

82



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“IDENTIFICACION DE EPITOPOS / MIMOTOPOS DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO TIPO 16 (VPH-16) UTILIZANDO BIBLIOTECAS DE PEPTIDOS EXPRESADOS EN FAGOS FILAMENTOSOS (PHAGE DISPLAY)”.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
ERIK GONZALEZ MARTINEZ

DIRECTOR DE ESTUDIOS DE KAREN MANUCHARYAN

DIVISION DE ESTUDIOS DE PROFESIONALES



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Identificación de epítomos/mimótopos del virus de Papiloma Humano Tipo 16 (VPH-16) utilizando bibliotecas de péptidos expresados en fagos filamentosos (Phage Display)".

realizado por Erik González Martínez

con número de cuenta 9130456-2 , quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Propietario

Propietario

Suplente

Suplente

Dr. Karen Manucharyan

Dra. Gohar Gevorgyan

Dra. Patricia Ramos Morales

Dr. Victor Manuel Valdés López

Dra. Leticia Rocha Zavaleta

Consejo Departamental de Biología

DRA. PATRICIA RAMOS MORALES

FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M.



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

El presente trabajo se realizó en el
Departamento de Inmunología del
Instituto de Investigaciones Biomédicas
de la UNAM.

Bajo la dirección del Dr. Karen Manucharyan

Dedico este trabajo a los dos pilares de mi vida.

A mi madre

Por su inigualable
cariño, apoyo y
dedicación que me ha
dedicado desde el inicio
de mi vida.

A mi hermano

Por ser mi amigo y mi
maestro, por enseñarme
a luchar y mejorar cada
día.

Agradecimientos

- Al Dr. Karen Manucharyan por aceptarme y brindarme su apoyo, así como por su orientación profesional.
- A la Dra. Gohar Gevorgyan por su paciencia y comprensión que sirvieron para mejorar mi desempeño y superación. Además por proporcionarme una beca de DGAPA desde el comienzo de mi tesis.
- A mi comité tutorial, la Dra. Leticia Rocha Zavaleta, el Dr. Victor Manuel Valdez López y la Dra. Patricia Ramos Morales, por sus sugerencias y comentarios al evaluar esta tesis.
- Al Dr. Carlos Larralde Rangel por su apoyo al otorgarme una beca del Sistema Nacional de Investigadores (SNI) durante el desarrollo de mi tesis.
- A mis compañeros del laboratorio Hugo, Alberto, Gonzalo, Yetzi, Natasha y José Angel, por compartir lo aprendido pero sobre todo por compartir su amistad.
- A mi amigos de la Facultad de Ciencias Irma, Pedro, Hector, Ivonne y Tonatiuh, que siempre me alentaron y apoyaron en las buenas y en las malas.
- A Carmen por haber compartido conmigo algo más que solo una parte de su vida.

ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	
2.1 Cáncer Cervicouterino.....	3
2.2 Virus de Papiloma Humano	6
2.3 Phage Display	13
2.4 Justificación del Proyecto	18
3. Hipótesis	19
4. Objetivos	
4.1 Objetivos Generales	19
4.2 Objetivos Particulares	19
5. Material y Métodos	
5.1 Medios de cultivo y soluciones	20
5.2 Material humano	21
5.3 Identificación de anticuerpos en suero de pacientes con infección por VPH, usando tres bibliotecas de péptidos expresados en fagos filamentosos	22
5.3.1 Bioselección	22
5.3.2 Titulación de los fagos	23
5.3.3 Amplificación de los fagos	23
5.3.4 Purificación del ADN de cadena sencilla de los fagos	25
5.3.5 Secuenciación del ADN de cadena sencilla de los fagos	26
5.4 Análisis de Similitud de Secuencias	27
5.5 Ensayos de ELISA	27

6. Resultados

6.1 Bioselección de las bibliotecas de péptidos al azar con sueros de pacientes infectadas con VPH-16	29
6.2 Secuenciación del ADN de las clonas.....	30
6.3 Evaluación de la reactividad de las clonas	33
7. Discusión	36
8. Conclusiones	40
9. Referencias	41

1. RESUMEN

El objetivo de este trabajo es identificar y evaluar epítomos y mimótopos relacionados con las proteínas del Virus de Papiloma Humano tipo 16 (VPH-16) utilizando bibliotecas de péptidos al azar expresados en fagos filamentosos (Phage Display). Se utilizaron tres bibliotecas de péptidos comerciales: 7, 12 y 9 aminoácidos flanqueados por cisteínas. Se realizaron ocho experimentos de bioselección utilizando tres sueros de pacientes infectadas con VPH-16. En los experimentos de bioselección, se seleccionaron al azar 157 clonas, las cuales se analizaron mediante el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA). Los ELISAs se realizaron usando los sueros de las pacientes con los que se llevaron a cabo los experimentos de bioselección. Las clonas con mayor reactividad en ELISA fueron evaluadas posteriormente con un panel de 36 sueros de pacientes infectadas con VPH-16. Dieciséis de 36 (44%) sueros de pacientes reaccionaron con al menos una clona de fago. Las clonas más reactivas fueron aquellas seleccionadas con el suero de la paciente 42, utilizando la biblioteca de siete aminoácidos. Estas clonas se llamaron **42-7-3**, **42-7-5**, **42-7-7** y **42-7-16** y todas las clonas, excepto la **42-7-3**, presentaron el consenso **MXXXXXXK** (siendo X cualquier aminoácido); pero ninguna de estas clonas representó similitud lineal con alguna proteína del VPH-16. Estas secuencias pueden representar epítomos conformacionales o mimótopos de alguna proteína del VPH-16. Por otra parte, siete clonas obtenidas durante los experimentos de bioselección, presentaron similitud lineal con la proteína principal de la cápside del VPH-16, la proteína L1. Esta similitud se encuentra en una región comprendida entre los aminoácidos **Prolina 77** y **Lisina 85**. Esta región forma un loop expuesto sobre la superficie de L1, la cual puede representar un posible epítopo de la proteína L1. Dos de las clonas (**25-12-13** y **51-12-3**) que presentaron mayor similitud con la proteína L1 del VPH-16, fueron reconocidas específicamente por varios sueros de pacientes

infectadas con VPH-16 en ELISA. Este es el primer reporte del uso de bibliotecas de péptidos al azar expresados en fagos filamentosos para identificar epítomos del VPH-16 y se necesitan estudios más detallados, con un mayor panel de sueros de pacientes así como la búsqueda de anticuerpos IgA secretoria (IgAs) presentes en secreciones cervicales con bibliotecas de péptidos expresados en fagos. Con el uso de Phage Display se pueden identificar epítomos específicos para el VPH-16 que posteriormente pueden formar parte de un ensayo diagnóstico multicomponente para la detección de anticuerpos dirigidos contra el VPH-16, así como de anticuerpos dirigidos contra marcadores de lesiones cervicales precancerosas y de cáncer cervical.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Cáncer Cervicouterino

El cáncer cervicouterino, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), es el segundo tipo de cáncer más común en la población femenina a nivel mundial y cada año se reportan aproximadamente 500,000 nuevos casos. El número total de muertes a nivel mundial por CaCu se estima en 276 000 muertes por año (1).

En México, el CaCu es el cáncer más común entre la población femenina. En 1993 y 1994, se diagnosticaron un total de 16 442 cánceres cervicales invasivos y 9 135 carcinomas *in situ*. Hay aproximadamente 4 600 muertes debidas al cáncer cervical invasivo al año con una mortalidad estimada de 5.2 por 100 000 (2). Recientes estadísticas publicadas por la Secretaría de Salud demuestran que 16 mujeres mueren diariamente por (CaCu) en territorio nacional. La edad promedio de las mujeres mexicanas que presentan ésta patología es de 48 años, pero el grupo de mujeres cuya edad fluctúa entre 35 y 59 años es el más afectado.

Extensos estudios a nivel mundial han demostrado que el factor de riesgo más importante en el desarrollo de cáncer cervicouterino (CaCu) es la infección por VPH (3-6), siendo los tipos 16 (VPH-16) y 18 (VPH-18) los más comúnmente asociados a tumores cervicales en la población mexicana y de Centroamérica (7,8). Un estudio reciente ha reportado que la prevalencia del VPH en cáncer cervical es del 99.7% (9). Este dato implica ser la mayor causa específica de cualquier cáncer humano, esto pone en duda la existencia de tumores provenientes de carcinomas cervicales

VPH-negativos (10). A la fecha, existen más de 130 diferentes tipos de VPHs (11) que infectan el epitelio humano (piel y mucosas) y se conocen más de 37 tipos de VPH que infectan el tracto anogenital y 25 o más de estos tipos de VPH están asociados al desarrollo de algún tipo de cáncer (12), complicando así la detección y distinción entre los diferentes tipos de VPHs asociados al cáncer (oncogénicos).

El desarrollo del CaCu avanzado a partir de una infección por VPH es un proceso lento, dada la capacidad de latencia del VPH, que inicia con la instalación del virus en las células basales indiferenciadas de las capas profundas del epitelio escamoso del cérvix uterino. Los virus penetran las células a través de la unión con receptores específicos, que no se han identificado hasta la fecha, sin embargo, existen candidatos como la α_6 integrina (13). Los VPH's detectados no presentan fase lítica y generan cantidades muy pequeñas de viriones por célula, los cuales pueden ser observados únicamente en las células maduras de las capas superiores del cérvix. Se ha reportado que durante el proceso natural de descamación de dichas células los antígenos virales son expuestos e inducen la generación de una respuesta inmune, evidenciada por la presencia de anticuerpos dirigidos contra las proteínas virales (6,14,15), lo cual puede tener utilidad práctica en el diagnóstico temprano de la infección por dicho virus.

El método tradicional de detección de lesiones cervicales (la neoplasia intraepitelial cervical -NIC-) y del CaCu, ha sido el análisis citológico llamado Papanicolaou, así como la colposcopia y la biopsia diagnóstica. Existen evidencias que indican que la aplicación de este sistema de diagnóstico ha reducido la incidencia de CaCu invasor, en países donde se ha aplicado como parte de un programa de prevención organizado y de amplia cobertura (16). En nuestro país,

el uso del Papanicolaou como práctica esencial en programas masivos de detección oportuna del CaCu, se lleva a cabo desde hace más de 30 años, en los cuales no ha sido posible detectar una reducción en la incidencia del CaCu. Entre los factores que impiden su éxito, se encuentran la "masificación" del ensayo; una insuficiente cobertura a nivel nacional y la baja concurrencia de las mujeres a los servicios de salud, donde se aplica el ensayo, que se ha visto también limitada por una serie de factores socioculturales propios de la idiosincrasia de los países latinoamericanos (17).

Los datos que hasta la fecha se conocen con referencia al perfil de anticuerpos que de manera natural se generan contra las diferentes proteínas del VPH son discordantes e incompletos, ya que el tipo de inmunoreactivo usado, como base del método diagnóstico, ha variado y con él los resultados que reflejan la prevalencia de anticuerpos. De esta forma, se han usado péptidos sintéticos (18, 19, 20), proteínas recombinantes del VPH fabricadas en bacterias (19, 21) y más recientemente proteínas expresadas en sistemas eucariontes tales como partículas que semejan virus (virus-like particles, VLP) (22). Existen además técnicas de biología molecular para la detección del VPH como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la captura de híbridos (23), técnicas que por su alto costo y complejidad son poco accesibles para ser aplicadas en nuestro país.

Ante este panorama y dado que la infección por VPH es el factor de riesgo más importante en el desarrollo del CaCu, se podría desarrollar un ensayo inmunológico para la detección de VPHs oncogénicos, basado en la detección oportuna de anticuerpos anti-VPH. Por ello, el diseño de nuevos inmunoreactivos para establecer un ensayo diagnóstico utilizando sueros

o secreciones cervicales de las pacientes, tendría un gran potencial en la prevención del CaCu. De esta forma, los anticuerpos detectados mediante este ensayo, indicarían una infección actual o pasada por el VPH.

