UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

GENERACIÓN DE INSUMOS INMUNOLÓGICOS DE UTILIDAD EN LA ELABORACIÓN DE PRUEBAS RÁPIDAS COMO ALTERNATIVA COSTO EFECTIVA PARA EL DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER DE CUELLO UTERINO EN ZONAS RURALES DE COLOMBIA

Gabriela Gómez Avendaño

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS, DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
BOGOTÁ D.C.
2025

GENERACIÓN DE INSUMOS INMUNOLÓGICOS DE UTILIDAD EN LA ELABORACIÓN DE PRUEBAS RÁPIDAS COMO ALTERNATIVA COSTO EFECTIVA PARA EL DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER DE CUELLO UTERINO EN ZONAS RURALES DE COLOMBIA

Gabriela Gómez Avendaño

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias - Bioquímica

Directora:
Dr. Rer. Nat María Helena Ramírez Hernández

Grupo de Investigación
Laboratorio de Investigaciones Básicas en Bioquímica (LIBBIQ)

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS, DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
BOGOTÁ D.C.
2025

“La vida es como andar en bicicleta.
Para mantener el equilibrio,
debes seguir moviéndote.”

Albert Einstein

A mis padres, mi hermana y mi esposo.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia, al departamento de Química y sus profesores que apoyaron mi formación académica.

Al grupo de investigación Laboratorio de Investigaciones Básicas en Bioquímica (LIBBIQ), por brindarme las herramientas necesarias para el desarrollo de mis habilidades investigativas. A la profesora María Helena Ramírez Hernández, por su admirable labor como directora del grupo y de este trabajo, por sus enseñanzas, su dedicación, paciencia y comprensión respecto a mi situación laboral y académica. Al profesor Luis Ernesto Contreras, a mis compañeros Sharon Villamil, Laura Riascos, Esteban León, Luis Ramirez, Valentina Gómez, Pablo Murillo por sus consejos e instrucciones; a Luisa María Caldas por su solidaridad, empatía y apoyo académico y emocional, ¡gracias!

A mi gran amor y ejemplo de vida: mis padres, por ser mi fuerza y motivación. A mi hermana por su cariño incondicional. A mi esposo, por su gran apoyo en este proceso de formación, por su compresión y motivación en los largos y duros días, por su amor. A mi amada familia, ¡gracias!

RESUMEN

GENERACIÓN DE INSUMOS INMUNOLÓGICOS DE UTILIDAD EN LA ELABORACIÓN DE PRUEBAS RÁPIDAS COMO ALTERNATIVA COSTO EFECTIVA PARA EL DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER DE CUELLO UTERINO EN ZONAS RURALES DE COLOMBIA.

El Virus del Papiloma Humano (VPH) es un virus de ADN doble cadena, cubierto por una cápside proteica icosaédrica, sin envoltura. Su infección se adquiere principalmente por contacto sexual, siendo uno de los virus de transmisión sexual más comunes en el mundo. Actualmente, se han descrito más de 150 genotipos, algunos de importancia clínica (VPH de alto riesgo) por su capacidad de generar una infección persistente en el tracto anogenital femenino, induciendo la proliferación celular del epitelio cervical, por lo que se conocen como la causa principal de Cáncer de Cuello Uterino (CaCU).

En Colombia, en 2022, el CaCU fue el segundo en ocasionar más muertes en mujeres, con 80 defunciones y 403 casos nuevos reportados. La ruta diagnóstica comprende PCR para detección de ADN del VPH, citología cervicovaginal, colposcopia y biopsia; sin embargo, en regiones rurales dispersas del país, debido a las limitaciones sociales, económicas y de desplazamiento a los sitios de salud, el diagnóstico se hace principalmente con técnicas de inspección visual, las cuales son menos sensibles, pero de resultado inmediato.

Por consiguiente, el objetivo de este estudio fue generar bioinsumos inmunológicos (proteínas recombinantes y anticuerpos) que constituyan la primera fase para el desarrollo de un sistema de rápida detección de oncoproteínas de VPH alto riesgo, como alternativa para el apoyo diagnóstico de CaCU en zonas rurales de Colombia. Combinando herramientas computacionales, de biología molecular y bioquímicas se logró la generación de un anticuerpo aviar anti MBP-E6VPH16 mediante la construcción de un vector recombinante que permitió obtener el péptido antigénico elegido a través de herramientas computacionales. El anticuerpo se caracterizó mediante ensayos de *western blot* y ELISA.

Palabras clave: Virus del Papiloma Humano, Cáncer de Cuello Uterino, bioinsumo

ABSTRACT

GENERATION OF IMMUNOLOGICAL TOOLS USEFUL IN THE DEVELOPMENT OF RAPID TESTS AS A COST-EFFECTIVE ALTERNATIVE FOR THE DIAGNOSIS OF CERVICAL CANCER IN RURAL AREAS OF COLOMBIA

Human Papillomavirus (HPV) is a double-stranded DNA virus, covered by an icosahedral protein capsid, without envelope. Its infection is acquired mainly by sexual contact, being one of the most common sexually transmitted viruses in the world. Currently, more than 150 genotypes have been described, some of clinical importance (high-risk HPV) for their ability to generate a persistent infection in the female anogenital tract, inducing cell proliferation of the cervical epithelium, so they are known as the main cause of Cervical Cancer (CaCU).

In Colombia, in 2022, CaCU was the second leading cause of death in women, with 80 deaths and 403 new cases reported. The diagnostic pathway includes PCR for HPV DNA detection, cervicovaginal cytology, colposcopy and biopsy; however, in dispersed rural regions of the country, due to social, economic and travel limitations to health sites, diagnosis is mainly done with visual inspection techniques, which are less sensitive, but with immediate results.

Therefore, the objective of this study was to generate immunological bioinputs (recombinant proteins and antibodies) that constitute the first phase for the development of a rapid detection system for high-risk HPV oncoproteins, as an alternative for the diagnostic support of CaCU in rural areas of Colombia. Combining computational, molecular biology and biochemical tools, the generation of an avian anti MBP-E6VPH16 antibody was achieved through the construction of a recombinant vector that allowed obtaining the chosen antigenic peptide through computational tools. The antibody was characterized by western blot and ELISA assays.

Key words: Human Papillomavirus, Cervical Cancer, bioinput.

CONTENIDO

RESUMEN *7*

LISTA DE FIGURAS *12*

LISTA DE TABLAS *14*

INTRODUCCIÓN *1*

1. MARCO TEÓRICO *3*

1.1 SISTEMA INMUNOLÓGICO **3**

1.2 PROTEÍNAS RECOMBINANTES Y ANTICUERPOS – RELEVANCIA BIOTECNOLÓGICA **6**

1.3 VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO **8**

1.4 CÁNCER DE CUELLO UTERINO (CaCU) **15**

1.5 TÉCNICAS DE DETECCIÓN DEL VPH **19**

2. ANTECEDENTES *20*

3. JUSTIFICACIÓN *26*

4. OBJETIVOS *27*

OBJETIVO GENERAL **27**

OBJETIVOS ESPECÍFICOS **27**

5. METODOLOGÍA *28*

5.1 ESTUDIO BIOINFORMÁTICO **29**

5.2 OBTENCIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE **29**

5.3 PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES **37**

5.4 EVALUACIÓN DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE ANTICUERPOS **40**

6. RESULTADOS Y DISCUSÓN *42*

6.1 IDENTIFICACIÓN DE REGIONES CONSERVADAS Y/O INMUNOGÉNICAS ENTRE LAS SECUENCIAS DE LA ONCOPROTEÍNA E6 ..... **42**

6.2 OBTENCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE MBP-E6VPH16 ..... **47**

6.3 PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES **55**

6.4 EVALUACIÓN DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS POLICLONALES ANTI MBP-E6VPH16 ..... **62**

7. CONCLUSIONES *66*

7.1 PERSPECTIVAS **67**

BIBLIOGRAFÍA..... 69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura general de los anticuerpos 4
Figura 2. Producción de proteínas recombinantes 7
Figura 3. Estructura del Virus del Papiloma Humano. 9
Figura 4. Estructura genómica del Virus del Papiloma Humano (VPH) 10
Figura 5. Principales funciones de proteínas de expresión temprana y tardía del VPH..... 12
Figura 6. Mecanismo de degradación de p53 mediado por la proteína E6 de VPH 13
Figura 7. Mecanismo de acción de proteína E7 de VPH para progresión de fase G1 a S..... 14
Figura 8. Tasa de incidencia y mortalidad de CaCU en Colombia, 2022. 16
Figura 9. Etapas de la infección por VPH y transición a la enfermedad..... 18
Figura 10. Evolución de las lesiones cervicales ocasionadas por VPH alto riesgo. Tomado y modificado de: (66)..... 19
Figura 11. Evolución de la relación del VPH con el CaCU..... 24
Figura 12. Estrategia metodológica aplicada 28
Figura 13. Perfil térmico para PCR del fragmento de E6 VPH16 31
Figura 14. Construcción In silico de plásmido recombinante pMALc5X-E6VPH16..... 32
Figura 15. Análisis filogenético de secuencias proteicas de E6 de los 16 tipos de VPH..... 44
Figura 16. Alineamiento de secuencias proteicas de las E6 de VPH genéticamente más cercanas. 44
Figura 17. Predicción de regiones antigénicas de la proteína E6..... 46
Figura 18. Predicción de regiones antigénicas de la proteína E6 del VPH16 48
Figura 19. Construcción de vector recombinante pMALc5X-E6VPH16 49
Figura 20. Obtención y verificación del plásmido recombinante pMALc5X-E6VPH16 50
Figura 21. Evaluación de colonias E. coli BL21 DE3 - pMALc5x-E6VPH16, mediante PCR (amplificado: 159 pb) 50
Figura 22. Expresión de MBP-E6VPH16..... 52
Figura 23. Evaluación de purificación parcial de MBP-E6VPH16 (50 kDa) mediante cromatografía de afinidad a amilosa..... 53
Figura 24. Expresión y purificación parcial de MBP 54
Figura 25. Inmunodetección de proteínas parcialmente purificadas MBP-E6VPH16 (50 kDa) y MBP (44 kDa), mediante western blot 54
Figura 26. Determinantes antigénicos en MBP-E6VPH16. COLORES..... 56
Figura 27. Liberación de E6VPH16 a partir de digestión proteolítica con Factor Xa. MBP-E6VPH16 (50 kDa), MBP (44 kDa), E6VPH16 (6 kDa) 57
Figura 28. Evaluación de IgY anti MBP-E6VPH16 presentes en suero mediante western blot.57
Figura 29. Evaluación de IgY anti MBP-E6VPH16 presentes en suero mediante ELISA indirecto..... 58
Figura 30. Purificación de IgY anti MBP-E6VPH16 a partir de huevos. **A.** Evaluación del proceso de purificación mediante precipitación con sulfato de amonio al 35% 59
Figura 31. Evaluación de la producción de IgYs anti MBP-E6VPH16 presentes en huevos durante el esquema de inmunización. 59

Figura 32. Evaluación mediante western blot de las IgYs purificadas anti MBP y anti MBP-E6VPH16 por afinidad al antígeno. 60
Figura 33. Evaluación de IgY purificadas por afinidad al antígeno, previa incubación con antígeno no diana en solución, mediante western blot 62
Figura 34. Evaluación de sensibilidad de anticuerpos policlonales anti MBP-E6VPH16 en suero, mediante western blot 62
Figura 35. Evaluación de condiciones óptimas de reconocimiento de MBP-E6VPH16 por parte de las IgY en huevo, mediante ELISA indirecto 63
Figura 36. Evaluación de reconocimiento cruzado de anticuerpos policlonales anti MBP-E6VPH16 en suero, mediante western blot 64

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características de inmunoglobulinas de los mamíferos. 5
Tabla 2. Genotipos de VPH asociados a CaCU 15
Tabla 3. Iniciadores para PCR del fragmento E6 VPH16 30
Tabla 4. Esquema de inmunización con E6 VPH 16 en modelo aviar 38
Tabla 5. Características generales a partir de la secuencia proteica de cada E6 43
Tabla 6. Cuantificación de proteína parcialmente purificada. MBP-E6VPH16 (izquierda). MBP (derecha) 55

INTRODUCCIÓN

Los anticuerpos son glucoproteínas organizadas en una o varias unidades estructurales básicas, compuestas por cuatro cadenas polipeptídicas (dos livianas y dos pesadas), unidas entre sí por puentes disulfuro y otras uniones de tipo no covalente. Estas glicoproteínas hacen parte del sistema inmune adaptativo y su función consiste en la unión específica a un antígeno ocasionando reacciones inmunitarias que provocan la destrucción del antígeno, por lo que se conocen como inmunoglobulinas (1).

Gracias a su capacidad de reconocimiento específico de un antígeno, los anticuerpos son una herramienta importante en investigación, en el sector clínico, biotecnológico, industrial, entre otros. Algunas de sus aplicaciones incluyen la detección de biomarcadores o microorganismos patógenos, la terapia inmunológica como agentes de señalización o bloqueo de mecanismos celulares y la identificación, cuantificación, caracterización y purificación de moléculas (2), siendo el bioinsumo fundamental en técnicas de detección como *western blot*, ELISA, inmunohistoquímica, inmunoprecipitación e inmunoensayos de flujo lateral, también conocidos como pruebas rápidas; estas últimas son de las más relevantes, por su sencillez operativa, calidad y tiempo del resultado y facilidad de interpretación (3), lo que las hace útiles en el diagnóstico clínico, siendo posible emplearlas en zonas rurales de difícil acceso.

En Colombia este tipo de pruebas se importan generalmente a precios elevados, según su complejidad y blanco de detección. Sin embargo, su producción a nivel local es posible y representa un paso importante para alcanzar una soberanía biotecnológica. La producción del principal bioinsumo (anticuerpos policlonales o monoclonales), parte de la disponibilidad del antígeno de interés; para el caso de las proteínas usadas como antígeno, estas se pueden obtener mediante tecnología de ADN recombinante (4) para la posterior inmunización responsable del modelo animal apropiado, que genere anticuerpos contra este agente externo (5).

Considerando lo anterior, este proyecto pretende la generación de bioinsumos (proteína recombinante y anticuerpos policlonales), que permitan la generación a futuro de una herramienta inmunológica como apoyo en el diagnóstico del Cáncer de Cuello Uterino.

Este cáncer es la muestra de cómo una infección viral (por Virus del Papiloma Humano) puede desencadenar una enfermedad maligna, cuando además se presentan factores epigenéticos que propician la persistencia y progresión de la infección, tales como tabaquismo, alimentación poco saludable, precocidad y promiscuidad sexual, entre otros (6).

El Virus del Papiloma Humano (VPH) de alto riesgo puede generar afectaciones en el mecanismo de división celular, adueñándose del proceso de síntesis de ADN de la célula huésped y ocasionando un gran número de variaciones que resultan en la proliferación celular e inhibición de apoptosis (7). La oncoproteína E6 de los VPH de alto riesgo cumple variedad de funciones encaminadas al mantenimiento y progresión de la infección, pues asegura la proliferación del virus a través de la eliminación de la capacidad de las células huésped para identificar y reparar daños en el material genético, logrando aumentar en gran medida la frecuencia de replicación celular, por lo cual su expresión ocurre en etapas avanzadas de la infección (8), lo que la convierte en blanco para la detección de la fase precancerosa.

En las zonas rurales dispersas del país la ruta diagnóstica del Cáncer de Cuello Uterino generalmente se modifica, debido a las limitaciones económicas, sociales y de desplazamiento, que dificultan la posibilidad de acceso en repetidas ocasiones a los centros de salud para la toma de diferentes muestras; más aún la infraestructura, tecnología y el personal capacitado para tomar y procesar las muestras se concentra en las zonas centrales del país, lo cual implica tiempos prolongados en la obtención de resultados, arriesgándose a perder el contacto con la paciente y la posibilidad de iniciar un plan de prevención o tratamiento. Por ello, el diagnóstico en estas zonas se realiza con técnicas de inspección visual que permiten observar directamente las células del cuello uterino y en caso de detectar lesiones precancerosas, definir la opción de tratamiento. Sin embargo, la efectividad de estas técnicas es mucho menor que la lograda en conjunto con las técnicas moleculares e histopatológicas (9), siendo una alternativa, el empleo de técnicas de inmunodetección rápida.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 SISTEMA INMUNOLÓGICO

El sistema inmunológico es fundamental para la preservación de los organismos, pues su función es la defensa ante agentes extraños y/o peligrosos (antígenos), a través de una red organizada de órganos, tejidos, células, proteínas y moléculas, que llevan a cabo diferentes mecanismos efectores y de señalización, para lograr la destrucción del antígeno (10). Estos mecanismos de defensa se efectúan en dos tipos de inmunidad, la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa (11).

La inmunidad innata es responsable de la primera línea de defensa ante el agente extraño, una vez lo reconoce, activa de inmediato una red de respuesta general cuyo objetivo es el ataque y destrucción del agente extraño, impidiendo su establecimiento dentro del organismo. En caso contrario, activa una red de señalización capaz de orientar el tipo de respuesta que efectuará la inmunidad adaptativa, para continuar con el ataque (12).

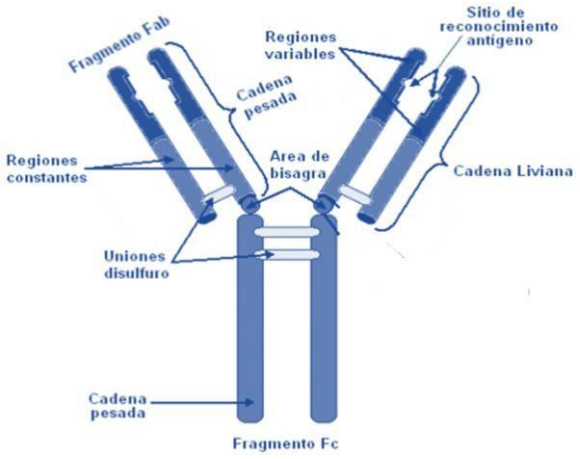
La inmunidad adaptativa ejerce su respuesta defensora de forma más especializada, luego de la exposición a cada agente extraño. Una vez recibe las señales o detecta la presencia de un agente extraño, activa su red efectora y de señalización para eliminarlo. Así mismo, es capaz de guardar información del agente y generar memoria con el fin de efectuar una respuesta más rápida y efectiva ante un próximo ataque del mismo (13). Los principales mediadores de este tipo de inmunidad, son los linfocitos T y B. Los linfocitos T reconocen los antígenos, inician su diferenciación en varios subtipos de células y envían señales para la acción de los linfocitos B (14). Los linfocitos B también se diferencian para potenciar este tipo de inmunidad, por lo que pueden ser linfocitos B de memoria, capaces de reconocer y efectuar una rápida respuesta en caso de nuevo contacto con el antígeno o linfocitos B efectores (plasmocitos) encargados de la producción de inmunoglobulinas (anticuerpos), que se excretan al sistema circulatorio y pueden reconocer de manera específica el antígeno uniéndose a este, para inducir su destrucción (15).

1.1.1 ANTICUERPOS

Los anticuerpos son glucoproteínas organizadas en una o varias unidades estructurales básicas, compuestas por cuatro cadenas polipeptídicas (dos livianas y dos pesadas), unidas entre sí por fuerzas iónicas y puentes disulfuro. Cada cadena liviana pesa aproximadamente 25 kDa y cada cadena pesada pesa aproximadamente 55 kDa. Cada tipo de cadena contiene una región constante y una región variable, cuya secuencia de aminoácidos cambia para cada anticuerpo, permitiendo el reconocimiento específico de cada antígeno (16).

Su estructura se puede dividir en el fragmento cristalizable (Fc) compuesto por la mitad de las dos cadenas pesadas, que permite a los anticuerpos unirse al receptor Fc presente en algunas células inmunitarias. Y dos fragmentos de unión al antígeno (Fab) compuestos por una de las cadenas livianas y la otra mitad de la cadena pesada, que contienen los sitios de reconocimiento y unión al antígeno. Adicionalmente, algunos tipos de anticuerpos presentan una región denominada bisagra, cerca de los puentes disulfuro, que les otorga flexibilidad (figura 1) (17).

Figura 1. Estructura general de los anticuerpos
Tomado y modificado de: (17)

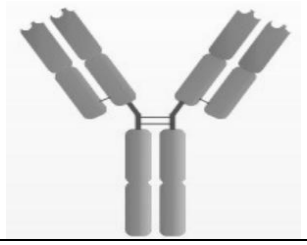
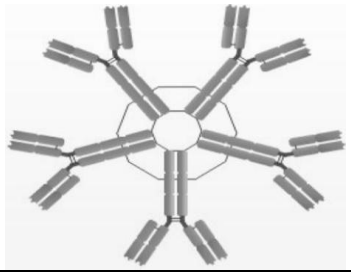
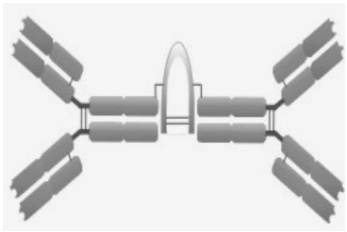
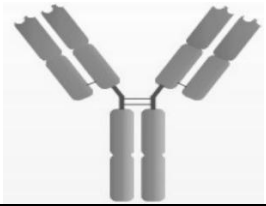
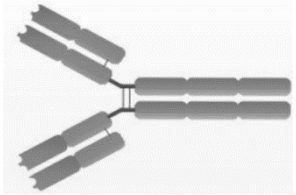


1.1.2 TIPOS DE ANTICUERPOS

La variabilidad de la región constante de las cadenas pesadas, el coeficiente de sedimentación y el contenido de carbohidratos, son algunas de las características que permiten que se presenten diferentes isotipos de anticuerpos; en mamíferos se presentan 5 tipos: G, A, M, D y E. Así mismo, la variabilidad de la región constante de las cadenas

pesadas les otorga propiedades biológicas distintas como la capacidad de fijación de complemento, de unirse a receptores celulares, y de unirse entre sí (17). En la tabla 1 se presentan algunas características y funciones de estos tipos de inmunoglobulinas.

Tabla 1. Características de inmunoglobulinas de los mamíferos.
Inspirada en y figuras tomadas de: (18)

INMUNOGLOBULINA (Ig)	CARACTERÍSTICAS
Ig G 	• Representa más del 70% de las inmunoglobulinas en suero. • Tiene capacidad de neutralizar, precipitar, fijar complemento y unirse a células inmunitarias. • Confiere inmunidad neonatal, por su capacidad de atravesar la placenta.
Ig M 	• Se presenta en forma pentamérica en la membrana de los linfocitos B y de forma monomérica en suero. • Activa complemento, neutraliza y participa en la lisis de microorganismos.
Ig A 	• Se encuentra en las mucosas en forma dimérica y en leche materna en forma monomérica. • Impide el ingreso de agentes infecciosos a través de las mucosas epiteliales, gracias a su capacidad neutralizante y precipitante.
IgD 	• Se encuentra en la superficie de los linfocitos B, para activar su crecimiento y facilitar el inicio de su respuesta.
IgE 	• El estímulo de su síntesis proviene del contacto con agentes alergénicos. • Se encuentra en sangre y en la superficie de mastocitos y basófilos.

1.2 PROTEÍNAS RECOMBINANTES Y ANTICUERPOS – RELEVANCIA BIOTECNOLÓGICA

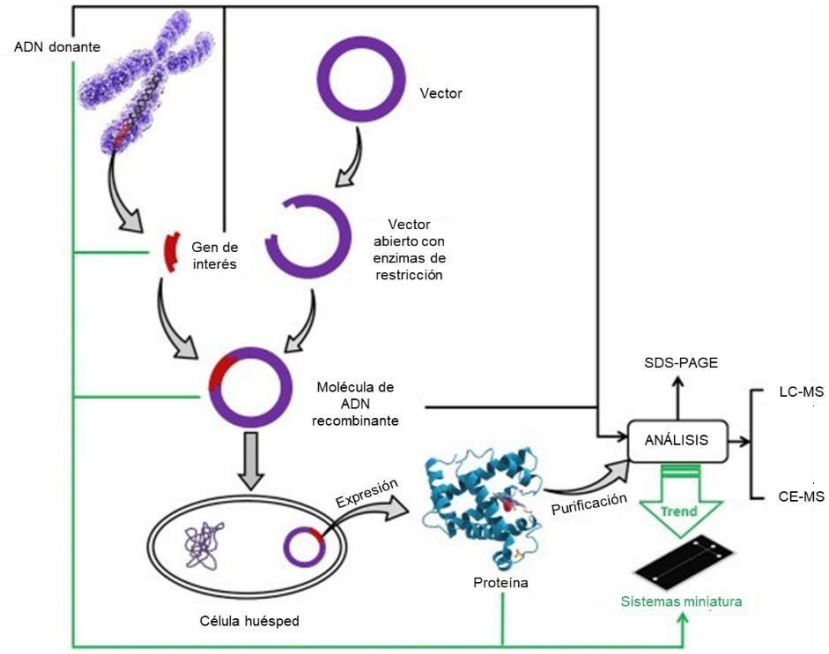
La investigación de los procesos vitales de los seres vivos y el entendimiento del mecanismo de acción de las macromoléculas involucradas, ha permitido la creación de técnicas para su obtención y uso como base de herramientas biotecnológicas necesarias en el avance de diversos sectores de la economía (19). Un ejemplo de ello es la variedad de aplicaciones que tienen los anticuerpos por su capacidad de reconocer y unirse a un antígeno, el cual se puede obtener directamente del organismo al cual se quiere dirigir el anticuerpo, mediante síntesis química o de manera recombinante (20). Siendo esta última ampliamente utilizada y constituyendo en sí misma la generación de un bioinsumo, como se describe a continuación.

1.2.1 PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Una proteína recombinante es aquella cuya expresión se lleva a cabo en células de una especie o línea celular diferente a la que originalmente la produce; además, su secuencia de aminoácidos puede ser igual a la natural o con modificaciones, con el propósito de alterar características como solubilidad, ubicación subcelular, función, entre otras (21).

De manera global, una proteína recombinante se produce a partir de la amplificación de su secuencia genética, para ser clonada en un vector de expresión, que debe ser transferido a un sistema que cuente con los mecanismos necesarios para ejecutar su producción, generalmente en un momento especifico luego de un estímulo especifico. Una vez confirmada su producción, se extrae, se confirma su identidad y se purifica (figura 2) (22). La producción de proteínas recombinantes puede realizarse en diferentes sistemas de expresión, conocidos como sistemas heterólogos, entre los que se encuentra *E. coli*, levaduras, células de mamífero, de insecto, entre otros.

Figura 2. Producción de proteínas recombinantes.
Tomado y modificado de: (22)



1.2.2 MODELOS ANIMALES PARA GENERACIÓN DE ANTICUERPOS

La obtención de anticuerpos por inmunización controlada de animales es un método tradicional que ha sido ampliamente explorado, por lo que existen protocolos definidos para el uso de varios modelos, cada uno con sus ventajas y desventajas. La selección del modelo a emplear depende de aspectos como el tipo de antígeno, la cantidad disponible y la especie de la que proviene, la cantidad de suero que se necesite y el tipo de anticuerpos que se pretenda producir (monoclonales o policlonales) (23).

