

**PURIFICACIÓN DE VLPs DE DIFERENTES TIPOS DEL VIRUS DEL
PAPILOMA HUMANO (VPH) OBTENIDOS A PARTIR DEL SISTEMA
BACULOVIRUS PARA ESTUDIOS DE SEROPREVALENCIA EN SUEROS**

JUAN DIEGO LIÉVANO RUIZ

**UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
MEDELLIN
2006**

**PURIFICACIÓN DE VLPs DE DIFERENTES TIPOS DEL VIRUS DEL
PAPILOMA HUMANO (VPH) OBTENIDOS A PARTIR DEL SISTEMA
BACULOVIRUS PARA ESTUDIOS DE SEROPREVALENCIA EN SUEROS**

JUAN DIEGO LIÉVANO RUIZ

Trabajo de Grado para optar al Título Biólogo

ASESORES

GLORIA INES SANCHEZ VASQUEZ, M.Sc, PhD

Grupo de infección y cancer

ALBA LUCIA COMBITA M.Sc, PhD

Grupo de Investigación en Biología del Cáncer

Instituto Nacional de Cancerología

**UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
MEDELLIN**

2006

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN	5-6
2. INTRODUCCIÓN	7-16
2.1. Virus del Papiloma Humano	
2.2. Taxonomía	
2.3. Estructura del genoma.	
2.3.3. Región tardía y proteínas estructurales	
2.4. Cápside viral	
2.5. Ciclo viral	
2.6. Lesiones asociadas a VPH	
2.7. VPH y cáncer de cuello uterino	
2.8. Vacunas contra VPH	
2.8.1. Estudios epidemiológicos de la respuesta inmune a VLP en infección por VPH	
2.8.2. Importancia de anticuerpos anti-cápside viral	
3. OBJETIVO	17
3.1. OBJETIVO GENERAL	
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18-22
4.1. Descripción del área	
4.2. Cultivo de células	
4.3. Infección de células con Baculovirus recombinantes	
4.4. Purificación de VLPs	
4.5. Cuantificación de VLPs	
4.6. Verificación de los clones recombinantes para cada tipo de VLP	
5. RESULTADOS.....	23-27
5.1. Cultivo de células	
5.2. Verificación de los clones recombinantes	

5.3. Infección de células con Baculovirus recombinantes	
5.4. Purificación de VLPs	
5.5. Cuantificación de VLPs	
5.6. Antigenicidad de las diferentes VLPs	
6. DISCUSIÓN.....	28-30
7. CONCLUSIONES.....	31
8. BIBLIOGRAFIA.....	32-39

1. RESUMEN

El cáncer cervical representa la primera causa de muerte en mujeres. Se estima que en el planeta mueren anualmente por esta causa aproximadamente 250.000, de las cuales el 80% ocurren en países en vía de desarrollo. En Colombia, el cáncer de cuello uterino es la segunda causa de muerte en la población femenina, con una tasa de incidencia de aproximadamente 30,3/100.000 casos. Son muchas las causas que se asocian al desarrollo del cáncer cervical, pero las evidencias indican que los Virus de Papiloma Humano (VPH) constituyen el factor etiológico más importante tanto para la aparición de lesiones premalignas en el cérvix como para su progresión a cáncer.

Los países desarrollados han logrado disminuir las tasas de mortalidad de cáncer de cuello uterino, debido a la implementación de programas de tamizaje efectivos; sin embargo en los países en desarrollo, estos programas no han logrado un impacto en el control de esta enfermedad. Estas limitaciones y el hecho que el VPH produce una infección de transmisión sexual de difícil control, han promovido la investigación de medidas preventivas primarias tales como el desarrollo de vacunas profilácticas. En 1.992 se reportó por primera vez que la clonación y expresión del gen L1 que resulta en el ensamble de una estructura similar a la cápside viral pero sin contenido genómico que se denominó VLP (Virus Like-Particles o partículas similares a virus), han sido los candidatos a vacunas más evaluados ya que presentan un gran potencial inmunogénico y antigénico.

Por lo anterior el presente trabajo tiene como objetivo la producción de dichas VLPs de los tipos de VPH más prevalentes en Colombia y que están asociados principalmente al cáncer de cuello uterino. Estas VLPs se produjeron a partir de

Baculovirus recombinantes que contenían los genes L1 codificantes para la proteína de la capsida viral. Una vez expresado dicho gen, las proteínas se ensamblan a si mismas en dichas partículas tipo viral (VLPs) inmunológica y morfológicamente similares a los virus.

Como resultados se obtuvieron VLPs de los genotipos 16 y 18 del Virus del papiloma Humano para ser utilizados posteriormente en un estudio de seroprevalencia de VPH en sueros de hombres y mujeres Colombianas.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Virus del papiloma humano (VPH)

Los VPH son un grupo heterogéneo de virus epiteliotrópicos presentes en piel y mucosa, son considerados los agentes etiológicos de casi el 100% de los carcinomas cérvico-uterinos, en el 100% de las verrugas genitales, vulgares y plantares y en la mayoría de los cánceres de piel. Además se han reportado invadiendo próstata, boca, laringe, esófago, colon, recto, región anal, uretra, vejiga y más recientemente en tejido hepático (1).