2.2 Virus del Papiloma Humano

Los virus del papiloma pertenecen al género A de la familia Papovaviridae. Los virus del papiloma son virus pequeños que miden aproximadamente 52 a 55 nm de diámetro, son esféricos, sin envoltura y con una doble cadena de ADN de aproximadamente 7800 a 8000 pb (**Figura 1**).

Los virus del papiloma están ampliamente distribuidos en la naturaleza y son completamente especie específico, pueden infectar a aves, algunos mamíferos (bovinos, caprinos, conejos, gatos, caballos, alces, venados, etc.) y al hombre. La mayoría de los virus del papiloma están asociados con lesiones hiperproliferativas del epitelio, tanto de la piel como de mucosas (faringe, esófago o el tracto genital) (14, 24, 25), aunque se ha encontrado ADN del VPH en sitios como en la cavidad oral, ojo y pulmón. (11, 26).

Funcionalmente, el genoma del VPH está dividido en una región no codificadora y dos regiones codificadoras. Una de las regiones codificadoras comprende la región temprana (Early), que incluye los genes de expresión temprana (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) los cuales contienen la información necesaria para la replicación viral, la transformación e inmortalización celular. La segunda región codificadora es llamada región tardía (Late), que contiene los genes de expresión tardía L1 y L2, los cuales codifican para las proteínas estructurales de la cápside. La región no

codificadora está localizada entre el gen L1 y el gen E6. Esta región no codificadora es comúnmente llamada región larga de control (LCR) (26).

Región Larga de Control (Long Control Region, LCR)

La Región Larga de Control, comprende una secuencia que incluye el origen de replicación, pero no codifica ningún gen. La LCR contiene un conjunto de sitios de unión sobrelapados para diferentes activadores y represores transcripcionales, tanto virales como celulares. La LCR regula la transcripción de las regiones tempranas y tardías, además controla la producción de proteínas virales y partículas infecciosas. La LCR tiene como características principales las regiones ricas en A-T, tiene varios promotores de ARN polimerasa tipo II, así como de sitios de unión para factores de transcripción celular (27).

Genes de Expresión Temprana

El marco de lectura abierto (open reading frame, ORF) del gen E1 es uno de los primeros genes que se expresa, junto con el gen E2, durante el inicio de la replicación del genoma de los VPHs y codifican para las proteínas E1 y E2, respectivamente. La proteína E1 interactúa con la proteína E2 para la formación de un complejo específico sobre el origen de replicación viral. La proteína E2 incrementa sustancialmente la afinidad de la proteína E1 por el origen de replicación (28).

El ORF de E2 produce una proteína que regula la replicación del ciclo viral al unirse a una secuencia específica del ADN viral. La proteína E2 también está implicada en la regulación de la replicación del ADN viral a través de su asociación con la proteína E1, el factor de replicación viral. El dominio N-terminal de la proteína E2 es requerido para la transactivación, uniéndose a E1 (29). Dependiendo del contexto del promotor, la proteína E2 puede actuar como un activador transcripcional o como un represor de la expresión génica viral. Los promotores de expresión de los genes E6/E7 del VPH-16 y VPH-18 son negativamente regulados por la proteína E2, la pérdida de la expresión de E2 está implicada en el desarrollo de cáncer cervical.

El ORF de E4 se expresa en las etapas finales de la infección junto con las proteínas de la cápside L1 y L2, cuando los viriones están siendo ensamblados y parece tener importancia para la maduración y replicación del virus. La proteína E4 del VPH-16 no parece poseer propiedades transformantes, pero está asociada con la membrana celular y se acumula en el citoplasma. En queratinocitos humanos, la proteína E4 induce el colapso de la red de citoqueratinas del citoplasma, lo que sugiere que estos cambios facilitan la liberación de las partículas virales. El colapso de la red de citoqueratinas puede causar el aclaramiento perinuclear característico, o halos (koilocitosis), observados histológicamente y citológicamente en células infectadas por VPH (30).

El ORF de E5 codifica la proteína E5 que es expresada en etapas más tempranas de la transformación neoplásica que E6 y E7. La proteína E5 es altamente hidrofóbica y es encontrada en el compartimiento citoplasmático de las células. Se ha demostrado que la proteína E5 del VPH-16 puede incrementar la vida media del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGF). La tirocina cinasa de los receptores de factores de crecimiento, tal como el receptor EGF inicia

diversos eventos que resultan en la transcripción de una variedad de proto-oncogenes. Previamente, se ha demostrado que la expresión de c-jun, junB y c-fos es inducida por la proteína E5 (31).

El ORF de E6 de los virus del papiloma codifica para la proteína E6, compuesta de 151 aminoácidos en el VPH-16. La característica común de las proteínas E6 es la presencia del consenso Cis-X-X-Cis, el cual es característico de los dedos de zinc. Los dedos de zinc han sido implicados en funciones tales como la activación transcripcional, la transformación, immortalización y asociación con proteínas celulares. La proteína E6 altera el crecimiento celular al afectar a p53, la cual es una proteína celular supresora de tumores. La unión de la proteína E6 a p53 estimula la degradación de p53 celular a través una vía proteolítica dependiente de ubiquitina. Por lo tanto, los niveles celulares de p53 son bajos en las células que expresan E6 del HPV-16 (30). La proteína E6 media actividades como la immortalización celular, la transformación, la formación de tumores y la apoptosis. Además, la proteína E6 modula la transcripción y actividad de telomerasa (32).

El ORF de E7 codifica para una proteína de cerca de 100 aminoácidos; se ha demostrado que se une al Zn^{2+} y es fosforilada por la caseína cinasa (CKII) (33). Se ha demostrado que la proteína E7 es necesaria para la etapa productiva del ciclo de vida del VPH-16. También la proteína E7 es necesaria para amplificar su ADN y expresar cantidades reducidas de la proteína L1, la cual es requerida para la producción del virus. Además la proteína E7 parece crear un ambiente favorable para la síntesis de ADN del VPH-16 al perturbar el programa de diferenciación de los queratinocitos e inducir la replicación del ADN del huésped (34) al afectar

los factores de la maquinaria replicativa del hospedero tal como el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) (35), y al gen de la DNA pol α (34). La inducción de las proteínas de replicación del ADN del hospedero por la proteína E7, ocurre a través de la habilidad de E7 para secuestrar a la proteína supresora de tumores, el producto del gen retinoblastoma, pRB, liberando el factor de transcripción celular E2F-1 (30).

La forma no fosforilada de pRB es la forma activa, que actúa como un regulador negativo del ciclo celular. Durante la transición a la fase S del ciclo celular, pRB es fosforilada y pasa a su forma inactiva. E2F-1 se une a pRB no fosforilada, formando un complejo que inactiva la transcripción celular. La fosforilación de pRB o la formación del complejo con la proteína E7 resulta en la liberación de E2F-1, permitiendo su función como activador transcripcional de genes celulares implicados en la síntesis de ADN celular y la progresión hacia la fase S del ciclo celular (26).

Genes de Expresión Tardía

El ORF de L1 codifica para la proteína principal de la cápside del virus de 50-60 kDa y constituye el 95% de la cubierta del virus. La cápside del virus está constituida en una proporción 30:1 por la proteína L1 y la proteína L2, respectivamente. La secuencia del gen que codifica para L1 es la segunda secuencia más conservada, después de la secuencia del gen E1, entre los diferentes VPHs. La proteína L1 es expresada en grandes cantidades durante la infección por VPH-16 o en etapas de neoplasia intraepitelial cervical (CIN) de bajo grado (36). L1 es capaz de autoensamblarse para formar las partículas parecidas a virus, VLPs (37). L1 es la proteína más

antigénica de los virus del papiloma; se han caracterizado epítomos lineales mediante proteínas de fusión producidas en bacterias (38); mediante el uso de VLPs de L1 del VPH-16 expresados en sistemas eucariontes, se han descrito epítomos conformacionales (39, 40). Los VLPs también han servido para producir y detectar anticuerpos neutralizantes (41), y se ha demostrado que los anticuerpos neutralizantes son tipo específicos con la excepción de los tipos estrechamente relacionados (40,42,43).

El ORF de L2 codifica para la proteína menor de la cápside viral de 49-60 kDa y es considerada una de las proteínas con mayor variación en su secuencia entre los distintos tipos de VPHs. L2 no tiene capacidad de autoensamblarse como L1. Sin embargo, L2 es incorporada en los VLPs, probablemente en los vértices de la cápside, cuando se coexpresa con L1 (44). La mayor parte de L2 se encuentra dentro de la cápside y es requerida para la encapsulación del genoma viral (45). No obstante, una pequeña porción de L2 está expuesta sobre la superficie de la cápside y es accesible a los anticuerpos (46), de los cuales un pequeño número son neutralizantes (47). L2 no es requerido para la unión de los viriones a la superficie celular y los antiseros neutralizantes contra L2 no afectan este proceso (48).

La clasificación de los virus del papiloma se basa en la comparación de las secuencias de regiones específicas de su genoma. Basados en el criterio adoptado por el Papillomavirus Nomenclature Committee, las secuencias de nucleótidos de los ORF's de L1, E6 y E7 de un nuevo tipo, no deben de exceder el 90% de similitud de las secuencias correspondientes de los genomas de los VPHs conocidos. (26,49).

Los diferentes tipos de VPH que infectan el tracto genital son clasificados comúnmente en dos categorías basados sobre la frecuencia de asociación con tumores malignos y el potencial oncogénico de los virus. La primera categoría llamada de "bajo riesgo" incluye a los VPH's tipo 6, 11, 42, 43, 44 así como a la mayoría de los nuevos tipos de VPH's. Los VPH's de bajo riesgo son comúnmente asociados con las verrugas genitales pero que son raramente encontrados en el cáncer cervical. La segunda categoría llamada de "alto riesgo" incluye predominantemente a los VPH's tipo 16, 18, 31, 45 y 56, los cuales son comúnmente encontrados en carcinomas y lesiones precursoras. Otros tipos de VPH como el 33, 35, 39, 51 y 52 son menos representados en cánceres pero muy frecuentes en lesiones intraepiteliales escamosas (SIL), son incluidos en la categoría de alto riesgo, aunque en algunos reportes son referidos como un grupo intermedio (30, 50, 24).

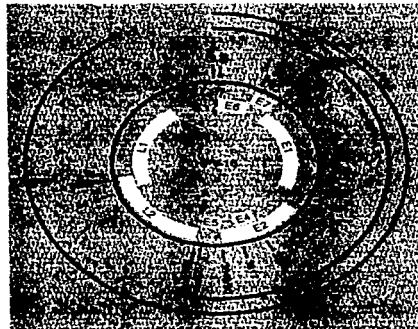


Figura 1. Genoma del Virus de Papiloma Humano (VPH)-16. El genoma es circular de doble cadena y 7.9 Kbp. Los números en el exterior del círculo indican el número de los nucleótidos con respecto a la posición de los distintos sitios de inicio de los genes que constituyen al VPH-16. Las zonas blancas dentro del círculo indican los genes de expresión temprana (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) y los genes de expresión tardía (L1 y L2).

2.3 Bibliotecas de péptidos expresados en fagos filamentosos (Phage Display).

La búsqueda e identificación de epítomos de moléculas de interés biológico ha tenido gran avance desde la aparición de la técnica llamada Phage Display. Esta poderosa herramienta ha captado la atención de la investigación y probablemente será una de las técnicas más importantes en los próximos años. Phage Display consiste en la expresión de péptidos y proteínas, fusionadas a algunas de las proteínas (pIII, pVI, pVII, pVIII y pIX) de la cubierta del fago. Las proteínas de la cubierta del fago comúnmente usadas para la expresión de péptidos son la pIII y la pVIII, pero se han hecho experimentos para utilizar la pVI (51), la pVII y la pIX (52).