Los modelos más usados para la generación de anticuerpos son los conejos, ratones, hamsters, ovejas y gallinas. Los conejos son de manejo sencillo y económico, la obtención de la sangría no es tan complicada y se pueden obtener volúmenes de suero de hasta 500mL. Los ratones y hamsters son también de fácil manejo, pero los volúmenes posibles de suero son más bajos, por lo que son más usados en la obtención de anticuerpos monoclonales. Los modelos más grandes como las cabras se usan preferentemente cuando se requieren altos volúmenes de suero con concentraciones elevadas de anticuerpos (24).

Así mismo, el empleo de gallinas permite la obtención de hasta 50 mL de suero en un protocolo de inmunización. El anticuerpo más abundante en suero es un isotipo de la inmunoglobulina G (IgG) de mamíferos; la inmunoglobulina Y (IgY), de

aproximadamente 180 kDa, compuesta también por dos cadenas polipeptídicas pesadas y dos livianas. Presenta ciertas diferencias estructurales con la IgG, como la ausencia de región bisagra, lo que la hace menos flexible y a la vez menos sensible a degradación proteolítica. Adicionalmente, las IgY se encuentran abundantemente en la fracción fluida de la yema de los huevos, lo cual representa una ventaja adicional, ya que se pueden obtener los anticuerpos a partir de los huevos, evitando procesos invasivos para su recolección (25).

1.3 VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

El Virus del Papiloma Humano (VPH) está clasificado dentro de la familia *Papillomaviridae*, dado que su estructura esférica de aproximadamente 52-55 nm está formada por una cápside proteica icosaédrica, sin envoltura. Se han descrito más de 200 tipos diferentes distribuidos en 5 géneros: α-papilomavirus, β-papilomavirus, γ-papilomavirus, μ-papilomavirus y ν-papilomavirus (26). Esta agrupación de los 5 géneros los relaciona no solo a nivel de composición genética, sino también con sus capacidades patogénicas y el tropismo o afinidad por tejidos epiteliales específicos, encontrando que los α-papilomavirus pueden infectar epitelio tanto cutáneo como mucoso, mientras que los β, γ, μ, y ν-papilomavirus infectan solo epitelio cutáneo. En el género α-papilomavirus se encuentran los VPH de interés para este estudio, pues poseen la capacidad de lograr una infección persistente que desencadena en la aparición de Cáncer de Cuello Uterino (CaCU) (27).

El VPH presenta distribución global y es uno de los virus de transmisión sexual más comunes (28), aunque recientemente se han evidenciado otras vías de transmisión, entre las que se encuentran el contacto a través de heridas o abrasiones con objetos en los que se encuentre el virus, o el contacto (en zonas no genitales) de una persona infectada con otra no infectada que presente algún tipo de lesión; incluso se ha evidenciado transmisión vertical, de madre a hijo (29).

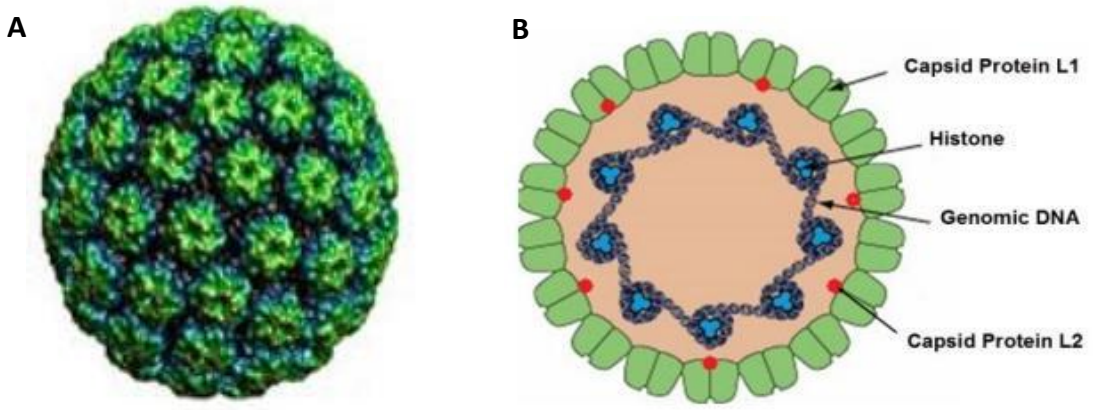
Este virus afecta tanto a mujeres como a hombres, siendo estos últimos generalmente asintomáticos (30). Las consecuencias de su infección pueden ser benignas o malignas, conduciendo en algunos casos al desarrollo carcinogénico del sitio infectado. De ahí que,

es la causa principal del CaCU y un factor determinante para el desarrollo de otro tipo de cánceres, como cáncer de pene, de ano, de vulva, de vagina, de cabeza y cuello (orofaríngeo), de cavidad oral y laríngeo (31).

1.3.1 ESTRUCTURA DEL VPH

El Virus del Papiloma Humano está formado por una estructura esférica de aproximadamente 52-55 nm constituida por una cápside proteica icosaédrica, sin envoltura, que protege su genoma circular (32). Esta cápside se compone de 72 capsómeros, cada uno formado por dos proteínas estructurales: L1 y L2, de manera que la proteína L1 se organiza en forma de pentámeros y L2 se organiza en el interior de estos pentámeros, como se ilustra en la figura 3 (parte A) (33).

Figura 3. Estructura del Virus del Papiloma Humano.
A) Construcción bioinformática de superficie externa de un virión de VPH. **B)** Esquema de conformación interna de VPH.
Tomado de: (32)

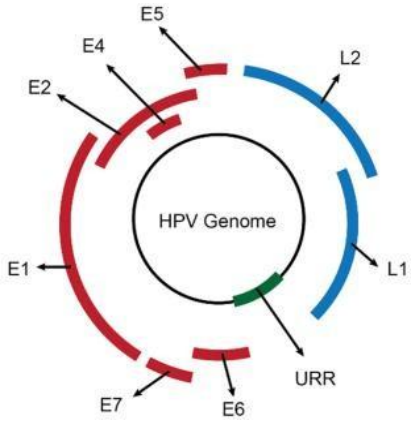


1.3.2 ESTRUCTURA GENÓMICA

Su genoma está compuesto por ADN de doble cadena, con una longitud aproximada de 8.000 pb distribuidas en: una región reguladora corriente arriba (URR) compuesta por aproximadamente 1.000 pb y dos regiones codificantes separadas entre ellas por señales de poliadenilación. Estas dos regiones abarcan 8 marcos abiertos de lectura (*ORF*s) y están clasificadas según el orden de transcripción de los genes que las componen, así: una región tardía, compuesta por los genes L1 y L2 (*Late genes*) y una región temprana

compuesta por los genes E1, E2, E4, E5, E6 y E7 (*Early genes*) (34,35). No obstante, dicho orden de transcripción ocurre parcialmente en los genes codificantes, pues sus ORFs se encuentran superpuestos, empalmados de manera diferencial y comparten el extremo 3' (figura 4). Los genes de la región tardía codifican para proteínas estructurales, los de la región temprana codifican para proteínas funcionales y la región de control contiene el origen de replicación y elementos de respuesta para factores de transcripción propios o de la célula huésped (35,36).

Figura 4. Estructura genómica del Virus del Papiloma Humano (VPH)
En verde: región reguladora. En rojo: región temprana. En azul: región tardía.
Tomado de: (37)



1.3.3 ESTRUCTURA PROTEICA

Las proteínas del VPH tienen el mismo nombre del gen que las codifica (figura 5); se expresan de manera diferencial según el tipo de VPH y son factores clave en los diferentes procesos necesarios para el establecimiento y mantenimiento de la infección (31). Las proteínas tempranas son E1, E2, E4, E5, E6 y E7. E1 (73kDa) es una de las involucradas en el inicio de la replicación del ADN viral, al unirse al sitio de origen de replicación del ADN celular, formando un complejo con actividad helicasa, y junto a diferentes factores virales y celulares permite el desenrollamiento de la doble hebra (38).

E2 (41kDa) es la principal proteína reguladora del virus, se involucra especialmente en el control de la transcripción de las demás proteínas virales, aunque también interviene en la replicación del ADN viral, al apoyar la acción de E1 formando un complejo hexamérico con esta. Adicionalmente, E2 logra la integración del ADN viral con el de la célula

huésped en la fase de mitosis, mediante su unión a la cromatina mitótica, lo que garantiza no solo la coordinación con el ciclo replicativo de esta, sino el paso del genoma viral a la célula hija. Cabe resaltar que esta última función solo ocurre en algunos tipos de VPH y es clave para la persistencia del virus en el tejido infectado, ya que en otros tipos su actividad se centra en mayor medida en funciones de control transcripcional (38).

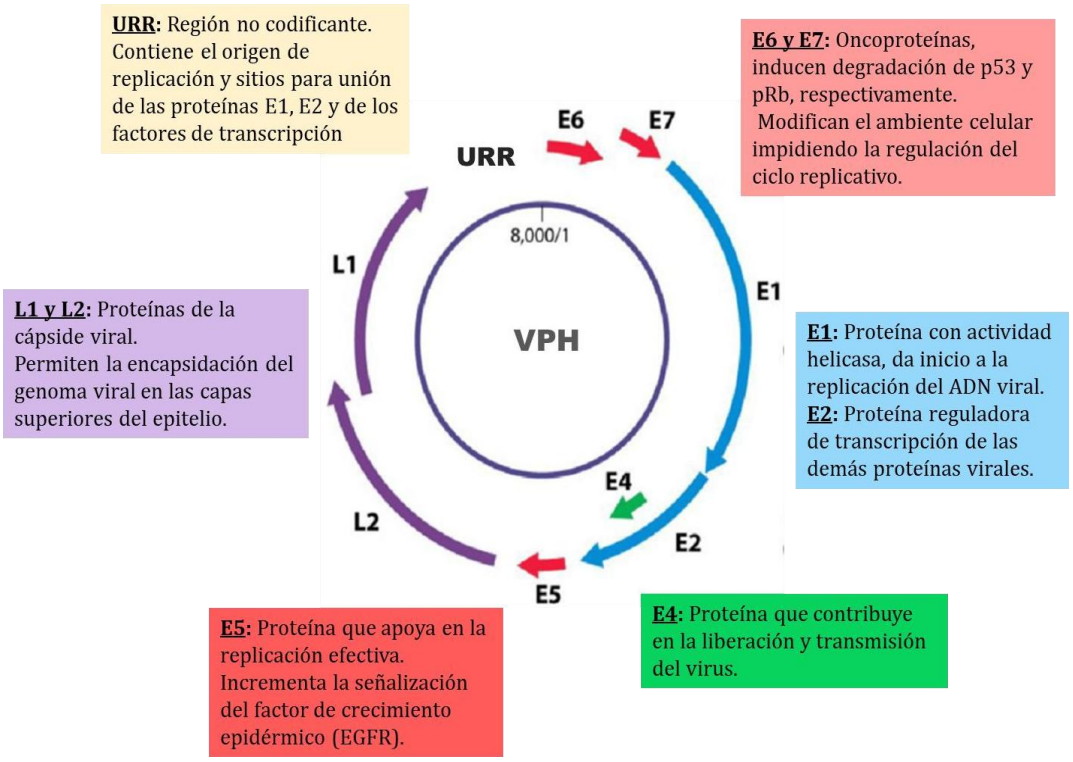
E4 (10kDa) es una proteína cuya función es aún desconocida; se sabe que su expresión tiene lugar en la etapa final del ciclo viral, cuando se completa la formación de nuevos viriones, favoreciendo su maduración y liberación (33).

La proteína E5 (9kDa) apoya la función de otras proteínas virales facilitando la disponibilidad de factores celulares a través del reclutamiento de estos, al tener una ubicación transmembranal en el retículo endoplasmático; conjuntamente, contribuye en la evasión de la respuesta inmune al reducir los niveles de Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) clase I en la superficie celular, mediante la retención del mismo y regula positivamente la señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (33).

E6 y E7 se denominan oncoproteínas, pues en algunos tipos de VPH desarrollan un elevado potencial de interacción con importantes factores y proteínas reguladoras del ciclo replicativo de la célula huésped, de manera que logran tomar el control del mismo y modificar su regularidad; así mismo tienen incidencia en la regulación de la apoptosis celular y la respuesta inmunológica del organismo (39).

Las proteínas tardías L1 y L2 se expresan cuando el virus alcanza las capas superiores del epitelio infectado y son proteínas estructurales, puesto que conforman la cápside viral. L1 es una proteína de 531 aminoácidos con un peso molecular de 55 kDa y representa el 90% de la cápside viral; cinco monómeros de esta se unen para formar una estructura pentamérica que resulta ser bastante inmunogénica, además, es la que interactúa con algunos de los receptores de superficie de la célula huésped, tales como heparán-sulfato, sindecano 3 e integrina alfa-6, para permitir el ingreso del virión (40). L2 (50kDa) se ubica en la parte interna de la estructura pentamérica antes mencionada, contribuyendo tanto en la unión a receptores celulares en la entrada del virión, como en el direccionamiento del ADN viral hacia los centros replicativos del núcleo, una vez se logra el ingreso (41).

Figura 5. Principales funciones de proteínas de expresión temprana y tardía del VPH.
Tomado y modificado de: (40)



1.3.4 ONCOPROTEÍNAS DEL VPH

E6

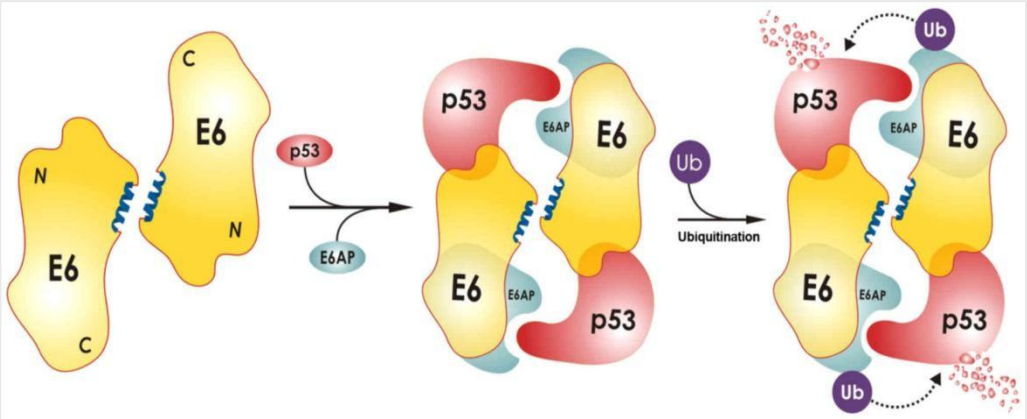
La proteína E6 tiene en promedio, un peso molecular de 18 kDa, compuesta por aproximadamente 158 aminoácidos, con un dominio de dedos de zinc en cada extremo, siendo el del extremo N-terminal, útil para su dimerización en el ambiente celular (42). En los VPH de alto riesgo, E6 presenta un dominio de unión a PDZ en su extremo C-terminal, que resulta ser una característica estructural determinante en la degradación de proteínas involucradas en la organización celular, las cuales contienen en su estructura un dominio PDZ (43).

Esta proteína cumple variedad de funciones encaminadas al mantenimiento y progresión de la infección, al asegurar la proliferación del virus a través de la eliminación de la capacidad celular para identificar y reparar daños en el material genético, logrando aumentar en gran medida la frecuencia de replicación celular (42,44).

Su rol más importante es la inducción de la degradación de p53 (proteína supresora de tumores y comúnmente conocida como el guardián del genoma celular), la cual lleva a cabo al formar dímeros, por la unión de sus dominios N-terminal, que reclutan una ubiquitina ligasa celular de tipo E3 llamada proteína de unión a E6 (E6 – AP); al formar este complejo se induce la poliubiquitinación y por ende la degradación de p53 (figura 6) (45). Otro mecanismo que E6 emplea para interrumpir la función de p53 es evitar la unión a su secuencia diana en el genoma e impedir que efectúe su señalización al retenerla en el citoplasma. Todo esto implica drásticas consecuencias como la alteración del ciclo celular y la inhibición de la apoptosis (46).

Así mismo, tiene la capacidad de regular positivamente la expresión de la telomerasa hTERT e interactuar con factores de la respuesta inmune innata contra infecciones virales (47).

Figura 6. Mecanismo de degradación de p53 mediado por la proteína E6 de VPH.
Tomado de: (33)

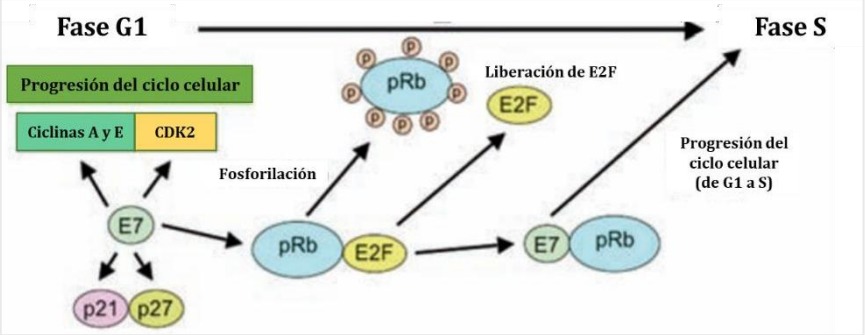


E7

E7 es una proteína de alrededor de 100 aminoácidos y 11 kDa que cumple funciones clave en la inducción de la proliferación celular. Su papel primordial es impedir la acción de la proteína de retinoblastoma (pRB, supresora de tumores); para ello, se une a esta, de manera que obstaculiza su interacción con los factores de transcripción E2F, la cual ocurre naturalmente como mecanismo de control para detener la entrada del ciclo celular a fase de síntesis (S). Entonces, como E2F se disocia, induce la expresión de sus genes diana, generando un aumento de ciclinas A y E que incitan al ingreso prematuro a fase de

síntesis y progresión del ciclo celular. Así mismo, apoya la inmortalización celular anulando la acción de p21 y p27, importantes inhibidores de las quinasas dependientes de ciclinas (CKI), sobre la quinasa dependiente de ciclina tipo 2 (CDK2), lo que también permite estimular el paso de la fase G1 a S (figura 7) (48).

Figura 7. Mecanismo de acción de proteína E7 de VPH para progresión de fase G1 a S.
Tomado y modificado de: (49)



1.3.5 TIPOS DE VPH

Desde que la especie humana se convirtió en su hospedero, el VPH ha evolucionado al punto que hoy en día se conocen al menos 400 tipos diferentes que, tal como se mencionó anteriormente, se han clasificado según las diferencias en su secuencia genética y el tipo de infección que causan, variables que se encuentran estrechamente relacionadas (6). Teniendo en cuenta esto, se clasifican en VPH de alto y bajo riesgo de inducir desarrollo canceroso en el epitelio infectado.

VPH DE BAJO RIESGO

Los VPH de bajo riesgo comprenden la mayoría de los tipos descritos. Estos VPHs al infectar el tejido no causan sintomatología y cuando la ocasionan, generan lesiones benignas, indoloras, que se presentan como papilomas (con aspecto de coliflor, que sobresalen haciendo relieve en el tejido), normalmente conocidas como verrugas (50). Los VPH de bajo riesgo tienden a eliminarse por acción del sistema inmune del organismo infectado y cursan su ciclo de vida con una cantidad relativamente pequeña de productos génicos virales los cuales se encuentran de forma episomal.

VPH DE ALTO RIESGO

Los VPH de alto riesgo presentan un elevado potencial oncogénico que depende de factores como el genotipo del virus, capacidad de integración de su genoma en el de la célula huésped y estado inmunológico del organismo infectado, así como otros factores epigenéticos. Si la infección sobrepasa todos esos factores y logra integrar su genoma, genera afectaciones en el mecanismo de división celular, adueñándose del proceso de síntesis de ADN de la célula huésped y ocasionando un gran número de variaciones que resultan en la proliferación celular e inhibición de apoptosis (7).

Una de las principales diferencias que distingue el tipo de VPH, es que los de bajo riesgo no suelen utilizar sus proteínas E6 y E7 para impulsar la proliferación celular, sino para replicarse y seguir produciendo viriones. Esto es consecuencia de una regulación transcripcional diferencial y también de disimilitudes en la función de las proteínas virales (51).

Respecto a los VPH asociados al cuello uterino, actualmente, se clasifican en tres grupos. Los de alto riesgo: relacionados con carcinogénesis, los de posible alto riesgo que en algunos casos se han encontrado como carcinogénicos y los de bajo riesgo: que no se han encontrado asociados a CaCU. En la tabla 2 se relacionan los genotipos de VPH clasificados en cada grupo (52).

Tabla 2. Genotipos de VPH asociados a CaCU

Genotipos de VPH según su potencial para inducir Cáncer de Cuello Uterino	
ALTO RIESGO	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68
POSIBLE ALTO RIESGO	26, 53, 69, 73, 82
BAJO RIESGO	6, 11, 40, 42, 43, 44, 53, 54, y 70

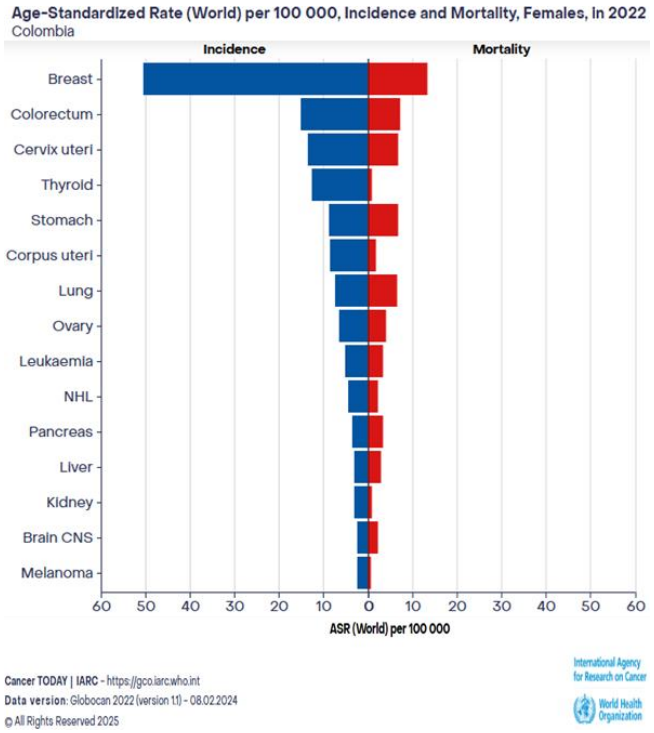
1.4 CÁNCER DE CUELLO UTERINO (CaCU)

La aparición y acumulación de tumores desarrollados debido a cambios anormales en las células del cuello del útero (región comprendida entre la parte inferior del útero y la vagina), se conoce como Cáncer de Cuello Uterino (53). Este cáncer es la muestra de cómo una infección viral puede desencadenar una enfermedad maligna, cuando además se presentan factores epigenéticos que propician la persistencia y progresión de la infección, tales como tabaquismo, alimentación poco saludable, precocidad y

promiscuidad sexual, entre otros (54). La infección por tipos de VPH de alto riesgo interrumpe la función normal de las principales proteínas celulares e interfiere en la expresión de productos genéticos (55).

El Cáncer de Cuello Uterino es el cuarto más común en mujeres de todo el mundo, con una incidencia de 14,1 y una mortalidad de 7,1 por cada 100.000 habitantes, con 662.301 casos nuevos reportados y 348.874 muertes en 2022, según cifras reportadas por GLOBOCAN para ese año (56,57). En Colombia, la incidencia fue 13.1 y la mortalidad 6,9 por cada 100.000 habitantes, como se muestra en la figura 8. Según de datos de la Cuenta de Alto Costo del Ministerio de Salud y Protección Social, en 2022 se presentaron 3.168 casos nuevos reportados (58).

Figura 8. Tasa de incidencia y mortalidad de CaCU en Colombia, 2022.
Tomado y modificado de: (56)



1.4.1 PROGRESIÓN DE LA INFECCIÓN POR VPH A CaCU

Las células basales del epitelio de transformación del cuello uterino (zona de transición

de endo-cervical a exo-cervical) son la fuente de origen de la infección por VPH, el cual logra ingresar a través de heridas o microabrasiones (59). La infección de estas células basales permite al virus su larga estancia en el tejido, pues estas cumplen un proceso de diferenciación dentro del epitelio y van avanzando hasta formar parte de las capas superficiales del mismo. Una vez dentro de la célula, la replicación viral ocurre lentamente y se mantiene estable durante la división de las células basales estableciéndose en forma de episomas en regiones específicas del núcleo. Posteriormente, E2 une el genoma viral a la cromatina del huésped, garantizando así que las polimerasas celulares lo repliquen también en toda la progenie (60).

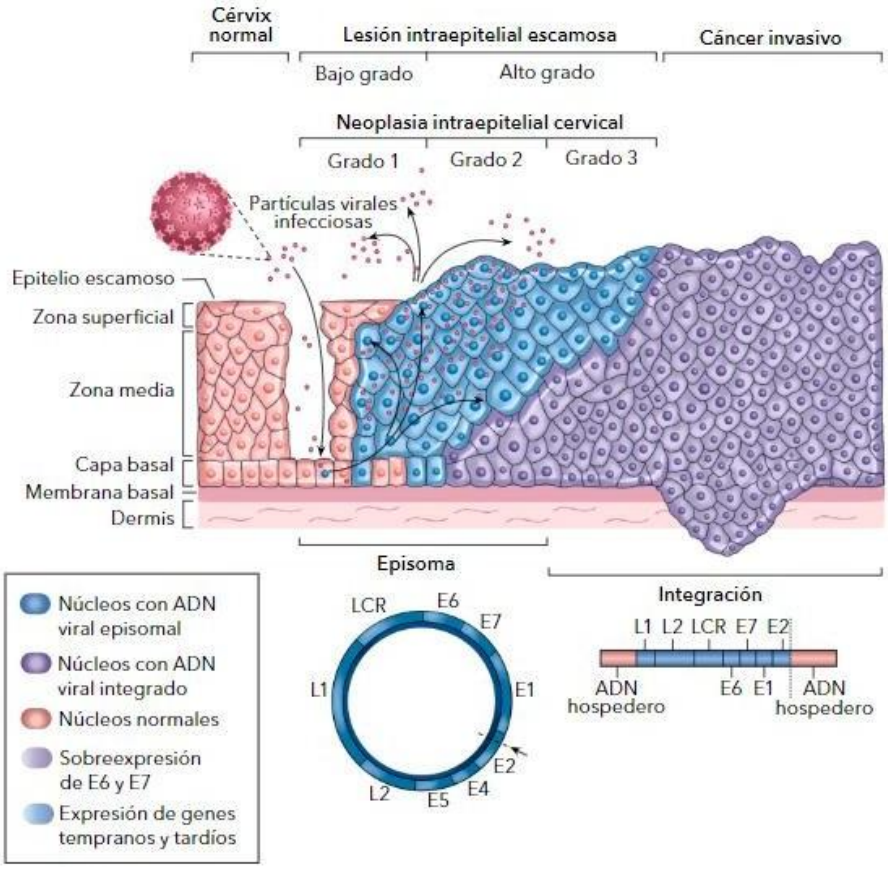
En las células infectadas de las capas superiores del epitelio, el ensamblaje del virión comienza en el núcleo, donde se produce la cápside y el empaquetado del genoma. Dado que el VPH es un virus no lítico, los viriones sólo se liberan cuando las células infectadas alcanzan las capas superficiales granulares del epitelio (61,62).

