

Expresión del gen L1 del Virus del Papiloma Humano tipo 18, aislado de una biopsia de una paciente cubana, en cepas de *Escherichia coli*

Expression of Human Papillomavirus Type 18 L1 gene from a Cuban patient biopsy by Escherichia coli strains

Elsa Pimienta-Rodríguez^{a,*}, Giovet Aldama-Paz^a, Yunier Serrano-Rivero^a, Sandra Rodríguez-Salgueiro^a, Adriana Otero-Blanca^a, Rafael Fando-Calzada^a, Karen Marrero-Domínguez^a

^a Centro Nacional de Investigaciones Científicas

*elsa.pimienta@cnic.edu.cu

Recibido: 4-01-2018; Aceptado: 14-08-2018

RESUMEN

El virus del papiloma humano (VPH) se encuentra asociado al 99,7 % de los casos diagnosticados con cáncer de cuello uterino (CCU) en el mundo. Se estima que el 70 % de los casos de CCU son producidos por los tipos 16 y 18 del VPH. Particularmente, el genotipo 18 (VPH-18) es el segundo de mayor prevalencia internacional y ha sido incluido en las vacunas preventivas comerciales contra el VPH; las cuales se fundamentan en la antigenicidad de la proteína L1, mayoritaria de la cápside viral. Estas vacunas son altamente costosas y no están disponibles para las poblaciones en riesgo de países en vías de desarrollo; como en Cuba, donde se ha detectado amplia distribución de genotipos oncogénicos del VPH. En la actualidad se están desarrollando candidatos vacunales contra el VPH a partir de hospederos alternativos como *Escherichia coli*. En este trabajo, el gen L1 del VPH-18, de tamaño completo y aislado de una muestra de una paciente cubana, se subclonó en un vector de expresión que contiene el promotor *T7lac*. Posteriormente se evaluó la producción de la proteína L1 en tres cepas de *E. coli* con marcadas diferencias genéticas (BL21(DE3), Origami(DE3) y Rosetta (DE3)pLysS. En los extractos celulares de las cepas evaluadas se detectó una banda con una talla cercana al peso molecular teórico de la proteína L1, reconocida por el anticuerpo monoclonal CamVir-1 anti-VPH-16 L1, lo cual corroboró su identidad como la proteína L1 del VPH-18. *E. coli* BL21(DE3) produjo al menos dos veces mayor cantidad de la proteína L1 que *E. coli* Origami(DE3), mientras que *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS produjo los menores niveles. En las tres cepas evaluadas, la proteína L1 se detectó solamente en la fracción insoluble del citoplasma. De acuerdo a nuestro conocimiento, este es el primer informe de la expresión de un gen L1 del VPH-18, fusionado a una secuencia codificadora de una etiqueta de seis histidinas, en las tres cepas de *E. coli* evaluadas.

Palabras clave: papilomavirus humano, proteína mayoritaria de la cápsida L1, candidato vacunal, *Escherichia coli*

ABSTRACT

Human papillomavirus (HPV) has been implicated in 99.7% of cervical squamous cell cancer cases (CCU) worldwide. HPV16 and HPV18 are known to cause around 70% of CCU. In particular, the genotype 18 (HPV-18) is the second most prevalent

worldwide and it has been included in the commercial preventive vaccines against HPV; which are based on the antigenicity of the major capsid protein L1. These vaccines are highly expensive and are not available to at-risk populations in developing countries, like in Cuba, where a wide distribution of oncogenic HPV genotypes has been detected. At present, vaccine candidates against HPV are being developed from alternative hosts such as *Escherichia coli*. In this work, the full-length HPV-18 L1 gene, isolated from a Cuban patient sample, was subcloned into an expression vector containing the *T7lac* promoter. Subsequently, the production of L1 protein was evaluated in three strains of *E. coli* with marked genetic differences (BL21 (DE3), Origami (DE3) and Rosetta (DE3) pLysS). In cell extracts of the evaluated strains, a band with a size close to the theoretical molecular weight of L1 protein was detected, which was recognized by the monoclonal antibody CamVir-1 anti-HPV-16 L1 and corroborated its identity as HPV-18 L1 protein. *E. coli* BL21 (DE3) produced at least two times higher amounts of L1 protein than *E. coli* Origami (DE3), while *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS produced the lowest levels. For all the evaluated strains, the L1 protein was only detected in the insoluble fraction of the cytoplasm. According to our knowledge, this is the first report about the expression of a HPV-18 L1 gene, fused to a sequence encoding a six histidine tag, in the three evaluated *E. coli* strains.

Keywords: human papillomavirus, L1 major capsid protein, vaccine candidate, *Escherichia coli*

INTRODUCCIÓN

El cáncer de cuello uterino (CCU) es la tercera neoplasia maligna más frecuente en la población femenina a nivel mundial (Maleki, 2016; Lowy, 2016). Su incidencia es de aproximadamente 530 000 nuevos casos por año, de los cuales el 80% tiene lugar en países en vías de desarrollo (Bruni *et al.* 2017a). Aproximadamente el 99,7 % de los casos de CCU están asociados a la infección por el virus del papiloma humano (VPH). Además, la infección por el VPH es considerada la enfermedad de transmisión sexual más común en el mundo. Existen más de 200 tipos de VPH, de los cuales solo un pequeño grupo, considerado como de alto riesgo oncogénico, está asociado a otros tipos de cáncer (Maleki, 2016; Lowy, 2016). Estos genotipos son detectados en el 90 % de los casos de cáncer anal, 40 % de los de órganos genitales externos (vulva, vagina y pene) y al menos en el 20 % de los orofaríngeos (Herrero *et al.* 2015). Particularmente, los genotipos 16 y 18 son identificados como los de mayor prevalencia y responsables del 70% de los casos de CCU a nivel mundial (de Sanjose *et al.* 2010). Debido a la elevada carga de las enfermedades relacionadas con el VPH, la Organización Mundial de la Salud (OMS) las reconoce como problemas de la salud pública mundial y ha reiterado la recomendación de que la vacunación contra el VPH se incluya en los programas nacionales de inmunización (OMS, 2017).

Los VPH constituyen un grupo diverso de virus pertenecientes a la familia *Papillomaviridae*. Son pequeños, no envueltos, con un genoma de ADN bicatenario, de estructura icosaédrica compuesta por 72 capsómeros pentaméricos y agrupados en una organización triangular T=7. Los capsómeros están constituidos por dos proteínas estructurales: L2 y L1, esta última como componente mayoritario. Precisamente, las vacunas profilácticas contra el VPH se basan en la antigenicidad de la proteína L1 (Burk *et al.* 2009). Cuando esta proteína es producida en sistemas

in vitro, tiene la capacidad de auto-ensamblarse, adquiriendo una conformación estructural y antigénica similar al virus nativo, pero no infestan al epitelio estratificado de la piel y mucosas en humanos. Tales estructuras se conocen con el nombre de partículas semejantes a virus (VLPs, del inglés *virus-like particles*) y han demostrado ser inmunogénicas, bien toleradas y protectoras durante los años de implementación (Lowy, 2016; Schwarz *et al.* 2017; Huh *et al.* 2017).

