este plásmido estaba bajo la regulación del promotor de CMV(citomegalovirus) en este experimento encontraron obtenían altos niveles de anticuerpos(anti-NP) , una alta respuesta de Linfocitos T citotóxicos (CTL) ,una baja de respuesta humoral en la que encontraron niveles bajos de IL-4 (Interleucina 4) y un alto nivel de IFN- γ ,la cual indicaba una respuesta de tipo celular. [13] . las vacunas de DNA han sido reportadas para generar respuesta inmune contra varios antígenos. Se han realizado estudios en los que han inyectando plásmidos vía intramuscular donde se han basado en la expresión de la proteína mediante un genes reporteros. Se han realizado experimentos en ratones de la Línea BALB/c donde se han inyectado plásmidos (100 µg) que codifican para el gen de la Luciferasa para evaluar la expresión de proteínas ,en la que se llevo a cabo la inyección del vector que trae como gen reportero el gen de la luciferasa y clonado el gen de fosfatasa alcalina ,como resultado encontraron el máximo nivel de expresión de la luciferasa a los siete días después de la inyección y un decremento a los 14 días, en la cual en el día 14 encontraron anticuerpos contra fosfatasa alcalina [14]. El desarrollo de una vacuna de DNA contra HPV en el cual como modelo a candidato esta una vacuna de DNA contra HPV-16 ,en el que se construyo y se subclono el gen que codifica para la proteína mayor de la cápside L1 en un plásmido que regula la expresión bajo el promotor de citomegalovirus para crear inmunidad en ratones de la línea BALB/c , en la que se encontraron anticuerpos contra L1 [10].

2.-ASPECTOS GENERALES DE CANCER CERVICO-UTERINO

2.1. INFECCIÓN

Gran cantidad de estudios epidemiológicos revelan que la mayor parte de los cánceres están asociados a factores del medio ambiente. La mayoría de estos factores inducen mutaciones en el DNA, como lo hacen algunos virus que actúan en periodos largos y probablemente en combinación con otros agentes. En el caso particular del cáncer cervical, actualmente se considera al HPV como el agente causal de esta neoplasia [18]. La infección del HPV se limita a epitelios escamosos (piel y mucosa), se inicia en las células basales del epitelio. La replicación del virus se encuentra aparentemente relacionada con el programa de diferenciación de las células epiteliales, posiblemente a través de proteínas celulares específicas que se unen al DNA viral y regulan la transcripción [19].

Numerosas observaciones clínicas, así como estudios epidemiológicos, sugieren que un factor viral (transmitido sexualmente) está involucrado en el desarrollo del CaCU [20]. De todos los tipos descritos de HPV, sólo algunos de ellos (tipos 6,11,16,18,31,33,35) se han encontrado recientemente en tumores de la región genital. Los tipos 6 y 11 se han encontrado en 90-100% de lesiones benignas, en 25% de lesiones precancerosas y muy raramente (2%) en las cancerosas. Por el contrario, en 90% de los carcinomas *“in situ”* o invasores se han encontrado los tipos 16,18,31,33,35. De estos casos, el 50-90% corresponden a los tipos 16 y 18 (en general el tipo 16 es tres veces más frecuente que el tipo 18) [21]. Como se ha mencionado los órganos blanco de los HPV son la piel y las mucosas y para que estos virus puedan penetrar e iniciar un proceso infeccioso se necesita que haya una solución de continuidad en estos tejidos, de manera que el virus pueda ponerse en contacto con las células permisivas, que son las células basales de los epitelios [22]. La infección por el HPV ocurre solamente, como ya se menciono, en células basales que pueden dividirse; en estas el virus no se replica y permanece en estado latente. A medida que las células epiteliales se diferencian, el DNA se replica, se transcribe y forma viriones completos. Esto sugiere que algunos factores de la diferenciación de

los epitelios participan en la regulación del ciclo viral. Durante la diferenciación celular, las células se vuelven más y más permisivas para la replicación viral. Esta puede observarse en las capas suprabasales, mientras que las proteínas estructurales y las partículas virales aparecen sólo en las capas superiores [23]. Al infectar las mucosas genitales, los HPV inducen frecuentemente koilocitosis, caracterizadas por una gran zona clara perinuclear y a menudo binucleación. En algunos koilocitos aparecen antígenos virales de la cápside, pero otros son negativos [20].

Se ha obtenido evidencia experimental que indica que en algunos tumores de CaCU, las secuencias del HPV 16 se encuentran muy cerca o adentro del oncogén c-myc [6]; en un alto porcentaje de los tumores de CaCU el oncogén c-myc está molecularmente alterado y presenta tanto rearrreglos como amplificación .

Es posible que la inserción de secuencias virales cerca de algún proto-oncogén celular pueda activar a estos últimos en posición *cis* [24,25]. El área de transformación del epitelio cervical, el cual es más proliferativo durante la pubertad y la adolescencia, es especialmente susceptible a alteraciones, las cuales pueden ser inducidas por agentes transmitidos sexualmente, principalmente por infección del virus del papiloma humano. Por lo tanto, la iniciación de la actividad sexual en una edad temprana constituye uno de los principales factores de riesgo para cáncer cervical. Estudios realizados en diferentes poblaciones han producido resultados similares en términos de iniciación de la actividad sexual en una edad temprana constituyendo uno de los principales factores de riesgo para la neoplasia cervical [26].

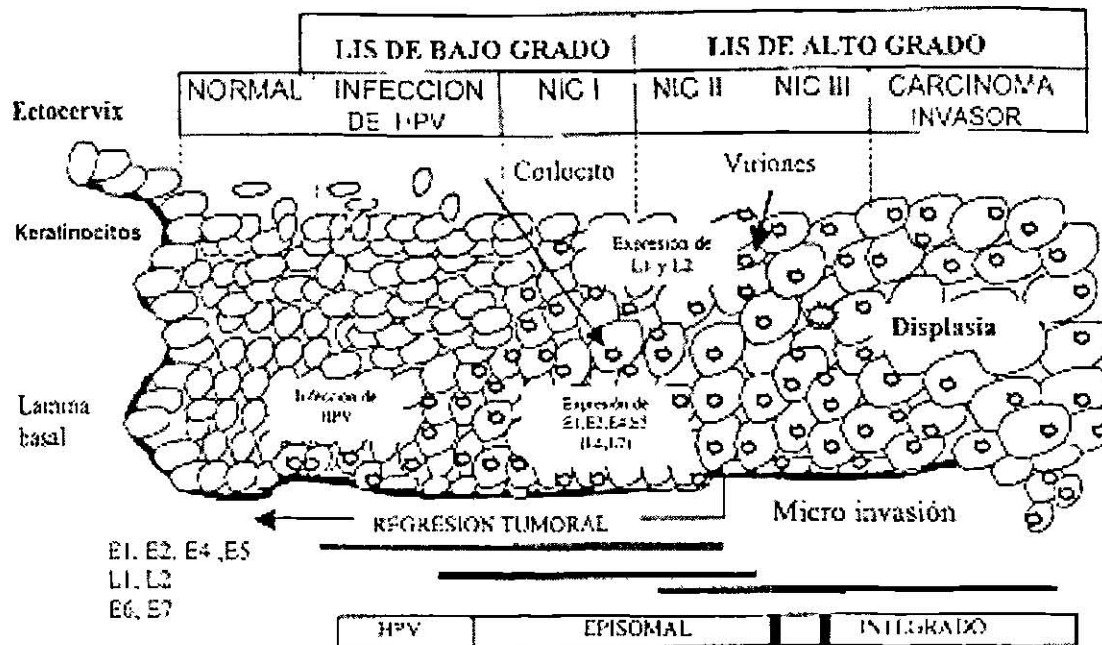


Fig.1.- REPRESENTACIÓN DE LA INFECCIÓN DE HPV

2.2. PATOLOGÍA

El resultado de la infección es el desarrollo de hiperplasia celular, lo que da origen a las manifestaciones clínicas de esta patología; verrugas vulgares, verrugas planas, pólipos, condilomas y tumores malignos. En el caso específico de del tracto genital, la infección puede ser clínica, subclínica o latente. La infección clínica se manifiesta por la presencia de condilomas y el periodo de incubación puede ser de seis semanas a tres meses. La infección subclínica es aquella que solamente se detecta con la colposcopia, por medio de la cual se observa en el cerviz-uterino zonas blanquecinas en la mucosa que ha sido infectada por HPV. Las infecciones latentes únicamente se pueden detectar por técnicas de biología molecular [25].

El hecho de que las lesiones precursoras tardan muchos años en progresar a CaCU (cuando lo hacen), así como las evidencias de pacientes con epidermodisplasia verruciforme, cuyas lesiones progresan a carcinoma rápidamente, sugiere la participación de

factores del hospedero en el desarrollo del CaCU; estudios epidemiológicos han apoyado el concepto de que el inicio de relaciones sexuales a temprana edad, el número de parejas sexuales, el uso de anticonceptivos orales por tiempo prolongado, la conducta sexual de la pareja, la deficiencia de ciertas vitaminas, el tabaquismo e infecciones virales del tracto genitourinario, son co-factores para el desarrollo de esta patología [27].

2.3. DESARROLLO

El CaCU es un tipo frecuente de cáncer en mujeres, y consiste en una enfermedad en la cual se encuentran células cancerosas (malignas) en los tejidos del cuello uterino. Se considera que la lesión precursora del CaCU es la neoplasia intraepitelial cervical (CIN). Al parecer, las lesiones preinvasoras e invasoras del cuello uterino son parte del mismo padecimiento. Estas generalmente empiezan con una lesión bien diferenciada (CIN I o displasia leve), pasan por una fase menos diferenciada (CIN II o displasia moderada), luego una lesión intraepitelial indiferenciada (CIN III, la clásica displasia severa o carcinoma *in situ*), y finalmente termina en carcinoma invasor (en diversos estadios) cuando las células neoplásicas del epitelio cervical han atravesado la membrana basal e invadido el tejido subyacente [20].

La evolución de estas lesiones a estadios invasores no es inevitable y depende del individuo. Hay lesiones preinvasoras que regresan o permanecen inalterables durante toda la vida, y sólo un porcentaje pequeño progresa hacia CaCU. El tiempo de evolución de las lesiones que progresan de CIN I a CIN III, y de éste a carcinoma invasor es muy variable, generalmente de 10 a 20 años, siendo la edad promedio de las mujeres que presentan CIN I y carcinoma invasor, de 25 y 50 años respectivamente [21]. El cáncer cervicouterino presenta diversos estadios o etapas; En el *estadio 0* ó *carcinoma in situ* el cáncer que se presenta es un cáncer temprano, las células anormales se encuentran sólo en la primera capa de células que recubren el cuello uterino, y no invaden los tejidos más profundos del cuello uterino.

En el *estadio I* el cáncer afecta el cuello uterino, pero no se han diseminado, a los alrededores. Este estadio se divide en: *estadio I-A*, en la cual se presenta una cantidad muy pequeña de cáncer, sólo visible por microscopio y se encuentra en el tejido más profundo del cuello uterino, *estadio I-B*, aquí una cantidad mayor de cáncer se encuentra en dicho tejido.

En el *estadio II* el cáncer se ha diseminado a áreas cercanas, pero aún se encuentra en el área pélvica. El estadio se divide en: *estadio II-A*, en el cual el cáncer se ha diseminado fuera del cuello uterino a los dos tercios superiores de la vagina, y en *estadio II-B*, aquí el cáncer se ha diseminado al tejido alrededor del cuello uterino.

El *estadio III* presenta un cáncer que se ha diseminado a toda el área pélvica, aquí puede haberse diseminado al a parte inferior de la vagina, o infiltrar los uréteres.

En el *estadio IV* el cáncer se ha diseminado a diversas partes del cuerpo. Este estadio se divide en: *estadio IV-A* aquí se presenta una diseminación a la vejiga o al recto, en el *estadio IV-B* se ha diseminado a órganos distales como los pulmones.

El CaCU es una enfermedad que puede ser recurrente, lo que significa que el cáncer puede volver después de haber sido tratado. Puede ocurrir en el propio cérvix o aparecer en otra localización.

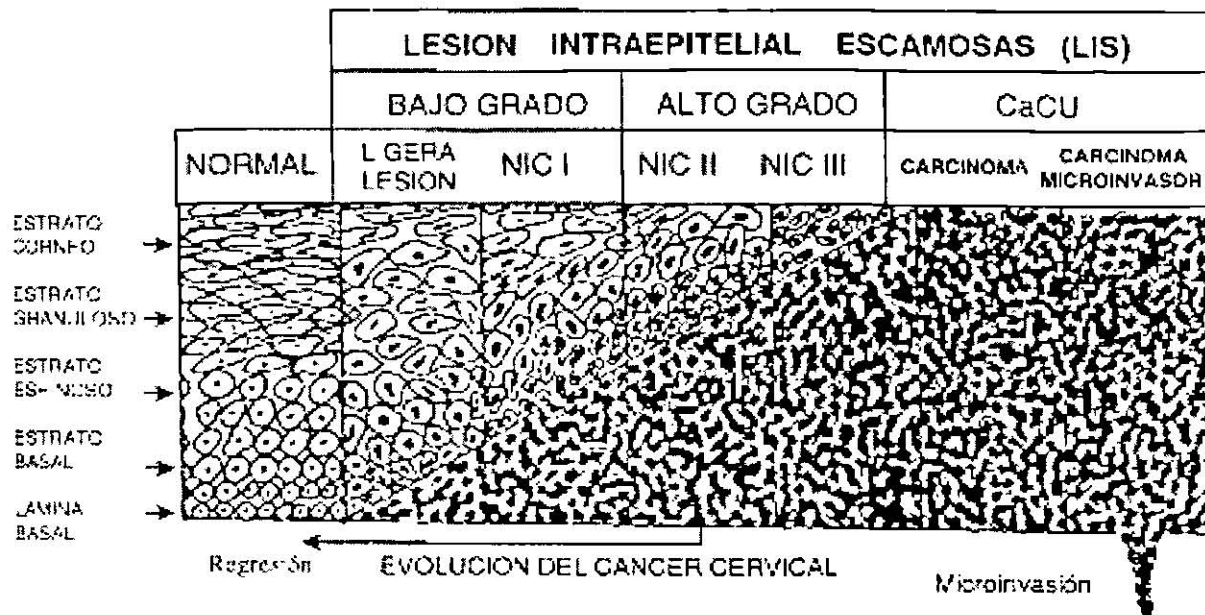


FIG.2.- REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS PRECURSORES DEL CÁNCER CERVICAL

2.4. DIAGNOSTICO

Existen varias técnicas para detectar la presencia del HPV en tejidos o en células. Estos métodos varían en cuanto a su sensibilidad y especificidad. Así, tenemos que durante mucho tiempo el único método utilizado para detectar HPV, era el estudio histológico de células de cérvix con tinción de Papanicolaou. Con esta técnica se pueden observar los cambios propios de las células infectadas por HPV. Estas células son los llamados coilocitos [26]. Este método tiene la desventaja de que solamente detecta infecciones activas y con gran producción de virus. Otro método también utilizado es la detección de antígenos virales por medio de la técnica de la inmunoperoxidasa, la cual también detecta solamente infecciones activas y no las infecciones latentes, aunque es mucho más específica que la anterior ya que se utilizan anticuerpos específicos contra antígenos de HPV [28]. Con el avance tecnológico de la biología molecular, se han desarrollado técnicas que han hecho posible el diagnóstico más específico y mucho más sensible, en etapas tempranas de la infección. La más utilizada es la hibridación, mediante la cual se

detecta el DNA viral que se encuentra en la célula huésped por medio de un DNA complementario marcado. Esta técnica supera por mucho la especificidad y sensibilidad del diagnóstico realizado por citología o por inmunoperoxidasa [29]. La técnica de reacción en cadena de la polimerasa es a la fecha la de mayor especificidad y sensibilidad ya que es posible que una sola copia del DNA viral pueda ser detectada en 100000 células [2].

Ya que en general no hay síntomas asociados con el CaCU, suelen ser necesarias una serie de pruebas para diagnosticarlo, como lo son:

- Citología con tinción de Papanicolaou: se lleva a cabo usando un pedazo de algodón, un cepillo o una espátula pequeña de madera para raspar suavemente el exterior del cuello uterino con el fin de recoger células.
- Biopsia: si se encuentran células anormales, se tendrá que extraer una muestra de tejido del cuello uterino y se observará a través del microscopio para determinar la presencia de células cancerosas. Para efectuar una biopsia sólo se necesita una pequeña cantidad de tejido, pero a veces se necesita extraer una muestra de biopsia más grande en forma de cono a lo que se le llama conización.

2.5. TRATAMIENTO

Existen tres tipos de tratamientos para el cáncer cervico-uterino los cuales son:

- **Cirugía.-** consiste en la extracción del cáncer en una operación.
- **Radioterapia.-** se utilizan radiaciones de alta energía para eliminar las células cancerosas.
- **Quimioterapia.-** utiliza medicamentos para eliminar las células cancerosas.