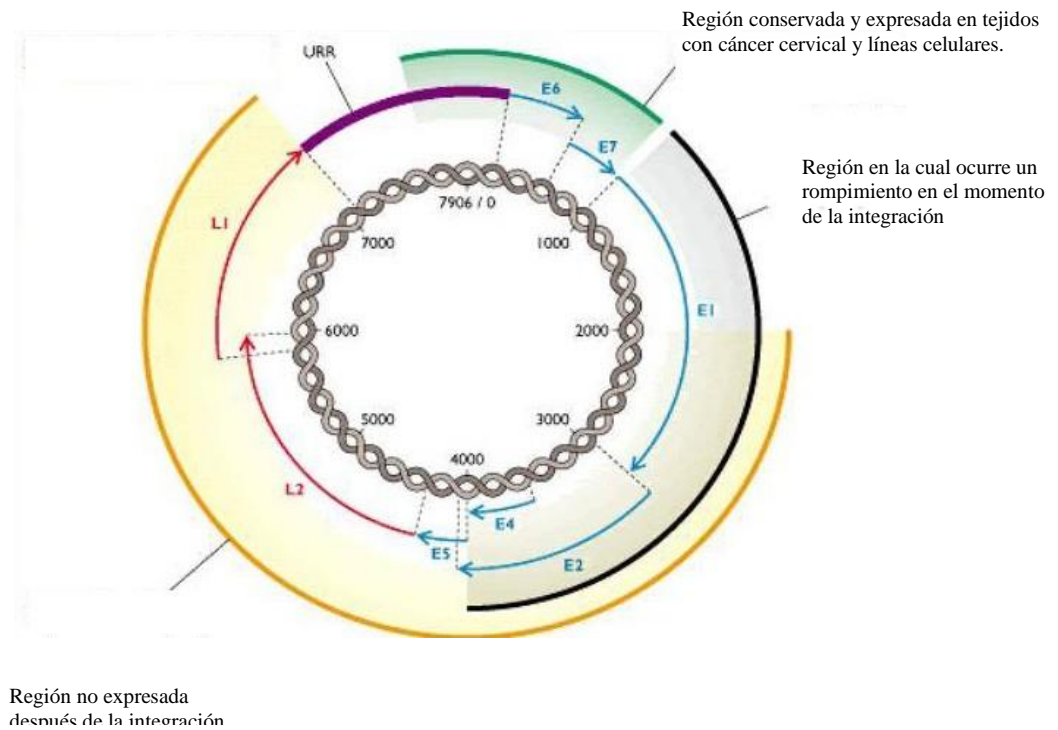
2.2 Taxonomía

Históricamente los papilomavirus habían sido agrupados con los poliomavirus en la familia de los *Papovaviridae*, recientemente esta familia se dividió en dos familias: los *Polyomaviridae* y los *Papillomaviridae* (2). Dentro de la familia *Papillomaviridae* se ha establecido la existencia de 18 géneros. Los papilomavirus humanos se encuentran ubicados en los géneros: Alfa-papillomavirus, Beta-papillomavirus, Gama-papillomavirus, Mu-papillomavirus y Nu-papillomavirus. Los papilomavirus que infectan otras especies están contenidos en los demás géneros.

2.3 Estructura del genoma

Los VPH son virus ADN desnudos, de doble cadena, que presentan una cápside con simetría icosaédrica con un diámetro de 50nm. El genoma de aproximadamente 8 Kb está constituido por tres regiones: Una región no codificante (NCR) que regula la expresión de las proteínas virales, una región temprana (E) que codifica proteínas implicadas en la replicación viral y la transformación celular y una región tardía (L) que codifica las proteínas de la cápside viral (3) (Fig. 1).

Figura 1. Diagrama del genoma del VHP 16. Las flechas azules indican los ORFs de la región E. Las flechas rojas indican los ORFs de la región L y la flecha morada indica el ORF de la LCR. (Tomado de <http://www.hospitalpractice.com.htm>).



2.3.1 La región larga de control

También llamada región no codificante (NCR) tiene un tamaño que oscila entre 800 y 1000 bp (10% del genoma) dependiendo del tipo de VPH, su secuencia nucleotídica es muy variable. Operacionalmente se define como la región comprendida entre la terminación del ORF L1 a la primera metionina del ORF E6 (4). Funcionalmente esta región se divide en dos dominios principales: Una región respondedora a E2 (RE2) regulada por la proteína E2, en esta región se localiza el punto de origen de replicación del ADN viral (ORI) y el

promotor temprano desde el cual se transcriben los oncogenes E6 y E7 y una segunda región denominada CE (del inglés *Cellular Enhancer*) la cual constituye un potenciador fuerte de la transcripción y es activado únicamente por factores transcripcionales celulares (5).

2.3.2 Región temprana y proteínas no estructurales

La región temprana constituye el 50% del genoma (~4.5 kb) y está formada por seis marcos de lectura abierta (del inglés *open reading frames*, ORF): E1, E2, E4, E5, E6 y E7.

2.3.3 Región tardía y proteínas estructurales

La región tardía esta formada por dos ORF, los cuales codifican las proteínas L1 y L2 de la cápside. La región L1 de aproximadamente 1525 pb codifica la proteína mayor de la cápside L1. Esta proteína, de 57 kDa, es altamente conservada entre los diferentes tipos de VPH y presenta la mayor capacidad antigénica. Actualmente, se conoce que la proteína L1 contiene sitios de localización nuclear, los cuales son indispensables para la encapsidación del genoma viral (6). El gen L2 codifica para la proteína menor de la cápside, esta proteína tiene un peso molecular de aproximadamente 49 a 60 kDa sin embargo, en geles de poliacrilamida migra con un peso aparente de 73 kD. La proteína L2 es altamente fosforilada y al igual que la proteína L1 posee dos sitios de unión al ADN (7).

2.4 Cápside viral

La cápside de los papilomavirus está formada por las proteínas L1 y L2 distribuidas en 72 capsómeros. Cada uno de los capsómeros contiene 5

moléculas de proteína L1. La proteína L2 se encuentra en una proporción menor (~12 o 36 moléculas) por cápside.

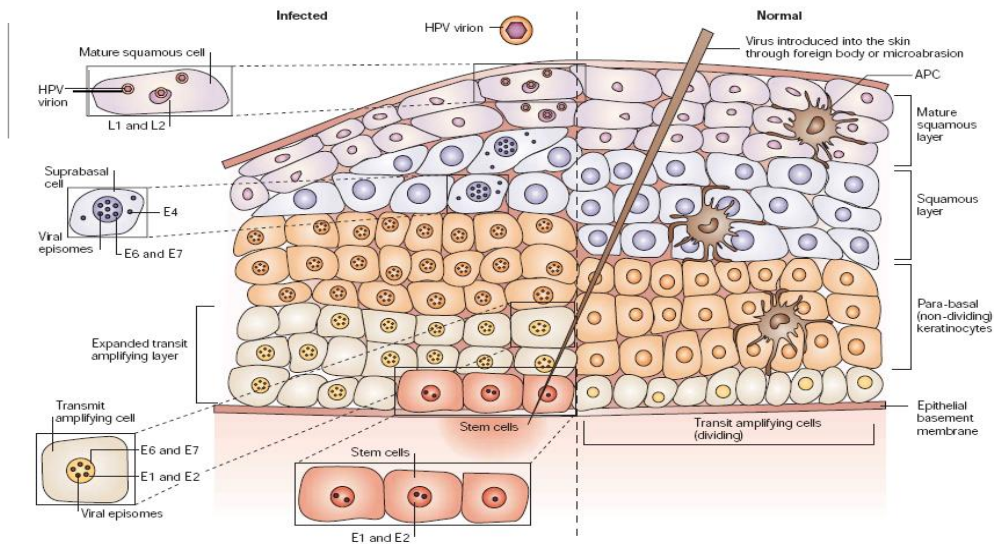
2.5 Ciclo viral

La replicación de los VPH está estrechamente correlacionada con la diferenciación celular (Fig. 2) (8). El ciclo viral se inicia cuando los VPH alcanzan la capa basal del epitelio gracias a microlesiones, la entrada del virus a la célula hospedera se realiza a través de la unión a un receptor presente en la superficie de las células.

Durante la primera etapa del ciclo viral, el ADN viral es mantenido en las capas basales del epitelio en la forma episomal (20 a 50 copias/celula) (9). Los genes de la región temprana son débilmente transcritos. A medida que avanza la diferenciación celular, la replicación viral se intensifica y se alcanza un número alto de copias/célula. Esta replicación está bajo el control de las proteínas E1 y E2. Las proteínas E6, E7 y probablemente E5 inducen la proliferación en células basales y parabasales. La segunda etapa de la replicación viral tiene lugar durante la diferenciación terminal de los keratinocitos y su migración hacia la superficie. La expresión de la proteína E4 y la síntesis de proteínas L1 y L2 tiene lugar en esta etapa (10).