Al alcanzar la zona media del epitelio, las células disminuyen su potencial de proliferación y aumentan su diferenciación, como el VPH depende en gran medida de la maquinaria de la célula huésped para la replicación y traducción de su genoma, retrasa el proceso normal de diferenciación terminal del tejido, para que las células continúen efectuando sus mecanismos de proliferación (63).

A medida que avanza la infección y el genoma viral se incorpora a la célula huésped, dejan de liberarse viriones, la expresión de las oncoproteínas produce la alteración del ciclo celular, acumulación de daño genético, inhibición de apoptosis y evasión de respuesta inmune; asegurando la persistencia del virus en el tejido (8). Las células responden al daño del ADN, intentando reparar sus estructuras dañadas, sin embargo, la división celular continúa ocurriendo aún con alteraciones genéticas, dando lugar al desarrollo de lesiones en el tejido epitelial, tal como se observa en la figura 9 (53).

En el 90% de los casos, el VPH solo infecta el tejido, manteniendo su genoma episomal dentro de la célula (con baja expresión de oncoproteínas), sin causar enfermedad; las infecciones, por tanto, son transitorias y tienden a resolverse gracias a la respuesta eficaz del sistema inmune, que generalmente se activa luego de algún tipo de estímulo, volviéndose indetectables entre 12 y 24 meses (no logran progresar a cáncer) (63).

Figura 9. Etapas de la infección por VPH y transición a la enfermedad.
Tomado de: (53)

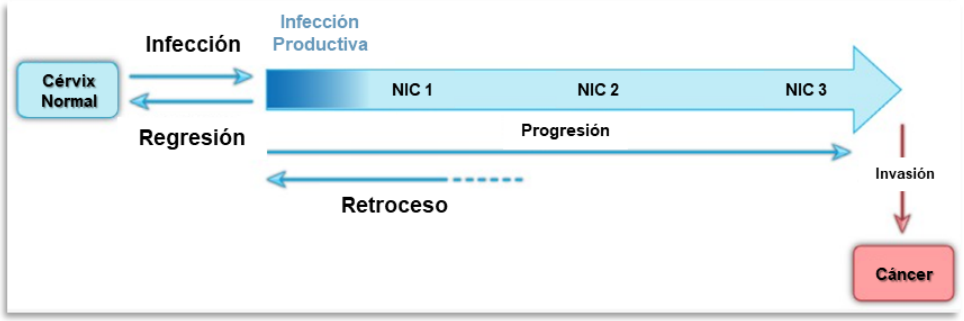


Por otro lado, cuando la infección persiste (propiciada por ciertos factores epigenéticos y debilidad del sistema inmune), se generan lesiones intraepiteliales que pueden ser leves o graves y se presentan como cambios morfológicos en el epitelio (64). Sin embargo, aún con desarrollo de lesiones, es posible la regresión y recuperación del epitelio, por lo que, solo un pequeño porcentaje de las lesiones logra progresar hasta ocasionar cáncer invasivo (65).

Los cambios morfológicos del epitelio inician con la aparición de una lesión leve: Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) grado I, clasificada como LSIL (Lesión Intraepitelial Escamosa de Bajo Grado), el 70% de estas son controladas espontáneamente sin necesidad de tratamiento (figura 10). El otro 30% puede progresar a lesiones precancerosas: Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) grado II y III, conocida como HSIL (Lesión Intraepitelial Escamosa de Alto Grado) (66). Se ha evidenciado que el 25 al 55% de las NIC II logran regresión y restablecimiento del epitelio. Las que logran

avanzar a NIC III se logran revertir con tratamiento, solo el 3% progresa a invasión cancerosa (8).

Figura 10. Evolución de las lesiones cervicales ocasionadas por VPH alto riesgo. Tomado y modificado de: (66)



1. 5 TÉCNICAS DE DETECCIÓN DEL VPH

Entendiendo la posibilidad de prevenir el CaCu gracias a la detección temprana de infección por VPH de alto riesgo, para posterior identificación de presencia de lesiones precancerosas; actualmente existen variedad de pruebas disponibles para detección de VPHar, que emplean técnicas tanto inmunológicas como moleculares dirigidas a uno o varios blancos analíticos. Las técnicas moleculares presentan niveles de sensibilidad y especificidad entre 92 y 98%, generalmente están dirigidas a la detección de 14 genotipos de alto riesgo, unas detectan los genes que codifican para las proteínas L1 y L2 y otras para las proteínas E6 y E7, con genotipificación individual normalmente solo de VPH16 y VPH18; algunas de las más usadas en Colombia incluyen *BD HPV Onclarity Assay. Cobas HPV test* y *Xpert HPV.* Otras técnicas están dirigidas a la detección de transcritos de E6 y E7, para los mismos 14 genotipos, como *APTIMA VPH (67).*

Por su parte, las técnicas de detección inmunológica más comunes generalmente solo detectan VPH 16 y VPH18, siendo sus blancos de detección las proteínas E6 y E7, como los kits de *OncoE6 Cervical Test* y *CERVIMAX IHC/WB/FC/IC (68).*

2. ANTECEDENTES

El VPH fue relacionado por primera vez con lesiones genitales, a inicios de la década de los 70´s, cuando Harald zur Hausen, de la Universidad de Heidelberg en Alemania, detectó genoma del VPH en muestras de verrugas genitales luego de encontrarlo en verrugas en otras partes del cuerpo; detectando también que se trataba de diferentes tipos del mismo virus, causando cada una de estas lesiones (59). A mediados de esta década, en 1976, Hausen y su equipo, estudiando muestras de tumor de cuello uterino, identificaron otros dos tipos diferentes de VPH que estaban presentes solo en estos tumores (60); fue así como se empezó a reconocer el VPH como agente etiológico del cáncer de cuello uterino (42).

A partir de este postulado, otros investigadores en todo el mundo continuaron estudiando la relación del VPH con esta clase de lesiones e identificaron otros tipos del virus, por lo que en 1985 se organizó el Centro Internacional de Referencia de VPH en el Centro Alemán de Investigación del Cáncer, para referenciar los nuevos tipos que se iban determinando, verificar su genoma completo y asignarles un nuevo número único de tipificación (26).

Posteriormente, en 1995, se concretó la que actualmente es la forma de clasificación y asignación de nuevos tipos del VPH, que consiste en que, para que sea considerado como tal y se le asigne un número (en orden cronológico según la fecha de descubrimiento), la secuencia del gen más conservado, el gen L1 debe ser diferente en >10% con respecto a los otros tipos ya determinados (27). Adicionalmente, se agruparon en 5 géneros (α-papilomavirus, β-papilomavirus, γ-papilomavirus, μ-papilomavirus y ν-papilomavirus), donde los tipos pertenecientes a un género deben tener similitud <60% en la región del gen L1 respecto a los de los demás géneros (26). Esta agrupación de los 5 géneros los relaciona no solo con semejanzas en su composición genética, sino también con sus capacidades patogénicas y el tropismo o afinidad por tejidos epiteliales específicos, encontrando que los α-papilomavirus pueden infectar epitelio tanto cutáneo como mucoso, mientras que los β, γ, μ, y ν-papilomavirus infectan solo epitelio cutáneo. En el género α-papilomavirus se encuentran los VPH de interés para este estudio, pues poseen

la capacidad de lograr una infección persistente que desencadena en la aparición de Cáncer de Cuello Uterino (6).

Luego de obtener una amplia evidencia epidemiológica y experimental acerca de la capacidad carcinogénica de algunos tipos sobre otros, en el 2012, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) estableció una nueva clasificación, organizándolos en tres categorías: grupo 1 (carcinógenos), grupo 2A (probablemente carcinógenos) y grupo 2B (posiblemente carcinógenos). Actualmente, se identifican como tipos de alto, posible y bajo riesgo. (51).

Al entenderse la relación del VPH con el cáncer de cuello uterino, se generaron propuestas respecto al desarrollo de una vacuna para prevenir la infección con este agente. La idea inicial se dio en 1986, por parte de Zur Hausen, quien continuando con sus estudios intentó desarrollarla; sin embargo, su idea fue rechazada por las compañías farmacéuticas porque no parecía un proyecto rentable (69). Más tarde, en 1990, los Drs. Ian Frazer y Jian Zhou iniciaron su trabajo juntos en la producción de la cápside del VPH 16, expresando las proteínas que la conforman en células renales de mono; un año después, luego de varios experimentos, determinaron que una vacuna para prevenir el VPH debía basarse en proteínas de la cápside, conocidas actualmente como Partículas Similares a Virus (VLP) e iniciaron su producción, aunque con un bajo rendimiento (70).

En 2002 se publicó el primer estudio (realizado por Merck) que estimaba la eficacia de la vacuna VLP VPH16 monovalente en mujeres sexualmente activas, encontrando que al aplicarla se inducía inmunidad esterilizante en la mayoría de los pacientes (69). No obstante, esto ocurría solo para infecciones con VPH16, ya que se seguía detectando infección, pero por otros tipos de VPH. Más adelante, en un ensayo realizado por GlaxoSmithKline (GSK) con una vacuna bivalente VLP VPH16/18 se consiguieron resultados análogos contra la infección por VPH16/18 (71).

Gracias a los diferentes estudios realizados, se demostró que la infección por VPH puede prevenirse más no curarse gracias a la aplicación de la vacuna; por lo que, en 2007, se autorizaron en muchos países las vacunas contra el VPH basadas en VLP (70). Dichas vacunas se conocen comercialmente como Cervarix, de GSK (bivalente, compuesta por VLP de VPH-16 y VPH-18 producido en células de insecto) y Gardasil de Merck

(tetravalente, compuesta por VLP de VPH-16, VPH-18, VPH-6 y VPH-11, producidos en levaduras) (71).

Otro de los campos ampliamente estudiados en cuanto a la identificación del desarrollo de Cáncer de Cuello Uterino ha sido la búsqueda del método adecuado para detección a partir de muestras clínicas. Desde 1941 dicha detección se realizaba únicamente, mediante el estudio de la morfología de las células del cuello para determinar si existía algún tipo de cambio inusual o degeneración celular, el método de Papanicolaou (por George Papanicolaou, citopatólgo que lo desarrollo); el cual es altamente específico y se consideraba el método de oro para esta detección (72).

No obstante, con los hallazgos iniciales de Zur Huasen, se iniciaron investigaciones para generar una técnica de detección de VPH en muestras clínicas que permitiera identificar el riesgo de desarrollar dicho cáncer y así complementar el método de Papanicolaou que, a pesar de ser altamente específico, presentaba una baja sensibilidad (73).

En 1980, la compañía BLT (Life Technology) creó un kit comercial para detección molecular de VPH; luego de extensos estudios e identificación de nuevos tipos de VPH, en 1988 lograron tener la aprobación FDA para comercializar el kit ViraPap (74).

En 1999 Digene logró la aprobación FDA del kit de Captura Híbrida, que consistía en la hibridación de ADN de VPH presente en muestras clínicas, con secuencias de ARN marcadas disponibles en el kit; dicha hibridación (que se daba si la muestra estaba positiva) se detectaba mediante anticuerpos que reconocían la formación del híbrido ADN-ARN (74).

Esta técnica fue el punto de partida para el diseño y desarrollo de un gran número de técnicas moleculares para detección de la infección, usando diferentes métodos para el genotipado parcial o extendido de los diferentes genotipos de alto riesgo identificados hasta el momento; algunas se basan en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real, otras en el análisis del Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP), otras en ensayos de hibridación (73,75); a tal punto, que hoy en día existen aproximadamente 254 pruebas comerciales y se han identificado más de 425 variantes de esas pruebas (73).

Cabe resaltar que algunas de las pruebas mencionadas se usan como tamizaje para la predicción del posible desarrollo de un Cáncer de Cuello Uterino (75), tales como la citología cervicovaginal, con una sensibilidad de 79% y especificidad de 81% y la prueba de detección de ADN del VPH por PCR, con sensibilidad de 92%, y una especificidad de 76% (76). Dicho tamizaje en Colombia se realiza a mujeres que han iniciado vida sexual, según el grupo etario en que se encuentren; hasta los 29 años, se realiza estudio de citología, en caso de resultado negativo, se repite el estudio en 1 año; en caso de resultado positivo, se realiza prueba de detección de ADN del VPH por PCR, en caso que esta resulte positiva, se realiza colposcopia y biopsia para definir manejo y tratamiento. Para las mujeres de 30 años en adelante, el tamizaje inicia con detección de ADN del VPH por PCR y solo en caso de resultado positivo se realiza citología y demás estudios (75,77).

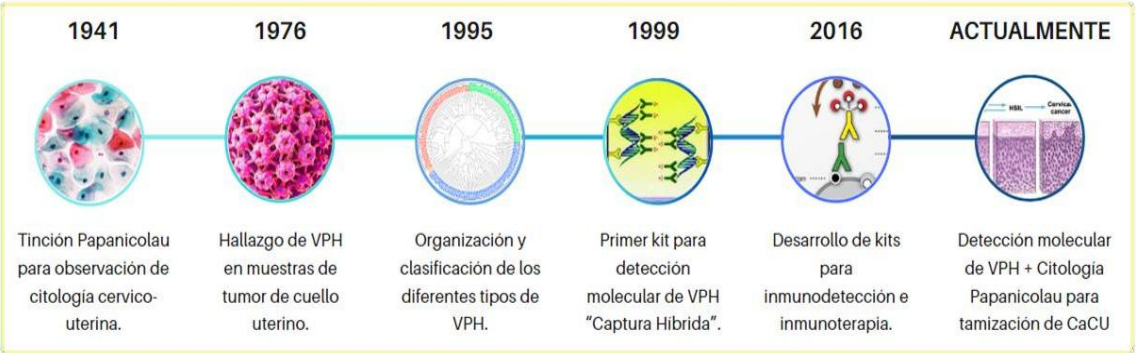
Lo anterior se modifica en las zonas rurales dispersas del país, donde es limitado el acceso a las diferentes pruebas de tamizaje y diagnóstico, así como al personal de salud especializado; por lo cual, en estas zonas tan solo se usa la técnica de Inspección Visual con Ácido Acético y Lugol (VIA VILI, por sus siglas en inglés) que se ha reportado tan sensible como la citología cervicovaginal, pero menos específica y consiste en visualizar el cuello del útero por medio de especuloscopia; y mediante la aplicación secuencial de dos reactivos sobre la superficie cervical, determinar la presencia de lesiones precancerosas o cancerosas y determinar si requieren tratamiento inmediato, que puede realizarse por crioterapia (77,78).

En cuanto a la investigación para aplicación de técnicas inmunológicas se han obtenido dos tipos de resultados; el diseño de pruebas para la detección serológica de anticuerpos y el diseño de pruebas basadas en métodos inmunológicos para la detección de antígenos del virus. El primero no ha sido muy efectivo debido principalmente a que, la presencia de anticuerpos anti-VPH en el suero no indica específicamente que exista una infección activa de VPH o que exista riesgo de carcinogénesis inducida por VPH, sino que puede deberse a múltiples razones que limitan en gran medida este método, como la presencia de títulos anti-VPH por vacunación, infección pasada donde el virus ya se eliminó, pero persisten los anticuerpos o presencia de anticuerpos inespecíficos con reactividad cruzada (79).

Por otro lado, el diseño de pruebas basadas en métodos inmunológicos para la detección de antígenos del virus ha demostrado ser más efectiva que las anteriores, pues se pueden producir anticuerpos que sean altamente sensibles y específicos de manera que logren identificar concentraciones bajas de antígeno viral (80), tal como se muestra en el estudio de Ferrera A. et al en el que se constata la efectividad en la detección de lesiones cervicales de alto grado, mediante el uso de anticuerpos para detectar la oncoproteína E6 del VPH 16 y 18 en muestras cervicales (81). En Colombia predomina el uso de pruebas moleculares, las cuales son importadas y no existe desarrollo local de ningún sistema de detección.

De forma similar se ha usado la producción recombinante de la oncoproteína E6 de VPH para usarla como antígeno en la realización de estudios básicos, estandarización y desarrollo de kits de diagnóstico e inmunoterapias. Así pues, en 2016 se logró la producción y purificación de las proteínas E6 de VPH16, VPH18 y VPH11 como moléculas solubles y estables, en cepas competentes de *E. coli;* dichas proteínas estaban etiquetadas con His6, sin ninguna modificación adicional en la secuencia de aminoácidos y se purificaron mediante cromatografía de afinidad usando resina de agarosa con ácido ni-nitrilotriacético (Ni-NTA; Qiagen) (figura 11) (43).

Figura 11. Evolución de la relación del VPH con el CaCU



A pesar de la variedad de técnicas disponibles para lograr la prevención del cáncer de cuello uterino, en Colombia se presentan diversas barreras que obstaculizan la posibilidad de tamizaje y diagnóstico en toda la población involucrada, especialmente en las zonas rurales del país, donde se hacen más evidentes estas limitaciones, tales como el diagnóstico inoportuno y la desinformación, que dirige a la creencia de que la infección

está directamente ligada con prácticas sexuales inseguras (promiscuidad), la resistencia a la toma de muestra, la ausencia de registros respecto a detección previa de lesiones preneoplásicas y la difícil accesibilidad a las pruebas disponibles en el país, debido principalmente a la centralización de los servicios de laboratorio especializado, razón por la cual se vuelve ineficiente la detección del cáncer de cuello uterino en estas zonas (82).

3. JUSTIFICACIÓN

La oncoproteína E6 de los VPH de alto riesgo cumple diversas funciones encaminadas al mantenimiento y progresión de la infección, pues asegura la proliferación del virus a través de la eliminación de la capacidad de las células huésped para identificar y reparar daños en el material genético, logrando aumentar en gran medida la frecuencia de replicación celular, por lo cual su expresión ocurre en etapas avanzadas de la infección, cuando inicia la formación de lesiones precancerosas (65).

Teniendo en cuenta lo anterior, la identificación de una región conservada entre las secuencias de la oncoproteína E6 de los VPH de alto riesgo, que permitan la generación de anticuerpos capaces de reconocer más de un tipo de este virus, constituiría la fase inicial para la producción a futuro de pruebas inmunológicas de amplio análisis y rápido resultado, que apoyen el diagnóstico del Cáncer de Cuello Uterino en las zonas rurales dispersas del país, de manera que estén disponibles junto a las técnicas de inspección visual durante las brigadas de prevención y detección, obteniendo resultados en el momento de la atención, reduciendo significativamente el tiempo de respuesta e incrementando así, la posibilidad de un diagnóstico oportuno, permitiendo la toma de decisiones respecto a la necesidad de tratamiento inmediato, en pro de la salud de la paciente.

Los anticuerpos mencionados pueden desarrollarse a partir de tecnología de ADN recombinante, que permite la producción de proteínas heterólogas, que puedan ser usadas como antígenos específicos en la generación de anticuerpos de captura en una inmunodetección. En el Grupo de Investigación Laboratorio de Investigaciones Básicas Bioquímica (LIBBIQ) es posible la ejecución y elaboración de estas herramientas, gracias a que ha desarrollado una robusta plataforma para la producción de proteínas y anticuerpos recombinantes, cuenta con protocolos establecidos para ello y posee la infraestructura, equipos e insumos necesarios, de modo que permite llevar a cabo investigaciones como las del presente proyecto.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Producir anticuerpos policlonales en modelo aviar, anti oncoproteína E6 del Virus del Papiloma Humano (VPH) de alto riesgo, que constituyan una herramienta inmunológica como apoyo en el diagnóstico del Cáncer de Cuello Uterino.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar mediante aplicaciones bioinformáticas, regiones conservadas y/o inmunogénicas entre las secuencias de la oncoproteína E6 de los genotipos de alto riesgo del VPH encontrados con mayor frecuencia en Colombia.

2. Obtener proteína recombinante a partir de las regiones identificadas de la oncoproteína E6 en el estudio bioinformático, empleando un sistema de expresión bacteriano.

3. Generar anticuerpos policlonales anti oncoproteína E6 del VPH posterior a la inmunización de un modelo aviar usando como antígeno la proteína recombinante obtenida.

4. Evaluar el grado de sensibilidad y especificidad de los anticuerpos anti oncoproteína E6 del VPH generados.

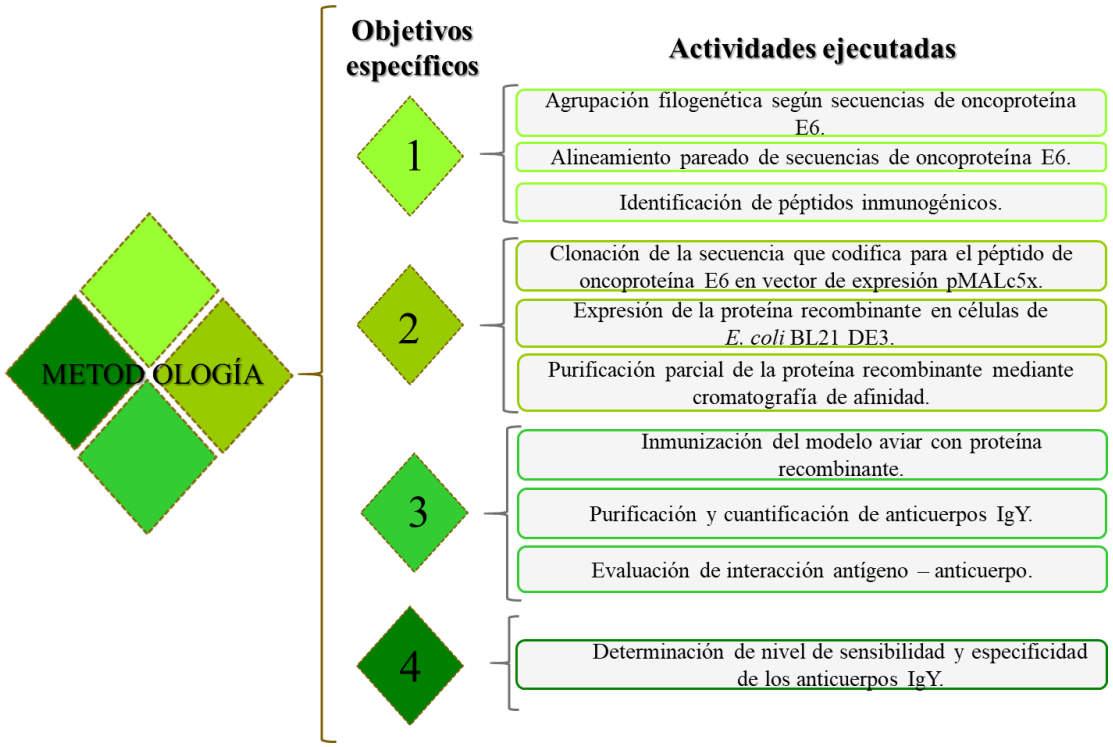
5. METODOLOGÍA

Para alcanzar el objetivo propuesto para este proyecto de investigación se diseñó una estrategia metodológica compuesta por cuatro fases, en concordancia con los objetivos específicos formulados, tal como se muestra en la figura 12. Inicialmente se analizó mediante herramientas bioinformáticas la oncoproteína E6 de los VPH de alto riesgo más comunes en Colombia, en busca de regiones conservadas y/o regiones inmunogénicas en su secuencia proteica. Esto permitió la identificación de péptidos que pueden ser usados como blanco para la detección de 16 tipos de VPH alto riesgo.

Posteriormente, se seleccionó uno de los péptidos identificados, para la clonación de su secuencia codificante en el vector de expresión pMALc5X, con el fin de lograr la producción de una proteína recombinante en el sistema heterólogo *E. coli* cepa BL21 DE3. Una vez se obtuvo la proteína parcialmente purificada, se inoculó en el modelo aviar para la generación de los anticuerpos.

Finalmente, para evaluar y caracterizar los anticuerpos generados, se realizaron ensayos de sensibilidad y especificidad frente al reconocimiento de la proteína empleada como antígeno.

Figura 12. Estrategia metodológica aplicada.



5.1 ESTUDIO BIOINFORMÁTICO

Se emplearon herramientas computacionales con el propósito de analizar la oncoproteína E6 de cada uno de los VPH de alto riesgo en estudio. Inicialmente, se utilizaron los programas UNIPROT y EXPASY'S PROTPARAM (83,84) para obtener las propiedades fisicoquímicas tales como peso molecular, secuencia de aminoácidos, porcentaje de aminoácidos con carácter polar y apolar, estimación de estructura terciaria, punto isoeléctrico e índice de inestabilidad.

5.1.1 ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Partiendo de la secuencia de cada oncoproteína E6, se ejecutó un análisis filogenético usando la herramienta T-COFFEE (85), con el fin de establecer la cercanía molecular entre los diferentes tipos de E6.

5.1.2 ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS PROTEICAS

Con base en el análisis filogenético se usó la herramienta CLUSTAL OMEGA (86) para realizar el alineamiento de las secuencias que resultaron más estrechamente relacionadas, a fin de identificar la presencia de secuencias conservadas entre las oncoproteínas E6 de cada tipo de VPH analizado.

5.1.3 IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS INMUNOGÉNICOS

Las secuencias de las oncoproteínas E6 que no presentaron estrecha cercanía con las demás E6 analizadas, se sometieron a un análisis en el servidor PREDICTED ANTIGENIC PEPTIDES (87), para obtener una estimación bioinformática de la presencia de péptidos con propiedades antigénicas.

Considerando los hallazgos del estudio bioinformático, se seleccionó una de las secuencias identificadas, correspondiente a la oncoproteína E6 de uno de los VPH alto riesgo más frecuentes en Colombia, para continuar con la aproximación experimental.

5.2 OBTENCIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE

5.2.1 CLONACIÓN DE SECUENCIA CODIFICANTE DEL PÉPTIDO E6VPH16

Amplificación de región codificante

Se amplificó mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) la secuencia seleccionada del gen E6 del VPH 16, usando como plantilla ADN genómico del VPH 16 obtenido de muestras de cepillado cervical suministradas por el Laboratorio Clínico Especializado ULTGEN S.A.S (previa autorización de las pacientes propietarias de las muestras, mediante consentimiento informado).

La PCR se realizó en el termociclador "*MyCycler*" de Biorad, garantizando las condiciones descritas a continuación: 2mM de Buffer 1X (20mM Tris-HCl pH 8.8, 10mM KCl, 0.1% (v/v) Triton X-100, 0.1 mg/ml de BSA), 2.5 µM de $MgCl_2$, 0.2 mM de dNTPs, 0.2 µM de iniciadores directo y reverso (cuyas características se describen en la tabla 3), 1U de Taq polimerasa y 50ng de plantilla, para un volumen final de 15uL (56). Los productos de PCR obtenidos se evaluaron en gel de agarosa TBE (Tris-Borato-EDTA) al 1,5% (p/v) y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio.

