



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CARRERA DE BIÓLOGO

**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y
CÁNCER**

LABORATORIO DE INMUNOBIOLOGÍA

**DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IgG ESPECÍFICOS A PÉPTIDOS
HOMÓLOGOS DE LA PROTEÍNA L1 DE VPH DE ALTO RIESGO EN
SUEROS DE RATONES C57 BL/6, INMUNIZADOS CON LA VACUNA
GARDASIL**

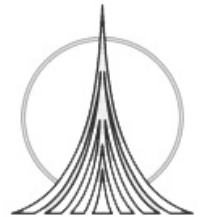
T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO
P R E S E N T A :
MUÑOZ GÓMEZ DAN EDUARDO

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. ALBERTO MONROY GARCÍA

MÉXICO, D. F.

2008





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS

El presente proyecto de investigación se realizó en el Laboratorio de Inmunología de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, FES-Zaragoza, UNAM; bajo la dirección del Dr. Alberto Monroy García a quien le ofrezco mi más sincero agradecimiento por el simple hecho de permitirme pertenecer a su grupo de trabajo y sobre todo por ser más que un tutor para mí al demostrarme siempre respeto, apoyo moral, confianza y paciencia.

Al M en C. Jorge Hernández Montes y a la Dra. Ma. de Lourdes Mora García. A ambos, un agradecimiento muy especial por las enseñanzas, por su asesoría, por todo el apoyo que me brindaron y sobre todo por todas las atenciones que tuvieron para conmigo.

A los Miembros del Jurado: M. en C. Catalina Machuca Rodríguez, Dr. Alberto Monroy García, Dra. Ma. de Lourdes Mora García, M en C. Jorge Hernández Montes y M. en C. Yolanda Córdova Galaviz. A todos, les agradezco las sugerencias realizadas a este trabajo las cuales sin lugar a dudas ayudaron a enriquecer el mismo.

El presente proyecto de investigación se realizó en el Laboratorio de Inmunología de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, FES-Zaragoza, UNAM

ESTE TRABAJO FUE FINANCIADO POR LOS PROYECTOS:

DGAPA-PAPIIT:

IN212506

CONACYT:

47615-Q

SILANES-FUNSAUD:

No. 536

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
CaCu	Cáncer cervico uterino
CPA	Célula presentadora de antígeno
D.O	Densidad óptica
DOC	Detección oportuna de cáncer
E	del inglés, earlier (Temprano)
ELISA	del inglés, Enzyme linked immunosorbent assay (Ensayo de inmunoabsorbancia ligado a enzimas)
FUTURE	siglas en inglés de Mujeres Unidas para Reducir Unilateralmente las Enfermedades Ecto- y Endocervicales
HSIL	del inglés High-grade squamous intraepithelial lesions (Lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado)
I.6.M	Inmunización después de seis meses
Ig	Inmunoglobulina o anticuerpo
IVSA	Inicio de la vida sexual activa
L	del inglés, last (Tardío)
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
P	Péptido
P.I	Péptido irrelevante
Pap	Papanicolaou
PBS	del inglés, Phosphates buffer solution, Solución bufer de fosfatos
PCR	del inglés Polimerase chain reaction, Reacción en cadena de polimerasa
PRR	Papilomatosis respiratoria recurrente
Rb	Retinoblastoma
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia humana
SP	Salud pública
TGI	Tracto genital inferior
VHB	Virus de la hepatitis B
VLP	del inglés, Virus-like particles (Partícula pseudoviral)
VPH	Virus de papiloma humano

NOMENCLATURA DE AMINOÁCIDOS

A	Alanina	T	Treonina
F	Fenilalanina	D	Ácido aspártico
G	Glicina	R	Arginina
I	Isoleucina	N	Asparagina
L	Leucina	Y	Tirosina
M	Metionina	K	Lisina
P	Prolina	Q	Glutamina
S	Serina	H	Histidina
V	Valina	C	Cisteína
W	Triptófano	E	Ácido glutámico