La replicación viral interfiere con la diferenciación terminal de las células infectadas e induce un efecto citopatogénico que se manifiesta en múltiples formas, agregados citoplasmáticos, vacuolaciones perinucleares característicos de los coilocitos (11).

Figura 2. Ciclo viral asociado a la diferenciación celular. Tomado de Frazer I, 2004.



2.6 Lesiones asociadas a VPH

Los papilomavirus son responsables de una gran variedad de lesiones cutáneas y mucosas. La mayoría de los VPH están implicados en el desarrollo de lesiones benignas, sin embargo, algunos VPH están estrechamente relacionados con el desarrollo de tumores malignos.

Generalmente, la mayoría de las infecciones en mujeres jóvenes son transitorias y no producen síntomas, mientras que en mujeres de mayor edad estas infecciones suelen ser crónicas. La infección por VPH es detectada en 5% a 40% de mujeres asintomáticas en edad reproductiva, (12) y aún en algunos casos donde la infección conduce a lesiones escamocelulares de bajo grado es frecuente la regresión espontánea (13). Sólo una pequeña proporción

de las infecciones (10-15%) persisten y pueden progresar hacia lesiones de alto grado e incluso llevar a un cáncer invasivo (14).

2.7 VPH y cáncer de cuello uterino

El Virus del Papiloma Humano se ha convertido actualmente en una de las más comunes enfermedades de transmisión sexual en todo el mundo. Se estima que una de cien personas sexualmente activas tiene verrugas genitales y el 8% de mujeres jóvenes presentan anomalías en pruebas clínicas indicando infección con VPH (15). El factor de riesgo más asociado con dicha enfermedad es tener un alto número de compañeros sexuales (16, 17, 18, 19), Sin descartar que tener relaciones sexuales ocasionales también se asocia con mayor riesgo de infección por VPH en mujeres.(20)

Numerosos estudios epidemiológicos han demostrado una asociación etiológica entre los virus del papiloma humano (VPH) y el desarrollo del cáncer de cuello uterino. El ADN viral es detectado hasta en un 99.7% de las biopsias de cáncer de cuello uterino (21). El cáncer de cuello uterino es el segundo cáncer más prevalente en el mundo, con una incidencia que varía entre 10/100.000 en países desarrollados y 40/100.000 en países en vías de desarrollo (21). En Colombia es el cáncer más frecuente en la mujer en edad reproductiva y la primera causa de muerte por cáncer en mujeres, hecho que constituye un grave problema de salud pública.

Hasta hoy se han descrito más de 80 genotipos diferentes del virus y estos han sido divididos de acuerdo a si se asocian o no con el desarrollo del cáncer en dos grupos: de bajo riesgo (VPH 6 y 11 principalmente) que se encuentran en los condilomas genitales y que son detectados frecuentemente en lesiones benignas y los de alto riesgo (VPH 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 58, 59, etc) que

están implicados en el desarrollo de neoplasias del cuello uterino, faringe, ano, vulva, pene y cabeza y cuello (22, 23, 24).

2.8 Vacunas contra VPH

El descubrimiento de la capacidad de la proteína L1, expresada de manera recombinante, de autoensamblarse en forma de cápsides vacías que se asemejan a las cápsides virales auténticas (VLP del inglés *virus like particles*) (25) ha permitido grandes avances en el conocimiento de la respuesta inmune humoral hacia el VPH. Estas VLPs poseen características estructurales y antigénicas similares a las de los viriones naturales (26, 27, 28, 30), y son capaces de inducir niveles de anticuerpos neutralizantes comparables a los inducidos por los viriones auténticos (31).

Además, se ha visto que la co-expresión de las proteínas L1 y L2 conduce a la producción de VLP que contienen ambas proteínas en una proporción similar a la de los viriones auténticos (32). Actualmente, la producción de VLP reviste gran interés para el desarrollo de vacunas profilácticas,(25, 32).

2.8.1 Estudios epidemiológicos de la respuesta inmune a VLP en infección por VPH.

La mayoría de estudios seroepidemiológicos con cápsides virales se ha realizado con VLP de VPH16, algunos han incorporado VLP de 18 y 45 y en general, estos estudios se han enfocado en la asociación de la presencia de anticuerpos y el desarrollo de lesiones preneoplásicas y cáncer de cuello uterino.

Los resultados de la mayoría de estos estudios han mostrado una alta prevalencia de anticuerpos hacia VLP de VPH 16 entre mujeres positivas para ADN de VPH 16 (60%)(33, 34). También se observa alta prevalencia de estos anticuerpos en mujeres infectadas por otros tipos diferentes de VPH 16 (38.6%), y en mujeres no infectadas (5-20%) (35, 33, 36, 37) como reflejo de exposiciones pasadas (38, 39).

La cinética de la producción de anticuerpos contra las cápsides virales se ha dilucidado gracias a la disponibilidad de VLP. La seroconversión se observa concomitantemente o unos meses después de adquirida la infección (35). En 10 a 20 % de los individuos infectados los anticuerpos son detectados en el momento en el que el ADN es detectado o entre 1 y 3 meses después de detectada la infección.

La detección de anticuerpos anti-VLP también se asocia con la severidad de las lesiones. La prevalencia de anticuerpos anti-VLP de VPH 16 es aproximadamente del 30% en pacientes con lesiones de bajo grado, del 50% en pacientes con lesiones de alto grado, y del 50 al 80% en pacientes con cáncer (40, 41). No obstante, la detección de anticuerpos anti-VLP es menos sensible que la detección de ADN viral.

Aún no es claro si la respuesta inmune contra cápsides de VPH 16, que se da en la infección natural, pueda tener una implicación importante en el tamizaje de mujeres con riesgo de desarrollar cáncer de cuello uterino. Solamente mediante estudios de seguimiento de cohortes expuestas será posible establecer cual es el papel de los anticuerpos hacia las cápsides en la

persistencia de la infección viral, la incidencia de nuevas infecciones, y la aparición de lesiones preneoplásicas.

La habilidad de los anticuerpos patógeno específicos para prevenir las infecciones, es la base de muchas vacunas. Sin embargo el papel que podrían desempeñar los anticuerpos específicos de papilomavirus en el control de la infección natural ha sido poco estudiado.

2.8.2 Importancia de anticuerpos anti-cápside viral

Los ensayos de ELISA basados en VLP de tipos específicos pueden ser útiles en la identificación de mujeres con infecciones crónicas. El valor diagnóstico de los ensayos serológicos con VLP es limitado debido a que individuos que son negativos para la detección de ADN viral pueden resultar positivos para anticuerpos debido a infecciones adquiridas meses o años antes, de otro lado, debido a que la seroconversión es lenta, algunos individuos pueden permanecer negativos para anticuerpos a VLP varios meses después de haber resultado positivos para ADN viral.