En la actualidad existen tres vacunas comerciales para prevenir la infección del VPH: Gardasil®, Gardasil®9 y Cervarix®, las cuales se obtienen en sistemas eucariontes y ofrecen cerca de un 100% de protección contra las infecciones reincidentes causadas por distintos tipos de VPH. Sin embargo, sus altos costos afectan su disponibilidad para las poblaciones de riesgo de países en vías de desarrollo (de Martel *et al.* 2017). Debido a esta situación, se han desarrollado nuevos candidatos vacunales, entre los que se encuentran los basados en las VLPs o los capsómeros, ensamblados a partir de la proteína L1 obtenida en sistemas bacterianos (Kumar *et al.* 2015; Gupta *et al.* 2017).

Escherichia coli es el sistema bacteriano más utilizado para la caracterización estructural de la proteína L1 del VPH. En la mayor parte de los estudios, las proteínas L1 de los genotipos 16 y 11 han sido obtenidas fusionadas a la glutatión-S-transferasa (GST), debido a que este tipo de fusión promueve el plegamiento y mayor solubilidad de las proteínas recombinantes en *E. coli* (Chen *et al.* 2001; Hanslip *et al.* 2006; Bang *et al.* 2016; Bishop *et al.* 2007). Particularmente, la expresión del gen L1 del tipo 18 del VPH (VPH-18) solo ha sido abordada en dos trabajos y en cepas de *E. coli* con genotipo deficiente de proteasas. Seo *et al.* (2009) la obtuvieron fusionada a GST en *E. coli* BL21(DE3), mientras que Gu y cols. (2017) la produjeron con una delección de cuatro residuos de aminoácidos por el extremo amino en *E. coli* ER2556. Este último estudio forma parte del proyecto de la compañía Xiamen Innovax Biotech (Xiamen, China) encaminado al desarrollo de una vacuna bivalente contra los genotipos 16 y 18 (Gu *et al.* 2017). Este candidato vacunal actualmente se encuentra cursando un ensayo clínico fase 3 de eficacia y es el candidato más avanzado hasta el momento (ClinicalTrials.gov NCT01735006).

Una de las ventajas de utilizar a *E. coli* como sistema hospedero es la gran variedad de cepas disponibles, mejoradas genéticamente, con el propósito de alcanzar altos rendimientos y elevada calidad de las proteínas recombinantes. Entre ellas destaca *E. coli* Origami (Novagen, EE.UU.), cuyo citoplasma fue ingenierizado a través de una doble mutación en los genes del sistema tiorredoxina - glutarredoxina para promover la formación de puentes disulfuro en el citoplasma (Berkmen, 2012; Rosano y Ceccarelli, 2014). *E. coli* Rosetta, con su uso de codones modificado para suministrar seis ARNt para codones raros, también ha sido útil para la expresión de genes con una representación significativa de codones empleados con baja frecuencia en *E. coli* (Guevara-Hernández *et al.* 2013).

En Cuba, el CCU representa la cuarta causa de muerte por tumores malignos en las mujeres y es el de mayor incidencia de muerte por cáncer en mujeres en edades comprendidas entre los 15 y 44 años de edad (Bruni *et al.* 2017b). En estudios epidemiológicos moleculares se ha identificado la circulación de genotipos oncogénicos de VPH en muestras poblacionales en La Habana, Cuba (Soto *et al.* 2007; Ríos *et al.* 2010). En los trabajos más recientes han estudiado 519 mujeres

entre 15 y 59 años con citología negativa previa (Soto *et al.* 2016a), 322 mujeres mayores de 30 años con citología positiva (Soto *et al.* 2014), 56 hombres seropositivos a VIH (Limia *et al.* 2017) y 63 pacientes con tumores colorrectales (Soto *et al.* 2016b). Dichos estudios han encontrado una frecuencia elevada de infección por el VPH, por encima de 50%, en las muestras anogenitales, donde los genotipos oncogénicos 16, 18, 31, 45, 52 y 58 fueron los más frecuentes. Además, la carga viral de HPV 16, 18 y 58 se asoció con el incremento de la severidad de las lesiones cervicales (Soto *et al.*, 2017). En concordancia con los resultados obtenidos, los estudios sustentan la introducción de la vacunación preventiva contra el VPH en la población adolescente cubana, lo cual no ha sido posible debido al elevado precio de las vacunas. Por esta razón se hace necesario la identificación de alternativas que faciliten a largo plazo la disponibilidad de vacunas contra el VPH en Cuba.

Teniendo en consideración que en Cuba el VPH-18 se encuentra entre los tres genotipos de mayor prevalencia y que no existen informes previos de la producción de la proteína L1 del genotipo 18 del VPH en cepas de *E. coli* genéticamente mejoradas, en este trabajo nos propusimos como objetivo: Evaluar la expresión del gen L1 del VPH-18, clonado a partir de ADN total de una muestra clínica cubana, en las cepas de *E. coli* BL21(DE3), Origami(DE3) y Rosetta(DE3)pLysS.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Las diferentes cepas de *E. coli* y plasmidios utilizados en este trabajo se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepas de *E. coli* y plasmidios utilizados.

Cepas	Genotipos o características	Referencia
Match-1	<i>F-φ80(lacZ)ΔM15 ΔlacX74 hsdR(rK-mK+) ΔrecA1398 endA1 tonA</i>	Invitrogen (EE.UU.)
BL21(DE3)	<i>F- ompT gal dcm lon hsdSB(r_B m_B) λ(DE3)</i>	Novagen (EE.UU.)
Origami(DE3)	<i>Δ(ara-leu)7697 ΔlacX74 ΔphoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL F'[lac+ lacI q pro] (DE3) gor522::Tn10 trxB (KanR, StrR, TetR)</i>	Novagen (EE.UU.)
Rosetta(DE3)pLysS	<i>F- ompT gal dcm lon hsdSB(r_B- m_B-) λ (DE3)pLysSRARE (Cam^R)</i>	Novagen (EE.UU.)
Plasmidios		
pGEM-T Easy-HPV-18L1	Derivado del <i>pGEM-T Easy Vector</i> que tiene clonado, en el sitio EcoRV, un gen L1 del VPH-18 procedente de una muestra cervical de una paciente cubana. Amp ^R .	Lab. de Biología Molecular, CNIC (resultados enviados a publicar)
pET-28a	Vector de expresión (5369 pb), Kn ^R . Contiene el promotor <i>T7lac</i> y una copia del gen represor <i>lacI</i> .	Novagen (EE.UU.)

Nota: Cam^R, Amp^R y Kn^R: confiere resistencia a cloranfenicol, ampicilina y kanamicina, respectivamente.

Medios de cultivo

Para el crecimiento de las cepas de *E. coli* se utilizaron los medio complejos *Luria-Bertani* (LB, Sambrook *et al.* 1989) y *Terrific Broth* (TB; Studier, 2005). Cuando fue necesario, los medios de cultivo se suplementaron con kanamicina a 100 µg/mL.

Enzimas, anticuerpos y reactivos

Todas las enzimas de modificación-restricción se adquirieron de Promega (EE.UU.). Se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-Histidina (anti-His), producido en ratón y conjugado a la peroxidasa de rábano (A7058, Sigma, EE.UU., diluido 1: 2 000), el anticuerpo monoclonal anti-VPH-16 L1 de ratón (clon CamVir-1, Merck, EE. UU., diluido 1:15 000) y como secundario el anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón conjugado con la enzima peroxidasa de rábano (CB10S0, CIGB Sancti Spiritus, Cuba, diluido 1:1000).

