

00322

17

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**  
*Facultad de Ciencias*



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**“Presencia de anticuerpos en Secreciones  
Cervicales (SeCe’s) de mujeres mexicanas  
infectadas por el Virus del Papiloma Humano  
tipo 16 (VPH 16), y su relación con el resultado  
del tratamiento de lesiones de bajo grado”.**

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
B I O L O G O  
P R E S E N T A:  
BARRIOS } GARCÍA } TONATIUH

**DIRECTOR DE TESIS: Dra LETICIA ROCHA ZAVALETA**



FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCIÓN ESCOLAR

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

L



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  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

Acreditado a la Dirección General de Bibliotecas. •  
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso  
el contenido de mi trabajo recepcional

NOMBRE: Tonatiuh Barrios

FECHA: 31-Marzo-2003

FIRMA: [Signature]

**DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA**  
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Presencia de anticuerpos en Secreciones Cervicales (SeCe's) de mujeres mexicanas infectadas por el Virus del Papiloma Humano tipo 16 (VPH 16), y su relación con el resultado del tratamiento de lesiones de bajo grado".  
realizado por TONATIUH BARRIOS GARCIA

con número de cuenta 9026452-2, quien cubrió los créditos de la carrera de:  
Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis	Dra. Leticia Rocha Zavaleta
Propietario	
Propietario	Dra. Patricia Ramos Morales
Propietario	M. en C. Emilio Joaquin Córdoba Alarcón
Suplente	Dra. Goar Gevorgyan Markosian
Suplente	M. en C. Salomón Hernández Gutiérrez

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

*[Handwritten signatures and initials]*

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM.

Consejo Departamental de Biología

[Signature]  
M. en C. JUAN MANUEL RODRIGUEZ CHAVEZ



DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGIA

*[Handwritten mark]*

**El presente trabajo se realizó en el departamento de Biología Molecular y  
Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, bajo la  
dirección de la Dra. Leticia Rocha Zavaleta.**

**Dedico este trabajo a mis padres:**

**Benita García y Salvador Barrios  
por haberme  
dado la vida, pero más...  
por haberme dado una educación.**

**Agradecimientos:**

- A la Dra. Leticia Rocha Zavaleta por haberme guiado y apoyado durante todo el trabajo.
- Al Dr. Fernando Cruz Talonia y sus colaboradores por apoyarnos con el diagnóstico colposcópico y toma del material biológico.
- A Sergio Solórzano, por sus consejos que me sirvieron, y seguirán sirviendo para mejorar en cualquier ámbito laboral.
- A mis amigos de la Facultad de Ciencias: Lorena, Rosa Isela, Mónica, Erica, Azahalia, Carmen, Miriam, Eric, Alfredo, Bruno, Alejandro, Octavio, por haber compartido con ellos parte de mi vida.
- A mis amigos del laboratorio: Angeles, Guillermo, Evelin, Elizabeth, Angélica, Wendy y Valentina por compartir su amistad que “es una lluvia de flores preciosas”.

## LISTA DE CONTENIDO.

## Índice.

<b>1. Resumen.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Introducción.....</b>	<b>3</b>
2.1 Historia natural del cáncer cervicouterino.....	3
2.1.1 Lesiones precancerosas.....	3
2.2 Epidemiología del CaCu.....	4
2.3 Clasificación de los VPH's.....	4
2.4 Etiología del CaCu.....	6
2.5 Infección por VPH.....	9
2.6 Organización genómica del VPH.....	9
2.6.1 Elementos de secuencia.....	10
2.6.1.1 El ORF E1.....	10
2.6.1.2 El ORF E2.....	10
2.6.1.3 El ORF E4.....	12
2.6.1.4 El ORF E5.....	12
2.6.1.5 El ORF E6.....	13
2.6.1.6 El ORF E7.....	15
2.6.1.7 El ORF L1.....	16
2.6.1.8 El ORF L2.....	16
2.6.1.9 La Región LCR.....	18
2.7 Expresión de los genes del VPH.....	19
2.8 Integración del genoma viral al de la célula hospedera y transformación celular.....	21
2.9 Inmunidad en contra del VPH.....	22
2.10 Respuesta inmune en contra de las proteínas "E" del VPH.....	24
2.11 Respuesta de anticuerpos en contra de las proteínas "L" del VPH.....	25
2.12 Partículas pseudovirales ó VLP's.....	26
2.12.1 Uso de las VLP's del VPH para estudios serológicos.....	27
2.13 Anticuerpos IgA.....	28
2.13.1 Transporte de los anticuerpos IgA a las secreciones mucosas.....	29
2.13.2 Función de los anticuerpos sIgA.....	32
2.13.3 Neutralización intraepitelial de virus mediada por anticuerpos IgA.....	33
2.14 Métodos de diagnóstico en la infección del tracto genital por el VPH.....	34
2.14.1 Observaciones clínicas (colposcopia).....	34
2.14.2 Método citológico e histológico.....	35
2.14.3 Ensayos serológicos.....	35
2.14.4 Métodos de detección de DNA del VPH.....	36
2.14.4.1 Southern Blot.....	36
2.14.4.2 Dot Blot.....	37
2.14.4.3 Hibridación <i>in situ</i> .....	37
2.14.4.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	37

2.14.4.5 Solución de hibridación (Ensayo de Captura de Híbridos).....	38
<b>3 Justificación del Proyecto.....</b>	<b>39</b>
<b>4 Objetivos.....</b>	<b>41</b>
4.1 Objetivo general.....	41
4.2 Objetivos Particulares.....	41
<b>5 Materiales y Métodos.....</b>	<b>42</b>
5.1 Población de Estudio.....	42
5.2 Material Humano.....	42
5.3 Determinación de la Presencia de DNA del VPH por PCR.....	43
5.4 Determinación de la presencia de DNA de VPH's de alto riesgo por Captura de Híbridos (CH).....	45
5.5 VLP's.....	46
5.6 Ensayo de ELISA.....	47
5.7 Análisis estadísticos.....	48
<b>6 Resultados.....</b>	<b>50</b>
6.1 Características de la Población Humana.....	50
6.2 Presencia de DNA del VPH, de genotipos de alto riesgo en tejido cervical y presencia de anticuerpos sIgA en secreciones cervicales (SeCe's) de pacientes con y sin lesiones acetoblancas.....	53
6.3 Seguimiento clínico/colposcópico. ....	59
<b>7 Discusión.....</b>	<b>68</b>
<b>8 Conclusiones.....</b>	<b>75</b>
<b>9 Apéndice.....</b>	<b>76</b>
<b>10 Bibliografía consultada .....</b>	<b>82</b>

## LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

**Figura 1.-** Representación de la imagen microscópica del epitelio cervical mostrando la evolución de las diferentes displasias hasta llegar al cáncer invasor. (A) Evolución de la displasia a partir de un tejido cervical normal, B) Displasia moderada o NIC I, C) Displasia acentuada ó NIC II, D) NIC III, considerado como el estadio cero del cáncer, en el cual las células tumorales todavía no han invadido los otros tejidos y permanecen en el seno del revestimiento epitelial ocupándolo en su totalidad. El revestimiento está sin madurar, constituido por células atípicas irregulares que presentan en ocasiones mitosis anormales, la membrana basal permanece intacta. E) Carcinoma in situ con microinvasión y F) Cáncer invasor. La membrana basal se rompe, y las células tumorales invaden el corion, la neoplasia se extiende a los tejidos subyacente y progresivamente llega a ganglios linfáticos, dando origen a metástasis regionales (1) (Página 5).

**Figura 2.-** Las causas del cáncer cervical (151) (Página 8).

**Figura 3.-** Organización genómica del VPH 16. Tiene alrededor de 7.9 Kb y se encuentra dividido en tres regiones: la región de expresión temprana "E", la cual contiene a los genes E1, E2, E4, E5, E6 y E7, la región de expresión tardía "L", alberga a los genes L1 y L2, y por último una región no codificante ó "LCR". La expresión de los genes E6 y E7 es guiada por un promotor localizado en el nucleótido 97 (p97), el cual es regulado por el producto del gene E2 (21) (Página 11).

**Figura 4.-** Orden de eventos de la degradación de p53 dependiente de E6. La asociación del complejo E6/E6-AP precede a la asociación con p53; p53 es entonces multiubiquitinada, y es degradada por el proteosoma 26S (152) (Página 14).

**Figura 5.-** Estructura típica de las VLP's de VPH 16, expresadas en células de insecto (153) (Página 17).

**Figura 6.-** Dibujo que representa las funciones dependientes de la diferenciación de células normales e infectadas por el VPH (154) (Página 20).

**Figura 7.-** Ruta de transporte de los anticuerpos IgA poliméricos a través de las células epiteliales. pIgR = receptor polimérico de inmunoglobulinas, pIgA = anticuerpos IgA poliméricos (109) (Página 31).

**Figura 8.-** Amplificación de un fragmento de la proteína L1 del VPH usando los oligonucleótidos MY 09 y 11 (Página 44).

**Figura 9.-** Lecturas de anticuerpos sIgA en secreciones cervicales (SeCe's) de pacientes sin y con lesiones acetoblanas (Página 56).

**Tabla 1.-** Muestras biológicas negativas a la presencia de VPH por PCR, utilizadas para estandarizar el valor de corte en anticuerpos sIgA dirigidos en contra del VPH 16 (Página 49).

**Tabla 2.-** Resultados del diagnóstico colposcópico (Página 51).

**Tabla 3.-** Características de la población dividida por el diagnóstico colposcópico (Página 52).

**Tabla 4.-** Asociación de resultados entre la prueba de PCR y el Diagnóstico colposcópico (Página 54).

**Tabla 5.-** Asociación de resultados entre la prueba de Captura de Híbridos (CH) y el Diagnóstico colposcópico (Página 55).

**Tabla 6.-** Asociación de resultados entre el ensayo de ELISA y el Diagnóstico colposcópico (Página 56).

**Tabla 7.-** Asociación de resultados entre la prueba de PCR y la prueba de Captura de Híbridos (CH) (Página 58).

**Tabla 8.-** Asociación de resultados entre la prueba de PCR y el ensayo de ELISA (Página 58).

**Tabla 9.-** Asociación de resultados entre la prueba de Captura de Híbridos (CH) y el ensayo de ELISA (Página 58).

**Tabla 10.-** Seguimiento de un grupo de pacientes con lesión acetoblanca tratadas con métodos ablativos (Asa diatérmica, ó Láser) (Página 61).

**Tabla 11.-** Asociación de resultados de los métodos ablativos (asa y láser) y el ensayo de ELISA (Página 62).

**Tabla 12.-** Asociación entre las pacientes tratadas con [A] y el ensayo de ELISA (Página 65).

**Tabla 13.-** Asociación entre las pacientes tratadas con [L] y el ensayo de ELISA (Página 66).

## 1. RESUMEN

La infección del tracto genital femenino por el virus del papiloma humano (VPH) es una enfermedad sexualmente transmitida. Los tipos de VPH oncogénicos están asociados con el desarrollo del cáncer cervicouterino. Los anticuerpos de secreción sIgA son la primer defensa en la mucosa genital y se ha observado que interactúan con las proteínas de la cápside de los VPH 16, 18, y 11, pero lo más interesante es que estos anticuerpos tienen una capacidad neutralizante, y por lo tanto se les confiere una función de protección en la infección mediada por el VPH 16. En este trabajo se evaluó la presencia de anticuerpos sIgA en contra de los antígenos de la cápside viral del VPH 16 en secreciones cervicales, así como la relación de estos anticuerpos con el resultado del tratamiento de lesiones de bajo grado. Para ello, se analizaron un total de 236 muestras de secreciones cervicales provenientes de pacientes con y sin lesiones acetoblancas en el cérvix. El 54.6% de todas las pacientes generaron una respuesta humoral de anticuerpos sIgA. Sin embargo la presencia de estos anticuerpos no fue asociada con la presencia de cambios patológicos relacionados con el VPH 16 ( $P = 0.704$ ). Un análisis más exhaustivo, reveló que la presencia de este tipo de anticuerpos si se asociaba con la presencia de DNA viral ( $P = 0.001$ ), pero no con la presencia de VPH's oncogénicos ( $P = 0.890$ ). Un seguimiento colposcópico se llevó acabo para evaluar mejor el papel de estos anticuerpos en la eliminación de las lesiones acetoblancas después de emplear métodos ablativos conservadores como es el asa diatérmica y la vaporización con láser. No se observaron asociaciones significativas entre el resultado del tratamiento ablativo y la presencia de anticuerpos sIgA. En conclusión, los anticuerpos de secreción sIgA no mostraron una actividad determinante

en la eliminación de las lesiones de bajo grado en el cérvix, y sólo el tratamiento quirúrgico fue capaz de curar a las pacientes.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Historia Natural del Cáncer Cervicouterino (CaCu).

#### 2.1.1 Lesiones precancerosas.

El estudio profundo del CaCu, cuya historia natural ha podido ser reconstruida, ha permitido establecer que entre la célula normal y el cáncer suceden muchas etapas que se engloban bajo el término de lesiones precancerosas. El reconocimiento de estas lesiones constituye la condición necesaria para la detección precoz de un cáncer. Las displasias se definen por “*la pérdida de la diferenciación estructural y funcional de las células y, en consecuencia, de un tejido, relacionada con una modificación de la velocidad y en ocasiones de calidad de la división celular*” (1). Se han descrito tres grados de displasias, en función de la gravedad de la lesión: **ligeras**, **moderadas** y **acentuadas**, y están caracterizadas por un número creciente de células atípicas y por una desorganización estructural del epitelio cada vez más pronunciada (**fig. 1**) (1). La clasificación citológica de Bethesda divide estas anomalías de las células escamosas en dos categorías: lesiones escamosas intraepiteliales o SIL (de sus siglas en inglés: Squamous Intraepithelial Lesion) de bajo grado (**LSIL**) y de alto grado (**HSIL**) (2). Las anomalías celulares que no corresponden a estas categorías son clasificadas como células escamosas atípicas de significancia indeterminada (**ASCUS**, del inglés: Atypic Squamous Cells Undetermined Significance). Las LSIL incluyen lesiones precursoras llamadas neoplasia intraepitelial cervical (ó NIC I) y cambios morfológicos inducidos por el virus del papiloma humano (IVPH) (**fig. 1B**) (3). Las HSIL comprenden lesiones tales como NIC II, NIC III y carcinoma *in situ* (**fig. 1C, D y E**). En el cáncer *in situ*, considerado por algunos como el estadio cero del cáncer y por otros como la última forma de displasia antes del cáncer

verdadero, el revestimiento epitelial aparece totalmente desorganizado, pero las células tumorales permanecen en su seno. La fractura de la lámina basal sobre la que reposan las células epiteliales señala la presencia y el comienzo del llamado cáncer “*invasivo*” (fig. 1F) (1). Por lo tanto, el CaCu se desarrolla de lesiones precursoras bien definidas en la zona de transformación, referidas como NIC (4) ó SIL (5). El CaCu es la neoplasia ginecológica maligna más común en nuestro país, y la que produce mayor número de defunciones.

### *2.2 Epidemiología CaCu.*

Alrededor de 500,000 nuevos casos de carcinoma cervical y 200,000 muertes son reportados anualmente en todo el mundo (6). El 80% de los CaCu's ocurren en los países en desarrollo en donde es una de las principales causas de mortalidad en las mujeres (7). A pesar de que el CaCu puede ser diagnosticado en forma temprana a través de la prueba citológica del Papanicolaou (**Pap**) (8), persiste con una elevada incidencia y mortalidad en la República Mexicana, donde se estiman en aproximadamente 5,000 el número de muertes anuales, por lo que se considera uno de los principales problemas de salud pública en mujeres mexicanas (9), y cuya etiología esta relacionada con el virus del papiloma humano (VPH).

### *2.3 Clasificación de los VPH's.*

La morfología del virión fue elucidada con la llegada del microscopio electrónico e inicialmente el Dr. Zur Hausen estableció la asociación del VPH y el CaCu. Al principio se creía que un solo tipo de VPH se encontraba asociado al CaCu, sin embargo, en los 70's Gissman y otros demostraron la diversidad de los VPH's en humanos y animales.

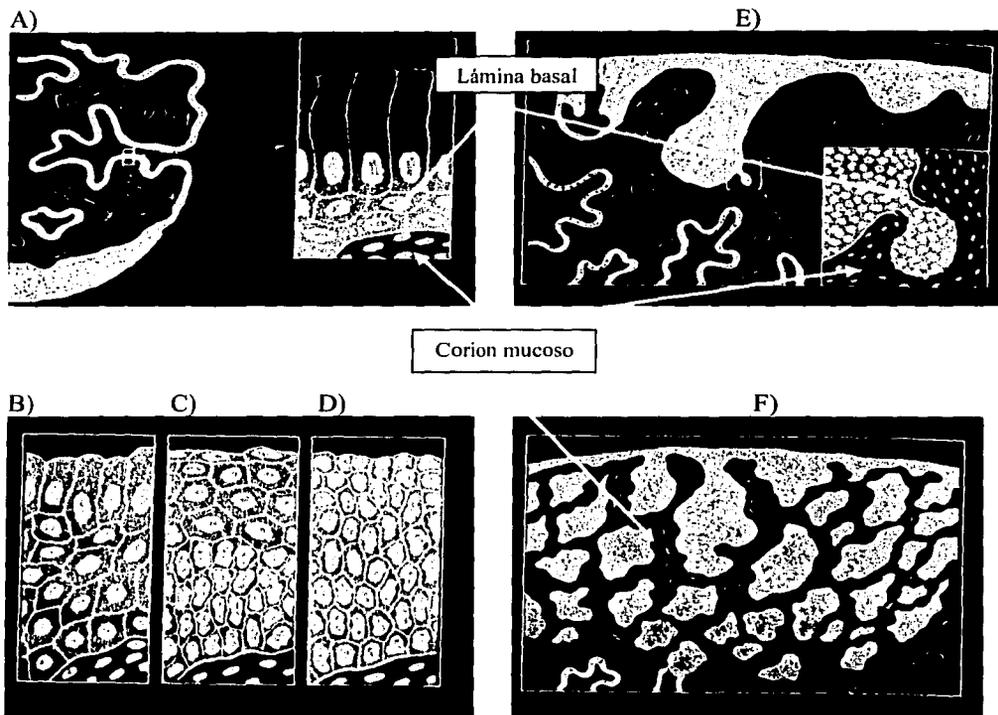


Figura.- 1. Representación de la imagen microscópica del epitelio cervical mostrando la evolución de las diferentes displasias hasta llegar al cáncer invasor. (A) Evolución de la displasia a partir de un tejido cervical normal, B) Displasia moderada o NIC I, C) Displasia acentuada ó NIC II, D) NIC III, considerado como el estadio cero del cáncer, en el cual las células tumorales todavía no han invadido los otros tejidos y permanecen en el seno del revestimiento epitelial ocupándolo en su totalidad. El revestimiento está sin madurar, constituido por células atípicas irregulares que presentan en ocasiones mitosis anormales, la membrana basal permanece intacta. E) Carcinoma in situ con microinvasión y F) Cáncer invasor. La membrana basal se rompe, y las células tumorales invaden el corion, la neoplasia se extiende a los tejidos subyacente y progresivamente llega a ganglios linfáticos, dando origen a metástasis regionales (1).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

En los últimos 30 años se han descrito más de 100 tipos de VPH's (10), los cuales son clasificados en dos grupos principales de acuerdo al sitio que infectan, y al tipo de lesión que generan (cutáneos y mucosos). La clasificación de éstos se basa en la especie de origen y en el grado de homología de los genomas (comparación de las secuencias nucleotídicas de regiones específicas del genoma), como aquellos que codifican para las proteínas E6, E7 y L1. Aproximadamente 50 tipos de VPH infectan el tracto genital, y se han clasificado como de "alto" y "bajo riesgo", dependiendo de la lesión que generan desde el punto de vista clínico.

Los VPH's de alto riesgo tales como los tipos 16, 18, 30, 31, 33, 35, 45, 50, 51, 52, 56, 58, 59 y 68 (11), están directamente asociados con el desarrollo de cáncer cervical, mientras que los virus de bajo riesgo tales como los tipos 6 y 11 son asociados con verrugas venéreas o *Condiloma acuminata* y estos raramente progresan a cáncer. Por otro lado, los VPH's asociados con lesiones en la piel son los siguientes: 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 21-25, 36, 41, 46 y 47, cuya etiología fue establecida por Ciffu, en 1907.

#### *2.4 Etiología del CaCu.*

Fue en el Laboratorio del Dr. Harald Zur Hausen en donde se clonaron los DNA's de VPH 16 y 18 a partir de tejido de carcinoma cervical (12, 13) y, usando estos DNA's como prueba, fueron capaces de demostrar que aproximadamente el 70% de los carcinomas cervicales humanos contenían DNA de estos tipos de VPH (14). Hoy día se sabe que la cifra es de alrededor del 99.7% (15). La evidencia incluye lo siguiente: (i) el DNA del VPH tiene una prevalencia del 99.7 % en cánceres cervicales (15), (ii) muchos de los tumores positivos para VPH de alto riesgo, contienen el DNA viral integrado, (iii) la vasta mayoría,

si no todas, de las biopsias cancerosas del cérvix positivas para VPH revelan transcritos específicos originados de los ORF's (del inglés: **O**pen **R**eadin**G** **F**rames) E6 y E7 del VPH (16). El principal modo de transmisión de los VPH's anogenitales es por vía sexual, evidenciado por una estrecha relación entre la detección del DNA de este virus y la actividad sexual (17).

El CaCu tiene una etiología multifactorial en la que pueden postularse dos fases, una de inducción y otra de progresión. En la fase de inducción intervienen el número de partos, número de abortos, número de parejas sexuales, infecciones adquiridas en la adolescencia, inadecuado aporte dietético, inmunodeficiencia, etc. Como agentes de progresión participarían las infecciones por VPH's de alto riesgo (11, 16, 18) (**fig. 2**). Ahora se sabe que los tipos de VPH's 16 y 18 son los principales agentes etiológicos del cáncer cervical y de sus precursores. La interacción del virus con proteínas celulares endógenas convergen en la desregulación del ciclo celular lo cual parece ser crítico en el desarrollo del los CaCu's (19, 20).

Aparte de la integración del DNA del VPH dentro del genoma de la célula hospedera, eventos y cofactores adicionales parecen jugar un papel importante en la progresión tumoral, destacando entre estos, los eventos mutacionales importantes en la patogénesis de los cánceres cervicales, que pueden agregar rearrreglos cromosomales, pérdida de heterocigocidad, y activación de genes que regulan el ciclo celular (21).