La presencia de anticuerpos hacia VLP de VPH de alto riesgo es claramente un marcador de actividad sexual. A mayor número de compañeros sexuales se aprecia un incremento en la seroreactividad.(42) La seroprevalencia para VPH de alto riesgo en prostitutas es 10 a 14 veces más alta que la de la población general (43). La detección de anticuerpos hacia VLP de VPH es un marcador más reciente que la detección de ADN viral y puede usarse en estudios epidemiológicos para establecer o confirmar el papel de éstos virus en diferentes cánceres (44, 45).

La detección de anticuerpos Anti-VLP es una herramienta que permite confirmar el papel etiológico del papilomavirus en diferentes tipos de cáncer. El estudio de anticuerpos anti-VLP permite medir la prevalencia de la infección en una población dada, y estudiar riesgo asociado con infecciones repetidas en un mismo individuo. La presencia de anticuerpos anti-VLP en pacientes negativos para ADN viral se correlaciona con un número elevado de compañeros sexuales (46, 47, 43). Sin embargo, la presencia de anticuerpos anti-VLP en un porcentaje de mujeres vírgenes y en niños, sugiere que puede existir otro modo de transmisión aparte del sexual. Alternativamente, la reactividad observada en estos individuos puede ser debida a reactividad cruzada con papilomavirus cutáneos, o a la existencia de una infección por papilomavirus genital en la cavidad oral (48, 49).

Este trabajo tiene como objetivo la obtención y purificación de VLPs de los tipos de VPH de mayor prevalencia en Colombia y es la etapa preliminar del Proyecto **Predicting the HPV genotypes vaccines that have to be introduced in Colombia to prevent cervical Cancer** propuesto por el Grupo de Infección y Cáncer de la Universidad de Antioquia y aprobado por Colciencias que busca evaluar la respuesta inmune humoral de sueros de hombres y mujeres de Pueblo Rico (Antioquia) contra dichos virus.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo General

Producir VLPs de los genotipos 16, 18, 53 y 31 del virus del Papiloma Humano a partir del sistema Baculovirus.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Descripción del área

El presente trabajo se realizó en el grupo de Investigación en Biología del cáncer del Instituto Nacional de Cancerología en Bogotá.

4.2 Cultivo de células

Las células Sf21 (*Spodoptera frugiperde*) criopreservadas en nitrógeno líquido fueron descongeladas en Agua previamente calentada a 37°C y se adicionaron a un tubo falcon que contenía 10 ml de medio SF-900 II SFM (Invitrogen Corporation), penicilina, estreptomycin, fungizona y suplementado con suero fetal bovino al 10%, luego fueron pasadas a una caja de cultivo e incubadas a 28°C durante 24h después el medio fue reemplazado por medio fresco buscando eliminar el exceso de Dimetilsulfóxido (DMSO) utilizado en el proceso de congelación de las células y se incubó por 4 días mas. Posteriormente las células fueron adicionadas en 20 cajas de 175 ml con el fin de aumentar la cantidad de células e incubadas por una semana hasta alcanzar un 80% de confluencia.

4.3 Infección de células con Baculovirus Recombinantes

Las células fueron infectadas con baculovirus recombinantes que contenía el gen L1 de VPH 16 y VPH 18 a un MOI de 10” (MOI=índice de multiplicidad). Pasados 4 días de la infección, el precipitado celular fue recuperado utilizando cell scraper (ref.) y se pasaron a tubos falcon de 50 ml y se centrifugaron a 3.500 rpm por 7 minutos en una centrífuga IEC centra MP4R; finalmente el sobrenadante fue almacenado a 4°C para usarse en futuras infecciones y el precipitado celular se utilizó en la purificación de los VLPs.

4.4 Purificación de VLP's

El precipitado celular fue resuspendido en tampón fosfato salino pH 7.2 (PBS) conteniendo 0.5% de Nodidet P-40, 10 $\mu\text{g/ml}$ de pestatina y 1 $\mu\text{g/ml}$ de leupeptina. Las células se incubaron a 4°C en hielo por 30 minutos y después las fracciones nuclear y citoplasmática se separaron por centrifugación a 12.000 rpm en un rotor Sorvall SA600 a 4°C durante 30 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado nuclear fue resuspendido en 2ml de PBS luego cada tubo se sonico a 60 Wats en tres pulsos de 15 segundos cada uno.

El lisado nuclear fue cargado sobre un gradiente lineal de cloruro de cesio CsCl de distintas densidades (1.38, 1.33, 1.272 y 1.164 mg /ml) y se centrifugó en una Ultra centrífuga Beckman a 27.000 rpm durante 23 horas a 4°C utilizando un rotor sw 28. Las fracciones fueron recogidas con una bomba de succión en fracciones de 1 ml y descartando los 12.5 ml de la parte inferior de cada tubo.

La densidad de los gradientes fue determinada mediante refractometría utilizando un refractómetro de Abbe (Fuzhou Huake Optical Instruments Co. Ltd, China). Las fracciones con una densidad alrededor de 1.272 fueron seleccionadas. Posteriormente se corrió una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% con el fin de confirmar si en dichas fracciones se encontraban las VLPs, una vez confirmado esto, las fracciones fueron mezcladas y concentradas por ultracentrifugación a 28,000 rpm durante 3 h a 4°C y resuspendidas en PBS 1X.

4.5 Cuantificación de VLP's

10 μg de cada gradiente, fueron sembrados en un gel de poliacrilamida y SDS al 10%, y posteriormente teñido con azul de Coomassie (0.1%) para ser analizado por densitometría, usando el software Molecular Analyst (Bio-Rad, Evry/Seine, France). Este software genera un electroforograma, en el cual se

selecciona el pico correspondiente a la proteína L1 para estimar su porcentaje sobre el total de la proteína analizada. Luego con este porcentaje se calcula la concentración real de proteína L1, entre el total de proteína cuantificada.

4.6 Verificación de los clones recombinantes para cada tipo de VLPs

Con el fin de verificar el buen estado de los sobrenadantes utilizados en la infección se realizó una PCR GP5+/GP6+.

Cada reacción de PCR se realizó en un volumen final de 50 µl, cada una contenía: Tris HCl 10 mM a un pH de 9.0, KCl 50 mM, Triton[®] X- 100 al 0.1 %, MgCl₂ 3.5 µM, dNTPs 0.3 µM, 0.6 µM de cada primer y 1.25 u. de Taq Polimerasa. Todos los reactivos a excepción de los primers fueron marca Promega. Las condiciones de PCR se ajustaron de acuerdo a lo descrito por Touzé A. y col en 1998 (50).

La secuencia de los primers utilizados en este trabajo se encuentra relacionada en la tabla 1.