MÉTODOS

Métodos de Biología Molecular

La preparación y transformación de las células competentes de *E. coli*, el pesquiasaje de los transformantes y las reacciones de digestión y modificación de ADN se realizaron según procedimientos descritos por Sambrook *et al.* (1989).

Análisis de secuencia del gen L1 del VPH-18

Los análisis del uso de codones en la secuencia nucleotídica del gen L1 del VPH-18 se realizaron con las herramientas bioinformáticas *ATGme* (<http://atgme.org/>; Daniel *et al.* 2015) y *E. coli* Codon Usage Analyzer 2.1 (<http://www.faculty.ucr.edu/~mmaduro/codonusage/usage.htm>; (Henaut y Danchin, 1996). La secuencia aminoacídica deducida a partir de la secuencia nucleotídica se analizó mediante el paquete bioinformático *Vector NTI suite 6000* (InforMax, Inc. EE.UU).

Para estimar la velocidad de inicio de la traducción de la construcción genética se utilizó el algoritmo de ingeniería reversa del calculador bioinformático *RBS Calculator* (<https://salislab.net/software/>; Salis *et al.* 2009).

Subclonaje del gen L1 del VPH-18 en el vector de expresión pET-28a

El gen L1, de 1521 pb, se extrajo del pGEM-T Easy-HPV-18L1 (Tabla 1) por digestión con las enzimas NdeI y BglII y se ligó al vector pET-28a, previamente digerido con las mismas enzimas. Posteriormente la mezcla de ligazón se transformó en células competentes de *E. coli* Match-1. El ADN plasmídico de los transformantes se purificó mediante el estuche *Wizard® Plus SV Minipreps DNA purification system* (Promega, EE.UU.). Tres de los clones recombinantes seleccionados se transformaron inicialmente en células competentes de *E. coli* BL21(DE3). Posteriormente, el derivado del pET28a se introdujo en *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS y *E. coli* Origami DE3 (Tabla 1). Cuatro de los transformantes derivados de cada cepa se conservaron en LB-glicerol a -70°C hasta el análisis de la expresión génica.

Cultivo de E. coli para la inducción de la expresión del gen L1

Los transformantes se inocularon en preinóculos de 5 mL de medio TB y se mantuvieron durante la noche a 30 °C y 220 rev min⁻¹ en una zaranda orbital termostataada (New Brunswick Scientific Co. Inc. EE. UU.). Para los estudios de expresión, 100 µL de cada precultivo se inocularon en 5 mL de medio TB y se incubaron a 30 °C y 220 rev min⁻¹ hasta alcanzar 0,6 - 0,8 unidades de DO₆₀₀, momento en el cual se adicionó IPTG a una concentración de 0,1 mmol/L por 4 h. Culminado el tiempo de inducción, se centrifugó 1 mL de las células y el precipitado celular se conservó a -20 °C hasta su análisis. Para homogenizar los

extractos celulares se adicionó un volumen de tampón PBS (Sambrook *et al.* 1989) a la biomasa para alcanzar una DO₆₀₀ final de 6,5.

Procedimientos utilizados en el trabajo con proteínas

Las electroforesis desnaturalizantes en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) se realizaron según Laemmli (1970), utilizando geles al 10 % de acrilamida. En los ensayos de inmunodetección, las muestras separadas electroforéticamente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Protran Whatman GmbH, Alemania) empleando un sistema de transferencia húmedo (Bio-Rad, EE.UU.). Posteriormente, las membranas se incubaron en solución de bloqueo (leche descremada al 5 % (m/v) en solución de PBS) durante 30 min y se incubaron con los anticuerpos durante 2 h a temperatura ambiente (TA). Finalmente, las membranas lavadas, se revelaron con 3,3'-diaminobencidina al 0,0125 % (m/v) y H₂O₂ al 0,1 % (v/v) en solución amortiguadora Tris-HCl pH 7,6.

Las imágenes de cada gel o membrana se capturaron mediante un sistema de escáner *Canon Image Runner 1023N* (Japón). El análisis de densitometría de imágenes para la estimación del peso molecular o de las cantidades producidas de la banda correspondiente a la proteína de interés se realizó mediante el programa *Gel Analyzer 2010* (Lazar *et al.* 2010).

Procedimiento para evaluar la solubilidad de la proteína recombinante

Los precipitados celulares correspondientes a 1 mL de cultivo se resuspendieron en 57 µL de una solución tamponada compuesta por sacarosa 10 % (m/v) y Tris-HCl 50 mmol/L pH 8. Posteriormente se adicionó 19 µL de lisozima y se incubó por 15 min a TA. A continuación se añadió 76 µL de Tritón X-100 0,2 % (v/v), EDTA 50 mmol/L y Tris-HCl 50 mmol/L pH 8, se homogenizó y se incubó por 5 min a TA. La mezcla se sometió a 3 ciclos de congelación-descongelación, seguido de centrifugación a 13 000 r/min durante 5 min. El sedimento obtenido se lavó con una solución de EDTA 25 mmol/L y Tris HCl 20 mmol/L pH 8 y se centrifugó a 13 000 r/min durante 5 min y la fracción insoluble se resuspendió en 167 µL de la misma solución.

Detección de cuerpos de inclusión en E. coli recombinante por microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Las células de *E. coli* se fijaron en glutaraldehído 2 % en tampón fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,2 durante una noche; se post-fijaron en tetróxido de osmio 1 % por dos horas; se deshidrataron en disoluciones seriadas de acetona y se incluyeron en resina Spurr. Se obtuvieron cortes ultrafinos, los cuales se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo y luego se observaron con un microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM 1011 (JEOL, Japón) a 20 000 X.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Subclonaje del gen L1 del VPH-18 en el plasmidio pET28a

Para evaluar la expresión del gen L1 del VPH-18, aislado de una muestra clínica de una paciente diagnosticada con CCU por infección por este genotipo, en *E. coli* se seleccionó al promotor *T7lac*. Este promotor híbrido ha sido utilizado

satisfactoriamente para dirigir la expresión de los genes L1 del VPH-16 (Zhang *et al.* 1998; Wei *et al.* 2009) y del VPH-11 en *E. coli* (Yan *et al.* 2009). La estimación teórica de la velocidad de inicio de la traducción del gen L1 insertado en el pET28a, que permite la fusión del extremo 5' del gen L1 a una región de 20 codones codificantes para un fragmento de la proteína principal de la cápsida del fago T7 e incluye una secuencia codificadora de una etiqueta de seis histidinas, mediante la herramienta *RBS Calculator* fue 28 855,1 ua; valor que se considera adecuado para obtener elevados niveles de síntesis proteica (Speer, 2018). Teniendo en cuenta este resultado teórico y con la finalidad de promover que las maquinarias de transcripción y traducción se encontrasen con secuencias 5' y amino compatibles con una síntesis eficiente del ARNm y de la proteína recombinante, respectivamente, se obtuvo una construcción plasmídica con el gen L1 insertado en el vector pET-28a, la cual se denominó pET28a-HPV-18 L1-tag (Fig. 1A). El plasmidio obtenido codifica para una proteína L1 fusionada por su extremo amino a una etiqueta de seis histidinas (VPH-18 L1-tag).