Algunas de las cirugías que se emplean para extraer el cáncer pueden ser:

- **Criocirugía.**- consiste en la eliminación del cáncer por congelamiento.
- **Cirugía con rayo láser.**- consiste en el uso de haz de luz intensa para eliminar células cancerosas.
- **Conización.**- consiste en la extracción de un pedazo de tejido en forma de cono en el lugar donde se encuentra la anomalía. Se emplea para biopsia, pero también para el tratamiento de cánceres tempranos del cuello uterino.
- **Escisión electroquirúrgica.**- la cual usa corriente eléctrica que pasa por un aro de alambre delgado, el cual sirve como cuchilla.
- **Histerectomía.**- es una operación en la cual se extrae todo el útero incluyendo todo el cuello uterino, además del cáncer.

Los tratamientos para CaCU también dependerán de la etapa o estadio en que se encuentra la enfermedad, el tamaño del tumor, la edad y estado de salud en general.

3.- BIOLOGIA MOLECULAR DEL VIRUS DEL PAPILOMA.

Los papillomavirus pertenecen a la familia Papovaviridae, estos virus se han encontrado en varias especies animales, principalmente en mamíferos [30]. Los papilomavirus se han clasificado con base a la especie animal de origen y en relación al grado de homología genética que existe entre los papilomas de una misma especie. Esta clasificación se realiza por medio de la técnica de hibridación en fase líquida. Aquellos virus cuya homología del DNA sea menor de 50% se consideran de diferente tipo, pero si la homología es mayor del 50% pero menor del 100% se consideran de diferentes subtipos [31]. Existen más de 75 tipos de HPV, aquellos capaces de infectar mucosas genitales se dividen en dos grandes grupos, de acuerdo con la malignidad de las lesiones en que se encuentran. Así los HPV tipos 6

y 11 se asocian con condilomas y lesiones benignas y los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 42 y 56 se presentan tanto en displasias moderadas como en carcinomas [32].

3.1. ORGANIZACIÓN GENERAL DEL GENOMA DEL HPV

El HPV presentan un genoma de DNA de doble cadena de una longitud aproximada de 8000 PB [33]. Miden aproximadamente 50 nm de diámetro, carecen de membrana, su cápside tiene forma icosaédrica y esta compuesta por 72 capsómeros, los cuales están formados por 2 proteínas la L1 y la L2. Su peso molecular es de aproximadamente de 5.2×10^6 d. Este DNA se encuentra combinado con histonas para formar un cromosoma pequeño [34].

Aunque los HPV despliegan una gran diversidad, su organización genómica es bastante conservada. Todos presentan siete genes de expresión temprana (E) y dos genes de expresión tardía (L), así como una región reguladora no codificadora. Todos sus genes están codificados por una sola cadena y usan un procesamiento diferencial de corte y empalme para la expresión individual de cada uno de sus genes. La capacidad oncogénica de los HPV reside en dos productos virales: las proteínas tempranas E6 y E7, cuya expresión depende de un gran número de factores celulares, y la presencia de la proteína viral reguladora E2. Asociada a E2, la proteína E1 cumple importantes funciones en la replicación del DNA viral [80]. Por su parte, los genes tardíos L1 y L2 codifican para las proteínas de la cápside viral [35].

3.2. MARCOS DE LECTURA ABIERTA (ORF'S) Y PROTEINAS VIRALES

La proteína E1 controla la replicación episomal del DNA, a través de la codificación de dos proteínas, una que es reguladora positiva y otra reguladora negativa [37]. E2 codifica un par de proteínas que se unen a la URR y funcionan como factores estimuladores o inhibidores de la transcripción viral, así como también regulan la transcripción de los genes virales E6 y E7 durante la infección. [36,38]. E3 es un marco abierto de lectura del cual se desconoce su producto proteico y

por ende su función. E4 produce varias proteínas que se encuentran en las células parabasales de los epitelios infectados y se cree que ellas inician los cambios coilocíticos en estas células. Este gen se pierde cuando se integra el DNA viral al genoma de la célula [39]. E5 es otro gen que juega un papel importante en la transformación celular, produce una pequeña proteína que se une a la membrana citoplasmática. La pérdida de este gen evita la replicación liposomal del DNA y favorece la integración del DNA viral al cromosoma [34,39].

El gene E6 codifica para una proteína de 18000 daltones, que se encuentra relacionada con la transformación maligna de las células. Este gen se encuentra conservado y activo en la mayoría de las células de CaCU estudiadas hasta ahora [36,38]. La proteína E6 tiene gran afinidad por el DNA, y se ha encontrado tanto en el núcleo como en la membrana plasmática [35]. E7 también participa importantemente en la oncogénesis. La proteína codificada por este gen causa transformación maligna de varias líneas celulares en cooperación con el gen E6 [19,34]. La proteína E7 es una fosfoproteína que se ha localizado que se ha localizado en el citoplasma aunque reportes recientes sugieren que es nuclear [19].

Los productos de estos oncogenes participan en la inducción y el mantenimiento del estado inmortalizado de las células que contienen secuencias de HPV; dichos genes se expresan selectivamente en tumores genitales y líneas celulares derivadas de tumores humanos, y se conservan intactos durante la integración del DNA viral al genoma celular [40,41]. Estas proteínas interactúan con diferentes proteínas celulares, las cuales se conoce que están involucradas en el control del ciclo celular y en la reparación del DNA, mas notablemente, las proteínas supresoras de tumor p53 y Rb [7,42]

No se sabe como ni en que momento el virus transforma a la célula [33,43]. Se sabe que los HPV 6, 11, 16 y 18 se encuentran en estado episomal y en forma productiva en las lesiones benignas y precancerosas; los HPV 16 y 18 se encuentran en forma no productiva e integrados al genoma celular en las células cancerosas y generalmente están amplificados en unas 50-200 copias por célula [44,45]. Esto parece indicar que la integración de los tipos 16 y 18 está relacionada con el proceso de malignización de las células normales o la progresión tumoral. El DNA viral generalmente se abre en la región

E1-E2 durante la inserción al DNA celular [46]. Los sitios de inserción en el DNA celular al parecer son muy variados y no hay un patrón característico [47].

3.3. PROTEÍNAS ESTRUCTURALES L1 Y L2

Todos los virus de papiloma contienen dos ORF's largos, designados como L1 y L2, los cuales codifican para polipéptidos estructurales virales. La proteína L1 tiene un peso molecular de 54,000 d, la cual está muy conservada entre las diferentes especies de HPV's, mientras que la proteína L2 es de 76,000 d en HPV-16, y es la que presenta mayor variabilidad en los HPV's. Ambas proteínas presentan patrones de fosforilación; L1 es fosforilada débilmente y parece ser bastante lábil, mientras que L2 es fosforilada excesivamente y parece ser la más estable. La transcripción de los ORF's de L1 y L2 ocurre cuando los viriones completos son ensamblados. La transcripción parece estar regulada por factores transcripcionales celulares que son únicamente producidos por las células epiteliales más diferenciadas en las capas superiores del epitelio. La presencia de tales factores transcripcionales en las células epiteliales escamosas más diferenciadas, explica el porqué de la producción de viriones y los efectos citopatológicos resultantes por HPV que son más pronunciados en lesiones de bajo grado. Estas lesiones interrumpen la diferenciación de las células escamosas. Aparentemente las proteínas L1 y L2 no participan en la inducción de lesiones, pero en pacientes con lesiones intraepiteliales de alto grado, hay una alta expresión de estas por lo que se producen anticuerpos contra tales proteínas.

3.4. REGIÓN LARGA DE CONTROL (LCR)

El genoma contiene una RLC (región larga de control) de aproximadamente 1000 PB, en la que se han identificado secuencias estimuladoras y represoras de la transcripción viral, así como el origen de la replicación [48]. Una característica interesante de la RLC es que, no obstante su importancia en la regulación de los HPV, su secuencia nucleotídica es extremadamente variable entre los diferentes tipos virales [49]. De esta forma, es posible distinguir los

diferentes tipos de HPV sólo con base en la secuencia de su RLC. No obstante lo anterior, la RLC conserva elementos de regulación comunes a todos ellos. Funcionalmente se encuentra dividida en dos dominios principales: el RE2, regulado por la presencia de la proteína viral E2 y donde se localizan tanto el origen de replicación del DNA viral, como el promotor temprano [36]. En el dominio RE2 se encuentra el promotor temprano a partir del cual se transcriben los oncogenes E6 y E7 [2,3].

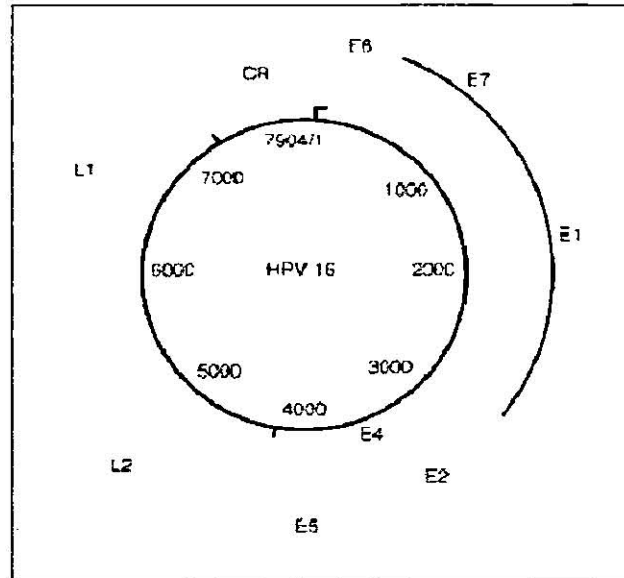


FIG. 3.-ORGANIZACIÓN GENOMICA DEL PAPILOMAVIRUS TIPO 16.

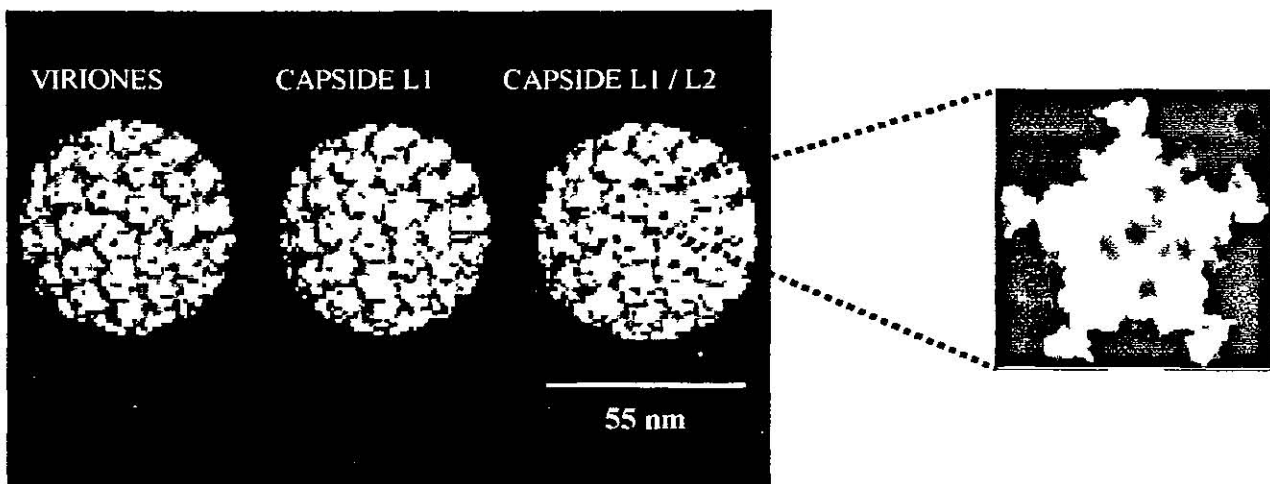


FIG. 4.- ESTRUCTURA TRIDIMENSIONALDE VIRIONES DE HPV.

4. CICLO DE VIDA DE LOS HPVs GENITALES

Poco se conoce acerca del ciclo de vida de los virus del papiloma, ya que no se ha podido cultivar el virus. Sin embargo, se ha tratado de interpretar todos los pasos, gracias a las evidencias conocidas. Se sabe que los HPV genitales, tienen preferencia para infectar células basales del epitelio genital, de tal manera que en esta fase el virus se encuentra en forma extracromosomal. Aún no se conocen cuales son pero se han propuesto que factores propios de la célula epitelial pueden participar en tal evento, debido a que se han identificado elementos de transcripción en la región RLC de los papilomavirus, que responden a tales factores de transcripción como : AP-1,NF-1/CTF,Octa-1,TEF etc. [50] , así como de elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE) [51,52].

En la fase temprana ,el virus puede replicarse por medio de la expresión de los genes tempranos E1 y E2 [53] , paulatinamente se expresan las proteínas L1 de la cápside, para formar el ensamblaje de los viriones. Por otra parte se expresan los genes E4 y E5 , importantes en maduración y replicación viral. Posiblemente la proteína E4 participa en el colapso de la red de queratinas citoplásmicas, lo que produce la apariencia de lesión del tejido, se predice que en esta fase, no se producen la expresión de las oncoproteínas E6 y E7, por la represión de la proteína E2, pero se cree que puede existir transcripción basal, no necesaria para crear un fenotipo transformante [54,55].

Cuando el virus se integra al genoma celular, se rompe en los sitios E1/E2,produciendo una proteína E2 truncada, incapaz de reprimir la expresión de los genes E6/E7,de esta manera se induce la transformación e inmortalización de la célula huésped. La expresión de los oncogenes E6/E7 se producen de manera constitutiva, incrementando los niveles de las oncoproteínas virales y de esta manera pueden interactuar con las proteínas supresoras de tumor; Rb y p53, además de estar involucradas en el control del ciclo celular [1,2,26,33]. La proteína E6 interactúa con p53,bloquea su función y la marca para su degradación, de esta manera la célula es inducida a permanecer en un estado de división celular constante, con lo cual hay posibilidad de que toda la maquinaria de replicación del ADN pueda

ser utilizada por el virus . La proteína E7 interactúa con p105 Rb e impide que este represor de tumor se asocie con el factor transcripcional celular E2F, el cual es responsable de la activación transcripcional de los promotores de algunos oncogenes celulares (p.e. *myc* y *fos*) . De esta manera , la función de las oncoproteínas E6 y E7 son muy importantes en el ciclo de vida viral, y parecen estar relacionadas con la abolición de algunos mecanismos de la regulación celular y con el desarrollo de la transformación [26].

5.- RESPUESTA INMUNOLOGICA CONTRA HPV

Poco se conoce acerca de la respuesta inmunológica contra el HPV , ya que no hay un sistema apropiado para la propagación de los viriones de HPV " *in vitro* ", ni tampoco un buen modelo animal. Sin embargo recientemente muchos grupos de investigadores han producido VLP's HPV-1 y HPV-11 en sistemas de expresión usando vaccinia virus o baculovirus. Estas cápsides producidas "*in vitro*" parecen tener una estructura idéntica a la de los viriones auténticos, lo cual ha sido determinado por microscopia electrónica. La inmunización de ratones con vaccinia virus recombinantes y/o VLP de HPV-1 genera inmunoglobulinas IgG, IgM, , y IgA, estos datos sugieren que las VLP's pueden sustituirse por viriones nativos.

La respuesta serológica contra las proteínas de la capsida L1 y L2 del HPV-16 han sido detectada por Western Blott (W.B.) (inmunobloting) con proteínas de fusión derivadas de bacterias o por la técnica de ELISA (Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima) con péptidos sintéticos. La respuesta de anticuerpos ha sido detectada, por estos métodos, en pacientes con neoplasia cervical, sin embargo es posible que los anticuerpos reconociendo virus intactos sean erróneos debido a que los antígenos péptidos y las proteínas desnaturalizadas utilizadas en los W.B. carezcan de la conformación nativa. Un reporte reciente presenta que más de la mitad de las mujeres con infección cervical por HPV generan un anticuerpo IgG en respuesta a los epitopes dependientes conformacionalmente de las proteínas L1 y L2 en ELISAs usando VLP's de HPV-16. En un estudio realizado entre las pacientes HPV-16 positivas con lesiones

intraepiteliales escamosas de alto grado o cáncer cervical invasivo, 61% presentan IgA, 44% presenta IgG, y un 39% presentan IgM en respuesta contra las cápsides del HPV-16 en las ELISAs -VLP's de HPV-16. Además, en este estudio, los porcentajes positivos y absorbancia media para IgA e IgG para el grupo positivo para HPV-16 fueron significativamente más altas que para el grupo HPV negativo y para los grupos positivos HPV-18 y HPV-6/1, pero dicha tendencia no fue igual para la respuesta de IgM. Así la respuesta de IgM parece no ser específica para HPV-16 en los ELISA-VPL's de este estudio. En este estudio cerca de la mitad de los pacientes con neoplasia cervical infectados con HPV tienen anticuerpos IgA e IgG contra HPV-16 [56].

5.1. RESPUESTA INMUNE HUMORAL

Las infecciones virales son primariamente intracelulares, y los antígenos virales escapan al alcance de los anticuerpos. La respuesta humoral es importante sólo para infecciones virales productivas, en las que las partículas vírales salen al espacio extracelular por exocitosis o durante la lisis celular por efecto del propio virus o las células citotóxicas del paciente. En el espacio extracelular las partículas virales son atrapadas por linfocitos B con receptores (anticuerpos de membrana), específicos para algunos epitopes de las proteínas virales. Una vez en el receptor, el antígeno es internalizado por endocitosis y digerido en el lisosoma para producir pequeños péptidos que se unen a moléculas de complejo principal de histocompatibilidad (MHC II) . Posteriormente, los péptidos son presentados en la superficie celular para ser reconocidos por linfocitos T cooperadores CD 4+ . Una vez activados, los linfocitos T estimulan a los linfocitos B para producir anticuerpos neutralizantes contra las partículas virales, los cuales juegan un papel muy importante para evitar la diseminación de la infección . Las moléculas MHC II están presentes en células del sistema inmune: linfocitos B, linfocitos T activados y células profesionales presentadoras de antígenos (CPA).