El método de expresar péptidos en fagos fue descrito por primera vez por Scott y Smith en 1990 y desde entonces ha sido usada en diversos estudios (53). Los péptidos fusionados a pIII son de 6 hasta 38 aminoácidos de longitud. Las fusiones a pVIII son más restringidas y expresan péptidos de 6-8 aminoácidos de longitud (54).

Phage Display incluye una técnica de selección *in vitro* en la cual un péptido o proteína es fusionado genéticamente a una proteína de la cubierta de un bacteriófago, esto resulta en la expresión de una proteína o péptido fusionada sobre la superficie del fago, mientras que el ADN del fago contiene el gen que codifica esta proteína o péptido. Mediante un simple procedimiento de selección *in vitro* llamado "biopanning" o bioselección, es posible una rápida identificación de ligandos de los distintos blancos (anticuerpos, enzimas, receptores de superficie celular, etc.). La bioselección se lleva a cabo al incubar una biblioteca de péptidos expresados en fagos en una placa cubierta con el blanco, se lava para eliminar los fagos que no se unen y se eluyen los fagos

que se unieron específicamente (53). El fago eluido es amplificado en bacterias *E. coli* y posteriormente se llevan a cabo varios ciclos o rondas adicionales de unión/amplificación para enriquecer el conjunto de fagos a favor de aquellos que expresan los péptidos que se unieron con mayor afinidad. Después de 3 o 4 rondas, las clonas seleccionadas son caracterizadas mediante la secuenciación de su ADN (Figura 2).

La técnica Phage Display emplea comúnmente como vector de expresión a un bacteriófago filamentosos llamado M13. El fago M13 tiene forma de filamento flexible con un diámetro aproximado de 6.5 nm y una longitud de aproximadamente 900 nm. (Figura 3). Su genoma es de ADN circular de cadena sencilla y mide aproximadamente 6.5 kb; codifica para 10 diferentes proteínas las cuales están implicadas en la replicación, morfogénesis y formación de la cápside viral. Su cubierta es de 1.5 a 2 nm de grueso y su peso aproximado entre 1.2 y 1.4×10^7 Da (55).

El ciclo de vida del fago comienza cuando el virus infecta a las bacterias *E. coli*. La infección se lleva a cabo por medio del reconocimiento del F' de las células macho (F⁺) mediante el dominio N-terminal de la pIII. Después de la retracción del pili y la penetración del genoma viral a través de la membrana bacteriana, la bacteria replica y traduce su genoma así como el del fago. El ensamblaje de los fagos toma lugar en la membrana citoplasmática con ayuda de las proteínas pI y pIV. Cerca de 100 a 300 fagos son producidos durante el ciclo de vida bacteriana.

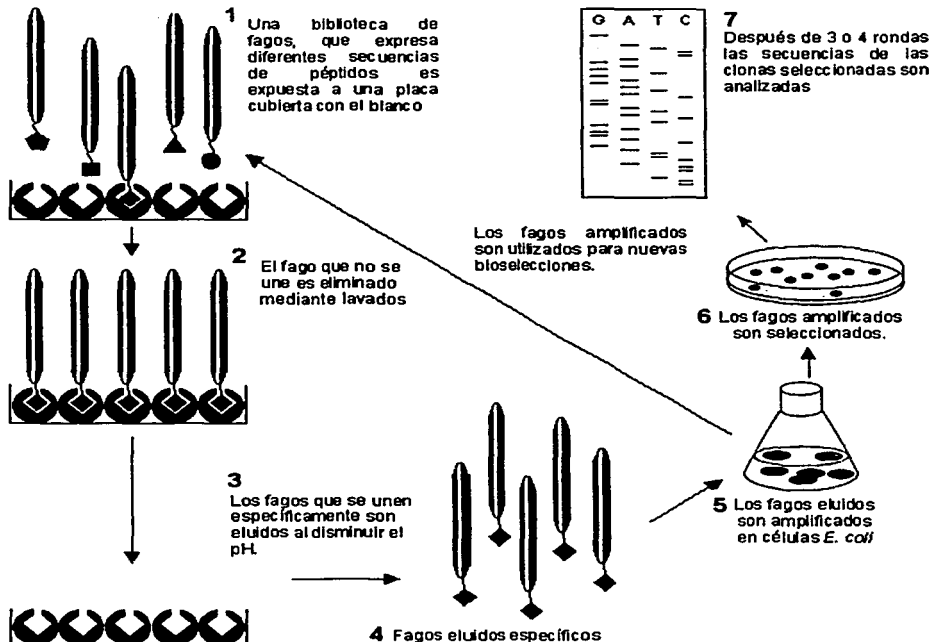


Figura 2. Procedimiento del uso de bibliotecas de péptidos expresados en fagos filamentosos durante la bioselección. Los fagos son incubados con la molécula inmóvilizada. Los fagos con poca afinidad son removidos mediante lavados y los fagos que permanecen unidos son eluidos. Los fagos eluidos son amplificados en células *E. coli*, son plaqueados y seleccionados para posteriormente caracterizar la secuencia de su péptido.

La proteína donde comúnmente se expresan los insertos peptídicos es la pIII. Esta proteína tiene un peso molecular de 43 kDa con 424 aminoácidos. Funcionalmente, tiene 3 dominios los cuales son estabilizados por enlaces disulfuro internos. El dominio N-terminal es responsable de la penetración, seguido por un dominio implicado en el reconocimiento del pilli bacterial. El dominio C-terminal es necesario para la morfogénesis y el anclaje a la membrana y es indispensable para el ensamblaje del fago (56).

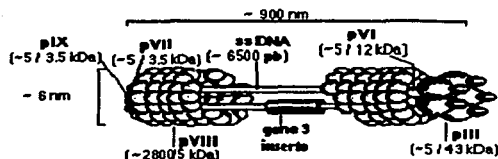


Figura 3. Esquema que muestra la estructura detallada del fago filamentos M13. La proteína o péptido está representada sobre la superficie del virus como una fusión a la proteína pIII.

La principal ventaja de Phage Display sobre otras tecnologías de mapeo de epítomos es la capacidad de trabajar con un gran número de péptidos a la vez (complejidad de 10^9) y llevando a cabo rondas de bioselección pueden seleccionarse las clonas con más alta afinidad. El fago M13 no lisa a su hospedero durante la fase de eclosión. Esto simplifica grandemente los pasos de purificación entre las rondas de bioselección. El poder de esta tecnología es su habilidad para identificar regiones interactivas de proteínas u otras moléculas sin conocer al ligando o la naturaleza de la interacción. De esta forma, es posible identificar los agentes responsables de enfermedades con etiología y/o patogénesis desconocidas. Además, hay que resaltar la inmunogenicidad que se produce en la inmunización con fagos en diferentes modelos animales sin el uso de adyuvantes (57-60).

Las bibliotecas de péptidos expresados en fagos filamentosos han surgido recientemente como una estrategia alternativa de investigación con numerosas aplicaciones, incluyendo el mapeo de epítomos lineales o conformacionales (61-68) o mimótomos (69,70), incluso de origen no peptídico (71), con capacidad de generar anticuerpos neutralizantes (68), para el desarrollo de métodos de diagnóstico y de vacunas (60,72). Las bibliotecas de péptidos expresados en fagos también se han usado para la identificación de sustratos para enzimas (73), para la identificación

de nuevos péptidos bioactivos contra receptores de superficie celular (74-76), así como para elucidar algunos mecanismos moleculares de infecciones y enfermedades.

2.4 JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

Se sabe que el repertorio de anticuerpos en pacientes con infección por VPH-16 es heterogéneo y los antígenos que son relevantes para ser usados en el diagnóstico no pueden ser identificados en la mayoría de los casos. Con el uso de bibliotecas de péptidos expresados en fagos filamentosos sería posible identificar epítomos y/o mimótopos que se unen a los anticuerpos presentes en el suero de pacientes con infección por VPH-16.

Existe un solo trabajo en donde se ha reportado la identificación de regiones seroactivas de las proteínas E4, E6, E7 y L1 del VPH-16 mediante el uso de fagos filamentosos (77). Por otra parte, también se han detectado anticuerpos contra L1 y L2 en etapas tempranas, mientras que anticuerpos anti-E6 y anti-E7 se han detectado en cáncer avanzado (78, 79, 80). Esto nos da la pauta para pensar que son varias las proteínas expresadas por el VPH-16 en sus distintas etapas de desarrollo, con una alta capacidad inmunogénica, y que la detección de anticuerpos, utilizando epítomos o mimótopos de diversos péptidos del VPH-16 expresados en fagos filamentosos, podría indicarnos tempranamente una infección por dicho virus.

En este proyecto se pretende explorar la posibilidad de producir estas moléculas a un bajo costo, que podría servir para desarrollar un método de diagnóstico sencillo, sensible, específico y de amplio alcance en toda la población. Con ello las mujeres mexicanas tendrían acceso a este método de diagnóstico en todas las instituciones de salud, tanto públicas como privadas, convirtiéndose probablemente en un recurso de diagnóstico de gran utilidad a nivel nacional.

3. HIPÓTESIS

Utilizando bibliotecas de péptidos expresados en fagos filamentosos (Phage Display) se pueden identificar epítomos o mimótopos de las proteínas del VPH-16, que podrán usarse eficazmente en la detección de la infección por VPH-16 y lesiones cervicales precancerosas mediante ELISAs, utilizando muestras de sueros de pacientes.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

- Identificar y evaluar epítomos y mimótopos relacionados con las proteínas del VPH-16 utilizando bibliotecas comerciales de péptidos expresados en fagos filamentosos.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Identificar epítomos y mimótopos del VPH-16 utilizando sueros de pacientes infectadas con VPH-16 y bibliotecas de siete, doce y nueve aminoácidos flanqueados por residuos de cisteína.
2. Caracterizar las clonas seleccionadas mediante la secuenciación de su ADN.
3. Comparar las secuencias de las clonas seleccionadas con las secuencias de las proteínas del VPH-16.
4. Evaluar la capacidad de las clonas obtenidas para reconocer específicamente anticuerpos en muestras de personas infectadas con VPH-16 usando la técnica de ELISA.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Medios de Cultivo y Soluciones

Medios de Cultivo

LB (Luria Bertani)

- 10 g Bacto-Tryptone
- 5 g de extracto de levadura
- 5 g de NaCl

Top Agar

- 10 g de Bacto-Tryptone
- 5 g de extracto de levadura
- 5 g de NaCl
- 1 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$
- 7 g de agarosa

Bacterias *Escherichia coli* cepa TG-1

Soluciones

PEG/NaCl (8000) 40%

- NaCl 5M
- Polietilenglicol (PEG) 400 g/l

TBS

- 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)
- 150 mM NaCl

PBS

- 0.01 M de KH_2PO_4
- 1 M Na_2HPO_4
- 1.37 M NaCl
- 0.027 M KCl
- pH 7.0

Gel de agarosa 1%

- 1 g de agarosa
- 100 ml de TBE 1X
- 0.5 de μ l de bromuro de etidio

Buffer de Elusión

- 0.2 M Glicina-HCl (pH 2.2)

Medio 2xYT

- 16 g de Bacto-Tryptone
- 10 g de extracto de levadura
- 5 g de NaCl

Medio mínimo

- Na_2HPO_4 0.6%
- KH_2PO_4 0.3%
- NH_4Cl 0.1%
- NaCl 0.05%
- Agarosa 1.5%
- Glucosa 20%
- Tiamina 1%
- $MgSO_4$ 1 M

TBE

- Tris 54g/l
- Ácido bórico 27.5 g/l
- EDTA, 20 ml

Buffer de Yodo

- 10 mM Tris-HCl pH 8.0
- 1 mM EDTA
- 4 M NaCl

Gel de poliacrilamida 8%

- 39.6 g Urea
- 26.4 ml Agua
- 16 ml Acrilamida/Bisacrilamida 38:2
- 8 ml TBE 10X
- 675 μ l Persulfato de Amonio
- 25 μ l TEMED

Xgal/IPTG

- 1 g X-Gal
 - 1.25 g IPTG
 - disolver en 25 ml de dimetil formamida
- Mantener a $-20^\circ C$.