TABLA 1. Secuencia de primers específicos para VPH – L1

SECUENCIA PRIMER	UBICACIÓN (nt – nt) sentido	REPORTADO POR:	DENOMINACION
TGTTACTGTGGTAGATACTAC	6626-6648 Sentido	van den Brule	GP5+
TATACTAAATGTCAAATAAAAAG	6743-6767 antisentido	van den Brule	GP6+

Se realizaron 40 ciclos de amplificación utilizando un Termociclador Perkin Elmer 9600. Cada ciclo incluía una denaturación a 94°C durante 30 seg., una hibridación a 50°C durante 1.30 min, una extensión de 72°C durante 2 min., el primer ciclo fue precedido por una denaturación a 94°C durante 4 minutos y el último ciclo fue seguido por una elongación a 72°C durante 10 min.

Se utilizó como control positivo células Hela que contienen ADN de VPH 16. Como marcador de peso se utilizó 1Kb DNA ladder (Gibco).

Los productos de la PCR fueron analizados mediante electroforesis horizontal corrida en geles de Agarosa al 2% TBE, coloreados con Bromuro de Etidio, corridos con Buffer TBE 0.5 X, a un voltaje de 110w (técnica estándar), y se observaron con luz ultravioleta, mediante el uso de un Transiluminador analítico DNA Fotodyne, se tomaron fotografías utilizando el Sistema Fotográfico de Fotodyne incorporated MP-ST™.

4.7. Antigenicidad de las diferentes VLPs

La antigenicidad de las diferentes preparaciones de VLPs se determinó mediante inmunotransferencia utilizando sueros de pacientes con cáncer positivos para VLP de cada uno de los tipos virales, evidenciando la presencia de la banda de 57 Kd, para cada tipo virus.

5. RESULTADOS

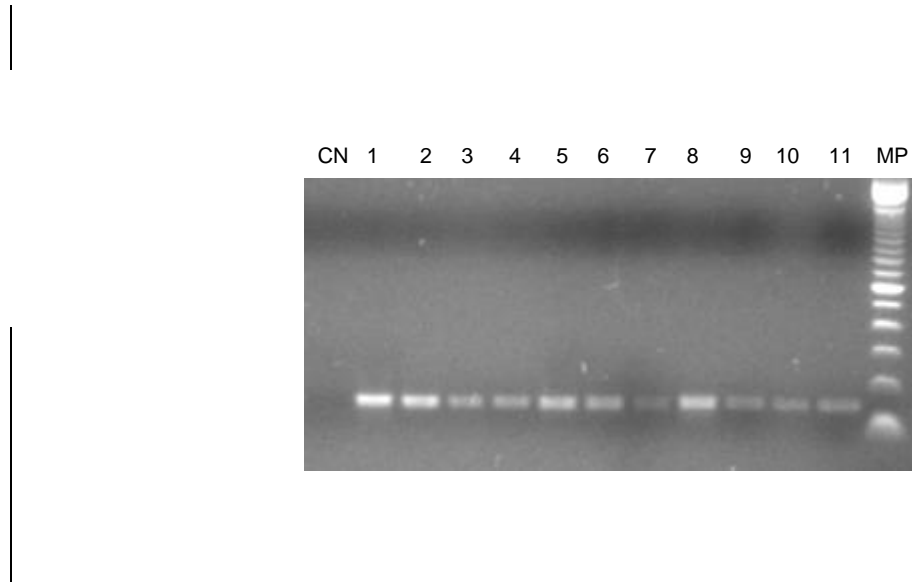
5.1. Cultivo de células

Se logró obtener células viables después de su descongelación, asegurándose así, el mantenimiento de la línea celular necesaria para la posterior infección.

5.2 verificación de los clones recombinantes

Mediante PCR se pudo confirmar que los sobrenadantes conteniendo los baculovirus recombinantes contenían el gen de la proteína L1 de VPH.

Figura 1. Amplímeros obtenidos con los primers Gp5+ y Gp6+.



CN: control negativo, carril 1 a 10: sobrenadantes. MP: marcador de peso molecular. Carril 11: control positivo.

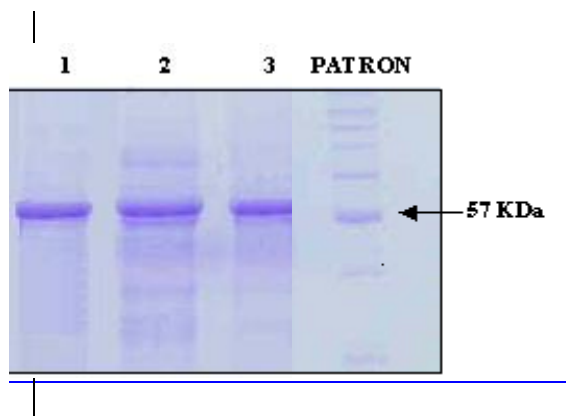
5.3 Infección de células con Baculovirus Recombinantes

Se obtuvo dos grupos de células infectadas con los baculovirus recombinantes para L1 VPH de los genotipos 16 y 18 respectivamente.

5.4 Purificación de VLP's

El análisis electroforético en gel de poliacrilamida mostró que en las fracciones recolectadas con valores de refractometría cercanos a 1.272 se encuentran las VLPs pues mostró la presencia de una proteína de 57 kDa que corresponde a la proteína L1 de PVH.

Figura 3. Electroforésis en gel de poliacrilamida al 10% revelado con azul de Coomassie de los diferentes tipos de VLP.



Carril 1: VLP VPH16; Carril 2: VLP VPH18; Carril 3: control positivo.

La pureza de las preparaciones, evaluada mediante dicha electroforesis en gel de poliacrilamida, fue de más del 90% para todos los tipos.

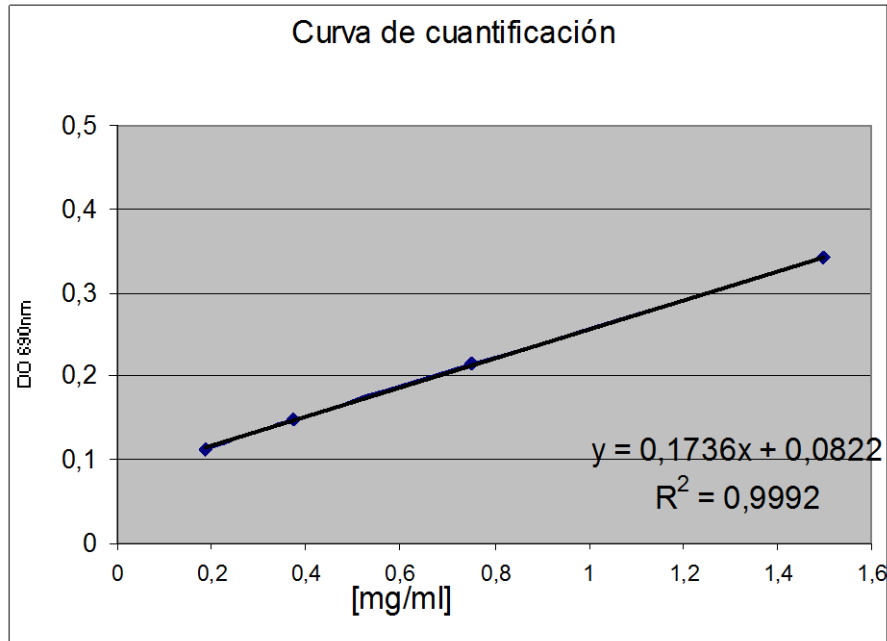
5.5 Cuantificación de las VLPs

Mediante el software, se obtuvo un electroforograma, en el cual se seleccionó el pico correspondiente a la proteína L1 y se estimó su porcentaje sobre el total de la proteína analizada. Luego con este porcentaje se calculó la concentración real de proteína L1, entre el total de proteína cuantificada por micro BSA.