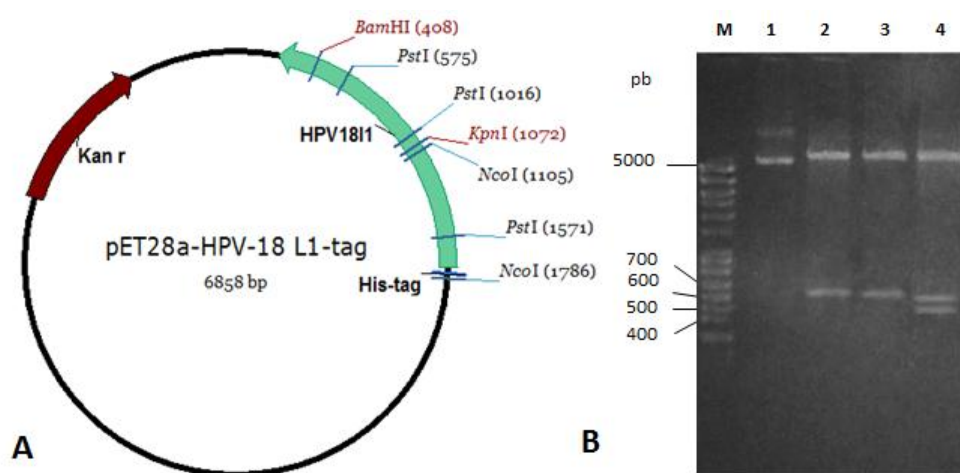


Fig. 1. Mapa físico del plasmidio pET28a-HPV-18L1-tag (A) y electroforesis en gel de agarosa (1 %) del plasmidio nativo y analizado por restricción (B). En (B) se aplicaron las muestras siguientes: M: Patrón de peso molecular *Standard 100 pb DNA Ladder* (Serva, Alemania); 1: pET28a-HPV-18L1-tag nativo; 2, 3 y 4: pET28a-HPV -18L1-tag digerido con las enzimas NcoI, BamHI-KpnI y PstI, respectivamente. Abreviaturas; Kan^r: gen de resistencia a kanamicina, HPV18L1: gen L1 del VPH-18 procedente de un aislado clínico cubano, His-tag: región codificante para una cola de 6 histidinas.

En la Figura 1B se muestran los resultados representativos de la digestión de un clon del plasmidio pET28a-HPV-18L1-tag con las enzimas BamH I, Nco I, Pst I y Kpn I. La digestión con la enzima Nco I dio lugar a dos bandas, las cuales se corresponden con los fragmentos de 6177 y 681 pb, que identifican a un sitio Nco I interno al gen L1 y otro externo (Fig. 1B, carril 2). Al digerir el plasmidio de interés con las enzimas BamH I y Kpn I, se obtuvieron dos bandas, que se corresponden con los fragmentos esperados de 6194 y 664 pb (Fig. 1B, carril 3). En la digestión con la enzima Pst I se obtuvieron tres bandas, que se corresponden con los fragmentos de 5862, 555 y 441 pb, que identifican a los tres sitios de corte Pst I internos al gen L1 (Fig. 1B, carril 4). De acuerdo al análisis realizado con el *Vector NTI suite 6000* (InforMax, Inc. EE.UU.), la proteína VPH-18 L1-tag tiene una talla molecular teórica de 58,8 kDa y debe poseer un total de 527 aa.

Expresión del gen L1 del VPH-18, fusionado a una secuencia codificadora de una cola de histidinas, en *E. coli* BL21(DE3)

El plasmidio pET28a-HPV-18 L1-tag se introdujo inicialmente en *E. coli* BL21 (DE3). Al realizar la inducción de la proteína recombinante con IPTG, una banda intensa de ~ 57 kDa se detectó en los extractos celulares de los transformantes con el plasmidio pET28a-HPV-18 L1-tag (Fig. 2A, carriles 2 al 4). Paralelamente, se determinó que la talla molecular de las bandas inducidas observadas por SDS-PAGE coincidieron con la banda inmunoreactiva de mayor talla detectada mediante *Western blot* con el anticuerpo CamVir-1, lo cual confirmó la identidad de la proteína L1 del VPH-18 evaluada (Fig. 2B, carriles 2 al 4). La presencia de la secuencia blanco de seis histidinas, fusionada al extremo amino de la proteína L1, también fue detectada mediante inmunoreacción con un anticuerpo anti-His (Fig. 2C, carriles 2 al 4). Como era de esperar, no se detectó ninguna banda inmunoreactiva en el extracto celular de la cepa transformada con el vector en contacto con el inductor (Fig. 2 B y 2C, carril 1).

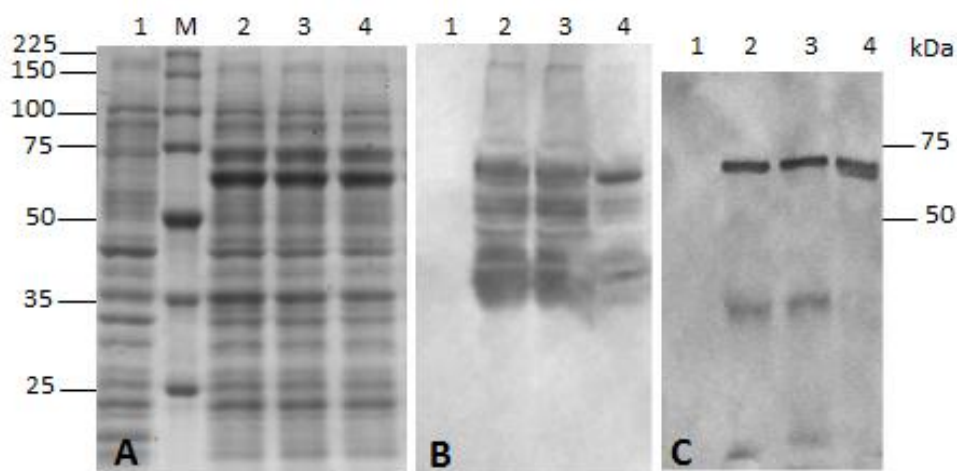


Fig. 2. Análisis de la expresión del gen L1 del VPH-18, fusionado a una secuencia codificadora de seis histidinas, mediante la inducción con $0,1 \text{ mmolL}^{-1}$ de IPTG por 4 horas en *E. coli* BL21(DE3). (A): Análisis por SDS-PAGE al 10%, (B): Inmunodetección con el anticuerpo CamVir-1, (C) Inmunodetección con un anticuerpo monoclonal anti-His. Se aplicaron 15 μl de cada lisado celular. 1: pET28a; 2, 3 y 4: clones 1, 2 y 3 del pET28a-HPV-18L1-tag, respectivamente; M: Patrón de peso molecular *Broad Range Protein Molecular Weight Markers* (Promega, EEUU.).

Durante la producción de las proteínas recombinantes en *E. coli*, uno de los principales retos es obtener la proteína en forma soluble y funcional, por lo que a continuación se evaluó la solubilidad de la proteína L1 del VPH-18, fusionada a la cola de histidinas, cuando fue inducida a bajas concentraciones de IPTG (0,1 mM) en *E. coli* BL21(DE3) [pET28a-HPV-18 L1-tag]. De acuerdo a los resultados obtenidos por *Western blot* con el anticuerpo anti-His, solamente se detectaron bandas inmunorreactivas en la fracción insoluble y mayoritariamente una banda de aproximadamente 57 kDa, valor cercano al peso molecular esperado de la proteína VPH-18 L1-tag (58,8 kDa) (Fig.3, carril 3). Estos resultados sugirieron que probablemente la proteína se encontraba formando agregados insolubles o depositada en cuerpos de inclusión (CI).