5.2 Material Humano

El material humano incluido en este estudio fue obtenido de pacientes atendidas en el Centro Nacional de Displasias (CENACLID) del Hospital General de México, Secretaría de Salud. Todas las pacientes fueron sometidas a un estudio citológico (Papanicolau) y a un ensayo colposcópico. Aquellas que mostraron evidencia de la presencia del VPH fueron pre-seleccionadas. De cada una de las pacientes se tomó una biopsia del área infectada, una muestra de sangre y una de secreción cervical. También se les realizó la confirmación molecular por PCR utilizando los primers MY09-MY11, que comprenden una región de ~ 450 pb dentro del ORF de L1 del VPH. Al mismo tiempo se les realizó el ensayo serológico de ELISA para confirmar la presencia de anticuerpos dirigidos contra el VPH-16 utilizando VLPs de L1 del VPH-16. A partir de un panel de 100 pacientes, se decidió utilizar una población de 36 pacientes, de las cuales, 28 tenían infección por VPH-16, 6 fueron diagnosticadas con NIC y 2 con CaCu y todas ellas fueron positivas para la presencia del VPH-16 (detección por PCR). El principal parámetro para incluirlas al inicio del proyecto, se basó en las lecturas más altas de anticuerpos anti-L1 (VLPs) en los ELISAs. 31 de 36 pacientes tuvieron IgAs anti-L1 en secreciones cervicales y 20 de 36 tenían niveles detectables de IgG en suero ($DO > 1.0$). Como controles negativos se utilizaron sueros provenientes de 24 donadores de sangre clínicamente saludables, obtenidos en el Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

5.3 Identificación de anticuerpos en suero de pacientes con infección por VPH, usando tres bibliotecas de péptidos expresados en fagos filamentosos.

Para identificar los epítomos/mimótopos de las proteínas del VPH-16 se usaron tres bibliotecas comerciales de siete, doce y siete aminoácidos flanqueados por cisteínas expresados al azar en el extremo amino de la proteína pIII de la superficie del fago filamentosos M13 (New England Biolabs Inc, Beverly, USA).

5.3.1 Bioselección

La bioselección se llevó a cabo utilizando placas de microtitulación (Boehringer Mannheim, GmbH-Germany) las cuales estaban cubiertas con anticuerpos anti-Fc de IgG humano. Esta modificación permitió seleccionar únicamente inmunoglobulinas con su fragmento Fab libre, y eliminar cualquier otra proteína presente en la muestra humana (81). Se evaluaron tres sueros de pacientes VPH-16 positivos (suero 25, suero 42 y suero 51), que tenían los más altos niveles de anticuerpos de tipo IgG e IgAs anti- VLP de VPH-16 (DO >1.0). Los sueros se agregaron a las placas sensibilizadas usando una dilución 1:20 en solución amortiguadora de fosfatos 7.2 (PBS 1X) agregando 50 µl por pozo, se incubó durante 1 hora y 30 minutos a 37°C. Posteriormente, se lavaron las placas cinco veces con PBS 1X y se incubaron a 4°C toda la noche. Al siguiente día se agregaron las bibliotecas de péptidos (10¹¹ fagos/pozo) en una dilución 1:40 en PBS con 0.1% de albúmina sérica bovina (PBS-BSA 0.1%), 100 µl a cada pozo, se dejaron incubar a 4°C por 4 horas. Después de lavar las placas con PBS frío se dejó incubar con 100 µl de PBS 1X a 4° C por 30 minutos (para remover los fagos no específicos). Se quitó el sobrenadante y para eluir los

fagos específicos que quedaron unidos a las placas se agregó a cada pozo 100 μ l de HCl-Glicina (0.2 M Glicina/HCl pH 2.2) dejándose 10 minutos a temperatura ambiente y después 10 minutos a 37°C. Se colectó el eluido de los pozos y se neutralizó con 25 μ l de TRIS (2 M, pH 11.07).

5.3.2 Titulación de los Fagos

Después de cada ronda de bioselección de cada uno de los experimentos se procedió a determinar el número de los fagos eluidos. Después de la primera ronda de cada experimento se hicieron diluciones seriadas 1:1000 en medio de cultivo 2YT a partir de los fagos eluidos de las bioselecciones anteriores.

Después de realizar la última dilución, se agregaron los fagos a 200 μ l de bacterias TG-1 (de un cultivo de toda la noche, DO₆₀₀ ~ 0.5) más 10 μ l de Xgal/IPTG, se dejó incubar por 5 minutos a temperatura ambiente. Después se agregaron 4 ml de medio Top Agar (fundido), se mezcló y se vació en una caja de petri preparada con medio LB agar para dejarse incubar a 37°C toda la noche. Al día siguiente se obtuvo el título contando las unidades formadoras de placas (pfu).

5.3.3 Amplificación de los Fagos

Para amplificar el eluido, un día antes se cultivaron bacterias de *E. coli* TG-1 en 10 ml de medio 2xYT en agitación a 37°C toda la noche. De estas bacterias se tomaron 500 μ l que se agregaron a 50 ml de medio 2xYT más 390 μ l de los fagos eluidos, se dejaron en agitación por

4.5 horas a 37°C. Posteriormente, se centrifugó a 10 000 rpm (12 000 g) por 10 minutos a 4°C. Se tomaron 40 ml del sobrenadante y se mezcló con 1/6 de polietilenglicol (PEG/NaCl) manteniéndose a 4°C toda la noche.

Después de 16 horas se centrifugó durante 15 minutos a 10 000 rpm (12 000 g) a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1ml de TBS. Después se transfirió la suspensión a un tubo de microcentrifuga y se centrifugó por 5 minutos a 13 200 rpm (16 100 g) a 4°C. Se volvió a transferir el sobrenadante a otro tubo de microcentrifuga y se reprecipitó con 180 µl de PEG/NaCl y se incubó en hielo por 1 hora. Después, se centrifugó 10 minutos a 13 200 rpm (16 100 g) a 4°C, se tiró el sobrenadante, se recentrifugó 2 minutos a 4°C y se desechó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet en 200 µl de TBS y se centrifugó 5 minutos a 4°C, para eliminar cualquier residuo insoluble. De esta forma, se transfirió el sobrenadante a otro tubo de microcentrifuga y se obtuvo el eluido amplificado, que posteriormente se tituló para tener ~ 10¹³ fagos/ml. De esta forma, los fagos amplificados se usaron para realizar las siguientes rondas de bioselección.

A partir de la segunda bioselección de cada experimento se llevó a cabo la selección al azar de las clonas de cada eluido (el número de clonas seleccionadas fue de 8 a 10 en cada experimento). Cada una de las clonas seleccionadas se amplificó en 10 ml de medio 2xYT más 100 µl de bacterias *E. coli* TG-1. Se incubaron 4.5 horas en agitación a 37°C. Los siguientes pasos son iguales a los llevados a cabo en la amplificación de los eluidos obtenidos de las bioselecciones.

Posteriormente, también se titularon cada una de las clonas amplificadas. Se hicieron diluciones seriadas 1:1000 en medio 2xYT. Después de realizar las diluciones, se agregaron los fagos en 200 µl de bacterias *E.coli* T-G1 (de un cultivo de toda la noche) más 10 µl de Xgal-IPTG, se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente y se transfirió a 4 ml de Top Agar fundido y de ahí a una caja de petri con medio LB sólido, dejándose incubar toda la noche a 37°C. Al día siguiente, se llevó a cabo el mismo procedimiento para calcular el título, pero en este caso se obtuvieron ~ 10¹¹ fagos/ml.

5.3.4 Purificación del ADN de cadena sencilla de los fagos

Para la purificación del ADN de la cadena sencilla de las clonas seleccionadas al azar (82), se tomó 1 ml del sobrenadante de la primera centrifugación del proceso de amplificación de cada clona seleccionada, se le agregó 400 µl de PEG/NaCl y se mantuvo a temperatura ambiente por 10 minutos, después se centrifugó 10 minutos a 13 200 rpm (16 100 g), se desechó el sobrenadante y se recentrifugó 30 segundos. Después de tirar el sobrenadante se agregó 200 µl de buffer de yodo [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 4 M NaI] y se resuspendió el pellet, se agregaron 500 µl de etanol absoluto, se mezcló y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó 10 minutos a 13 200 rpm (16 100 g), se tiró el sobrenadante y se agregaron 200 µl de etanol al 70%. Después de centrifugar 1 minuto, se tiró el sobrenadante y el pellet se suspendió en 15.5 µl de agua bidestilada. Para verificar la presencia del ADN, se tomaron 2 µl de la muestra y se analizó en un gel de agarosa al 1%.

5.3.5 Secuenciación del ADN de cadena sencilla de los fagos

La secuenciación del ADN de los fagos seleccionados se realizó mediante el uso del kit "T7 Sequenase versión 2.0 Quik-Denature plasmid sequencing" (Amershan Life Science, OH) y dATP α -S³⁵ como se describe a continuación. Se incubaron a 37°C durante 10 minutos, 1.5 μ l de primer (Secuencing Primer -96 gIII, New England Biolabs, USA) con 2 μ l de "plasmid reaction buffer" y 12.5 μ l del ADN purificado de cada uno de los fagos (0.5-3 μ g de ADN). Después se incubó en hielo 10 minutos. A la mezcla anterior se le agregó 1 μ l de DTT (dithiotritol) 0.1 M, 2 μ l de labeling mix (dNTPs de G, T, C; 7.5 μ M c/u), 0.5 μ l de dATP α -S³⁵ (3.75×10^{-13} μ Ci), y 1 μ l de enzima (4 unidades de polimerasa), dejándose incubar 5 minutos a 37°C. Posteriormente en 4 tubos por reacción se agregaron 2.5 μ l de ddNTPs (80 μ M) nucleótidos análogos de terminación, (G, A, T y C), a los cuales se les agregó 4.5 μ l de la mezcla anterior dejándose a 37°C por 5 minutos. Posteriormente, a cada uno de los tubos se les agregó 4 μ l de la solución stop y se incubaron a 75°C por tres minutos. Inmediatamente se agregaron 6 μ l de cada una de las muestras en los carriles de un gel de poliacrilamida al 8%. Se corrió 4 horas y 30 minutos a 1800 Volts, se secó el gel en un secador de geles durante 60 minutos a 80°C. Se transfirió a un cassette en donde se expuso a una placa de rayos X durante 72 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se reveló la placa y se llevó a cabo la lectura manual de la misma para determinar la secuencia de aminoácidos de los péptidos expresados en los fagos seleccionados.

5.4 Análisis de Similitud de Secuencias

La similitud de las regiones de aminoácidos entre los insertos de péptidos de las clonas seleccionadas y las secuencias de proteínas del VPH-16, se compararon usando los programas de computadora ALIGN y LALING del Servidor de Genestream Bioinformatics Resource (<http://xylian.igh.cnrs.fr/>).

5.5 Ensayos de ELISA

Para comprobar la reactividad de las clonas con los sueros de las cuales fueron obtenidas se realizó el siguiente formato de ELISA.