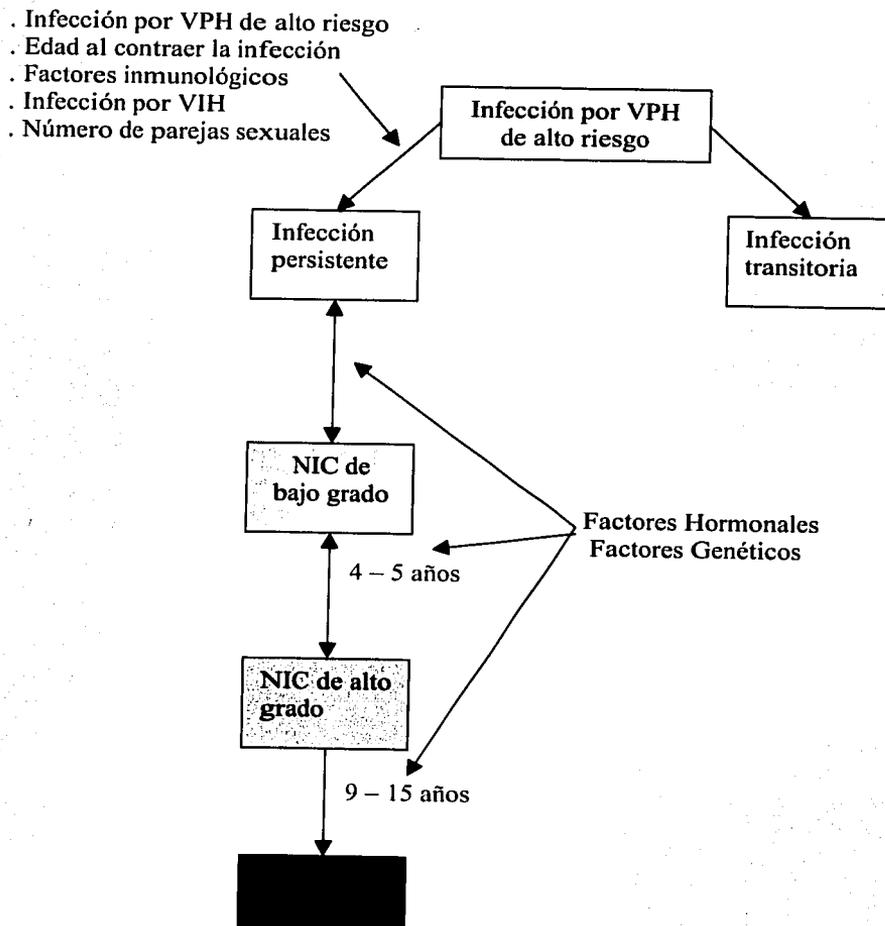


Figura.- 2 Las causas del cáncer cervical (151).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 2.5 Infección por VPH.

Los VPH's son un grupo de pequeños virus de DNA que inducen verrugas (papilomas) en una amplia gama de vertebrados superiores incluyendo al hombre. Los VPH's tienen un tropismo por las células del epitelio escamoso de la piel o de membranas mucosas, tales como el tracto genital femenino y el masculino. Las partículas virales entran por la piel ó el cérvix cuando estos presentan un trauma en la superficie epitelial, y entonces infectan los queratinocitos vía receptores de sus superficies celulares, uno de estos receptores ha sido recientemente identificado como la molécula  $\alpha_6$  - *integrina* (22). Una vez dentro de la célula hospedera, experimentan una replicación limitada en las capas celulares suprabasales del epitelio, donde las proteínas tempranas E1, E2, E4 y E5 juegan un papel importante en la replicación viral. La naturaleza viral de las verrugas ya había sido establecida anteriormente (la naturaleza infecciosa de las verrugas había sido reconocida durante varios siglos, pero su transmisión sexual no había sido firmemente establecida hasta finales de los 60's). El primer virus del papiloma fue descrito en 1933 por Richard Shope, quién reconoció al virus del papiloma del conejo cola de algodón (CRPV, del inglés: Cottontail Rabbit Papilloma Virus) como el agente etiológico responsable de la papilomatosis cutánea de este mamífero (23, 24).

### 2.6 Organización genómica del VPH.

El genoma de los VPH's tiene alrededor de 7900 pares de bases (**pb**) y se encuentra dividido en tres regiones: una región no codificante de control (**LCR** del inglés: Long Region Control), una región de expresión temprana (genes **E**, del inglés: Early), la cual

codifica seis diferentes oncoproteínas (E1, E2, E4, E5, E6 y E7), cada una de las cuales contribuye a la replicación viral. Una región de expresión tardía (genes **L**, del inglés: Late), la cual contiene a los genes que codifican para las proteínas estructurales de la cápside del virus, L1 y L2 (**fig. 3**). Las proteínas L1 y L2 son blancos potenciales para anticuerpos y consecuentemente juegan un papel importante como herramienta de diagnóstico.

### *2.6.1 Elementos de secuencia.*

#### *2.6.1.1 El ORF E1.*

Codifica para una proteína de 68-76 KD esencial para la replicación del DNA. La proteína E1 es una ATP-asa y tiene actividad de helicasa dependiente de Adenosin-Trifosfato (ATP) la cual cataliza el desenrollamiento del DNA dúplex (25, 26). También se ha visto que se une a la proteína E2, lo que fortalece la afinidad de la proteína E1 por el origen de la replicación del DNA. En VPH 16, la proteína E1 tiene efectos indirectos sobre la immortalización. Esta proteína se encuentra bien conservada entre los virus del papiloma, y contiene bloques de homología con el antígeno T grande del virus del simio tipo 40 (SV40) (27).

#### *2.6.1.2 El ORF E2.*

Codifica para una proteína de 48 KD La proteína E2 es un activador y represor de la transcripción, activa y promueve la unión de los elementos “potenciadores” de respuesta a E2. Secuencias parcialmente palindrómicas (5'-ACCN6G[GT]T-3'), son sitios de unión para dímeros de la proteína E2 en promotores de los virus del papiloma. En VPH's oncogénicos, la proteína E2 suprime al promotor p97 del tipo 16 y p105 del tipo 18, por lo tanto las proteínas E6 y E7 (transformantes) solo pueden transcribirse en ausencia de E2.

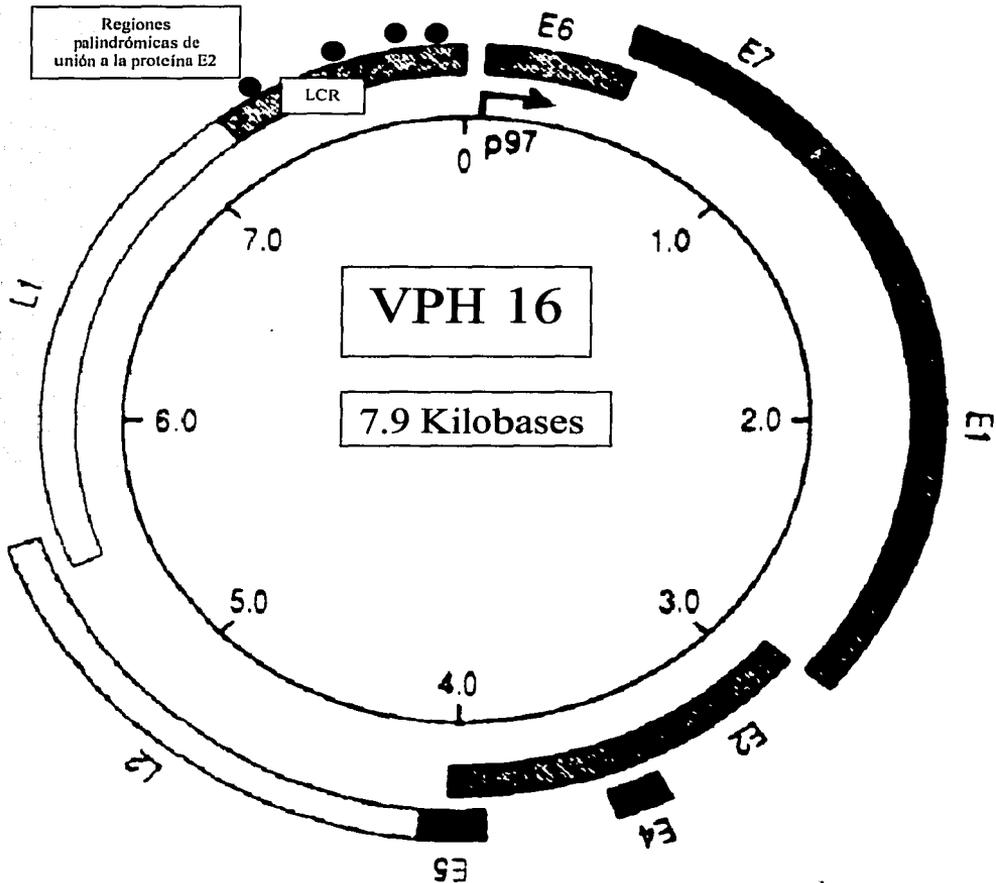


Figura.- 3 Organización genómica del VPH 16. Tiene alrededor de 7.9 Kb y se encuentra dividido en tres regiones: la región de expresión temprana "E", la cual contiene a los genes E1, E2, E4, E5, E6 y E7, la región de expresión tardía "L", alberga a los genes L1 y L2, y por último una región no codificante ó "LCR". La expresión de los genes E6 y E7 es guiada por un promotor localizado en el nucleótido 97 (p97), el cual es regulado por el producto del gene E2 (21).

Cuando el genoma del VPH se integra al cromosoma de la célula infectada, la integridad de los ORF's E1 y E2 puede perderse, como resultado, la represión de E6 y E7 puede ser afectada.

#### *2.6.1.3 El ORF E4.*

Se encuentra contenido completamente dentro del ORF E2. Carece de un codón de inicio, y es expresado a partir de transcritos empalmados. Este gene a pesar de encontrarse en la región temprana del genoma del VPH, es considerado como gene de expresión tardía (L), ya que se expresa en el epitelio diferenciado, y no es una proteína estructural (28). Sus funciones no son bien conocidas, aunque se ha visto que se asocia con los filamentos intermediarios de queratina (29, 30), así como también forma inclusiones citoplásmicas y nucleares, lo cual probablemente interfiere con la diferenciación del epitelio normal, permitiendo que el virus complete su ciclo, o alternativamente, interrumpe la integridad celular guiando a la liberación de los viriones maduros.

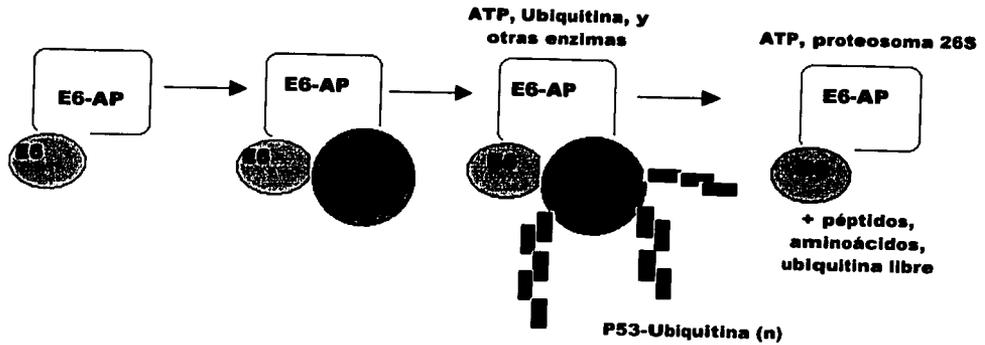
#### *2.6.1.4 El ORF E5.*

Codifica para una proteína hidrofóbica que se encuentra en los compartimientos de membrana incluyendo el aparato de Golgi. Es una proteína débilmente transformante la cual no es usualmente expresada en cánceres genitales, pero juega un papel importante en los primeros estados de transformación (31). En conjunto con E4 juega un papel importante en dirigir al virus de la superficie celular al núcleo, además se ha demostrado que inhibe la acidificación de los lisosomas (32). En algunos virus del papiloma se une y activa al receptor derivado de plaquetas (PDGF; del inglés: Plaquettes Derivated Growth Factor).

### 2.6.1.5 El ORF E6.

Codifica para una proteína de 16-19 KD presente en niveles extremadamente bajos en el núcleo y el citoplasma de células infectadas. La proteína E6 es considerada una proteína multifuncional; es un activador de la transcripción o coactivador (33, 34), por ejemplo, se conoce que transactiva heterológicamente el promotor *E2* del adenovirus (35). Además de su papel de transactivador transcripcional, E6 de VPH's de alto riesgo es conocida por su capacidad de transformar e inmortalizar células. Por el contrario, la proteína E6 de VPH's de bajo riesgo puede transactivar diversos promotores pero virtualmente no tiene capacidad transformante (36).

La proteína E6 se une a proteínas celulares, en particular a E6AP (del inglés: E6 Association Protein) y E6BP (del inglés: E6 Binding Protein) modulando por medio de esta asociación el proceso del ciclo celular. El complejo E6-E6AP puede unirse *in vitro* a p53 (37) o a E6BP (38). Además contiene cuatro motivos (sitios repetidos a lo largo de la secuencia de DNA) CXXC, que indican una unión potencial al zinc; los "dedos" de zinc relativamente largos creados por estos motivos son característicos de algunas proteínas transactivadoras de la transcripción, y E6 tiene esta capacidad. El producto del gen E6 en virus de alto riesgo afecta la actividad reguladora de la transcripción de p53 al inducir su degradación, un proceso que requiere del complejo E6-E6AP y p53 (39) (fig. 4). Los VPH's de bajo riesgo tales como los tipos 6 y 11, no tienen la capacidad de degradar a p53.



*Figura.- 4 Orden de eventos de la degradación de p53 dependiente de E6. La asociación del complejo E6/E6-AP precede a la asociación con p53; p53 es entonces multiubiquitinada, y es degradada por el proteosoma 26S (152).*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 2.6.1.6 El ORF E7.

Codifica para una proteína de 10-14 KD con funciones reguladoras de la transformación y de la transcripción similares a las que se han visto en la proteína *E1A* del adenovirus y en el antígeno T grande del SV40, funciones conferidas a las regiones conservadas CR1, CR2 y CR3, que también se presentan en la proteína E7 de VPH's. El producto del gen E7 contiene dos residuos de cisteína (CXXC) en su extremo carboxilo, capaces de formar un dedo de zinc. E7 se encuentra en el núcleo y citoplasma de la célula infectada. La proteína E7 de virus de alto riesgo se une a pRB, de esta manera modula el control del ciclo celular.

La proteína E7 del VPH 16 induce la transformación celular *in vitro* a través de su CR2 (40). Por otro lado, las proteínas E7 de virus de bajo riesgo no muestran el potencial transformante de las proteínas de VPH's de alto riesgo. Esta diferencia es altamente confinada al extremo amino de E7 (41, 42). La proteína E7 también está involucrada en el crecimiento celular e incrementa la proliferación de fibroblastos de embrión de rata (REFs) y queratinocitos humanos (HKs) (40).

La proteína E7 es un factor de transcripción nuclear regulado por fosforilación a través del ciclo celular, e interactúa con innumerables proteínas durante el desarrollo y la diferenciación celular, y juega un papel crítico en el control de la proliferación. Se ha demostrado que E7 de VPH's de alto riesgo tiene una afinidad diez veces más grande que la de VPH's de bajo riesgo por pRB (43). Esta afinidad se relaciona con su capacidad de immortalizar células (44).

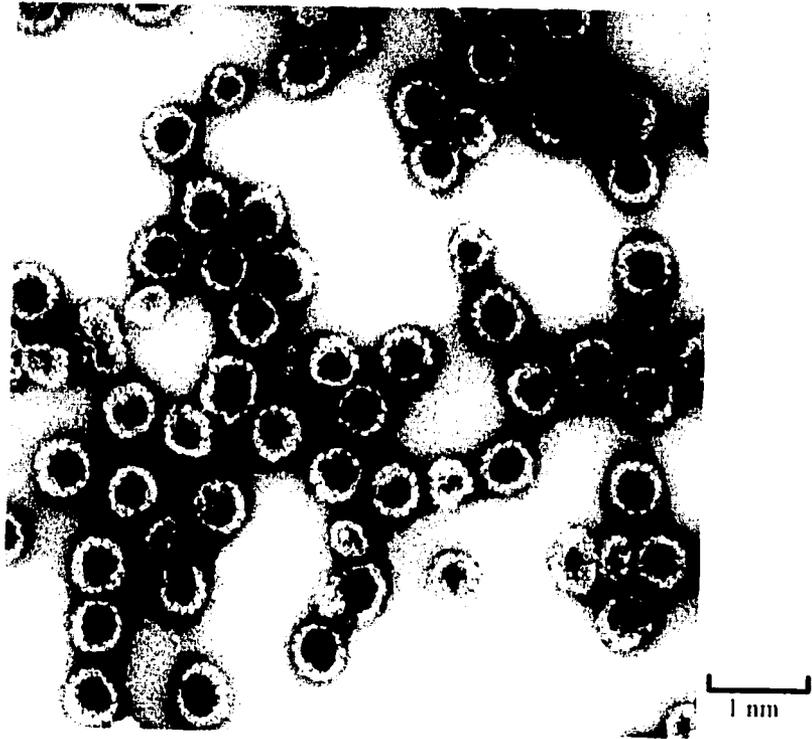
### 2.6.1.7 *El ORF L1.*

Codifica para una proteína de la cápside del VPH de 50-60 KD. L1 la proteína más antigénica de los virus del papiloma, se encuentra débilmente fosforilada y no se une al DNA. L1 puede ser glicosilada e interactuar consigo misma mediante puentes disulfuro. Es relativamente bien conservada entre los virus del papiloma, y es la molécula predominante de la cápside viral, con un radio de 30:1 con respecto a L2 (45). Una región de aminoácidos básicos cerca del extremo carboxilo de L1 del VPH 16 es importante para la localización nuclear de ésta (46). Se ha visto que el aminoácido en el residuo 202 de la L1 del VPH 16 determina el ensamble de las partículas pseudovirales (VLP's; del inglés: Virus-Like Particles) (47).

Mediante análisis de microscopía electrónica de alta resolución se determinó la similitud estructural de los virus del papiloma bovino tipo 1 y el VPH tipo 1, con un arreglo de 72 capsómeros pentaméricos, que tienen un diámetro máximo de aproximadamente 60 nm. Estos capsómeros están compuestos de cinco moléculas de L1 (48), en donde la  $\alpha$ -hélice 5 (h5) de esta proteína juega un papel importante en el ensamble de estas VLP's (49) (fig. 5).

### 2.6.1.8 *El ORF L2.*

Codifica para la proteína menor de la cápside viral de aproximadamente 49-60 KD, la cual es altamente fosforilada y se une al DNA. La proteína L2 migra en un gel como si fuera una proteína de 73 KD. No tiene la capacidad de ensamblarse sobre si misma como L1. La mayor parte de L2 esta dentro de la estructura de la cápside viral, y es requerida para encapsular el genoma (50). Por esta razón una porción muy pequeña es expuesta en la cáp-



*Figura.- 5 Estructura típica de las VLP's de VPH 16, expresadas en células de insecto (153).*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

-side, y por lo tanto es poco accesible a los anticuerpos producidos por la persona infectada (51, 52, 53). La proteína L2 se une al DNA del VPH 16; los 12 aminoácidos básicos contenidos al inicio de la proteína son importantes para esta unión (54). Similar a L1, las proteínas L2 de los virus del papiloma tienen una región de aminoácidos cerca del extremo carboxilo (46). Una secuencia altamente conservada de las proteínas L2 de VPH's en lesiones de la mucosa ha sido detectada, y se piensa que puede estar involucrada en la determinación del tropismo celular (55). Por otro lado la localización de la proteína L2 en la cápside no ha sido bien determinada.

#### *2.6.1.9 La región LCR.*

La región larga de control (del inglés: Long Control Region ó URR, del inglés: Upstream Regulatory Region), es operacionalmente definida como la región que se encuentra entre la terminación del ORF L1 y el primer residuo de metionina del ORF E6. La LCR es una región no codificante que contiene varios motivos reguladores de la transcripción y un sitio de unión a las proteínas virales E1 y E2 (56). En esta región es donde la transcripción es iniciada y controlada, debido a la interacción de factores de transcripción viral y del hospedero. La regulación coordinada de la diferenciación de las células epiteliales y la replicación viral, así como las bases de la especificidad epitelial de los VPH's, es probable que sea influenciada por los eventos que ocurren dentro de esta región. Con respecto a esto, un factor de diferenciación epitelial asociado con la transcripción de los VPH's ya ha sido identificado (57).

### 2.7 Expresión de los genes del VPH.

La transcripción y replicación del VPH están ligadas al estado de diferenciación de la célula hospedera. Los genes virales de la región temprana (genes E1, E2, E4, E5, E6 y E7) se expresan únicamente en las capas más profundas del epitelio cervical donde las células basales se dividen. Estas células no producen viriones. Sin embargo, los genes *E* también son expresados en células transformadas. En el núcleo de la célula hospedera procedente de una lesión benigna, la proteína E1 inicia la replicación de DNA viral uniéndose a la DNA polimerasa mientras que la E2 actúa como un regulador de la transcripción. Los genes E4 y E5 desempeñan un papel importante en dirigir a la partícula viral de la superficie celular al núcleo, ya que se ha demostrado que la E4 es capaz de agregar citoqueratinas, o formar estructuras como filamentos, y la proteína E5 es capaz de inhibir la acidificación de los lisosomas (34). Niveles bajos de E6 y E7 pueden asistir la replicación viral en queratinocitos terminalmente diferenciados donde la replicación del DNA está normalmente apagada. Mientras que los genes de la región tardía, L1 y L2, se expresan en las células diferenciadas que se encuentran cerca de la superficie del epitelio (7) (fig. 6). Estas células son incapaces de dividirse, y están destinadas a morir, en cambio, su localización proporciona un foco fácilmente accesible para la transmisión viral en un contacto susceptible.