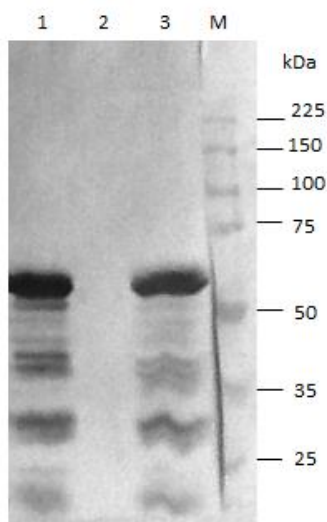


Fig. 3. Análisis mediante *Western blot* de la solubilidad de la proteína L1-tag obtenida en *E. coli* BL21(DE3) [pET28a-HPV-18 L1-tag]. Se aplicaron 15 μ l de cada muestra. Carriles: 1. Fracción Total; 2. Fracción Soluble; 3. Fracción Insoluble; M. Patrón de peso molecular *Broad Range Protein Molecular Weight Markers* (Promega, EEUU.) revelado con Rojo Ponceau. Para la inmunodetección de la proteína de interés se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-His (Sigma).

El análisis de las células de *E. coli* BL21(DE3) [pET28a-HPV-18 L1-tag] mediante TEM reveló la presencia de CI (Fig.4), lo cual sugiere que la proteína L1 del VPH 18 se deposita en estas estructuras intracelulares. La agregación de la proteína L1 del VPH en los CI de bacterias se ha estudiado fundamentalmente para la proteína L1 del genotipo 16 (Zhang *et al.* 1998; Kelsall y Kulski, 1995; Nardelli-Haeffliger *et al.* 1997; Ma *et al.* 2007) y se ha evaluado su posterior extracción, renaturalización y purificación mediante cromatografías de intercambio iónico (Zhang *et al.* 1998; Kelsall y Kulski, 1995) o IMAC (del inglés, *Immobilized Metal Affinity Chromatography*) a partir de *E. coli* (Choe *et al.* 2003; Di Bonito *et al.* 2006; Lai y Middelberg, 2002). En los trabajos informados por Zhang *et al.* (1998) y Lai y Middelberg (2002), que purifican la proteína L1 mediante cromatografías de intercambio catiónico e IMAC, respectivamente, la proteína L1 purificada fue capaz de auto-ensamblarse en capsómeros y VLPs. Las VLPs obtenidas fueron reconocidas por el anticuerpo monoclonal H16 V5, que solo reconoce las del genotipo 16 nativas, sugiriendo la presencia de epítomos neutralizantes dominantes.

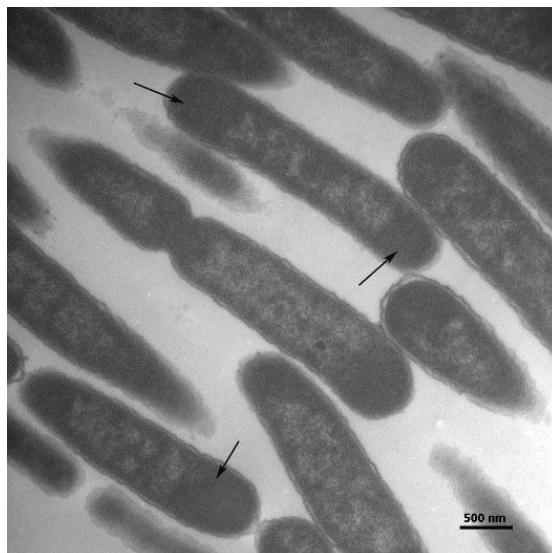


Fig. 4. Cortes ultrafinos de células de *E. coli* BL21(DE3) [pET28a-HPV-18 L1-tag], cultivadas en medio TB e inducidas con 0,1 mmol L⁻¹ de IPTG, observados mediante Microscopía Electrónica de Transmisión. Las flechas indican los cuerpos de inclusión.

Producción de la proteína L1 del VPH-18 por cepas hospederas de E. coli

Teniendo en consideración que el gen L1 del VPH-18, del aislado clínico cubano, contiene 14 codones que codifican para residuos de cisteína, potencialmente capaces de interactuar por medio de enlaces disulfuro (Ishii *et al.* 2003), en este trabajo se seleccionó a *E. coli* Origami como hospedero para evaluar la producción de la proteína L1, dado que esta cepa posee una doble mutación en los genes del sistema tiorredoxina - glutarredoxina para promover la formación de puentes disulfuro en su citoplasma. Particularmente, la cepa FÅ113 (*trx*B, *gor*, *ahp*C*) utilizada ha sido satisfactoriamente empleada para producir varias proteínas con puentes disulfuros en dicho compartimento (Kumano-Kuramochi *et al.* 2007, Drees *et al.* 2008, Xu *et al.* 2008).

La cepa *E. coli* Rosetta también se seleccionó para evaluar la obtención de la proteína L1 del VPH-18, dado que al examinar el uso de codones en la secuencia nucleotídica del gen L1 del VPH-18, mediante el empleo del programa bioinformático *ATGme*, se detectaron un total de 122 codones raros y 13 codones muy raros; lo que representa aproximadamente un 24 % de la secuencia del gen. En particular, se detectaron 15 agrupamientos de codones raros, dos de ellos ubicados hacia el extremo 5' del gen. Estos resultados se sustentaron con otra herramienta bioinformática: *E. coli* Codon Usage Analyzer 2.1. Este último análisis indicó la presencia de 90 codones raros, lo que representa aproximadamente un 18 % de la secuencia total. Además, se identificaron 10 agrupamientos de codones raros. Ambas herramientas permitieron identificar simultáneamente a 49 codones empleados con una frecuencia baja en *E. coli*, que representa un 9,6 % aproximadamente respecto a la secuencia total.

Considerando el análisis anterior, el plasmidio pET28a-HPV-18 L1-tag se introdujo en las dos cepas de *E. coli* seleccionadas y la inducción de la expresión del gen L1 del VPH-18 se llevó a cabo en el mismo medio de cultivo y en las mismas condiciones en que anteriormente se evaluó la producción de la proteína L1 en *E. coli* BL21 (DE3). En dichas condiciones, *E. coli* BL21 produjo al menos dos veces

mayor cantidad de la proteína L1 del VPH-18 que la producida por *E. coli* Origami (DE3) (Fig. 5, carriles 1 vs 7), de acuerdo a análisis densitométrico del *Western blot*. *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS produjo la menor cantidad de proteína L1 recombinante, solamente detectable por *Western blot* (Figura 5, carril 4), a pesar de que esta cepa tiene la ventaja de expresar seis ARNts para los codones: AUA, AGG, AGA, CUA, CCC y GGA, todos representados en la secuencia del gen L1 evaluado. La cepa *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS ha sido un hospedero útil para la expresión de genes L1 de VPH alfas de especies cutáneas, con delecciones por ambos extremos (Senger *et al.* 2010) y también de los genes L1 del VPH-16 y 18 (Liu *et al.* 2013), pero cuando estos han sido clonados en el sistema de plasmidios pGEX para obtener las proteínas L1 fusionadas a la secuencia blanco GST. Esta estrategia permitió la obtención de las proteínas L1 mayormente en la fracción soluble del citoplasma. Sin embargo, en el presente trabajo no se siguió una estrategia de fusión a la secuencia blanco GST dado nuestro interés en evitar posibles complicaciones potenciales relacionadas con el corte de la secuencia blanco GST y su posterior purificación. Además, se ha informado sobre la formación de agregados mayormente insolubles de la proteína L1, posterior a la remoción de la etiqueta GST en *E. coli* (Senger *et al.* 2010).