Se sensibilizó una placa para ELISA de 96 pozos (Nunc Maxi Sorp, Denmark) con 100 µl/pozo de un anticuerpo anti-IgG humano [Goat Anti-Human IgG (Fc), Zymed Laboratories Inc, Sn. Fco. California, USA] diluido 1:200 en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS 1X, pH 7.4) y se incubó una hora a 37°C. Se realizaron cuatro lavados con PBS-Tween 0.1% y se utilizaron 200 µl/pozo de una solución bloqueadora para ELISA (Blocking Reagent for ELISA, Boehringer Mannheim, Germany) para cubrir los sitios de unión inespecíficos de la placa, dejándose incubar una hora a 37°C. Se realizaron cuatro lavados con PBS-Tween 0.1% y se mantuvo la placa a 4°C toda la noche. Al día siguiente, se agregaron 100 µl/pozo de los sueros VPH-16 positivos con los cuales se habían obtenidos las clonas en las distintas bioselecciones en una dilución 1:100 en PBS-BSA 1% y se incubó una hora y media a 37°C. Se hicieron cuatro lavados con PBS-Tween 0.1% y se agregaron 100 µl/pozo de las clonas de los fagos (10⁹/pozo)

en PBS-BSA 0.1% incubándose 3.5 hrs a 4°C. Se hicieron cuatro lavados con PBS-Tween 0.1% y se agregaron 100 µl/pozo de un anticuerpo monoclonal anti-M13 conjugado con peroxidasa (HRP/Anti M13 Monoclonal Conjugate, Amersham Pharmacia Biotech Inc, NJ, USA) en una dilución 1:2500 en PBS-BSA 1% dejándose en incubación una hora a 37°C. Se hicieron cuatro lavados con PBS-Tween 0.1% y se agregó 100 µl del sustrato para peroxidasa (ABTS single solution, Zymed Laboratories Inc, Sn. Fco. California, USA). Se midió la absorbancia a 405 nm en un lector de placas automático.

Las clonas más reactivas fueron seleccionadas para probarse en ELISA con un panel de sueros de pacientes VPH-16 positivo. Los ensayos de ELISA se llevaron a cabo de la misma forma que la anterior.

6. RESULTADOS

6.1 BIOSELECCIÓN DE LAS BIBLIOTECAS DE PÉPTIDOS AL AZAR CON SUEROS DE PACIENTES INFECTADAS CON VPH-16

En este estudio se utilizaron tres bibliotecas comerciales de péptidos expresados en fagos filamentosos. Se usaron dos tipos de bibliotecas de péptidos: bibliotecas con insertos lineales (siete y doce aminoácidos) y una biblioteca de insertos cíclicos (nueve aminoácidos flanqueados por residuos de cisteína). Estas bibliotecas se utilizaron en ocho experimentos de bioselección con tres sueros de pacientes infectadas con VPH-16.

Tres rondas de bioselección se llevaron a cabo en cada experimento. Después de la primera ronda de bioselección, se obtuvieron aproximadamente de 10^4 a 10^5 fagos en siete experimentos, con excepción del suero 42 y la biblioteca de 12 aminoácidos, donde 10^2 fagos fueron recobrados. Durante la segunda ronda de bioselección, la cantidad de fagos específicos aumentó 100 veces en 6 experimentos, 10 veces en un experimento y 1000 con el suero 42 y la biblioteca de 12 aminoácidos. En la tercera ronda de bioselección, la cantidad de fagos específicos se conservó en 2 experimentos, aumentó 10 veces en 2 experimentos, 100 veces en 2 experimentos, y se redujo 10 veces con los sueros 51 y 42, ambos con la biblioteca de 12 aminoácidos.

Suero/Biblioteca	RONDA I	RONDA II	RONDA III
25-7	1.1×10^5	1.6×10^7	1.0×10^8
25-12	1.22×10^5	1.2×10^7	2.7×10^7
42-7	1.3×10^5	1.8×10^7	1.0×10^8
42-9	9.8×10^5	6.17×10^7	2.3×10^8
42-12	2.0×10^5	3.27×10^6	4.0×10^5
51-7	1.8×10^5	5.0×10^7	1.0×10^8
51-9	3.6×10^5	1.0×10^7	1.47×10^7
51-12	2.5×10^5	1.95×10^6	9.0×10^5

Tabla 1. Selección de fagos por afinidad de los anticuerpos presentes en sueros de individuos infectados con VPH-16 en 8 diferentes ensayos de bioselección.

6.2 SECUENCIACIÓN DEL ADN DE LAS CLONAS

Se obtuvieron 157 fagos seleccionados al azar de los eluidos de la segunda y tercera ronda después de 8 experimentos y se determinaron las secuencias de los insertos peptídicos de las clonas. De las secuencias determinadas, 11 presentaron el residuo metionina en la primera posición y el residuo lisina en la séptima posición (Tabla 2). Las demás secuencias de los insertos peptídicos se encuentran resumidos en la Tabla 3. La secuencia (FHENWPS) fue encontrada 10 veces, dos secuencias (SPYDGFSAARRG y SPINNTKPHEAR) fueron encontradas nueve veces, la secuencia (MPMTPAK) se encontró 8 veces, otra secuencia (MKIPNNKLFLPV) se encontró 4 veces y tres secuencias (MHPSNSKSPPRH, QTIGNAKPLGRV, SDSHVGKLSLAH) fueron encontradas dos veces.

SECUENCIA											CLONA	
M	K	I	P	N	N	K	L	F	L	P	V	(25-12-13) ⁴
M	K	V	S	N	H	K	D	I	P	P	L	(42-12-19)
M	K	V	S	N	S	K						(51-7-7)
M	P	V	N	D	T	K						(51-7-2)
M	P	M	T	P	A	K						(42-7-16) ⁸
M	P	P	C	N	Y	K						(51-7-9)
M	P	L	V	S	Q	K						(42-7-5)
M	P	L	Q	N	S	K						(42-7-7)
M	R	L	E	T	S	K						(42-7-4)
M	R	P	D	N	A	K						(42-7-6)
M	H	P	S	N	S	K	S	P	P	R	H	(42-12-11) ²

Tabla 2. Secuencias de las clonas de fagos aisladas en los ensayos de bioselección usando sueros de los pacientes 25, 42 y 51 con las bibliotecas de 7, 9 y 12 aminoácidos. Los residuos idénticos se encuentran en negritas. Los números en paréntesis indican el ensayo en el cual se obtuvo la clona con dicha secuencia (no. de suero-tipo de biblioteca-número de clona). El superíndice indica el número de veces que fue aislada la clona.

Secuencia	Clona	Secuencia	Clona	Secuencia	Clona
TISRGTI	(51-7-1)	AASMRTLEAHSK	(25-12-1)	KDQTNYP	(42-7-8)
LKLRHLP	(51-7-4)	THMQGWWWKSPW	(25-12-2)	GKTTAAS	(42-7-3)
SASHPPP	(51-7-5)	GSGLPQYMLWLT	(25-12-3)	WAPYMTN	(42-7-2)
DPASLFH	(51-7-8)	LPLGQHQFNPSG	(25-12-4)	GEADFNM	(42-7-1)
GLLTAYV	(51-7-10)	SGMMSNATIANV	(25-12-5)	MRLPTIP	(42-7-9)
TLQALPS	(25-7-1)	ANQSLPDRLYKS	(25-12-7)	MPLTQKD	(42-7-10)
WTYSPIA	(25-7-2)	KLALSNGAIAQP	(25-12-8)	CSSGPIAPC	(42-9-1)
SLPKMLS	(25-7-3)	LSDTQAVYSADN	(25-12-10)	CALHPPPQC	(42-9-2)
ARLLFGI	(25-7-4)	QPIENYKLMPTST	(25-12-11)	CKEGKKSFC	(42-9-3)
FQRDDLRL	(25-7-6)	QLPTILGVPTQP	(25-12-14)	CNASTSMQC	(42-9-4)
LHSRPLP	(25-7-7)	AAPDDVLPNPAR	(25-12-16)	CTKMKKNIC	(42-9-5)
SCFFGRL	(25-7-8)	RFPNDQAPSWPP	(25-12-18)	CAKVVQADC	(42-9-6)
NAMSPPA	(25-7-9)	SPLFLDQRSLTP	(25-12-21)	CTHPEILFC	(42-9-7)
FHLSTAS	(25-7-10)	PSACWEAGAPSR	(25-12-22)	CPVYKPC	(42-9-8)
NRLHAYP	(25-7-11)	NAPPLFWSHQW	(25-12-24)	CNKLSRPVC	(42-9-11)
AMGYQHP	(25-7-12)	IVGTGPOPSSTV	(25-12-27)	QQLDSQKIC	(51-9-1)
HLVCRPS	(25-7-13)	HAHSRMLSMMP	(51-12-1)	CLEASYFRC	(51-9-2)
IVQLTQW	(25-7-14)	SPINNTKPHEAR	(51-12-2) ⁹	CSPLTHAIC	(51-9-3)
YSHADTM	(25-7-15)	TLKLQIRLPETI	(51-12-5)	CMKNMKQPC	(51-9-4)
AGNDRMH	(25-7-16)	QLNKIQHFTTNS	(51-12-7) ²	CNTRLLHNC	(51-9-5)
IANYGG	(25-7-17)	IKIWSTRKASLAM	(51-12-8)	CIPASGQTC	(51-9-11)
CDATTLH	(25-7-18)	AKFNARIPGFM	(51-12-9)	CYETGPWAC	(51-9-12)
DSFTPRA	(25-7-20)	FVPQLNLHTPKN	(51-12-12)	CNFTHPGYC	(51-9-13) ³
FVAHSPP	(25-7-21)	KESPTNHKTRLW	(51-12-20)	CAEPNNLLC	(51-9-15)
SPIAPPR	(25-7-23)	SPYDGFSAARRG	(42-12-1) ⁹	CNSSSMNSC	(51-9-16)
DMGPGRS	(25-7-24)	SDSHVKGKLSLAH	(42-12-3) ²	CTLSHGPSC	(51-9-17)
FHENWPS	(25-7-25) ¹⁰	HDQTLVGGVRLH	(42-12-4)	MKVNILR	(51-7-3)
KHARTSE	(25-7-26)	APYKLA MRDQA	(42-12-17)	MSPRFPQ	(51-7-6)
QTATLTY	(25-7-27)	QTIGNAKPLGRV	(42-12-18) ²	DPASLFH	(51-7-8)

Tabla 3. Resumen de las secuencias de las clonas de fagos aisladas en los ensayos de bioselección usando sueros de los pacientes 25, 42 y 51 con las bibliotecas de 7, 12 y 9 aminoácidos. Los números en los paréntesis indican el ensayo en el cual se obtuvo la clona con dicha secuencia (no. de suero-tipo de biblioteca-número de clona). El superíndice indica el número de veces que fue aislada la clona con la misma secuencia en forma independiente.

Al realizar la comparación de secuencias entre los insertos peptídicos de las clonas seleccionadas y las proteínas del VPH-16, se obtuvieron algunas similitudes. De esta forma, los péptidos MKIPNNKLFPLV (clona 25-12-13) y SPINNTKPHEAR (clona 51-12-3) aislados 9 y 4 veces respectivamente, comparten similitud con la proteína L1 del VPH-16. Además cinco clonas mas muestran similitud con la misma región de L1 (Tabla 4).