En las infecciones no productivas, como serían los casos de los NIC de alto grado (NIC-AG) y el cáncer invasor, solamente se producen proteínas tempranas del virus y no proteínas tardías, por lo que las partículas virales no se presentan en el espacio extracelular, y no se esperaría una respuesta humoral contra los antígenos virales.

Sin embargo, en el suero de las pacientes con cáncer cervical frecuentemente se encuentran anticuerpos contra la proteína E7 del HPV 16 o el HPV 18 [53,57]. Igualmente, se han detectado anticuerpos contra las proteínas E2 del HPV 16 y del HPV 18,11,12 E4,13,14 y E6 del HPV 16 [53,58]. Además, se ha encontrado que los títulos de anticuerpos contra las proteínas E2, E6 y E7 aumentan con el estadio clínico y varían de acuerdo con la manera en que es tratada la enfermedad [59,60]. No se sabe cómo se genera esta respuesta humoral, pero quizá durante la lisis de células cancerosas por linfocitos T citotóxicos (CTL), salgan antígenos virales al espacio extracelular. De cualquier manera, estos datos sugieren que esas proteínas virales son inmunogénicas y que pueden representar blancos para el sistema inmunológico.

5.2.- ANTICUERPOS CONTRA PROTEÍNAS DE LA CÁPSIDE

La proteína principal de la cápside es L1, que comprende más de 90% de las proteínas del virión. La proteína menor es L2, cuya localización dentro de la cápside aún es incierta.

Los estudios sobre vacunas de HPV se han hecho principalmente en perros, conejos y bovinos. De estos estudios se ha podido demostrar que la infección con HPV se puede prevenir en estos animales al ser inmunizados con la proteína L1. Asimismo, la proteína L2 desnaturalizada sólo previene infecciones en bovinos y conejos [54,61] Aún no sabemos cuáles inmunizaciones protegen contra infecciones por la exposición a mucosas, como vía natural de la infección; además se desconoce cómo y dónde los anticuerpos sistémicos IgG neutralizan virus que solamente infectan células epiteliales.

En humanos, se ha demostrado la presencia de anticuerpos específicos o de reacción cruzada contra VLP's. De 50 a 60% de las mujeres infectadas con HPV tienen anticuerpos contra VLP's de HPV-16. A diferencia de otros tipos, los HPV-16 tienen algunas variantes y serológicamente presentan reacción cruzada [62,63].

En CIN3 HPV-16+, estadio anterior a un cáncer cervical invasivo, se han encontrado anticuerpos contra proteínas de la cápside; sin

embargo, en cáncer invasivo HPV-16+, donde se están expresando proteínas tempranas y no viriones, no siempre se encuentran anticuerpos contra VLP de HPV [64]. Estudios de serorreactividad contra las VLP de los HPV sugieren que anticuerpos contra la cápside son inducidos durante infecciones severas o persistentes de HPV, y se pierden levemente después de que pasa la infección productiva. Los anticuerpos específicos contra la cápside, por consiguiente, no son marcadores confiables de infecciones por HPV-16 recientes o pasadas en un individuo.

5.3. RESPUESTA INMUNE CELULAR

Una de las respuestas más efectivas contra los virus se realiza por la inmunidad celular, que es mediada como los macrófagos, las células asesinas naturales (NK) y los CTL, cuya actividad es regulada principalmente por los linfocitos T CD4+, los que se dividen en dos subpoblaciones de linfocitos T cooperadores (Th1 y Th2, por sus siglas en inglés), y son antagonistas entre sí en cuanto a la función de las citocinas que secretan. Los Th1 secretan interleucina (IL-2) e interferón gama (INF-g), los que participan como los principales mediadores de la inmunidad celular contra microorganismos intracelulares y dirigen la defensa del huésped mediada por fagocitosis. Las células Th2 secretan IL-4, IL-5 e IL-10, citocinas que suprimen la inmunidad mediada por células, por lo que Th2 es responsable de la defensa independiente de la fagocitosis [65]. Así, una respuesta inmune celular antitumoral es inducida por citocinas de los linfocitos Th1 e inhibida por los Th2 (inmunosupresión). El papel de las citocinas en la respuesta inmune celular contra lesiones genitales producidas por el HPV ha sido poco estudiada. Las células NK y macrófagos están presentes en la mayoría de las lesiones; sin embargo, células de cáncer cervical y líneas celulares HPV+ son resistentes a las células NK. Se encontró gran proporción de linfocitos T CD3+, CD4⁻, CD8, junto con la expresión del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), IL-6 e IL-10 en 60% de las CIN [66]. Por otro lado, existe gran interés en estudiar el papel de los linfocitos T CD4+ en la respuesta inmune antitumoral [67,68]. con el fin de desarrollar estrategias terapéuticas para pacientes con CaCU avanzado. Se ha identificado la expresión de citocinas inmunosupresoras, tales como IL-10, IL-4 y TGF- β (Factor de crecimiento Tumoral) , en biopsias de

pacientes con cáncer cervico-uterino avanzado, positivo al HPV-16, y no existe expresión de citocinas que aumentan la actividad antitumoral, como IL-2 e IL-12. Por lo tanto, estos resultados sugieren que existe un estado de inmunosupresión susceptible de ser manipulado por citocinas que inhiban la expresión de citocinas inmunosupresoras y aumenten la expresión de citocinas con actividad antitumoral.

6. VACUNAS CONTRA HPV

6.1. Vacunas terapéuticas para evitar la replicación intracelular del HPV

Debido a que los anticuerpos neutralizantes no pueden reaccionar con los viriones intracelulares, una vacuna cuya función sea eliminar la replicación viral debe estimular CTL dirigidos contra sitios específicos (epítomos) de proteínas procesados intracelularmente y presentados en el contexto del MHC-I. Lo ideal de este tipo de vacunas sería producir una respuesta celular tanto para células diferenciadas infectadas viralmente, como para células madre epiteliales, dirigidas principalmente hacia proteínas L1, L2 y E4, en el caso de las células diferenciadas, y contra E1 y E2 para las células madre.

6.2. Vacunas Terapéuticas para controlar células tumorales

Como ya se ha mencionado anteriormente la expresión de las proteínas oncogénicas E6 y E7 son necesarias para mantener a las células epiteliales del cervix en un estado transformado. Estas proteínas han sido detectadas como antígenos específicos de tumor y por ende representan blancos adecuados para una vacuna dirigida a controlar tumores inducidos por HPV. Las células tumorales podrían ser eliminadas por una vacuna que estimule linfocitos T citotóxicos específicos para E6 y E7 aun con la presión selectiva predominante en el huésped inmunocompetente donde se ha creado condiciones para minimizar la presentación de proteínas oncogénicas de HPV para inducir la activación de los mecanismos efectores de la respuesta inmune, como por ejemplo ,la pérdida de expresión de alelos de HLA clase I (Antígenos leucocitario Humano de clase I), mutaciones puntuales en epitopes inductores de linfocitos T citotóxicos y la inhibición de la expresión de proteínas de la maquinaria que procesa

péptidos endógenos derivados de antígenos virales usando algoritmos predictivos y ensayos de unión a moléculas HLA clase I vacías, se han identificado epitopes inductores de linfocitos T citotóxicos en las proteínas E6 y E7 de HPV-16 que se unen a los haplotipos de HLA clase I mas comunes. Esta estrategia habré posibilidad de construir una vacuna de "poliepitopes" formada por múltiples epitopes inductores de CTL arreglados en un polipéptido linear y presentados por alelos de HLA expresados por el paciente con cáncer cervical. Una vacuna "poliepitope generica" podría ser desarrollada usando múltiples epitopes inductores de CTL que se asocian a los haplotipos de HLA mas comunes de una población abierta. Actualmente se vislumbran varias estrategias para potenciar la respuesta inmune especifica contra el tumor todas basadas en el control inmunológico del cáncer cervical :

- Vacunación con péptidos conteniendo epitopes inductores de linfocitos T citotóxicos.
- Inmunización con proteínas recombinantes E6 y E7 expresadas en sistemas bacterianos como proteínas de fusión.
- Dirigir el inmunogeno (proteína E7) a los compartimentos endosomicos y lisosomales de la vía de presentación de MHC clase II, usando una secuencia señal de distribución intracelular de la proteína de membrana asociada a lisosoma (LAMP) .La inmunización con el virus vaccinia con un gen quimérico E7/LAMP-1 produce mas anticuerpos y mayor respuesta de linfocitos T citotóxicos capaces de generar una protección contra tumores establecidos y contra el reto del tumor epitelial expresando E7.
- Infusiones subcutáneas múltiples de células dendríticas autologas cargadas con antígeno tumoral (E7),las cuales son capaces de inducir linfocitos T citotóxicos *in vivo* e inducir respuestas clínicas parciales y totales en otros tipos de tumores.
- Inmunización con virus vaccinia recombinante expresando las proteínas oncogénicas E6 y E7. Esta estrategia se basa en la inducción de linfocitos T citotóxicos específicos contra células transformadas por HPV.

- Inmunización con plásmidos desnudos para inducir la expresión de las proteínas oncogénicas puede potencialmente inducir linfocitos T citotóxicos para el tumor [9,10,18]

6.3. VACUNAS PROFILACTICAS

La infección natural de los papilomavirus oncogénicos ocurre en la superficie de la mucosa genital, la cual se caracteriza por ser un área de muy pobre inmunogenicidad para el huésped, esto es reflejado en parte por la falta de una infección productiva, las limitaciones de los queratinocitos para funcionar como células presentadoras de antígeno y la co-evolución del virus y el huésped, dado que los papilomavirus han evolucionado para evadir la respuesta del huésped mas que inducirla, por su tropismo a los queratinocitos.

Una estrategia de vacunación profiláctica debe superar estos problemas de inmunogenicidad y establecer una barrera inmunológica en el epitelio anogenital dirigida a las proteínas estructurales L1 y L2 de la cápside viral. [69]. Dos de las grandes dificultades para producir antígenos de la cápside viral para una vacuna profiláctica radica esencialmente en que los viriones de HPV no pueden ser propagados fácilmente in vitro y tampoco se pueden obtener razonables de las lesiones. Recientemente se han desarrollado estrategias para producir VLP's libres de DNA en levaduras y en otros tipos de células usando como vectores virus vaccinia, baculovirus y virus de Semliki forest [8,9,10].

Aunque parecen existir diferencias antigénicas entre este tipo de partículas virales y los viriones nativos, las VLP pueden representar una fuente adecuada de epitopes conformacionales naturales para estimular una respuesta inmune contra las proteínas de la cápside viral . En algunos sistemas experimentales en animales y humanos se ha observado la necesidad de epitopes conformacionales en los antígenos para inducir una respuesta optima de neutralización contra los papilomavirus, lo que apoya el uso de antígenos vacunales conformacionales nativos, asi mismo estos epitopes conformacionales son generalmente específicos del genotipo viral, lo que obviamente obstaculizara el desarrollo de una vacuna múltiple contra los genotipos de HPV asociados a las lesiones anogenitales [55].

Existen los suficientes datos experimentales que muestran que las VLP's formadas por proteínas de la cápside L1 y L2 de papilomavirus usadas como antígenos vacunales son efectivas en producir una inmunidad sistémica y en mucosas que confiere protección a las lesiones inducidas por papilomavirus infecciosos [70,71]. Una nueva estrategia para producir inmunidad específica en mucosas contra las proteínas de la cápside viral de papilomavirus radica en la inyección de plásmidos que controlan la expresión de proteínas heterólogas en el sitio de la inoculación , esta estrategia ha recibido el nombre de "Inmunización con DNA" y ha demostrado que induce protección contra las lesiones inducidas por papilomavirus, esta estrategia ofrece la posibilidad de desarrollar una vacuna polivalente combinando el DNA que codifica para las proteínas de la cápside viral de varios genotipos de HPV. [72].

El objetivo principal de las vacunas profilácticas es prevenir la infección por HPV, así como el desarrollo de lesiones en individuos infectados con el virus. Las vacunas que protegen de la infección por HPV están dirigidas a producir anticuerpos neutralizantes contra proteínas estructurales L1 y L2 de la cápside viral de HPV. El uso de proteínas de fusión L1 y L2, que inducen la producción de anticuerpos neutralizantes, ha demostrado prevenir infecciones con HPV [73,74]. Se han usado partículas sintéticas de algunos tipos de HPV dando mejores resultados que las proteínas de fusión. Otra estrategia para producir respuesta inmune neutralizante contra las proteínas de la cápside viral ha sido la producción por ingeniería genética de proteínas ensambladas incapaces de infectar por sí mismas a una célula viva VLP's, las que están compuestas solamente de las proteínas externas de membrana L1 o L1/L2; esta técnica es muy útil ya que la producción de partículas virales *in-vitro* no es sencilla [75,76]. Se conoce poco acerca de los factores implicados en la progresión hacia la enfermedad clínica, y debido a la gran cantidad de tiempo que se necesita para que se desarrolle, la vacunación profiláctica es menos atractiva para CaCU que para infecciones por HPV no oncogénicas, las que desarrollan lesiones rápidamente. Hay varias consideraciones respecto a la utilización de este tipo de vacunas, ya que no está claro si la infección es debida a partículas virales libres o a partículas que permanecen encerradas en las células escamosas, las cuales protegen de la acción de los anticuerpos; también deben realizarse vacunas dirigidas contra HPV específicos o

contra un grupo de virus .Ya que hay casos de infecciones mixtas, además de que la mayoría de las infecciones por HPV son y/o clínicamente no detectables. La identificación de individuos probables para la aplicación de vacunas profilácticas se realiza principalmente por ensayos serológicos, pero es difícil identificar a los verdaderos seronegativos, ya que hay varios factores que influyen en estos resultados; más aún, debido a que estas infecciones son a nivel de mucosas, es necesario producir vacunas que induzcan inmunidad de tipo IgA, pero que a la vez sea un a inmunidad persistente en virtud de que es necesaria la persistencia de la infección del HPV para que se desarrolle cáncer invasor[77,78].

JUSTIFICACIÓN

En nuestro país el CaCU es la enfermedad neoplásica más frecuente en la población femenina de los países subdesarrollados ya que constituyó la segunda causa de muerte en el año de 1995, con 48,222 decesos, el 11.2% del total de muertes. Aproximadamente 12 mujeres mueren de cáncer cervical cada 24 horas lo cual representa más de 4,000 muertes anuales. La infección natural de los papilomavirus oncogénicos ocurre en la superficie de la mucosa genital, la cual se caracteriza por ser un área de muy pobre inmunogenicidad para el huésped, esto es reflejado en parte por la falta de una infección productiva, las limitaciones de los queratinocitos para funcionar como células presentadoras de antígeno y la co-evolución del virus y el huésped, dado que los papilomavirus han evolucionado para evadir la respuesta del huésped más que inducirla, por su tropismo a los queratinocitos. Una estrategia de vacunación profiláctica debe superar estos problemas de inmunogenicidad y establecer una barrera inmunológica en el epitelio anogenital dirigida a las proteínas estructurales L1 y L2 de la cápside viral. En el presente trabajo de investigación está encaminado a la clonación y expresión de la proteína mayor de la cápside de papilomavirus tipo 16 (L1) en tejido muscular y detectar la expresión de la proteína mediada por el promotor temprano de citomegalovirus, por lo tanto el objetivo es obtener la expresión del gen que codifica para la proteína L1 en tejido muscular y tracto genital. Nuestros resultados obtenidos servirán como una alternativa para generar una profilaxis presentando el antígeno al sistema inmune y evitar la infección de papilomavirus generando anticuerpos neutralizantes dirigidos hacia la proteína L1 e papilomavirus tipo 16.

HIPÓTESIS

La clonación del gene L1 que codifica para la principal proteína de la cápside de HPV-16 en un vector bajo el control del promotor de citomegalovirus puede inducir la expresión de la proteína L1 en línea celular, músculo del ratón y tracto genital.

OBJETIVO GENERAL

Clonación y expresión *in vitro* e *in vivo* de la principal proteína de la cápside L1 de HPV-16 usando plásmidos de expresión eucariótica.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Amplificar el gen con oligonucleotidos específicos para el gen L1 HPV-16, a partir de la línea celular *Siha*. Por medio de la técnica PCR.
- 2.- Clonar el producto de PCR en pGEMT EASY VECTOR.
- 3.- Subclonar L1 HPV-16 a vectores (pCDNA3 y pEGFP-C1) de expresión en células eucariotas que posean promotor de CMV (citomegalovirus).
- 4.- Transfectar el plásmido pEGFP-C1 -L1 a la línea celular MK-16, para observar la expresión *in vitro* de la proteína verde fluorescente como gen reportero de expresión.
- 5.- Inyección del plásmido pCDNA3 conteniendo el gene L1 de HPV-16 en un modelo murino C57-BL6, y extraer DNA, RNA, para observar la expresión del transgen por medio la técnica de RT-PCR.
- 6.- Identificar la expresión del transgen L1 por medio de anticuerpos monoclonales, mediante la técnica de inmunohistoquímica.
- 7.- Transfectar el plásmido pEGFP-C1 -L1 en el modelo murino Balb/c via intravaginal, para observar la expresión *in vivo* de la proteína verde fluorescente como gen reportero de expresión.