En este estudio, la proteína VPH-18 L1 se detectó solamente en la fracción insoluble de Rosetta (DE3) pLysS, (Fig. 5, carril 6), de forma similar a su expresión en *E. coli* BL21 (DE3). Se ha especulado que la agregación de las proteínas recombinantes en cepas de *E. coli* que tienen su *codon-bias* ajustado puede deberse a la suplementación de los ARNts de codones raros, lo cual puede provocar la eliminación de pausas de traducción necesarias para el plegamiento y estabilidad de la proteína de interés (Rosano y Ceccarelli, 2009). Como perspectiva futura queda abierta la posibilidad de evaluar las potencialidades de un gen L1 del VPH-18 de origen sintético, con uso armonizado de codones, para la obtención de la proteína de interés con mayores rendimientos. No obstante, Chen *et al.* (2016) no detectaron expresión de un gen L1 del VPH-16 con uso optimizado de codones para *E. coli*, el cual se clonó en el plasmidio pET-28a, fusionado a las secuencias codificadoras de la cola de histidina y de la proteína principal de la cápsida del fagoT7.

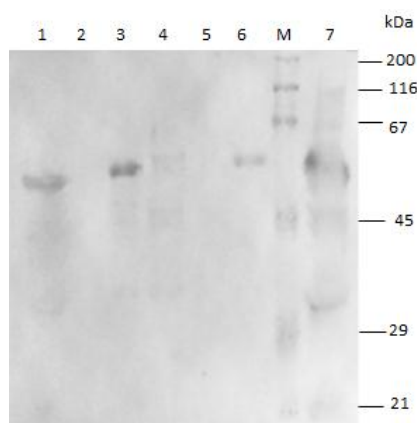


Fig. 5. Análisis representativo mediante *Western blot* de la producción de la proteína L1 del VPH-18 en tres cepas de *E. coli* transformadas con el plasmidio pET28a-HPV-18 L1-tag. Se aplicaron 15 µl de cada muestra. 1: *E. coli* Origami (DE3) Fracción total; 2: *E. coli* Origami (DE3) Fracción soluble; 3: *E. coli* Origami (DE3) Fracción insoluble; 4: *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS Fracción total; 5: *E. coli*

Rosetta (DE3) pLysS Fracción soluble; 6: *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS Fracción insoluble; *M*: Patrón de peso molecular *Prestained SDS PAGE Protein Marker* 6.5-200 kDa (Serva, Alemania); 7: *E. coli* BL21(DE3) Fracción total.

De acuerdo a los análisis densitométricos realizados a las membranas de *Western blot*, *E. coli* Origami (DE3) produjo dos veces cantidades menores de la proteína L1 que las producidas por *E. coli* BL21 (DE3). La cepa Origami fue seleccionada para evaluar su capacidad de catalizar la formación de los puentes disulfuros en el citoplasma, bajo condiciones de inducción de la expresión y temperatura, que pudieran favorecer la obtención soluble de la proteína L1, considerando que recientemente Bang *et al* (2016) utilizaron diez veces mayor concentración del inductor IPTG y temperatura de 37 °C y obtuvieron la proteína L1 del VPH-16 en la fracción insoluble de *E. coli* Origami. Existe el consenso que bajos niveles del inductor y temperaturas reducidas durante la inducción puede promover la solubilidad de las proteínas recombinantes en *E. coli* (Gopal y Kumar, 2013; Gupta y Shukla, 2016) requisito necesario para que la cepa Origami pueda catalizar la formación de los puentes disulfuro de la proteína (Berkmen, 2012). A su vez, los enlaces disulfuros son requeridos para el plegamiento y la estabilidad de los dominios de la proteína de interés y en ocasiones son importantes para la solubilidad de la proteína (Drees *et al.* 2008).

De forma similar a *E. coli* BL21 (DE3) y *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS, la proteína VPH-18 L1-tag se detectó depositada en la fracción insoluble de *E. coli* Origami (DE3) (Fig. 5, carril 3); por lo que considerando los niveles de expresión de la proteína VPH-18 L1-tag, *E. coli* BL21 (DE3) es el hospedero más atractivo para su producción. Estos resultados fueron similares a los informados por autores que utilizaron genes ricos en codones codificantes para cisteínas y con uso optimizado de codones para *E. coli*, como Bang y cols (2016) en el que la cepa más productora de la proteína L1 del VPH-16 fue *E. coli* BL21(DE3), o la proteína reteplasa, también mejor producida por *E. coli* BL21 (Fathi-Roudsari *et al.* 2016).

En experimentos futuros se evaluará el efecto de condiciones de solubilización más suaves, que puedan favorecer el proceso de purificación de la proteína en estado funcional, a partir de los CI producidos en el citoplasma ingenierizado de *E. coli* Origami (DE3) [pET28a-HPV-18 L1-tag], respecto a los de *E. coli* BL21. Se ha informado sobre la presencia de estructuras plegadas y variantes semejantes a la nativa entre los intermediarios y agregados *amiloides* de algunas proteínas en CI en *E. coli* (García-Fruitós *et al.* 2005, Peternel *et al.* 2008, Rinas *et al.* 2017) lo cual ha permitido utilizar condiciones de solubilización menos agresivas, que han conducido a mayores recobrados de las proteínas funcionales a partir de los CI (Singh y Panda, 2005; Singh *et al.* 2015). Hasta nuestro conocimiento, un estudio comparativo de este tipo no se ha realizado a partir de los CI aislados de ambas cepas y por ello, nuestro grupo evalúa esta alternativa.

CONCLUSIONES

En este trabajo, un gen L1 del VPH-18, aislado de una muestra cervical de una paciente cubana, se expresó en *E. coli* cuando el promotor *T7lac* dirigió su expresión génica. *E. coli* BL21 fue la cepa hospedero que produjo mayores cantidades de la proteína L1 del VPH-18, al menos 2 veces más que las producidas por *E. coli* Origami (DE3). *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS produjo los menores niveles de la proteína L1 del VPH-18, inferiores al límite de detección de la técnica de SDS-