ÍNDICE

Contenidos	Página
ABREVIATURAS	
RESUMEN.....	1
MARCO TEÓRICO.....	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	16
HIPÓTESIS.....	18
OBJETIVOS.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
RESULTADOS.....	23
ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	30
CONCLUSIONES.....	34
PERSPECTIVAS.....	35
BIBLIOGRAFÍA.....	36
APÉNDICE.....	45

RESUMEN

Dentro de las enfermedades de transmisión sexual, la infección por VPH es una de las más comunes. Se ha estimado que más del 60% de la población sexualmente activa, está infectada con algún tipo de VPH (Frazer, 2004). Aunque 90% de las infecciones se resuelven espontáneamente, la infección persistente con VPH de alto riesgo como VPH-16 y 18, se ha asociado con el desarrollo de neoplasias intraepiteliales cervicales y anogenitales. Por esta razón, es importante establecer métodos que permitan detectar de manera oportuna las infecciones por estos virus. La detección de anticuerpos dirigidos contra antígenos del VPH por el método de ELISA, en la población general se ha tratado de utilizar como un marcador de exposición acumulada de la infección, particularmente la presencia de anticuerpos contra proteínas tardías L1 y L2 que sugieren una infección previa (Kaelin *et al*, 1992). Recientemente, nuestro grupo de investigación ha identificado que la secuencia 417-425 (péptido IHSMNSTIL) o P16, derivado de la proteína L1 del VPH-16, la cual es altamente conservada entre secuencias L1 de varios VPH de alto riesgo asociados a CaCu, es fuertemente reconocida por anticuerpos presentes en sueros de más del 90% de mujeres que presentan infección por VPH de alto grado (Rocha-Zavaleta *et al*, 2004). Sugiriendo entonces que el péptido P16 es un determinante antigénico y puede ser de gran utilidad en la detección de infecciones por VPH de alto riesgo en individuos infectados. Por otro lado, tomando en consideración que la vacuna tetravalente GARDASIL contiene VLP's constituidas de la proteína L1 de VPH-6, -11, -16 y -18 e induce fuertemente la generación de anticuerpos hacia estas partículas en los individuos vacunados (Koutsky *et al*, 2002); en el presente trabajo, en un modelo *in vivo* utilizamos ratones hembra de la cepa C57 BL/6 vacunados con GARDASIL, con la finalidad de analizar la presencia de anticuerpos séricos de tipo IgG específicos al péptido IHSMNSTIL (P16) y a sus homólogos pertenecientes a la proteína L1 de virus de alto riesgo como VPH-18 (IHSMNSSIL) (P18), VPH-31 (IHSMNPAIL) (P31), VPH-33 (IHAMNPDIL) (P33), VPH-52 (IHKMDATIL) (P52), VPH-58 (IHTMDSNIL) (P58) y de bajo riesgo de VPH-6 (IHTMNPSVL) (P6) y VPH-11 (IHTMNPSVL) (P11). Se aplicaron 3 dosis de 5 µg de la vacuna GARDASIL por ratón, a un grupo de nueve ratones durante 15 días y 4 dosis de 100 µg de cada uno de los péptidos a lotes de 3 ratones independientes, por espacio de 15 días. Mediante ensayos de ELISA se monitorearon los títulos de

anticuerpos en los ratones inmunizados. A partir de la primera inmunización se encontraron títulos altos de anticuerpos hacia la vacuna GARDASIL, no obstante los títulos más altos de anticuerpos hacia los péptidos se obtuvieron después de la tercera inmunización. Anticuerpos séricos obtenidos de ratones inmunizados con la vacuna GARDASIL reconocieron fuertemente a todos los péptidos, especialmente a P16, P18 y P6/11. Asimismo anticuerpos séricos de ratones inmunizados con P16, P18 y P6/11 reconocieron fuertemente a VLP's de la vacuna GARDASIL, aunque también sueros de ratones inmunizados con los péptidos P31, P33, P52 y P58 mostraron reactividad cruzada, pero con menor intensidad hacia VLP's de la vacuna. Estos resultados permiten sugerir que el péptido P16, y/o sus homólogos P18, P6/11, P31, P33, P52 y P58 pueden ser útiles en la detección y monitoreo de los anticuerpos de memoria en individuos que han generado respuesta inmune de manera natural o inducida hacia la proteína estructural L1 de varios tipos de VPH.