MATERIAL Y METODO

1.- OBTENCIÓN DE DNA,RNA POR EL METODO DE TRIZOL.

Homogenizar con 1 ml de Trizol (Gibco BRL) por cada $5-10 \times 10^6$ células de la línea celular SiHa (Línea celular de HPV-16) . Incubar 5 min a temp. ambiente (T.A.). Añadir 0.2ml de cloroformo por cada ml de Trizol utilizado. Agitar vigorosamente con la mano por 15 seg. Incubar 2-3 min a T.A. Centrifugar 12,000 g(gravedades)/ 15 min 2-8°C.

A) Para la obtención de RNA recuperar la fase transparente de arriba ,transferir este contenido a otro tubo eppendorf, añadir 500 µl de isopropanol, vortexear e incubar a -20°C por 15 min. Centrifugar a 12,000 rpm por 10 min. , eliminar sobrenadante, lavar el paquete de RNA con 1 ml. de etanol al 75%,centrifugar 5 min. a 10,000 rpm. Eliminar sobrenadante y resuspender la pastilla en 20 ul de agua DEPC. Calentar a 65°C por 10 min.

B) Para la obtención de DNA recuperar la interfase (DNA) . Añadir a la interfase y a la fase orgánica 0.3 ml de etanol 100% por c/ml de trizol utilizado mezclar por inversión, incubar 2-3min a T.A. centrifugar 2000 X g / 5 min a 2-8°C . Eliminar sobrenadante . Lavar el pellet de 2-3 veces con 1ml de citrato de sodio 0.1 M preparado en etanol 10% por cada ml de trizol usado en cada lavado dejar el pellet 30 min con el citrato de sodio a T.A. (mezcle periódicamente) .Centrifugar a 2,000g / 5 min. después del último lavado dejar secar al aire por 5-15 min. Resuspender el pellet en 1.5-2 ml de etanol 75% , incube por 10 a 20 min mezclando periódicamente Centrifuge a 2000 X g por 5 min a 2-8°C. Disolver en NaOH 8 mM (300-600µl) aprox. para obtener una concentración de 0.2-0.3µg/µl de DNA. Este DNA sera utilizado como el templado para la amplificación de la proteína de la cápside de papilomavirus de tipo 16. Se utilizaran los oligos (primers) para la amplificación del gen L1 de HPV-16 ;

forward:

5' - CCGGGCCCATGTCTCTTTGGCTGCCTAGTGAGGC - 3'

reverse:

5'- CCGGGCCCTTACAGCTTACGTTTTTTGCGTTTAG - 3'

2.- AMPLIFICACION DEL GEN L1 HPV-16 POR PCR

El PCR se llevo a cabo en un volumen de 50 μ l , el cual contiene 1 μ g de templado (DNA de la Línea celular SiHa) , Buffer 1X (200 mM Tris-HCL pH 8.4, 500 mM KCL) , 1.5 mM MgCL₂ , 800 uM dNTPs, 10 pmol de primers para L1 , 1U de taq DNA polimerasa (PROMEGA).

Las muestras se amplificaron en un Termociclador (PTC-200 , MJ RESEARCH). Cada ciclo consistió de una fase de desnaturalización a 94°C por 1 min; una fase de alineamiento a 65°C por 2 min . y un paso de extensión a 72°C por 7 min. Se tomo una alícuota de la reacción de PCR para observar la amplificación del gen L1 (1517 pb) en un gel de agarosa al 1% y se visualizo por medio de la tinción con Bromuro de etidio bajo la luz UV (Ultravioleta).

3.- CLONACION DE L1 EN VECTOR T

Clonar el producto de PCR (gen L1) al vector T (pGEMT EASY VECTOR ,PROMEGA), incubar a 4°C 16 horas. La reacción de ligación (10 μ l) se llevo a cabo con relación vector - inserto 1:1 con 50 ng de vector e inserto , en presencia de buffer de ligación 1X y 1U de T4 DNA Ligasa (Promega). La reacción se incubo 16 hrs. a 4°C.

4.- TRANSFORMACIÓN EN *Escherichia coli*

Se tomaron 5 ul de la reacción de ligación y se transformaron en 50 μ l de células competentes DH5 α de *E. coli*. Se Incubo la reacción en hielo de 30-40 minutos se realizo un choque térmico a 42°C , por 1 minuto. Incubar en hielo 1 minuto. Agregar LB Broth base sin antibiótico e incubar por una hora a 37°C. Plaquear en cajas Petri con medio agar, con ampicilina (100 μ g/ml) y 0.5 mM de IPTG (isopropil β -

D-tiogalactosido) y 80 µg/ml de X-Gal (5-Bromo,4-Cloro,3-indolil-β-D-Galactosido). Incubar 20 horas a 37 °C para ver la expresión de la β-galactosidasa y seleccionar las colonias blancas las cuales contienen el inserto.

5.- ANALISIS DE CLONAS POR MINIPREP RAPIDO

Seleccionar las colonias blancas e incubar a 37°C por 20 horas, en un ml. de medio con ampicilina (100µg/ml) .Centrifuhgar 2 min. A 13000 rpm. Tirar sobrenadante ,Adicionar 70 µl de Buffer loadyng y 40 µl de fenol. Centrifugar y obtener solo la fase de arriba. Correr las muestras en Agarosa al 8% ,en cámara de electroforesis a 100 Volts. Teñir con bromuro de etidio y observar bajo luz UV. Comparar un plásmido sin inserto y compararlo con las clonas y observar diferencias de peso molecular.

6.- PURIFICACIÓN DE PLASMIDOS POR MINIPREP

De las colonias que salieron positivas (pGEM - L1). Purificar el plásmido por MINIPREP. Crecer las clonas positivas transformadas en *E. coli*, en 15 ml. de LB. Centrifugar 13000 rpm(Revoluciones por minuto) por 3 minutos., tirar sobrenadante, resuspender la pastilla en 200 µl de solución I, adicionar 400 µl de Solución II, adicionar 300 µl de Solución III, centrifugar a 13000 rpm ,por 10 minutos, guardar sobrenadante, agregar PEG(Polietilenglicol) al 30%, incubar 30 minutos en hielo, centrifugar 10 minutos, tirar sobrenadante lavar la pastilla con etanol al 70%, dejar secar y resuspender en 30 µl de agua estéril.

7.- OBTENCIÓN DEL GEN L1 POR DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Hacer la digestión con endonucleasas de las clonas que salieron positivas para que liberen el fragmento. Usar 1U (1 unidad) de ambas enzimas (*Not I* -*Apal*) para liberar el gene L1 (1530 pb) de la construcción pGEM-L1. La reacción de digestión se realizo con 1 ug de plásmido, buffer de digestión 1X, 1U de cada una de las enzimas de digestión, se Incubaron por una hora a 37°C , inactivar la enzima a

65°C por 10 minutos, correr la muestra en agarosa al 0.8%, a 100 Volts.

8.- SUBCLONACIÓN DEL GEN L1 EN pCDNA3 Y pEGFP-C1

Cortar el inserto (gen L1) del gel de agarosa para purificarlo por la técnica de GENE CLEAN (BIO101) y subclonarlo en vectores de expresión en eucariotes. En pCDNA3 con los sitios Not I - Apal y en pEGFP-C1 con los sitios *HindIII*-*Apal*. Ya clonado el gene L1 en pCDNA3 es subclonado en el vector pEGFP-C1 con las enzimas de restricción *HindIII*-*Apa I*.

Purificación de vector (pCDNA3 y pEGFP-C1) e inserto (L1) por medio de GeneClean :

- 1) Cortar las bandas
- 2) Difundir la agarosa con NaI (Ioduro de sodio) 3 volúmenes
- 3) Adicionar 1 µl de resina Glassmilk por cada µg de DNA.
- 4) Centrifugar 10 segundos
- 5) Hacer tres lavados con NEW WASH.
- 6) Secar pastilla y eluir con agua estéril
- 7) Centrifugar y obtener sobrenadante (DNA)

Comparar concentraciones de DNA y Hacer la Ligación del vector con el inserto. Las relaciones de concentración de vector e inserto fueron de 100 ng con relación 1:1 vector - inserto, en presencia la reacción de Buffer de ligación 1X y la enzima T4 DNA Ligasa (PROMEGA) , posteriormente :

- A) Incubar a 4°C por 16 horas.
- B) Transformar en células calcio competentes.
- C) Plaquear en cajas petri con Ampicilina (100 µg por ml.) o Kanamicina (50 µg por ml.)
- D) Analizar colonias por Miniprep y confirmar la inserción del inserto medio de Digestión con endonucleasas.

Ya confirmado la inserción del gen L1 a los vectores de expresión en eucariotas se purifican los plásmidos por medio de la técnica de purificación de DNA por medio de acetato de amonio.

9.- TECNICA DE PURIFICACION DE DNA PARA TRANSFECCIÓN POR ACETATO DE AMONIO

A) Activar la cepa de interés en 10 ml. caldo LB con antibiótico (ampicilina 100µg/ml, y Kanamicina 50 µg/ml.) 6-8 hrs. A 37°C.

B) Inocular 2 ml de un cultivo activado en 250 ml. de caldo LB con antibiótico, e incubarlo a 37 °C de 12-16 Hrs. con agitación constante.

C) Centrifugar a 10,000 X g ,el cultivo celular y concentrar el paquete celular y resuspender en 6 ml. de solución I (Tris-HCL pH 7.6, EDTA 0.5 M y Glucosa 0.5M).Incubar en hielo por 20 minutos.

D) Agregar 12 ml de solución II (20 % SDS, 5 M de NaOH), y hacer homogenización por inversión con agitación moderada, no usar vortex. Incubar en hielo por 20 minutos.

E) Adicionar 9 ml. de solución III (7.5 M acetato de amonio ph 7.6, realizar agitación por inversión. No utilizar vortex. Incubar 10 minutos en hielo.

F) Centrifugar a 10,000 X g por 10 minutos a 4°C, eliminar el sobrenadante y adicionar 0.6 volúmenes de isopropanol e incubar 10 minutos a temperatura ambiente.

G) Centrifugar a 10,000 X g por 10 minutos a 4°C ,se tira el sobrenadante y el paquete resultante se resuspende en 4 ml. de acetato de amonio al 2 M pH 7.4 y se incuba 10 minutos en hielo.

H) Centrifugar 10 minutos a 10,000 X g a 4°C, el sobrenadante pasarlo a un tubo nuevo y agregar 4 ml. de isopropanol y agitar por inversión e incubar a temperatura ambiente por 10 minutos. Y centrifugar a 10,000 X g por 10 minutos, al paquete resultante resuspenderlo en 2 ml. de agua estéril y agregar 10 µl de RNasa a 5 mg/ml e incubar a 37°C por 20 minutos.

I) Ya tratado con RNasa adicionar un ml. de acetato de amonio 7.5 M pH 7.4 e incubar a temperatura ambiente por 5 minutos, y centrifugar a 10,000 X g por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante es pasado a un nuevo tubo y se le adicionan 3 ml. de isopropanol y se incuba a temperatura ambiente por 10 minutos.

J) Centrifugar a 10,000 X g por 10 minutos y el paquete resultante se lava con etanol al 70% ,secar el paquete que contiene el DNA y resuspenderlo en agua deionizada estéril.

10.- TRANSFECCION *IN VITRO* DE PLASMIDOS EN UNA LINEA CELULAR

La construcción pEGFP-C1, purificado el plásmido (1-2 µg) conteniendo el gene de interés (L1) y como gen reportero el de la proteína verde fluorescente, se realiza la transfección *in vitro* con LIPOFECTAMINE (Gibco BRL) en la línea celular MK-16 (Línea de HPV que carece de las proteínas estructurales de la cápside L1 y L2) :

A) En una caja de seis pozos de cultivo celular incubar a 37°C, y 5 % de CO₂ (dióxido de carbono), de 18-24 hrs. de $1-3 \times 10^5$ células de MK-16 con una confluencia de 70-80% adicionando MEM (Medio Esencial Mínimo) suplementado con suero.

B) Preparar soluciones para la transfección :

Solución A .- adicionar 1 µg de DNA en 100 µl de medio libre de suero.

Solución B .- adicionar de 2 –20 µl de LIPOFECTAMINE a 100 µl de medio libre de suero.

C) Ya preparadas las soluciones mezclar las soluciones A y B e incubarlas a temperatura ambiente de 15-45 minutos.

D) Lavar las células con 2 ml. de medio libre de suero.

E) Adicionar 800 µl de medio libre de suero y la mezcla de las soluciones A y B a cada pozo. Incubar de 12-24 hrs. A 37 °C, y CO₂ al 5 %.

F) Reemplazar el medio cada 24 horas.

G) Realizar la observación de la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) por Microscopía Confocal , a las 48,72 y 96 horas después de la transfección.

12.- INYECCIÓN DE PLASMIDOS EN TEJIDO MUSCULAR

A) ANÁLISIS DE LA EXPRESION *IN VIVO* MEDIANTE LA CUANTIFICACIÓN DE LUCIFERASA.

La determinación de luminiscencia se realizo por medio del kit Luciferasa Reporter Gene Assay (Boehringer). Para determinar la expresión de vectores de DNA (plásmidos) que están bajo la

regulación del promotor de CMV ,se realizo un experimento en el que se realizo la inyección intramuscular en el músculo anterior de la tibia en un ratón de la línea C57-BL6 con el vector pCMV sGFP-Luc (100 µg) para verificar la expresión *in vivo*, para saber a que tiempo se obtenía la mayor expresión para poder detectar la proteína. Para esto nos valimos del vector pCMV sGFP-Luc el cual codifica para luciferasa y puede ser medida con facilidad debido a su alta sensibilidad. Una vez realizada la inyección se extrajo músculo a los días 3,7 y 11 días después de la inyección con el vector pCMV sGFP Luc y se proceso el músculo fue lisado con 100 µl Buffer e Lisis y fue homogenizado con politrón , el tejido solubilizado fue centrifugado a 12,000 rpm por 30 seg. Se utilizaron 50 µl del sobrenadante y fue mezclado perfectamente con 100 µl del sustrato de luciferasa y pasando 10 segundos de reacción la emisión de luz fue cuantificada en un luminómetro (OPTOCOMP I ,MGM INSTRUMENTS) durante un período de 1 minuto.

B) ANALISIS DE EXPRESIÓN *IN VIVO* DEL GEN L1 EN MUSCULO.

Inyección *in vivo* en un modelo murino C57BL/6 , realizar la inyección del plásmido pCDNA3 - L1 (100 µg) ; intramuscular en el músculo anterior de la tibia. La expresión del transgen L1 se identifico por medio de la técnica de RT - PCR :

RT-PCR

A) Obtener músculo a los siete días después de la inyección

B) Obtención de RNA por la técnica de TRIZOL (Gibco ,BRL)

C) Para la síntesis de la hebra de cDNA (DNA complementario) a partir de RNA se llevo a cabo la reacción de RT - PCR ; en presencia de 3µg de RNA obtenido del músculo , buffer 5X (250 mM tris-HCL pH 8.3 , 375 mM KCL, 50 mM Dithiothreitol, 1.5 mM MgCl₂), 1U de inhibidor de RNasas, 800 uM de dNTPs , 2.5 uM de oligo dT₁₂₋₁₈ y 3 U de transcriptasa reversa del virus de la leucemia Moloney Murina (MMLV). Incubar la reacción a 37°C por 2 hrs. Inactivar la enzima a 60°C por 10 min.

D) Para determinar si se transcribió el gen L1 y se produjo el mensaje se dirigieron primers específicos para el gen L1 y se amplifico

por PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa) en un volumen de 50 µl , en presencia de 1 µg de templado (cDNA) , Buffer 1X (200 mM Tris-HCL pH 8.4, 500 mM KCL) , 1.5 mM MgCL₂ , 800 uM dNTP's(desoxinucleotidotrifosfatados) , 10 pmol (10 picomoles) de primers para L1 , 1U de taq DNA polimerasa (PROMEGA). Las muestras se amplificaron en un Termociclador (PTC-200 , MJ RESEARCH). Cada ciclo consistió de una fase de desnaturalización a 94°C por 1 min; una fase de alineamiento a 65°C por 2 min . y un paso de extensión a 72°C por 7 min. Se tomo una alícuota de la reacción de PCR para observar la amplificación del gen L1 (1517 pb) en un gel de agarosa al 1% y se visualizo por medio de la tinción con Bromuro de etidio bajo la luz UV.