DIFERENCIACIÓN

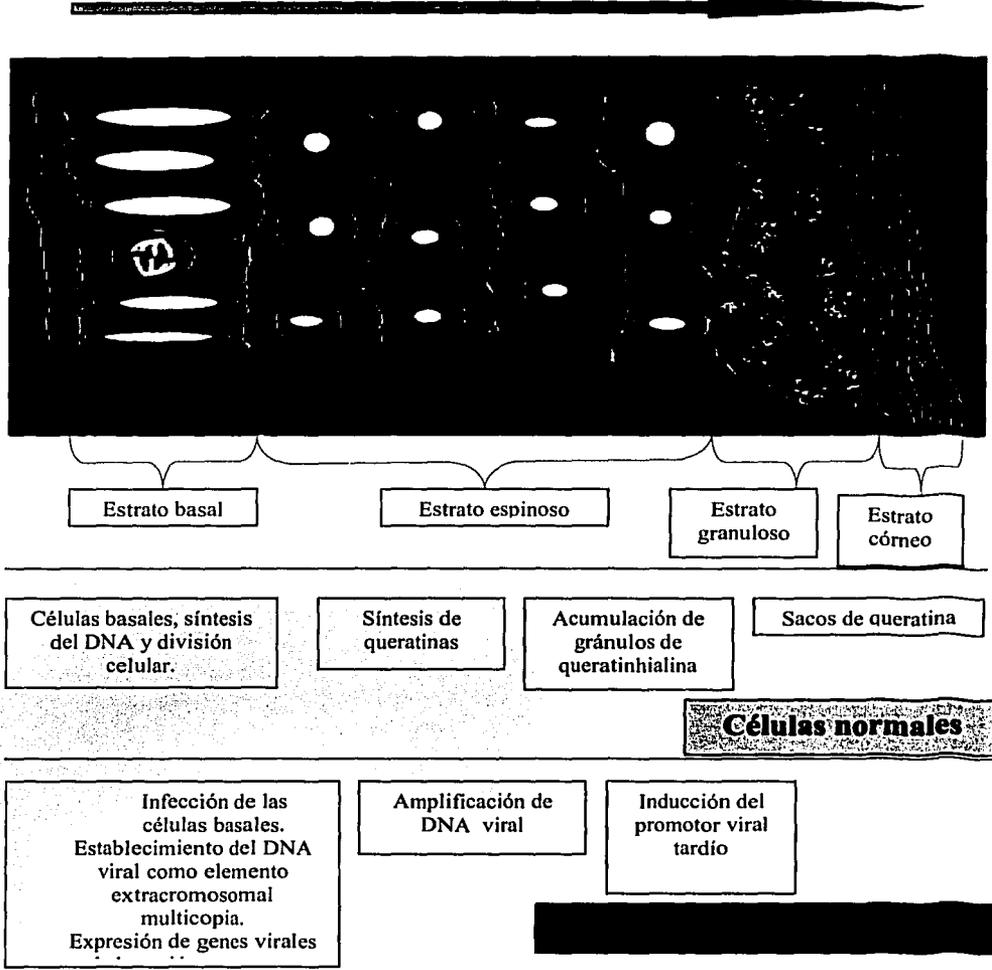


Figura.- 6 Dibujo que representa las funciones dependientes de la diferenciación de células normales e infectadas por el VPH (154).

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

### *2.8 Integración del genoma viral al de la célula hospedera y transformación celular.*

Todos los tipos de VPH's se replican en el núcleo de la célula infectada. En lesiones benignas de la piel asociadas al VPH, el genoma típicamente se encuentra separado del DNA de la célula hospedera. Las moléculas de DNA de VPH's de alto riesgo permanecen en forma episomal en lesiones de bajo grado y se replican autónomamente de los cromosomas del hospedero (58). De manera contraria, en tumores invasivos el DNA viral se encuentra frecuentemente integrado en el genoma humano (16, 59, 60). Sin embargo, evidencia reciente sugiere que el genoma viral debe permanecer extracromosomal para que la expresión de los genes tardíos ocurra (61). Cuando se realiza la integración del DNA viral con el del hospedero, el genoma circular del VPH se rompe en el ORF E2. Dado que E2 inhibe la transcripción de los genes E6 y E7, el resultado de la integración del genoma viral es la producción incontrolada de las oncoproteínas E6 y E7 (62, 63). Se ha demostrado que la integración del DNA del VPH 16 al genoma de la célula hospedera precede a la microinvasión en displasias de alto grado (60). La integración del DNA viral en el cromosoma del hospedero puede proporcionar un estado de infección latente sin replicación viral o transformación.

Debe ocurrir un rompimiento en el genoma viral para que este se pueda integrar al DNA de la célula, esta separación no ocurre de forma azarosa, ya que muchos rompimientos se han localizado en la región E1/E2 del genoma del virus (64), y son acompañados por la pérdida de la función reguladora de estos dos genes, propiciando la desregulación de la expresión de los genes E6 y E7, y resultando en la transformación celular (65). La oncoproteína E6 es requerida para la replicación viral en las células infectadas y es capaz de unirse con gran afinidad a p53 (Gen supresor de tumores)

causando la inactivación de sus funciones (arresto en la fase G1-S del ciclo celular y apoptosis) a través del mecanismo de degradación dependiente de la Ubiquitina (66, 67). Por otro lado, la oncoproteína E7 se une a la proteína del retinoblastoma (pRB) inhibiendo sus funciones y permitiendo la progresión del ciclo celular.

### *2.9 Inmunidad en contra del VPH.*

La persistencia de lesiones cutáneas y genitales inducidas por VPH son comunes, indicándonos que las infecciones pueden ser sostenidas por largos períodos sin la inducción de una respuesta inmune efectiva, pero las lesiones asociadas a VPH en individuos con inmunidad deprimida, demuestra que la respuesta inmune juega un papel importante en el control de la infección por VPH. La eliminación de algunas infecciones es mediada por la respuesta inmune celular, mientras que los anticuerpos desempeñan una función primordial en la neutralización viral. Sin embargo, algunos individuos con infecciones por VPH, no han sido capaces de eliminarlas.

Hay varios factores en el ciclo de vida de los virus del papiloma que evidencian este proceso de evasión del sistema inmune, como la exposición limitada de productos de los genes virales, ya que no hay fase virémica al inicio del ciclo de vida del VPH, así que el sistema inmune no es antigénicamente estimulado. También niveles muy bajos de proteínas virales son expresados en las capas celulares basales y espinosas de la epidermis del hospedero, donde deberían ser reconocidas por las células de Langerhans, y linfocitos infiltrantes (68, 69), así como la inadecuada presentación de algunas de estas células en el curso de la infección confirma la falta de una respuesta inmune humoral efectiva (7). Únicamente en las capas celulares terminalmente diferenciadas es donde hay una producción intensa de proteínas virales, colocando a los virus infecciosos en los límites del

epitelio externo y lejos del sistema inmune del hospedero. Esto nos indica que los VPH's han desarrollado un mecanismo para evadir la vigilancia del sistema inmune. Por lo tanto un entendimiento de este mecanismo de evasión puede ser de gran importancia en el desarrollo de una vacuna efectiva contra la infección por VPH, mientras que el conocimiento de la respuesta inmune en contra del VPH en pacientes con lesiones malignas y premalignas es importante para la selección de antígenos que induzcan una respuesta inmune exitosa.

Las células CD4 son importantes en el control de la respuesta inmune, ya que son requeridas para varias respuestas de anticuerpos, y probablemente necesarias en el desarrollo de una respuesta de células T citotóxicas. Se han encontrado en lesiones cervicales regresivas asociadas a VPH's (70, 71). Las células T citotóxicas (CD8+) (CTL, del inglés: Cytotoxic T Lymphocytes) son reconocidas como un factor clave en el control de infecciones virales intracelulares. Estas células CTL se han visto implicadas en la regresión de las lesiones causadas por los virus del papiloma en modelos animales (72) y seres humanos (73). Por esta razón, varias pruebas de vacunación en humanos han demostrado que los CTL's pueden ser inducidos en pacientes con infección por VPH (74). Además, la respuesta de las células Th1 y Th2 pueden contribuir a la eliminación completa de la infección por VPH.

Las células TH1 producen diversas citosinas, incluidas la interleucina tipo 2 (IL-2) y el interferón gama (IFN- $\gamma$ ), que promueve la proliferación y diferenciación de las CTL's. Entonces, un número incrementado de CTL's específicos en contra de los VPH's pueden ser capaces de eliminar las células infectadas. Por otro lado, las células del tipo Th2

producen IL-4 y proporcionan ayuda a las células B, guiándolas a diferenciarse en células del plasma y eventualmente producir anticuerpos en contra del VPH (7).

### *2.10 Respuesta inmune en contra de las proteínas "E" del VPH.*

Durante la integración viral y el desarrollo de la malignidad, es evidente que hay una sobrerregulación de las proteínas E6 y E7, lo cual permite que estas moléculas sean un blanco para la respuesta de anticuerpos (75). Varios trabajos en la serología del VPH, se han enfocado en las respuestas de inmunoglobulinas tipo G (IgG) con muy poca atención en subclases o isotipos importantes tales como sIgA. Sin embargo, algunos han indicado la presencia de IgA en el suero dirigidos contra genes de la región temprana del genoma del VPH, especialmente en contra de la E2 de pacientes con varios estadios de cáncer (76). Otros estudios han indicado la presencia de anticuerpos sIgA específicos para antígenos del VPH en el curso de la infección natural (77).

Hay evidencia de que animales retados con células tumorales que expresan las proteínas E1, E2, E6 y E7, pueden desarrollar una inmunidad humoral e incluso una respuesta mediada por células, la cual juega un papel importante en la regresión temprana de lesiones y erradicación de células infectadas por el virus (78, 79, 80).

Por otro lado, la facilidad de producir partículas pseudovirales (VLP's, del inglés: Virus-Like Particles) quiméricas con las proteínas E6, E7 y L1 de VPH's ya ha sido demostrada (81). Estas VLP's son capaces de inducir una respuesta de anticuerpos neutralizantes y específicos en contra de estas proteínas. Además la inmunización con este tipo de VLP's es capaz de inducir una respuesta de tipo CTL específica en contra la E7 en ratones inmunizados, protegiéndolos de un reto con células tumorales que expresan la E7 del VPH 16 (7).

### *2.11 Respuesta de anticuerpos en contra las proteínas "L" del VPH.*

Como se mencionó anteriormente, los VPH's de bajo riesgo causan verrugas genitales, mientras que los de alto riesgo están estrechamente relacionados con la etiología del cáncer cervical, por lo que varios estudios epidemiológicos han examinado los patrones de respuesta inmunológica de estos últimos tipos de VPH, midiendo la reacción serológica (82), usando como antígeno las VLP's obtenidas a través de varios sistemas eucarióticos. De esta forma se ha encontrado que un gran número de pacientes con NIC y CaCu poseen anticuerpos en contra de estas VLP's del VPH 16 (83, 84).

La mayoría de las mujeres infectadas con VPH 16, presentan anticuerpos específicos contra este virus, generalmente anticuerpos sistémicos IgA e IgG, mientras que otras subclases de IgG son ocasionalmente detectadas. La respuesta de anticuerpos IgA es tipo-específica, como se ha demostrado por su correlación con la presencia de DNA de VPH tipo-específico. Los anticuerpos IgA además se relacionan con un reciente número de parejas sexuales principalmente en mujeres jóvenes (85).

La respuesta de anticuerpos IgA puede ser un marcador de una infección reciente o activa, que puede también ser usada para medir la sensibilidad serológica de la cápside del VPH (85). Algunos datos sugieren que estos anticuerpos en contra de la cápside de VPH pueden ser un marcador pronóstico, además de ser detectables en la mucosa cervical. Los anticuerpos IgG locales también han sido detectados en secreciones cervicales (77, 86). Por otro lado, la respuesta de IgM específicos ha sido difícil de demostrar en estudios seroepidemiológicos. El transcurso típico de la respuesta de anticuerpos después de una inoculación experimental, es una respuesta rápida de anticuerpos IgM e IgA, seguida por la

rápida desaparición de la respuesta IgM, manteniéndose un decline lento de la respuesta IgA y posterior aparición de una respuesta estable de anticuerpos IgG (87).

### 2.12 Partículas pseudovirales ó VLP's.

La expresión del ORF L1 de VPH's en sistemas eucarióticos resulta en el ensamble de VLP's, sin que L2 sea requerida para la generación de pseudoviriones (88). La capacidad de las VLP's para mimetizar la estructura tridimensional de los viriones nativos las hacen atractivas para el desarrollo de una vacuna preventiva ó profiláctica y como antígeno blanco en estudios inmunológicos.

Las VLP's de los tipos de VPH's asociados a enfermedades del tracto ano-genital humano, ya se han producido en una gran variedad de sistemas de expresión, tales como: células de insecto (88, 89), levaduras (90, 91), y *Escherichia Coli* (49, 92). Una ventaja de las VLP's para el desarrollo de una vacuna profiláctica, es que no contienen el genoma viral, y por lo tanto los individuos vacunados no serán expuestos a los oncogenes virales. La eficacia de este tipo de vacuna ya ha sido demostrada en varios modelos animales; conejos (93, 94, 95), perros y monos (96). Altos títulos de anticuerpos son detectados en estos modelos animales, y la protección es transferible con el suero (97, 98).

La L1 del VPH tipo 16 presenta epítopes inmunodominantes y neutralizantes que pueden ser útiles en la caracterización de respuestas inmunes en muestras de suero de individuos vacunados y expuestos naturalmente al VPH, así como también pueden proporcionar un conocimiento más profundo de las relaciones función-estructura del virus (99). Las VLP's no solo tienen la capacidad de inducir anticuerpos neutralizantes, también pueden inducir inmunidad mediada por células (100). Las infecciones no líticas son usualmente blancos de respuestas inmunes celulares.

En el caso del VPH, las células epiteliales (queratinocitos), en el estado no inflamado son células presentadoras de antígenos no profesionales (101), así que los antígenos deben ser liberados por los nódulos linfáticos locales mediante células dendríticas locales (células de Langerhans) para iniciar una respuesta inmune innata. Al parecer, las células de Langerhans presentan los antígenos en desechos celulares como proteínas activamente secretadas (102). De esta forma una de las respuestas inmunes es invocada, ya que el sistema innato mantiene y promueve la respuesta adaptativa en el sitio local, así como remueve desechos de una infección reincidente.

#### *2.12.1 Uso de las VLP's del VPH para estudios serológicos.*

Un ensayo serológico basado en las cápsides del VPH16 que se correlaciona con la detección tipo-específica de infección por VPH, determinada por la detección del genoma viral fue establecido en 1994 por el Dr. Kirnbauer R. La respuesta de anticuerpos en suero humano en contra de las cápsides intactas del VPH tipo 16 puede ser bloqueada con un anticuerpo monoclonal llamado V5. Esta propiedad nos indica la existencia de un epítoto tipo-específico sobre la cápside del VPH, el cual puede ser usado para confirmar una respuesta de anticuerpos contra VPH tipo-específica (103).

El ensayo Inmunoabsorbente Ligado a una Enzima (de sus siglas en inglés: ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (ver sección 4.9) es un método que se utiliza para determinar la presencia de anticuerpos dirigidos en contra de un antígeno de interés. Al respecto, varios estudios han usado las VLP's como inmunógenos en varios modelos animales (93, 95, 97, 98), incluyendo al hombre (104), y se ha visto que generan anticuerpos neutralizantes y que además son capaces de proteger en contra de un reto viral. Tales anticuerpos reconocen epítopes conformacionales tanto de los viriones nativos como

de las VLP's (105, 106, 107), lo cual nos quiere decir que esta respuesta de anticuerpos es tipo específica (7) y en dónde la proteína L1 de la cápside juega el papel predominante en producir la respuesta de anticuerpos. Sin embargo, también hay evidencia de que la proteína menor de la cápside L2 puede estar parcialmente involucrada en la neutralización del virus (51, 108).

### *2.13 Anticuerpos IgA.*

La respuesta inmune en las membranas mucosas es mediada por mecanismos inmunológicos no específicos y específicos. Los mecanismos no específicos pueden variar de un lugar anatómico a otro. En las secreciones de membranas mucosas, el moco actúa como una barrera fisicoquímica y como una matriz viscosa en donde los agentes patógenos pueden ser atrapados. Los mecanismos inmunológicos específicos en contra de los agentes patógenos incluyen una respuesta celular (mediada por linfocitos T) y una respuesta de tipo humoral (mediada por anticuerpos). Hay varios tipos de inmunoglobulinas, y todas tienen oportunidad de interactuar con los antígenos. Los anticuerpos IgM muestran características similares con los anticuerpos IgA, ya que ambos son poliméricos (IgM es pentamérico, mientras que IgA es dimérico) y pueden unirse al receptor polimérico de inmunoglobulinas (pIgR), el cual transporta los anticuerpos IgM con menos selectividad que a los anticuerpos IgA (109) a través de las células del epitelio mucoso. Los anticuerpos IgG son principalmente sistémicos, son secretados en gran cantidad por el tejido linfoide sistémico y generalmente presentan una estructura monomérica. También son secretados por una minoría de células plasmáticas mucosas. No hay un mecanismo de transporte selectivo para que estos anticuerpos puedan alcanzar las secreciones mucosas. La inflamación local o daño a la envoltura epitelial, es una oportunidad para que estos anticuerpos entren por

difusión. Por otro lado, los anticuerpos IgE se encuentran en una baja concentración en el tejido mucoso. Son producidos en gran cantidad por el tejido linfoide mucoso en comparación con los tejidos linfoides sistémicos, y células del tallo, las cuales son numerosas en el tejido conectivo mucoso que además tienen receptores de alta afinidad para estos anticuerpos. Estos anticuerpos son los responsables en disparar una inflamación alérgica. Las células mucosas del plasma tienden a fabricar anticuerpos de la clase IgA, y son más abundantes en los tejidos mucosos. La gran mayoría de anticuerpos IgA es producido localmente en las membranas mucosas y son destinados a entrar en las secreciones mucosas (109).

#### *2.13.1 Transporte de los anticuerpos IgA a las secreciones mucosas.*

Los anticuerpos IgA son secretados como dímeros por las células del plasma, consistiendo en dos subunidades de inmunoglobulina convencionales, cada una con dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas polipéptido ligeras (L), y una cadena de unión (J) entre las dos subunidades. Estos dímeros de IgA son capaces de unirse al pIgR que se encuentra en la superficie de la célula epitelial en la línea de la membrana mucosa (109).

El pIgR es una proteína transmembranal con un dominio externo de unión a IgA, un dominio intermembranoso, y un dominio citoplásmico que contiene señales de salida. Estas señales dirigen al pIgR a la superficie de la célula epitelial, donde tiene la oportunidad de unirse al anticuerpo IgA dimérico que es secretado por las células plasmáticas locales. El complejo IgA-pIgR es endocitado, y otras señales de salida causan que sea transcitosado en vesículas a la superficie apical. En la superficie apical un rompimiento proteolítico separa al dominio externo del pIgR (ahora llamado componente secretorio) liberando al complejo

IgA dimérico-componente secretorio, conocido como IgA secretorio o exócrino (sIgA), dentro de las secreciones mucosas (109).

En la figura 7 se pueden observar los diferentes niveles en los cuales los anticuerpos IgA son transportados a través de las células del epitelio mucoso. Las células plasmáticas en la lámina propia de una membrana mucosa secretan anticuerpos IgA poliméricos (pIgA), el cual se une a su receptor, pIgR, en la superficie basolateral de la célula epitelial. El complejo es endocitado y transcitosado en vesículas hacia la superficie apical, en donde el receptor pIgR se rompe, liberando al anticuerpo IgA secretorio hacia el lumen. Los antígenos en la lámina propia se pueden unir al anticuerpo IgA y pueden ser excretados como complejos inmunes a través del epitelio por las mismas rutas como los anticuerpos IgA libres. Los virus que infectan una célula epitelial pueden potencialmente ser neutralizados intracelularmente si los anticuerpos IgA transitorios son capaces de unirse al componente viral e interferir con la síntesis o ensamble del virus. En el esquema hipotético que se muestra, las proteínas de la cubierta viral fueron sintetizadas en el retículo endoplásmico rugoso, procesadas en el aparato de Golgi y transportadas en vesículas hacia el endosoma apical de reciclaje el cual contiene anticuerpos antivirales IgA transitorios, los cuales potencialmente son capaces de interrumpir el ensamble del virus. Un último nivel de acción para los anticuerpos IgA secretorios, se encuentra en el lumen, en donde se unen a los antígenos, proporcionando una barrera de exclusión inmune que inhibe el acceso al epitelio (109).

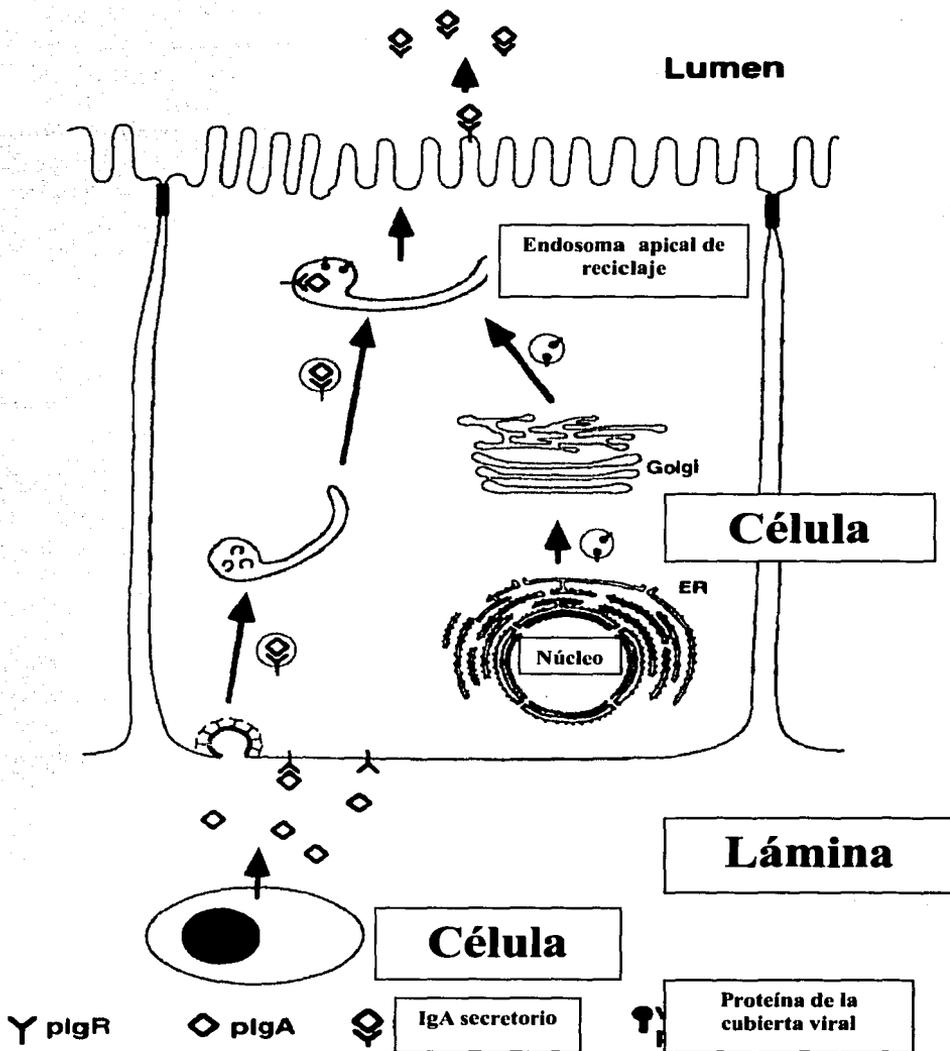


Figura.- 7 Ruta de transporte de los anticuerpos IgA poliméricos a través de las células epiteliales. pIgR = receptor polimérico de inmunoglobulinas, pIgA = anticuerpos IgA poliméricos (109).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 2.13.2 Función de los anticuerpos sIgA

Una vez en las secreciones, los anticuerpos sIgA pueden unirse a los antígenos, y pueden ayudar a prevenir que estos se unan o penetren la superficie mucosa. La función de barrera inmune de los anticuerpos sIgA ha sido inferida de relaciones entre el contenido de anticuerpos IgA en secreciones mucosas y la resistencia a la infección por una variedad de microbios, especialmente virus (101-113). Tales relaciones se deben a estudios clínicos, después de una inmunización en experimentos con animales. Otros estudios han mostrado que una vacunación oral guía a la producción de anticuerpos sIgA que bloquean infecciones mucosas primarias (112). Esta respuesta prominente de anticuerpos sIgA representa una diferencia principal en comparación con una respuesta de anticuerpos inducidos por una inmunización parental. Otro ejemplo de la función de estos anticuerpos es la protección pasiva en contra de una infección proporcionada a través de la leche materna a los infantes, donde hay evidencia de que el principal mediador son los anticuerpos IgA (114).