MARCO TEÓRICO

CÁNCER CÉRVICO UTERINO Y VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO.

El cáncer cérvico uterino (CaCu) es considerado el segundo tipo de cáncer más común a nivel mundial y como la primer causa de muerte por neoplasias en nuestro país (Torroella *et al.*, 1998). Varios estudios epidemiológicos indican que el virus del papiloma humano (VPH) es el principal agente etiológico en el desarrollo del CaCu, pues se ha observado que más del 99.7% de las mujeres con CaCu son positivas a VPH (Walboomers *et al.*, 1999, Yamada *et al.*, 1997 y Zur, 2000).

Diferentes estudios moleculares han demostrado que existen más de 200 tipos diferentes de VPH (Molijn *et al.*, 2005) y aproximadamente 40 de ellos infectan epitelios y mucosas genitales. Debido a la capacidad de inducir lesiones benignas o malignas, los VPH han sido clasificados respectivamente en: virus de bajo riesgo (VPH-6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 y CP6108) los cuales generan verrugas genitales y condilomas y en virus de alto riesgo (VPH-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82) que están fuertemente asociados al CaCu, cáncer de vulva, vagina o pene (Tabla 1) (Muñoz *et al.*, 2003).

TIPO DE VPH	RIESGO ONCOGÉNICO
16, 18, 45, 56, 31, 33, 35, 51, 52	Alto riesgo
6,11, 34, 42, 43, 44	Bajo riesgo

Tabla 1. Clasificación de algunos tipos de VPH de acuerdo al riesgo oncogénico que presentan (Zur, 2000).

De los tipos de VPH de alto riesgo, el VPH-16 es el tipo oncogénico más común en CaCu en el mundo (50%) seguido de VPH-18, -31, y -45 (20%) (Palefsky *et al.*, 2000). En nuestro país, se ha estimado que el VPH-16 se encuentra en el 50% de los casos, el VPH-18 en el 15%, los VPH-31, 33 y 35; en conjunto, el 12% y otros tipos virales, en el porcentaje restante. En México, la incidencia de cáncer cervical ha sido de aproximadamente 3, 500 casos nuevos anuales en mujeres de edad promedio de 48 años

(Lazcano *et al.*, 1996). Asimismo en nuestro país, la prevalencia de la infección por VPH en mujeres es del 14.5% y del 42.7% en hombres. De las mujeres que adquieren la infección un 70% al 90% la eliminan dentro de los 2 primeros años (Nakawaka *et al.*, 2002). Una fracción considerable de infecciones por VPH es subclínica tanto en mujeres como en hombres, no obstante el hombre puede participar como portador y vehículo de la infección durante el contacto sexual. En hombres generalmente la mayoría de las infecciones por VPH, son transitorias y no presentan lesiones visibles. La edad promedio para el desarrollo de CaCu es alrededor de los 50 años y se ha descrito una distribución bifásica de los casos con picos entre los 35 a 39 años y de los 60-64 años (Fehrmann *et al.*, 2003). Aunque en nuestro país, la distribución bifásica se presenta en la ocurrencia de la infección en la población general, en donde se observa que existe un primer pico de infección en el grupo de edad menor de 25 años (17%) y el segundo pico en mujeres mayores de 65 años (23%) (Lazcano, 2007).

La presencia de ADN viral se ha detectado en diferentes tipos de biopsias de piel normal y folículos pilosos, hecho que sugiere la existencia de múltiples infecciones sin síntomas clínicos (Zur, 2002). De la misma manera, la presencia de un gran número de verrugas o lesiones malignas en pacientes inmunosuprimidos o con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), indican la importancia de la respuesta inmune para controlar la infección (Berkhout *et al.*, 1995 y Goldie *et al.*, 1999). Estas observaciones han llevado a concluir que de acuerdo al estado en el que el hospedero se encuentre, el VPH puede existir en forma de una infección latente, infección inadvertida (sin síntomas), infección aparente (desarrollo de lesiones) e infección abortiva (la integración del genoma viral al celular con el posible desarrollo de lesión maligna) (Zur, 1999).

ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE VPH.

El genoma de los VPH consiste de aproximadamente 8,000 pares de bases y dos tipos de genes son expresados: genes de transcripción temprana (E) y tardía (L) (Fig 1). Los genes E se encargan de codificar proteínas tempranas que son necesarias para la replicación viral y la transformación de la célula infectada. A estas proteínas E se las designa como E1, E2, E4, E5, E6 y E7 y se pueden detectar en las áreas proliferativas del epitelio infectado. Por otro lado, los genes L de los cuales existen dos: L1 y L2, se encargan de codificar en forma tardía y conforman las proteínas estructurales del virus y se expresan solamente en los sectores diferenciados del epitelio (capas más superficiales) (Tabla 2). De esta manera el ciclo viral se halla estrechamente vinculado con el grado de diferenciación de la célula epitelial (queratinocito), de tal forma que a nivel de las células basales (las únicas con capacidad proliferativa) se expresan los genes tempranos y a medida que la célula madura se diferencia y asciende hacia las capas más superficiales, se intensifica la replicación viral. A este nivel se expresan los genes que codifican las proteínas estructurales de la cápside, permitiendo la encapsidación del genoma y la producción de viriones (Pandero, 2000 y Zur, 2002).

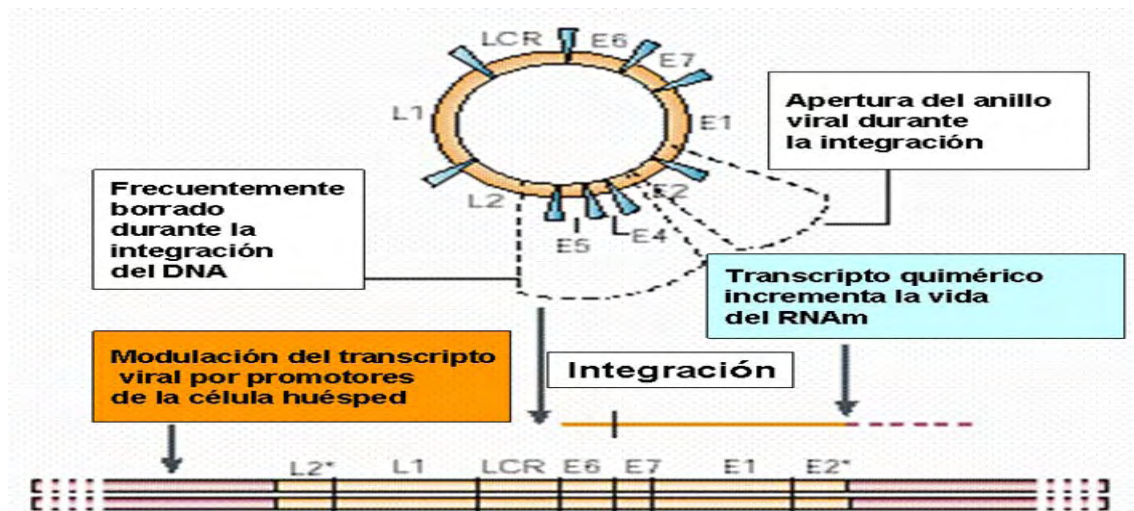


Fig. 2. Genoma circular del VPH, descripción ilustrada y general de la ubicación de los genes tempranos (E) y tardíos (L). (Zur, 2002)

PROTEÍNAS VIRALES	FUNCIONES
TEMPRANAS	
E1	Replicación del ADN viral y mantenimiento episomal
E2	Transcripción viral, replicación y transformación
E4	Modifica el citoesqueleto para permitir la liberación del virus
E5	Proteína transformante, inhibición de la degradación de EGFR
E6	Proteína transformante que inactiva la proteína P53 e inhibe la apoptosis
E7	Proteína transformante que interfiere con Rb y reactiva la síntesis de ADN del huésped.
TARDÍAS	
L1 y L2	Principales proteínas de la cápside, L1 constituye el 80% y L2 el 20%.