13.- DETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA L1 POR INMUNOHISTOQUIMICA

- A) Obtener músculo a los siete días después de la inyección
- B) Realizar cortes histologicos del músculo y montar en Laminillas
- C) Técnica de inmunohistoquímica :

- | | |
|---|-----------------|
| 1) Depositar los portaobjetos en la plancha caliente (2 min.) | |
| 2) XILOL 1 | 5 min. |
| 3) XILOL 2 | 5 min |
| 4) ETANOL ABSOLUTO | 3 min |
| 5) ETANOL AL 80% | 3 min |
| 6) ETANOL AL 70 % | 3 min |
| 7) ETANOL AL 50 % | 3 min |
| 8) H2O CORRIENTE | 3 min |
| 9) TRIPSINA 0.25% | 20 min (a 37°C) |
| 10) TEMPERATURA AMBIENTE | 20 min |
| 11) AGUA DESTILADA | 2-3 LAVADOS |
| 12) BUFFER DE LAVADO (1:10) | 20 min |
| 13) LAVAR CON H2O DESTILADA | 2-3 LAVADOS |
| 14) BLOQUEADOR DE PEROXIDASA
(peróxido de hidrógeno) | 5 min |
| 15) LAVADO CON BUFFER | 1- 2 LAVADOS |
| 16) BLOQUEADOR DE BIOTINA
(proteína bloqueadora) | 5 min |
| 17) BUFFER DE LAVADO | 5-6 LAVADOS |
| 18) ANTICUERPO PRIMARIO(anti-L1) | 20 min |
| 19) BUFFER DE LAVADO | 1-2 LAVADOS |
| 20) ANTICUERPO SECUNDARIO | 15 min |

- | | |
|--|----------------|
| 21) BUFFER DE LAVADO | 1-2 LAVADOS |
| 22) ESTREPTAVIDINA | 15 min |
| 23) BUFFER DE LAVADO | 1-2 LAVADOS |
| 24) DAB (diaminobencidina) | 30-60 seg |
| 25) LAVAR CON H2O DEST. | 5-6 LAVADOS |
| 26) HEMATOXILINA | 20-30 SEGUNDOS |
| 27) LAVAR EN AGUA CORRIENTE | 1-2 LAVADOS |
| 28) ETANOL AL 50% | 8-10 LAVADOS |
| 29) ETANOL AL 70% | 8-10 LAVADOS |
| 30) ETANOL AL 80% | 8-10 LAVADOS |
| 31) ETANOL AL 100% | 8-10 LAVADOS |
| 32) XILOL 2 | 8-10 LAVADOS |
| 33) XILOL 1 | 5 min |
| 34) Colocar un gota de resina y posteriormente un cubreobjetos para observar al microscopio. | |

14.- Expresión de GFP *in vivo* en tracto genital. En este experimento se utilizó el modelo murino BALB/c, y se inocularon vía intravaginal con 100 µg de la construcción pEGFP-C1, purificado por la técnica de acetato de amonio, resuspendido en agua inyectable. Se analizó el tracto genital a los 3 , 7 y 10 días postinfección, por Microscopía Confocal para observar la expresión de la GFP.

RESULTADOS

Con el fin de lograr clonar y expresar la proteína L1 de HPV-16 , se realizaron varios experimentos en el cual se optimizaron técnicas para observar la expresión de la proteína L1 *in vitro* e *in vivo*. Se extrajo DNA genómico de la Línea celular SiHa por medio de la técnica de TRIZOL (Gibco BRL). Se amplificó el gen L1 por medio de la técnica de PCR , con oligonucleotidos específicos para el gen L1 HPV-16 en cual se colocaron adaptadores en los extremo 5' de la cadena líder y en el extremo 3' de la cadena complementaria con el sitio de restricción Apa-I. En esta reacción de PCR se utilizó como templado el DNA de la línea celular *SiHa* para amplificar L1. La amplificación del gen L1 (1517 pb) se observó en un gel de agarosa al 1% [Fig.5].

OLIGONUCLEOTIDOS ESPECIFICOS PARA L1 (HPV16) :

Forward

5' - CCGGGCCCATGTCTCTTTGGCTGCCTAGTGAGGC -3'

Reverse

5' - CCGGGCCCTTACAGCTTACGTTTTTTGCGTTTAG - 3'

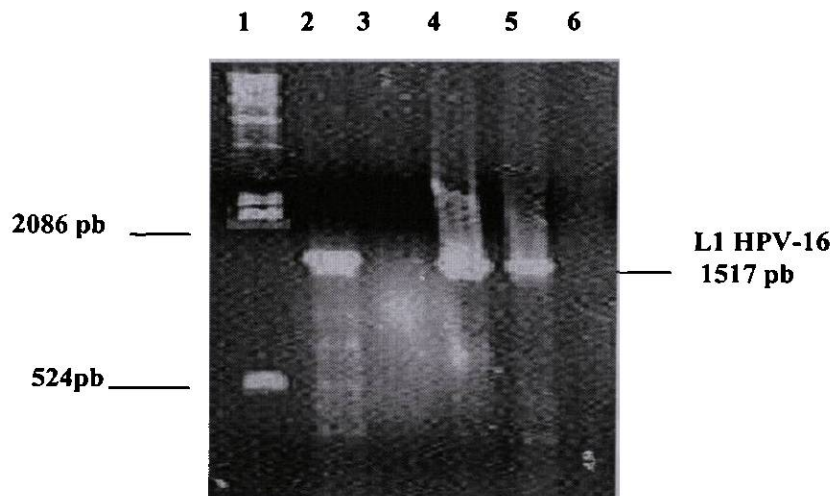


Fig.5 .- Gradiente de amplificación del gen L1 HPV 16. Carril 1, Marcador de peso molecular λ Hind III . Temperaturas de alineamiento : Carril 2, 58°C ; Carril 3, 60°C; Carril 4, 62°C; Carril 5, 65°C; Carril 6, Control Negativo.

Este producto de PCR (gen L1) el cual contiene la información completa del gene L1 se clono en un vector de clonación de productos de PCR , se clono en el vector pGEM-T Easy Vector(PROMEGA) [Fig. 6].

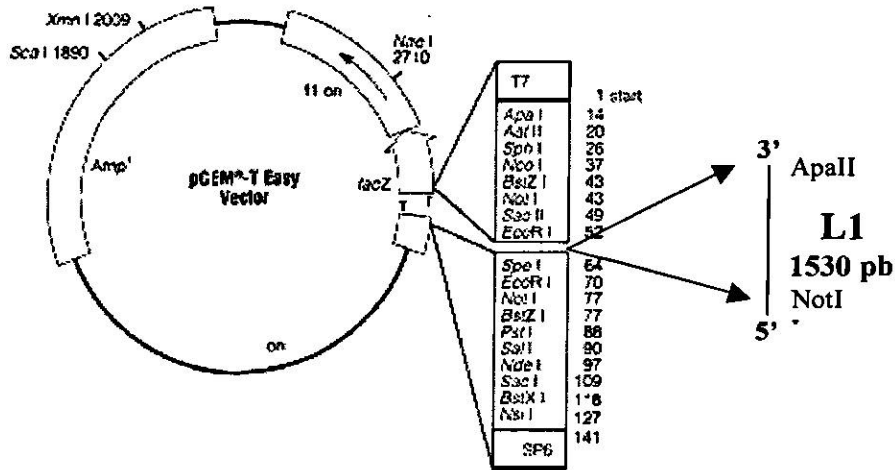


Fig. 6.- Representación esquemática del Vector pGEM-T Easy Vector (Promega) para clonación de productos de PCR. Posición del producto de PCR del gene L1 HPV-16 dentro del Vector.

Se transformo la reacción de ligación a células calcio competentes de la cepa DH5α de *Escherichia coli*. Se analizaron las colonias por miniprep rapido para obtener plásmido purificado y se analizo en gel de agarosa al 1% , para determinar si el vector contenía el gen L1 [Fig.7].

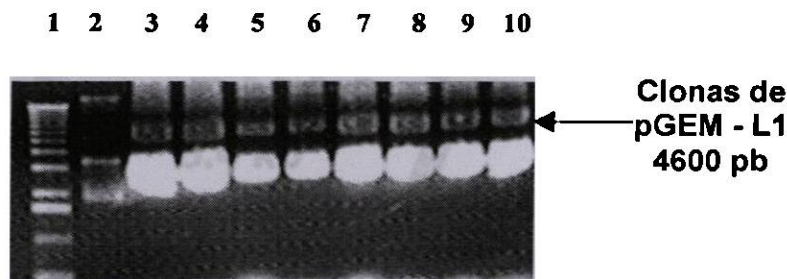


Fig. 7 - Análisis de clonas de la construcción L1 en pGEM por Mini prep. Rápido . Carril 1, Marcador peso molecular 1KB ; Carril 2, pGEM; Carril 3 – 10 , Clonas obtenidas de pGEM – L1.

Las colonias positivas que contenían el inserto (gen L1) se purificaron por Mini prep para obtener plásmido y se realizó la digestión de este con la enzima de restricción Apa I para observar la liberación del gen L1 (1517 pb) en un gel de agarosa al 1% [Fig.8].

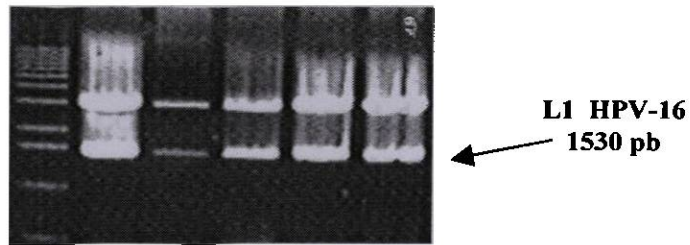


Fig. 8.- Digestión de las clonas pGEM-L1 y liberación del gene L1(1517 pb) con las enzimas de restricción Not I – Apa I.

Se obtuvo de la construcción pGEMT-L1, el gen L1 (1530 pb) con las enzimas Not I - Apa I para subclonarlo en un vector de expresión en eucariotes pcDNA3 (INVITROGEN) [Fig.9].

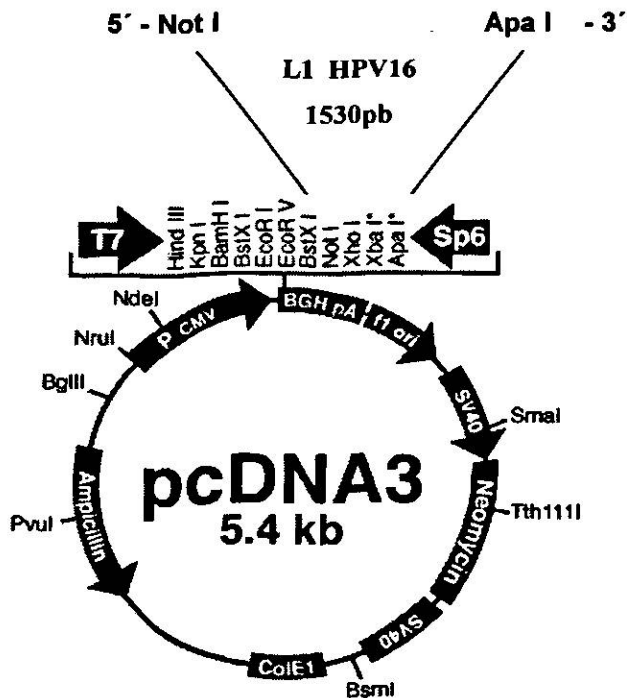


Fig .9.- Clonación del gene L1 HPV-16 en pcDNA3, con los sitios de restricción NotI – Apa I.

Se realizo una reacción de ligación con la enzima T4 DNA LIGASE (PROMEGA) para clonar el gen L1 al vector pCDNA3 se transformo la reacción de ligación a células calcio competentes de la cepa DH5 α de *Escherichia coli*. Se analizaron las colonias por miniprep rapido para obtener plásmido purificado y se analizo en gel de agarosa al 1%, para determinar si el vector contenía el gen L1 [FIG.10].

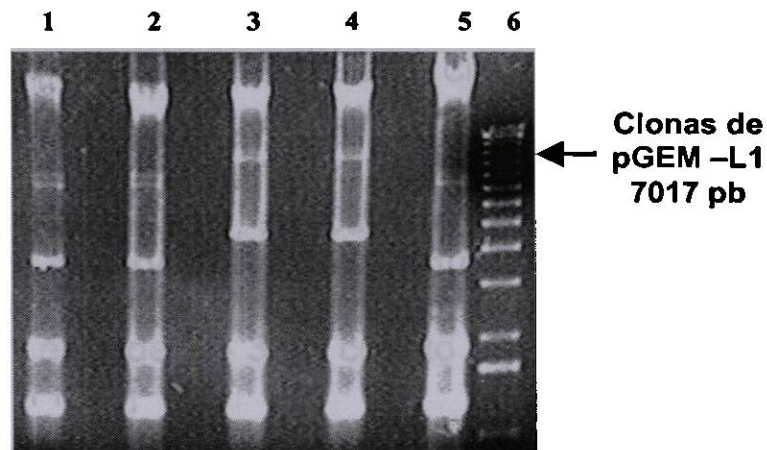


Fig. 10 .- Análisis de clonas de la construcción pCDNA3 – L1 por Mini prep. rapido.Carril 1,2, Clonas sin inserto (L1 HPV-16) ; Carril 3,4, clonas con inserto (L1 HPV-16) ;Carril 5, pCDNA3.

Las colonias positivas que contenían el inserto (gen L1) se purificaron por Mini prep para obtener plásmido y se realizó la digestión de este con las enzimas de restricción Not I- Apa I para observar la liberación del gen L1 (1530 pb) [Fig 11].

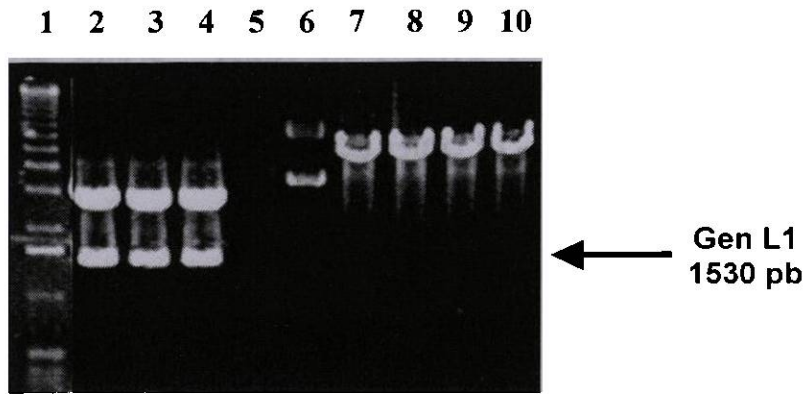


Fig. 11 .- Digestión de clonas de la construcción pCDNA3 – L1 , y liberación del gen L1(1530 pb) con las enzimas de restricción Not I – Apa I . Carril 1, Marcador de peso molecular 1Kb; Carril 2,3,4, liberación del gen L1(1530 pb) ; Carril 6, vector pCDNA3 (5.4 Kb) ; Carril 7,8,9,10 , Clonas de la construcción pCDNA3 - L1 (6.9Kb).

La construcción pCDNA3-L1 se caracterizo con la enzima de restricción EcoRI para observar si el gen L1 queda en frente de lectura en cuanto al promotor de CMV, el producto de caracterización para observar si el gen L1 esta de 5'- 3'en cuanto al promotor de CMV es de 1260 pb y 257 pb [Fig12] .

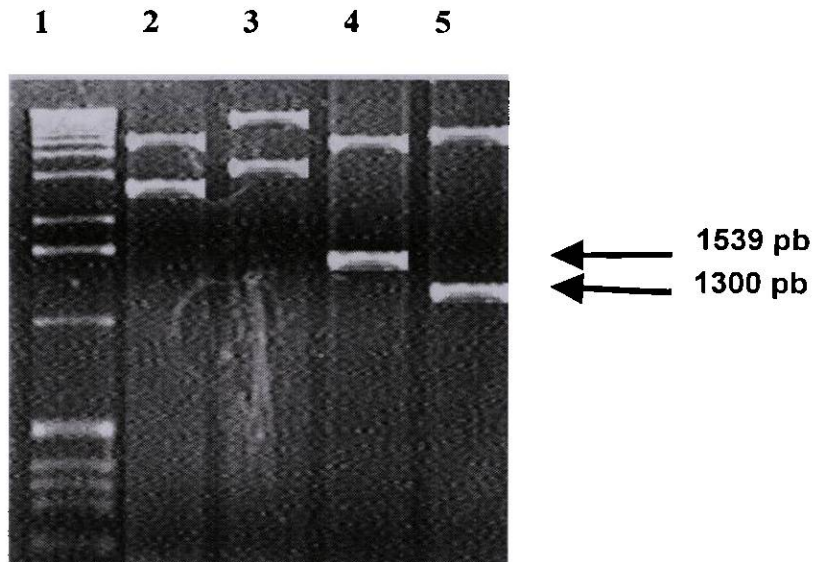


Fig. 12 .- Caracterización del gen L1 en la construcción pCDNA3 – L1. Carril 1, Marcador de peso molecular 1KB ; Carril 2, pCDNA3 ; Carril 3, pCDNA3 – 1 ; Carril 4 , liberación del gen L1 HPV-16 con Not I – Apa I (1606 pb) ; Carril 5 , Caracterización del gen L1 HPV-16 con ECOR I (1300 pb) .

Este gen L1 clonado en la construcción pCDNA3-L1 se extrae de esta construcción con los sitios Hind III - Apa I para posteriormente subclonarlo en el vector pEGFP-C1 (CLONTECH) de expresión en células eucariotas con los mismos sitios Hind III - Apa I [FIG.13] .