Un número reciente de estudios han demostrado que diversos modelos animales contienen anticuerpos IgA monoclonales pasivos como su único reactante inmunoespecífico en contra de una gran variedad de virus (Sendai, influenza, sincial respiratorio) y bacterias (*Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Vibrio cholerae*, *Chlamydia trachomatis*, *Helicobacter felis*) que afectan diferentes mucosas (115-116). Estos estudios con anticuerpos monoclonales colectivamente ilustran el potencial protector de una respuesta de anticuerpos IgA. Bajo condiciones naturales una respuesta inmune en mucosa debe ser policlonal con anticuerpos dirigidos a determinantes antigénicas, más que a una sola determinante, y consecuentemente debería aún ser más efectiva (105).

### 2.13.3 Neutralización intraepitelial de virus mediada por anticuerpos IgA.

Se cree que los anticuerpos funcionan como defensa en contra de los patógenos combinándose con ellos extracelularmente. Una vez que el patógeno ha entrado a su célula blanco, se considera que es inaccesible a la acción de los anticuerpos. La inmunidad mediada por células, la cual no es efectiva en contra de patógenos extracelulares, es crucial para combatir infecciones intracelulares. Hay evidencia que sugiere una infección de los tejidos mucosos por patógenos intracelulares tales como virus puede ofrecer una excepción a la regla antes mencionada, ya que los anticuerpos IgA transitan a través de las células epiteliales, y pueden tener contacto con los antígenos de un virus el cual infecta a la misma célula. En este contexto, hay evidencia en modelos animales en donde se ha observado la neutralización intracelular de virus medida por anticuerpos IgA *in vitro* e *in vivo* (109). En ambos experimentos de neutralización intracelular, se encontró que los anticuerpos para diferentes componentes de un virus dado, tenían diferentes grados de efectividad. Esto podría reflejar reactividad hacia epítopes que intrínsecamente son más o menos neutralizantes. En teoría, la neutralización intracelular de virus por anticuerpos IgA puede ser mediada en un número de estados del ciclo de vida viral, incluyendo el punto de entrada del virus a la célula, desvoltura, replicación, tránsito de componentes nuevamente sintetizados a través de diferentes compartimentos subcelulares, ensamble y liberación (109). El sitio exacto de neutralización del virus mediada por anticuerpos IgA no ha sido determinado. Sin embargo, datos preliminares de microscopía inmunoelectrónica indican que los anticuerpos IgA y proteínas de la cubierta viral interactúan dentro de las vesículas (109). De esta forma, las dos principales funciones de defensa de los anticuerpos IgA, la barrera de exclusión inmune en el lumen, y la neutralización intraepitelial celular, deben

proporcionar resistencia a una infección viral. Estudios en inmunidad pasiva por clases de anticuerpos individuales, en el contexto de inmunidad de la mucosa, se han enfocado generalmente en anticuerpos IgA. Ya que estos anticuerpos normalmente predominan en las secreciones mucosas y pueden ser más efectivos que otras clases.

#### *2.14 Métodos de diagnóstico en la infección del tracto genital por el VPH.*

Aunque las lesiones ano-genitales son visibles en algunas personas infectadas, la mayoría de los individuos con una infección en el tracto genital causada por el VPH no muestran lesión clínica aparente. En la ausencia de manifestaciones clínicas, los signos de la infección por el VPH pueden ser difíciles de detectar. Varias de las técnicas utilizadas en el diagnóstico de otras infecciones virales no han sido apropiadamente aplicadas al VPH. En particular, este virus no puede ser cultivado *in vitro*, probablemente porque las células diferenciadas son necesarias para una infección productiva. Por lo tanto, las lesiones clínicas aparentes y alteraciones citológicas permanecerán como los criterios más frecuentemente usados para el diagnóstico de la infección por el VPH.

##### *2.14.1 Observaciones clínicas (colposcopia).*

La visualización directa de lesiones vaginales y del cérvix es llevada a cabo por un estudio colposcópico, el cual también permite evaluar el grado de la lesión. Esta técnica tiene una sensibilidad de detección moderada, ya que las lesiones acetoblancas no son únicas para la infección mediada por el VPH, y por lo tanto tiene una especificidad de diagnóstico baja. Las lesiones condilomatosas más allá del área acetoblanca pueden ser erradas, o pueden ser falsos positivos (124), por esta razón debe utilizarse en conjunto con otros métodos de diagnóstico más sensibles, tales como el PCR y la captura de híbridos.

#### *2.14.2 Método citológico e histológico.*

El método más común para pruebas citológicas son los raspados celulares para el Papanicolaou (Pap), en el cual las células genitales exfoliadas son teñidas y examinadas por sus características de koilocitosis y neoplasia. Las células koilocíticas son consideradas parte de un espectro de LSIL (ó NIC1). Aunque la apariencia de koilocitosis es virtualmente un diagnóstico de infección del tracto genital asociada al VPH, varios tejidos infectados por el VPH, particularmente aquellos con infecciones latentes, no muestran señales de células koilocíticas. Aunque la especificidad de la prueba del Pap es del 90%, su sensibilidad es pobre, ya que alrededor del 15-50% de los pacientes con infección por VPH son exitosamente identificados por esta prueba (124).

#### *2.14.3 Ensayos serológicos.*

Aunque el ensayo de ELISA para detectar la infección por el VPH está disponible, no ha logrado detectar exitosamente otros patógenos virales. En particular, esta prueba no es específica y también tiene una sensibilidad baja para ser usada como una herramienta de diagnóstico en la infección por el VPH. Un parámetro serológico que puede ser útil en el seguimiento de la infección por el VPH, es la seroreactividad a las proteínas E6 y E7 de los tipos de VPH oncogénicos. En un estudio se analizó la seroreactividad en contra de estas proteínas, y se encontró que los títulos de anticuerpos hacia estas proteínas se relacionaba con el curso clínico del cáncer cervical invasivo (124). Esta técnica puede proporcionar importante información pronóstica en pacientes con una prueba de Pap anormal.

#### *2.14.4 Métodos de detección de DNA del VPH.*

Las pruebas que detectan la presencia de DNA del VPH han proporcionado información epidemiológica clave y patogénica relacionada a la infección por este virus, y además son una herramienta de investigación muy importantes. Los métodos de detección de DNA juegan un papel importante en el diagnóstico de pacientes cuya prueba del Pap muestra ASCUS. Los ensayos de detección de DNA del VPH aún no son practicados en los diagnósticos de rutina, en parte porque requieren una labor intensiva y costosa. Varios tipos de ensayos están disponibles, cada uno de estos con sus propias ventajas y limitaciones. Un paso clave en estos métodos de detección de DNA de VPH, es una reacción de hibridación en el cual el DNA del virus se une a un fragmento de DNA sintético. Los ensayos varían con respecto a la preparación de las células que sirven como origen del DNA, a la preparación del DNA sintético, y a la forma de la prueba usada (124). Algunos de los ensayos más comúnmente usados para la detección de DNA del VPH son mencionados a continuación.

##### *2.14.4.1 Southern Blot.*

En este ensayo, el DNA es aislado de la muestra de células y digerido con enzimas de restricción. Los fragmentos de DNA resultantes son separados por electroforesis en geles de agarosa y transferidos a papel de nitrocelulosa. Usando sondas que se unen específicamente al tipo de DNA de VPH dado, el tipo de VPH presente en la muestra puede ser determinado (124).

#### *2.14.4.2 Dot Blot.*

Este tipo de ensayos usan varios de los principios empleados por el ensayo del Southern blot, pero técnicamente más simple. En el Dot blot, el DNA es extraído de las células, se desnaturaliza, y se aplica directamente a un filtro de nitrocelulosa sin ser digerido con enzimas de restricción o corrido en un gel de electroforesis. Como en el Southern blot, el filtro es hibridado con una sonda, es lavado, y examinado mediante autoradiografía (124).

#### *2.14.4.3 Hibridación in situ.*

Estos ensayos son utilizados en material histológico que ha sido fijado en portaobjetos especialmente tratados. Las células son tratadas con sustancias que incrementan la permeabilidad, y un álcali o calor es usado para desnaturalizar el DNA. La sonda es entonces hibridada, la muestra es lavada, y las señales positivas son visualizadas por autoradiografía o por métodos de detección enzimática. Esta técnica tiene la ventaja de revelar de una manera específica las células infectadas por el VPH o regiones de tejido. Este ensayo es menos sensible que los Southern blots o que los Dot blots, y puede solamente detectar infecciones virales expresadas; infecciones latentes no contienen suficiente DNA del VPH para dar una señal positiva (124).

#### *2.14.4.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).*

La reacción en cadena de la polimerasa tiene la ventaja de ser capaz de detectar cantidades muy pequeñas de DNA del VPH. En este procedimiento, dos pequeños oligonucleótidos correspondientes a secuencias específicas de VPH son hibridados con el DNA desnaturalizado aislado de las muestras de interfase. Después de que la reacción es

completada, los ciclos de desnaturalización, los de hibridación, y extensión del oligonucleótido comienzan otra vez. Los ciclos secuenciales, resultan en la amplificación del DNA originalmente reconocido por los oligonucleótidos. En una buena reacción, 30 ciclos de este procedimiento producen alrededor de 1, 000, 000 de copias del DNA original. La principal ventaja de este tipo de ensayo, es que tiene una excelente sensibilidad (124) (ver sección 5.3).

#### *2.14.4.5 Solución de hibridación (Ensayo de Captura de Híbridos).*

En este ensayo, el DNA es aislado, desnaturalizado e hibridado con una sonda de RNA de una sola hebra. Los híbridos son retirados de la solución e inmovilizados con anticuerpos específicos que reaccionan con un sustrato luminiscente, el cual emite luz que puede ser medida mediante un luminómetro. Este sistema es capaz de proporcionar datos cuantitativos de la cantidad de DNA del VPH presente en la muestra. Este sistema puede detectar más de 16 tipos diferentes de VPH (124) (ver sección 5.4).

### 3. JUSTIFICACIÓN.

La importancia del sistema inmune en la eliminación de la infección por VPH juega un papel determinante, ya que hay mujeres que revierten espontáneamente esta infección. Sin embargo, no se han determinado los factores que intervienen en este proceso. En el intento de elucidar algunos de estos factores, varios estudios han detectado niveles de anticuerpos relacionados con los estadios de la infección por este virus, incluso se han detectado en pacientes en las cuales la infección ya ha desaparecido, lo cual indica que estos anticuerpos sirven como marcadores de la presencia del DNA del VPH en el epitelio cervical, lo cual puede representar infecciones latentes. En este contexto, los anticuerpos del tipo sIgA se han asociado con un reciente número de parejas sexuales así como de infecciones recientes. Esta respuesta inmunológica se ha visto que no es biológicamente estable en el tiempo, como lo es la respuesta de anticuerpos del tipo IgG, que los hace buenos marcadores de infecciones pasadas y persistentes. Sin embargo, otras líneas de trabajo han medido la capacidad neutralizante de los anticuerpos de secreción IgA, utilizando como antígeno partículas pseudovirales o VLP's de varios tipos de VPH's incluido el tipo 16, las cuales son producidas en sistemas procarióticos y eucarióticos, y su eficacia ya ha sido probada en varios modelos animales, incluido el hombre, ya que no solo tienen la capacidad de inducir una respuesta de anticuerpos, sino que también generan inmunidad mediada por células. Otros estudios, han tratado de medir que tipo de respuesta de anticuerpos está involucrada en la eliminación del virus, y han llegado a la conclusión de que ambas respuestas serológicas (sIgA e IgG) son necesarias para conferir protección en contra del VPH. Por otro lado se ha establecido que la respuesta mediada por células también juega un papel muy importante en la eliminación del virus. En el presente trabajo se estudió la presencia de anticuerpos del tipo sIgA en secreciones cervicales de pacientes con y sin evidencia

colposcópica de VPH. Se investigó si existe una relación entre la presencia de tales anticuerpos y la detección del virus por métodos colposcópicos y moleculares (PCR y Captura de Híbridos). Así mismo se realizó un seguimiento clínico de pacientes con lesiones asociadas a este virus, que fueron tratadas quirúrgicamente antes del seguimiento y se analizó si la presencia de estos anticuerpos antes del tratamiento influían en el resultado del mismo. Si el transcurso típico de una respuesta inmune después de una inoculación experimental, la respuesta de sIgA es la primer línea de defensa en las superficies de los epitelios mucosos, entonces se espera que jueguen un papel determinante en la neutralización del VPH, y eliminación de lesiones de bajo grado, ya que son comúnmente encontrados en mujeres infectadas.

## 4. OBJETIVOS.

### 4.1 *Objetivo general.*

- Estudiar la presencia de anticuerpos del tipo sIgA asociada a la infección por el virus de papiloma humano tipo 16 (VPH 16).

### 4.2 *Objetivos particulares.*

- Determinar la presencia de VPH en biopsias de tejido cervical de pacientes con LSIL.
- Analizar la presencia de VPH de alto riesgo en biopsias de tejido cervical de pacientes con LSIL.
- Estandarizar una prueba de ELISA para la detección de anticuerpos en secreciones cervicales (SeCe) de pacientes con un diagnóstico colposcópico de infección por el virus del papiloma humano (IVPH) y de NIC.
- Estudiar la presencia de anticuerpos del tipo sIgA en secreciones cervicales de pacientes con LSIL.
- Relacionar la presencia de anticuerpos sIgA en contra del VPH 16 con el resultado del tratamiento ablativo en lesiones LSIL.
- Evaluar la eficacia del método Colposcópico en la detección de VPH's de alto riesgo asociados a lesiones acetoblancas.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 5.1 Población de estudio.

El material humano utilizado en este trabajo (*Secreciones Cervicales [SeCe's]* y *biopsias de tejido cervical*) fue obtenido de pacientes atendidas en el Centro Nacional de Clínicas de Displasias (CENACLID) del Hospital General de México. Todas las pacientes fueron analizadas por colposcopia. Lo que se observó después de la aplicación de una solución de ácido acético al 15% y con la ayuda de un colposcopio tipo Zeiss OPMI-1 (Carls Zeiss Incorporation, Oberkochen, Alemania), fueron las zonas del epitelio cervical infectado por VPH denotado por una mancha acetoblanca (de acuerdo con la Federación Internacional de Colposcopia y Patología Cervical). Las características de estas zonas (color, transparencia, contorno y presencia de vasos sanguíneos) fueron claves para determinar el tipo de lesión que se presentaba. A cada paciente se le practicó un cuestionario para poder asociar factores de riesgo alternos en el desarrollo del CaCu. Un grupo de pacientes sin presencia de VPH por colposcopia, PCR y ELISA, fueron utilizadas como grupo control.

### 5.2 Material humano.

Las muestras de *SeCe* fueron tomadas de la siguiente manera. Se hizo un lavado del cuello uterino con 1 ml de PBS 1X (ver apéndice) de cada paciente antes de ser tratadas con ácido acético diluido al 15%. Esto con el fin de evitar dañar la estructura conformacional de los anticuerpos contenidos en el moco cervical. Las soluciones de lavado se colectaron en tubos eppendorf estériles de 1.5 ml. El desecho celular fue eliminado mediante una centrifugación a 13 000 rpm durante 5 min. Las muestras se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis. El tejido cervical fue obtenido de la zona de transformación del epitelio

cervical, usando unas pinzas para biopsias, inmediatamente fueron colocadas en PBS 1X y procesadas el mismo día.

### *5.3 Determinación de la presencia de DNA del VPH por PCR.*

Todos los reactivos usados fueron obtenidos de Gibco BRL (Rockville, MD, USA). La presencia de DNA de VPH se determinó mediante la amplificación de un fragmento del gene L1 con los oligonucleótidos degenerados MY 09/11. Estos oligonucleótidos amplifican un fragmento de aproximadamente 450 pb de longitud de una región conservada del gen L1 del DNA de los VPH's que infectan el tracto genital de la mujer (6, 11, 16, 18 y 33), esta región se encuentra entre las bases 6722 y 7170 del genoma viral (**fig. 8**). Tal secuencia es la siguiente: para MY 09 (5' CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC 3'), y para MY 11 (5' GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG 3'). La mezcla de reacción de la PCR fue la siguiente: 3 µl de MgCl<sub>2</sub> 10mM; 2 µl de amortiguador para PCR 10X; 2 µl de dNTP's 2mM; 0.4 µl de MY 09 50 pM; 0.4µl de MY 11 50 pM; 0.2 µl de DNA taq polimerasa 5 U/µl; 500 ng de DNA genómica; y H<sub>2</sub>O para completar el volumen de reacción a 20 µl. Mientras que los ciclos térmicos fueron los siguientes: un precalentado a 95°C 5', 30 ciclos de reacción a 95 °C 30'', 45 °C 30'', 72 °C 1', almacenamiento a 4°C 30'. El proceso se llevó a cabo en un termociclador (Perkin Elmer/ Gene Amp PCR System 2400). Finalmente el producto se mantuvo a 4°C hasta ser analizado en un gel de agarosa con bromuro de etidio al 1%, y con ayuda de un marcador de pesos moleculares (100 pb Ladder) se determinó la banda esperada.

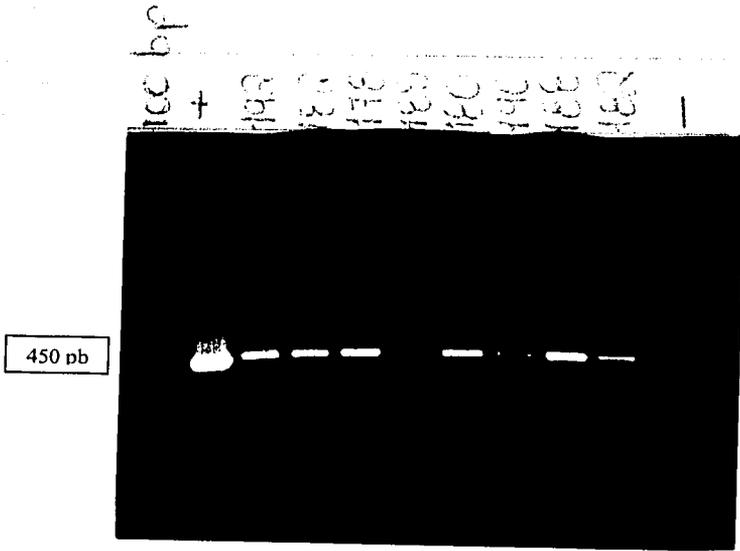


Figura.- 8 Amplificación de un fragmento de la proteína L1 del VPH usando los oligonucleótidos MY 09 y 11.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### *5.4 Determinación de la presencia de DNA de VPH's de alto riesgo por Captura de Híbridos (CH).*

En esta prueba se utilizó el Kit Digene HPV Test Hybrid Capture® II (Digene Corp., Beltsville, MD, USA), que detecta DNA de VPH de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, y 68). Esta prueba se basa en la detección de una señal luminosa emitida por la hibridación de sondas de RNA de VPH con DNA de VPH proveniente de muestras de tejido cervical. Se tomaron 20 µl de DNA extraído de tejido cervical (con 250-500 ng de DNA), y fue colocado en un tubo que contenía 30 µl de medio de transporte de especímenes. Enseguida se agregaron 25 µl de un reactivo de desnaturalización basado en NaOH a cada muestra, los tubos fueron vigorosamente mezclados e incubados a 65 °C durante 45 min. La hibridación y la detección de híbridos fue hecha de acuerdo al protocolo establecido: se preparan los cokteles para las pruebas A y B; se vacía el contenido de la prueba A en el tubo de la prueba B también diluido, y se mezclan vigorosamente. Entonces se agregan 25 µl de la mezcla A y B en cada tubo de hibridación, se mezclan bien las muestras y se adicionan 75 µl a cada tubo, posteriormente se agitan a 1 100-1 200 rpm durante 3' a 65-67 °C. Se transfiere el contenido de cada tubo de hibridación al pozo correspondiente en la placa de captura, se tapa y se agita a 1,100-1,200 rpm durante 60-65' a 20-25 °C, al terminar este paso, se decanta el sobrenadante, enseguida se adicionan 75 µl del reactivo de detección 1 en cada pozo de la placa, y se incuba durante 30-33' a 20-25 °C, y se desecha el sobrenadante. Entonces se lava la placa con búfer de lavado 6 veces. La generación de la señal de hibridación se obtiene agregando 75 µl del reactivo de detección 2 en cada pozo e incubando durante 15' a 20-25 °C. Finalmente se lee la señal de

hibridación en un luminómetro, se valida el ensayo y se interpretan los resultados. El DNA acarreador y el DNA del VPH 16 incluidos en el Kit fueron respectivamente usados como calibradores negativo y positivo, y fueron hechos por triplicado para cada una de las pruebas. Un ensayo fue considerado válido solo cuando los resultados de los calibradores negativo y positivo mostraron un coeficiente de variación menor o igual al 25%, y el valor promedio de radio calibrador positivo:calibrador negativo fue mayor o igual a 2.0. El valor de corte para positividad fue calculado para cada uno de los ensayos y fue definido como el valor promedio RLU (del inglés: Relative Light Units) del calibrador positivo.