77	P	I	K	K	P	N	N	N	K	85						L1 VPH-16
		M	K	I	P	N	N	-	K	L	F	L	P	V	(25-12-13) ⁴	
			S	P	I	N	N	T	K	P	H	E	A	R	(51-12-3) ⁹	
			M	K	V	S	N	H	K	D	I	P	P	L	(42-12-19)	
			M	H	P	S	N	S	K	S	P	P	R	H	(42-12-11)	
			M	K	V	S	N	S	K						(51-7-7)	
			M	P	L	Q	N	S	K						(42-7-7)	
			M	R	P	D	N	A	K						(42-7-6)	

Tabla 4. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los péptidos insertados de las clonas seleccionadas que tienen similitud con la proteína L1 del VPH-16 (secuencia de residuos de aminoácidos de la Prolina 77 hasta el residuo de Lisina 85). Las letras en negritas indican residuos idénticos y las letras cursivas indican residuos homólogos. Los números en paréntesis indican el ensayo en el cual se obtuvo la secuencia (no. de suero-tipo de biblioteca). El superíndice indica cuantas veces se aisló la clona con la misma secuencia en forma independiente.

Mediante el uso del programa Swiss-PDB Viewer versión 3.7 (b2) y la secuencia de la proteína L1 del VPH-16 obtenida del Protein Databank Database, se elaboró un modelo tridimensional de la proteína L1 (**Figura 4**). En el modelo, se identificó la región de la proteína de L1 (la secuencia de residuos de aminoácidos de la Prolina 77 hasta el residuo de Lisina 85 **PIKKPNNNK-**) que compartía similitud con las secuencias de la **tabla 4**. Esta región forma parte de un loop que se encuentra expuesto y que Müller en 1990 reportó como un posible epítipo.

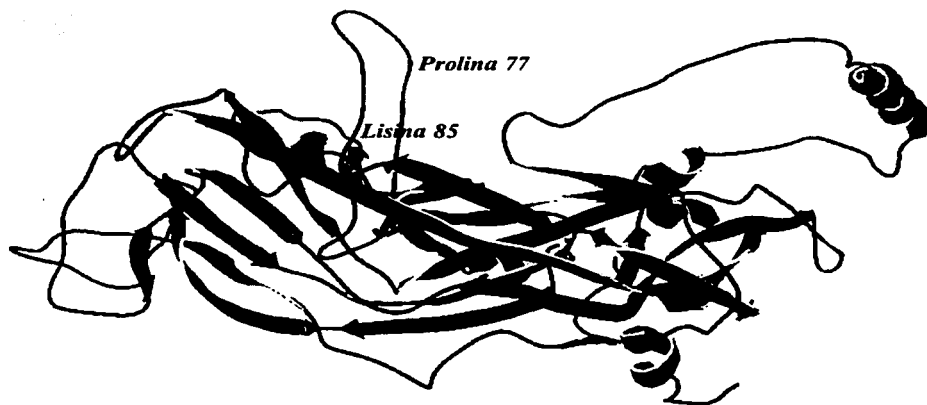
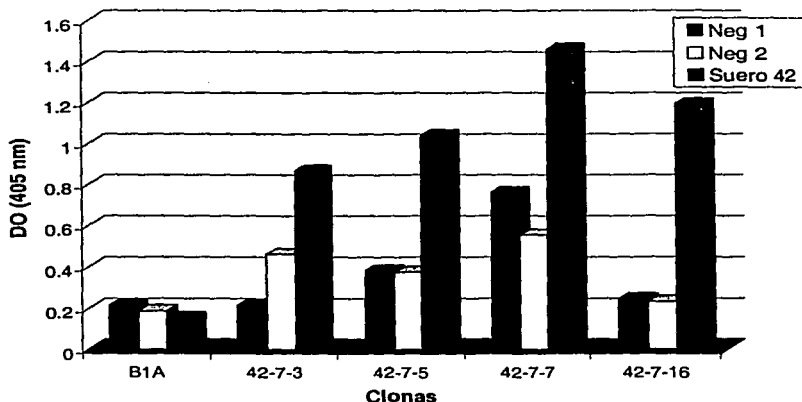


Figura 4. Modelo de un monómero de la proteína L1 del VPH-16. La estructura incluye los residuos 20-474. La secuencia de residuos de aminoácidos de la Pro 77 hasta el residuo de Lys 85 (PIKKPNNNK), forman parte de un loop que se encuentra expuesto y que anteriormente había sido reportado como un posible epítope de L1 (77). Para el desarrollo del modelo se utilizó el programa Swiss-PDB Viewer versión 3.7 (b2) de *Glaxo Wellcome Experimental Research*

6.3 EVALUACIÓN DE LA REACTIVIDAD DE LAS CLONAS

Las propiedades de unión y de reconocimiento de las clonas de fagos seleccionadas se analizaron en ELISA. Todas las clonas de fagos seleccionadas en los experimentos con el suero de la paciente 42 y la biblioteca de 7 aminoácidos se probaron primero en ELISA con el suero 42 y 2 sueros controles negativos, no infectados con VPH-16. Se analizó este grupo debido a que la mayoría de las clonas de fagos seleccionadas con el suero 42 y la biblioteca de siete aminoácidos compartían el motivo **MXXXXXXK**. Ocho de 18 clonas seleccionadas en este experimento tuvieron la misma secuencia (MPMTPAK), y las otras 11 clonas diferentes se probaron en

ELISA. Las clonas de fagos 42-7-3, 42-7-5, 42-7-7 y 42-7-16 se unieron fuertemente a los anticuerpos presentes en el suero de la paciente 42 (Tabla 2) y fueron además analizadas en ELISA con los sueros de otras pacientes infectadas también con VPH-16, así como con sueros de mujeres donadoras de sangre, VPH-16 negativas. En todos los ensayos de ELISA de fagos, la especificidad del reconocimiento fue confirmada mediante el uso de un fago no relacionado (B1A), obtenido de otro experimento. De esta forma, se excluyó el fondo de interacción del suero de la paciente con el fago y se demostró la interacción específica con el inserto peptídico de cada una de las clonas seleccionadas positivas. Así, 13 de 36 sueros de pacientes mostraron reactividad con al menos una de las clonas de fagos como se puede observar en la Tabla 5, y ninguno de estos sueros reaccionó con el fago no relacionado. Solamente 2 de 24 sueros de donadoras reaccionaron débilmente con una de las clonas positivas.



Gráfica 1. Clonas reactivas obtenidas con el suero de la paciente 42 y la biblioteca de siete aminoácidos. Se utilizó el fago B1A como control negativo y dos sueros de personas no infectadas con VPH-16 (Neg 1, Neg 2).

Las clonas de fagos con la secuencias SPINNTKPHEAR (clona 51-12-3) y MKIPNNKFLPV (clona 25-12-13) reaccionaron con 7 de 16 sueros positivos para VLPs de VPH-16 (Tabla 5) y no se observó ninguna reacción con cualquiera de los 24 sueros control.

En resumen, 16 de 36 (44%) sueros de pacientes reaccionó con al menos una clona de los fagos seleccionados durante los experimentos de bioselección, y solamente 2 de 24 sueros de donadoras mostraron reacción con las clonas seleccionadas.

Tabla 5. Reactividad de sueros de pacientes con clonas de fagos en ELISA.

SUERO	B1A	42-7-3	42-7-5	42-7-7	42-7-16	25-12-13	51-12-3
VPH 13	0.394	NR	NR	0.715	NR	NR	NR
VPH 19	0.179	NR	NR	NR	NR	0.27	0.51
VPH 20	0.213	0.479	0.398	0.482	0.385	NR	NR
VPH 24	0.2	NR	NR	1.37	1.084	0.28	1.55
VPH 25	0.21	0.29	0.24	0.3	0.16	1.46	1.34
VPH 27	0.248	1.159	0.623	0.934	0.688	0.83	0.4
VPH 42	0.205	1.496	1.187	2.026	1.698	NR	NR
VPH 51	0.23	NR	NR	0.801	0.632	0.29	0.61
VPH 56	0.090	0.447	0.225	0.120	0.139	NR	NR
VPH 72	0.367	NR	NR	0.727	0.590	NR	NR
VPH 75	0.205	NR	0.532	0.288	NR	NR	NR
VPH 76	0.21	NR	NR	0.27	NR	1.44	0.385
VPH 80	0.365	NR	NR	0.352	0.635	NR	NR
VPH 83	0.237	NR	NR	0.634	0.198	NR	NR
VPH 93	0.163	0.292	0.210	0.748	0.163	0.309	0.65
VPH 98	0.229	NR	NR	0.494	0.291	0.25	0.2

Solamente el suero que tuvo un valor de OD con al menos una clona de fago está incluido en esta tabla. Los resultados están expresados como un valor promedio de los duplicados. Los valores positivos se encuentran en negrillas. Cada suero incluido fue positivo en al menos 2 experimentos independientes. Los valores de corte fueron calculados como el promedio de los sueros negativos más 3 desviaciones estándar para cada uno de los fagos y fueron 0.38 para el fago 42-7-3; 0.34 para el fago 42-7-5; 0.4 para el fago 42-7-7; 0.2 para el fago 42-7-16; 0.61 para el fago 25-12-13 y 0.21 para el fago 51-12-3. Además, la reactividad de cada suero se consideró positiva con el correspondiente fago sí el valor era mayor que con el fago control no relacionado. NR - No Realizado.

7. DISCUSIÓN

El uso de bibliotecas de péptidos expresados en fagos filamentosos puede ser una herramienta importante en la identificación de epítomos y mimótopos específicos de la infección por VPH. Para ello se pueden utilizar sueros de pacientes, para el desarrollo de nuevos reactivos útiles en el diagnóstico de infecciones por VPH así como de lesiones cervicales precancerosas. En este estudio se usaron dos tipos de bibliotecas de péptidos: bibliotecas con insertos lineales y una biblioteca de insertos cíclicos. El enlace disulfuro entre los residuos de cisteínas restringe las conformaciones que el péptido es capaz de adoptar permitiendo una conformación que debería unirse más estrechamente que la misma secuencia expresada en una biblioteca lineal. Un inconveniente de la biblioteca cíclica es que un péptido específico puede estar restringido en una conformación no adecuada para un enlace de alta afinidad. Sin embargo, es difícil de predecir cual biblioteca producirá más ligandos para un anticuerpo, esto es por lo que usamos ambos tipos de bibliotecas.

Los sueros humanos policlonales contienen una colección de diferentes tipos de anticuerpos con un amplio rango de afinidades y especificidades. Entre estos anticuerpos, existe un grupo de anticuerpos específicos para una enfermedad y este grupo de anticuerpos específicos para la enfermedad puede hacer posible la distinción entre pacientes e individuos sanos. La búsqueda con bibliotecas de péptidos con sueros de individuos infectados con VPH-16 podrían proporcionarnos clonas que reconozcan los anticuerpos relacionados y los no relacionados con la enfermedad. Durante los experimentos de bioselección se observó el aumento del título conforme se realizan más rondas de bioselección. Esto es debido al enriquecimiento de la población de clonas capaces de unirse específicamente a los anticuerpos presentes en el suero de las pacientes

VPH-16 positivos. Una de las formas para incrementar el porcentaje de clonas específicas parece ser la sustracción de fagos no específicos que reaccionen con los anticuerpos no específicos de la enfermedad, al usar sueros de individuos sanos antes de llevar a cabo la bioselección con los sueros positivos (83). Sin embargo, previamente se intentó aplicar este procedimiento para otros experimentos con sueros humanos y no se purificó significativamente la biblioteca de fagos. Después de la segunda y tercera ronda de bioselección, las clonas de fagos fueron seleccionados al azar y sus insertos fueron secuenciados.

Posterior al análisis de las secuencias de los péptidos de las clonas, aquellas con secuencias de insertos idénticos así como alguna similitud con la proteína L1 del VPH-16 fueron seleccionadas para estudios posteriores. En un experimento con el suero de la paciente 42 y la biblioteca de heptapéptidos, se seleccionaron y secuenciaron cuatro clonas que fueron usadas para su caracterización, una de ellas no presentó ninguna similitud ni consenso con otras clonas que parecieron ser fuertemente positivas con distintos sueros de pacientes infectadas con VPH-16 (Tabla 2). La clona 42-7-3 con secuencia distinta (GKTTAAS) podría mimetizar un epítipo conformacional o lineal de alguna proteína viral.