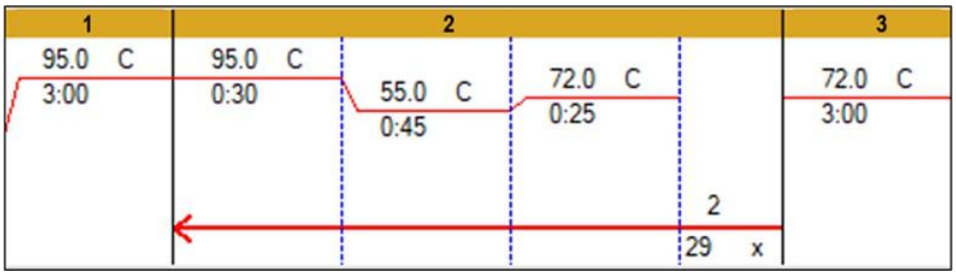
Cabe resaltar que esta amplificación se realizó con el propósito de obtener el fragmento a insertar en el vector de expresión mediante clonación por enzimas de restricción, por lo cual, los iniciadores usados en la reacción se diseñaron con adición de los sitios de restricción de las enzimas seleccionadas: EcoRI y SalI, así como adición de secuencias "*linker*" para favorecer la digestión de las enzimas (88).

Tabla 3. Iniciadores para PCR del fragmento E6 VPH16

INICIADORES E6 VPH16	**SECUENCIA**	**pb**	**GC %**	**Tm °C)**
Link - SalI – DIR	5' - CTGACAGTCGACACAGAGCTGCAAACAACT - 3'	30	50	66
Link - EcoRI - REV	5' - CAGTCAGAATTCAGCATATGGATTCCCATC - 3'	30	43	60

El perfil térmico establecido incluyó las siguientes etapas. Inicialmente, una denaturación a 95°C durante 15 minutos, la segunda etapa compuesta por 30 ciclos de denaturación a 95°C por 30 segundos, hibridación a 55°C por 45 segundos y extensión a 72°C por 25 segundos y la tercera etapa, para elongación final a 72°C por 3 minutos, como se ilustra en la figura 13.

Figura 13. Perfil térmico para PCR del fragmento de E6 VPH16



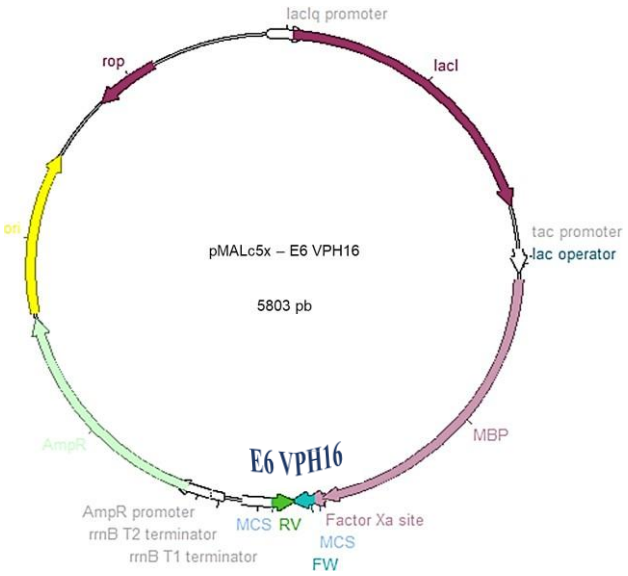
Una vez verificada la amplificación del fragmento E6 VPH16, el producto de PCR se sembró en gel de agarosa TAE (Tris-Acetato-EDTA) al 1,5% (p/v), luego de verificar la presencia de la banda en el peso molecular correspondiente al fragmento amplificado (159 pb), se cortó la banda y se purificó el fragmento aplicando el método *Squeeze & Freeze,* (89) tal como lo proponen Thuring *et al.*

Clonación en vector de expresión

El vector de expresión seleccionado para llevar a cabo la clonación del fragmento E6 VPH16 fue pMAL-c5x (90) ideal para transformación bacteriana. Dicho vector y el fragmento previamente purificado se sometieron a una doble reacción de digestión con las enzimas de restricción EcoRI y SalI, durante 4 horas a 37ºC, siguiendo las instrucciones del fabricante (Thermo Fisher) (91,92). Posteriormente se evaluó la digestión mediante electroforesis en gel de agarosa TBE al 1% (p/v) para el vector y al 1,5% (p/v) para el fragmento, con posterior visualización en bromuro de etidio.

Cada producto de digestión se purificó a partir de banda, siguiendo el método mencionado anteriormente (*Squeeze & Freeze*), para llevar a cabo la subsecuente reacción de ligación de inserto y vector en relación 18:1 respectivamente, siguiendo el protocolo sugerido para reacción con T4 ligasa (93), generando el constructo pMALc5X – E6VPH16, evaluado mediante gel de agarosa 0,8% (p/v) con posterior visualización en bromuro de etidio. La construcción *In silico* de este plásmido recombinante mediante el servidor ApE (94) se ilustra en la figura 14.

Figura 14. Construcción *In silico* de plásmido recombinante pMALc5X-E6VPH16.
Usando la herramienta: (94)



Para obtener la proteína recombinante se optó por un sistema de expresión bacteriano, por lo cual se emplearon células de *E. coli* cepa BL21 DE3 (95), teniendo en cuenta características como su bajo nivel de expresión de proteasas, su sencillo mantenimiento y compatibilidad con el vector de expresión usado. Sin embargo, el proceso de transformación con el vector recombinante se llevó a cabo inicialmente en la cepa de mantenimiento *E. coli* TOP10, con posterior criopreservación (96).

Preparación de células para transformación

Con el fin de obtener células aptas para el proceso de transformación, se llevó a cabo la preparación de células *E. coli* TOP10 y *E. coli* BL21 DE3 químicamente competentes. Para ello, partiendo de un inóculo líquido de cada cepa, se realizó una dilución 1/10 en medio de cultivo LB (Luria-Bertani), se incubó a 37°C en agitación constante (180 rpm) hasta que alcanzó una densidad óptica (DO) de 0,4 a 600 nm de absorbancia y se centrifugó a 4.000 rpm (rotor Microliter 30x2 sealed 75003652 ThermoFisher) durante 10 minutos en condiciones refrigerantes a 4°C. Seguidamente, se recuperó el botón de centrifugado, se realizó un primer lavado resuspendiéndolo suavemente en $CaCl_2$ a 100 mM (estéril, frío y fresco) y se incubó durante 10 minutos a 4°C. Pasado este tiempo se mezcló, se centrifugó en las mismas condiciones y se resuspendió suavemente en $CaCl_2$

de nuevo, realizando 3 lavados más. Al finalizar el tercer lavado, se resuspendieron las células en 1.750 mL de $CaCl_2$ y 750 µL de glicerol 100%. Por último, se prepararon alícuotas de 50 µL, que se almacenaron a- 80°C, reservando una alícuota fresca para la transformación (97).

Transformación de células *E. coli* TOP10 químicamente competentes

La inserción del vector recombinante pMALc5X – E6VPH16 en las células competentes de *E. coli* TOP10 se logró mediante la técnica de choque térmico, así: se adicionaron 3 µL del vector a 50 µL de células competentes, incubándolos durante 30 minutos a 4°C; pasado este tiempo, se sometieron a choque térmico, incubándolos a 42°C por 35 segundos. Luego, se transfierieron a 4°C por 3 minutos y se adicionan 250 uL de medio de recuperación SOC, para incubarlos 1 hora a 37°C, en agitación constante. Finalmente, se sembraron las células en medio de selección LB-ampicilina (100 µg/mL) y se incubaron toda la noche a 37°C (98).

Evaluación de células *E. coli* TOP10 transformadas

Las colonias obtenidas en el cultivo previamente mencionado, se verificaron con el objetivo de seleccionar aquellas en las cuales se logró la correcta inserción del vector recombinante; con tal efecto, se tomó muestra de cada colonia, se resuspendió en H_2O DEPC, se llevó a lisis por ebullición y se realizó PCR de colonia garantizando las condiciones descritas en el numeral 5.2.1. Los amplicones obtenidos para cada colonia fueron visualizados como se describió previamente mediante geles de agarosa – TBE.

Seguidamente, se seleccionó una de las colonias positivas del análisis anterior, se preparó un inóculo líquido de 15 mL en medio de selección LB – ampicilina y se incubó a 37°C con agitación constante (180 rpm) durante toda la noche para extraer el plásmido recombinante, siguiendo el protocolo de lisis alcalina planteado por Birnboim, H. C. (99); El plásmido obtenido se sometió a evaluación de integridad mediante gel de agarosa TBE 0,8% (p/v) y se usó como plantilla para corroborar por PCR la presencia del fragmento insertado. Así mismo, los amplicones obtenidos se sembraron el gel de agarosa TAE 1,5% (p/v), se purificaron a partir de banda siguiendo el método mencionado anteriormente (89) y se enviaron al Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia

(IGUN) para secuenciación Sanger, preparando la muestra en las condiciones sugeridas por el laboratorio.

Transformación y evaluación de la cepa de expresión *E. coli* BL21 DE3

Una vez obtenido y verificado el plásmido recombinante, este se usó para transformar células químicamente competentes de *E. coli* BL21 DE3 (cepa de expresión), aplicando el método de choque térmico (98) empleado con la cepa de mantenimiento. De igual forma, las colonias obtenidas en el cultivo de selección en agar LB-ampicilina (100 μg/mL) se llevaron a lisis por ebullición y se verificaron por PCR de colonia teniendo como blanco el fragmento clonado. Los productos de PCR se observaron en gel de agarosa TBE 1,5% (p/v) identificando así, las colonias positivas *E. coli* BL21 DE3 – pMALc5X E6VPH16 y seleccionando una para los siguientes ensayos de inducción de la expresión.

5.2.2 EXPRESIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE MBP – E6VPH16 (50 kDa)

Para lograr la obtención de la proteína recombinante MBP – E6VPH16 (MBP: Proteína de Unión a Maltosa, proteína etiqueta proporcionada por el vector de expresión – E6VPH16: péptido resultante del fragmento previamente clonado), la colonia *E. coli* BL21 DE3 – pMALc5X E6VPH16 seleccionada en el ensayo anterior, se inoculó en medio LB-ampicilina (100 μg/mL) – glucosa 1%, durante toda la noche a 37ºC, con agitación constante (180 rpm). Consecutivamente, se diluyó el cultivo 1:100 y se continuó la incubación hasta alcanzar una DO de 0,6 a una absorbancia de 600 nm, tomando una muestra de 1mL de cultivo. Con el propósito de inducir la expresión controlada de MBP-E6VPH16 se adicionó IPTG (Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido) 0,3mM y se modificaron las condiciones de incubación a 30°C, en agitación constante (160 rpm). Luego de 2 horas, se tomó otra muestra y se continuó la incubación, repitiendo este paso a las 4, 6 horas y al finalizar la incubación durante toda la noche; para determinar así, el tiempo óptimo de inducción (100).

Las cuatro muestras recolectadas se llevaron a medición de DO a 600 nm y se centrifugaron a 12.000 rpm (rotor Microliter 30x2 sealed 75003652 ThermoFisher) por 5 minutos, conservando el botón de centrifugado que fue resuspendido en buffer de carga 1x (Tris-HCl 0,5M pH 6.8, glicerol 30%, SDS 10%, β-mercaptoetanol 33%, azul de bromofenol 0.4mg/mL) para análisis de expresión mediante electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes SDS-PAGE, con geles preparados como se describe a continuación: un gel concentrador al 4% (acrilamida al 30% (29g acrilamida + 1g Bis acrilamida), H_2Od, Tris-HCl 0.5M pH 6.8, SDS 10%, PSA 10% y TEMED) y un gel separador al 12% (acrilamida 30%, H_2Od, Tris-HCl 1.5M pH 8.0, SDS 10%, PSA 10% y TEMED); antes de cargar en el gel, las muestras se llevaron a 92°C durante 7 minutos, se cargaron y se ajustó el potencial de corrida a 100 Voltios. Por último, se visualizó el gel mediante tinción con azul de Coomassie R-250 (101), esperando observar la presencia mayoritaria de proteínas en 50 kDa, correspondiente al peso molecular de la proteína recombinante.

Seguidamente, se colectaron las bacterias obtenidas luego de la incubación toda la noche, se centrifugaron a 4000 rpm durante 20 minutos en condiciones refrigerantes a 4 °C. Se descartó el sobrenadante, se estableció el peso húmedo de las bacterias y con base en este, se adicionó 5 mL/g de buffer de lisis (Tris-HCl 20mM pH 7.4, NaCl 200mM, EDTA 1mM, β-mercaptoetanol 10 mM), lisozima (1 mg/mL), una mezcla de inhibidores de proteasas (Sigma Aldrich) que contiene AEBSF 1 mM, E64 14 µM, Pepstatin A 15 µM, Bestatin 40 µM, Leupeptin 20 µM y Aprotinin 0,8 µM y se incubó a 4°C durante 30 minutos en agitación; pasado este tiempo se sometió a sonicación por 4 minutos bajo las siguientes condiciones: 50 % de amplitud, 15 segundos de pulso y 15 segundos de reposo. Por último, se centrifugó a 15.000 rpm (rotor Microliter 30x2 sealed 75003652 ThermoFisher) durante 30 minutos en condiciones refrigerantes a 4°C, obteniendo una fracción soluble (sobrenadante) y una fracción insoluble (90).

Las fracciones fueron evaluadas mediante SDS-PAGE 12%, con posterior visualización en azul de Coomassie R-250, para verificar en cuál de estas se obtuvo la proteína recombinante. Adicionalmente, se cuantificó la fracción soluble siguiendo el protocolo descrito para el método de Bradford (102).

Inmunodetección de la proteína recombinante MBP-E6VPH16

Con el fin de corroborar la identidad de la proteína recombinante en las fracciones obtenidas, se realizó detección por *western blot* usando un anticuerpo capaz de detectar la proteína etiqueta MBP. Para ello, inicialmente se tomó una alícuota de la fracción insoluble y una de la fracción soluble, se separaron mediante SDS-PAGE 12%, y se transferieron a una membrana de nitrocelulosa (Thermo Fisher), usando el método de electrotransferencia húmeda (103), realizado en buffer de transferencia compuesto por: Tris base 25 mM, Glicina 192 mM y Metanol 10 % v/v pH 8,3; el cual se usó para equilibrar el gel y la membrana de nitrocelulosa que fue activada previamente en agua destilada por 30 segundos. La electrotransferencia se ejecutó a 200 mA durante 2 horas. Una vez finalizada, se verificó mediante tinción de la membrana con Rojo Ponceau.

Posteriormente, se bloqueó la membrana con buffer TBST-L (leche 5%, Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 150 mM y Tween 20 0,1% v/v) por 2 horas, se realizaron tres lavados con buffer TBST (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 150 mM y Tween 20 0,1% v/v), cada uno durante 5 minutos y se adicionó el anticuerpo primario: Anti MBP (NEB) previamente diluido en buffer TBST 1:10.000, incubando durante 2 horas. Después, se lavó 3 veces la membrana con TBST por 5 minutos y se incubó por 2 horas con el anticuerpo secundario: anti-IgG biotinilado de conejo, diluido 1:10.000 en buffer TBST; luego se repitieron los 3 lavados y se incubó por 30 minutos con estreptavidina-fosfatasa alcalina diluida 1:5.000 con buffer TBST. Finalmente, se realizaron 3 lavados y se incubó durante 5 minutos en buffer de reacción (Tris-HCl 100 mM pH 9.0, NaCl 150 mM, $MgCl_2$ 1 mM). Para revelar la detección de la proteína se usaron los sustratos cromogénicos BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine Salt) y NBT (Nitro-Blue Tetrazolium Choride) (104).

5.2.3 PURIFICACIÓN PARCIAL DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE: MBP-E6VPH16

Teniendo en cuenta que el péptido expresado se encuentra ligado a la proteína de unión a maltosa y que esta tiene afinidad por moléculas de amilosa y maltosa, se usó una resina de amilosa para la purificación parcial de la proteína mediante cromatografía de afinidad

(105). Para iniciar se equilibró la resina de amilosa con buffer de lisis y se mezcló con la fracción soluble en dilución 1:6 permitiendo la reacción de unión durante 1 hora a 4°C en agitación constante. Al cabo de este tiempo, se transfirió la mezcla a la columna de purificación y luego de 5 minutos se recolectó la primera fracción correspondiente a las proteínas no deseadas. Posterior a ello, se realizaron 12 lavados a la resina con buffer de lisis, recolectando la fracción de cada lavado. La proteína deseada MBP-E6VPH16 se eluyó adicionando buffer de elución compuesto por buffer de lisis con adición de maltosa 20 mM; este eluido se suplementó con glicerol 50% y se almacenó a -20°C (106).

Las fracciones recolectadas en todo el proceso se evaluaron mediante SDS-PAGE 12% y aquella correspondiente al eluído de MBP-E6VPH16 se cuantificó por densitometría realizando SDS-PAGE 12%, comparando la intensidad de la banda obtenida con diferentes concentraciones conocidas de BSA (seroalbúmina bovina).

Es necesario resaltar que los ensayos de expresión y purificación parcial de proteína se realizaron paralelamente, bajo las mismas condiciones para obtener la proteína de unión a maltosa y usarla como control en todos los ensayos.

5.3 PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES

5.3.1 INMUNIZACIÓN DE MODELO AVIAR CON MBP-E6VPH16

Con el propósito de obtener anticuerpos policlonales anti E6 VPH16 se tomó una alícuota fresca de la proteína recombinante previamente purificada para realizar la inmunización del modelo aviar seleccionado (gallina), bajo las condiciones ya estandarizadas en el Laboratorio de Investigaciones Básicas en Bioquímica – LIBBIQ, según estudios previos reportados en la literatura. Se inmunizaron gallinas de la raza Hy-line Brown, de 50 semanas de edad criadas en el Centro de Producción Avícola de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, siguiendo la reglamentación tanto ética como técnica para el manejo animal. Para ello, se preparó un inóculo de 150 μg de MBP-E6VPH16 para la gallina estudio y un inóculo con PBS 1x pH7.5 para la gallina tomada como control negativo.

La inmunización se realizó mediante inyección intramuscular en cada gallina, siguiendo el esquema de inmunización (estandarizado en el Laboratorio de Investigaciones Básicas en Bioquímica – LIBBIQ), detallado a continuación: 5 inoculaciones, en los días 0, 14, 21, 28 y 35; en la primera inoculación se inyectaron 300 uL del antígeno recombinante homogenizado con adyuvante completo de Freund en relación 1:1, en las siguientes tres inoculaciones, se realizó refuerzo inyectando el antígeno recombinante con adyuvante incompleto, manteniendo la relación 1:1 y en el último refuerzo se inoculó solo el homogenizado con adyuvante incompleto y el péptido recombinante previamente separado de la proteína etiqueta mediante digestión con Factor Xa, cuyo sitio de corte está presente en la intersección entre E6VPH16 y MBP (107). Esto, con el fin de corroborar si se obtiene en esta última fase de inmunización, una producción de anticuerpos con afinidad mayor hacia el péptido recombinante (6 kDa).

En la gallina inmunizada como control negativo, se empleó el mismo esquema, pero con PBS 1x en lugar de antígeno recombinante (Tabla 4). Para monitorear la producción de anticuerpos, se evaluaron huevos y muestras de sangre de las dos gallinas; la primera sangría se tomó el día cero, previo a la inoculación, con el propósito de determinar títulos preinmunes. A partir de la primera inoculación, se recolectaron huevos cada día durante 43 días y 5 sangrías más en los días 14, 21, 28 y 35 previo a cada inmunización.

Tabla 4. Esquema de inmunización con E6 VPH 16 en modelo aviar.
C: Completo. I: Incompleto

	Gallina E6VPH16					Gallina control				
N° de inoculación	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Día	0	14	21	28	35	0	14	21	28	35
Adyuvante de Freund (uL)	C 150	I 150	I 150	I 150	I 150	C 150	I 150	I 150	I 150	I 150
PBS 1x (uL)	0	0	0	0	0	150	150	150	150	150
Proteína recombinante MBP-E6VPH16 (uL)	150	150	150	150	0	0	0	0	0	0
Péptido recombinante E6VPH16 (uL)	0	0	0	0	150	0	0	0	0	0
Volumen de inyección (uL)	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300

5.3.2 PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES

Purificación de anticuerpos IgY (policlonales)

Para obtener los anticuerpos IgY presentes en la yema de los huevos, se separó la yema de cada uno de los huevos y se solubilizó en buffer PBS 1x (pH 7.4) en relación 1:2, realizando vórtex para homogenizar. De cada homogenizado se tomó alícuota de 1mL, se mezcló con dextran sulfato 0.2% y se incubó a 4°C durante toda la noche. Seguidamente, se centrifugó durante 20 minutos a 12000 rpm (rotor Microliter 30x2 sealed 75003652 ThermoFisher) en condiciones refrigerantes, se descartó la fracción lipídica y se conservó la fracción proteica para adicionar sulfato de amonio 35% e incubar a temperatura ambiente, con agitación constante durante 20 minutos. Pasado este tiempo, se centrifugó bajo las condiciones anteriores, separando el sobrenadante correspondiente a la fracción enriquecida con los IgY, se almacenaron a -20°C y se conservó una alícuota fresca para evaluación mediante SDS-PAGE (12%), *western blot* y ELISA (108). Adicionalmente, cada fracción final se cuantificó usando espectrofotometría en celda de cuarzo a una absorbancia de 280nm, para determinar la concentración de las proteínas purificadas.

Por otra parte, las sangrías tomadas a partir de la vena alar de las gallinas se centrifugaron a 12000 rpm, a 4°C por 20 minutos (previa retracción del coágulo). Se separó el suero, se almacenó una alícuota a -20°C con glicerol al 20% (v/v) y se purificaron los anticuerpos mediante afinidad a antígeno. Para ello, se tomaron 500ng de las proteínas recombinantes previamente purificadas, se sometieron a SDS-PAGE 12% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante dos horas a 200mA. Las bandas donde se encuentraban las proteínas de interés se visualizaron con colorante Rojo de Ponceau S y se cortaron. Seguidamente, se realizó un preeluído con glicina 100 mM (pH2.5) por 10 minutos en agitación constante. Luego, se lavaron las membranas con TBS-T 2% por 10 minutos y se bloquearon con TBS-T 2%, leche 5% durante 1 hora. Los lavados se repitieron 3 veces con TBS-T 2% por 10 minutos. Posteriormente, se tomó la membrana correspondiente a MBP, se trituró en pequeños trozos y se incubó con el suero (1:5000) durante 2 horas en agitación constante. Los anticuerpos no unidos se retiraron por pipeteo y se incubaron igualmente, durante 2 horas en agitación constante con la membrana correspondiente a MBP-E6VPH16 previamente triturada en pequeños trozos. Pasado este tiempo se retiró el suero y se almacenó a -20°C. Finalmente, se lavaron las membranas con TBS-T 2% y se monitorearon por espectrofotometría a 280nm hasta lograr una absorbancia menor a 1.0. Para eluir los anticuerpos se adicionaron 150 uL de glicina 100

mM (pH2.5) y se permitió la interacción con la membrana durante 10 minutos en vórtex. Los eluidos obtenidos se neutralizaron con 15uL de Tris-HCl 2M (pH 8.5) y se almacenaron a -20°C. (109).

5.4 EVALUACIÓN DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE ANTICUERPOS

Para evaluar la sensibilidad de los anticuerpos purificados a partir del suero, se expusieron a diferentes cantidades de MBP-E6VPH16 (7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125 y 250 ng) en un ensayo w*estern blot* tomando el suero como anticuerpo primario (1:5000 con TBS-T). Así mismo, se realizó un segundo w*estern blot* usando la mínima cantidad de MBP-E6VPH16 detectada en el ensayo anterior y se expuso a diferentes concentraciones del suero (en diluciones desde 1:2500 hasta 1:15000 con TBS-T) usándolos igualmente como anticuerpo primario y como anticuerpo secundario αIgY acoplado a fosfatasa alcalina. Por otro lado, para evaluar especificidad se llevó a cabo el mismo ensayo, pero se enfrentaron los anticuerpos presentes en el suero a 250ng de otro tipo de proteínas recombinantes.

Para evaluar los anticuerpos obtenidos a partir de yema de huevo se realizó inicialmente una titulación por medio de un ensayo ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) indirecto en placa de microtitulación de 96 pozos, tomando como antígeno la proteína recombinante (MBP-E6VPH16) previamente preparada en buffer carbonatos (carbonato/bicarbonato) 10 ug/mL (pH 9.6); se siembraron 100 ul en cada pozo y se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche. Posteriormente, se realizó bloqueo adicionando 200 uL de PBS 1x Leche 5% por 2 horas a temperatura ambiente. En este punto, se adicionaron (como anticuerpo primario) 100 uL de los anticuerpos obtenidos en una dilución 1:500 en PBS 1x, dejándolos a temperatura ambiente durante 2 horas. Seguidamente, se adicionaron 100 uL del anticuerpo secundario αIgY-HRP (Sigma) en dilución 1:10.000 en PBS 1x y se incubaron en las condiciones anteriormente mencionadas. Después de cada adición, se realizaron 3 lavados por aspersión usando PBS 1x. La reacción se reveló adicionando 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS - Sigma) diluido en peróxido de hidrógeno y buffer citrato-fosfato 100mM (pH 5); se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y se detuvo adicionando 20uL de SDS 1%. Finalmente, se realizó lectura de la placa a 450nm. (110).

Para determinar sensibilidad de los anticuerpos, estos se prepararon en diluciones seriadas 1:2000, 1:1000 y 1:500 con PBS 1x y se enfrentaron a diferentes cantidades de las proteínas recombinantes (100ng, 250ng y 500ng) en ensayo de ELISA indirecto.

6. RESULTADOS Y DISCUSÓN

6.1 IDENTIFICACIÓN DE REGIONES CONSERVADAS Y/O INMUNOGÉNICAS ENTRE LAS SECUENCIAS DE LA ONCOPROTEÍNA E6

Los tipos de VPH cuya infección al tiempo con los factores epigenéticos mencionados anteriormente pueden causar cáncer en el cuello uterino son VPH 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 66, 68 y 69 (52,111). Considerando que la oncoproteína E6 es una de las sobre expresadas luego de la integración del genoma viral con el de la célula huésped (por ende, está presente en etapas avanzadas de la infección) y que sus funciones son cruciales y determinantes en el mantenimiento de la inmortalidad celular (112), se seleccionó como antígeno para la generación de los anticuerpos policlonales. Es importante señalar que anteriormente se han desarrollado varios sistemas de inmunodetección que han tomado como blanco esta proteína. No obstante, los anticuerpos se han generado contra toda la proteína. En este trabajo se realizó un acercamiento *in silico* para determinar péptidos comunes que permitan la generación de anticuerpos contra varios tipos de VPH (113).

Teniendo en cuenta lo anterior, se tomaron las secuencias proteicas de la oncoproteína E6 de estos tipos de VPH y se analizaron inicialmente sus características fisicoquímicas (tabla 5), encontrando que, en promedio tienen un peso molecular de 18.2 kDa, 153 aminoácidos y un punto isoeléctrico de 9.1; lo cual, según lo expuesto por Y. Nomine, *et al.* (44), le confiere una superficie positivamente cargada que biológicamente facilita, mediante los dedos de zinc, su unión al ADN celular, logrando así la represión transcripcional (111).