PAGE convencional. Hasta nuestro conocimiento, no existen informes previos de la expresión de un gen L1 nativo del VPH-18, fusionado a una secuencia codificadora de una etiqueta de seis histidinas, por cepas ingenierizadas de *E. coli*. En las tres cepas estudiadas, la proteína L1 se detectó en la fracción insoluble del citoplasma y particularmente el análisis de las células de *E. coli* BL21(DE3) mediante TEM sugirió la agregación de la proteína L1 del VPH-18 en cuerpos de inclusión. Considerando los trabajos previos que informan sobre la purificación y caracterización satisfactoria de la proteína L1 del VPH-16 a partir de CI de *E. coli*, en el futuro será necesario establecer las condiciones de extracción y purificación de la proteína L1 del VPH-18 a partir de la cepa de *E. coli* que ofrezca las condiciones de solubilización más favorables para la conservación de la actividad del producto final.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bang, H. B., Lee, Y. H., Lee, Y. J., & Jeong, K. J. (2016). High-level production of human papillomavirus (HPV) type 16 L1 in *Escherichia coli*. *J Microbiol Biotechnol*, 26(2), 356-363.
- Berkmen, M. (2012). Production of disulfide-bonded proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 82(1), 240-251.
- Bishop, B., Dasgupta, J., & Chen, X. S. (2007). Structure-based engineering of papillomavirus major capsid 11: controlling particle assembly. *Virology*, 4, 3.
- Bruni, L., Barrionuevo-Rosas, L., Serrano, B., Mena, M., Gómez, D., Muñoz, J., & Castellsagué, X. ICO Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). *Human Papillomavirus and Related Diseases in World. Summary Report 19 May 2017*. Recuperado de <http://www.hpvcentre.net/statistics/reports/XWX.pdf>
- Bruni, L., Barrionuevo-Rosas, L., Serrano, B., Mena, M., Gómez, D., Muñoz, J., & de Sanjosé, S. ICO Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre) (2017). *Human Papillomavirus and Related Diseases in Cuba. Summary Report 27 July 2017*. Recuperado de <http://www.hpvcentre.net/statistics/reports/CUB.pdf>
- Burk, R. D., Chen, Z., & Van Doorslaer, K. (2009). Human papillomaviruses: genetic basis of carcinogenicity. *Public Health Genomics*, 12(5-6), 281-290.
- Chen, X. S., Casini, G., Harrison, S. C., & Garcea, R. L. (2001). Papillomavirus capsid protein expression in *Escherichia coli*: purification and assembly of HPV11 and HPV16 L1. *J Mol Biol*, 307(1), 173-182.
- Chen, Y., Liu, Y., Zhang, G., Wang, A., Dong, Z., Qi, Y., & Jiang, M. (2016). Human papillomavirus L1 protein expressed in *Escherichia coli* self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Virus Res*, 220, 97-103.
- Choe, W. S., Clemmitt, R. H., Chase, H. A., & Middelberg, A. P. (2003). Coupling of chemical extraction and expanded-bed adsorption for simplified inclusion-body processing: Optimization using surface plasmon resonance. *Biotechnol Bioeng*, 81(2), 221-232.
- Daniel, E., Onwukwe, G. U., Wierenga, R. K., Quaggin, S. E., Vainio, S. J., & Krause, M. (2015). ATGme: Open-source web application for rare codon

identification and custom DNA sequence optimization. *BMC bioinformatics*, 16(1), 303.

de Martel, C., Plummer, M., Vignat, J., & Franceschi, S. (2017). Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. *Int J Cancer*, 141(4), 664-670.

de Sanjose, S., Quint, W. G., Alemany, L., Geraets, D. T., Klaustermeier, J. E., Lloveras, B., & Shin, H.-R. (2010). Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncology*, 11(11), 1048-1056.

Di Bonito, P., Grasso, F., Mochi, S., Accardi, L., Donà, M. G., Branca, M., & Ciotti, M. (2006). Serum antibody response to Human papillomavirus (HPV) infections detected by a novel ELISA technique based on denatured recombinant HPV16 L1, L2, E4, E6 and E7 proteins. *Infect Agent Cancer*, 1(1), 6.

Drees, C., Stürmer, C. A., Möller, H. M., & Fritz, G. (2008). Expression and purification of neurolin immunoglobulin domain 2 from *Carrassius auratus* (goldfish) in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 59(1), 47-54.

Fathi-Roudsari, M., Akhavian-Tehrani, A., & Maghsoudi, N. (2016). Comparison of three *Escherichia coli* strains in recombinant production of reteplase. *Avicenna J Med Biotechnol*, 8(1), 16-22.

García-Fruitós, E., González-Montalbán, N., Morell, M., Vera, A., Ferraz, R. M., Arís, A., & Villaverde, A. (2005). Aggregation as bacterial inclusion bodies does not imply inactivation of enzymes and fluorescent proteins. *Microb Cell Fact*, 4(1), 27.

Gopal, G. J., & Kumar, A. (2013). Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. *Protein J*, 32(6), 419-425.

Gu, Y., Wei, M., Wang, D., Li, Z., Xie, M., Pan, H., & Xia, N. (2017). Characterization of an *Escherichia coli*-derived human papillomavirus type 16 and 18 bivalent vaccine. *Vaccine*, 35(35), 4637-4645.

Guevara-Hernández, E., López-Zavala, A., Jiménez-Gutiérrez, L., & Sotelo-Mundo, R. (2013). Perspectivas actuales del uso de proteínas recombinantes y su importancia en la investigación científica e industrial. *Biotecnia*, 15(3), 8-17.

Gupta, G., Glueck, R., & Patel, P. R. (2017). HPV vaccines: global perspectives. *Hum Vaccin Immunother*, 13(6), 1421-1424.

Gupta, S. K., & Shukla, P. (2016). Advanced technologies for improved expression of recombinant proteins in bacteria: perspectives and applications. *Crit Rev Biotechnol*, 36(6), 1089-1098.

Hanslip, S. J., Zaccai, N. R., Middelberg, A. P., & Falconer, R. J. (2006). Assembly of Human Papillomavirus Type-16 Virus-Like Particles: Multifactorial Study of Assembly and Competing Aggregation. *Biotechnol Prog*, 22(2), 554-560.

Henaut, A., & Danchin, A. (1996). Analysis and predictions from *Escherichia coli* sequences, or *E. coli in silico*. *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. ASM Press, Washington, DC, 2047-2066.