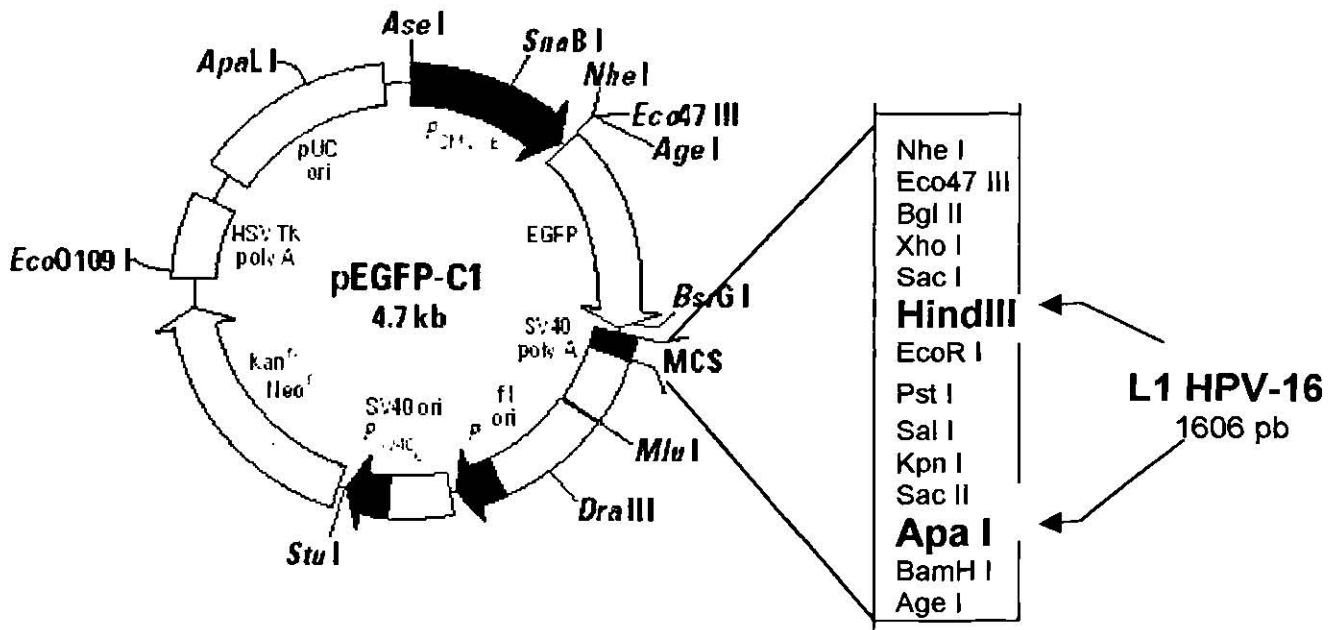


Fig. 13.- Representación Esquemática de la Clonación del gen L1 HPV-16 en el vector pEGFP – C1. con los sitios de restricción Hind III – Apa I.

Se analizó el gen L1 clonado en la construcción pEGFP-C1 - L1 mediante la enzima de restricción ECORI para caracterizar el gen en el cual el producto de la digestión fue de 1300 pb [Fig. 14] .

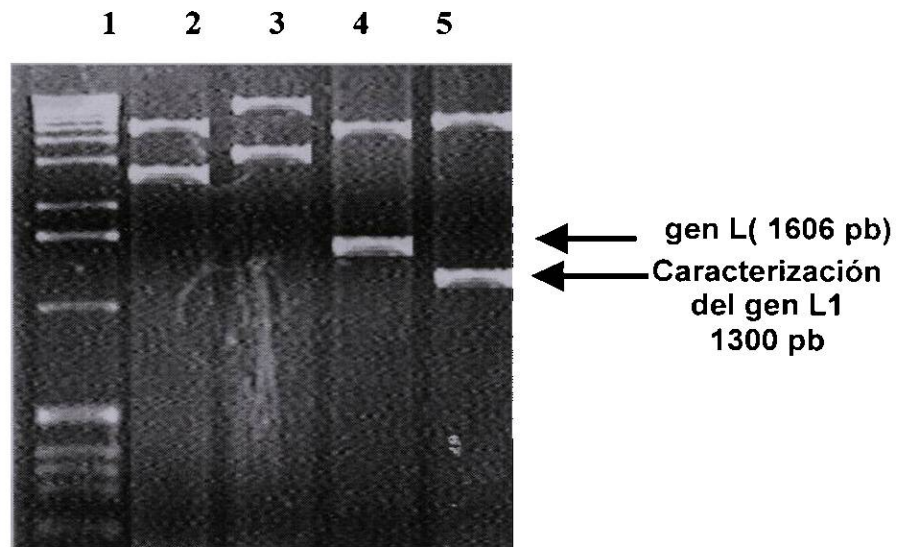


Fig. 14 .- Caracterización del gen L1 en la construcción pEGFP-C1-L1 .Carril 1, Marcador de peso molecular 1KB ; Carril 2, pEGFP-C1 ; Carril 3, pEGFP-C1 – L1 ; Carril 4 , liberación del gen L1 HPV-16 con Hind III – Apa I (1606 pb) ; Carril 5 , Caracterización del gen L1 HPV-16 con ECOR I (1300 pb).

La construcción de pEGFP-C1-L1 nos sirvió para transfectar con LIPOFECTAMINE (GIBCO BRL) este plásmido que contiene nuestro gen de interés (L1 HPV-16) a la Línea celular MK-16 para observar en un Microscopio Confocal (OLYMPUS IX70) la expresión *in vitro* de la proteína verde fluorescente (GFP) a las 48,72 y 96 horas , después de la transfección [Figs. 15,16,17].

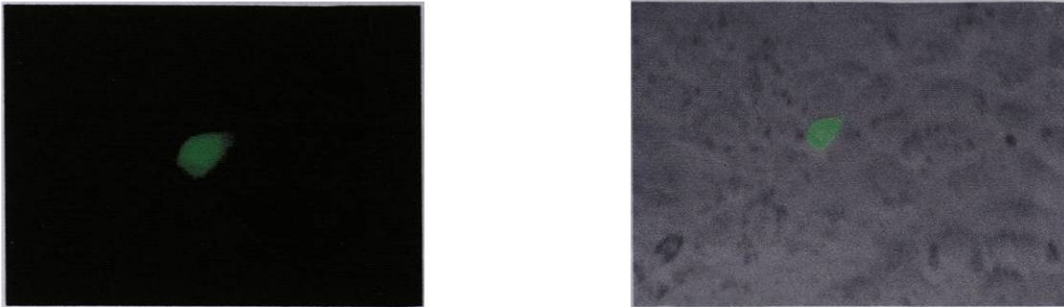


Fig. 15 .- Análisis de la expresión in vitro de la proteína verde fluorescente (GFP) por Microscopía Confocal (OLYMPUS IX70) 10X. A las 48 hrs. después de la transfección ,de la construcción pEGFP-C1-L1 a la línea celular MK-16.

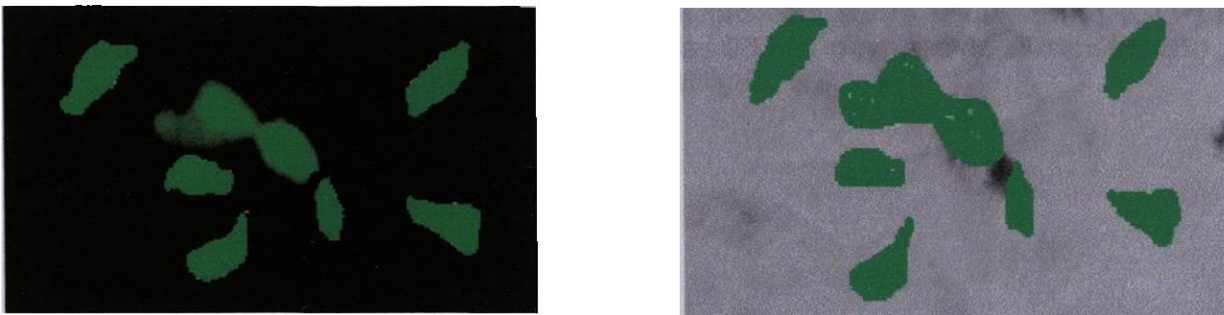


Fig. 16 .- Análisis de la expresión in vitro de la proteína verde fluorescente (GFP) por Microscopía confocal (OLYMPUS IX70) 40X . A las 72 hrs. después de la transfección ,de la construcción pEGFP-C1-L1 a la línea celular MK-16.

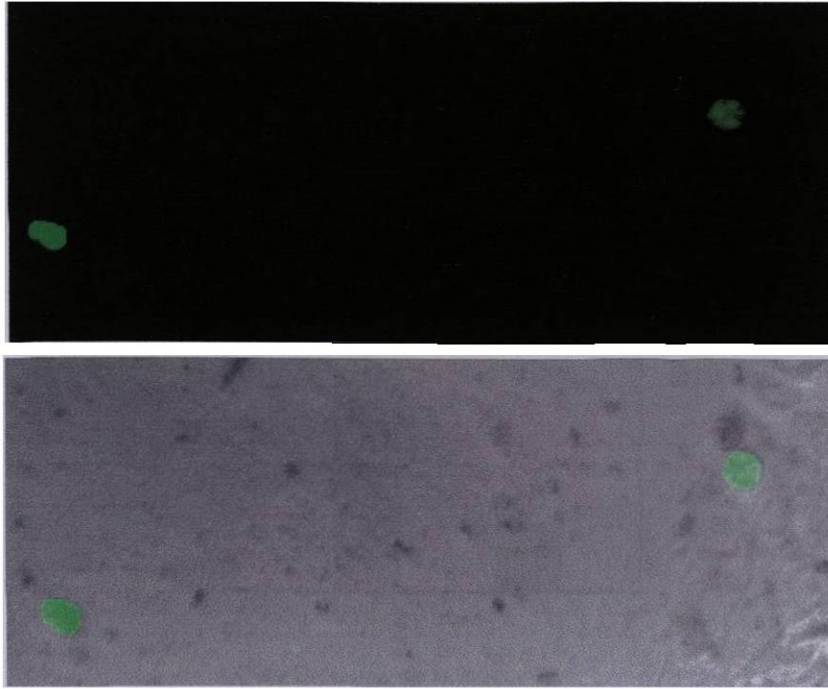
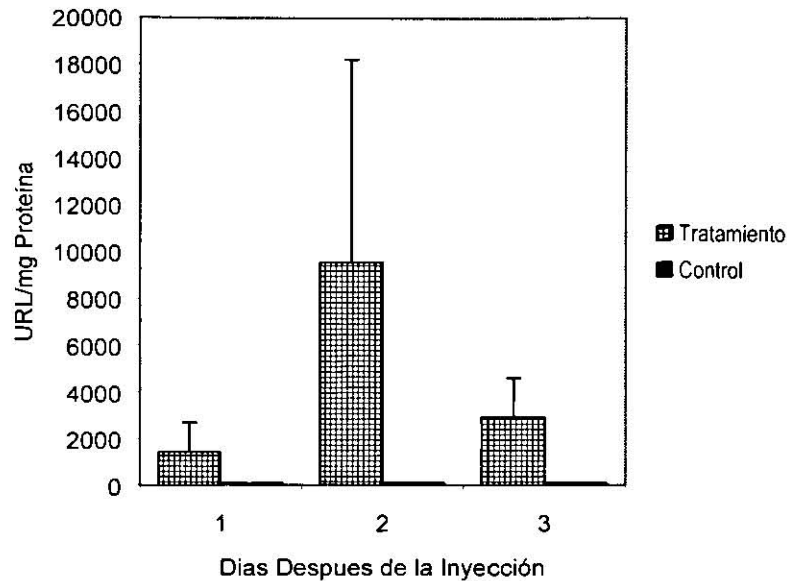


Fig. 17 .- Análisis de la expresión *in vitro* de la proteína verde fluorescente (GFP) por Microscopía Confocal (OLYMPUS IX70) 10X. A las 96 hrs. después de la transfección ,de la construcción pEGFP-C1-L1 a la línea celular MK-16.

El experimento para determinar y estandarizar la expresión *in vivo* de plásmidos desnudos consto en la inyección del plásmido desnudo pCMV GFP Luc (100 µg) y se inyectó a grupos de tres ratones C57/BL6 de 8 semanas de edad para estandarizar la expresión *in vivo* midiendo la expresión del gen reportero de la Luciferasa y así estandarizar el tiempo en la que se expresa a mas alto nivel la Luciferasa bajo la regulación del promotor de CMV, posteriormente obteniendo este resultado en la cual se encontro que el grado maximo de expresión se encontraba al séptimo día . Se prosiguió a realizar dos experimentos en los que se realizara la inyección en músculo con la construcción pCDNA3-L1 y detectar la expresión por RT-PCR e Inmunohistoquímica.



Grafica 2.-Expresión de Luciferasa en músculo de ratones transfectados con 50µg del plásmido pCMV-GFP-Luc . Análisis de Expresión de Luciferasa : Tratamiento 1; 3 días post-inyección, Tratamiento 2; 7 días post-inyección, Tratamiento 3; 11 días post-

Después de haber obtenido el resultado "*in vivo*" en la cual observamos la mayor expresión del gen de la luciferasa al séptimo día. Se prosiguió al primer experimento el cual consistió en inyectar un ratón de la línea C57-BL6 para observar la expresión "*in vivo*" del transgen (L1) en la cual se inyectó la construcción pCDNA3-L1(100ug) en PBS1X , al músculo anterior de la tibia y se extrajo el músculo a los siete días después de la inyección para observar la expresión del mensaje , en la cual se extrajo DNA y RNA del músculo por medio de la técnica de TRIZOL (GIBCO BRL) , este RNA se utilizó para hacer la reacción de RT-PCR en el cual se sintetizó el RNA a cDNA por medio de la transcriptasa reversa , para utilizarlo como templado para la reacción de PCR en la cual en la reacción de PCR se añadieron los oligonucleótidos (primers) específicos para el gen L1 para comprobar si el plásmido (pCDNA3-L1) inyectado se transcribió y generó el RNA mensajero que codifica para la proteína L1 HPV-16 , este

experimento se analizo en un gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio .

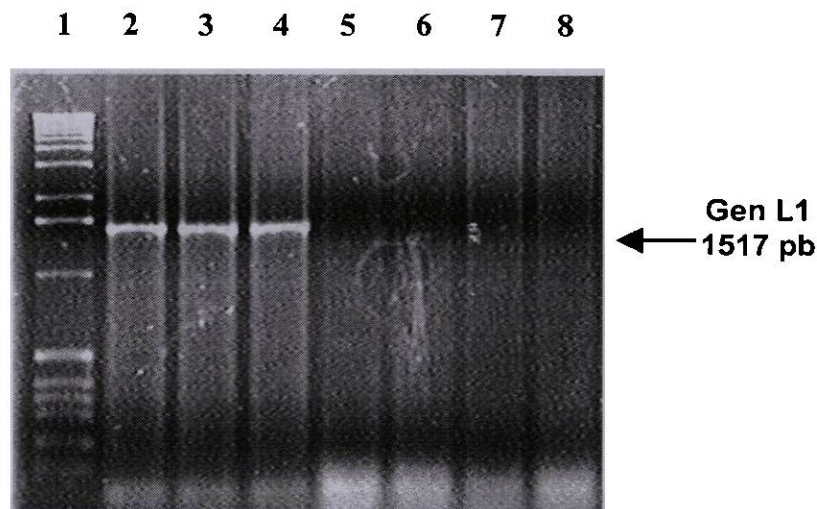


Fig. 18 .- Análisis de la expresión *in vivo* del gen L1 , por medio de la técnica de RT-PCR. Carril 1, Marcador de peso Molecular 1KB ; Carril 2 , Control positivo ,Siha ; Carril 3, control positivo pCDNA3–L1 ; Carril 4 , cDNA de músculo inyectado con pCDNA3–L1 ; Carril 5, RNA de músculo inyectado con pCDNA3–L1 ; Carril 6, cDNA de músculo inyectado con pCDNA3 ; Carril 7 , DNA de músculo inyectado con pCDNA3 ; Carril 8 , Mezcla de reacción de PCR sin templado

El segundo experimento consto en la inyección del plásmido desnudo (pCDNA3-L1 100ug) en PBS 1X , al músculo anterior de la tibia y se extrajo el músculo a los siete días después de la inyección para detectar la expresión de la proteína L1 de HPV-16 por INMUNOHISTOQUÍMICA usando el método streptavidína-biotina : Se efectuaron cortes histológicos , los cuales fueron luego desparafinados en xilol y rehidratados a través de alcoholes, agua destilada y PBS. Se hizo un pretratamiento con Tripsina, y la recuperación antigénica se hizo a 37°C . Posteriormente se siguieron los siguientes pasos : bloqueo de los tejidos con peróxido de hidrógeno por 5 min y lavado con buffer de citratos ; coloración inmunohistoquímica a temperatura ambiente; incubación con el anticuerpo primario específico 30 min (Ac. monoclonal de ratón para L1 HPV-16 diluido 1:1000 , CHEMICON) ; incubación con anticuerpo secundario (Ig anti-ratón biotinilado) por 30 min y lavado con buffer citrato; incubación con streptavidina por 30

min., lavado con buffer citrato en 2 baños por 5 min, reacción con substrato cromógeno diaminobenzidine hasta que aparezca la reacción de color, luego contraste del espécimen con Hematoxilina de Harris y colocar un gota de resina y posteriormente un cubreobjetos para observar al microscopio . Encontrando resultados negativos en el ejemplar del ratón de la Línea C57BL/6 con inyección de plásmido pCDNA3 (100 µg) [FIG.19 a y b]. Y se encontró resultados positivos en el ejemplar (ratón C57BL/6) que fue inyectado con la construcción pCDNA3-L1 , lo cual indica que el gen clonado en el vector de expresión en eucariotes regulado por el promotor de citomegalovirus , se transcribió y expreso el gen que codifica para la proteína L1 de HPV-16 , la cual fue reconocida por el anticuerpo monoclonal anti-L1 HPV-16 [FIG.20 a y b] .