Tabla 2. Cuantificación de las VLP's de los tipos 16 y 18.

Tipo de VLP	DO	Total [mg/ml]	%	[VLP L1] [mg/ml]
VLP 16	0,225	0,823	90	0,740
VLP 16	0,191	0,624	90	0,561
VLP 16	0,196	0,653	90	0,587
VLP 16	0,174	0,529	75	0,397
VLP 16	0,176	0,54	85	0,459
VLP 16	0,145	0,362	85	0,307
VLP18	0,229	0,843	20	0,169
VLP18	0,214	0,756	80	0,605
VLP18	0,197	0,661	75	0,496
VLP18	0,290	1,194	80	0,955

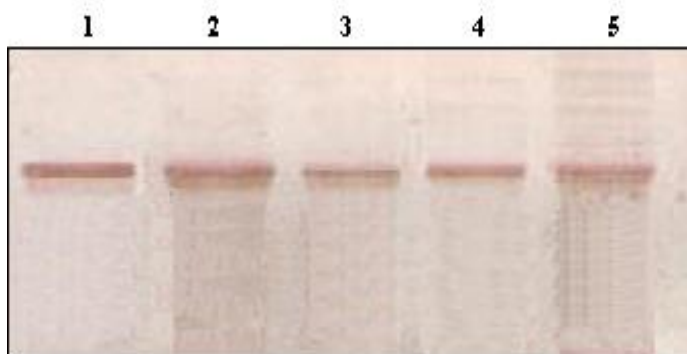
Figura 4.



5.6 Antigenicidad de las diferentes VLPs

La antigenicidad de las diferentes preparaciones de VLPs se determinó mediante inmunotransferencia utilizando sueros de pacientes con cáncer positivos para VLP de cada uno de los tipos virales, evidenciando la presencia de la banda de 57 Kd, para cada tipo viral (Fig. 2). Lo anterior mostró que las VLPs obtenidos pueden ser usados como antígeno en estudios posteriores de seroprevalencia.

Figura 5. Inmunotransferencia en nitrocelulosa revelada con AEC de los diferentes tipos de VLP. Carril 1 y 2: VLP VPH16; Carril 3 y 4: VLP VPH18; Carril 5: control positivo.



6. DISCUSIÓN

El Virus del Papiloma Humano es uno de los virus más estudiados actualmente debido a su alta relación con el cáncer de cuello uterino. En Colombia es una de las principales causas de muerte por cáncer en la mujer, hecho que constituye un gran problema de salud pública en nuestro país.

Estudios epidemiológicos recientes basados en homología de secuencias lograron clasificar los diferentes tipos de VPH en dos grupos a los que se les denominó de alto y bajo riesgo, entre los de alto riesgo se encuentran los tipos 16 y 18 empleados en este estudio. Dichos tipos de VPH se han encontrado estrechamente relacionados con el cáncer de cuello uterino y en Colombia presentan una alta prevalencia en mujeres jóvenes con un vida sexual activa.

Aun cuando existe abundante información respecto del rol del VPH en la carcinogénesis del cuello uterino, ésta no ha sido suficiente en nuestro país, es por esto que se desarrolló el presente trabajo como paso preliminar a la búsqueda de una posible vacuna preventiva en nuestro país.

Es indudable que la detección, el diagnóstico y la erradicación de las lesiones precursoras previenen el desarrollo del cáncer invasor, por lo que es necesaria la realización de campañas masivas para detectar el padecimiento en etapas iniciales. Sin embargo, los resultados de una buena campaña de detección oportuna se obtienen a largo plazo, de modo que en los países en vías de desarrollo el cáncer invasor seguirá siendo un problema importante por muchos años. Una estrategia diferente y que se puede sumar a los esfuerzos de la lucha contra esta enfermedad es invertir en el desarrollo de vacunas terapéuticas construidas con la tecnología del ácido desoxirribonucleico (ADN) recombinante, dirigidas a estimular el sistema inmune de la persona afectada, contra blancos de las células tumorales

Estudios en fase clínica II y III han demostrado claramente que es posible proteger contra PVH mediante VLPs o partículas virales, las cuales son producto de la expresión y auto ensamblaje *in vitro* del gen L1, el cual codifica para la principal proteína de la cápside de este virus. Sin embargo, el desarrollo de estas vacunas ha enfrentado grandes dificultades debido a que los PVH poseen un ciclo viral complejo, su replicación es totalmente dependiente del estado de diferenciación de las células que este infecta, y a la carencia de modelos animales para evaluar los genotipos que infectan la mucosa genital, pues estos virus están restringidos a su especie hospedera (1). Sin embargo en la última década, se han logrado muchos progresos en este campo de las vacunas profilácticas y terapéuticas contra el PVH. En la actualidad se han llevado a cabo varios ensayos clínicos en humanos de fase II con estas partículas VLPs y los resultados demuestran que estas vacunas son seguras, inmunogénicas y muestran una eficacia entre el 95% y el 100% contra infecciones persistentes (36).

Experimentos realizados en modelos animales como conejos (*Cottontail Rabbit Papillomavirus*, CRPV), (8) bovinos (*Bovine Papillomavirus type 4*, BPV4) (9) y perros (*Canine Oral Papillomavirus*, COPV) (10) demostraron que la vacunación sistemática con VLPs resulta en un 90~100% de protección. Esta protección es mediada por la neutralización del virus mediante anticuerpos contra epítopos conformacionales (11) de la proteína L1 de la cápside.

Aunque este trabajo no resulta ser una novedad, pues es prácticamente un procedimiento de rutina en el laboratorio del grupo de Inmunología del Instituto Nacional de Cancerología, fue de vital importancia para desarrollar el proyecto **Predicting the HPV genotypes vaccines that have to be introduced in**

Colombia to prevent cervical Cancer a cargo de el Grupo de infección y Cancer de la Universidad de Antioquia pues La purificación de VLPs fue un paso preliminar y necesario para poder iniciar el proyecto. En este momento dichas VLP´s están siendo utilizadas como antígenos en las pruebas de ELISA, para la evaluación de seroprevalencia que permitirá determinar los niveles de anticuerpos de la población colombiana contra la infección con uno o contra varios de los genotipos. Aunque se pretendía obtener VLP´s de los tipos 16, 18, 53 y 31, solo fue posible para los tipos 16 y 18 debido a problemas de contaminación de las células de insecto antes de ser infectadas con los sobrenadantes que contenían los baculovirus con los diferentes tipos de VPH, Lo que constituyo una demora importante que solo permitió la realización de dos protocolos de purificación.