Tabla 2. Función de las proteínas de VPH. Tomado de Zur, 2000.

ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA L1 DE VPH

El tamaño de la estructura icosaédrica (Fig. 2) de la cápside de los VPH, conformada principalmente por la proteína L1, es aproximadamente de 600 Å de diámetro. Esta estructura contiene 72 capsómeros, cada uno constituido por 5 unidades de proteína L1 la cual a su vez está constituida por cerca de 500 residuos de aminoácidos (Chen *et al.*, 2000 y Sasagawa *et al.*, 1995).

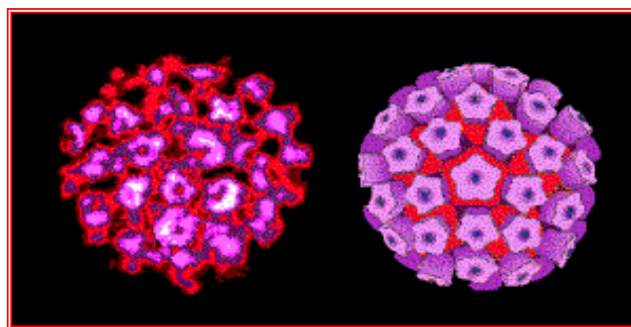


Fig 2. Diagrama de VPH en su forma icosaédrica desnuda. Tomado de <http://www.hon.ch/HON/P.html>

Las uniones entre los capsómeros están formadas de la siguiente manera: La extensión menor de los contactos interpentaméricos están formados por pequeñas proyecciones laterales llamadas dominios, las cuales se agrupan alrededor de tres pliegues simétricos como ejes; la orientación del eje del dominio es aproximadamente radial, el carbono

terminal en proyección lateral es significativamente una α -hélice; las tres hélices (h2-h4) forman la superficie de contacto con otros monómeros. Los contactos entre los pentámeros van de las pequeñas proyecciones laterales dominios; las primeras dos hélices (h2-h3) en la proyección de dominios forman una figura de V, dentro de la cual entra la parte del aminoácido terminal, la tercera hélice (h4) va de la subunidad relacionada al tercer pliegue; el contacto es fuertemente hidrófobo la h4 conecta y va del resto del dominio por medio de la extendida cadena del polipéptido creando una ajustable interacción orientada (Fig. 3) (Chen *et al*, 2000).



Fig. 3. Proteína L1 del VPH-16. Se muestran las α -hélices en rosa y las betas hojas plegadas en Amarillo. Tomado de <http://cat.middlebury.edu/~chem/chemistry/class/bio/ch322/ribosome/images/L1>

CICLO BIOLÓGICO Y EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE LOS VPH'S

El VPH infecta a las células epiteliales de piel o mucosa anogenital y orofaríngea produciendo lesiones hiperproliferativas benignas que pueden progresar a neoplasia de alto grado y cáncer. El ciclo biológico de los VPH's requiere de la disponibilidad de células epiteliales que tengan la capacidad de proliferar, razón por la cual está íntimamente ligado a la diferenciación del epitelio y se divide en dos fases: la productiva y la no productiva. La fase no productiva se lleva a cabo en las células basales y el virus se mantiene como un plásmido nuclear con bajo número de copias. La fase productiva transcurre en el compartimiento suprabasal conforme las células se van diferenciando, los eventos que la caracterizan son: amplificación del ADN, expresión de los genes L1 y L2 y producción de viriones (Genther *et al.*, 2003).