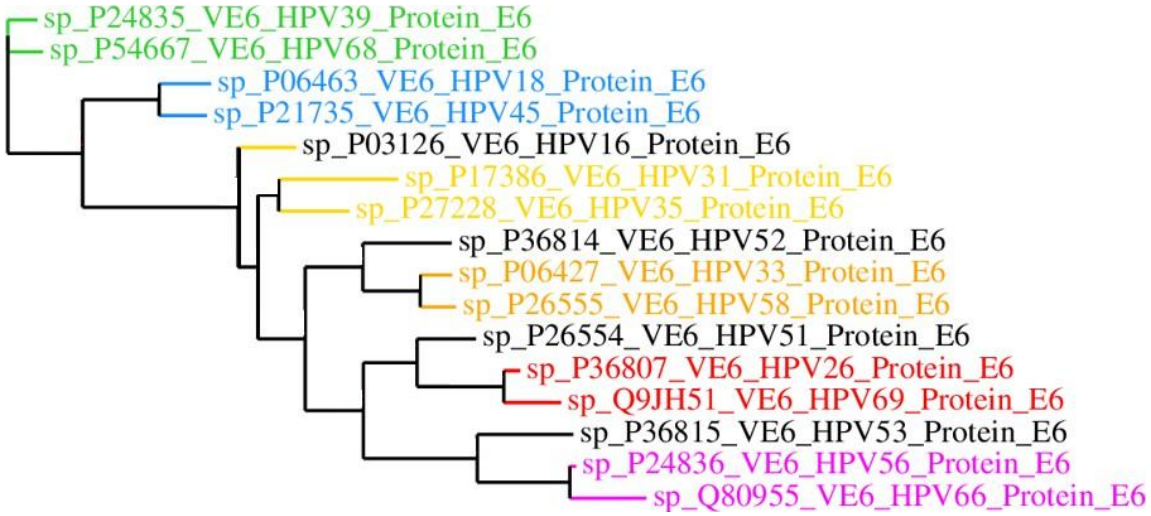
Tabla 5. Características generales a partir de la secuencia proteica de cada E6
Recopilado de EXPASY'S PROTPARAM.

Tipo de VPH	N° de aminoácidos	Peso Molecular (kDa)	Punto isoeléctrico	Vida media en *E. coli (hrs)*
16	158	19	9,16	40
18	158	18,8	9,95	
26	150	17,9	8,95	
31	149	17,7	9,14	
33	149	17,6	9,06	
35	149	18	8,32	
39	158	18,7	9,24	
45	158	18,8	9,18	
51	151	18,1	9,28	
52	148	17,8	8,95	
53	154	18,1	9,03	
56	155	18,5	8,86	
58	149	17,7	9,1	
66	155	18,6	9,21	
68	158	18,7	9,18	
69	151	17,9	9,09	

6.1.1 ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Así mismo, se llevó a cabo un análisis filogenético con el fin de establecer la cercanía molecular entre las secuencias de las E6 estudiadas y con base en ello, determinar la posibilidad de identificar una región conservada, ejecutando un alineamiento entre todas, para así, generar un anticuerpo capaz de reconocer los 16 tipos de oncoproteína E6. No obstante, este análisis permitió evidenciar que, aunque todos los tipos evaluados pertenecen a VPH clasificados dentro del mismo género (α-papilomavirus) por su tropismo por el tejido mucoso y cutáneo (26), se agruparon máximo dos tipos de E6 estrechamente relacionadas e incluso, algunas no se relacionaron con ninguna de las secuencias analizadas (figura 15), lo cual cobra sentido al analizar la especie a la que pertenece cada tipo analizado, pues en general, aquellas que pertenecen a la misma especie, como es de esperar resultaron estrechamente relacionadas.

Figura 15. Análisis filogenético de secuencias proteicas de E6 de los 16 tipos de VPH.
Ejecutado en T-COFFEE.



6.1.2 ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS PROTEICAS

Teniendo presente el resultado anterior, la búsqueda de regiones conservadas se realizó a partir de las secuencias E6 estrechamente relacionadas, utilizando la herramienta "Clustal omega" que realiza un alineamiento de tipo progresivo, iniciando con la alineación en pares de aminoácidos, hasta construir el árbol guía y arrojar el alineamiento, como se observa en la figura 16 (86).

Figura 16. Alineamiento de secuencias proteicas de las E6 de VPH genéticamente más cercanas.

15.1 Alineamiento de E6 VPH 39 y VPH 68.
Se señala en el recuadro una secuencia consenso de 20 aminoácidos.

```
CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment


sp|P24835|VE6_HPV39       MARFHNPAERPYKLPDLCTTLDTTLQDITIACVYCRRPLQQTEVYEFAFSDLYVVYRDGE   60
sp|P54667|VE6_HPV68       MALFHNPEERPYKLPDLCRTLDTTLHDVTIDCVYCRRQLQRTEVYEFAFSDLCVVYRDGV   60
                          ** **** ********** ******:*:** ****** **:*********** ******

sp|P24835|VE6_HPV39       PLAACQSCIKFYAKIRELRYYSDSVYATTLENITNTKLYNLLIRCMCCLKPLCPAEKLRH   120
sp|P54667|VE6_HPV68       PFAACQSCIKFYAKIRELRYYSESVYATTLETITNTKLYNLLIRCMSCLKPLCPAEKLRH   120
                          *:******************.********.**************.*************

sp|P24835|VE6_HPV39       LNSKRRFHKIAGSYTGQCRRCWTTKREDRRLTRRETQV 158
sp|P54667|VE6_HPV68       LTTKRRLHKIAGNFTGQCRHCWTSKREDRRRIRQETQV 158
                          *.:***:*****.:*****:***:******  *:****
```

15.2 Alineamiento de E6 VPH 18 y VPH 45.
Se señala en el recuadro una secuencia consenso de 20 aminoácidos.

```
CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment


sp|P21735|VE6_HPV45      MARFDDPKQRPYKLPDLCTELNTSLQDVSIACVYCKATLERTEVYQFAFKDLCIVYRDCI   60
sp|P06463|VE6_HPV18      MARFEDPTRRPYKLPDLCTELNTSLQDIEITCVYCKTVLELTEVFEFAFKDLFVVYRDSI   60
                         ****:**.:*****************:.*:*****:.** ***::****** :****.*

sp|P21735|VE6_HPV45      AYAACHKCIDFYSRIRELRYYSNSVYGETLEKITNTELYNLLIRCLRCQKPLNPAEKRRH   120
sp|P06463|VE6_HPV18      PHAACHKCIDFYSRIRELRHYSDSVYGDTLEKLTNTGLYNLLIRCLRCQKPLNPAEKLRH   120
                          :*****************:**:****:****:*** ******************** **

sp|P21735|VE6_HPV45      LKDKRRFHSIAGQYRGQCNTCCDQARQERLRRRRETQV 158
sp|P06463|VE6_HPV18      LNEKRRFHNIAGHYRGQCHSCCNRARQERLQRRRETQV 158
                         *::*****.***:*****::**::******:*******
```

15.3 Alineamiento de E6 VPH 31 y VPH 35.
Se señala en el recuadro una secuencia consenso de 15 aminoácidos.

```
CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment


sp|P17386|VE6_HPV31      MFKNPAERPRKLHELSSALEIPYDELRLNCVYCKGQLTETEVLDFAFTDLTIVYRDDTPH   60
sp|P27228|VE6_HPV35      MFQDPAERPYKLHDLCNEVEESIHEICLNCVYCKQELQRSEVYDFACYDLCIVYREGQPY   60
                         **::***** ***:*.. :*   .*: ******* :* .:** ***  ** ****:. *:

sp|P17386|VE6_HPV31      GVCTKCLRFYSKVSEFRWYRYSVYGTTLEKLTNKGICDLLIRCITCQRPLCPEEKQRHLD   120
sp|P27228|VE6_HPV35      GVCMKCLKFYSKISEYRWYRYSVYGETLEKQCNKQLCHLLIRCITCQKPLCPVEKQRHLE   120
                         *** ***:****:**:********* ****  ** :*.*********:**** ******:

sp|P17386|VE6_HPV31      KKKRFHNIGGRWTGRCIACWRRPRTETQV  149
sp|P27228|VE6_HPV35      EKKRFHNIGGRWTGRCMSCWKPTRRETEV  149
                         :***************::**:  * **:*
```

15.4 Alineamiento de E6 VPH 33 y VPH 58.
Se señala en el recuadro una secuencia consenso de 37 aminoácidos.

```
CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment


sp|P06427|VE6_HPV33      MFQDTEEKPRTLHDLCQALETTIHNIELQCVECKKPLQRSEVYDFAFADLTVVYREGNPF   60
sp|P26555|VE6_HPV58      MFQDAEEKPRTLHDLCQALETSVHEIELKCVECKKTLQRSEVYDFVFADLRIVYRDGNPF   60
                         ****:****************::*:***:****** ********.**** :***:****

sp|P06427|VE6_HPV33      GICKLCLRFLSKISEYRHYNYSVYGNTLEQTVKKPLNEILIRCIICQRPLCPQEKKRHVD   120
sp|P26555|VE6_HPV58      AVCKVCLRLLSKISEYRHYNYSLYGDTLEQTLKKCLNEILIRCIICQRPLCPQEKKRHVD   120
                         .:**:***:************:**:*****:** ************************

sp|P06427|VE6_HPV33      LNKRFHNISGRWAGRCAACWRSRRRETAL  149
sp|P26555|VE6_HPV58      LNKRFHNISGRWTGRCAVCWRPRRRQTQV  149
                         ************:****.*** ***:* :
```

15.5 Alineamiento de E6 VPH 26 y VPH 69.
Se señala en el recuadro una secuencia consenso de 22 aminoácidos

```
CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment


sp|Q9JH51|VE6_HPV69      MFQDPRERPRTIHELCEALNTPLQSLQVQCVYCKKTLEWADVYNFAICDLRIVYRNDSAY   60
sp|P36807|VE6_HPV26      MFEDPRERPRTLHELCESLNTTLQNLQVQCVYCKETLQWADVYNFAICDLRVVYRDRSPY   60
                         **:********:*****:*** **.*********:**:*************:***: * *

sp|Q9JH51|VE6_HPV69      GACKKCIIFYSKIIEYRRYTSSVYGATLEARPKRSLCNLLIRCHRCQIPLGPEEKQRIVD   120
sp|P36807|VE6_HPV26      AACKRCVIFYSKITEYRRYTCSVYGATLEALTKKSLCNLLIRCHRCQMPLGPEEKQRIVD   120
                         .***:*:****** ******.********  *:************:************

sp|Q9JH51|VE6_HPV69      EKRRFHEIAGYWKGLCTNCWRPRREATETQV        151
sp|P36807|VE6_HPV26      EKRRFHEIAGQWKGLCTNCWRPRRQTETQV-        150
                         ********** *************::
```

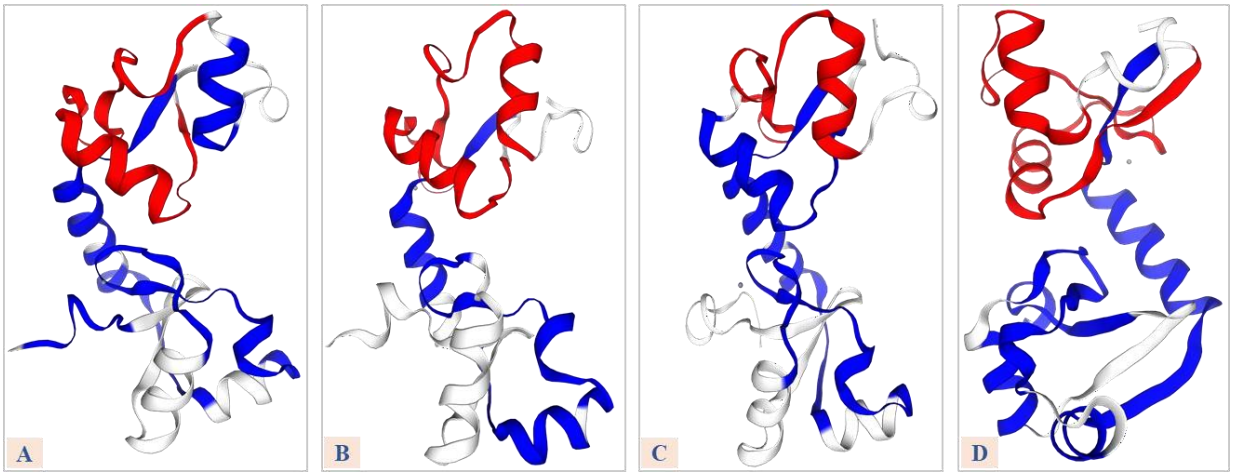
15.6 Alineamiento de E6 VPH 56 y VPH 66.
Se señala en el recuadro una secuencia consenso de 21 aminoácidos.

```
CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment


sp|P24836|VE6_HPV56       MEPQFNNPQERPRSLHHLSEVLEIPLIDLRLSCVYCKKELTRAEVYNFACTELKLVYRDD   60
sp|Q80955|VE6_HPV66       MDSIFSNTQERPRSLHHLSEVLQIPLLDLRLSCVYCKKELTSLELYRFACIELKLVYRNN   60
                          *:  *.* **************:***:**************  *:*.*** *******::

sp|P24836|VE6_HPV56       FPYAVCRVCLLFYSKVRKYRYYDYSVYGATLESITKKQLCDLLIRCYRCQSPLTPEEKQL   120
sp|Q80955|VE6_HPV66       WPYAVCRVCLLFYSKVRKYRYYKYSVYGATLESITKKQLSDLSIRCYRCQCPLTPEEKQL   120
                          :*********************.***************.** *******.*********

sp|P24836|VE6_HPV56       HCDRKRRFHLIAHGWTGSCLGCWRQTSREPRESTV    155
sp|Q80955|VE6_HPV66       HCEHKRRFHYIAYAWTGSCLQCWRHTSRQATESTV    155
                          **::***** **:.****** ***:***:  ****
```

6.1.3 IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS INMUNOGÉNICOS

Por otro lado, a fin de determinar la región a usar como antígeno para la producción de los anticuerpos que detecten las E6 que no presentan regiones conservadas con las demás estudiadas, se tomaron sus secuencias y se sometieron a un análisis de predicción de péptidos con propiedades antigénicas (figura 17), usando la herramienta “Predicting Antigenic Peptides” (87), la cual tiene en cuenta propiedades fisicoquímicas de la proteína a analizar y calcula los promedios de varios parámetros (como el tamaño total de la proteína), en busca de residuos de aminoácidos con propiedades tales como flexibilidad, hidrofobicidad y accesibilidad, las cuales se comparan con otros epítopos determinados experimentalmente.

Figura 17. Predicción de regiones antigénicas de la proteína E6.
En azul: regiones antigénicas. En rojo: región antigénica de mayor longitud.
A. E6 de VPH 16. **B.** E6 de VPH 51. **C.** E6 de VPH 52. **D.** E6 de VPH 53.



Cabe resaltar que tanto las regiones conservadas como las regiones inmunogénicas halladas, hacen parte de un motivo estructural importante para el funcionamiento de E6 correspondiente a dedos de zinc (Cys-X-X-Cys), los cuales son exclusivos para las oncoproteínas E6 y E7 del VPH y le permiten interactuar con otras proteínas y con el ADN celular, logrando entre otras cosas, impedir la transcripción de los genes supresores de tumores (111).

En atención a los resultados obtenidos en esta primera fase computacional, se podrían generar 10 tipos de anticuerpos dirigidos contra péptidos esenciales de la oncoproteína E6, altamente expresada en etapas avanzadas de la infección (112); útiles como insumos biológicos que podrían constituir una herramienta inmunológica para la detección de los 16 tipos de VPH alto riesgo más comúnmente relacionados con el desarrollo de CaCU. Sin embargo, la fase experimental se abordó con la secuencia correspondiente a la oncoproteína E6 de uno de los VPHar más frecuentes en Colombia (VPH16) (114,115), resaltando el potencial de ejecutar la fase experimental con cada una de las secuencias identificadas, de forma que se puedan generar insumos inmunológicos para la detección de estos 16 tipos de VPHar.

6.2 OBTENCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE MBP-E6VPH16

Aunque frecuentemente los péptidos se obtienen mediante síntesis química, su inmunogenicidad generalmente es baja, y requiere de procesos adicionales, como el acople a otras proteínas portadoras o “carriers” o la generación de polímeros del mismo péptido (116). En este trabajo se plantea la generación de una proteína fusión recombinante para obtener el péptido de interés.

6.2.1 CLONACIÓN DE LA SECUENCIA QUE CODIFICA PARA EL PÉPTIDO DE ONCOPROTEÍNA E6 EN VECTOR DE EXPRESIÓN PMALC5X.

La oncoproteína E6 elegida para la fase experimental fue la del VPH16; el análisis de su secuencia arrojó 6 regiones con determinantes antigénicos, de las cuales se seleccionó aquella correspondiente al péptido de mayor longitud (figura 18) para su clonación y

expresión recombinante. Este péptido (mencionado de ahora en adelante como E6VPH16) está compuesto por 35 aminoácidos, tiene un peso molecular de 4,3 kDa y un índice de inestabilidad de 59, es decir, es inestable, según su análisis individual mediante la herramienta "Expasy-protparam" (117).

Figura 18. Predicción de regiones antigénicas de la proteína E6 del VPH16
Se señala la región correspondiente al péptido de mayor longitud (35 aminoácidos).

35 aa

Antigenic plot for sequence E6 HPV 16

There are 6 antigenic determinants in your sequence:

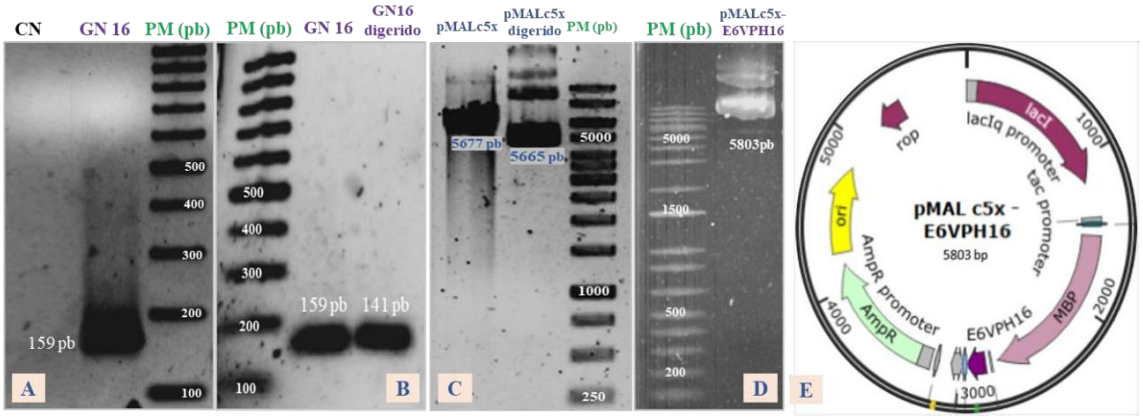
n	Start Position	Sequence	End Position
1	17	RKLPQLCTE	25
2	27	QTTIHDIILECVYCKQQLLRREVYDFAFRDLCIVY	61
3	65	NPYAVCDKCLKFYSK	79
4	81	SEYRHYCYSLYG	92
5	99	YNKPLCDLLIRCINCQKPLCP	119
6	142	RCMSCCR	148

Considerando estas propiedades de E6VPH16 y teniendo en cuenta que los vectores de expresión poseen las herramientas moleculares necesarias para asegurar la producción de una proteína en un sistema de expresión seleccionado, siempre y cuando, este sea compatible con el vector y la secuencia genética de la proteína quede correctamente insertada dentro del mismo (118); se seleccionó el vector pMALc5X (5.677 pb) para la clonación de la secuencia codificante de E6VPH16, debido a que este es apto para expresión en bacterias, presenta sitio de múltiple cloning con variedad de sitios de restricción, otorga resistencia a ampicilina y resulta de gran utilidad en la expresión de proteínas pequeñas y péptidos, ya que se expresan junto a una proteína etiqueta de aproximadamente 40,4 kDa, que favorece la solubilidad de la proteína recombinante en el citoplasma y facilita su purificación (90). El peso molecular de la proteína etiqueta fue clave para su elección respecto a otros vectores con características similares como pET-SUMO, que otorga un peso adicional de 19 kDa a la proteína de interés, siendo esto poco favorable para los ensayos posteriores considerando el tamaño del péptido a expresar.

El proceso de clonación se presenta en la figura 19; inicialmente se logró la amplificación de la secuencia codificante de E6VPH16, usando como plantilla ADN genómico del VPH 16 extraído de muestras de cepillado cervical, obteniendo una banda de 159pb (19A), lo que corresponde al tamaño esperado más las secuencias "*linker*" y las secuencias

necesarias para digestión con las enzimas de restricción (SalI: GTCGAC y EcoRI: GAATTC) (19B), las cuales permitieron generar extremos cohesivos tanto en el inserto como en el vector de expresión (19C). Obteniendo finalmente, luego de ligación, un producto de 5.803pb (19D), correspondiente al vector recombinante pMALc5X – E6VPH16.

Figura 19. Construcción de vector recombinante pMALc5X-E6VPH16
A. Amplificación de secuencia codificante de E6VPH16 (inserto: 159pb). **B.** Digestión de inserto con EcoRI y SalI. **C.** Digestión de pMALc5X con EcoRI y SalI. **D.** Ligación de E6VPH16 y pMALc5X. **E.** Representación del constructo generado (usando SnapGene (119)).
A y B: visualizados en TBE – agarosa (1,5%) y bromuro de etidio. C y D: TBE – agarosa (0,8%) y bromuro de etidio. CN: control negativo. GN16: A partir de ADN genómico de VPH16. PM: marcador de peso molecular.



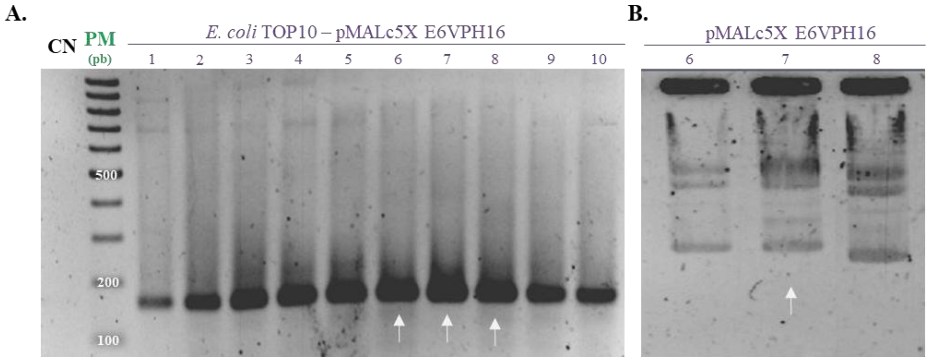
Transformación y evaluación de colonias *E. coli* TOP10

Considerando la necesidad de conservación del vector recombinante generado y su disponibilidad para futuros estudios, la transformación se llevó a cabo inicialmente en células *E. coli* TOP10, ya que son ideales para la replicación estable de plásmidos gracias a mutaciones como *end A1* que reduce la posibilidad de digestión no especifica por endonucleasa 1 y *rec A1* que implica una menor incidencia de recombinación no especifica en ADN clonado (120).

El crecimiento de colonias en el medio de selección LB-Ampicilina (100 µg/mL) se consideró un indicio de transformación exitosa, debido a que el vector otorga resistencia a ampicilina (90). No obstante, era necesario corroborar la presencia del fragmento de interés (E6VPH16) en dichas colonias, lo cual se confirmó mediante PCR de colonia, que permitió evidenciar la amplificación del fragmento de interés en todas las colonias evaluadas (121), confirmando así la obtención de colonias *E. coli* TOP10 – pMALc5X

E6VPH16 (figura 20-A), de las cuales se seleccionaron tres colonias para extraer el plásmido de interés, cuya integridad se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa (20B). Finalmente se seleccionó el plásmido recombinante obtenido de la colonia 7 para continuar con los ensayos de expresión de la proteína recombinante, previa verificación de su identidad mediante secuenciación Sanger, a partir del producto de PCR de dicho plásmido (ver anexo 1).

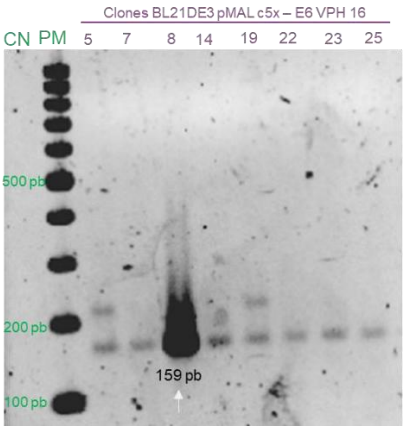
Figura 20. Obtención y verificación del plásmido recombinante pMALc5X-E6VPH16
A. Confirmación de colonias *E. coli* TOP10 – pMALc5X E6VPH16 (amplificado:159pb).
B. Obtención de plásmido recombinante pMALc5X-E6VPH16.
A: visualizado en TBE – agarosa (1,5%) y bromuro de etidio. B: TBE – agarosa (0,8%) y bromuro de etidio.
CN: control negativo. PM: marcador de peso molecular.



Transformación y evaluación de la cepa de expresión *E. coli* BL21 DE3

El plásmido recombinante obtenido de la colonia *E. coli* TOP10 – pMALc5X E6VPH16 se usó para la transformación de la cepa de expresión, cuya evaluación en medio de selección resultó exitosa, obteniendo crecimiento de colonias que, a su vez, se evaluaron mediante PCR de colonia (figura 21); lo que permitió la selección de la colonia positiva *E. coli* BL21 DE3 - pMALc5x-E6VPH16 número 8 para llevar a cabo la inducción de la expresión de la proteína recombinante MBP – E6VPH16.

Figura 21. Evaluación de colonias *E. coli* BL21 DE3 - pMALc5x-E6VPH16, mediante PCR (amplificado: 159 pb).
Visualizado en TBE - Agarosa 1,5% - Bromuro de etidio. CN: control negativo. PM: marcador de peso molecular.



6.2.2 EXPRESIÓN DE MBP – E6VPH16 EN *E. coli* BL21 DE3

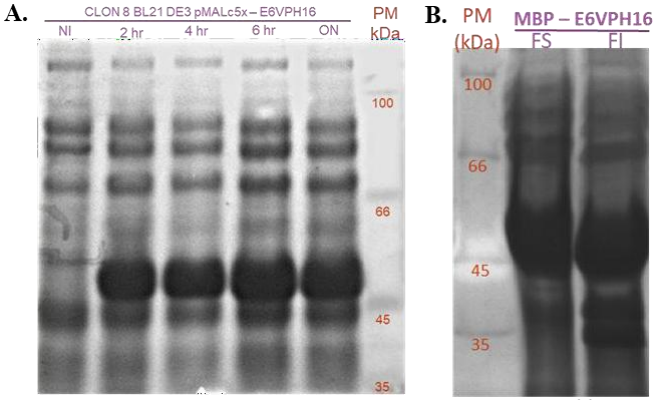
Como sistema de expresión bacteriano, *E. coli* es uno de los más usados para la expresión de antígenos, presenta ventajas como bajo costo de mantenimiento, respecto a otros sistemas como levaduras y células de mamíferos; rápido crecimiento lo que permite obtener proteínas en corto tiempo, sencillos requerimientos nutricionales y ambientales y variedad de cepas modificadas, vectores y otras herramientas para lograr buenos rendimientos en la producción de proteínas recombinantes (122). Particularmente, la cepa BL21 (DE3) es deficiente en proteasas, lo cual favorece la expresión de la proteína recombinante. De la misma forma, el sistema heterólogo *E. coli* es muy utilizado para la generación de antígenos que no requieren modificaciones postraduccionales complejas como epitopes lineales o proteínas virales simples (123), tales como los péptidos seleccionados en este trabajo.