Para prevenir la pérdida de clonas potencialmente útiles, debería ser más apropiado probar todas las clonas seleccionadas al azar con la muestra de suero usado en la bioselección, después secuenciar los insertos de todas las clonas positivas y evaluarlas en ELISA con un panel de sueros de pacientes infectadas con VPH-16 e individuos sanos. Sin embargo, esta aproximación puede ser útil en estudios donde exista suficiente cantidad de suero; en casos de sueros inmunes de

conejo o ratón. En nuestro caso, teníamos cantidades limitadas de sueros de pacientes infectadas por VPH-16 y fuimos forzados a seguir la estrategia descrita.

Es interesante hacer notar que dos secuencias de fagos seleccionadas múltiples veces, SPINNTKPHEAR (clona 51-12-3) y MKIPNNKLFLPV (clona 25-12-13), presentaron secuencias similares con una región de la proteína L1 del VPH-16, pero lo más sorprendente, es que esta región esta dentro de un loop expuesto sobre L1, como se demostró al ser evaluada con el programa Swiss-PDB Viewer versión 3.7 (b2) de *Glaxo Wellcome Experimental Research* (Figura 4), lo que apunta a esta región como un posible epítipo inmunogénico e inmunodominante de la molécula. Anteriormente, ya se había identificado esta región como un posible epítipo de la proteína L1 del VPH-16. utilizando un método de predicción e identificación de regiones inmunoreactivas (77).

La clona de fago con la secuencia de su inserto peptídico que se encontró múltiples veces, MPMTPAK (42-7-16), fue reconocida por varios sueros VPH-16 positivos. Sin embargo, este péptido no mostró ninguna similitud lineal con alguna de las proteínas virales. Esta secuencia puede representar un mimótopo de un epítipo conformacional o lineal. La conservación del motivo M(X)₅K en varias clonas seleccionadas en los experimentos de bioselección con diferentes sueros VPH-positivos indican que estos aminoácidos pueden ser cruciales para que los péptidos adquieran una estructura que se amolde al sitio de unión del antígeno de una fracción de los anticuerpos anti-VPH-16.

La identificación de los epítomos y mimótopos específicos de la infección por VPH, usando sueros de pacientes y bibliotecas de péptidos expresados en fagos filamentosos, puede ser una herramienta importante para el desarrollo de nuevos reactivos útiles en el diagnóstico de infecciones por VPH-16.

**ESTA TESIS NO SALIR
DE LA BIBLIOTECA**

8. CONCLUSIONES

- Utilizando bibliotecas de péptidos expresados en fagos filamentosos y sueros de personas infectadas con VPH-16 se obtuvieron fagos que expresan péptidos que son reconocidos por anticuerpos anti-VPH-16.
- Se identificaron posibles epítomos y/o mimótopos de alguna de las proteínas que constituyen al VPH-16.
- Se encontraron similitudes entre las secuencias de los péptidos obtenidos y la proteína L1 del VPH-16. Estas secuencias pueden representar epítomos.
- La combinación de varios epítomos específicos generados por la búsqueda con bibliotecas de péptidos expresados en fagos con sueros de pacientes, pueden potencialmente utilizarse en un ensayo diagnóstico multicomponente.

9. REFERENCIAS

1. The World Health Organization report 1995. Bridging the gaps. Geneva: WHO, 1995.
2. Secretaria de Salud, Dirección General de Epidemiología, Histopathological Registry of Malignant Neoplasia, SSA, México, 1996.
3. Pfister, H. (1987). Human papillomavirus and genital cancer. *Adv.Cancer Res.* 48: 113-147.
4. Barrasso, R., De Brux, J., Croissant, O., et al. (1987). High prevalence of papillomavirus associated to penile intraepithelial neoplasia in sexual partners of women with cervical intraepithelial neoplasia. *N. England J. Med.* 317: 916-923.
5. Bosch, X., et. al. (1995) Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J.Natl Cancer Inst.* 87: 796-802.
6. Freese, U., Schultz, P., Pfister, H. (1982). Papillomavirus-induced tumors contain a virus specific transcrip. *Virology* 117: 257-261.
7. Berumen, J., Casas, L., Segura, E., Amezcua, J. y García Carrancá, A. (1994).Genome amplification of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical carcinomas is related to the retention of E1/E2 genes. *Int. J. Cancer,* 56: 640-645.
8. Hernández-Avila, M.,Berumen, J., Lazcano, E., (1997). Human Papilloma Virus 16-18 Infection and Cervical Cancer in Mexico: A Case-Control Study. *Arch. of Med. Res.* 28: 265-271
9. Walboomers, J., Jacobs, M., Manos, M., Bosch, X., Kummer, A., Shah, K., Snijders, P., Peto, J., Meijer, C. and Muñoz N. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology,* 189:12-19.
- 10.Walboomers, J.M.M., and Meijer, C.J.L.M. (1997). Do HPV-negative cervical carcinomas exist? *J. Pathol.* 181: 253-254.
11. Dillner, J. (1999) The serological response to papillomaviruses. *Seminars in Cancer Biology,* 9:423-430. 30
- 12.Jacobs, M.V., Walboomers, J., Snidjers, P., Voorhorst, F., Verheijen, R., Fransen-Daalmeijer, N. and Meijer, C. (2000). Distribution of 37 mucosotropic HPV types in women with cytologically normal cervical smears: the age-related patterns for high-risk and low-risk types. *Int. J. Cancer.* 87: 221-227.
- 13.Evander M., Frazer, Y., Payne, E., Mei QI, Y., McMillan J. (1997). Identification of the α_2 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J. of Virology,* 71: 2449-2456.

14. Taichman, L., La Porta, R. (1987). The expression of papillomaviruses in epithelial cells. *In: The papovaviridae, New York plenum Pres.*
15. Lambert, P. (1991). Papillomavirus DNA replication. *J. Virol.* **65**: 3417-3420.
16. Lazcano-Ponce, E., Moss, S., Alonso de Ruiz, P., Salmeron, J. and Hernández, M. (1999). Cervical Cancer Screening in Developing Countries: Why is ineffective? The Case of Mexico. *Archives of Medical Research*, **30**: 240-250.
17. Hernandez, M, Lazcano-Ponce; E.C., Alonso de Ruiz, P., and Romieu, I. (1998). Evaluation of the cervical cancer screening programme in México: a population-based case-control study. *Int. Epidem. Assoc.* **27**: 370-376.
18. Hamsikova, E., Novak, J., Hofmannova, V., Munoz, N., Bosch, F.X., Sanjose, S., Shah, K., Roth, Z., Vonka, V. (1994). Presence of antibodies to seven human papillomavirus type 16-derived peptides in cervical cancer patients and healthy controls. *J. Infect. Diseases* **170**: 1424-1431.
19. Nindl, Y., Benites-Bribiesca, L., Berumen, J., Fisher, S., Gross, G., López-Carrillo, L., Müller, Vazquez-Curiel, A. y Gissmann, L. (1994). Antibodies against linear and conformational epitopes of the papillomavirus (HPV) type 16 E6 and E7 oncoproteins in sera of cervical cancer patients. *Arch. of Virology* **137**: 341-353.
20. Dillner, J., Wiklund, F., Lenner, P. et al (1995). Antibodies against linear and conformational epitopes of HPV type 16 that independently associate with incident of cervical cancer. *Int. J. Cancer* **60**: 377-382.
21. Dillner, J., Dillner, L., Utter, G., Eklund, C. (1990). Mapping of linear epitopes of human papillomavirus type 16: the L1 and L2 open reading frame. *Int. J. Cancer* **45**: 529-535.
22. Kimbauer, R., Taub, J., Greenstone, H., Roden, R., Durst, M., Gissmann, L., Lowy, D.R. and Schiller, J.T. (1993). Efficient self assembly of human papillomavirus type 16 L1-L2 into virus-like particles. *J. Virol.*, **67**: 6929-6936.
23. Coutlée, F., Mayrand, M-H., Provencher, D. and Franco, E. (1997). The future of HPV testing in clinical laboratories and applied virology research. *Clinical and Diagnostic Virology*, **8**: 123-141.
24. van Ranst, M., Tachezy, R., Delius, H., Burk, R. (1993). Taxonomy of the human papillomaviruses. *Papillomavirus Rep.* **4**: 61-65.
25. Laimonis A. Laimins, (1993). The biology of human papillomaviruses: from warts to cancer. *Infectious Agents and disease* **2**: 74-86.
26. Fields, B.N., Knipe, D.M., and Howley, P.M. (1996). *Fundamental Virology*. Lippincott-Raven Publisher, USA. pp.

27. Turek, L.P. (1994) The structure, function, and regulation of papillomaviral genes in infection and cervical cancer. *Adv Virus Res.* **44**:305-56.
28. Berg, M. and Stenlund, A. (1997). Functional interactions between papillomavirus E1 and E2 proteins. *Journal of Virology*, **71**: 3853-3863.
29. Nishimura, A., Ono, T., Ishimoto, A., Dowhanick, J., Fizel, M.A., Howley, P., and Sakai, H. (2000). Mechanisms of human papillomavirus E2-mediated repression of viral oncogene expression and cervical cancer cell growth inhibition. *J. Virol.* **74**: 3752-3760.
30. Park, T-W, Fujiwara, H. and Wright, C. (1995). Molecular biology of Cervical Cancer and its precursors. *Cancer supplement*, **76**:1902-1913.
31. Hsieh, C.H., Tsao, Y.P., Wang, C.H., Han, C.P., Chang, J.L., Lee, J.Y., and Chen, S.L. (2000). Sequence variants and functional analysis of human papillomavirus type 16 E5 gene in clinical specimens. *Arch. Virol.* **145**: 2273-2284.
32. Rapp, L. and Chen, J.J. (1998). The papillomavirus E6 proteins. *Biochimica Biophys. Acta.* **F1-F19**.
33. Munger, K., Scheffner, M., Huibregtse, J.M. and Howley, P.M. (1992). Interactions of HPV E6 and E7 with tumor suppressor gene products. *Cancer Surv.* **12**: 197-217.
34. Flores, E., Allen-Hofman, B.L., Lee, D., and Lambert, P. (2000). The human papillomavirus type 16 E7 oncogene is required for the productive stage of the viral cycle. *J. Virol.* **74**: 6622-6631.
35. Demeter, L.M., M.H. Stoler, T.R. Broker, and L.T. Chow. (1994). Induction on proliferating cell nuclear antigen in differentiated keratinocytes of human papillomavirus-infected lesions. *Hum. Pathol* **25**: 343-348.
36. Matsumoto, K., Yoshikawa, H., Yasugi, T., Nakagawa, S., Kawana, K., Nozawa, S., Hoshiai, H., Shiromizu, K., Kanda, T. and Taketani, Y. (1999). Balance of IgG subclasses toward human Papillomavirus Type 16 (HPV 16) L1 capsids is a possible predictor for the regression of HPV 16-positive cervical intraepithelial neoplasia. *Biochem. Biophys. Research Commun.*, **258**: 128-131.
37. Chen, X., Casini, G., Harrison, S. and Garcea, R. (2001). Papillomavirus capsid protein expression in *Escherichia coli*: purification and assembly of HPV 11 and HPV 16. *J. Mol. Biol.*, **307**: 173:182.
38. Kulski, J., Sadleir, J., Kelsall, S., Cicchini, M., Shellam, G., Peng, S., Qi, Y., Galloway, D., Zhou, J. and Frazer, I. (1998). Type specific and genotype cross reactive B epitopes of the L1 protein of HPV16 defined by a panel of monoclonal antibodies. *Virol.*, **243**: 275-282.