- Herrero, R., González, P., & Markowitz, L. E. (2015). Present status of human papillomavirus vaccine development and implementation. *Lancet Oncology*, 16(5), e206-e216.
- Huh, W. K., Joura, E. A., Giuliano, A. R., Iversen, O.-E., de Andrade, R. P., Ault, K. A., & Hirschberg, A. L. (2017). Final efficacy, immunogenicity, and safety analyses of a nine-valent human papillomavirus vaccine in women aged 16–26 years: a randomised, double-blind trial, *Lancet*, 390(10108), 2143-2159.
- Ishii, Y., Tanaka, K., & Kanda, T. (2003). Mutational analysis of human papillomavirus type 16 major capsid protein L1: the cysteines affecting the intermolecular bonding and structure of L1-capsids. *Virology*, 308(1), 128-136.
- Kelsall, S., & Kulski, J. (1995). Expression of the major capsid protein of human papillomavirus type 16 in *Escherichia coli*. *J Virol Methods*, 53(1), 75-90.
- Kumano-Kuramochi, M., Xie, Q., Sakakibara, Y., Niimi, S., Sekizawa, K., Komba, S., & Machida, S. (2007). Expression and characterization of recombinant C-terminal biotinylated extracellular domain of human receptor for advanced glycation end products (hsRAGE) in *Escherichia coli*. *J Biochem*, 143(2), 229-236.
- Kumar, S., Biswas, M., & Jose, T. (2015). HPV vaccine: Current status and future directions. *Med J Armed Forces India*, 71(2), 171-177.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Lai, W., & Middelberg, A. (2002). The production of human papillomavirus type 16 L1 vaccine product from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Bioprocess Biosyst Eng*, 25(2), 121-128.
- Lazar, I., & Lazar, I. (2010). Gel Analyzer 2010: *Freeware 1D gel electrophoresis image analysis software*, Recuperado de <http://www.gelanalyzer.com/>
- Limia, C. M., Soto, Y., García, Y., Blanco, O., Kourí, V., López, M. V., & Caturla, Y. (2017). Human papillomavirus infection in anal intraepithelial lesions from HIV infected Cuban men. *Infect Agent Cancer*, 12(1), 5.
- Liu, H.-B., Chaturvedi, P. K., Battogtokh, G., Bang, H. J., Kim, I.-W., Kim, Y.-W., & Ahn, W. S. (2013). Development of Bead-based Immunoassay to Quantify Neutralizing Antibody for Human Papillomavirus 16 and 18. *Mol Biotech*, 54(2), 361-370.
- Lowy, D. R. (2016). HPV vaccination to prevent cervical cancer and other HPV-associated disease: from basic science to effective interventions: *J Clin Invest*, 126(1), 5-11.
- Ma, Z., Chen, B., Zhang, F., Yu, M., Liu, T., & Liu, L. (2007). Increasing the expression levels of papillomavirus major capsid protein in *Escherichia coli* by N-terminal deletion. *Protein Expr Purif*, 56(1), 72-79.
- Maleki, Z. (2016). Human papilloma virus vaccination: Review article and an update. *World J Obstet Gynecol*, 5(1), 16-27.
- Nardelli-Haeffliger, D., Roden, R. B., Benyacoub, J., Sahli, R., Kraehenbuhl, J. P., Schiller, J. T., & De Grandi, P. (1997). Human papillomavirus type 16 virus-like

particles expressed in attenuated *Salmonella typhimurium* elicit mucosal and systemic neutralizing antibodies in mice. *Infect Immun*, 65(8), 3328-3336.

OMS. (2017). Human papillomavirus vaccines: WHO position paper, May 2017-Recommendations. *Vaccine*, 35(43), 5753-5755.

Peternel, Š., Grdadolnik, J., Gaberc-Porekar, V., & Komel, R. (2008). Engineering inclusion bodies for non denaturing extraction of functional proteins. *Microb Cell Fact*, 7(1), 34.

Rinas, U., Garcia-Fruitós, E., Corchero, J. L., Vázquez, E., Seras-Franzoso, J., & Villaverde, A. (2017). Bacterial inclusion bodies: discovering their better half. *Trends Biochem Sci*, 42(9), 726-737.

Ríos Hernández, M. d. I. Á., Hernández Menéndez, M., Aguilar Vela de Oro, F. O., Silveira Pablos, M., Amigó de Quesada, M., & Aguilar Fabré, K. (2010). Tipos de papilomavirus humanos más frecuentes en muestras cubanas de cáncer cervical. *Rev Cub Obst y Gin*, 36(2), 104-111.

Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2009). Rare codon content affects the solubility of recombinant proteins in a codon bias-adjusted *Escherichia coli* strain. *Microb Cell Fact*, 8(1), 41.

Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol*, 5, 172.

Salis, H. M., Mirsky, E. A., & Voigt, C. A. (2009). Automated design of synthetic ribosome binding sites to control protein expression. *Nat Biotechnol*, 27(10), 946-950.

Sambrook, J., Fritsch, E., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, EE.UU.

Schwarz, T. F., Galaj, A., Spaczynski, M., Wysocki, J., Kaufmann, A. M., Poncelet, S., & Lin, L. (2017). Ten-year immune persistence and safety of the HPV-16/18 AS0₄-adjuvanted vaccine in females vaccinated at 15–55 years of age. *Cancer Med*, 6(11), 2723-2731.

Senger, T., Schädlich, L., Textor, S., Klein, C., Michael, K. M., Buck, C. B., & Gissmann, L. (2010). Virus-like particles and capsomeres are potent vaccines against cutaneous alpha HPVs. *Vaccine*, 28(6), 1583-1593.

Seo, P., Heo, S., Han, E., Seo, J., Ghim, S., & S, K. (2009). Bacterial Expression and Purification of Human Papillomavirus Type 18 L1. *Biotechnol Bioproc Engin*, 14, 168-174.

Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, A. K., Singh, S. M., & Panda, A. K. (2015). Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microb Cell Fact*, 14(1), 41.

Singh, S. M., & Panda, A. K. (2005). Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci Bioeng*, 99(4), 303-310.

- Soto, Y., MunÉ, M., Morales, E., Goicolea, A., Mora, J., Sanchez, L., & Hengge, U. R. (2007). Human papillomavirus infections in Cuban women with cervical intraepithelial neoplasia. *Sex Transm Dis*, 34(12), 974-976.
- Soto, Y., León, C. M. L., Cardellá, V. K., Maiza, A. G., de Paz, V. C., & Jiménez, M. M. (2016). Papilomavirus humanos y otros factores asociados al desarrollo de lesiones cervicouterinas en mujeres cubanas. *Panorama Cuba y Salud*, 11(1), 24-33.
- Soto, Y., Torres, G., Kouri, V., Limia, C. M., Goicolea, A., Capo, V., & Manzano, B. R. (2014). Molecular epidemiology of human papillomavirus infections in cervical samples from cuban women older than 30 years. *J Low Genit Tract Dis*, 18(3), 210-217.
- Soto, Y., Limia, C. M., González, L., Grá, B., Hano, O. M., Martínez, P. A., & Kourí, V. (2016). Molecular evidence of high-risk human papillomavirus infection in colorectal tumours from Cuban patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 111(12), 731-736.
- Soto, Y., Limia, C. M., Kourí, V., Torres, G., Goicolea, A., Capó, V., & Escobar, X. (2017). Papillomavirus humanos y factores de asociados al desarrollo de lesiones precursoras de cáncer en población cubana. *Congreso 80 Aniversario del Instituto de Medicina Tropical*. La Habana, Cuba, Diembre 4-8 de 2017.
- Speer, R. (2018) *Optimizing soluble protein expression: codon optimization, RBS design, and expression vector*. Recuperado de <https://www.genscript.com/gsfiles/techfiles/Webinar Optimize Protein Expression.pdf>
- Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expr Purif*, 41(1), 207-234.
- Wei, M., Li, S., Huang, B., Shen, W., Su, Y., Zhang, C., & Xia, N. (2009). Production of human papillomavirus type 16 virus-like particles and its immunogenicity. *Chinese J Virology*, 25(4), 245-250.
- Xu, Y., Lewis, D., & Chou, C. P. (2008). Effect of folding factors in rescuing unstable heterologous lipase B to enhance its overexpression in the periplasm of *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 79(6), 1035-1044.
- Yan, C., Li, S., Wang, J., Wei, M., Huang, B., Zhuang, Y., & Xia, N. (2009). Expression, purification and immunogenicity of human papillomavirus type 11 virus-like particles from *Escherichia coli*. *Acta Microbiologica Sinica*, 49(11), 1527-1533.
- Zhang, W., Carmichael, J., Ferguson, J., Inglis, S., Ashrafian, H., & Stanley, M. (1998). Expression of Human Papillomavirus Type 16 L1 Protein in *Escherichia coli*: Denaturation, Renaturation, and Self-Assembly of Virus-like Particles *in Vitro*. *Virology*, 243(2), 423-431.