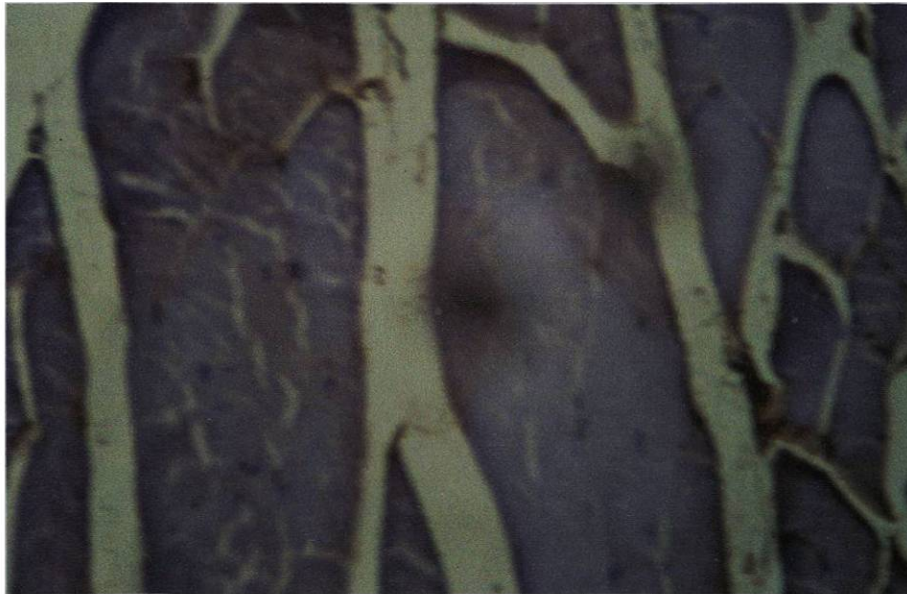


Fig.19a.- Inmunohistoquímica de la inyección de 100 µg de pCDNA3 en tejido muscular



Fig.19b.- Inmunohistoquímica de la inyección de 100 μ g de pCDNA3 en tejido muscular

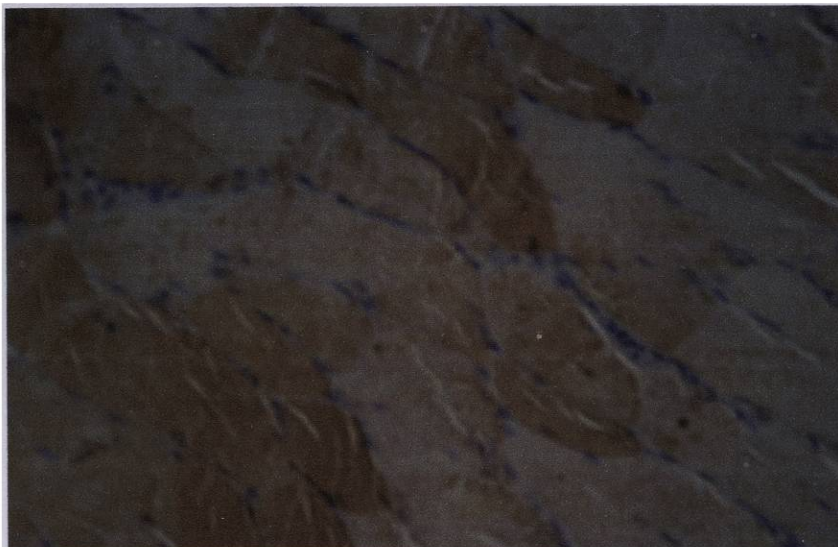


Fig. 20a.- Detección con anti-L1 HPV-16 (CHEMICON) de la Expresión de la proteína L1 a los siete días después de la inyección con la construcción pCDNA3-L1 en el músculo anterior de la tibia.



Fig. 20b.- Detección con anti-L1 HPV-16 (CHEMICON) la Expresión de la proteína L1 a los siete días después de la inyección con la construcción pCDNA3-L1 en el músculo anterior de la tibia.

Expresión de la GFP en tracto genital. La expresión de la GFP en el tracto genital observamos mayor expresión al 3 día postinoculación, encontrando disminución de la expresión al 7 y 10 día . Donde se encontró que al tercer día fue el punto maximo de expresión y fue disminuyendo la expresión genica de la GFP gradualmente al 7 y 10 día postinyección (figura 21a, A,B,C). Tambien se encontró expresión de la GFP aparte de la vagina , en la vulva ,el utero y en las vellosidades, pero esta expresión solo se encontró al 3 y 7 día postinoculación (figura 21b ,A,B,C).

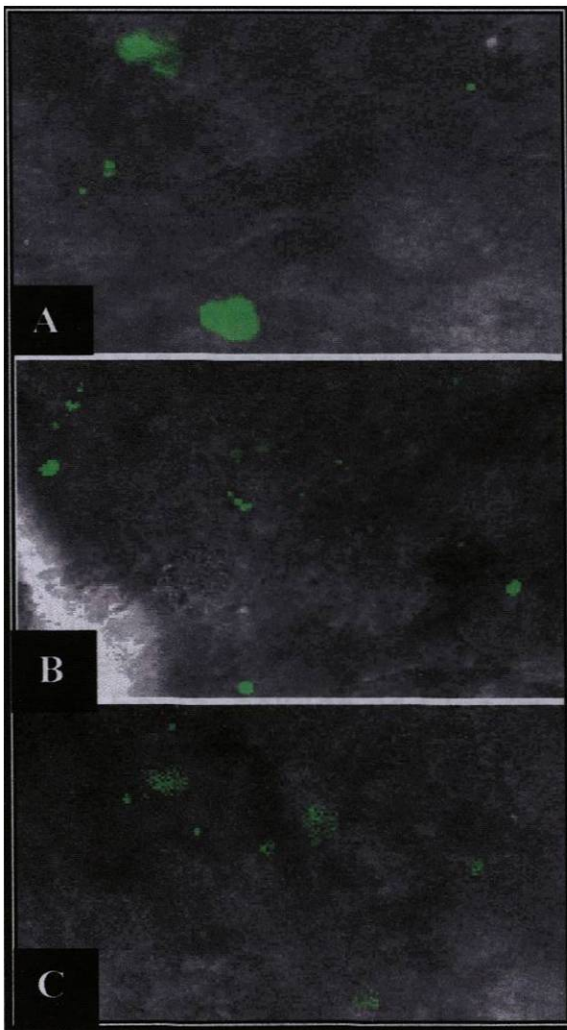


Fig. 21a . Análisis de la expresión de la GFP *in vivo* en vagina. A) 3er. Día postinoculación, 20X. B) 7mo. Día postinoculación, 10X . C) 10 día postinoculación. 20X.

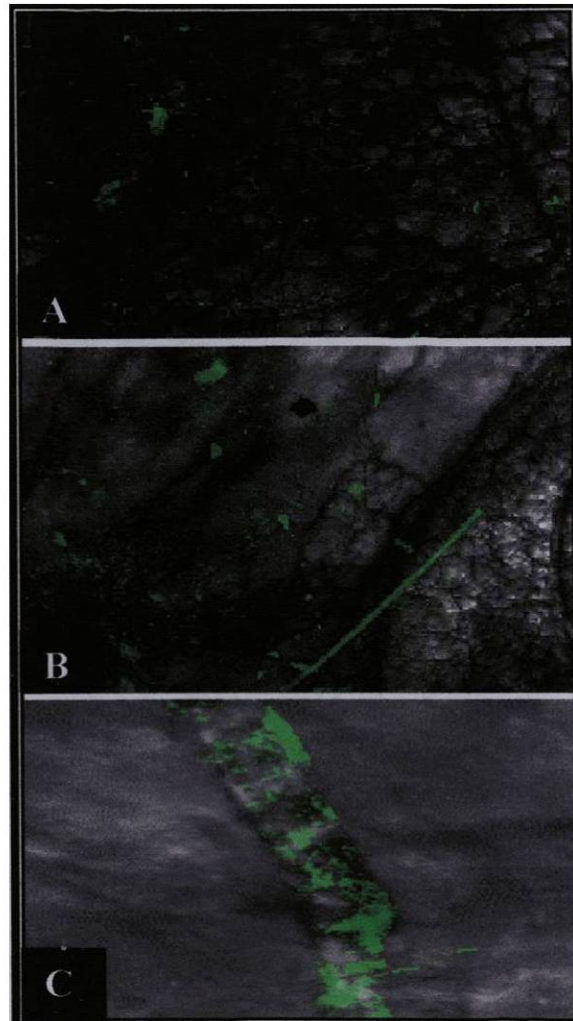


Fig. 21b . Análisis de la expresión de la GFP *in vivo* en vulva, utero y vellosidades. A) Expresión de la GFP al 3er. Día postinoculación en la vulva.10X B) Expresión de la GFP al 3er. Día postinoculación en el utero. C) Expresión de la GFP al 7mo. Día postinoculación en las microvellosidades.

DISCUSIONES

En salud pública el cáncer constituye un problema de salud pública. En nuestro país constituyó la segunda causa de muerte en el año de 1995, con 48,222 decesos, el 11.2% del total de muertes. El CaCU es la enfermedad neoplásica más frecuente en la población femenina de los países subdesarrollados . A nivel mundial el CaCU ocupa el segundo lugar como causa de muerte por neoplasias, superado solo por el carcinoma mamario . Según la Organización Mundial de la Salud cada año se registran al menos 450000 casos de los cuales cerca del 45 por ciento fallece. El virus del papiloma humano es considerado el principal agente causal de esta neoplasia , siendo el tipo 16 y 18 los mas frecuentes en neoplasias de cervix.

Existen varias técnicas para detectar la presencia del HPV en tejidos o en células. Estos métodos varían en cuanto a su sensibilidad y especificidad. Así, tenemos que durante mucho tiempo el único método utilizado para detectar HPV, era el estudio histológico de células de cervix con tinción de Papanicolaou. Con esta técnica se pueden observar los cambios propios de las células infectadas por HPV. Estas células son los llamados coilocitos . Este método tiene la desventaja de que solamente detecta infecciones activas y con gran producción de virus. Otro método también utilizado es la detección de antígenos vírales por medio de la técnica de la inmunohistoquímica, la cual también detecta solamente infecciones activas y no las infecciones latentes, aunque es mucho más específica que la anterior ya que se utilizan anticuerpos específicos contra antígenos de HPV .

Con el avance tecnológico de la biología molecular, se han desarrollado técnicas que han hecho posible el diagnostico más específico y mucho más sensible, en etapas tempranas de la infección. La más utilizada es la hibridación, mediante la cual se detecta el DNA viral que se encuentra en la célula huésped por medio de un DNA complementario marcado. Esta técnica supera por mucho la especificidad y sensibilidad del diagnostico realizado por citología o

por inmunohistoquímica . Así como también la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica con gran especificidad.

Sin embargo recientemente muchos grupos de investigadores han producido VLP's de HPV-1 y HPV-11 en sistemas de expresión usando levaduras ,vaccinia virus, baculovirus y virus de semliki forest. Estas cápsides producidas "*in vitro*" parecen tener una estructura idéntica a la de los viriones auténticos, lo cual ha sido determinado por microscopia electrónica . La inmunización de ratones con vaccinia virus recombinantes y/o VLP de HPV-16 genera inmunoglobulinas IgG, IgM, , y IgA, estos datos sugieren que las VLP pueden sustituirse por viriones nativos . Existen los suficientes datos experimentales que muestran que las VLP's formadas por proteínas de la cápside L1 y L2 de papilomavirus usadas como antígenos vacunales son efectivas en producir una inmunidad sistémica y en mucosas que confiere protección a las lesiones inducidas por papilomavirus infecciosos.

Una nueva estrategia para producir inmunidad específica en mucosas contra las proteínas de la cápside viral de papilomavirus radica en la inyección de plásmidos que controlan la expresión de proteínas heterólogas en el sitio de la inoculación , esta estrategia ha recibido el nombre de "Inmunización con DNA" y ha demostrado que induce protección contra las lesiones inducidas por papilomavirus, esta estrategia ofrece la posibilidad de desarrollar una vacuna polivalente combinando el DNA que codifica para las proteínas de la cápside viral L1 y L2 de varios genotipos de HPV.

Por lo tanto este trabajo esta encaminado a detectar en líneas celulares el gen L1 amplificarlo por PCR y clonarlo y expresar el gen para detectar posteriormente el transgen L1 en sistemas "*in vivo*" e in "*vitro*". En la cual primeramente se extrajo DNA genómico de la línea celular SiHa para posteriormente utilizarlo como templado para amplificar el gen L1 (1517 pb) con primers específicos mediante un gradiente de amplificación con las temperaturas 58,60,62,65,66°C, en la cual todas la temperaturas amplificaron pero la temperatura de 65°C fue la temperatura en la cual encontramos menos inespecificidades el producto de amplificación como resultado de la reacción de PCR es de 1517 pb, este producto de PCR el gen L1 HPV-16 fue clonado en un vector de clonación de productos de PCR (pGEMT-Easy Vector

promega) en el cual se llevo a cabo la ligación de vector e inserto (L1) y se transformo en células competentes de *E. coli*, se seleccionaron las colonias positivas que interrumpieron el marco de lectura del gen de β -Galactosidasa . Se realizo extracción de plásmido de las cepas positivas de la construcción pGEMT-L1 para hacer digestión con la enzima Apa I para liberar y comprobar la inserción del gen L1 en el vector pGEMT (PROMEGA) el producto de la digestión es de 1530 pb . De esta construcción se extrajo el gen L1 con la enzimas de restricción Not I - Apa I para posteriormente subclonarlo en un vector de expresión en eucariotas (pCDNA3) ya que contiene un promotor de citomegalovirus , ya realizada la construcción en pCDNA3 se obtiene el gen L1 con los sitios Hind III - ApaI y se subclona en el vector pEGFP-C1 con los sitios Hind III - ApaI ,este vector también contiene promotor de citomegalovirus para regular la expresión en eucariotes pero este posee un gen reportero que codifica para la GFP . Para comprobar si el gen L1 de las construcciones de pCDNA3-L1 y pEGFP-C1-L1 , estaba en relación 5'- 3' en cuanto al promotor de CMV se caracterizo el gen L1 con la enzima EcoRI ,el cual el producto de la digestión de ambas construcciones es de 1300 pb . La construcción pEGFP -C1 se transfecto con LIPOFECTAMINE (GIBCO BRL) en la línea celular MK-16 para observar la expresión de la GFP "*in vitro*" la cual iba fusionada al gen L1 HPV-16 en la cual analizamos la expresión de la GFP como gen reportero a las 48,72 y 96 horas después de la transfección ,en la cual encontramos una expresión transitoria mayor a las 72 horas.

Nuestro experimento realizado *in vivo* se estandarizó mediante la inyección de un plásmido con promotor de citomegalovirus y como gen reportero del gen de la Luciferasa donde encontramos mayor expresión de la luciferasa a los siete días inyectando (100 μ g de plásmido) al ratón C57BL/6 , el cual coincide este resultado haciéndose similar a lo reportado por (Wolf ,J. et al ,1990) en su experimento en la cual inyecto 100 μ g pero a el ratón de la línea BALB/c ,observando la mayor expresión de la proteína al séptimo día, asi mismo, también coincidió con lo reportado por (Raz et al ,1997) en la que observo que al inyectar 100ug de la nucleoproteína de influenza A encontró anticuerpos contra nucleoproteína y el transcrito de la nucleoproteína lo detecto a los siete días. Nuestros resultados finales obtenidos se asemejan por lo tanto a los resultados obtenidos en laboratorio donde se estandarizo la expresión de proteínas *in vivo* en

el modelo de ratón C57BL/6 inyectando 100µg de plásmido, midiendo la expresión del gen de la luciferasa como gen reportero, así también como la similitud de los resultados obtenidos por lo reportado, en cuanto al tiempo en la cual se determino la identificación del transcrito y la expresión de la luciferasa en la línea de ratón BALB/c. Por lo tanto la construcción pCDNA3-L1 (100 µg) que fue inyectada al músculo anterior de la tibia del ratón C57BL/6 , para determinar si el plásmido desnudo se transcribía, se detectó por RT-PCR la identificación del transgen L1 al séptimo día después de la transfección, encontrándose así el mensaje que codifica para la proteína de la cápside L1 de HPV-16. En músculo de ratón de la línea C57BL/6 inyectado con la construcción pCDNA3-L1 se encontró al séptimo día por medio de la técnica de inmunohistoquímica la especificidad del anticuerpo monoclonal anti-L1 HPV-16 (Chemicon) para reconocer la proteína L1 expresada en músculo. La expresión en el músculo de la proteína L1 de HPV 16 medida por la expresión del transcrito y la presencia de la proteína en el tejido indican que el vector generado en el presente trabajo puede ser utilizado inducir inmunidad contra esta proteína de HPV 16. Así también encontramos una mayor expresión de la GFP en el experimento en la cual se inoculo via intravaginal en el modelo murino Balb/c con la construcción pEGFP-C1-L1 la cual tiene el gen que codifica para la GFP y el gen L1, donde se encontro expresión del gen reportero utilizando DNA desnudo. En esta primera etapa hemos clonado y expresado el gene L1 *in vivo* y construido un vector de DNA que nos permitirá desarrollar una estrategia experimental de inmunización basada en este vector con el objetivo de inducir anticuerpos neutralizantes que puedan bloquear las infecciones producidas por HPV 16 en el epitelio cervical.