#### 5.5 VLP's.

Los baculovirus recombinantes que expresan L1 del VPH 16 la cual se autoensambla para formar VLP's, fueron generosamente donados por el Dr. John Schiller (National institute of Health, Bethesda, MD, USA). La extracción y purificación de las VLP's se llevó acabo de la siguiente manera: células SF21 (*Spodoptera frugiperda*) fueron crecidas a un 80% de confluencia a 27 °C, y posteriormente infectadas con baculovirus recombinantes a una multiplicidad de infección (MOI) de 10. Las células se cultivaron durante un periodo de 72 h, y posteriormente fueron centrifugadas. La pastilla se resuspendió en 15 ml de PBS y se homogeneizo, entonces se centrifugó a 2 000 g durante 10' para separar los núcleos y la pastilla se resuspendió en 4 ml de PBS y fue sonicada en hielo durante 30''. El lisado resultante se colocó cuidadosamente sobre una solución de sacarosa-PBS al 40% (w/v) se centrifugó a 34 000 rpm durante 2 h en un rotor Beckman SW 55 Ti. La pastilla fue resuspendida en 2 ml de PBS seguida de 10'' de sonicación en hielo. Entonces una densidad final de 1.33g/ml de Cloruro de Cesio (CsCl)-PBS fue agregada, y la mezcla CsCl-lisado se centrifugo durante 16 h a 45 000 rpm. Después de la centrifugación dos

bandas fueron claramente identificables en el tubo, y se colectaron por separado. La densidad de las fracciones colectadas fue determinada con ayuda de un refractometro. La fracción de 1.30 g/ml la cual contenía las VLP's fue diluida con PBS, y el CsCl fue removido por centrifugación, y la pastilla entonces se resuspendió en PBS y fue almacenada a 4 °C. El contenido de la proteína fue determinado mediante el ensayo de Bradford (1976), y la pureza fue confirmada mediante electroforésis en geles de poliacrilamida-Sulfato dodecil de sodio (SDS-PAGE), y por tinción con azul de Coomassie. Las VLP's fueron usadas como antígenos blanco para detectar anticuerpos específicos del tipo sIgA anti-VPH en una prueba de ELISA.

#### *5.6 Ensayo de ELISA.*

El ensayo de ELISA para la detección anticuerpos sIgA en contra de la proteína L1 del VPH 16, se llevó a cabo en placas de ELISA de 96 pozos (Maxisorp, Nalge Nunc Int. Co. Naperville, IL, USA). Las placas fueron cubiertas durante toda la noche a 4 °C con 500 ng/ml de VLP's purificadas y diluidas en un amortiguador de bicarbonato de sodio 1X (ver apéndice). Las placas ya cubiertas fueron lavadas 4 veces con TBS/Tw20 (ver apéndice) a pH 7.6 (v/v). Una vez lavados los pozos, se procedió a bloquear los sitios de unión no específicos, utilizando una solución de TBS/Tw20 (v/v)/ BSA (albúmina de suero bovino; Sigma, UK) al 2% (200 µl/ pozo), y se incubó durante 2 h a 37 °C. Una vez bloqueadas las placas fueron lavadas 4 veces con TBS/Tw20 (v/v) a pH 7.6, y se adicionaron 100 µl/ pozo de SeCe directamente de la solución de lavado (ver sección 4.1) y se incubó 2 h a 37°C. Las placas fueron lavadas 4 veces como se describió antes. Posteriormente se adicionaron 100 µl/ pozo del anticuerpo secundario anti-componente secretorio de IgA humana (Dako

Co. CA, USA) conjugado a fosfatasa alcalina, este anticuerpo secundario se diluyó a una concentración 1:5000 en TBS/Tw20 (v/v) BSA 2% , y se incubó 2 h a 37 °C. Después de que el reconocimiento de anticuerpos se llevó a cabo, se procedió a agregar el sustrato de la fosfatasa alcalina, disolviendo una tableta de 5 mg del sustrato (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) en 5 ml de dietanolamina al 10% pH 9.8 (ver apéndice), agregando 100  $\mu$ l/ pozo e incubando durante 15' a 37 °C. La reacción fue bloqueada con 50  $\mu$ l/ pozo de hidróxido de sodio 3 M. La reacción fue cuantificada leyendo la densidad óptica a una longitud de onda de 405nm ( $OD_{405nm}$ ) haciendo uso de un lector de microplacas (DU®-65 Spectrophotometer, Beckman). El valor de corte para delinear las SeCe's positivas y las negativas para anticuerpos sIgA en contra del VPH 16, fue calculado usando la media aritmética de los valores corregidos de  $DO_{405nm}$  del grupo de pacientes control, y sumándole dos desviaciones estándar, excluyendo los valores por arriba de los de las desviaciones estándar calculadas, se obtuvo un valor de corte igual a 0.486 (**tabla 1**) determinando así la positividad de cada una de las muestras de SeCe.

### *5.7 Análisis estadísticos.*

Los datos fueron ordenados en tablas de contingencia de 2 por 2 para ser analizados por la prueba de  $\chi^2$  corregida por Yates, a excepción de los resultados de la tabla 2 en donde se utilizó una tabla de contingencia de 3 por 2. Una prueba de t no paramétrica fue usada para comparar las lecturas de OD. Se consideró un nivel de significancia básico de  $p = 0.05$  en todas las pruebas. intervalos de confianza del 95% fueron calculados usando fórmulas estándar.

*Tabla.- 1 Muestras biológicas negativas a la presencia de VPH por PCR, utilizadas para estandarizar el valor de corte en anticuerpos sIgA dirigidos en contra del VPH 16.*

n	PCR	sIgA (DO) <sub>405nm</sub>
1	-	0.476
2	-	0.455
3	-	0.242
4	-	0.178
5	-	0.278
6	-	0.181
7	-	0.220
8	-	0.317
9	-	0.332
10	-	0.440
11	-	0.427
12	-	0.097
13	-	0.108
14	-	0.182
15	-	0.099
16	-	0.099
17	-	0.273
18	-	0.140
19	-	0.196
20	-	0.139
21	-	0.289

*DO: valor de densidad óptica de las muestras de secreción cervical (SeCe) a 405nm.  
Punto de corte = 0.486*

## 6. RESULTADOS.

### 6.1 Características de la población humana.

En el presente estudio se incluyeron 236 muestras de una población abierta. Un estudio colposcópico practicado a esta población de pacientes demostró una reacción acetoblanca en 117 (49.57%) de estas pacientes, de las cuales el 76.92% (90/117) presentaron las características propias de una infección por VPH (IVPH), mientras que el 23.07% (27/117) presentaron una lesión con las características correspondientes a un NIC. Por otro lado, 119 (50.42%) pacientes no mostraron una reacción acetoblanca (**tabla 2**). A la población total de mujeres (sin y con lesión acetoblanca) se les practicó una serie de pruebas moleculares, con el fin de determinar la presencia de DNA de VPH, y su genotipo, así como la presencia de anticuerpos del tipo IgA dirigidos en contra del VPH 16.

En el grupo de pacientes sin lesión acetoblanca, el rango de edad osciló entre los 17 y 58 años, con una edad promedio de 32 años. El promedio de hijos de este grupo de mujeres fue de 3, mientras que el promedio de abortos fue de 2. Por otro lado, en el grupo de pacientes con lesión acetoblanca, el rango de edad osciló entre los 17 y 79 años, con una edad promedio de 33 años. El promedio de hijos en este grupo de pacientes fue de 3, mientras que el promedio de abortos fue de 1. Los datos de las pacientes con y sin evidencia de VPH no fueron significativamente diferentes (**Tabla 3 A y B**  $p = 0.895$ ,  $p = 0.282$  respectivamente), lo cual nos sugiere que las características de nuestra población no jugaron un papel importante en el desarrollo de la infección mediada por el VPH.

*Tabla.- 2 Resultados del diagnóstico colposcópico.*

Diagnóstico colposcópico	Pacientes n (%)
<b>Sin evidencia de VPH</b>	119 (50.42)
<b>IVPH</b>	90 (38.13)
<b>NIC</b>	27 (11.44)

*VPH: Virus del Papiloma Humano.*

*IVPH: Infección por Virus del Papiloma Humano.*

*NIC: Neoplasia Intraepitelial cervical.*

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

Tabla.- 3. Características de la población dividida por el diagnóstico colposcópico.

A)

	<i>Pacientes con lesión acetoblanca n (%)</i>	<i>Pacientes sin lesión acetoblanca n (%)</i>
<b>Pacientes con Hijos</b>	101 (86.32)	101 (84.87)
<b>Pacientes sin Hijos</b>	16 (13.67)	18 (15.12)
<b>Total</b>	<b>117</b>	<b>119</b>

Los datos que se muestran representan el total de la población estudiada.

Los resultados se analizaron con una tabla de contingencia de 2 por 2 por la prueba de  $\chi^2$  corregida por Yate's ( $p = 0.895$ ).

B)

	<i>Pacientes con lesión acetoblanca n (%)</i>	<i>Pacientes sin lesión acetoblanca n (%)</i>
<b>Pacientes con abortos</b>	40 (22.59)	32 (26.89)
<b>Pacientes sin abortos</b>	77 (65.81)	87 (73.10)
<b>Total</b>	<b>117</b>	<b>119</b>

Los datos que se muestran representan el total de la población estudiada.

Los resultados se analizaron con una tabla de contingencia de 2 por 2 por la prueba de  $\chi^2$  corregida por Yate's ( $p = 0.282$ ).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

*6.2 Presencia de DNA del VPH, de genotipos de alto riesgo en tejido cervical y presencia de anticuerpos sIgA en secreciones cervicales (SeCe's) de pacientes con y sin lesiones acetoblancas.*

La presencia de DNA de VPH en biopsias cervicales, fue investigada mediante la prueba de PCR utilizando los oligonucleótidos universales MY 09 y 11, los cuales amplifican una secuencia conservada de 450 pb correspondiente al gen L1 de este virus. Se analizaron un total de 236 muestras de tejido cervical, de las cuales 119 correspondieron a pacientes sin una reacción acetoblanca, y 117 a pacientes con una reacción acetoblanca de acuerdo con el estudio colposcópico que se les practicó. En el primer grupo de muestras encontramos que un 66.38% (79/119) fue positiva a la presencia de DNA del VPH (**tabla 4**), indicándonos que más de la mitad de pacientes sin lesión acetoblanca presentaron infección por algún tipo de VPH, a pesar de que el estudio colposcópico fue negativo. Por otra parte, en el grupo de pacientes con lesión acetoblanca, encontramos que un 88.88% (104/117) de estas pacientes fue positiva a la presencia de DNA del VPH (**tabla 4**). El análisis estadístico de estos datos no mostró una diferencia significativa ( $p = 0.0001$ ), a pesar de que un alto porcentaje de pacientes con una colposcopia normal fue positiva a la presencia del DNA del VPH. Sugiriéndonos que muchas pacientes sin cambios patológicos evidentes pueden presentar infecciones latentes.

Una vez observada la prevalencia del DNA del VPH, nos dimos a la tarea de detectar la proporción de pacientes infectadas por genotipos de alto riesgo. En total se analizaron 142 muestras de tejido cervical (debido a que el Kit de captura de híbridos solamente alcanzó para este número de muestras), en donde 42 muestras positivas para el VPH correspondieron a pacientes sin lesión acetoblanca y 100 muestras negativas para el

VPH correspondieron a pacientes con una lesión acetoblanca. En el primer grupo, sólo el 16.66% (7/42) de estas muestras fueron positivas a la presencia de DNA de virus de alto,

*Tabla.- 4 Asociación de resultados entre la prueba de PCR y el Diagnóstico colposcópico.*

	Con lesión acetoblanca n (%)	Sin lesión acetoblanca n (%)	Total n (%)
<b>PCR +</b>	104 (88.88)	79 (66.38)	183 (77.54)
<b>PCR -</b>	13 (11.11)	40 (33.61)	53 (22.45)

*Los resultados se analizaron con una tabla de contingencia de 2 por 2 por la prueba de Chi<sup>2</sup> corregida por Yates (p = 0.0001).*

lo cual podría esperarse de un grupo de mujeres las cuales no presentaron lesiones visibles en la zona de transformación del epitelio cervical. En el segundo grupo encontramos que un 94% de las muestras fueron positivas a la presencia de genotipos de alto riesgo (**tabla 5**). Al hacer el análisis de los resultados, encontramos una asociación significativa entre el diagnóstico colposcópico y la presencia de VPH's de alto riesgo (p = 0.0001), lo cual nos indicó que las pacientes con lesiones visibles en el epitelio cervical tienen un mayor riesgo de estar infectadas por VPH's oncogénicos.

La presencia de anticuerpos específicos en contra del VPH 16 fue detectada en muestras de secreción cervical de pacientes, sin y con lesión acetoblanca, haciendo uso de un ensayo de ELISA. En general, se analizaron un total de 119 muestras de pacientes sin

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

lesión acetoblanca, y 117 muestras de pacientes con lesión acetoblanca. En el grupo de pacientes sin lesión acetoblanca, más de la mitad 56.30% (67/119) de las muestras analizadas fueron positivas a la presencia de anticuerpos sIgA (**tabla 6**). Mientras que, en el grupo de pacientes con lesión acetoblanca el 52.99% (62/117) de las muestras fueron positivas a la presencia de tales anticuerpos. En total, poco más de la mitad de las muestras analizadas (129/236) fueron positivas a los anticuerpos en contra del VPH 16. Al analizar estadísticamente los datos, no encontramos diferencias significativas ( $p = 0.704$ ) entre ambos grupos de pacientes y la presencia de anticuerpos sIgA. Sugiriéndonos, ninguna relación de dichos anticuerpos con el cambio patológico observado. La **figura 9** es una representación esquemática de la lectura de anticuerpos para cada grupo de pacientes. Se puede observar que la respuesta de anticuerpos es muy semejante. Sin embargo, los valores más altos de anticuerpos sIgA corresponden a las pacientes infectadas.

*Tabla.- 5 Asociación de resultados entre la prueba de Captura de Híbridos (CH) y el Diagnóstico colposcópico.*

	Con lesión acetoblanca n (%)	Sin lesión acetoblanca n (%)	Total n (%)
<b>CH +</b>	94 (94)	7 (16.66)	101 (71.12)
<b>CH -</b>	6 (6)	35 (83.33)	41 (28.87)

*Los resultados se analizaron con una tabla de contingencia de 2 por 2 por la prueba de  $\chi^2$  corregida por Yates ( $p = 0.0001$ ).*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

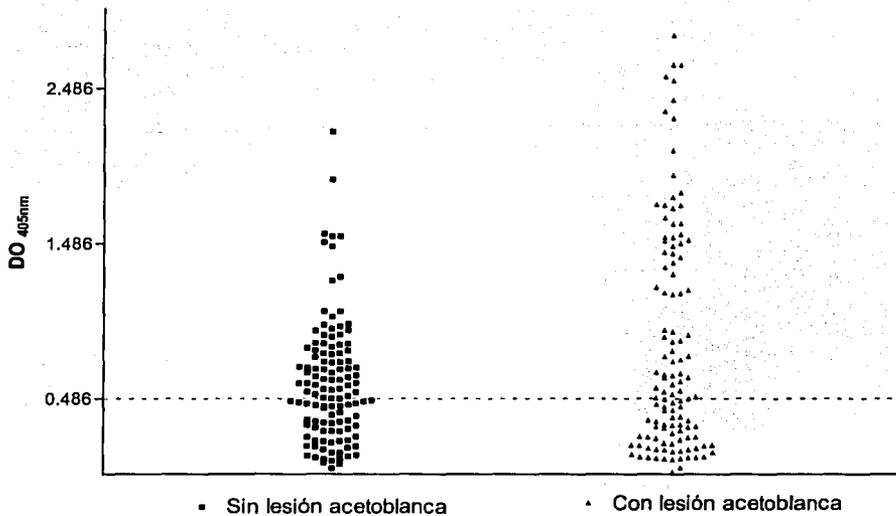


Figura.- 9 Lecturas de anticuerpos sIgA en secreciones cervicales (SeCe's) de pacientes sin y con lesiones acetoblancas.

Tabla.- 6 Asociación de resultados entre el ensayo de ELISA y el Diagnóstico colposcópico.

	Con lesión acetoblanca n (%)	Sin lesión acetoblanca n (%)	Total n (%)
<b>sIgA +</b>	62 (52.99)	67 (56.30)	129 (54.66)
<b>sIgA -</b>	55 (47.01)	52 (43.69)	107 (45.33)

Los resultados se analizaron con una tabla de contingencia de 2 por 2 por la prueba de  $\chi^2$  corregida por Yates ( $p = 0.704$ ).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Con el fin de establecer posibles correlaciones entre los resultados de cada prueba, estos fueron analizados entre sí mediante tablas de contingencia. De esta forma, al analizar los datos de la prueba de PCR contra CH, se pudo observar que sólo un 16.66% de las pacientes con colposcopia normal fueron consistentes para ambas pruebas, mientras que en las pacientes con lesión acetoblanca, el 94% fue positiva para ambas pruebas (**Tbla 7**). Estos resultados nos indicaron la alta prevalencia de virus oncogénicos en el tejido acetoblanco ( $p = 0.0001$ ). Por otro lado, cuando se comparó la presencia de anticuerpos con la presencia de virus por PCR, se observó que en el grupo de mujeres con colposcopia normal la presencia de anticuerpos no estaba asociada con la presencia de DNA viral ( $p = 0.851$ ) (**tabla 8**). Por el contrario en el grupo con lesiones acetoblanas la mayoría de pacientes positivas para la presencia de anticuerpos sIgA, fue también positiva para la presencia de DNA viral ( $p = 0.001$ ) (**tabla 8**). Sugiriéndonos que la respuesta de anticuerpos sIgA esta asociada a la infección por el VPH. Sin embargo, al hacer el análisis de la presencia de anticuerpos con la de VPH's de alto riesgo, no se encontró asociación en ambos grupos de pacientes ( $p = 0.890$  y  $p = 0.097$ ) (**tabla 9**), indicándonos que las pacientes correspondientes pudieron estar infectadas por algún tipo de VPH, pero no de alto riesgo.

Tabla.- 7 Asociación de resultados entre la prueba de PCR y la prueba de Captura de Híbridos (CH).

Resultado de la prueba de PCR	Resultado de la prueba de CH	Con lesión acetoblanca n (%).	Sin lesión acetoblanca n (%).
+	+	94 (94)	7 (16.66)
-	-	4 (4)	35 (83.33)
-	+	0	0
+	-	2 (2)	0
<b>Valor de p</b>		<b>p = 0.0001</b>	<b>p = 0.0001</b>

Los resultados se analizaron con una tabla de contingencia de 2 por 2 por la prueba de  $\chi^2$  corregida por Yates.

Tabla.- 8. Asociación de resultados entre la prueba de PCR y el ensayo de ELISA.

Resultado de la prueba de PCR	Resultado del ensayo de ELISA	Con lesión acetoblanca n (%)	Sin lesión acetoblanca n (%)
+	+	61 (52.13)	44 (36.97)
-	-	12 (10.25)	17 (14.28)
-	+	1 (0.85)	23 (19.32)
+	-	43 (36.75)	35 (29.41)
<b>Valor de p</b>		<b>p = 0.001</b>	<b>p = 0.851</b>

Los resultados se analizaron con una tabla de contingencia de 2 por 2 por la prueba de  $\chi^2$  corregida por Yates.

Tabla.- 9. Asociación de resultados entre la prueba de Captura de Híbridos (CH) y el ensayo de ELISA.

Resultado de la prueba de CH	Resultado de la prueba de ELISA	Con lesión acetoblanca n (%)	Sin lesión acetoblanca n (%)
+	+	1 (2.38)	58 (58)
-	-	15 (35.71)	3 (3)
-	+	20 (47.61)	3 (3)
+	-	6 (14.28)	36 (36)
<b>Valor de p</b>		<b>p = 0.097</b>	<b>p = 0.890</b>

Los resultados se analizaron con una tabla de contingencia de 2 por 2 por la prueba de  $\chi^2$  corregida por Yates.

TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN

### 6.3 Seguimiento clínico/colposcópico.

Las pacientes con lesiones acetoblancas fueron tratadas para eliminar la lesión, haciendo uso de métodos ablativos conservadores, tales como la electrocirugía o asa diatérmica [A], y la vaporización con rayos láser [L].

En este trabajo se realizó un seguimiento clínico, mismo que duró año y medio después del tratamiento conservador aplicado de un grupo de 74 pacientes. El estudio colposcópico inicial indicó que el 79.72% (59/74) de las pacientes tenían las características típicas de un IVPH, mientras que el 20.27% (15/74) de un NIC. Por otra parte, el número de pacientes tratadas con cada uno de los diferentes métodos ablativos fueron los siguientes. El 81.08% (60/74) de las pacientes fueron tratadas con [A] y el 18.91% (14/74) de las pacientes restantes fueron tratadas con [L]. Como se muestra en la **tabla 10**, 47/60 pacientes con IVPH fueron tratadas con [A] y 12/14 con [L]. Por otro lado, 13/60 pacientes con NIC fueron tratadas con [A] y 2/14 con [L].

Durante el seguimiento se observaron un total de 23 pacientes con recurrencias, de las cuales 12 fueron tratadas con [A] y 11 con [L]. De las pacientes tratadas con [A], 6 presentaron una recurrencia, 2 presentaron dos recurrencias, y 4 pacientes presentaron más de tres recurrencias a través del seguimiento. Por el contrario, en las pacientes tratadas con [L], 3 presentaron una recurrencia, 4 presentaron dos recurrencias, y 4 pacientes presentaron más de tres recurrencias en el transcurso del seguimiento. Al final de este estudio encontramos que el 93.24% (69/74) de las pacientes tratadas con alguno de los dos métodos quirúrgicos, no presentaron vestigios de infección por VPH, mientras que el resto de las pacientes 6.75% (5/74), recayeron en una infección característica de un IVPH. El 98.33% (59/60) de las pacientes tratadas con [A] presentaron un epitelio cervical normal, mientras que en las pacientes tratadas con [L], solo el 71.42% (10/14) mantuvo un epitelio

cervical normal (**tabla 10**). Estos datos reflejan que el tratamiento quirúrgico aplicado a la población de mujeres en este estudio tuvo resultados alentadores, y por lo tanto, el estudio colposcópico del cérvix uterino debe implementarse como una herramienta en el tratamiento de infecciones clínicas causadas por VPH' de alto riesgo.