El ciclo de replicación comienza cuando el virus ingresa a las células del estrato germinativo a través de una abrasión o microtrauma (Fig. 4). Es entonces cuando comienza la expresión de E7. Conforme las células se van diferenciando se reduce la expresión de E7 e inicia la replicación del DNA viral y empiezan a expresarse E4, E2 y E5 en la capa intermedia del epitelio cervical. Conforme van migrando a la superficie del epitelio las partículas virales son ensambladas. Finalmente los viriones se liberan al eliminarse por descamación de los queratinocitos muertos (Middleton *et al.*, 2003).

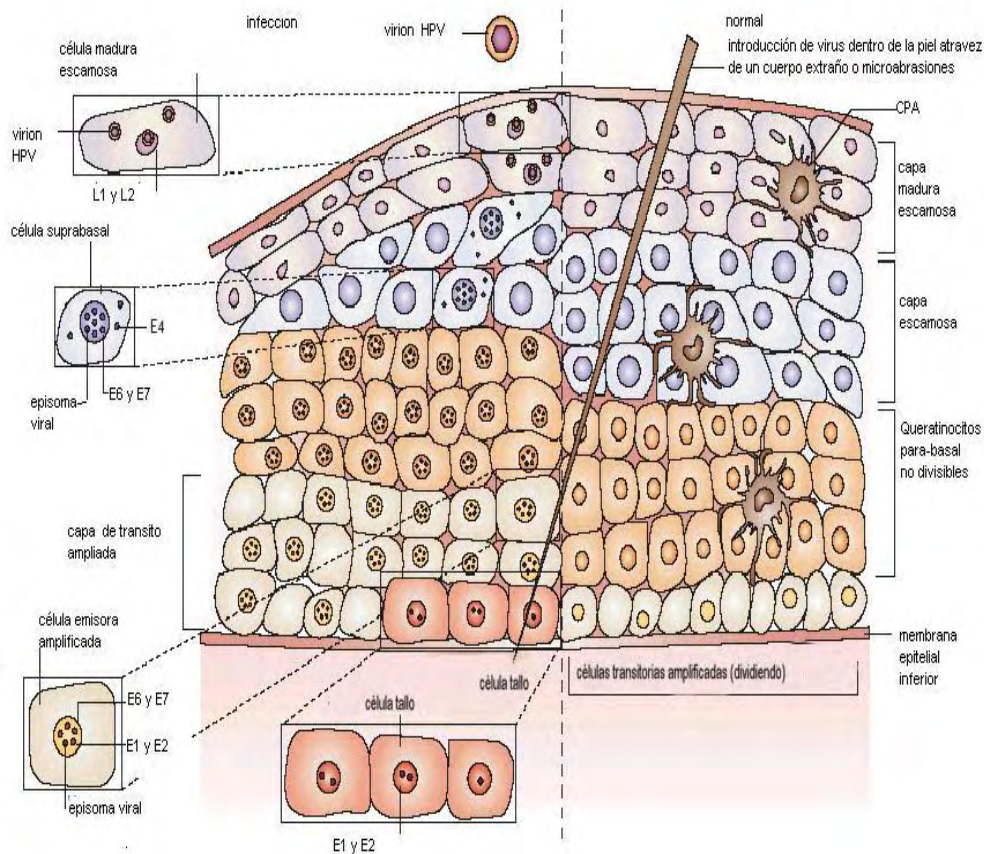


Fig. 4. Etapas del ciclo de vida del VPH y su localización en el epitelio escamoso. En el epitelio normal cervical escamoso y estratificado, las células hijas de la célula tallo del epitelio se dividen a lo largo de la membrana basal y maduran verticalmente a través del epitelio sin más división (lado derecho). Mientras que cuando ocurre la infección por VPH dentro de las células tallo, en la capa basal del epitelio, la expresión de proteínas virales de transcripción temprana ocurre. Bajo la regulación de estas proteínas, la división celular de la población se expande verticalmente y la diferenciación de las células epiteliales es tardía y menos completa, con cambios en la arquitectura del epitelio (lado izquierdo). Los viriones maduros son producidos en las capas más superficiales del epitelio y las células presentadoras de antígeno (CPA) intraepiteliales son eliminadas en el epitelio infectado por VPH. Tomado de Frazer 2004.