CONCLUSIONES

Los datos mas relevantes derivados de los experimentos realizados en este trabajo nos permiten concluir lo siguiente:

1.- Se amplifico el gen L1 apartir de la línea celular *Siha* con oligonucleotidos específicos mediante la estandarización de la técnica de PCR.

2.- Se logro clonar el producto de PCR (gen L1) en el vector pGEMT-Easy Vector.

3.- Se subclono el gen L1 a los vectores de expresión en eucariotes pCDNA3 y pEGFP-C1.

4.-Se observo la expresión transitoria "*in vitro*" de la proteína verde fluorescente en la línea celular MK-16, que esta transformada con HPV16.

5.-Se identificó el mensaje del gen L1 generado por la inyección del vector pCDNA3-L1 en el musculo del raton, por medio de la técnica de RT-PCR.

6.- Se identificó la expresión de la proteína L1 de HPV-16 en el músculo por medio de anticuerpos monoclonales dirigidos hacia la proteína L1 HPV-16 mediante la técnica de Inmunohistoquímica. Así también se logro expresar la proteína verde fluorescente como gen reportero en el tracto genital utilizando DNA desnudo.

7.- En esta primera etapa hemos clonado y expresado el gene L1 y construido un vector que nos permitirá desarrollar una estrategia experimental de inmunización basada en este vectores de DNA con el objetivo de desarrollar una vacuna profilactica e inducir anticuerpos neutralizantes que puedan bloquear las infecciones producidas por HPV-16 en el epitelio cervical.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Schiffman, M.H., H.M. Bauer, R.N. Hoover, A.G. Glass, D.M. Cadell, B.B. Rush, D.R. Scott, M.E. Sherman, R.J. Kurman, S. Wacholder, et. al. 1983. Epidemiological evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia J. Natl. Cancer Inst. 85:958-964.
- [2] Broker TR, Botchan M. 1986 Papillomaviruses: retrospectives and prospectives. Cancer cell :42 ;4:17
- [3] Cox, M.F., C.A. Meanwell, N.J. Maitland, G. Blackledge. C. Scully and J.A. Jordan. 1986 Human papillomavirus type-16 homologous DNA in normal human ectocervix. Lancet. 2:157-158.
- [4] Gariglio, P. Rangel L.M. 1992. Virus y Cancer. Salud Publica de México mayo-junio.34:308-317.
- [5] Cisneros M.T. Espinoza R. Pineda BE. 1987. Mortalidad por cáncer de la mujer mexicana. Salud Publica de México.29:299-312.
- [6] Brinton LA. Current epidemiological studies-emerging hypotheses. En: Peto R, Howley PM, ed. 1986. Viral etiology of cervical cancer. New York: Cold Spring Harbor Laboratory,. (2), p.200-204.
- [7] Werness BA, AJ Levine and PM Howley. 1990. Association of human papillomavirus type 16 and 18 E6 proteins with p53. Science. 248:76-79.
- [8] Nelson JH, Averette HE, Richart RM. 1984. Dysplasia, carcinoma in situ, and early invasive cervical carcinoma. Cancer J Clin.34:306-315.
- [9] Hines jf, Ghim SJ, Schlegel R, Jenson B. 1995. Prospects for a vaccine against human papillomavirus. Obstet Gyecol.86:860-866.
- [10] Nindl I, Benitez-Bribiesca L, Berumen J, Farmanara N, Fisher S, Gross G L et al. 1994. Antibodies against linear and conformational epitopes of the human papillomavirus (VPH) type 16 E6 and E7 oncoproteins in sera of cervical cancer patients. Arch Virol .137:341-353.

- [11] Sasagawa T., Yamazaki H. 1998. Immunoglobulin-A and -G Responses Against virus-like particles(VLP) of human papillomavirus type 16 in women with cervical cancer intra-epithelial lesions. *Int. J. Cancer.* 75: 529-535.
- [12] Hagensee, ME. 1993. Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins. *J. Virol.* 67.No.1. :315-322.
- [13] Haefliger D. Roden R. Beyancoub J. 1997. Human Papillomavirus Type Virus-Like Particles Expressed in Attenuated *Salmonella typhimurium* Elicit Mucosal and Systemic Neutralizing Antibodies in Mice. *Infection and Immunity.* pp. 3328-3336.
- [14] Matsumoto et al. 2000. Vaccination of Mice with Plasmid Expressing Human Papillomavirus 6 Major Capsid Protein L1 Elicits Type- Specific Antibodies Neutralizing Pseudovirions Constructed in vitro .. *J. Medical Virology.* 60 (2), p.200-204.
- [15] Wolff, J.A. Malone, R.W. 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247, 1645- 1653.
- [16] Raz, E, Carson, D.A. 1994. Intramuscular gene immunization : the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 91, 9519-9526.
- [17] Tang DC, Devit M. 1992. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* . 356 : 152-154.
- [18] Muñoz NL, Crawford P, Coursaget P. 1995 HPV vaccine and their potential use in the prevention and treatment of cervical displasia papillomavirus. *Reproduction.* 6:54-55.
- [19] Clark WH. 1995. The nature of cancer: Morphogenesis and progressive (self)-disorganization in neoplastic development and progression. *Acta Oncol.* 34:3-21.
- [20] Morin C, Braun L, Casas-Cordero, M. Shah, K.V. Roy, M. Fortier, M. Meisels, A. 1981. Confirmation of the papillomavirus etiology of condylomatous cervix lesions by the preoxidase-antiperoxidase technique. *J. Natl. Cancer Inst.* 66:831.
- [21] A. Garcia, P.V. Gariglio. 1993. Aspectos moleculares de los papillomavirus humanos y su relación con el cáncer cérvico-terino. *Rev Inv. Clin.* 45:85-92
- [22] Reid R MD, Campion MJ. 1989. The biology and significance of human papillomavirus infection in the genital tract. *Yale J Biol Med.* 61:307-325

- [23] Reeves WC, Rawls. Brinton LA. 1989. Epidemiology of genital papillomavirus and cervical cancer.. Rev Infect Dis;3:426-439.
- [24] Durst M, Croce CM, Gissmann L, Scharz E, Huebner K. 1987. Papillomavirus sequences integrate near cellular oncogenes in some carcinomas. Proc Natl Acad Sci USA.84 :1070-1074.
- [25] Campion MJ. 1987. Manifestaciones clínicas y evolución de la infección humana por papillomavirus. Clin N A Ginecol Obstet..2:263-288.
- [26] Pater MM; Mittal R, Pater A. 1994 . Role of steroid hormones in potentiating transformation of cervical cells by human papillomaviruses. Trends microbiol . ; 2 ,79 : 229-234.
- [27] Terris M, Wilson F, Smith H, Sprung E, Nelson JH Jr. 1967. The relationship coitus ta carcinoma of the cervix. Am J Public Health. 57:840-845.
- [28] Meanwell CA. 1988 The epidemiology of human papillomavirus infection in relation to cervical cancer. Cancer Surveys. 7: 481-497.
- [29] Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A. 1985. Structure and transcription of human papillovirus sequences in cervical carcinoma cells. Nature. .314 :111-114.
- [30] Shah KV. 1896. Papovaviridae: Clinical Virology Manual Steven Specter, Gerald J Lancz edit. USA Edit Elsevier. 1896 :373-386.
- [31] Coggin Jr. zur Hausen. 1979. Worshop on papillomavirus and cancer. Cancer Research.39 :545-547.
- [32] Zur Hausen H, Schneider A. 1987 .The role or papillomavirus in human anogenital cancer. En: Salzman NP, Howley PM, ed The Papovaviridae. Nueva York: Plenum Press:254-263.
- [33] Herrington CS. 1994 .Human papillomavirus and cervical neoplasia. I. Clasification, virology, pathology, and epidemiology. J. Clin. Pathol .47 : 1066-1072.
- [34] Howley PM. 1990. Papillomavidae and their replication. Fields BN ed. Virology second ed. New York. Raven Press.1625-1650.
- [35] DiPaolo JD, Popescu N, Alvarez L, Woodeorth C. 1993. Cellular and molecular alterations in human epithelial cell transformed by recombinant human papillomavirus DNA. Crit Rev Oncog.4:337-360.
- [36] Gius D Grossman S Bedell MA, Laimins L .1988 .Inducible and constitutive enhancer domains in the noncoding region of human papillomavirus type 18.J Virol. 62: 665-62.

- [37] Howley PM. 1990 .Papillomaviridae and their replication. :Fields BN ed. Virology second ed. New york. Raven Press.1625-1650.
- [38] reid R MD,campion MJ, 1989. The biology and significance of human papillomavirus infection in the genital tract. Yale J Biol Med . 61 :61:307-325.
- [39] Mallon RG, Wojciechewicz D, Defendi V. 1987. DNA-Binding activity of papillomavirus proteins. J Virol.61:1655-1660.
- [40] Schwarz E, Freese VK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A et al. 1987. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cell. Nature.314:111-114.
- [41] Smotkin D, Wettstein FO. 1986 .Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and cancer-derived cell line and identification the E7 protein. Proc Natl Acad Sci USA. 83 :4680-4684.
- [42] Koss L. 1986. Sequence of events in carcinogenesis of the uterine cervix. En: Peto R, Howley PM, ed. Viral etiology of cervical cancer. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. p.488-489.
- [43] Durst, M. L. Gissmann, H. Ikenberg, and H.A. Zur Hausen. 1983. Papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA .80:3812-3815.
- [44] Durst M, Kleinheinz A, Hotz M, Gissmann L. 1986. The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumors. J Gen Virol .66:1515-1522.
- [45] Durst M, Schwarz E, Gissman L. 1986. Integration and persistence of human papillomavirus DNA in genital tumors. En: Peto R, Howley PM, ed. Viral etiology of cervical cancer. New York: Cold Spring Harbor Laboratory,. p.499-504.
- [46] Lazcano-Ponce E, Rascon-Pacheco, Lozano-Ascencio R, Velasco E. 1996. Mortality from carcinoma of the uterine cervix in México: impact of screening 1980-1990. Acta Cytol ;40:506.
- [47] Rose PG, Baker S, Fournier L, Nelson BE. 1993. Serum squamous cell carcinoma antigen levels in invasive cervical cancer: Prediction of response and recurrence. Am J Obstet Gynecol .168:942-946.
- [48] A. García, P.V. Gariglio. 1993 .Aspectos moleculares de los papilomavirus humanos y su relación con el cancer cervico - uterino. Rev Inv, Clin 1993: 45 : 85-92.

- [49] Chow L, Hirochika H, Nasser M, Stoler M, Wolinsk S, Chin m et al. 1987. Human papillomavirus gene expression in papillomaviruses. *Cancer Cells*. ; 5: 55-72
- [50] Alvarez L, Lopez E. 1995. Regulación genética de los papilomavirus humanos genitales. *Rev. Salud Pública*. 37 :240-247.
- [51] Tan SH, Gloss B, Bernard HU. 1992 . During negative regulation of human papillomavirus-16 E6 promoter, the viral E2 protein can displace Sp1 from proximal promoter element. *Nucleic Acids Res* .20 : 251-256.
- [52] Mittal R, Tsutsumi K, Pater A, Pater M. 1993. Human papillomavirus type 16 expression in cervical keratinocytes : role of progesterone and glucocorticoid hormones. *Obstet Gynecol*. 81 : 12-15.
- [53] Nindl I, Benitez-Bribiesca L, Berumen J, Farmanara N, Fisher S, Gross G L et al. 1994. Antibodies against linear and conformational epitopes of the human papillomavirus (VPH) type 16 E6 and E7 oncoproteins in sera of cervical cancer patients. *Arch Virol* .137:341-353.
- [54] Kirnbauer R, Chandrachud LM, O'Neil BW, Wagner ER, Grindlay GJ, Armstrong AA et al. 1996. Virus-like particles of bovine papillomavirus type 4 in prophylactic and therapeutic immunization. *Virology* .219:37-44.
- [55] White, W. Wilson, S. 1999. Characterization of a Major Neutralizing Epitope on Human Papillomavirus Type 16 L1. *J of Virology*. 73(6); p.4882-489.
- [56] Luxton C, Rose R, Coletart T. 1997. Serological and T-helper cell responses to human papillomavirus type 16 L1 in women with cervical dysplasia or cervical carcinoma and in healthy controls. *J Gen. Virol*. 78 ; 917-923
- [57] Muller M, Viscidi RP, Sun Y, Guerrero E, Hill PM, Shah F et al. 1992. Antibodies to VPH-16 E6 and E7 proteins as markers for VPH-16 associated invasive cervical cancer. *J Virology* .187:508-514.
- [58] Ghosh AK, Smith NK, Stacey SN, Glew SS, Connor ME, Arrand JR et al. 1993. Serological response to HPV-16 in cervical dysplasia and neoplasia: Correlation of antibodies to E6 with cervical cancer. *Int J Cancer*. 53:591-596.
- [59] Viscidi RP, Sun Y, Tsuzaki B, Bosch FX, Muñoz N, Shah KV. 1993. Serologic response in human papillomavirus-associated invasive cervical cancer. *Int J Cancer*. 55:780-784.
- [60] Dillner J. 1993. Disappearance of antibodies to HPV-16 E7 after treatment for cervical cancer. *Lancet* . 341:1594.

- [61] Suzich JA, Ghim SJ, Palmer-Hill, White WI, Tamura JK, Bell JA et al. 1995. Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.*92:11553-11557.
- [62] Yamada T, Wheeler CM, Halpern AL, Stewart ACM, Hildesheim A, Jenison SA. 1995. Human papillomavirus-16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments. *J Virol.*69:7743-7753.
- [63] Cheng G, Icenogle JP, Kirnbauer R, Hubbert NL, St Louis ME, Han CL et al. 1995. Divergent human papillomavirus type 16 variants serologically cross-reactive. *J Infect Dis.*172:1584-1587.
- [64] Nonnenmacher B, Hubbert NL, Kirnbauer R, Shah KV, Muñoz N, Bosch FX et al. 1995. Serologic response to human papillomavirus-16 virus-like particles in HPV-16+ invasive cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia grade III patients and controls from Colombia and Spain. *J Infect Dis.*172:19-24.
- [65] Abbas KA, Lichtman HA, Pober SJ. 1991. Cellular and molecular immunology. 2a. edición. Filadelfia: W.B. Sanders. pp.231-234.
- [66] Crowley-Nowick P, Bell MC, Bull R, Edwards RP, Partridge EE. 1993. Cytokine expression by T cells isolated from cervical intraepithelial neoplasia lesions. 12th. International Papillomavirus Conference; septiembre 20-30; Baltimore (MD); Abstracts Book: 7.
- [67] Tzzy-Chou W. 1994. Immunology of the human papillomavirus in relation to cancer. *Curr Opin Immunol.*6:746-754.
- [68] Topalian SL. 1994. MHC class II restricted tumor antigens and the role of CD4+ T cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol.*6:741-745.
- [69] Galloway, D. 1998. Is vaccination against human papillomavirus a possibility. *Lancet.* 351 ; 22-28
- [70] Dupuy C, Buzoni-Gatel D. 1996. Cell mediated immunity induced in mice by HPV 16 L1 virus-like particles. *Microbial Pathogenesis.*22:219-225.
- [71] Rose C., Lane Ch., Wilson S. 1999. Oral vaccination of mice with human papillomavirus virus-like particles induces systemic virus-neutralizing antibodies. *Vaccine.* 17 : 2129-2135.
- [72] Da Silva D, Velders MP., Rudolf M. 1999. Papillomavirus virus-like particles as anticancer vaccines. *Mol. Therapeutics.* 1.(1): 82-87.

- [73] Christensen ND, Kreider JW, Kan NC, DiAngelo SL. 1991. The open reading frame L2 of cottontail rabbit Papillomavirus contains antibody-inducing neutralizing epitopes. *Virology*.181:572-579.
- [74] Hagensee M, Galloway D. 1993. Growing human papillomaviruses and virus like particles in the laboratory. *Virology*.4:121-124.
- [75] Hofmann KJ, Neeper MP, Markus HZ, Brown DR, Müller M, Jansen KU. 1996. Sequence conservation with the major capsid protein of human papillomavirus (HPV) type 18 and formation of hpv-18 virus-like particles in *Sacharomyces cerevisiae*. *J Gen Virol*.77:465-468.
- [76] Heino P, Diller J, Schwartz S. 1995. Human papillomavirus type 16 capsid proteins produced from recombinant Semliki forest virus assemble into virus like particle. *Virology* .214:349-359.
- [77] Hagensee ME, Yaegashi N, Galloway DA et al. 1993. Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid protein. *J Virol*.67:315- 322.
- [78] Ruffin MT, Ogaily MS, Johnston CM, Gregoire L, Lancaster WD, Br ener DE. 1995. Surrogate endpoint biomarkers for cervical cancer chemoprevention trials. *J Cell Biochem*.23:113-124.