Con el objetivo de investigar si la presencia de anticuerpos sIgA dirigidos en contra del VPH 16 antes del tratamiento tuvo algún efecto sobre el resultado de éste, relacionamos el resultado del ensayo de ELISA con el resultado del tratamiento quirúrgico. De esta forma, encontramos que en las pacientes recuperadas al final del seguimiento el 55.40% (41/74) fueron positivas a la presencia de anticuerpos sIgA, mientras que el 37.83% (28/74) fueron negativas. Solo el 6.75% (5/74) de las pacientes no se recuperó. Las pacientes que no se recuperaron fueron 5, de las cuales 4 tenían anticuerpos y sólo una fue negativa a la presencia de estos anticuerpos (**tabla 11 A**). Al hacer el análisis estadístico de estos datos, no encontramos una asociación entre la presencia de anticuerpos sIgA y el resultado del tratamiento quirúrgico ( $p = 0.662$ ). Por lo tanto, esto nos indicó que dichos anticuerpos no influyeron sobre la recuperación de las pacientes quirúrgicamente tratadas. Este resultado nos hizo hacer un análisis más específico de dicha relación. En las pacientes tratadas con [A], 59 (98.33%) se recuperaron de la infección y solamente una (1.66%) permaneció infectada. De las 37 (61.66%) pacientes que se recuperaron fueron positivas a la presencia de anticuerpos sIgA, mientras que 22 (36.66%) fueron negativas. La única paciente que permaneció infectada también fue positiva a la presencia de estos anticuerpos (**tabla 11 B**).

Tabla.- 10. Seguimiento de un grupo de pacientes con lesión acetoblanca tratadas con métodos ablativos (Asa diatérmica , ó Láser).

<b>RATAMIENTO QUIRÚRGICO</b>	<b>n</b>	<b>IVPH</b>	<b>NIC</b>	<b>PCR +</b>	<b>sIgA +</b>	<b>CH +</b>	<b>RECURRENTES DURANTE EL SEGUIMIENTO</b>	<b>CÉRVIX NORMAL AL FINAL DEL SEGUIMIENTO</b>	<b>RECURRENTES AL FINAL DEL SEGUIMIENTO</b>
ASA	60	47	13	56	37	57	12	59	1
LÁSER	14	12	2	14	8	14	11	10	4
<b>TOTAL (%)</b>	<b>100</b>	<b>79.72</b>	<b>20.27</b>	<b>94.59</b>	<b>60.81</b>	<b>95.94</b>	<b>31.08</b>	<b>93.24</b>	<b>6.75</b>

*n*: número de pacientes analizadas, IVPH: pacientes con infección por VPH, NIC: pacientes con neoplasia intraepitelial cervical, positividad a las pruebas moleculares e inmunológicas (PCR +, sIgA +, CH +). Se puede observar el número de pacientes con recurrencias en el transcurso del seguimiento, así como las pacientes que mostraron un cérvix normal, y en las cuales persistió la infección al final del seguimiento.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

El análisis estadístico de estos datos, no resultó ser significativo ( $p = 0.442$ ). Por otro lado, en las pacientes tratadas con [L], 10 (71.42%) de estas se recuperaron al final del seguimiento, 5 (35.71%) de las cuales, fueron positivas a la presencia de anticuerpos sIgA, y 5 (35.71%) fueron negativas. Sólo 4 (28.57%) pacientes no lograron recuperarse, a pesar de que 3 de ellas fueron positivas a la presencia de anticuerpos (**tabla 11 C**). Al hacer la relación de los datos, encontramos que tampoco hubo una asociación significativa entre la presencia de anticuerpos sIgA y eliminación de la lesión causada por el VPH ( $p = 0.797$ ). Lo cual refuerza la idea de que los anticuerpos sIgA no tuvieron ninguna relación con el resultado del tratamiento quirúrgico.

El número de tratamientos varió para aquellas pacientes tratadas con ambos métodos ablativos, debido a que varias de estas no pudieron recuperarse en la primera intervención, y fue necesario someterlas a dos o más intervenciones. En este contexto,

*Tabla.- 11. Asociación de resultados de los métodos ablativos (asa y láser) y el ensayo de ELISA .*

**A) Pacientes sometidas al tratamiento quirúrgico (74)**

	Curadas n (%)	No curadas n (%)
sIgA +	41 (55.40)	4 (5.40)
sIgA -	28 (37.83)	1 (1.35)

*Los resultados se analizaron con una tabla de contingencia de 2 por 2 por la prueba de  $\chi^2$  corregida por Yates ( $p = 0.662$ ).*

**B) Pacientes sometidas al tratamiento con Asa diatérmica (n = 60)**

	Curadas n (%)	No curadas n (%)
sIgA +	37 (61.66)	1 (1.66)
sIgA -	22 (36.66)	0

Los resultados se analizaron con una tabla de contingencia de 2 por 2 por la prueba de  $\chi^2$  corregida por Yates ( $p = 0.442$ ).

**C) Pacientes sometidas al tratamiento con Láser (n = 14)**

	Curadas n (%)	No curadas n (%)
sIgA +	5 (35.71)	3 (21.42)
sIgA -	5 (35.71)	1 (7.14)

Los resultados se analizaron con una tabla de contingencia de 2 por 2 por la prueba de  $\chi^2$  corregida por Yates ( $p = 0.797$ ).

los datos fueron agrupados de acuerdo al número de intervenciones quirúrgicas practicadas a las pacientes, al resultado del mismo, y a la presencia de anticuerpos del tipo sIgA. De esta forma, en las pacientes sometidas a un primer tratamiento con [A], 48 respondieron satisfactoriamente al tratamiento, y solo 12 permanecieron con la infección. De estas 48 pacientes que se recuperaron, 28 fueron positivas a la presencia de anticuerpos del tipo sIgA y 20 fueron negativas, mientras que de las 12 pacientes que no se recuperaron, 10 de ellas fueron positivas a la presencia de anticuerpos (**tabla 12 A**). los resultados del análisis estadístico no fueron significativos ( $p = 0.203$ ). A las 12 pacientes que permanecían todavía con la infección se sometieron a una segunda intervención quirúrgica, aquí observamos que

4 de estas pacientes pudieron recuperarse, y que además fueron positivas a la presencia de anticuerpos sIgA, mientras que 8 permanecieron con la infección, a pesar de que 6 fueron positivas a la presencia de anticuerpos (**tabla 12 B**). Los resultados de esta relación tampoco mostraron una asociación significativa ( $p = 0.784$ ) entre la presencia de anticuerpos sIgA y la eliminación de la infección causada por el VPH. De la misma forma que antes, a las últimas 8 pacientes que presentaban la infección, se sometieron una tercera o más intervenciones, aquí pudimos ver que 7 pacientes respondieron positivamente, y de las cuales 5 fueron positivas a la presencia de anticuerpos, solamente una de las ocho pacientes tratadas no se recuperó al final del seguimiento, a pesar de ser positiva a la presencia de anticuerpos sIgA. (**tabla 12 C**). El análisis estadístico de esta relación no demostró ser significativa ( $p = 0.537$ ). Por lo tanto podemos concluir que la presencia de anticuerpos sIgA en pacientes sometidas al tratamiento con asa diatérmica, no jugaron ningún papel en eliminar la lesión causada por el VPH.

Por otro lado, de las 14 pacientes sometidas a un primer tratamiento con [L], solamente una pudo recuperarse, y fue negativa a la presencia de anticuerpos sIgA, mientras que las 13 restantes permanecieron infectadas, a pesar de que 8 de ellas fueron positivas a la presencia de este tipo de anticuerpos (**tabla 13 A**). El análisis estadístico de esta relación nos indicó una relación significativamente negativa ( $p = 0.881$ ). A las 13 pacientes que permanecían con la infección por VPH se sometieron a una segunda intervención, en donde 4 de estas respondieron satisfactoriamente al tratamiento, mientras que 9 recayeron en la infección. Tres de las pacientes que se recuperaron fueron positivas a la presencia de anticuerpos sIgA, y 5 de las que no se recuperaron también fueron positivas a la presencia de anticuerpos (**tabla 13 B**). El análisis estadístico de los datos no resultó

*Tabla.- 12 Asociación entre las pacientes tratadas con [A] y el ensayo de ELISA.*

**A) 1<sup>er</sup> tratamiento con Asa.**

	Curadas	No curadas
sIgA +	28	10
sIgA -	20	2

*Los resultados se analizaron con una tabla de contingencia de 2 por 2 por la prueba de Chi<sup>2</sup> corregida por Yates (p = 0.203).*

**B) 2<sup>o</sup> tratamiento con Asa.**

	Curadas	No curadas
sIgA +	4	6
sIgA -	0	2

*Los resultados se analizaron con una tabla de contingencia de 2 por 2 por la prueba de Chi<sup>2</sup> corregida por Yates (p = 0.784).*

**C) 3<sup>er</sup> tratamiento con Asa.**

	Curadas	No curadas
sIgA +	5	1
sIgA -	2	0

*Los resultados se analizaron con una tabla de contingencia de 2 por 2 por la prueba de Chi<sup>2</sup> corregida por Yates (p = 0.537).*

ser significativo ( $p = 0.962$ ). Una paciente de las cuatro que se recuperaron al final del seguimiento fue diagnosticada con IVPH, a pesar de que fue positiva a la presencia de anticuerpos sIgA. Las 9 pacientes que permanecían infectadas se sometieron a una tercera o más intervenciones. Aquí se pudo observar que 6 pacientes respondieron positivamente al tratamiento, mientras que 3 permanecieron infectadas por VPH. Tres de las pacientes que se recuperaron fueron positivas a la presencia de anticuerpos sIgA, y 2 pacientes de las que no se recuperaron, también fueron positivas a la presencia de anticuerpos (**tabla 13 C**). El análisis estadístico de la relación de estos datos no fue significativo ( $p = 0.635$ ). Por lo tanto podemos concluir que la presencia de anticuerpos sIgA en pacientes tratadas con láser, no resultaron ser importantes en la eliminación de lesión causada por el VPH.

*Tabla.- 13 Asociación entre las pacientes tratadas con [L] y el ensayo de ELISA.*

A) 1<sup>er</sup> tratamiento con Láser.

	Curadas	No curadas
sIgA +	0	8
sIgA -	1	5

*Los resultados se analizaron con una tabla de contingencia de 2 por 2 por la prueba de  $\chi^2$  corregida por Yates ( $p = 0.881$ ).*

B) 2<sup>o</sup> tratamiento con Láser.

	Curadas	No curadas
sIgA +	3	5
sIgA -	1	4

*Los resultados se analizaron con una tabla de contingencia de 2 por 2 por la prueba de  $\chi^2$  corregida por Yates ( $p = 0.962$ ).*

C) 3<sup>er</sup> tratamiento con Láser.

	Curadas	No curadas
sIgA +	3	2
sIgA -	3	1

Los resultados se analizaron con una tabla de contingencia de 2 por 2 por la prueba de  $\text{Chi}^2$  corregida por Yates ( $p = 0.635$ ).

## 7. DISCUSIÓN.

En este estudio se evaluó la presencia del DNA de VPH, así como la presencia de genotipos de alto riesgo en biopsias cervicales dirigidas colposcópicamente y la presencia de anticuerpos secretorios sIgA, dirigidos en contra de la cápside del VPH tipo 16 y la relación de estos con los resultados de los métodos ablativos aplicados a las pacientes con lesión acetoblanca.

Se ha reportado que el desarrollo de una neoplasia esta asociada a factores secundarios como el número de parejas sexuales, el inicio de una vida sexual a temprana edad, un alto número de embarazos, entre otros (125). En este trabajo encontramos que las características de la población seleccionada por el diagnóstico colposcópico, tales como el número de hijos y el número de abortos, no representaron ser factores relacionados con la infección por el VPH ( $p > 0.05$ ), ya que los datos entre ambos grupos de pacientes (sin lesión acetoblanca y con lesión acetoblanca), fueron similares. Otro estudio realizado por Lazcano y colaboradores (2001) (125) concuerda con nuestros resultados, a diferencia de la alta paridad, la cual es considerada como uno de los principales cofactores en la infección por el VPH, progresión a HSIL, y cáncer.

La colposcopia se ha considerado como el método más adecuado en el diagnóstico y tratamiento de lesiones LSIL en varios países, mientras que en el nuestro, se esta validando su papel como tal, ya que aún con los errores de diagnóstico cometidos en la prueba del Papanicolaou, está sigue siendo el método para detectar cáncer temprano en el cuello y cérvix uterino. Con el fin de evaluar el resultado de este método basado en la reacción acetoblanca del epitelio cervical de pacientes infectadas por el VPH, muestras de epitelio cervical y de secreción cervical de estas pacientes fueron analizadas con métodos

moleculares para ratificar la presencia del VPH en una lesión visible, y si se trataba de un genotipo de alto riesgo. También se determinó la presencia de anticuerpos específicos en contra del VPH tipo 16. De igual forma, muestras biológicas de las pacientes que no presentaron lesiones visibles, fueron analizadas con las mismas pruebas moleculares.

La presencia de DNA del VPH en el epitelio cervical, fue detectada mediante la prueba de PCR utilizando los oligonucleótidos universales MY. El DNA del VPH fue detectado en un 77.54% de todas las muestras analizadas. Otros trabajos han reportado porcentajes similares a los obtenidos en este estudio, Ken-Lin Chua y colaboradores (1996) (126), detectaron el DNA de este virus en un 88% de sus casos analizados (15000 casos), equivalentes a pacientes saludables con riesgo a desarrollar un NIC. Esto indica que la alta prevalencia del VPH en nuestra población de mujeres puede representar un factor de riesgo para desarrollar una infección de mayor grado. Relacionamos los resultados de esta prueba entre los grupos de pacientes con y sin lesiones acetoblanca, y observamos diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), lo cual nos indicó que el diagnóstico colposcópico pudo detectar lesiones que involucraron la presencia del DNA del VPH. Por otro lado, hubo pacientes positivas a la presencia de DNA de VPH, pero no mostraron una reacción acetoblanca. Una posible explicación de esto es la presencia de infecciones latentes por VPH, las cuales son muy comunes y no dependen de algún tipo de VPH, y solo pueden ser detectadas por la presencia de DNA ya que no producen anomalías macroscópicas (127).

Es importante hacer notar que sólo el 16.6% de las pacientes con una colposcopia normal fueron positivas a la presencia de DNA de VPH de alto riesgo. Mientras que, el 94% de las pacientes con lesión acetoblanca fueron positivas a la presencia de virus oncogénicos. Estas observaciones apoyan el valor de la colposcopia como un método efectivo para detectar lesiones con riesgo incrementado de progresión hacia un cáncer. Se

sabe que la presencia de VPH de alto riesgo en el tejido cervical es el principal factor de riesgo para progresión a carcinoma *in situ* (128), y eventualmente a cáncer invasor (129).

Con la finalidad de estudiar la respuesta inmune humoral presente en la mucosa cervical, se detectaron anticuerpos específicos en contra del VPH 16, usando un ensayo de ELISA. Los anticuerpos de secreción (sIgA) fueron detectados en un 54.66% de todas las muestras analizadas. Los resultados sugieren, que más de la mitad de las pacientes fueron capaces de generar una respuesta de anticuerpos específicos en contra de este tipo de VPH. En un estudio realizado por Rocha-Zavaleta L. (2001) (130), se demostró que estos anticuerpos son capaces de interaccionar con partículas pseudovirales o VLP's del VPH 16 en un ensayo de inhibición de la hemaglutinación. Sin embargo, al hacer el análisis estadístico de los resultados obtenidos mediante esta prueba y los obtenidos por el método colposcópico, no observamos diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). Lo cual nos sugirió que la presencia de anticuerpos sIgA en contra del VPH 16 no estaba asociada con el resultado del diagnóstico colposcópico. Esto nos indicaría, que la presencia de estos anticuerpos fue independiente a la infección causada por el VPH. Sin embargo, encontramos que las pacientes con lesión acetoblanca presentaron una respuesta inmune más marcada en comparación con las que no tuvieron una reacción acetoblanca. Una explicación posible a esta diferencia pudo deberse a la alta tasa de infección por VPH en nuestra población, y por lo tanto, la respuesta de anticuerpos sIgA tendió a ser más elevada.

Por otro lado, un 45.33% de las pacientes no presentaron anticuerpos sIgA, un dato que ya se había encontrado en otros estudios (82, 84, 131-134), los cuales han reportado que alrededor del 20% al 50% de las mujeres con DNA del VPH o lesiones asociadas no presentan anticuerpos detectables en contra de VPH's específicos. Uno de los factores que pudo contribuir al fracaso de una respuesta de anticuerpos o seroconversión, pudo ser la

infección por ciertas variantes de VPH, resultando en respuestas serológicas que no fueron detectadas por el ensayo de ELISA. Cheng y colaboradores (1995) (135) han reportado que 2 ó más variantes divergentes del VPH 16 tienen reacciones serológicas cruzadas; de la misma forma, Ellis y colaboradores (1997) (136) han demostrado que las mujeres infectadas con una variante en particular eran menos probables a ser positivas para anticuerpos, que las mujeres con otras variantes. Diferencias en el fondo genético del hospedero o el estatus inmune podría también explicar porque algunas mujeres fracasan en seroconvertir.

En el caso de las mujeres sin lesión acetoblanca se encontró que sólo una pequeña proporción de pacientes positivas por PCR lo fue también por CH, lo cual nos indicó una prevalencia baja de VPH's de alto riesgo en estas pacientes. Por otro lado, en las mujeres con lesión acetoblanca la gran mayoría de estas positivas a la presencia de DNA de VPH por PCR mostró también positividad a la CH, lo cual nos sugirió una alta prevalencia de VPH's oncogénicos en estas pacientes. El estudio estadístico de estos datos demostró que había una fuerte asociación entre la presencia de lesiones acetoblanca y la infección por virus de alto riesgo, lo cual nos permitió suponer que estos virus de alto riesgo son capaces de producir cambios en las células que pueden provocar una reacción con el ácido acético, misma que puede ser visible macroscópicamente. A este respecto se sabe que los tipos de VPH oncogénicos tienen la capacidad de transformar sus células hospederas. Evidencia experimental sugiere que las células infectadas por VPH's oncogénicos experimentan cambios genéticos y moleculares importantes en los primeros estados de la infección (137, 138). Sin embargo, se necesitan más estudios para investigar mejor algunos de estos cambios relacionados con la capacidad de las células en reaccionar con el ácido acético.

Nos pareció interesante el resultado del análisis de comparación entre los datos de la presencia de DNA viral y la presencia de anticuerpos, ya que se observó que algunas pacientes fueron negativas a la presencia del virus pero positivas para anticuerpos, de la misma forma se encontraron mujeres que a pesar de tener DNA viral en su tejido cervical no presentaron anticuerpos contra del virus. El 19.32% de mujeres sin VPH por PCR fueron positivas a la presencia de anticuerpos sIgA, lo cual pudo deberse a una clasificación serológica incorrecta, ya que el estudio colposcópico resultó ser negativo y además fue corroborado por la prueba de CH. Sin embargo, una explicación más probable puede ser que estas mujeres sufrieron una infección previa por VPH (141), y que la presencia de anticuerpos en el moco cervical puede deberse a infecciones fluctuantes (142).

Los técnicas moleculares del PCR y CH han sido reconocidas como métodos altamente sensibles para la detección de infecciones por VPH, y su nivel individual de resultados falsos-negativos y falsos-positivos es ampliamente reducido cuando son usados de manera conjunta para determinar la presencia del VPH (139, 140). Los anticuerpos sIgA en contra de los antígenos de la cápside del VPH 16 han sido encontrados en el moco cervical (142), fluido oral (143) y muestras del suero (144, 145, 146) de pacientes no infectadas y citológicamente normales. Por otro lado se ha sugerido que los anticuerpos IgA del suero pueden ser marcadores de infecciones recientes (145); también se ha propuesto que la presencia de anticuerpos IgA mucosos es debido a infecciones previamente curadas (143). El presente estudio muestra datos representativos, que no pueden concluir acerca del significado de la presencia de anticuerpos en pacientes no infectadas. Para aclarar este punto, más estudios de seguimiento y moleculares deberán hacerse.

Los anticuerpos sIgA son la principal molécula efectora en la inmunidad del epitelio mucoso. Aquí hemos encontrado una reacción mediada por sIgA en contra de las proteínas

de la cápside del VPH 16 en un 60.38% de pacientes positivas para el VPH 16. Esto se diferencia de un estudio hecho por Wang et al. (77) quienes encontraron que un 25% de las muestras de moco cervical de pacientes infectadas por el VPH 16 contenían anticuerpos IgA en contra de la cápside del VPH 16. De manera interesante, nuestros datos mostraron que los anticuerpos IgA se desarrollaron en contra de las cápsides virales de pacientes positivas para el VPH16 con evidencia patológica de infección. La proporción de anticuerpos en las pacientes con lesión acetoblanca (94%) fue significativamente más alta en comparación con las pacientes sin lesión acetoblanca (16.6%). Esta proporción de positividad en el grupo con cambios patológicos es diferente a la reportada por Bontkes et al (1999) (86), probablemente por la alta incidencia de infección de VPH en nuestra población. Un estudio más reciente reporta que la presencia de anticuerpos sIgA en contra de los antígenos de la cápside del VPH16, esta asociada con la detección de lesiones de bajo grado (SIL) (147), lo cual concuerda con nuestros resultados.

En el seguimiento colposcópico, se incluyeron 74 de las pacientes que tuvieron una reacción acetoblanca. Estas pacientes se sometieron a un tratamiento ablativo conservador. Dicho tratamiento consistió en eliminar las lesiones causadas por el VPH, mediante el uso de métodos tales como el asa diatérmica [A] y la vaporización con láser [L], dependiendo de la lesión presentada. Al finalizar el seguimiento se hizo una relación del resultado de los métodos ablativos con el resultado del ensayo de ELISA, con el propósito de entender mejor si los anticuerpos sIgA jugaban un papel determinante en la eliminación de la infección causada por el VPH.

El resultado del tratamiento quirúrgico fue alentador, ya que al finalizar el seguimiento, 69/74 de las pacientes incluidas en este estudio, mostraron un epitelio cervical sin lesión alguna. La mayoría (59/74) fueron tratadas con [A]. En el transcurso del

seguimiento se presentaron un total de 23 pacientes recurrentes, de las cuales solamente 5 no se lograron recuperar, probablemente por no cumplir con las condiciones dadas por el médico colposcopista; principalmente de evitar el contacto sexual con su pareja durante aproximadamente 3 meses, y de usar condón en cada relación. Otro factor importante que pudo haber influido en el resultado de estas pacientes, pudo ser que su sistema inmune se encontraba inmunosuprimido.