La integración del genoma viral al genoma de la célula hospedera puede ocurrir de manera aleatoria. Cuando ésta ocurre, el genoma de VPH tiende a seccionarse en los marcos de lectura abierta de E1 y E2 (Cheng *et al.*, 2000). Si la ruptura ocurre dentro de la región de E2, deja de producirse esta proteína que regula negativamente la expresión de E6 y E7, dando como resultado una vigorosa expresión de éstas proteínas, lo cual es un factor fundamental en el desarrollo de la neoplasia avanzada, dada su actividad transformante (Zur, 2000).

La proteína E6, mediante una ligasa ubiquitina “marca” a la proteína p53 induciendo su degradación por parte del complejo proteasoma (Warness *et al.*, 1990). La proteína p53 es una proteína antitumoral que impide la replicación de las células bajo condiciones de alteración genética. Asimismo existen evidencias de que E6 tiene otras funciones asociadas a la transformación celular como son: efectos antiapoptóticos; desestabilización cromosómica, activación de telomerasa; y mutagenicidad (Zur, 2000, Galloway, 1996 y McIntyre, 1996). Por su parte, la proteína E7 tiene la capacidad de interactuar con proteínas encargadas de la regulación del ciclo celular, principalmente inhibidores de las ciclinas como son p57 y p21. Además, una de las actividades más notables de E7 es su capacidad de asociarse y fosforilar a la proteína Rb, la cual constituye el freno a la progresión del ciclo celular (Dyson *et al.*, 1989), de esta manera, la proteína Rb fosforilada queda inactivada y se da la progresión del ciclo celular, induciendo por tanto que la célula prolifere continuamente.

Por otro lado, potencialmente todas las proteínas del VPH pueden ser blancos antigénicos para generar una respuesta inmune; no obstante, de acuerdo con el ciclo biológico viral, algunas proteínas pueden quedar más accesibles al reconocimiento inmune. En las etapas tempranas de infección viral o en las etapas iniciales del desarrollo del CaCu, cuando existe una amplia formación de viriones, las proteínas de la cápside (primordialmente L1) son las principales antígenos blanco accesibles para la respuesta inmune humoral y celular contra la infección de VPH (Campo, 1995 y Monroy *et al.*, 2002). Mientras que en etapas avanzadas las oncoproteínas E6 y E7 constituyen los principales blancos de la respuesta inmune (Matlashewski, 1989).

RESPUESTA INMUNE CONTRA LAS INFECCIONES POR VPH

Se conocen principalmente dos sistemas de defensa utilizados por el organismo para la destrucción de células infectadas con virus o contra tumores: el sistema innato y el sistema inmune adaptativo (Tabla 3). El sistema innato está formado principalmente por células fagocitarias: monocitos-macrófagos, neutrófilos polimorfonucleares y las células asesinas naturales (NK) que eliminan a las células tumorales de manera inespecífica (Janeway *et al.*, 1997). Cuando el sistema innato fracasa en su intento por detener la invasión de los patógenos o la proliferación de células tumorales, se pone en marcha el sistema inmune específico, caracterizado por la presencia de receptores que reconocen a los antígenos. En este respecto, es importante mencionar que el desarrollo de la respuesta inmune específica contra proteínas de transcripción temprana, tal como E6 y E7, así como de transcripción tardía (L1 y L2), toma su base en el microambiente celular donde se desarrolla la infección por VPH. En condiciones normales, las células dendríticas del epitelio normal o del epitelio tumoral toman el antígeno y viajan al nódulo linfático para madurar y mostrar la carga antigénica a linfocitos B y T para inducir una respuesta inmune positiva.

CARACTERÍSTICAS	INMUNIDAD INNATA	INMUNIDAD ADAPTATIVA
Especificidad	Para estructuras comunes a grupos de microorganismos relacionados	Para antígenos de microorganismos y antígenos no microbianos.
Diversidad	Limitada	Muy amplia
Memoria	No	Si
COMPONENTES		
Barreras físicas y químicas	Piel, epitelios mucosos; productos químicos antimicrobianos	Linfocitos en epitelios; anticuerpos secretados en superficies epiteliales.
Proteínas sanguíneas	Complemento	Anticuerpos
Células	Fagocitos (macrófagos, neutrófilos), células naturales asesinas	Linfocitos

Tabla 3. Características de la inmunidad innata y adaptativa. Tomado de Abbas, 2000.