La presencia del operador *lac* en pMALc5X otorga la posibilidad de controlar la producción de la proteína recombinante, permitiendo iniciar su expresión mediante la adición del inductor de isopropil-b-D-tiogalactopiranósido (IPTG), el cual, al ser análogo de la lactosa, podrá desplazar al represor *LacI* para dar inicio a la transcripción (124). La evaluación de las proteínas presentes en las colonias luego de la adición del IPTG, evidenció la expresión prioritaria de la proteína de interés (MBP – E6VPH16) dos horas después de la inducción, manteniéndose incluso luego de 16 horas (toda la noche) (figura 22-A). Considerando este resultado, se determinó que un adecuado tiempo de inducción de la proteína es 2 horas, lo cual coincide con lo reportado por Ang. *et al*. (100), al evaluar la expresión de proteína recombinante MBP-P12 en diferentes cepas, bajo diferentes condiciones de inducción, determinando que este tiempo de inducción es óptimo para obtener altos niveles de expresión.

El proceso de lisis bacteriana permitió la recuperación de las fracciones de proteínas solubles e insolubles, que se evaluaron mediante SDS PAGE 10% (figura 22-B), con el fin de determinar la solubilidad de la proteína recombinante, encontrando que MBP-E6VPH16 se obtuvo en las dos fracciones. En este punto, es importante resaltar ciertas propiedades de la proteína de unión a maltosa (MBP) como su peso molecular, su alto

porcentaje de residuos hidrofílicos expuestos y su abundancia de bucles flexibles; las cuales, probablemente, son las que le permiten facilitar la solubilidad de la proteína fusionada (125).

Figura 22. Expresión de MBP-E6VPH16.
A. Evaluación de la expresión de BL21(DE3)-MBP-E6VPH16 (50 kDa). **B.** Verificación de solubilidad de MBP-E6VPH16.
NI: Colonias no inducidas. ON: Inducción toda la noche-16 horas. PM: marcador de peso molecular FS: fracción soluble. FI: fracción insoluble. SDS-PAGE 10% - Azul de Coomassie



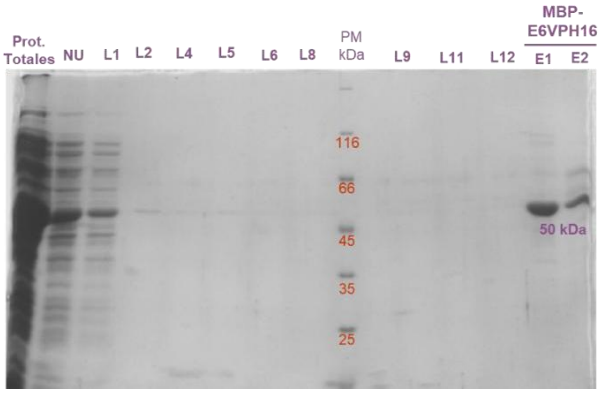
Uno de los problemas más frecuentes en la producción de proteínas recombinantes es la agregación de la proteína expresada como cuerpos de inclusión, por ello, la adición de proteínas fusión es determinante para obtener la proteína en la fracción soluble (126). En el caso de la proteína MBP-E6VPH16, la proteína se encontró en las dos fracciones en alta concentración, lo cual permite la purificación a partir de la fracción soluble por métodos cromatográficos.

6.2.3 PURIFICACIÓN PARCIAL DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE MBP-E6VPH16 MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD A AMILOSA.

Teniendo en cuenta la presencia de MBP-E6VPH16 en la fracción soluble, se optó por ejecutar la purificación parcial de la proteína mediante cromatografía de afinidad a amilosa. Se presenta a continuación la purificación parcial de la misma usando resina de amilosa, con posterior elución mediante adición de buffer de columna suplementado con maltosa 20mM (figura 23), donde se evidencia la obtención de MBP-E6VPH16 parcialmente purificada en los eluídos 1 y 2, evidenciándose con la presencia principalmente de la proteína fusión, sobre el peso molecular esperado (50 kDa);

adicionalmente, se observa presencia mínima de proteínas contaminantes de mayor peso molecular, que podría tratarse de proteínas endógenas de *E. coli* que poseen una afinidad menor a la resina de amilosa, como la proteasa Lon (87.4 kDa) (127) y las proteínas de unión a maltosa presentes en *E. coli (128).*

Figura 23. Evaluación de purificación parcial de MBP-E6VPH16 (50 kDa) mediante cromatografía de afinidad a amilosa.
NU: Proteínas no unidas. L: lavados. E: Eluídos. SDS-PAGE 10% - Azul de Coomassie

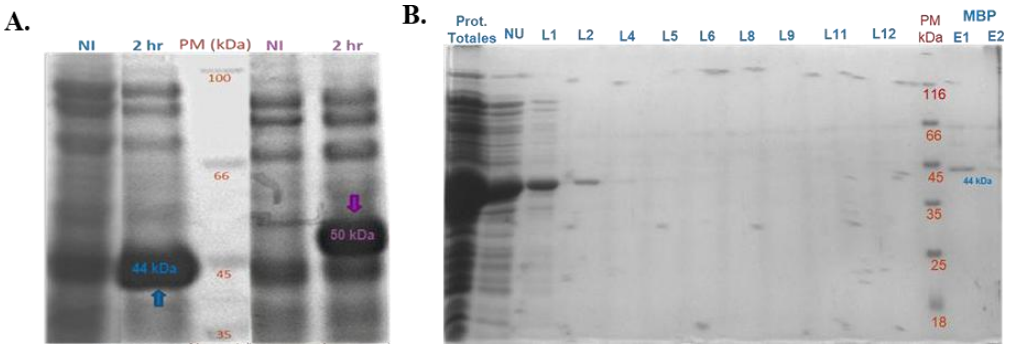


La proteína de unión a maltosa (MBP), se encuentra naturalmente en bacterias Gram-negativas, en el citoplasma y más abundantemente en el periplasma. Principalmente, actúa como proteína transportadora facilitando la captación y movilización de maltodextrinas para su adecuado metabolismo. Su cadena polipeptídica presenta dos dominios globulares (lóbulos) conectados por una región bisagra, compuesta por tres cadenas polipeptídicas cortas; entre cada lóbulo se presenta una hendidura central que contiene el sitio de unión al ligando (maltodextrina o polisacáridos de conformación similar). La presencia de maltosa induce un cambio conformacional de la proteína en el que cada dominio gira hacia el otro, ocasionando el cierre de la hendidura y la consecuente captación del polisacárido, cuya unión se estabiliza mediante la formación de puentes de hidrógeno (129).

Lo anterior constituye la base de la utilidad de la cromatografía de afinidad a amilosa, cuyo fundamento radica en que, al ser la amilosa un polímero repetitivo de maltosa, puede ser captada por la MBP fusionada a la proteína de interés, quedando retenida en la columna. Así mismo, al adicionar el buffer con maltosa, MBP se une con mayor afinidad a esta, obteniéndose así en la fracción del eluido (130).

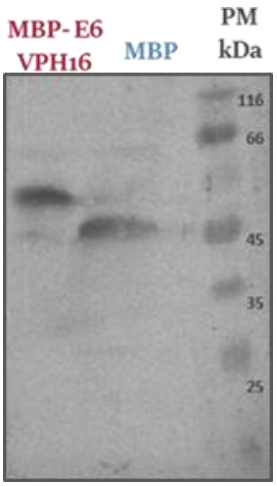
El proceso de expresión y purificación parcial se realizó bajo las mismas condiciones para la proteína MBP, con el propósito de usarla como control en ensayos posteriores; su presencia se corroboró igualmente en la fracción soluble y se logró su purificación parcial, como se presenta en la figura 24.

Figura 24. Expresión y purificación parcial de MBP
A. Expresión en *E. coli* BL21 DE3 de MBP (en azul) y MBP-E6VPH16 (en morado).
B. Evaluación de purificación parcial de MBP mediante cromatografía de afinidad a amilosa.
NI: Colonias no inducidas. NU: Proteínas no unidas. L: lavados. E: Eluídos. PM: marcador de peso molecular. SDS-PAGE 10% - Azul de Coomassie



Una vez obtenidas las proteínas MBP (44 kDa) y MBP-E6VPH16 (50 kDa) parcialmente purificadas, se realizó verificación de identidad mediante inmunodetección por w*estern blot*, usando como anticuerpo primario un anti MBP (NEB) y como anticuerpo secundario anti rabbit- fosfatasa alcalina (Thermo Fisher), evidenciando reconocimiento tanto de la proteína recombinante como de la proteína control, ilustrado en la figura 25.

Figura 25. Inmunodetección de proteínas parcialmente purificadas MBP-E6VPH16 (50 kDa) y MBP (44 kDa), mediante *western blot.*
Nitrocelulosa. Anticuerpo primario: Anti-MBP. Anticuerpo secundario: anti *rabbit*- fosfatasa alcalina.



La eficiencia de la producción de proteínas recombinantes puede variar ampliamente dependiendo del sistema de expresión, la proteína específica, las condiciones de cultivo y otros factores tales como la concentración de inductor y temperatura. Así, por ejemplo, producción altamente optimizada a escala industrial pueden presentar un rango de rendimiento típico de 1 a 5 gr/L. Por otro lado, dependiendo del promotor, sin optimización los rangos de crecimiento pueden estar por debajo del mg/L (131).

El rendimiento del proceso de purificación obtenido a partir de la fracción soluble de MBP-E6VPH16 y MBP se presenta en la tabla 6. A partir de 100 mL de cultivo celular, se obtuvieron 1,4mg y 0,15mg respectivamente, lo cual es consistente con lo reportado en el estudio de V. Salema *et al.* (132) quienes lograron purificar niveles de proteína recombinante mayores a 12 mg/L usando MBP como proteína etiqueta. Estas proteínas se emplearán como antígeno y proteína control en fases posteriores de este trabajo.

Tabla 6. Cuantificación de proteína parcialmente purificada. MBP-E6VPH16 (izquierda). MBP (derecha).

	MBP – E6 VPH16	
	ELUÍDOS	
	E1	E2
Volumen (mL)	2	2
Concentración (mg/mL)	0.395	0,330
Cantidad (mg)	0,79	0,66
Total proteína (mg)	1,45	
Rendimiento a partir de 100 mL de cultivo	14,5 mg/L	

	MBP	
	ELUÍDOS	
	E1	E2
Volumen (mL)	2,5	2
Concentración (mg/mL)	0.037	0,031
Cantidad (mg)	0,092	0,062
Total proteína (mg)	0,15	
Rendimiento a partir de 100 mL de cultivo	1,5 mg/L	

6.3 PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES

6.3.1 INMUNIZACIÓN DE MODELO AVIAR CON MBP-E6VPH16

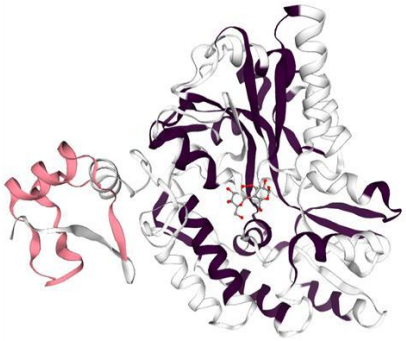
La producción de anticuerpos se llevó a cabo en modelo aviar (gallinas). Esto, teniendo en cuenta las ventajas que presenta frente a otros modelos (ratones y conejos) como: el costo de manutención, la facilidad en la toma de la sangría, la posibilidad de obtener IgY a partir de la yema de los huevos y la cantidad de IgY producida, correspondiente al 1-10% del total de anticuerpos producidos (133). Así mismo, tal como en los otros modelos animales, la cantidad de anticuerpos producidos depende en gran medida de

características del antígeno como su peso molecular, su nivel de inmunogenicidad y la cantidad de antígeno usado (134).

Lo anterior fue clave en la selección del método de producción del péptido para la inmunización, prefiriendo la tecnología de ADN recombinante frente a métodos típicos como la síntesis química, evitándose la necesidad de adicionar otro tipo de moléculas que garanticen generación de respuesta inmune e impliquen aumento de costos. Considerando ello, la inmunización se realizó con la proteína recombinante MBP-E6VPH16, que presenta propiedades consideradas altamente inmunogénicas como: provenir de una especie diferente, composición química compleja (alto contenido de residuos hidrofílicos) y adecuado peso molecular (entre 5.000 y 100.000 Da) (135); lo cual se corroboró mediante búsqueda de regiones inmunogénicas en su secuencia, que arrojó 17 determinantes antigénicos, como se ilustra en la figura 26, gracias a que MBP actúa como portador inmunogénico para péptidos que no lo son por si solos presentan bajos niveles de inmunogenicidad (136,137).

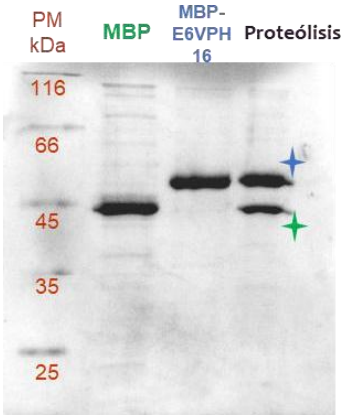
Figura 26. Determinantes antigénicos en MBP-E6VPH16. COLORES
Izquierda: determinantes antigénicos usando la herramienta Predicted Antigenic Peptides: (87), MBP: del N.1 al 16 - E6VPH16: N.17. Derecha: modelamiento usando Swiss-Model (138). En morado: determinantes antigénicos MBP. En rosado: determinante antigénico E6VPH16.

n	Start Position	Sequence	End Position
1	5	EGKLVIW	11
2	32	TGIKVTVEH	40
3	46	EKFPQVAA	53
4	72	AQSGLLAE	79
5	86	FQDKLYPFTWDA	97
6	99	RYNGKLIAYPIAVEALSLIYNK	120
7	132	EIPALDK	138
8	156	YFTWPLIAA	164
9	178	DIKDVGV	184
10	191	AGLTFLVDLI	200
11	209	TDYSIAE	215
12	237	DTSKVNYGVTVLPT	250
13	255	PSKPFVGVLSAGIN	268
14	281	LENYLLT	287
15	299	PLGAVALK	306
16	338	SAFWYAVRTAVIN	350
17	404	QTTIHDIILECVYCKQQLLRREVYDFAFRDLCIVY	438



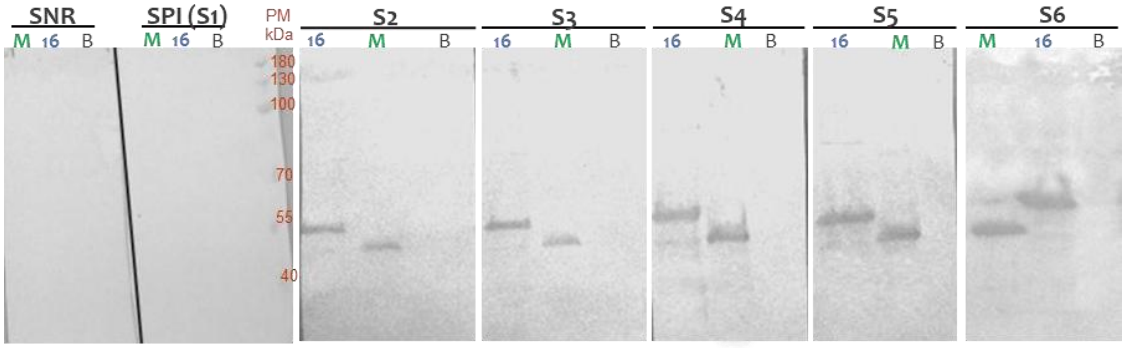
Adicionalmente, con el fin de reforzar la especificidad de los anticuerpos hacia el péptido de interés, la última inmunización se realizó luego de la proteólisis de MBP-E6VPH16 con Factor Xa, el cual separa a MBP del péptido E6VPH16, como se verificó mediante SDS-PAGE 10% (figura 27).

Figura 27. Liberación de E6VPH16 a partir de digestión proteolítica con Factor Xa. MBP-E6VPH16 (50 kDa), MBP (44 kDa), E6VPH16 (6 kDa)
SDS-PAGE 10% - Azul de Coomassie



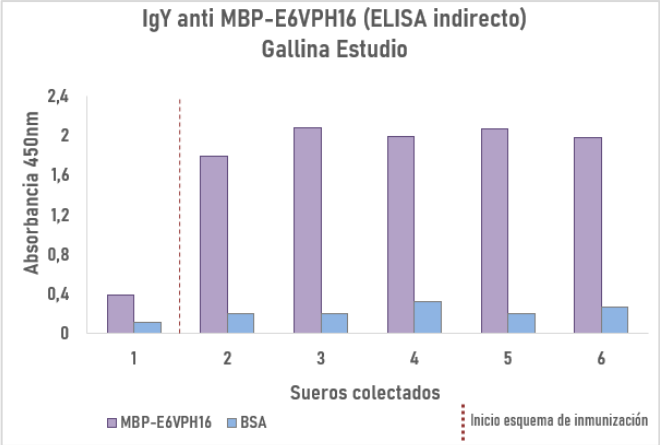
El protocolo de inmunización empleado permitió la recolección de 6 sangrías tanto para la gallina control como para la gallina estudio, correspondientes a: 1 sangría pre inmune y 5 sangrías tomadas luego de cada inmunización, recolectando 2mL de suero a partir de cada una. Estos sueros en dilución 1:5.000 fueron enfrentados a 250 ng de MBP-E6VPH16 en un ensayo de *western blot* con el fin de evaluar el reconocimiento del antígeno (figura 28), encontrando que las IgY presentes en el suero perteneciente a la gallina control no presentaron señal de reconocimiento, tal como se esperaba, pues esta no fue inmunizada con el antígeno. Igualmente, las IgY presentes en el suero pre inmune de la gallina inmunizada (MBP-E6VPH16), tampoco reconocieron el antígeno. Por el contrario, las IgY presentes en los sueros de interés no solo demostraron reconocimiento del antígeno, sino que también evidenciaron un aumento del nivel de detección a medida que avanzó el tiempo de inmunización.

Figura 28. Evaluación de IgY anti MBP-E6VPH16 presentes en suero mediante *western blot.*
SNR: Suero no relacionado (gallina control). SPI (S1): Suero pre inmune (gallina estudio). S2: Suero día 14. S3: Suero día 21. S4: Suero día 28. S5: Suero día 35. S6: Suero día 42. M: MBP, 16: MBP-E6VPH16, B: BSA (control negativo).
Nitrocelulosa. Anticuerpo primario: suero (1:5.000), anticuerpo secundario: anti IgY-fosfatasa alcalina (1:10.000).



La capacidad de reconocimiento del antígeno por parte de las IgY presentes en los sueros se evaluó adicionalmente por ELISA indirecto, buscando corroborar el nivel de detección de cada suero recolectado de la gallina inmunizada, enfrentándolos en una dilución 1:5000 a 500ng de MBP-E6VPH16, evidenciando aumento del nivel de detección del antígeno respecto al suero pre inmune (figura 29), teniendo presente que se ha reportado que en el modelo aviar empleado, luego de 7 días desde la primera inoculación ocurre producción de IgYs (139).

Figura 29. Evaluación de IgY anti MBP-E6VPH16 presentes en suero mediante ELISA indirecto.
Se presenta el promedio de dos réplicas técnicas. Anticuerpo primario: suero (1:5.000), anticuerpo secundario: anti IgY-HRP (1:10.000). 1: Suero pre inmune. 2: Suero día 14. 3: Suero día 21. 4: Suero día 28. 5: Suero día 35. 6: Suero día 42. BSA: Control negativo.

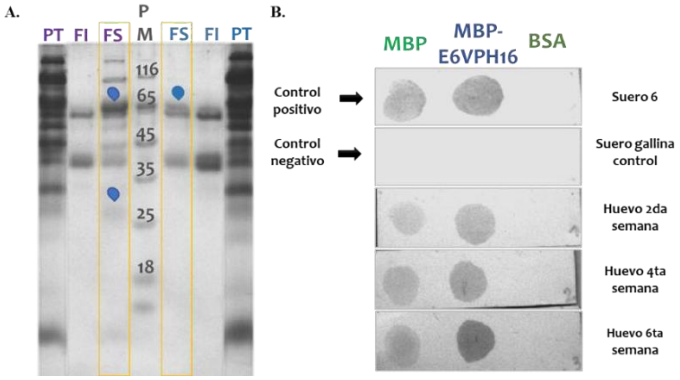


6.3.2 PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES ANTI MBP-E6VPH16

Purificación de anticuerpos IgY a partir de yema de huevo anti MBP-E6VPH16

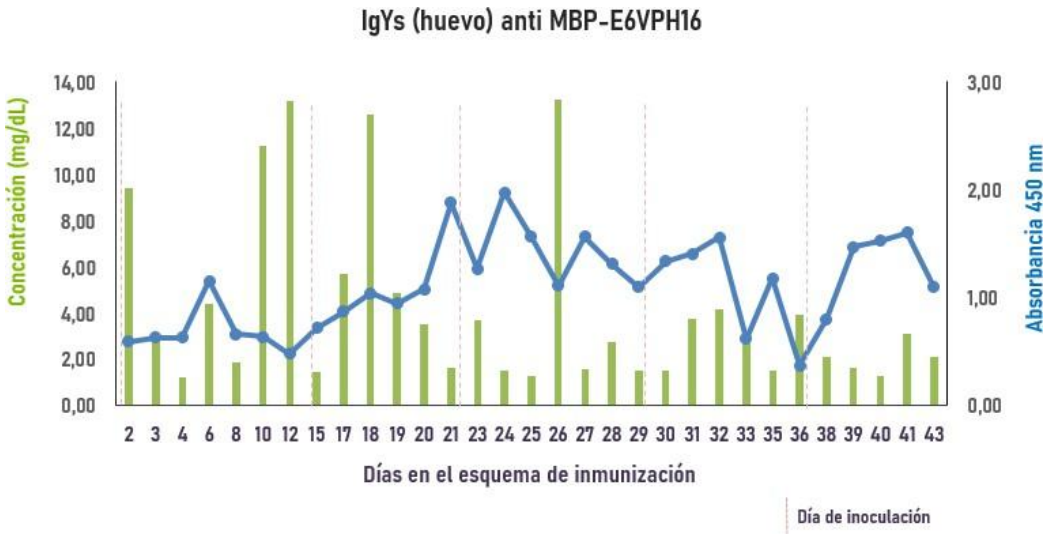
Durante el esquema de inmunización se realizó la recolección de huevos diariamente, con el fin de obtener las IgY allí presentes. Teniendo en cuenta que, en general, las IgM e IgA prevalecen en la clara de los huevos y las IgY son predominantes en las yemas (134), se realizó la purificación con sulfato de amonio al 35% de las proteínas presentes en la yema de todos los huevos y se evaluó el proceso (para uno de los huevos seleccionado al azar) mediante SDS-PAGE 12% (figura 30-A). Adicionalmente, se seleccionaron tres huevos (uno del inicio, uno de la mitad y uno del final del esquema de inmunización) para verificar mediante *dot blot*, el reconocimiento del antígeno por parte de las IgY (figura 30-B), posterior al proceso de purificación.

Figura 30. Purificación de IgY anti MBP-E6VPH16 a partir de huevos.
A. Evaluación del proceso de purificación mediante precipitación con sulfato de amonio al 35%.
(SDS-PAGE 12% - Azul de Coomassie). PT: proteínas totales. FI: fracción insoluble. FS: fracción soluble. Morado: huevo de gallina inmunizada con MBP-E6VPH16. Azul: huevo de gallina control. Se señala con puntos azules las cadenas pesadas (68kDa) y cadenas livianas (27 kDa).
B. Evaluación de reconocimiento de MBP-E6VPH16 con IgY purificadas a partir de las yemas y sueros, mediante *dot blot.*
Nitrocelulosa. Anticuerpo primario: suero (1:5.000), anticuerpo secundario: anti IgY-fosfatasa alcalina (1:10.000).



Una vez verificada la purificación de las IgY presentes en la yema de los huevos, se evaluó mediante ELISA indirecto su capacidad de reconocimiento usando como antígeno 500 ng de MBP-E6VPH16, como anticuerpo primario las IgY de cada huevo (1:500) y como anticuerpo secundario anti IgY-HRP (1:10.000), permitiendo así, la selección del huevo con las IgY con mayor nivel de reconocimiento del antígeno para los ensayos posteriores. Adicionalmente, se estimó la concentración (mg/mL) aproximada de las IgY purificadas de cada huevo mediante espectrofotometría a 280nm (figura 31).

Figura 31. Evaluación de la producción de IgYs anti MBP-E6VPH16 presentes en huevos durante el esquema de inmunización.
Barras: absorbancia a 280nm, cuantificación de proteínas precipitadas con sulfato de amonio (35%). Línea de tendencia: absorbancia a 405nm, estimación de anticuerpos específicos mediante ELISA indirecto. Línea vertical punteada indica los días de inoculación.



Tal como se mencionó anteriormente, las IgY aviares se transfieren desde el torrente sanguíneo hasta la yema del huevo, donde se almacenan para proporcionar protección al embrión. Se han reportado concentraciones de IgY en yema entre 7 y 15 mg/mL (139). En este estudio, la concentración aproximada de IgY en cada huevo es concordante con dichos reportes. No obstante, es necesario resaltar que este tipo de factores como la concentración de inmunoglobulinas es muy cambiante, pues es directamente dependiente de factores como la raza, edad y el tipo y cantidad de antígeno inoculado (140).

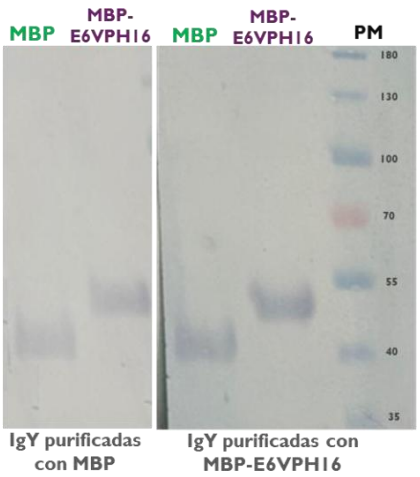
De la misma forma, el perfil de reconocimiento del antígeno (MBP-E6VPH16) demuestra aumento en el nivel de detección proporcional al aumento de días de inoculación, evidenciando en el último refuerzo una reactivación del nivel de reconocimiento y presentando comportamientos similares respecto a otros procesos de producción de anticuerpos realizados previamente en nuestro grupo de investigación LIBBIQ (con antígenos más complejos y de mayor peso molecular) que generalmente abarcan entre 31 y 33 días de inoculación (141,142).

Purificación de anticuerpos IgY por afinidad a los antígenos MBP y E6VPH16

Teniendo en cuenta que el antígeno utilizado para la inmunización fue MBP-E6VPH16, es de esperar que se generen anticuerpos policlonales que reconozcan MBP y anticuerpos policlonales que reconozcan el péptido E6VPH16. Con el propósito de obtener las IgY que presenten mayor afinidad para E6VPH16, se sometió el suero que evidenció mayor reconocimiento de MBP-E6VPH16 (figura 28) en una dilución 1:5.000 a una purificación por afinidad utilizando 500ng de MBP previamente inmovilizada sobre nitrocelulosa, como se describió en 5.3.2 e igualmente se purificó por afinidad empleando 500ng del péptido E6VPH16 inmovilizado. Los eluidos obtenidos de cada purificación se emplearon en el reconocimiento de los antígenos respectivamente, mediante *western blot* (figura 32).