Para estudiar el papel que desempeñan los anticuerpos sIgA en el resultado del tratamiento quirúrgico, se hizo una relación de las pacientes curadas y no curadas con la presencia de estos anticuerpos. Los resultados no mostraron asociación significativa ( $p > 0.05$ ), aún cuando se observó una relación muy marcada entre el número de pacientes que se recuperaron y la presencia de este tipo de anticuerpos. Para entender mejor estos resultados, la misma relación se hizo con el resultado de cada uno de los tratamientos quirúrgicos, y de igual forma los resultados no fueron significativos (**tablas 11 B y 11 C**  $p > 0.05$ ). Esta asociación se hizo más específica de acuerdo a los resultados de cada intervención quirúrgica y el número de pacientes que se recuperaban en cada una de estas intervenciones. El análisis estadístico tampoco mostró asociaciones significativas (**tablas 12 y 13**  $p > 0.05$ ). Por lo tanto, concluimos que los anticuerpos de secreción IgA no jugaron un papel protector en contra de la infección causada por el VPH, y solo el tratamiento quirúrgico fue capaz de eliminar la infección. Esta observación es consistente con otros trabajos previos, los cuales reportan el éxito de estas terapias para el tratamiento de displasias (148) y lesiones NIC (149), hasta el nivel de prevenir nuevas lesiones (150).

## 8. CONCLUSIONES.

- Encontramos una asociación marcada de los anticuerpos sIgA en contra de la cápside del VPH 16, lo cual concuerda con varios reportes que también han asociado la presencia de anticuerpos en contra de VPH's tipo específicos.
- En este estudio la presencia de anticuerpos sIgA en pacientes sometidas a los tratamientos ablativos conservadores, no tuvieron ninguna relación en el resultado de este, por lo tanto no fueron capaces de proporcionar protección, y solo se les puede confiar un valor predictivo para infecciones relacionadas con el VPH.
- La baja sensibilidad del ensayo de ELISA puede limitar su uso como prueba de diagnóstico para infecciones causadas por el VPH 16, en comparación con las pruebas moleculares de PCR y CH, las cuales deben implementarse como métodos de diagnóstico para detectar VPH's en lesiones subclínicas, y tempranas. De esta manera podrá darse el tratamiento adecuado a las pacientes.
- La reacción acetoblanca del epitelio cervical en la zona de transformación se relaciona con infecciones subclínicas causadas por VPH's oncogénicos. Como consecuencia, las pacientes pueden tener un riesgo incrementado en desarrollar cáncer cervical.
- Los resultados del seguimiento sugieren que las terapias con asa y la vaporización con láser son altamente efectivas para el tratamiento de lesiones de bajo grado.

## 9. APÉNDICE

### Bromuro de Etidio 10 mg/ ml.

Se agrega 1g de Bromuro de Etidio a 100 ml de agua destilada estéril y se mantiene en agitación con un agitador magnético durante algunas horas hasta asegurarse que el colorante se haya disuelto. Se envuelve el contenedor de la solución con papel aluminio o se transfiere la solución a una botella oscura y se almacena a temperatura ambiente.

Precaución: El Bromuro de Etidio es un poderoso mutágeno. Deben utilizarse guantes de látex cuando se trabaje con soluciones que contengan este colorante y mascarilla o cubrebocas cuando sea pesado.

### Búfer de Digestión 100 ml.

1X

50 mM Tris-HCl	0.79g
1 mM EDTA .	0037g
0.5 % Tween 20	5.0ml

Disolver el Tris-HCl, EDTA y Tween 20 en 80 ml de agua desionizada y aforar a 100 ml .

Se alicuota y esteriliza en autoclave durante 20 min a 15lb/sq y se almacena a 4 °C.

### Búfer Gel Loading Tipo III 100 ml.

0.25 % Azul de Bromofenol	0.25g
0.25 % Xilencianol FF	0.25g
45.0 % Glicerol puro	45.0 ml

Se disuelven los colorantes en 20 ml de agua desionizada estéril con un agitador magnético hasta asegurarse de que están disueltos por completo (si es necesario, agregar otros 20 ml de agua). Se agrega poco a poco el glicerol manteniendo la agitación y se afora a 100 ml. Se alicuota la cantidad necesaria y se almacena junto con el stock a temperatura ambiente.

Éste búfer sirve para tres propósitos. Primero, incrementa la densidad de la muestra asegurando que el DNA siempre va a caer en el pozo del gel de agarosa, agrega color a la muestra simplificando el proceso de corrimiento, ya que los colorantes que tiene corren hacia el ánodo a tasas predecibles en un campo eléctrico. El azul de bromofenol migra a través de los geles de agarosa aproximadamente 2.2 veces más rápido que el Xilencianol FF, independientemente de la concentración de agarosa. El azul de bromofenol, en los geles de agarosa que corren con TBE 0.5 X, migra aproximadamente a la misma tasa que una molécula de DNA bicatenario de 300 pb en longitud, mientras que el Xilencianol FF lo hace a la misma tasa que migra una molécula de DNA lineal bicatenario de 4 Kb de longitud. Esta relación no es afectada significativamente por la concentración de agarosa en geles con rangos de concentración entre los 0.5 % y el 1.4 %.

Búfer de Reconstitución 100 ml.

10 mM Tris-HCl	0.16g
20 mM CaCl <sub>2</sub>	0.15g
50 % Glicerol puro	50 ml

Se disuelven las sales en 40 ml de agua desionizada y se agrega poco a poco el Glicerol. Una vez disueltos los componentes se afora a 100 ml y se almacena a 4 °C. Se puede almacenar a -20 °C si es que no tiene Glicerol, para evitar que la proteinasa K se precipite. Puede ocurrir crecimiento bacterial en las soluciones almacenadas a 4 °C cuando se

mantienen por largos periodos de tiempo. El  $\text{Ca}^{2+}$ , puede servir como estabilizador evitando la autólisis.

EDTA (Tetraacetato de etilenamin disodio) 1 M 1000 ml.

Agregar 372.2g de EDTA dihidratado en 800 ml de agua destilada, agitando vigorosamente con agitador magnético. Ajustar el pH a 8.0 con NaOH (aproximadamente 20g de pastillas de NaOH). Dispersar en alicuotas y esterilizar en autoclave durante 20 min a 15 lb/sq. La sal de EDTA no se disuelve hasta que el pH de la solución alcanza 8.0.

PBS 1000 ml (Búfer Salino de Fosfatos).

	<u>1X</u>	<u>10X</u>
KCL (Cloruro de Potasio)	0.20g	2.0g
NaCl (Cloruro de Sodio)	8.0g	80.0g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (Fosfato monobásico de Potasio)	0.24g	2.4g
$\text{Na}_2\text{PO}_4$ (Fosfato dibásico de Sodio)	1.44g	14.4g

Disolver el KCl, NaCl,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , y el  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  en 800 ml de agua desionizada y ajustar el pH a 7.0. aforar a 1000 ml y alicuotar la solución para esterilizarla en autoclave durante 20 min a 15lb/sq en ciclo líquido. Almacenar a temperatura ambiente.

Solución de lisis alcalina (NaOH/SDS): 0.2 N NaOH, 1% SDS en  $\text{H}_2\text{O}$  dd.

20 ml of 1 N NaOH (o 0.8 g)

10 ml of 10% SDS (o 1.0 g)

ddH<sub>2</sub>O to 100 ml (hacer en fresco)

TBE 1000ml (Búfer Tris-borato EDTA).

	<u>1X</u>	<u>5X</u>	<u>10X</u>
0.045 M Tris Base	5.45g	27.25g	54.5g
0.045 M Ácido bórico	2.78g	13.90g	27.8g
0.001 M EDTA	0.37g	1.85g	3.7g

Disolver el Tris-base, ácido bórico, y el EDTA en 800 ml d agua desionizada y ajustar el pH a 8.0. aforar a 1000 ml y alicuotar la solución para esterilizarla en autoclave durante 20 min a 15lb/sq en ciclo líquido y almacenar a temperatura ambiente.

Generalmente se forma un precipitado cuando las soluciones concentradas de TBE se almacenan durante largos periodos de tiempo.

TBS 1L

6.5 g Tris base, 8.7 g NaCl. Ajustar pH a 7.6. Aforar con H<sub>2</sub>O dd.

TE 1000ml (Búfer Tris-HCL EDTA (pH 8.0)).

	<u>1X</u>	<u>10X</u>
10 mM Tris-HCl	1.21g	12.11g
1 mM EDTA	0.37g	3.37g

Se disuelve el Tris-HCl y el EDTA n 800 ml de agua desionizada y se ajusta el pH a 8.0. Aforar a 1000 ml y alicuotar para esterilizar la solución en autoclave durante 20 min a 15lb/sq y almacenar a temperatura ambiente.

El pH de las soluciones Tris es termodependiente y disminuye aproximadamente a 0.03 unidades de pH por cada grado que se incrementa la temperatura. Por ejemplo, una

solución 0.05 M tiene un valor de pH de 9.5, 8.9 y 8.6 a 5 °C, 25 °C, y 37 °C, respectivamente.

dNTP's 2 mM 3 ml. Gibco/BRL, Life Technologies Inc., UK.

Se toman 60 µl de cada dNTP (dATP, dTTP, dGTP, y dCTP) y se colocan en un tubo Falcon estéril nuevo, el cual se mantiene en hielo. Se agregan 2.760 ml de agua inyectable y se agita a intervalos de 15 seg en un vórtex durante 1 min cuidando de volver a colocarlo en hielo entre cada agitación. Posteriormente se alicuotea y se mantiene a -20 °C.

Proteínasa K 16.5 mg/ml.

Se disuelve la proteínasa K en el búfer de reconstitución y se almacena 4 °C ó a -20 °C. Es una serinproteasa inespecífica. No es activada por iones metálicos, agentes quelantes (como el EDTA), reactivos sulfocrílicos o por inhibidores de tripsina o quimiotripsina. Es estable en un amplio rango de pH's (4 - 12.5), con una actividad óptima a pH entre 6.5 - 9.5. Su actividad puede aumentarse agregando agentes desnaturizantes como el SDS y la Urea. La temperatura óptima a la cual actúa la enzima es de 65 °C. A temperaturas mayores de la óptima, experimenta una rápida desnaturización.

Reconstitución y Almacenamiento de los Primers.

Para reconstituir:

- Centrifugar el tubo durante pocos segundos para colectar el DNA en el fondo del tubo.
- Abrir cuidadosamente y agregar un volumen adecuado de Búfer TE. Cerrar el tubo y dejar que el DNA se rehidrate por 2 min.

- Homogenizar usando un vórtex durante 15 seg.

Es recomendable que los primers sean reconstituidos en concentraciones grandes a 10  $\mu\text{mol}$  en Búfer TE y almacenar a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La estabilidad del material liofilizado almacenado a esta temperatura es de aproximadamente 1 año, mientras que la estabilidad del material reconstituido es de aproximadamente 6 meses.

## 10. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA.

- 1.- Sceautes Catherine. La detección del cáncer. Mundo científico, 11(9): 1004-1016 (1990).
- 2.- Reid R. Biology and colposcopic features of human papillomavirus-associated cervical diseases. *Obstet. Gyn. Clin. North Am.* 20: 123-149 (1993).
- 3.- Schiffman MH. New epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J Natl. Cancer Inst.* 87: 1345-1347 (1995).
- 4.- Wrigth TC, Ferenczy AF, Kurman RJ, editor. *Blaustein's Pathology of de female genital tract.* 4<sup>th</sup> ed. New York: Springer-Verlag. 229-278 (1994).
- 5.- Wrigth TC, Kurnam RJ. A critical review of the morphologic classification systems of preinvasive lesions of the cervix: the scientific basis of the paradigm. *Papillomavirus Reports.* 5: 175-181 (1994).
- 6.- Koutsky LA, Galloway DA, Holmes KK. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Epidemiologic reviews.* 10: 122-163 (1988).
- 7.- Tindle RW. *Vaccines for human papillomavirus infection and anogenital disease.* R. G. Landes Company. Austin, Texas, USA. 1999.
- 8.- Leopold G, Koss MD. The papanicolaou test for cervical cancer detection: a triumph and tragedy. *JAMA* 261: 737-743 (1989).
- 9.- Lazcano-Ponce EC, Patricia Nájera Aguilar, Patricia Alonso de Ruiz, Eva Buiatti, Mauricio Hernández Ávila. Programa de Detección Oportuna de Cáncer Cervical en México. I. Diagnóstico Situacional. *Cancerología.* 42: 123-140 (1996).

- 10.- Van R, MR Tachezy, and RD Burk. Human papillomaviruses: A neverending story? In: Papillomavirus reviews: Current research on papillomaviruses. Eds. C. Lacey, Leeds University Press, Leeds (1996).
- 11.- Lobatón TA, Edgar Román Bassaure, Rogelio Martínez Macías, Fernando Cruz Talonia. Cáncer cervicouterino. Evidencias a favor de una etiología multifactorial. Ginecología y Obstetricia de México. 55: 214-217 (1987).
- 12.- Durst, M., Gissman, L., Ikenberg, H., and Zur Hausen, H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80: 3812-3815 (1983).
- 13.- Boshart, M., Gissman, L., Ikenberg, H., Kleinheinz, A., Scheurlen, W., and Zur Hausen, H. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. EMBO J. 3: 1151-1157 (1984).
- 14.- Zur Hausen H., and Schneider A. The role of papillomaviruses in human anogenital cancer. In: P. M. Howell and N. P. Salzman (eds), The papillomaviruses, Vol. 2, pp. 245-263. New York: Plenum Publishing Corp. (1987).
- 15.- Wallboomers JMM, Marcel VJ, M Michele M, F Xavier B, J Alain K, Keerti VS, Peter JFS, Julian P, Chris JLMM and Nubia Muñoz. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J. Pathol. 189: 12-19 (1999).
- 16.- Zur Hausen H. Viruses in human cancers. Science. 254: 1167-1173 (1991).
- 17.- Dillner J, Anderson-Ellstrom A, Hagmar B, Schiller JT. High risk genital papillomavirus infections are not spread vertically. Rev. Med. Virol. 9: 23-29 (1999).
- 18.- Howley PM. Papillomaviridae: The virus and replication (NY, Raven Press) (1996).
- 19.- Schiffman MH. Recent progress in defining the epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. J Natl. Cancer Inst. 84: 394-398 (1992).

- 20.- Muñoz N, Bosch FX. HPV and cervical neoplasia: review of case control and cohort studies. *IARC Sci. Publ.* 119: 251-261 (1992).
- 21.- Tjoung-Won Park, M.D., Hisaya Fujiwara, M.D. Ph.D., and Thomas C. Wright, M.D. Molecular biology of cervical cancer and its precursors. *Cancer supplement.* 76: 1902-1913 (1995).
- 22.- Evander M, Frazer JH, Payne E et al. Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomavirus. *J Virol.* 71: 2449-2456 (1997).
- 23.- Syverton JT. The pathogenesis of the rabbit papilloma-to-carcinoma sequence. *Ann. NY Acad. Sci.* 54: 1126-1140 (1952).
- 24.- Kreider JW, Bartlett GL. The Shope papilloma-carcinoma complex of rabbits: A model system of neoplastic progression and spontaneous regression. *Adv. Cancer Res.* 35: 81-110 (1981).
- 25.- Hughes FJ, Romanos MA. E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. *Nucl. Acids Res.* 21: 5817-5823 (1993).
- 26.- Liu J-S, Kuo S-R, Broker TR, Chow LT. The function of human papillomavirus type 11 E1, E2 and E2C proteins in cell-free DNA replication. *J. Biol. Chem.* 270: 27283-27291 (1995).
- 27.- Clertant P, Seif I. A common functions for polyomavirus large-T and papillomavirus E1 proteins? *Nature.* 311: 276-279 (1984).
- 28.- Doobar J. The E4 proteins and their role in the viral life cycle. In: Lacey C, ed. *Papillomavirus reviews: Current Research on Papillomavirus.* Leeds: University Press, 1996: 31-38.
- 29.- Roberts S, Ashmole I, Rookes SM et al. Mutational analysis of the human papillomavirus type 16 E1-E4 proteins shows that the c terminus is dispensable for keratin

- cytoskeleton association but is involved in inducing disruption of the keratin filaments. *J Virol.* 71: 3554-3562 (1997).
- 30.-** Doobar J, Ely S, Sterling J et al. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature.* 352: 824-827 (1991).
- 31.-** Favre M, Ramoz N, Orth G. Human papillomaviruses: General factors. *Clin Dermatol.* 15: 181-198 (1997).
- 32.-** Straight SW, Herman B, McCance DJ. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes. *J Virol.* 69: 3185-3192 (1995).
- 33.-** Sedman SA, Barbosa MS, Vass WC, Hubbert NI, Haas JA, Lowly DR and Schiller JT. The full-length E6 protein of human papillomavirus type 16 has transforming and transactivating activities and cooperates with E7 to immortalize keratinocytes in culture. *J Virol.* 65: 4860-4866 (1991).
- 34.-** Lamberti C, Morrissey LC, Grossman SR and Androphy EJ. Transcriptional activation by the papillomavirus E6 zinc finger oncoprotein. *EMBO J.* 9: 1907-1913 (1990).
- 35.-** Desaintes C, Hallez S, Van Alphen P and Burny A. Transcriptional activation of several heterologous promoters by the E6 protein of human papillomavirus type 16. *J. Virol.* 66: 325-333 (1992).
- 36.-** Barbosa MS, Vass WC, Lowly DR, and Schiller JT. In vitro biological activities of the E6 and E7 genes vary among human papillomaviruses of different oncogenic potential. *J. Virol.* 65: 292-298 (1991).

- 37.- Huibregtse JM, Scheffner M and Howley PM. Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Mol. Cell. Biol.* 13: 775-784 (1993).
- 38.- Chen JJ, Reid CE, Band V and Androphy EJ. Interaction of papillomavirus E6 oncoproteins with a putative calcium-binding protein. *Science.* 269; 529-531 (1995).
- 39.- Scheffner M, Romanczuk H, Munger K, Huibregtse JM, Mietz JA and Howley PM. Functions of human papillomavirus proteins. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 186: 83-99 (1994).
- 40.- Munger K, and WC Phelps. The human papillomavirus E7 protein as a transforming and transactivating factor. *Biochimica et biophysica Acta*, 5. 1155: 111-123 (1993).
- 41.- Munger K, Cl Yee, WC Phelps, JA Pietenpol, HL Moses and PM Howley. Biochemical and Biological differences between E7 oncoproteins of the high- and low- risk human papillomavirus types are determined by amino-terminal sequences. *J Virol.* 65: 3943-3948 (1991).
- 42.- Takami Y, T Sasagawa, TM Sudiro, M Yutsudo and A Hakura. Determination of the functional difference between human papillomavirus type 6 and 16 E7 proteins by their 30 N-terminal amino acids residues. *Virology.* 186: 489-495 (1992).
- 43.- Sang BC, Barbosa MS. Single amino acid substitutions in "low-risk" human papillomavirus (HPV) types 6 E7 protein enhance features characteristic of the "high-risk" HPV E7 oncoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 8063-8067 (1992).
- 44.- Heck DV, Yee CL, Howley PM, Münger K. Efficiency of binding the retinoblastoma protein correlates with the transformation capacity of the E7 oncoproteins of the human papillomavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 4442-4446 (1992).

- 45.- Trus BL, Roden RB, Greenstone HL, Vrhel M, Schiller JT, and Booy FP. Novel structural features of bovine papillomavirus capsid revealed by three-dimensional reconstruction to 9 Å resolution. *Nature Struct. Biol.* 4: 413-420 (1997).
- 46.- Zhou J, Doorbar J, Sun XY, Crawford LV, McLean CS, and Frazer IH. Identification of the nuclear localization signal of human papillomavirus type 16 L1 protein. *Virology.* 185: 625-632 (1991).
- 47.- Kirnbauer R, Taub J, Greenstone H, Roden R, Durst M, Gissmann L, Lowy DR and Schiller JT. Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J Virol.* 67: 6929-6936 (1993).
- 48.- Volpers C, Schirmacher P, Streeck RE and Sapp M. Assembly of the major and minor capsid protein of human papillomavirus type 33 into virus-like particles and tubular structures in insect cells. *Virology.* 200: 504-512 (1994).
- 49.- Xiaojian SCJ, Gregory C, Stephen CH and Robert LG. Papillomavirus capsid protein expression in *Escherichia coli*: purification and assembly of HPV 11 and HPV 16 L1. *J Mol. Biol.* 307: 173-182 (2001).
- 50.- Roden RB, Greenstone HL, Kirnbauer R, Booy FP, Jessie J, Lowy DR, and Schiller JT. In vitro generation and type-specific neutralization of a human papillomavirus type 16 virion pseudotype. *J Virol.* 70: 5875-5883 (1996).
- 51.- Christensen ND, Kreider JW, Kan NC and DiAngelo SL. The open reading frame L2 of cottontail rabbit papillomavirus contains antibody-inducing neutralizing epitopes. *Virology.* 181: 572-579 (1991).
- 52.- Roden RB, Weissinger EM, Hemderson DW, Booy F, Kirnbauer R, Mushinski JF, Lowy DR, and Schiller JT. Neutralization of bovine papillomavirus by antibodies to L1 and L2 capsid proteins. *J Virol.* 68: 7570-7574 (1994).

- 53.-** Gaukroger JM, Chandrachud LM, O'Neil BW, Grindlay GJ, Knowles G and Campo MS. Vaccination of cattle with bovine papillomavirus type 4 L2 elicits the production of virus-neutralizing antibodies. *J. Gen. Virol.* 77: 1577-1583 (1996).
- 54.-** Liddington RC, Yan Y, Moulai J, Sahli R, Benjamin TL, and Harrison SC. Structure of simian virus 40 at 3.8 resolution. *Nature.* 354: 278-284 (1991).
- 55.-** Rho J, Roy-Burman A, Kim H, de Villiers EM, Matsukara T and Choe J. Nucleotide sequence and phylogenetic classification of human papillomavirus type 59. *Virology.* 203: 158-161 (1994).
- 56.-** O'Connor M, Chan S-Y, Bernard HU. Transcription factor bindings sites in the long control region of genital HPV's In: Myers G, Delius H, Icenogel J et al, eds. *Human papillomavirus 1995. A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences.* Los Alamos: Los Alamos National Laboratory, 1995: III-21-III-40.
- 57.-** Yukawa K, Butz K, Yasui T, et al. Regulations of papillomavirus transcription by the differentiation-dependent epithelial factor Epuc-1/skn-1a. *J Virol.* 70; 10-16 (1996).
- 58.-** Durst M, Kleinheinz A, Hotz M, Gissmann L. The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumors. *J Gen. Virol.* 66: 1515-1522 (1985).
- 59.-** Cullen AP, Reid R, Campion M, Lorinez AT. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical naoplams. *J Virol.* 65: 606-612 (1991).
- 60.-** Daniel B, Mukherjee G, Seshadri L, Vallicard E, Krishna S. Changes in the physical state and expression of human papillomavirus type 16 in the progression of cervical intraepithelial neoplasia lesions analysed by PCR. *J Gen. Virol.* 76: 2589-2593 (1995).