Los primers G5 y G6 exhibieron una alta especificidad en la detección del Virus del Papiloma Humano.

7. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en el estudio se pudo concluir que:

- El procedimiento de obtención de las VLPs fue el adecuado y el preciso ya que permitió obtener buenas cantidades de las VLPs, además permitió obtenerlas con un alto grado de pureza.
- Las VLPs obtenidas de los tipos 16 y 18 fueron altamente funcionales y están siendo probadas actualmente como potentes inmunógenos en sueros de pacientes Colombianos, buscando evaluar la seroprevalencia que permitirá determinar los niveles de anticuerpos de la población colombiana contra la infección con ambos tipos de VPH.
- Se obtuvo mas cantidad de VLPs del tipo 16; esto obedeció simplemente a la contaminación de dos de los tubos utilizados en la centrifuga al momento de purificar el tipo 18 y no a baja calidad de los sobrenadantes de este tipo.
- Los primers Gp5+ y Gp6+ presentan una alta especificidad en la detección del Virus del Papiloma Humano.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Soto Y. 1998. Aplicación de la Técnica en Cadena de Polimerasa para la detección de secuencias de Papillomavirus Humano. *Rev Cub Med Trop.*; 3 (50):191-8.
2. de Villiers, E. M. and A. Ruhland. 2001. Do specific human papillomavirus types cause psoriasis? *Arch.Dermatol.* 137:384.
3. Myers, G., H. Lu, C. Calef, and T. Leitner. 1996. Heterogeneity of papillomaviruses. *Semin.Cancer Biol.* 7:349-358.
4. Myers, G., H. Lu, C. Calef, and T. Leitner. 1996. Heterogeneity of papillomaviruses. *Semin.Cancer Biol.* 7:349-358.
5. Yamada, T., C. M. Wheeler, A. L. Halpern, A. C. Stewart, A. Hildesheim, and S. A. Jenison. 1995. Human papillomavirus type 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.
6. Schafer, F., L. Florin, and M. Sapp. 2002. DNA binding of L1 is required for human papillomavirus morphogenesis in vivo. *Virology* 295:172-181.
7. Zhou, J., X. Y. Sun, K. Louis, and I. H. Frazer. 1994. Interaction of human papillomavirus (HPV) type 16 capsid proteins with HPV DNA requires an intact L2 N-terminal sequence. *J.Virol.* 68:619-625.
8. Doorbar, J. 2005. The papillomavirus life cycle. *J.Clin.Virol.* 32 Suppl 1:S7-15.
9. Park, J. S., Y. H. Chee, S. E. Namkoong, S. K. Han, T. E. Kim, H. Y. Lee, and S. J. Kim. 1994. Human papillomavirus detection in cervical carcinoma

tissues and paraaortic lymph nodes by the polymerase chain reaction. *Gynecol.Oncol.* 53:344-351.

10. Stoler, M. H. and T. R. Broker. 1986. In situ hybridization detection of human papillomavirus DNAs and messenger RNAs in genital condylomas and a cervical carcinoma. *Hum.Pathol.* 17:1250-1258.

11. Croissant, O., F. Breitburd, and G. Orth. 1985. Specificity of cytopathic effect of cutaneous human papillomaviruses. *Clin.Dermatol.* 3:43-55.

12. Schiffman, M. H. and L. A. Brinton. 1995. The epidemiology of cervical carcinogenesis. *Cancer* 76:1888-1901.

13. Duggan, M. A., S. E. McGregor, G. C. Stuart, S. Morris, V. Chang-Poon, A. Schepansky, and L. Honore. 1998. The natural history of CIN I lesions. *Eur.J.Gynaecol.Oncol.* 19:338-344.

14. Ho, G. Y., R. D. Burk, S. Klein, A. S. Kadish, C. J. Chang, P. Palan, J. Basu, R. Tachezy, R. Lewis, and S. Romney. 1995. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J.Natl.Cancer Inst.* 87:1365-1371.

15. Villa,L.L.2005.Prophylactic HPV vaccines: Reducing the burden of HPV-related diseases.*JVac.*

16. Burk, R. D., G. Y. Ho, L. Beardsley, M. Lempa, M. Peters, and R. Bierman. 1996. Sexual behavior and partner characteristics are the predominant risk factors for genital human papillomavirus infection in young women. *J.Infect.Dis.* 174:679-689.

17. Tarkowski, T. A., E. H. Koumans, M. Sawyer, A. Pierce, C. M. Black, J. R. Papp, L. Markowitz, and E. R. Unger. 2004. Epidemiology of human

papillomavirus infection and abnormal cytologic test results in an urban adolescent population. *J.Infect.Dis.* 189:46-50.

18. Wang, S. S., M. Schiffman, T. S. Shields, R. Herrero, A. Hildesheim, M. C. Bratti, M. E. Sherman, A. C. Rodriguez, P. E. Castle, J. Morales, M. Alfaro, T. Wright, S. Chen, B. Clayman, R. D. Burk, and R. P. Viscidi. 2003. Seroprevalence of human papillomavirus-16, -18, -31, and -45 in a population-based cohort of 10000 women in Costa Rica. *Br.J.Cancer* 89:1248-1254.

19. Wheeler, C. M., C. A. Parmenter, W. C. Hunt, T. M. Becker, C. E. Greer, A. Hildesheim, and M. M. Manos. 1993. Determinants of genital human papillomavirus infection among cytologically normal women attending the University of New Mexico student health center. *Sex Transm.Dis.* 20:286-289.

20. Winer, R. L., S. K. Lee, J. P. Hughes, D. E. Adam, N. B. Kiviat, and L. A. Koutsky. 2003. Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am.J.Epidemiol.* 157:218-226.

21. Munoz, N. 2000. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J.Clin.Virol.* 19:1-5.

22. de Villiers, E. M., C. Fauquet, T. R. Broker, H. U. Bernard, and H. H. zur. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324:17-27.

23. Lowy, D. R., R. Kirnbauer, and J. T. Schiller. 1994. Genital human papillomavirus infection. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91:2436-2440.

24. zur, H. H. 1999. Immortalization of human cells and their malignant conversion by high risk human papillomavirus genotypes. *Semin.Cancer Biol.* 9:405-411.

25. Kirnbauer, R., F. Booy, N. Cheng, D. R. Lowy, and J. T. Schiller. 1992. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89:12180-12184.

26. Chen, X. S., R. L. Garcea, I. Goldberg, G. Casini, and S. C. Harrison. 2000. Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol.Cell* 5:557-567.

27. Combita, A. L., M. M. Bravo, A. Touze, O. Orozco, and P. Coursaget. 2002. Serologic response to human oncogenic papillomavirus types 16, 18, 31, 33, 39, 58 and 59 virus-like particles in colombian women with invasive cervical cancer. *Int.J.Cancer* 97:796-803.