Figura 32. Evaluación mediante *western blot* de las IgYs purificadas anti MBP y anti MBP-E6VPH16 por afinidad al antígeno.

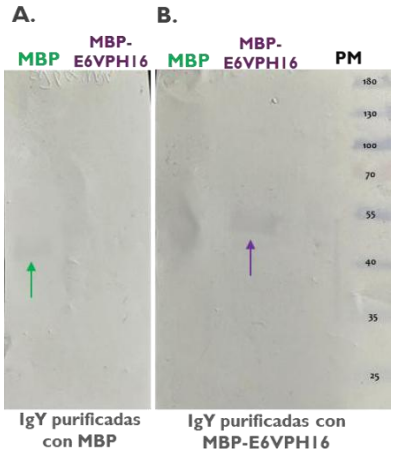
Nitrocelulosa: 250 ng de antígeno: MBP (44 kDa) en verde y MBPE6VPH16 (50 kDa) en morado, PM (marcador de peso molecular preteñido), anticuerpo primario: A. anti MBP B. anti MBP-E6VPH16 (1:5.000), anticuerpo secundario: anti IgY-fosfatasa alcalina (1:10.000).



Considerando los antígenos utilizados, el proceso de purificación no permitía aislar los anticuerpos específicos dirigidos hacia el péptido E6VPH16, ya que no se utilizó el péptido aislado. No obstante, se esperaba que el tratamiento con MBP enriqueciera la fracción de anticuerpos contra E6VPH16 (figura 32). No se observan diferencias en cuanto a especificidad, indicando que no se lograron neutralizar los anticuerpos contra MBP con este tratamiento. Se abordó una segunda estrategia para optimizar estos resultados empleando el protocolo de purificación propuesto por Benet C. *et al.* en el cual se realiza una primera separación de anticuerpos inespecíficos dirigidos a antígenos no diana, donde previo a enfrentar el suero al antígeno diana fijado en la membrana de nitrocelulosa se realizó una preincubación con la muestra que contenía antígenos no diana, esto con el fin de remover los anticuerpos que no son de interés (143). Teniendo en cuenta lo anterior, se modificó el protocolo de purificación de anticuerpos por afinidad al antígeno, realizando una preincubación del suero diluido 1:5.000 con 500 ng de MBP en solución durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación constante. Posteriormente, se continuó el protocolo tal como se había realizado previamente.

En la figura 33 se presenta la evaluación del proceso mediante *western blot*, evidenciando que se logró un reconocimiento específico por el antígeno de interés (E6VPH16) y por la MBP. Estos anticuerpos se emplearán en ensayos posteriores de caracterización.

Figura 33. Evaluación de IgY purificadas por afinidad al antígeno, previa incubación con antígeno no diana en solución, mediante *western blot*.
A. Inmunodetección de MBP (44kDa) IgYs eluidas de purificación con MBP. **B.** Inmunodetección de MBP-E6VPH16 (50kDa) IgYs eluidas de purificación con MBP-E6VPH16. Nitrocelulosa: 250 ng de antígeno, anticuerpo primario: suero enfrentado a MBP y suero enfrentado a MBP-E6VPH16 (1:5.000), anticuerpo secundario: anti IgY-fosfatasa alcalina (1:10.000).



Los anticuerpos generados contra MBP, aunque inicialmente vistos como contaminantes, pueden ser considerados herramientas inmunológicas valiosas, ya que permiten el reconocimiento de proteínas recombinantes asociadas a MBP y serán insumos de utilidad en estudios a futuro.

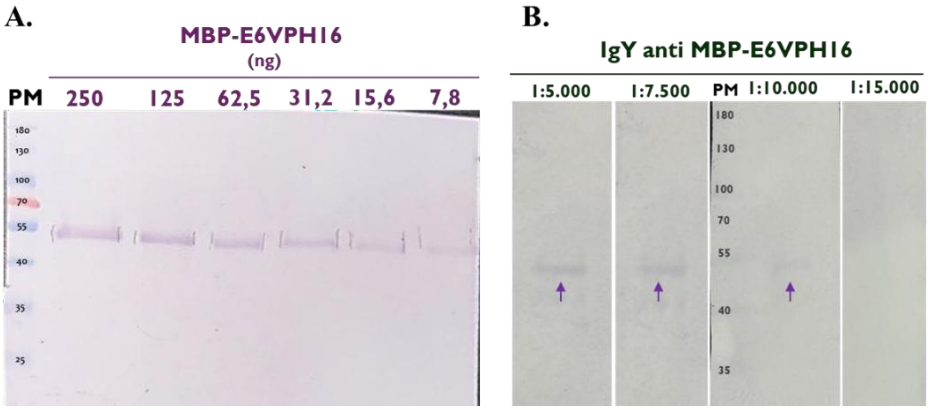
6.4 EVALUACIÓN DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS POLICLONALES ANTI MBP-E6VPH16

Con el fin de determinar el menor título de anticuerpos capaz de reconocer la menor concentración de antígeno se evaluaron mediante *western blot* los IgY que presentaron mayor afinidad por E6VPH16 previamente purificados y mediante ELISA indirecto los IgY presentes en el huevo que evidenció el mayor nivel de reconocimiento del antígeno en los ensayos previos. Lo anterior con el propósito de evaluar la capacidad de reconocimiento de epítopos lineales y conformacionales (figura 34).

Figura 34. Evaluación de sensibilidad de anticuerpos policlonales anti MBP-E6VPH16 en suero, mediante *western blot.*

A. Nitrocelulosa: anticuerpo primario: IgY anti MBP-E6VPH16 (1:5.000), anticuerpo secundario: anti IgY-fosfatasa alcalina (1:10.000). **B.** Nitrocelulosa. Antígeno: 7,8ng de

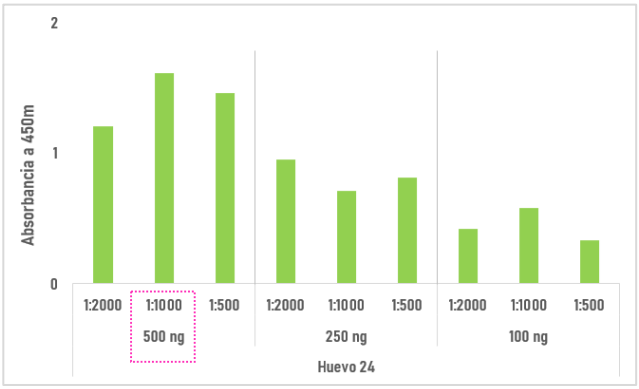
MBP-E6VPH16 (50 kDa), anticuerpo primario: IgY anti MBP-E6VPH16 en diluciones 1:5.000, 1:7.500, 1:10.000 y 1:15.000, anticuerpo secundario: anti IgY-fosfatasa alcalina (1:10.000). PM: Marcador de peso molecular preteñido



Estos ensayos permitieron determinar que las IgY generadas tienen la capacidad de reconocer hasta 7,8ng de MBP-E6VPH16 al ser empleados en una dilución 1:5000 (figura 34-A). Así mismo, tienen la capacidad de reconocer mínimo 7,8ng de MBP-E6VPH16 en una dilución de hasta 1:10.000 (figura 34-B).

Por su parte, el ensayo ELISA indirecto permitió determinar que se logra un reconocimiento adecuado y suficiente de 500ng de MBP-E6VPH16 usando como anticuerpo primario las IgY recuperadas de huevo en una dilución 1:1.000 (figura 35), lo cual coincide con los resultados obtenidos en estudios previamente realizados en nuestro grupo de investigación LIBBIQ, en donde se detectan 500ng de antígeno por parte de las IgY purificadas de huevo en una dilución 1:500 (141,142).

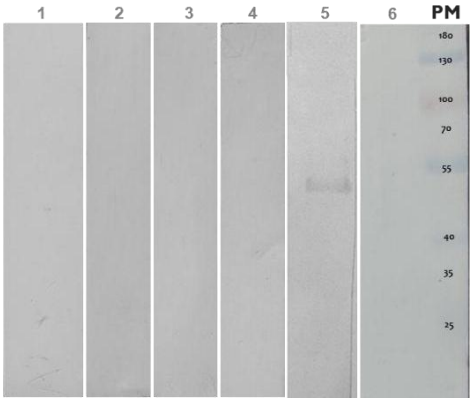
Figura 35. Evaluación de condiciones óptimas de reconocimiento de MBP-E6VPH16 por parte de las IgY en huevo, mediante ELISA indirecto



Evaluación de especificidad de los anticuerpos policlonales anti MBP-E6VPH16

El grado de especificidad de los IgY anti MBP-E6VPH16 se evaluó mediante *western blot* enfrentándolos a a BSA (como control negativo) y a diferentes proteínas recombinantes previamente producidas en nuestro grupo de investigación (LIBBIQ) que contaban bien sea, con la etiqueta 6xHis o las dos etiquetas 6xHis-SUMO (figura 36). Las proteínas etiquetadas con 6xHis, corresponden a la proteína verde fluorescente (EGFP) (144), la T4Ligasa y SpCas9 (145) y la que cuenta con el tag 6xHis-SUMO es la triparedoxina de *Leishmania braziliensis* (146), Este ensayo permitió determinar que los IgY anti MBP-E6VPH16 generados no presentan reactividad cruzada con las proteínas recombinantes evaluadas.

Figura 36. Evaluación de reconocimiento cruzado de anticuerpos policlonales anti MBP-E6VPH16 en suero, mediante *western blot.*
Nitrocelulosa. Antígeno 250ng (1: 6xHis-EGFP (30kDa), 2: SpCas9 -6xHis (158 kDa), 3: T4ligasa (95 kDa), 4: 6xHis-SUMO-LbTXN (37 kDa), 5: MBP-E6VPH16 (50 kDa), 6: BSA (66 kDa)), anticuerpo primario: IgY anti MBP-E6VPH16 (1:5.000), anticuerpo secundario: anti IgY-fosfatasa alcalina (1:10.000).



Así pues, se puede afirmar que el abordaje de la tecnología de ADN recombinante para la producción del antígeno a inocular en modelo aviar fue una estrategia costo efectiva comparado con otras estrategias como la síntesis química, que implicaría costos adicionales necesarios para asegurar la inmunogenicidad como la conjugación péptido-proteína transportadora (147). Adicionalmente, la proteína recombinante producida (MBP-E6VPH16) fue un excelente punto de partida para la obtención de anticuerpos que reconocen el péptido E6VPH16 en forma específica, como se evidenció con el protocolo de neutralización de los anticuerpos anti MBP.

Cabe resaltar que, partiendo de 150 μg de antígeno inoculado, la cantidad de IgYs totales generadas en promedio para cada huevo fue aproximadamente 25 mg/huevo, lo que inicialmente podría considerarse como una baja cantidad respecto a las reportadas para inmunizaciones con otro tipo de proteínas, las cuales oscilan entre 50 y 150 mg/huevo (148). No obstante, es necesario resaltar que las IgY de este trabajo se generaron a partir de un péptido, por lo que la cinética de producción de anticuerpos no es comparable. Por otro lado, las cantidades reportadas para producción de anticuerpos a partir de péptidos, donde generalmente se requieren entre 5 y 20mg de péptido unido a una proteína transportadora, oscilan entre 0,5 y 5 mg/huevo (149)

Finalmente, las herramientas biotecnológicas aplicadas permitieron la generación de bioinsumos tales como el vector recombinante, el antígeno recombinante, y los anticuerpos (IgY), que no solo constituyen un recurso para el desarrollo de este trabajo, sino también para escalar su aplicación a otro tipo de metodologías, como el empleo de la proteína recombinante en la selección de aptámeros que permitan identificar otro tipo de moléculas para el reconocimiento y detección de estos tipos de VPH.

7. CONCLUSIONES

Este trabajo permitió la generación de bioinsumos para la inmunodetección de la oncoproteína E6 del VPH16 en modelo aviar, mediante el uso de la tecnología de ADN recombinante. Adicionalmente, se identificaron regiones de la oncoproteína E6 de los otros 15 tipos de VPH alto riesgo, de manera que sea posible mediante la aplicación de la misma estrategia, la generación de los bioinsumos necesarios para el ensamble de una herramienta de inmunodetección del Virus del Papiloma Humano, indicando el posible desarrollo de lesiones precancerosas en el cuello uterino.

Conclusiones específicas de cada apartado

Mediante aplicaciones bioinformáticas se identificaron 6 regiones conservadas entre las oncoproteínas E6 de 12 tipos de VPH y 4 regiones inmunogénicas de las E6 pertenecientes a otros 4 tipos de VPH, lo que permitiría la generación de 10 tipos de anticuerpos policlonales con capacidad de reconocimiento de los 16 tipos de VPH capaces de desencadenar cáncer de cuello uterino.

Usando tecnología de ADN recombinante se generó el vector recombinante pMALc5X-E6VPH16 útil para transformación de sistema de expresión bacteriano, otorgando resistencia a ampicilina y la información genética necesaria para la expresión de la proteína recombinante MBP-E6VPH16.

Se generó la cepa de mantenimiento *E. coli* TOP10-pMALc5X-E6VPH16 para conservación del vector de expresión pMALc5X-E6VPH16. Así mismo, se generó la cepa de expresión *E. coli* BL21DE3 - pMALc5X-E6VPH16 capaz de expresar con un rendimiento de 14,5 mg/L a partir de 100mL de cultivo, la proteína recombinante MBP-E6VPH16 que fue purificada mediante cromatografía de afinidad a amilosa y constituyó el bioinsumo determinante en la generación del bioinsumo inmunológico, usándola como antígeno para la inmunización del modelo aviar.

Así mismo se generó la cepa de expresión *E. coli* BL21DE3 - pMALc5X que permitió la producción de la proteína recombinante MBP, que luego de su purificación mediante cromatografía de afinidad a amilosa fue útil como control en los ensayos de innmunodetección y purificación de anticuerpos por afinidad al antígeno.

Gracias a la inmunización del modelo aviar se generaron anticuerpos policlonales IgY, obtenidos a partir de la recolección de sangre y huevos de este modelo. La evaluación de estos anticuerpos mediante ensayos de *western blot* y ELISA indirecto permitió confirmar su capacidad de reconocimiento de la proteína recombinante MBP-E6VPH16 y su caracterización en cuanto a sensibilidad y especificidad determinó que poseen capacidad de detección de la proteína recombinante MBP-E6VPH16 en una mínima concentración de 7,8ng en una dilución de hasta 1:10.000 y no presentan reactividad cruzada con otras proteínas recombinantes producidas en el grupo de investigación LIBBIQ.

La cantidad de anticuerpos IgY anti MBP-E6VPH16 generados se puede considerar elevada respecto a las cantidades reportadas de IgY producidas en modelo aviar a partir de la inmunización con otro tipo de péptidos.

La purificación por afinidad al antígeno de los anticuerpos policlonales IgY generados permitió la obtención de anticuerpos policlonales con mayor afinidad a la proteína MBP, que pueden ser usados en otro tipo de investigaciones que requieran ensayos de inmunodetección de esta proteína.

7.1 PERSPECTIVAS

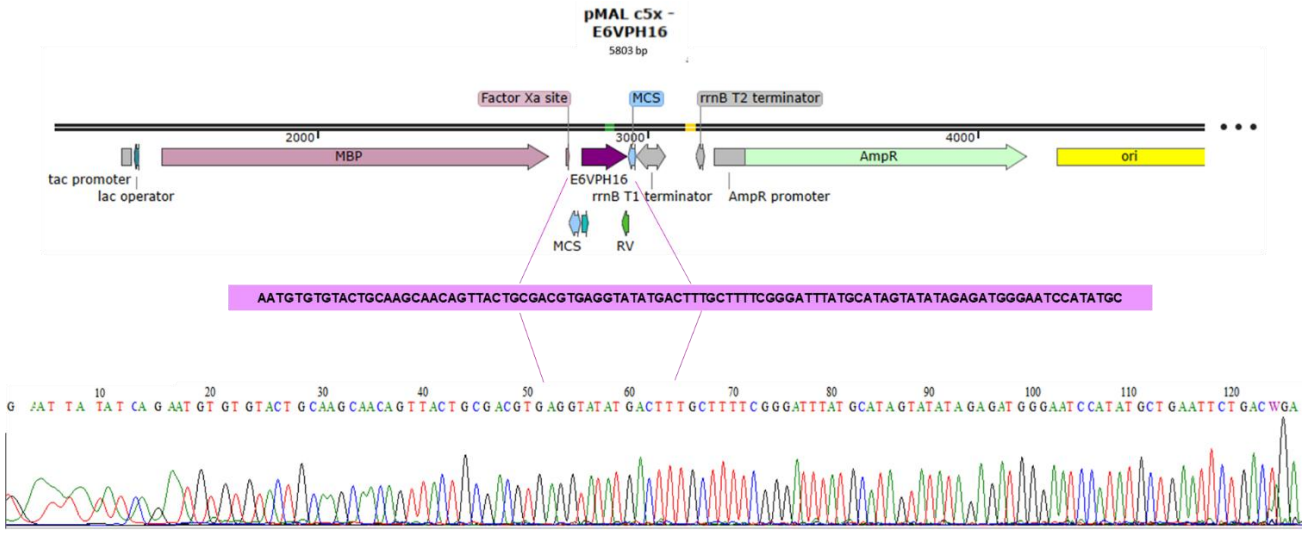
Se plantea como la continuidad de este trabajo, la generación de los bioinsumos (vectores recombinantes, proteínas recombinantes y anticuerpos policlonales IgY) útiles para la detección de la oncoproteína E6 de los demás tipos de VPH de alto riesgo capaces de generar cáncer de cuello uterino.

Considerando las cantidades de anticuerpos policlonales IgY obtenidos, se sugiere la purificación de la totalidad de los anticuerpos generados, de manera que se tengan disponibles en el grupo de investigación para los ensayos iniciales de la cromatografía de flujo lateral.

Así mismo, se plantea la posibilidad de escalar la aplicación de la proteína recombinante producida (MBP-E6VPH16) a otro tipo de metodologías, como la selección de aptámeros para la identificación de otro tipo de moléculas útiles en el reconocimiento y detección de estos tipos de VPH.

ANEXOS

Anexo N.1 Secuenciación Sanger inserto E6VPH16 a partir de amplificado de pMALc5X-E6VPH16.



BIBLIOGRAFÍA

1. Merlo LMF, Mandik-Nayak L. Adaptive Immunity: B Cells and Antibodies. Cancer Immunotherapy: Immune Suppression and Tumor Growth: Second Edition. 2013 Jan 1;25–40.

2. Crescioli S, Kaplon H, Chenoweth A, Wang L, Visweswaraiah J, Reichert JM. Antibodies to watch in 2024. MAbs [Internet]. 2024 Dec 31 [cited 2025 Apr 9];16(1). Available from: https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19420862.2023.2297450

3. Sukumaran A, Thomas T, Thomas R, Thomas RE, Paul JK, Vasudevan DM. Development and Troubleshooting in Lateral Flow Immunochromatography Assays. Indian Journal of Clinical Biochemistry [Internet]. 2021 Apr 1 [cited 2025 Mar 7];36(2):208–12. Available from: https://link.springer.com/article/10.1007/s12291-020-00887-5

4. Khan S, Ullah MW, Siddique R, Nabi G, Manan S, Yousaf M, et al. Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life. 2016 [cited 2024 Apr 7]; Available from: http://dx.doi.org/10.1155/2016/2405954

5. Gatica R, Slebe JC, Ulloa J, Yáñez AJ. Comparación de dos vías de inoculación en la producción de anticuerpos contra fructosa 1,6-bisfosfatasa en huevos de gallina. Arch Med Vet [Internet]. 2004 [cited 2025 Jan 18];36(1):49–58. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2004000100005&lng=es&nrm=iso&tlng=es

6. de Sanjosé S, Brotons M, Pavón MA. The natural history of human papillomavirus infection. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2023 Mar 19];47:2–13. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521693417301335

7. Formana D, de Martel C, Lacey CJ, Soerjomatarama I, Lortet-Tieulent J, Bruni L, et al. Global Burden of Human Papillomavirus and Related Diseases. Vaccine. 2012 Nov 20;30(SUPPL.5):F12–23.

8. Scarth JA, Patterson MR, Morgan EL, Macdonald A. The human papillomavirus oncoproteins: a review of the host pathways targeted on the road to transformation. J Gen Virol [Internet]. 2021 Jan 11 [cited 2023 Aug 27];102(3):1540. Available from: /pmc/articles/PMC8148304/

9. LPC_Guia_Profesionales_julio_2016.

10. Zerón A. Inmunización e inmunidad. Regreso a clases de inmunología. Revista de la Asociación Dental Mexicana. 2021;78(3):124–7.

11. Reyes Martín E, Prieto Martín A, Díaz Martín D, Álvarez-Mon Soto M. Inmunidad innata e inmunidad adaptativa. Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado. 2013 Mar 1;11(28):1760–7.

12. Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. Nature Immunology 2015 16:4 [Internet]. 2015 Mar 19 [cited 2025 Apr 10];16(4):343–53. Available from: https://www.nature.com/articles/ni.3123

13. Prieto Martín A, Barbarroja Escudero J, Haro Girón S, Monserrat Sanz J. Respuesta inmune adaptativa y sus implicaciones fisiopatológicas. Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado. 2017 Jan 1;12(24):1398–407.

14. Fraile Sauce LJ. Transferencia de la inmunidad humoral y celular. Suis, ISSN 1699-7867, Nº 150, 2018, págs 12-18 [Internet]. 2018 [cited 2025 Apr 10];(150):12–8. Available from: https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6572168&info=resumen&idioma=SPA

15. Prieto Martín A, Barbarroja Escudero J, Barcenilla Rodríguez H, Díaz Martín D. Funciones de los linfocitos B. Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado. 2013 Mar 1;11(28):1752–9.

16. (PDF) Inmunoglobulinas [Internet]. [cited 2025 Apr 10]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/233794658_Inmunoglobulinas

17. Gartner LP, Hiatt JL. Color Atlas and Text of Histology-sixth editon. Lippinot Williams and Wilkins [Internet]. 2014 [cited 2025 Apr 10];2–148. Available from: file:///Users/aylingokhan/Documents/Mendeley Desktop/Gartner, HIatt - 2014 - Color Atlas and Text of Histology-sixth editon.pdf

18. Mamani Yujra R, Tito Ramírez E. Revista de Actualización Clínica Investiga. Revista de Actualización Clínica Investiga [Internet]. 2011 [cited 2025 Apr 10];13:663. Available from: http://revistasbolivianas.umsa.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2304-37682011001000007&lng=pt&nrm=iso&tlng=es

19. Digilio P. Biotecnología, desarrollo y neoliberalismo. Erasmus Revista para el diálogo intercultural [Internet]. 2021 Apr 9 [cited 2025 Apr 12];23(1). Available from: https://qellqasqa.com.ar/ojs/index.php/erasmus/article/view/609

20. Hernández Fonseca H. Biotecnología. Revista Científica [Internet]. 2010 [cited 2025 Apr 12];20(3):225–6. Available from: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592010000300001&lng=es&nrm=iso&tlng=es

21. Notin P, Rollins N, Gal Y, Sander C, Marks D. Machine learning for functional protein design. Nature Biotechnology 2024 42:2 [Internet]. 2024 Feb 15 [cited 2025 Apr 12];42(2):216–28. Available from: https://www.nature.com/articles/s41587-024-02127-0

22. Morbioli GG, Mazzu-Nascimento T, Aquino A, Cervantes C, Carrilho E. Recombinant drugs-on-a-chip: The usage of capillary electrophoresis and trends in miniaturized

systems - A review. Anal Chim Acta [Internet]. 2016 Sep 7 [cited 2025 Apr 12];935:44–57. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27543014/

23. Thompson MK, Fridy PC, Keegan S, Chait BT, Fenyö D, Rout MP. Optimizing Selection of Large Animals for Antibody Production by Screening Immune Response to Standard Vaccines. J Immunol Methods [Internet]. 2016 Mar 1 [cited 2025 Apr 12];430:56. Available from: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4769958/

24. Greenfield EA. Immunizing Animals. Cold Spring Harb Protoc [Internet]. 2022 Jul 1 [cited 2025 Apr 12];2022(7):267–94. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35820791/

25. Fibriani A, Naisanu K, Yamahoki N, Kinanti DR. Development of polyclonal chicken egg yolk immunoglobulin Y (IgY) antibodies targeting SARS-CoV-2 multi-epitope antigen. J Virol Methods [Internet]. 2025 [cited 2025 Apr 13];331:115062. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39551444/

26. Bzhalava D, Eklund C, Dillner J. International standardization and classification of human papillomavirus types. Virology [Internet]. 2015 Feb 1 [cited 2023 Mar 19];476:341–4. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682214005777

27. Chen Z, Schiffman M, Herrero R, DeSalle R, Anastos K, Segondy M, et al. Classification and Evolution of Human Papillomavirus Genome Variants: Alpha-5 (HPV26, 51, 69, 82), Alpha-6 (HPV30, 53, 56, 66), Alpha-11 (HPV34, 73), Alpha-13 (HPV54) and Alpha-3 (HPV61). Virology [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2023 Mar 19];516:86. Available from: /pmc/articles/PMC6093212/

28. Zou K, Huang Y, Li Z. Prevention and treatment of human papillomavirus in men benefits both men and women. Vol. 12, Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. Frontiers Media S.A.; 2022.

29. Petca A, Borislavschi A, Zvanca M, Petca RC, Sandru F, Dumitrascu M. Non-sexual HPV transmission and role of vaccination for a better future (Review). Exp Ther Med. 2020 Oct 13;20(6):1–1.

30. Malinova M. [Human papillomavirus infection and pregnancy]. Akush Ginekol (Mosk) [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2023 Oct 27];54 Suppl 2:14–8. Available from: https://europepmc.org/article/med/26817247

31. Araldi RP, Sant'Ana TA, Módolo DG, de Melo TC, Spadacci-Morena DD, de Cassia Stocco R, et al. The human papillomavirus (HPV)-related cancer biology: An overview. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2018 Oct 1;106:1537–56.

32. Santos-López G, Márquez-Domínguez L, Reyes-Leyva J, Vallejo-Ruiz V. Aspectos generales de la estructura, la clasificación y la replicación del virus del papiloma humano. [cited 2023 Mar 9]; Available from: http://viralzone.expasy.org/.

33. Pappa KI, Kontostathi G, Lygirou V, Zoidakis J, Anagnou NP. Novel structural approaches concerning HPV proteins: Insight into targeted therapies for cervical cancer (Review). Vol. 39, Oncology Reports. Spandidos Publications; 2018. p. 1547–54.

34. Nguyen HP, Ramírez-Fort MK, Rady PL. The Biology of Human Papillomaviruses. Current Problems in Dermatology (Switzerland) [Internet]. 2014 [cited 2023 Mar 18];45:19–32. Available from: https://www.karger.com/Article/FullText/355959

35. Vashisht S, Mishra H, Mishra PK, Ekielski A, Talegaonkar S. Structure, Genome, Infection Cycle and Clinical Manifestations Associated with Human Papillomavirus. Curr Pharm Biotechnol. 2019 Aug 4;20(15):1260–80.