39. Wang, Z., N. Christensen, J.T. Schiller, and J. Dillner. (1997). A monoclonal antibody against human papillomavirus type 16 blocks the serological reactivity of most human sera. *J. Gen. Virol.*, **78**: 2209-2215.
40. White, W., Wilson, S., Palmer-Hill, F., Woods, R., Ghim, S-J., Hewitt, L., Goldman, M., Burke, S., Jenson, A., Koenig, B. and Suzich, J. (1999). Characterization of a major neutralizing epitope on human papillomavirus type 16 L1. *J. Virol.*, **73**: 4882-4889.
41. Christensen, N.D., Deillner, J., Eklund, C., Carter, J.J., Wipf, G.C., Reed, C.A., Cladel, N.M. and Galloway, D.A. (1996). Surface conformational and linear epitopes on HPV-16 and HPV-18 L1 virus-like particles as defined by monoclonal antibodies. *Virology*. Sep 1; **223** (1): 174-84.
42. Roden, R.B., Hubbert, N.L., Kimbauer, R., Christensen, N.D., Lowy, D.R. and Schiller, J.T. (1996). Assessment of the serological relatedness of genital human papillomavirus y hemagglutination inhibition. *J. Virol.* **70**: 3298-3301.
43. Giroglou, T., Sapp, M., Lane, C., Fligge, C., Christensen, N.D., Streeck, R.E., and Rose, R. (2001) Immunological analyses of human papillomavirus capsids. *Vaccine*. **19**: 1783-1793.
44. Kimbauer R., Taub J., Greenstone H., et al (1993). Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16, L1 and L1 plus L2 introvirus-like particles. *J. Virol.* **67**: 6923-6936.
45. Roden, R.B., Greenstone, H., Kimbauer, R., Booy, F., Jessie, J., Lowy, D.R. and Schiller, J.T. (1996) In vitro generation and type-specific neutralization of a human papillomavirus type 16 virion pseudotype. *J. Virol.*, **70**: 5875-5883.
46. Kawana, K., Matsumoto, K., Yoshikawa, H., Taketani, Y., Kawana, T., Yoshike, K. and Kanda, T. (1998). A surface immunodeterminant of Human Papillomavirus type minor capsid protein L2. *Viol.*, **245**: 353-359.
47. Roden, R.B., Yutzi IV, W.H., Fallon, R., Inglis, S., Lowy, D.R. and Schiller, J.T. (2001). Minor capsid protein of human genital human papillomavirus contains subdominant, cross-neutralizing epitopes. *Virology*. **270**: 254-257.
48. Gaukroger, J.M., Chandrachud, L.M., O'Neil, B.W., Grindaly, G.L., Knowless, G., and Campo, M.S. (1996). Vaccination of cattle with bovine papillomavirus type 4 L2 elicits the production of virus-neutralizing antibodies. *J. Gen. Virol.* **77**: 1577-1583.
49. Bernard, H.U., Chan, S.Y., Manos, M., Ong, C.K., Villa, L.L., Delius, H. (1994). Identification and assesment of known and novel human papillomavirus by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorfism, nucleotide secuence and phylogenetic algorithms. *J. Infect. Dis.* **170**: 1077-1085.
50. Lina, L. (1997). Human Papillomavirus and Cervical Cancer, in *Advances in Cancer Research*. (Vandle, G.F. and Klein, G). Volume 71, Academic Press, USA.

51. Hufton , E.E., Moerkerk, P.T., Meulemans, E.V., De Bruine, A., Arends, J.W. and Hoogenboom, H.R. (1999). Phage display cDNA repertoires: the pVI display system and its applications for the selection of immunogenic ligands. *J. Immunol. Meths.*, 1-2:39-51.
52. Makowski, L. (1993). Structural constraints on the display of foreign peptides on filamentous bacteriophages. *Gene*, 1:5-11.
53. Scott, J., and Smith, G. (1990). Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* 249: 386-390.
54. Kay, B., Winter, J. and McCafferty, J. 1996. Phage Display of peptides and proteins: a laboratory manual. Editorial Academic Press. USA. 344 pp.
55. Bhardwaj, D., Singh, S.S., Abrol, S. and Chaudhary. V.K. (1995). Monoclonal antibodies against a minor and the major coat proteins of filamentous phage M13: their application in phage display. *J. Immunol. Meths.*, 179:165-175.00.
56. Jung, S., Arndt, K. M., Müller, K. M. and Plückthun, A. (1999). Selectively infective phage (SIP) technology: scope and limitations. *Journal of Immuno. Meths.* 231:93-104.
57. Manoutcharian, A., Terrazas, L.I., Gevorkian, G., Acero, A., Petrossian, P., Rodriguez, M. and Govezensky, T. (1999). Phage-Displayed T-cell epitope grafted into immunoglobulin heavy-chain complementary-determining regions: and effective vaccine design tested in murine cysticercosis. *Infec Immun.* 67 (9): 4764-4770.
58. Demangel, C., Lafaye, P. and Mazie, J. (1996). Reproducing the immune response against the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 with mimotopes selected from a phage-displayed peptide library. *Molecular Immunology*, 33:909-916.
59. Willis, A, Perham, R. and Wraith D. (1993). Immunological properties of foreign peptides in multiple display on a filamentous bacteriophage. *Gene*, 128:79-83.
60. Delmastro, P., Meola, A., Monaci, P., Cortese, R. and Galfré G. (1997). Immunogenicity of filamentous phage displaying peptide mimotopes after oral administration. *Vaccine*, 15:1276-1285.
61. Zhang H., Zhong, Z., Pirofsky, L.A. (1997). Peptide epitopes recognized by a human anti-cytococcal glucuronoxylomannan antibody. *Infect Immunology* 65: 1158-1164.
62. Goar Gevorkian, Karen Manoutcharian, Juan Carlos Almagro, Tzipi Govezensky and Victoria Dominguez. (1998), Identification of Autoimmune Thrombocytopenic Purpura. Related Epitopes Using Phage Display Peptide Library. *Clinical Immun. and Immunopathology*.86: 305-309.

63. Karen Manoutcharian, Julio Sotelo, Esperanza García, Alberto Cano, and Goar Gevorkian (1999). Characterization of Cerebrospinal Fluid Antibody Specificities in Neurocysticercosis Using Phage Display Peptide Library. *Clinical Immunology*, **91**: 117-121.
64. Cortese, I., Tafi, R., Grimaldi, L.M.E., Martino, G., Nicosia, A., Cortese, R. (1996). Identification of peptides specific for cerebrospinal fluid antibodies in multiple sclerosis by using phage libraries. *Proc.Natl Acad.Sci. USA* **93**: 11063-11067.
65. Germaschewski, V., and Murray K. (1996). Identification of polyclonal serum specificities with phage display libraries. *J.Virol. Methods*. **58**: 21-32.
66. Iniguez, P., Zientara, S., Marault, M., Machin, I., Hannant, D. and Cruciere, C. (1998). Screening of horse polyclonal antibodies with a random peptide library displayed on phage: identification of ligands used as antigens in an ELISA test to detect the presence of antibodies to equine arteritis virus. *Journal of Virological Methods*, **73**:175-183.
67. Ferrer, M and Harrison , S. (1999). Peptide ligands to human immunodeficiency virus type 1 gp 120 identified from phage display libraries. *Journal of Virology*, **73**:5795-5802.
68. Dybwad, A., Forre, O., Natvig, J.B., Sioud, M. (1995). Structural characterization of peptides that bind synovial fluid antibodies from RA patients: a novel strategy for identification of disease-related epitopes using a random peptide library. *Clinical Immunol. Immunopathol.* **75**: 45-50.
69. Boots, L., McKenna, P., Arnold, B., Keller, P., Gorny, M., Zolla-Pasner, S., Robinson, J. and Conley, A. (1997). Anti-human Immunodeficiency virus type-1 human monoclonal antibody that bind discontinuous epitopes in the viral glycoproteins can identify mimotopes from recombinant phage peptide display libraries. *AIDS Research and Human Retroviruses*, **13**:1549-1559.
70. Felici, F., Luzzago, A., Folgori, A., Cortese, R. (1993). Mimicking of discontinuous epitopes by phage-displayed peptides. II. Selection of clones recognized by a protective monoclonal antibody against the Bordetella pertussis toxin from phage peptide libraries. *Gene* **128**: 21-27.
71. Glee, P., Pincus, S., Mc-Namer, D., Smith, M., Burritt, J. and Cutler, J. (1999) Peptide ligands that bind IgM antibodies and block interaction with antigen. *The Journal of Immunology*, **163**:826-833.
72. Keller, P., Arnold, B., Shaw, A., Tolman, R., Middlesworth, F., Bondy, S., Rusiecki, V., Koenig, S., Pazner, S., Conrad, P., Emimi, E., and Conley, A. (1993). Identification of HIV vaccine candidate peptides by screening random phage epitope libraries. *Virology*. **193**: 709-716.

73. Dente, L., Vetriani, C., Zucconi, A., Pelicci, G., Lafrancone, L., Pelicci, P.G., and Cesaren, G. (1997). Modified phage peptide libraries as a tool to study specificity of phosphorylation and recognition of tyrosine containing peptides. *J. Mol. Biol.* **269**: 694-703.
74. Wrighton, N., Farrell, F., Chang, R., Kashyap, F., Barbone, P., Mulcachy, L., Johnson, D., Barrett, R., Jolliffe, L., and Dower, W. (1996). Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin. *Science*. **273**: 458-463.
75. Cwirla, S., Balasubramanian, P., Duffin, D., Wagstrom, R., Gates, C., Singer, S., Davis, A., Tansik, R., Mattheakis, L., Boytos, C., Schatz, P., Baccarani, D., Wrighton, N., Barrett, R., and Dower, W. (1996). Peptide agonist of the thrombopoietin receptor as potent as the natural cytokine. *Science*. **276**: 1696-1699.
76. Balass, M., Heldman, Y., Cabilly, S., Givol, D., Katchalski Katzir, E., Fuchs, S. (1993). Identification of a hexapeptide that mimics a conformation dependent binding site of acetylcholine receptor by use of a phage-epitope library. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**: 10638-10642.
77. Müller, M., Gawsepohl, H., Martynoff, G., Frank, R., Brasseur, R., (1990). Identification of seroreactive regions of the human papillomavirus type 16 proteins E4, E6, E7 y L1. *J. Gen. Virol.* **71**: 2709-2717.
78. Ghosh, A., Stacey, S., Rocha, L., Smith, N., Arrand, J., and Stern, P. (1994). Development of serological assays for the detection of anti-HPV-16 E6 and E7 antibodies. In "Immunology of Human Papillomaviruses" (Ed. Stanley, M.) Plenum Press. New York. USA. p. 125-132.
79. Muller, M., Viscidi, R.P., Sun, Y., Guerrero, E., Hill, P.M., Shah, F., Bosch, F.X., Muñoz, N., Gissmann, L., Shah, K.V. (1992). Antibodies to HPV 16 E6 and E7 proteins as markers for HPV 16-associated invasive cervical cancer. *Virology*. **187**: 508-514.
80. Ghosh, A., Smith, N., Stacey, S., Glew, S. and Connor, M. (1993). Serological responses to HPV in cervical dysplasia and neoplasia: correlation of antibodies to E6 with cervical cancer. *Int. J. Cancer* **53**: 591-596.
81. Vlodav, P. and Scharff, M. (1996). Enhancement of ELISAs for screening peptides in epitope phage display libraries. *Journal of Immunological Methods*, **197**: 171-179.
82. Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, N.Y.
83. Folgori, A., Tafi, R., Meola, A., Felici, F., Galfrè, G., Cortese, R., Monaci, P., and Nicosia, A. (1994). A general strategy to identify mimotopes of pathological antigens using random peptide libraries and human sera. *EMBO J.* **13**, 2236-2243.