28. Roden, R. B., A. Armstrong, P. Haderer, N. D. Christensen, N. L. Hubbert, D. R. Lowy, J. T. Schiller, and R. Kirnbauer. 1997. Characterization of a human papillomavirus type 16 variant-dependent neutralizing epitope. *J.Virol.* 71:6247-6252.

29. White, W. I., S. D. Wilson, F. J. Palmer-Hill, R. M. Woods, S. J. Ghim, L. A. Hewitt, D. M. Goldman, S. J. Burke, A. B. Jenson, S. Koenig, and J. A. Suzich. 1999. Characterization of a major neutralizing epitope on human papillomavirus type 16 L1. *J.Virol.* 73:4882-4889.

30. Heino, P., B. Skyldberg, M. Lehtinen, I. Rantala, B. Hagmar, J. W. Kreider, R. Kirnbauer, and J. Dillner. 1995. Human papillomavirus type 16 capsids expose multiple type-restricted and type-common antigenic epitopes. *J.Gen.Virol.* 76 (Pt 5):1141-1153.

31. Ho, G. Y., R. Bierman, L. Beardsley, C. J. Chang, and R. D. Burk. 1998. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N.Engl.J.Med.* 338:423-428.

32. Kirnbauer, R., J. Taub, H. Greenstone, R. Roden, M. Durst, L. Gissmann, D. R. Lowy, and J. T. Schiller. 1993. Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J.Virol.* 67:6929-6936.

33. Kirnbauer, R., N. L. Hubbert, C. M. Wheeler, T. M. Becker, D. R. Lowy, and J. T. Schiller. 1994. A virus-like particle enzyme-linked immunosorbent assay detects serum antibodies in a majority of women infected with human papillomavirus type 16. *J.Natl.Cancer Inst.* 86:494-499.

34. Kjellberg, L., Z. Wang, F. Wiklund, K. Edlund, T. Angstrom, P. Lenner, I. Sjoberg, G. Hallmans, K. L. Wallin, M. Sapp, J. Schiller, G. Wadell, C. G. Mahlck, and J. Dillner. 1999. Sexual behaviour and papillomavirus exposure in cervical intraepithelial neoplasia: a population-based case-control study. *J.Gen.Virol.* 80 (Pt 2):391-398.

35. Carter, J. J., L. A. Koutsky, G. C. Wipf, N. D. Christensen, S. K. Lee, J. Kuypers, N. Kiviat, and D. A. Galloway. 1996. The natural history of human papillomavirus type 16 capsid antibodies among a cohort of university women. *J.Infect.Dis.* 174:927-936.

36. Sasagawa, T., M. Inoue, M. Lehtinen, W. Zhang, S. E. Gschmeissner, M. A. Hajibagheri, J. Finch, and L. Crawford. 1996. Serological responses to human papillomavirus type 6 and 16 virus-like particles in patients with cervical neoplastic lesions. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* 3:403-410.

37. Viscidi, R. P., K. L. Kotloff, B. Clayman, K. Russ, S. Shapiro, and K. V. Shah. 1997. Prevalence of antibodies to human papillomavirus (HPV) type 16 virus-like particles in relation to cervical HPV infection among college women. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* 4:122-126.

38. Luxton, J. C., R. C. Rose, T. Coletart, P. Wilson, and P. S. Shepherd. 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 (Pt 4):917-923.

39. Sun, Y., J. Eluf-Neto, F. X. Bosch, N. Munoz, J. M. Walboomers, C. J. Meijer, K. V. Shah, B. Clayman, and R. P. Viscidi. 1999. Serum antibodies to human papillomavirus 16 proteins in women from Brazil with invasive cervical carcinoma. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 8:935-940.

40. Bontkes, H. J., T. D. de Gruijl, J. M. Walboomers, J. T. Schiller, J. Dillner, T. J. Helmerhorst, R. H. Verheijen, R. J. Scheper, and C. J. Meijer. 1999. Immune responses against human papillomavirus (HPV) type 16 virus-like particles in a cohort study of women with cervical intraepithelial neoplasia. II. Systemic but not local IgA responses correlate with clearance of HPV-16. *J.Gen.Virol.* 80 (Pt 2):409-417.

41. Konya, J. and J. Dillner. 2001. Immunity to oncogenic human papillomaviruses. *Adv.Cancer Res.* 82:205-238.

42. Dillner, J., I. Kallings, C. Brihmer, B. Sikstrom, P. Koskela, M. Lehtinen, J. T. Schiller, M. Sapp, and P. A. Mardh. 1996. Seropositivities to human papillomavirus types 16, 18, or 33 capsids and to *Chlamydia trachomatis* are markers of sexual behavior. *J.Infect.Dis.* 173:1394-1398.

43. Touze, A., S. de Sanjose, P. Coursaget, M. R. Almirall, V. Palacio, C. J. Meijer, J. Kornegay, and F. X. Bosch. 2001. Prevalence of anti-human papillomavirus type 16, 18, 31, and 58 virus-like particles in women in the general population and in prostitutes. *J.Clin.Microbiol.* 39:4344-4348.

44. Heino, P., C. Eklund, V. Fredriksson-Shanazarian, S. Goldman, J. T. Schiller, and J. Dillner. 1995. Association of serum immunoglobulin G antibodies against human papillomavirus type 16 capsids with anal epidermoid carcinoma. *J.Natl.Cancer Inst.* 87:437-440.

45. Olsen, A. O., J. Dillner, K. Gjoen, T. Sauer, I. Orstavik, and P. Magnus. 1996. A population-based case-control study of human papillomavirus-type-16 seropositivity and incident high-grade dysplasia of the uterine cervix. *Int.J.Cancer* 68:415-419.

46. Lowy, D. R. and J. T. Schiller. 1998. Papillomaviruses and cervical cancer: pathogenesis and vaccine development. *J.Natl.Cancer Inst.Monogr* 27-30.

47. Hagensee, M. E., J. Slavinsky, III, C. M. Gaffga, J. Suros, P. Kissinger, and D. H. Martin. 1999. Seroprevalence of human papillomavirus type 16 in pregnant women. *Obstet.Gynecol.* 94:653-658.

48. Giovannelli, L., G. Campisi, A. Lama, O. Giambalvo, J. Osborn, V. Margiotta, and P. Ammatuna. 2002. Human papillomavirus DNA in oral mucosal lesions. *J.Infect.Dis.* 185:833-836.

49. Klussmann, J. P., S. J. Weissenborn, U. Wieland, V. Dries, J. Kolligs, M. Jungehuelsing, H. E. Eckel, H. P. Dienes, H. J. Pfister, and P. G. Fuchs. 2001. Prevalence, distribution, and viral load of human papillomavirus 16 DNA in tonsillar carcinomas. *Cancer* 92:2875-2884.

50. Touze, Antoine *et al.* 1998. The L1 major capsid protein of Human Papillomavirus type 16 variants affects yields of virus-like particles produced in an Insect cell expression system. *Journal of Clinical Microbiology.* Vol 36: 2046-2051.

51. Den Brule, V, Adrian *et al.* 1990. PCR based detection of genital HPV genotypes. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol, 28; p. 2739-2743.