36. Kirk A, Graham S V. The human papillomavirus late life cycle and links to keratinocyte differentiation. J Med Virol [Internet]. 2024 Feb 1 [cited 2025 Mar 22];96(2):e29461. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jmv.29461

37. Sravani AB, Ghate V, Lewis S. Human papillomavirus infection, cervical cancer and the less explored role of trace elements. 2011 [cited 2023 Oct 29]; Available from: https://doi.org/10.1007/s12011-022-03226-2

38. Verssimo J, de Medeiros Fernandes TAA. Human Papillomavirus: Biology and Pathogenesis. In: Human Papillomavirus and Related Diseases - From Bench to Bedside - A Clinical Perspective. InTech; 2012.

39. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. Vol. 30, Vaccine. Elsevier Ltd; 2012.

40. Hampson IN, Oliver AW, Hampson L. Potential effects of human papillomavirus type substitution, superinfection exclusion and latency on the efficacy of the current l1 prophylactic vaccines. Vol. 13, Viruses. MDPI AG; 2021.

41. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. Rev Med Virol [Internet]. 2015 Mar 1 [cited 2023 Mar 18];25(S1):2–23. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/rmv.1822

42. Zanier K, Ould M'hamed Ould Sidi A, Boulade-Ladame C, Rybin V, Chappelle A, Atkinson A, et al. Article Solution Structure Analysis of the HPV16 E6 Oncoprotein Reveals a Self-Association Mechanism Required for E6-Mediated Degradation of p53.

43. Illiano E, Demurtas OC, Massa S, Bonito P, Consalvi V, Chiaraluce R, et al. Production of functional, stable, unmutated recombinant human papillomavirus E6 oncoprotein: Implications for HPV-tumor diagnosis and therapy. J Transl Med [Internet]. 2016 Jul 28 [cited 2023 Mar 24];14(1):1–14. Available from: https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-016-0978-6

44. Nominé Y, Masson M, Charbonnier S, Zanier K, Ristriani T, Deryckère F, et al. Structural and functional analysis of E6 oncoprotein: Insights in the molecular pathways of human papillomavirus-mediated pathogenesis. Mol Cell [Internet]. 2006 Mar 3 [cited 2024 Nov 3];21(5):665–78. Available from: http://www.cell.com/article/S1097276506000463/fulltext

45. Li S, Hong X, Wei Z, Xie M, Li W, Liu G, et al. Ubiquitination of the HPV oncoprotein E6 is critical for E6/E6AP-mediated p53 degradation. Front Microbiol [Internet]. 2019 Oct 31 [cited 2025 Mar 23];10(OCT):497413. Available from: www.frontiersin.org

46. Ferreira AR, Ramalho AC, Marques M, Ribeiro D. cancers The Interplay between Antiviral Signalling and Carcinogenesis in Human Papillomavirus Infections. 2020 [cited 2023 Oct 29]; Available from: www.mdpi.com/journal/cancers

47. Stewart BZ, Caria S, Humbert PO, Kvansakul M. Structural analysis of human papillomavirus E6 interactions with Scribble PDZ domains. FEBS J [Internet]. 2023 Jun 1 [cited 2025 Mar 23];290(11):2868–80. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/febs.16718

48. Argentina R, María Elina Totaro L. ANÁLISIS DE LOS GENES E6, E7 y L1 DEL VIRUS PAPILOMA HUMANO TIPO 16 COMO MARCADORES PRONÓSTICO TEMPRANOS DE LA PROGRESIÓN DE LESIONES DE CUELLO UTERINO.

49. Senba M, Mori N. Mechanisms of virus immune evasion lead to development from chronic inflammation to cancer formation associated with human papillomavirus infection. Vol. 6, Oncology Reviews. 2012. p. 135–44.

50. Egawa N, Doorbar J. The low-risk papillomaviruses. Virus Res. 2017 Mar 2;231:119–27.

51. Arbyn M, Tommasino M, Depuydt C, Dillner J. Are 20 human papillomavirus types causing cervical cancer? J Pathol [Internet]. 2014 Dec 1 [cited 2023 Mar 19];234(4):431–5. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/path.4424

52. Kim M, Kim J, Park NJY, Park JY. Comparison of Seegene Anyplex II HPV28 assay with BD Onclarity HPV assay for human papillomavirus genotyping. PLoS One [Internet]. 2022 Jul 1 [cited 2023 Mar 20];17(7):e0267836. Available from: https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0267836

53. Toro-Montoya AI, Tapia-Vela LJ. Human papillomavirus (HPV) and cancer. Vol. 25, Medicina y Laboratorio. Universidad de Antioquia; 2021. p. 467–83.

54. Ruiz AA, Ruiz AAA, Cruz MO, Pino MMGG del, Palacios KR, Hernández ONM, et al. Cáncer cérvicouterino. Algo para reflexionar. Medisur [Internet]. 2019 Nov 6 [cited 2024 Oct 2];17(6):857–66. Available from: http://medisur.sld.cu/index.php/medisur/article/view/4446

55. Piña-Sánchez P. Human Papillomavirus: Challenges and Opportunities for the Control of Cervical Cancer. Arch Med Res. 2022 Dec 1;53(8):753–69.

56. WHO. CERVIX UTERI Cancer - GLOBOCAN. 2022.

57. WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO guideline for screening and treatment of cervical pre-cancer lesions for cervical cancer prevention. WHO guideline for screening and treatment of cervical pre-cancer lesions for cervical cancer prevention [Internet]. 2021 [cited 2024 Oct 2]; Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK572317/

58. Día Mundial del Cáncer de Cuello Uterino 2024 - Cuenta de Alto Costo [Internet]. [cited 2025 Mar 24]. Available from: https://cuentadealtocosto.org/cancer/dia-mundial-del-cancer-de-cuello-uterino-2024/

59. Blackadar CB. Historical review of the causes of cancer. World J Clin Oncol [Internet]. 2016 Feb 10 [cited 2023 Mar 19];7(1):54–86. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26862491/

60. Tanriverdi O, Tasar M, Yilmaz M, Durak M, Sezer S, Demir H, et al. Important milestones for cancer at the Nobel prize. Indian J Cancer [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2023 Mar 19];57(4):370–5. Available from: https://journals.lww.com/indianjcancer/Fulltext/2020/57040/Important_milestones_for_cancer_at_the_Nobel_prize.2.aspx

61. Waggoner SE. Cervical cancer. Lancet [Internet]. 2003 Jun 28 [cited 2023 Nov 18];361(9376):2217–25. Available from: http://www.thelancet.com/article/S0140673603137786/fulltext

62. Nelson CW, Mirabello L. Human papillomavirus genomics: Understanding carcinogenicity. 2023 [cited 2023 Oct 31]; Available from: https://doi.org/10.1016/j.tvr.2023.200258

63. Wang X, Huang X, Zhang Y. Involvement of Human Papillomaviruses in Cervical Cancer. Front Microbiol [Internet]. 2018 Nov 28 [cited 2023 Mar 20];9(NOV). Available from: /pmc/articles/PMC6279876/

64. Gravitt PE, Winer RL, Mcbride AA, Munger K. Natural History of HPV Infection across the Lifespan: Role of Viral Latency. [cited 2023 Mar 18]; Available from: www.mdpi.com/journal/viruses

65. Molina MA, Steenbergen RDM, Pumpe A, Kenyon AN, Melchers WJG. HPV integration and cervical cancer: a failed evolutionary viral trait. Trends Mol Med. 2024 Sep 1;30(9):890–902.

66. Della Fera AN, Warburton A, Coursey TL, Khurana S, McBride AA. Persistent Human Papillomavirus Infection. Viruses 2021, Vol 13, Page 321 [Internet]. 2021 Feb 20 [cited 2023 Mar 18];13(2):321. Available from: https://www.mdpi.com/1999-4915/13/2/321/htm

67. Rincón R DF, Morales L LA, Rincón-Orozco B, Rincón R DF, Morales L LA, Rincón-Orozco B. Modernas metodologías diagnosticas para la detección del Virus del Papiloma Humano y prevención del cáncer de cuello uterino. Revista de la Universidad Industrial de Santander Salud [Internet]. 2017 Sep 30 [cited 2025 Apr 14];49(3):478–88. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-08072017000300478&lng=en&nrm=iso&tlng=es

68. HPV Tests For Cervical Cancer Screening - PAHO/WHO | Pan American Health Organization [Internet]. [cited 2025 Apr 14]. Available from: https://www.paho.org/en/topics/cervical-cancer/hpv-tests-cervical-cancer-screening

69. Lowy DR. HPV vaccination to prevent cervical cancer and other HPV-associated disease: from basic science to effective interventions. J Clin Invest [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2023 Mar 20];126(1):5. Available from: /pmc/articles/PMC4701560/

70. Frazer IH. The HPV Vaccine Story. ACS Pharmacol Transl Sci [Internet]. 2019 Jun 6 [cited 2023 Mar 20];2(3):210. Available from: /pmc/articles/PMC7089001/

71. Markowitz LE, Schiller JT. Human Papillomavirus Vaccines. J Infect Dis [Internet]. 2021 Sep 30 [cited 2023 Mar 21];224(Supplement_4):S367–78. Available from: https://academic.oup.com/jid/article/224/Supplement_4/S367/6378095

72. Swailes AL, Hossler CE, Kesterson JP. Pathway to the Papanicolaou smear: The development of cervical cytology in twentieth-century America and implications in the present day. Gynecol Oncol. 2019 Jul 1;154(1):3–7.

73. Chrysostomou AC, Kostrikis LG. Methodologies of Primary HPV Testing Currently Applied for Cervical Cancer Screening. Life 2020, Vol 10, Page 290 [Internet]. 2020 Nov 19 [cited 2023 Mar 23];10(11):290. Available from: https://www.mdpi.com/2075-1729/10/11/290/htm

74. Saraiya M, Steben M, Watson M, Markowitz L. Evolution of cervical cancer screening and prevention in United States and Canada: Implications for public health practitioners and clinicians. Prev Med (Baltim) [Internet]. 2013 Nov [cited 2023 Mar 23];57(5):426. Available from: /pmc/articles/PMC4515308/

75. Cubie HA, Cuschieri K. Understanding HPV tests and their appropriate applications. Cytopathology [Internet]. 2013 Oct 1 [cited 2023 Mar 24];24(5):289–308. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/cyt.12083

76. Kocken M, Uijterwaal MH, De Vries ALM, Berkhof J, Ket JCF, Helmerhorst TJM, et al. High-risk human papillomavirus testing versus cytology in predicting post-treatment disease in women treated for high-grade cervical disease: a systematic review and meta-analysis. Gynecol Oncol [Internet]. 2012 May [cited 2024 Oct 5];125(2):500–7. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK97911/

77. Ministerio de Salud y Protección Social, Colombia. Guía de Práctica Clínica (GPC) para la detección y manejo de lesiones precancerosas de cuello uterino. 2014.

78. Jiménez Jiménez C, Paola Y, Muvdi M, Pacheco Hernández O, Antonio L, Castillo D. Técnica “VIA-VILI” y su aplicación comparativa en México y Colombia: scoping review. Paradigmas Socio-Humanísticos [Internet]. 2021 May 12 [cited 2024 Oct 6];3(2):38–49. Available from: https://revistas.juanncorpas.edu.co/index.php/revistaparadigmassh/article/view/542

79. Dong Z, Hu R, Du Y, Tan L, Li L, Du J, et al. Immunodiagnosis and Immunotherapeutics Based on Human Papillomavirus for HPV-Induced Cancers. Front Immunol. 2021 Jan 8;11:3408.

80. Gutierrez-Xicotencatl L, Salazar-Piña DA, Pedroza-Saavedra A, Chihu-Amparan L, Rodriguez-Ocampo AN, Maldonado-Gama M, et al. Humoral Immune Response Against Human Papillomavirus as Source of Biomarkers for the Prediction and Detection of Cervical Cancer. https://home.liebertpub.com/vim [Internet]. 2016 Mar 7 [cited 2023 Mar 24];29(2):83–94. Available from: https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/vim.2015.0087

81. Ferrera A, Valladares W, Cabrera Y, de la Luz Hernandez M, Darragh T, Baena A, et al. Performance of an HPV 16/18 E6 oncoprotein test for detection of cervical precancer and cancer. Int J Cancer [Internet]. 2019 Oct 15 [cited 2024 Oct 5];145(8):2042–50. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30684396/

82. Wiesner C, Rincón L, Gamboa Ó, Piñeros M, González M, Ortiz N, et al. Barreras para la implementación de la prueba ADN-VPH como técnica de tamización primaria para cáncer de cuello uterino en un área demostrativa en Colombia. Revista Colombiana de Cancerología. 2013 Sep 1;17(3):93–102.

83. E6 - Protein E6 - Human papillomavirus type 16 | UniProtKB | UniProt [Internet]. [cited 2023 Nov 22]. Available from: https://www.uniprot.org/uniprotkb/P03126/entry#sequences

84. Expasy - ProtParam [Internet]. [cited 2023 Nov 22]. Available from: https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam

85. T-Coffee - Multiple Sequence Alignment Server [Internet]. [cited 2023 Nov 22]. Available from: https://tcoffee.crg.eu/

86. CLUSTAL OMEGA Multiple Sequence Alignment [Internet]. [cited 2023 Nov 22]. Available from: https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/

87. PREDICTED ANTIGENIC PEPTIDES [Internet]. [cited 2023 Nov 22]. Available from: http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl

88. Bertero A, Brown S, Vallier L. Methods of Cloning. Basic Science Methods for Clinical Researchers. 2017 Jan 1;19–39.

89. Thuring RWJ, Sanders JPM, Borst P. A freeze-squeeze method for recovering long DNA from agarose gels. Anal Biochem. 1975 May 26;66(1):213–20.

90. Instruction Manual pMAL Protein Fusion & Purification System PROTEIN EXPRESSION & ANALYSIS NEB #E8200S Store at-20°C.

91. EcoRI [Internet]. 2012. Available from: www.thermoscientific.com/doubledigest

92. SalI [Internet]. 2012. Available from: www.thermoscientific.com/doubledigest

93. Scientific T. T4 DNA Ligase, 5 Weiss U/µL [Internet]. 2014. Available from: www.thermoscientific.com/onebio

94. Davis MW, Jorgensen EM. ApE, A Plasmid Editor: A Freely Available DNA Manipulation and Visualization Program. Frontiers in Bioinformatics. 2022 Feb 4;2:818619.

95. BL21 Competent E. coli | NEB [Internet]. [cited 2023 Nov 13]. Available from: https://www.neb.com/en/products/c2530-bl21-competent-e-coli#Product%20Information_Related%20Products

96. Guo N, Wei Q, Xu Y. Optimization of cryopreservation of pathogenic microbial strains. J Biosaf Biosecur. 2020 Dec 1;2(2):66–70.

97. Chung CT, Miller RH. [43] Preparation and storage of competent Escherichia coli cells. Methods Enzymol. 1993 Jan 1;218(C):621–7.

98. Froger A, Hall JE. Transformation of plasmid DNA into E. coli using the heat shock method. J Vis Exp [Internet]. 2007 Aug 1 [cited 2024 May 18];6(6):253–253. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/18997900/?tool=EBI

99. Birnboim HC. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. Methods Enzymol [Internet]. 1983 Jan 1 [cited 2025 Mar 16];100(C):243–55. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6353143/

100. Effect of Temperature, Inducer Concentration, and Escherichia coli Cytosolic Redox State on MBP-PI2 Expression | jemi.microbiology.ubc.ca [Internet]. [cited 2025 Jan 29]. Available from: https://jemi.microbiology.ubc.ca/node/109

101. Geohanna A, Jurado S. APROXIMACIÓN AL ESTUDIO DE LAS SIRTUINAS DE G. duodenalis: Evaluación y caracterización de un nuevo candidato.

102. MM B. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem [Internet]. 1976 May 7 [cited 2023 Nov 27];72(1–2):248–54. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/942051/

103. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 1979 [cited 2023 Nov 27];76(9):4350. Available from: /pmc/articles/PMC411572/?report=abstract

104. Mahmood T, Yang PC. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. N Am J Med Sci [Internet]. 2012 Sep [cited 2023 Nov 27];4(9):429. Available from: /pmc/articles/PMC3456489/

105. Jeong C, Kim HJ. MBP fusion proteins: enhanced expression and solubility, unexpected cleavage dilemma. BioDesign [Internet]. 2024 Sep 30 [cited 2024 Nov 4];12(3):39–43. Available from: https://www.bdjn.org/journal/view.html?doi=10.34184/kssb.2024.12.3.39

106. Lebendiker M, Danieli T. Purification of Proteins Fused to Maltose-Binding Protein. Methods in Molecular Biology [Internet]. 2011 [cited 2025 Jan 30];681:281–93. Available from: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-60761-913-0_15

107. Alexandrov A, Dutta K, Pascal SM. MBP fusion protein with a viral protease cleavage site: One-step cleavage/purification of insoluble proteins. Vol. 30, BioTechniques. Eaton Publishing Company; 2001. p. 1194–8.

108. Tong C, Geng F, He Z, Cai Z, Ma M. A simple method for isolating chicken egg yolk immunoglobulin using effective delipidation solution and ammonium sulfate. Poult Sci. 2015 Jan 1;94(1):104–10.

109. Benet C, Van Cutsem P. Negative purification method for the selection of specific antibodies from polyclonal antisera. Biotechniques. 2002 Nov 1;33(5):1050–4.

110. Hornbeck P. Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. Curr Protoc Immunol. 1992 Mar;1(1).

111. Relevance of infection with human papillomavirus: The role of the p53 tumor suppressor protein and E6/E7 zinc finger proteins (Review) [Internet]. [cited 2024 Nov 4]. Available from: https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2013.2105?text=fulltext

112. De Freitas AC, Coimbra EC, Leitão M da CG. Molecular targets of HEPV oncoproteins: Potential biomarkers for cervical carcinogenesis. Vol. 1845, Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer. 2014. p. 91–103.

113. Downham L, Jaafar I, Rol ML, Nyawira Nyaga V, Valls J, Baena A, et al. Accuracy of HPV E6/E7 oncoprotein tests to detect high-grade cervical lesions: a systematic literature review and meta-analysis. Br J Cancer [Internet]. 2023 Mar 9 [cited 2025 Feb 8];130(4):517. Available from: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10876647/

114. Trujillo E, Morales N, Buitrago O, Posso H, Bravo MM. Distribución de los genotipos del virus del papiloma humano en mujeres de Bogotá con anomalías en la citología cervicouterina. Revista Colombiana de Cancerología [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2023 Mar 9];20(1):3–9. Available from: https://www.elsevier.es/es-revista-revista-colombiana-cancerologia-361-articulo-distribucion-genotipos-del-virus-del-S0123901515000955

115. Garzón-Olivares CD, Grillo-Ardila CF, Amaya-Guio J, Vallejo-Ortega MT, Diaz-Cruz LA, Fernández-Motta C, et al. Tamización primaria con prueba ADN-VPH en mujeres menores de 30 años: evaluación de tecnología sanitaria. Rev Colomb Obstet Ginecol [Internet]. 2022 Jun 30 [cited 2024 Oct 5];73(2):203–22. Available from: https://revista.fecolsog.org/index.php/rcog/article/view/3866

116. Van Regenmortel MHV. Antigenicity and Immunogenicity of Synthetic Peptides. Biologicals. 2001 Sep 1;29(3–4):209–13.

117. Expasy - ProtParam [Internet]. [cited 2025 Mar 30]. Available from: https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam

118. Haq WY, Kang SK, Lee SB, Kang HC, Choi YJ, Lee CN, et al. High-level soluble expression of bioactive porcine myostatin propeptide in E. coli. Appl Microbiol Biotechnol [Internet]. 2013 Oct 1 [cited 2024 Apr 19];97(19):8517–27. Available from: https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-013-5134-0

119. SnapGene | Software for everyday molecular biology [Internet]. [cited 2025 Apr 20]. Available from: https://www.snapgene.com/

120. Durfee T, Nelson R, Baldwin S, Plunkett G, Burland V, Mau B, et al. The Complete Genome Sequence of Escherichia coli DH10B: Insights into the Biology of a Laboratory Workhorse. J Bacteriol [Internet]. 2008 Apr [cited 2025 Apr 7];190(7):2597. Available from: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2293198/

121. Bergkessel M, Guthrie C. Colony PCR. Methods Enzymol [Internet]. 2013 [cited 2025 Apr 7];529:299–309. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24011056/

122. Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en Escherichia.

123. Jia B, Jeon CO. High-throughput recombinant protein expression in Escherichia coli: current status and future perspectives. Open Biol [Internet]. 2016 Aug 1 [cited 2025 Apr 14];6(8):160196. Available from: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5008019/

124. Zamora Chimal CG. Análisis espectral del ruido bioquímico en un oscilador genético sintético. Exploraciones, intercambios y relaciones entre el diseño y la tecnología [Internet]. 2015 [cited 2025 Apr 14];57–79. Available from: https://repositorio.cinvestav.mx/handle/cinvestav/2127

125. Jin T, Chuenchor W, Jiang J, Cheng J, Li Y, Fang K, et al. Design of an expression system to enhance MBP-mediated crystallization. Scientific Reports 2017 7:1 [Internet]. 2017 Jan 23 [cited 2025 Apr 14];7(1):1–11. Available from: https://www.nature.com/articles/srep40991

126. Bhatwa A, Wang W, Hassan YI, Abraham N, Li XZ, Zhou T. Challenges Associated With the Formation of Recombinant Protein Inclusion Bodies in Escherichia coli and Strategies to Address Them for Industrial Applications. Front Bioeng Biotechnol [Internet]. 2021 Feb 10 [cited 2025 Apr 20];9:630551. Available from: www.frontiersin.org

127. Sonezaki S, Kondo A, Oba T, Ishii Y, Kato Y, Nakayama H. Overproduction and purification of Lon protease from Escherichia coli using a maltose-binding protein fusion system. Appl Microbiol Biotechnol [Internet]. 1994 Nov [cited 2025 Apr 14];42(2–3):313–8. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7765772/

128. Tran PL, Yoo M, Kim SG, Park JT. MalS, a periplasmic α-amylase in Escherichia coli, has a binding affinity to glycogen with unique substrate specificities. Appl Microbiol Biotechnol [Internet]. 2025 Dec 1 [cited 2025 Apr 14];109(1):46. Available from: https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-025-13421-5

129. Bertz M, Rief M. Ligand binding mechanics of maltose binding protein. J Mol Biol [Internet]. 2009 Nov 13 [cited 2025 Apr 14];393(5):1097–105. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19733183/

130. Pattenden LK, Thomas WG. Amylose Affinity Chromatography of Maltose-Binding Protein. Affinity Chromatography. 2008;169–90.

131. Sivashanmugam A, Murray V, Cui C, Zhang Y, Wang J, Li Q. Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using Escherichia coli. Protein Sci [Internet]. 2009 May [cited 2025 Apr 14];18(5):936. Available from: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2771296/

132. Salema V, Fernández LÁ. High yield purification of nanobodies from the periplasm of E. coli as fusions with the maltose binding protein. Protein Expr Purif [Internet]. 2013 [cited 2025 Jan 30];91(1):42–8. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23856605/

133. Pereira EPV, van Tilburg MF, Florean EOPT, Guedes MIF. Egg yolk antibodies (IgY) and their applications in human and veterinary health: A review. Int Immunopharmacol. 2019 Aug 1;73:293–303.

134. Michael A, Meenatchisundaram S, Parameswari G, Subbraj T, Selvakumaran R, Ramalingam S. Chicken egg yolk antibodies (IgY) as an alternative to mammalian antibodies. Indian J Sci Technol. 2010;3(4):468–74.

135. Valor L, De la Torre I. Comprender el concepto de inmunogenicidad. Reumatol Clin [Internet]. 2013 Jan 1 [cited 2025 Apr 15];9(1):1–4. Available from: https://www.reumatologiaclinica.org/es-comprender-el-concepto-inmunogenicidad-articulo-S1699258X12002537

136. Satterlee DG, Cadd GG, Fioretti WC. Active immunization of broiler breeder hens with a recombinant chicken inhibin fusion protein enhances egg lay. Poult Sci. 2002 Apr 1;81(4):519–28.

137. Zhang L, Ye F, He Y, Kong D, Han C, Zhao Z, et al. Establishment of a Mouse IgA Nephropathy Model With the MBP-20-Peptide Fusion Protein. The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology [Internet]. 2010 Oct 1 [cited 2025 Apr 15];293(10):1729–37. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ar.21225

138. Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, et al. SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. Nucleic Acids Res. 2018 Jul 2;46(W1):W296–303.

139. Pacheco BLB, Nogueira CP, Venancio EJ. IgY Antibodies from Birds: A Review on Affinity and Avidity. Animals 2023, Vol 13, Page 3130 [Internet]. 2023 Oct 7 [cited 2025 Apr 15];13(19):3130. Available from: https://www.mdpi.com/2076-2615/13/19/3130/htm

140. Pauly D, Chacana PA, Calzado EG, Brembs B, Schade R. Igy technology: Extraction of chicken antibodies from egg yolk by polyethylene glycol (PEG) precipitation. Journal of Visualized Experiments. 2011;(51).

141. Eliana S, Silva V. EXPLORATION OF A NAD+ TRANSPORTER AND/OR ITS PRECURSORS IN LEISHMANIA.

142. Estefanía L, Orjuela R. Aplicación del sistema phage display para la producción de anticuerpos monoclonales: Una aproximación al desarrollo de herramientas para la detección de proteínas. 2023.

143. Benet C, Van Cutsem P. Negative purification method for the selection of specific antibodies from polyclonal antisera. Biotechniques [Internet]. 2002 Nov 1 [cited 2025 Apr 16];33(5):1050–4. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12449383/

144. Gómez Osorio V, González Rodríguez S, Contreras Rodríguez LE, Díaz GJ, Ramírez Hernández MH, Gómez Osorio V, et al. Obtención de la proteína verde fluorescente recombinante y su anticuerpo policlonal Igy. Rev Colomb Biotecnol [Internet]. 2023 Jun 1 [cited 2025 Apr 20];25(1):57–68. Available from:

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752023000100057&lng=en&nrm=iso&tlng=es

145. Esteban J, León G. Desarrollo de herramientas moleculares para la implementación del sistema CRISPR-Cas9 en Leishmania braziliensis. 2024.

146. Eliana S, Silva V. EXPLORATION OF A NAD+ TRANSPORTER AND/OR ITS PRECURSORS IN LEISHMANIA.

147. Lee BS, Huang JS, Jayathilaka LP, Lee J, Gupta S. Antibody Production with Synthetic Peptides. Methods Mol Biol [Internet]. 2016 [cited 2025 Apr 17];1474:25–47. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27515072/

148. Carlander David. Avian IgY antibody : in vitro and in vivo. 2002. 53 p.

149. Zeng X, Wang H, Huang C, Logue CM, Barbieri NL, Nolan LK, et al. Evaluation of the Immunogenic Response of a Novel Enterobactin Conjugate Vaccine in Chickens for the Production of Enterobactin-Specific Egg Yolk Antibodies. Front Immunol [Internet]. 2021 Apr 2 [cited 2025 Apr 16];12:629480. Available from: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8050339/