- 61.-** Frattini MG, Lim HB, Laimins LA. In vitro synthesis of oncogenic human papillomaviruses requires episomal genomes for differentiation-dependent late expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 3062-6067 (1996).
- 62.-** Cole HM. Diagnostic and therapeutic technology assessment: human papillomavirus DNA testing in the management of cervical neoplasia. *J Am. Med. Assoc.* 270: 2975-2981 (1993).
- 63.-** Stoler MH. A brief synopsis of the role of human papillomavirus in cervical carcinogenesis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 175: 1091-1098 (1996).
- 64.-** Baker CC, Phelps WC, Lindgren V, Braun MJ, Gonda MA, Howley PM. Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Virol.* 61: 962-971 (1987).
- 65.-** Bedell MA, Jones KH, Laimins LA. The E6E7 region of human papillomavirus type 18 is sufficient for transformation of NIH 3T3 and rat-1 cells. *J Virol.* 61; 3535-3640 (1987).
- 66.-** Scheffner M, Werness BA, Hubregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell.* 63: 1129-1136 (1990).
- 67.-** Scheffner M, Huibregtse JM, Viestra RD and Howley PM. The HPV16-E6 and E6-AP complex functions as a Ubiquitin-Protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell.* 75: 495-505 (1993).
- 68.-** Stoler MH, Rhodes MH, Witbeck A, et al. Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias. *Hum. Pathol.* 23: 117-128 (1992).

- 69.- Durst M, Glitz D, Schneider A, et al. Human papillomavirus type 16 (HPV 16) gene expression and DNA replication in cervical neoplasia: Analysis by in situ hybridization. *Virology*. 189: 132-140 (1992).
- 70.- Knowles G, O'Neill BW, Campo MS. Phenotypical characterization of lymphocytes infiltrating regressing papillomas. *J Virol*. 70: 8451-8458 (1996).
- 71.- Arany I, Tying SK. Status of local cellular immunity in interferon-responsive and – nonresponsive human papillomavirus-associated lesions. *Sex. Transm. Dis.* 23: 475-480 (1996).
- 72.- Selvakumar R, Schmitt A, Iftner T et al. Regression of papillomas induced by cottontail rabbit papillomavirus is associated with infiltration of CD8 + cells and persistence viral DNA after regression. *J Virol*. 71: 5540-5548 (1997).
- 73.- Coleman N, Birley HD, Renton AM et al. Immunological events in regressing genitals warts. *Am. J Clin. Pathol.* 102: 768-773 (1994).
- 74.- Borysiewics LK, Fiander A, Nimako M et al. A recombinant vaccinia virus encoding human papillomavirus types 16 and 18, E6 and E7 proteins as immunotherapy for cervical cancer. *Lancet*. 347: 1523-1527 (1996).
- 75.- Fisher SG, Benitez-Bribiesca L, Nindl I et al. The association of human papillomavirus type 16 E6 and E7 antibodies with stage of cervical cancer. *Gynecol. Oncol.* 61: 73-78 (1996).
- 76.- Dillner J, Dillner L, Robb J et al. A synthetic peptide defines a serologic IgA response to a human papillomavirus-encoded nuclear antigen expressed in virus-carrying cervical neoplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86: 3838-3841 (1989).

- 77.- Wang ZH, Hansson BG, Forslund O, Dillner L, Sapp M, Schiller JT, Bjerre B, Dillner J. Cervical mucus antibodies against human papillomavirus type 16, 18 and 33 capsids in relation to presence of viral DNA. *J Clin. Microbiol.* 34: 3056-3062 (1996).
- 78.- Selvakumar R, Borenstein LA, Lin YL et al. Immunization with nonstructural proteins E1 and E2 of cottontail rabbit papillomavirus stimulates regression of virus-induced papillomas. *J Virol.* 69: 602- 605 (1995).
- 79.- Feltkamp MC, Smits HL, Vierboom M et al. Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16 -transformed cells. *Eur. J Immunol.* 23: 2242-2249 (1993).
- 80.- Chen L, Mizuno MT, Singhal MC et al. Induction of cytotoxic T lymphocytes specific for a syngenic tumor expressing the E6 oncoprotein of human papillomavirus type 16. *J Immunol.* 148: 2617-2621 (1992).
- 81.- Muller M, Zhou J, Reed TD et al. Chimeric papillomavirus-like particles. *Virology.* 234: 93-111 (1997).
- 82.- Kirnbauer R, Gubert NL, Wheeler CM, Becker TM, Lowy DR, Schiller JT. A virus-like particle enzyme linked immunosorbent assay detects serum antibodies in a majority of women infected with human papillomavirus type 16. *J Natl Cancer Insts.* 86: 494-499 (1994).
- 83.- Lehtinen M, Dillner J, Knekt P, Loustarinen T, Aromaa A, Kirnbauer R, Koskela P, Paavonen J, Peto R. Schiller JT, and Hakama M. serologically diagnosed infection with human papillomavirus type 16 and risk for subsequent development of cervical carcinoma: nested case-control study. *Brit. Med. J.* 312: 537-539 (1996).

- 84.-** Carter JJ, Koutsky LA, Wipf GC, et al. The natural history of human papillomavirus type 16 capsid antibodies among a cohort of university women. *J Infect Dis.* 174: 927-936 (1996).
- 85.-** Wang ZH, Kjellberg L, Abdalla H, Wiklund F, Eklund C, Knekt P, Lehtinen M, Kallings I, Lenner P, Hallmans G, Mahlck CG, Wadel G, Schiller J, Dillner J. Type specificity and significance of different isotypes of serum antibodies to human papillomavirus capsids. *J Infect. Dis.* 181: 456-462 (1999).
- 86.-** Bontkes HJ, de Guijil TD, Walboomers JMMM, Schiller JT, Dillner J, Helmerhost TJM, Verheijem RHM, Scheper RJ, Meijer CJLM. Immune response against human papillomavirus type 16 (HPV 16) virus-like particles in a cohort study of women with cervical intraepithelial neoplasia: systemic but not local IgA responses correlate with clearance of HPV 16. *J Gen Virol.* 80: 409-417 (1999).
- 87.-** Dillner J. The serological response to papillomavirus. *Sem. Cancer Biol.* 9: 423-430 (1999).
- 88.-** Kirnbauer R, F Boy, N Cheng, DR Lowly and JT Schiller. Papilomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. UAS.* 89: 12180-12184 (1992).
- 89.-** Rose RC, W Bonnez, RC Reichman and L Garcea. Expression of human papillomavirus type 11 L1 protein in insect cells: in vivo and in vitro assembly of virus-like particles. *J Virol.* 67: 1936-1944 (1993).
- 90.-** Hofmann K, J Cook, J Joyce, DR Brown, LD Schulz, HA George, M Rosolowsky, KH Fife and KU Jansen. Sequence determination of human papilomavirus 6a and assembly of virus-like particles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Virology.* 209: 506-518 (1995).

- 91.-** Sasagawa T, Pushko, G Steers, SE Gschmeinsner, MA Hajibagheri, J Finch, L Crawford and M Tomassino. Synthesis and assembly of virus-like particles of human papillomavirus type 6 and type 16 in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Virology*. 206: 126-135 (1995).
- 92.-** Li ML, TP Cripe, PA Estes, MK Lyon, RC Rose and RL Garcea. Expression of the human papillomavirus type 11 L1 capsid protein in *Escherichia coli*: characterization of protein domains involved in DNA binding and capsid assembly. *J Virol*. 71: 2988-2995 (1997).
- 93.-** Breitburd F, R Kirnbauer, NL Hubbert, B Nonnenmacher, C Trindinh-Desmarquet, G Orth, JT Schiller and DR Lowly. Immunization with virus-like particles from cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) can protect against experimental CRPV infection. *J Virol*. 69: 3959-3963 (1995).
- 94.-** Christensen ND, CA Reed, NM Cladel, R Han and JW Kreider. Immunization with virus like particles induces long-term protection of rabbits against challenge with cottontail rabbit papillomavirus. *J Virol*. 70: 960-965 (1996).
- 95.-** Jansen KU, Rosolowsky, LD Schulz, HZ Markus, JC Cook, JJ Donnelly, D Martinez, RW Ellis and AR Shaw. Vaccination with yeast-expressed cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) virus-like particles protects rabbits from CRPV-induced papilloma formation. *Vaccine*. 13: 1509-1514 (1995).
- 96.-** Lowe RS, DR Brown, JT Bryan, JC Cook, HA George and KJ Hofmann. Human papillomavirus type 11 neutralizing antibodies in the serum and mucosal secretions of African green monkeys immunized with HPV-11 virus-like particles expressed in yeast. *J Infect. Dis*. 176: 1141-1145 (1997).

- 97.-** Suzich JA, S Ghim, FJ Palmer-Hill, WJ White, JK Tamura, JA Bell, JA Newsome, AB Jenson and R Schlegel. Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 11553-11557 (1995).
- 98.-** Kirnbauer R, LM Chandrachud, BW O'Neill, GJ Grindlay, A Armstrong, GM McGarvie, JT Schiller, DR Lowly and MS Campo. Virus-like particles of bovine papillomavirus type 4 in prophylactic and therapeutic immunization. *Virology.* 219: 37-44 (1996).
- 99.-** Wendy IW, Susan DW, Frances J Palmer-Hill, Robert MW, Shin-Je G, Lisa AH, Daniel MG, Steven JB, AB Jenson, Scott K, and Joann AS. Characterization of a major neutralizing epitope on human papillomavirus type 16L1. *J Virol.* 73: 4882-4889 (1999).
- 100.-** Dupuy C, D Buzoni Gatel, A Touze, P LeCann, D Bout and P Coursaget. Cell mediated immunity induced in mice by HPV 16L1 virus-like particles. 22: 219-225 (1997).
- 101.-** Nikoloff BJ, Turka LA. Keratinocytes: Immunocytes of the integument. *Am. J Pathol.* 143: 325-331 (1993).
- 102.-** Bennett SRM, FR Carbone, F Karamalis et al. Induction of a CD8 + T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4 + T cell help. *J Exp. Med.* 186: 65-70 (1997).
- 103.-** Wang ZC, Christensen ND, Schiller JT, Dillner J. A monoclonal antibody against intact human papillomavirus type 16 capsids blocks the serological reactivity of most human sera. *J Gen. Virol.* 78: 2209-2215 (1997).
- 104.-** Harro CD, Yu-Ying SP, Roden RBS, Hildeshein A, Wang Z, Reynodls MJ, Mast TC, Robinson R, Murphy BR, Karron RA, Dillner J, Schiller JT, Lowy DR. Safety and

immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine. *J Natl Cancer Inst.* 93: 284-292 (2001).

**105.-** Christensen ND, Hopfl R, Di Angelo SL, et al. Assembled baculovirus-expressed human papillomavirus type 11 L1 capsid protein virus-like particles are recognized by neutralizing monoclonal antibodies and induce high titres of neutralizing antibodies. *J Gen virol.* 75: 2271-2276 (1994).

**106.-** Roden RB, Nancy L Hubbert, Reinhard Kirnbauer, et al. Assessment of the serological relatedness by hemoagglutination inhibition. *J Virol.* 70: 3298-3301 (1996).

**107.-** White WI, Wilson SD, Bonnez W, et al. In vitro infection and type restricted antibody-mediated neutralization of authentic HPV 16. *J Virol.* 72: 959-964 (1998).

**108.-** Lin YL, Borestein LA, Selvakumar R, et al. Effective vaccination against papilloma development by immunization with L1 or L2 structural protein of cottontail rabbit papillomavirus. *Virology.* 187: 612-619 (1992).

**109.-** Lamm ME. Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. *Annu Rev Microbiol.* 51: 311-340 (1997).

**110.-** Shroff KE, Meslin K, Cebra JJ. Commensal enteric bacteria engender a self-limiting humoral mucosal immune response while permanently colonizing the gut. *Infect Immun.* 63: 3904-3913 (1995).

**111.-** Feng N, Burns JW, Bracy L, Greenberg HB. Comparison of mucosal and systemic humoral immune responses and subsequent protection in mice orally inoculated with a homologous or a heterologous rotavirus. *J Virol.* 68: 7766-7773 (1994).

**112.-** Onorato IM, Modlin JF, McBean AM, et al. Mucosal immunity induced by enhanced.potency inactivated and oral polio vaccines. *J Infect Dis.* 163: 1-6 (1990).

- 113.-** Reuman PD, Bernstein DI, Keely SP, Sherwood JR, Young EC, Schiff GM. Influenza-specific ELISA IgA and IgG predict severity of influenza disease in subjects pre-screened with hemagglutination inhibition. *Antiviral Res.* 13: 103-110 (1990).
- 114.-** Ruiz-Palacios GM, Calva JJ, Pickering LK. Protection of breastfed infants against *Campylobacter* diarrhoea by antibodies in human milk. *J Pediatr.* 116: 707-713 (1990).
- 115.-** Weltzin R, Traina-Dorge V, Soike K, Zhang JY, Mack P, et al. Intranasal monoclonal IgA antibody to respiratory syncytial virus protects rhesus monkeys against upper and lower respiratory tract infection. *J Infect Dis.* 174: 256-261 (1996).
- 116.-** Blanchard TG, Czinn SJ, Maurer R, et al. Urease-specific monoclonal antibodies prevent *Helicobacter felis* infection in mice. *Infect Immun.* 63: 1394-1399 (1995).
- 117.-** Cotter TW, Meng Q, Shen Z-L, Zhang Y-X, Su H, Caldwell HD. Protective efficacy of major outer membrane protein-specific immunoglobulin A 8IgA) and IgG monoclonal antibodies in a murine model of *Chlamydia trachomatis* genital tract infection. *Infect Immun.* 63. 4704-4714 (1995).
- 118.-** Phalipon A, Kaufman M, Michetti P, Cavaillon JM, Huerre M, et al. Monoclonal immunoglobulin A antibody directed against serotype-specific epitope of *Shigella flexneri* lipopolysaccharide protects against murine experimental shigellosis. *J Exp Med.* 182: 769-778 (1995).
- 119.-** Weltzin R, Hsu SA, Mitller ES, Georgakopoulos K, Monath TP. Intranasal monoclonal immunoglobulin A against respiratory syncytial virus protects against upper and lower respiratory tract infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 38: 2785-2791 (1994).

- 120.-** Apter FM, et al. Analysis of the roles of antipolysaccharide and anti-cholera toxin immunoglobulin A (IgA) antibodies in protection against *Vibrio cholerae* and cholera toxin by use of monoclonal IgA antibodies *in vivo*. *Infect Immun.* 61: 5279-5285 (1993).
- 121.-** Czinn SJ, Cai A, Nedrud JG. Protection of germ-free mice from infection by *Helicobacter felis* after oral or passive IgA immunization. *Vaccine.* 11: 637-642 (1993).
- 122.-** Mazanec MB, Lamm ME, Lyn D, Portner A, Nedrud JG. Comparison of IgA versus IgG monoclonal antibodies for passive immunization of the murine respiratory tract. *Virus Res.* 23: 1-12 (1992).
- 123.-** Michetti P, Mahan MJ, Slauch JM, Mekalanos JJ, Neutra MR. Monoclonal secretory immunoglobulin A protects mice against oral challenge with the invasive pathogen *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun.* 60: 1786-1792 (1992).
- 124.-** Kenneth F and Trofatter Jr. Diagnosis of human papillomavirus genital tract infection. *Am. J Med.* 102: (5A) 21-27 (1997).
- 125.-** Lazcano-Ponce E, et al. Epidemiology of infection among Mexican women with normal cervical cytology. *Int J Cancer.* 91: 412-420 (2001).
- 126.-** Ken-Lin Chua, Fredrik Wiklund, Per Lenner, et al. A prospective study on the risk of cervical intraepithelial neoplasia among healthy subjects to HPV compared with HPV DNA in cervical smears. *Int J Cancer.* 68: 54-59 (1996).
- 127.-** Handsfield HH. Clinical presentation and natural course of anogenital warts. *Am J Med.* 102: 16-20 (1997).
- 128.-** Ylitalo N, Josefsson A, Melbye M, et al. A prospective study showing long-term infection with human papillomavirus 16 before the development of cervical carcinoma *in situ*. *Cancer Res* 60: 6027-6032 (2000).

- 129.-** Saito J, Fukuda T, Hoshiai H, Noda K. High-risk types of human papillomavirus associated with the progression of cervical dysplasia to carcinoma. *J Obstet Gynaecol Res* 25: 281-286 (1999).
- 130.-** Rocha ZL, Tonatiuh BG, Alejandro GC, Victor V, Fernando CT. Cervical secretory immunoglobulin A to human papillomavirus type 16 (HPV 16) from HPV 16-infected women inhibit HPV 16 virus-like particles-induced hemagglutination of mouse red blood cells. *FEMS Immunol. Medical Microbiol.* 1320: 1-5 (2001).
- 131.-** Dillner J, Wiklund F, Lenner P, et al. Antibodies against linear and conformational epitopes of human papillomavirus type 16 that independently associate with incident cervical cancer. *Int J Cancer.* 60: 377-382 (1995).
- 132.-** Wikstrom A, Eklund C, Von Krogh G, Lidbrink P, Dillner J. Antibodies against human papilloamvirus type 6 capsids are elevated in men with previous condylomas. *APMIS.* 105: 884-888 (1997).
- 133.-** Eisemann C, Fisher SG, Gross G, Muller M, Gissman L. Antibodies to human papillomavirus type 11 virus-like particles in sera of patients with genital warts and in control groups. *J Gen virol.* 77: 1799-1803 (1996).
- 134.-** Carter JJ, Wipf GC, Hagensee ME, et al. Use of human papillomavirus type 6 capsids to detect antibodies in people with genital warts. *J Infect Dis.* 172: 11-18 (1995).
- 135.-** Cheng G, Icenogle JP, Kirnbauer R, et al. Divergent human papillomavirus type 16 variants are serologically cross-reactive. *J Infect Dis.* 172: 1584-1587 (1995).
- 136.-** Ellis JR, Etherington I, Galloway D, Luesley D, Young LS. Antibody responses to HPV16 virus-like particles in women with cervical intraepithelial neoplasia infected with a variant HPV16 [letter]. *Lancet.* 349: 1069-1070 (1997).

- 137.-** Southern SA, Herrington CS. Differential cell cycle regulation by low- and high-risk human papillomavirus in low-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Cancer Res.* 58: 2941-2945 (1998).
- 138.-** Cottage A, Downen S, Roberts I, Pett M, Coleman N, Stanley M. Early genetic events in HPV immortalized keratinocytes. *Gen Chrom Cancer.* 30: 72-79 (2001).
- 139.-** Clavel C, Masure M, Bory JP, Putaud I, et al. Hybrid capture II-based human papillomavirus detection, a sensitive test to detect in routine high-grade cervical lesions: a preliminary study on 1518 women. *Br J Cancer.* 80: 1306-1311 (1999).
- 140.-** Riethmuller D, Gay C, Bertrand X, et al. Genital human papillomavirus infection among women recruited for routine cervical cancer screening or for colposcopy determined by hybrid capture II and polymerase chain reaction. *Diagn Mol Pathol.* 8: 157-164 (1999).
- 141.-** Kjaer SK, Chackerian B, van den Brule AJ, Svare EI, et al. High-risk human papillomavirus is sexually transmitted: evidence from a follow-up study virgins starting sexual activity (intercourse). *Cancer epidemiol Biomarkers Prev.* 10: 101-106 (2001).
- 142.-** Veress G, Konya T, Csiky-Meszaros J, et al. Human papillomavirus DNA and anti-HPV secretory IgA antibodies in cytologically normal cervical specimens. *J Med Virol.* 43: 201-207 (1994).
- 143.-** Marais DJ, Best JM, Rose RC, Keating P et al. Oral antibodies to human papillomavirus type 16 in women with cervical neoplasia. *J Med Virol.* 65: 149-154 (2001).
- 144.-** Sasagawa T, Yamazaki H, Dong YZ, Satake S, Tateno M, and Inoue M. Immunoglobulin-A and -G responses against virus-like particles (VLP) of human papillomavirus type 16 in women with cervical cancer and cervical intra-epithelial lesions. *Int J Cancer.* 75: 529-535 (1998).

- 145.-** Wang Z, Kjellberg L, Abdalla H, Wiklund F et al. Type specificity and significance of different isotypes of serum antibodies to human papillomavirus capsid. *J Infect Dis.* 181: 456-462 (2000).
- 146.-** Wideroff L, Schiffman M, Haderer P et al. Seroreactivity of human papillomavirus types 16, 18, 31, and 45 virus-like particles in a case-control study of cervical squamous intraepithelial lesions. *J Infect Dis.* 180: 1424-1428 (1999).
- 147.-** Hagensee ME, Koutsky LA, Lee SK et al. Detection of cervical antibodies to human papillomavirus type 16 (HPV 16) capsid antigens in relation to detection of HPV-16 DNA and cervical lesions. *J infect Dis.* 181: 1234-1239 (2000).
- 148.-** Lee KE, Koh CF, Watt WF. Outpatient procedures for cervical dysplasia: a 3 year review of laser vaporisation and LEEP. *Med J Malaysia.* 54: 47-51 (1999).
- 149.-** Paraskevaidis E, Kalantaridou SN, Georgiou I, Koliopoulos G, Pappa L, Malamou-Mitsi V, Agnantis NJ, Kitchener HC, Lolis DE. Spontaneous evolution of human papillomavirus infection in the uterine cervix. *Anticancer Res.* 19: 3473-8 (1999).
- 150.-** Mann CH, Steele JC, Burton A, Bailey AS, Etherington IJ, Luesley DM. LLETZ- Evidence of its efficacy against HPV infection. *Gynecol Oncol.* 81:125-127 (2001).
- 151.-** Muñoz N and Bosch FX. Cervical and human papillomavirus: Epidemiological evidence and prospectives from prevention. *Salud Pública de México.* 39; 274-282 (1997).
- 152.-** Huibregtse JM, and Silvie Beaudemon. Mechanism of HPV E6 proteins in cellular transformation. *Seminars in Cancer Biology.* 7: 317-326 (1996).
- 153.-** Breitburd F and Pierre Coursaget. Human papillomavirus vaccines. *Sem Cancer Biol.* 9: 431-445 (1999).
- 154.-** Stubenrauch F and Laimins LA. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Sem. Cancer Biol.* 9: 379-386 (1999).

155.- Lane DP. p53 guardian of the genome. *Nature*. 358: 15-16 (1992).