La especificidad se basa en la generación de anticuerpos por parte de los linfocitos B (respuesta inmune mediada por anticuerpos) (Tabla 4) o mediante el ataque lítico llevado a cabo por los linfocitos T citotóxicos (respuesta inmune celular) al reconocer a los péptidos antigénicos presentados por moléculas del complejo principal de

histocompatibilidad clase I (MHC-I) en la membrana de las células blanco, así como la producción de citocinas llevadas a cabo por linfocitos T auxiliares al reconocer antígenos presentados por moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad (Doherty, 1993 y Doherty, *et al.*, 1994).

ELEMENTOS DEL SISTEMA INMUNE HUMORAL	
CÉLULAS	ACCIÓN
LINFOCITOS B	Transportan receptores de un antígeno particular entonces se dividen en células plasmáticas y de memoria. Pueden ser medidas por la proliferación general de las células B a antígenos específicos.
CÉLULAS DE MEMORIA	Recuerdan encuentros previos y responden más rápidamente a infecciones subsecuentes.
ANTICUERPOS	Proteínas especializadas que se fijan a un solo antígeno en particular resultando en su destrucción, eliminación, o neutralización.

Tabla 4. Elementos del sistema inmune humoral y su función. Tomado de Guzmán, 1998.

RESPUESTA INMUNE MEDIADA POR ANTICUERPOS CONTRA VPH.

La detección de anticuerpos dirigidos contra antígenos de VPH a través de la técnica de ELISA (del inglés, Enzyme linked immunosorbent assay) ha sido uno de los métodos más utilizados en el diagnóstico de la infección por VPH, además de utilizarse como un marcador de exposición acumulada hacia el virus (Hamiskova *et al.*, 1994). En los últimos años, la producción de partículas similares a virus (VLP, del inglés Virus like particles) obtenidas a través de la expresión de la proteína de la cápside L1 de los VPH's en vectores recombinantes (Schiller y Roden, 1995), ha facilitado el estudio de la respuesta inmune mediada por anticuerpos contra los diferentes tipos de VPH's. En estudios recientes sobre la detección de anticuerpos contra epítopes de VLP's, se ha observado que la presencia de anticuerpos contra VLP's de VPH-16, 18 y 33, aumenta conforme aumenta la edad, siendo del 50% en individuos mayores de 50 años (Hamiskova *et al.*, 1998) y de 35% en la población general (Marais *et al.*, 2000). Sin embargo, variables como la edad (> a 20 años) y el número de parejas sexuales se asocian con la presencia de anticuerpos VLP-16.

En hombres, el inicio temprano de actividad sexual, el número de parejas sexuales y el tiempo de actividad sexual mayor a 10 años, se asocian a estos anticuerpos (Stone *et al.*, 2002). Por otro lado, la presencia de VPH de bajo riesgo como VPH-6 en el 94% de condilomas anogenitales, correlaciona con la seropositividad de IgG anti-VLP-6 (Greer, *et al.*, 1995). En cuanto a los tipos virales oncogénicos, se ha demostrado que existe una asociación significativa entre la presencia de anticuerpos de tipo IgG anti-VLP-16, la presencia de VPH-16 y el grado de lesión en cérvix (Carter *et al.*, 1996), siendo la cero prevalencia del 50% en mujeres con lesiones de alto grado, en comparación con el 16% del grupo control (Wideroff *et al.*, 1995), posiblemente porque las lesiones de alto grado son producto de infecciones productivas y persistentes.

En relación a ello, se ha encontrado una asociación positiva entre la presencia de Ig G anti-VLP-16 con la presencia de neoplasia intraepitelial grado II y III (NIC II/III) (Bontkes *et al.*, 1999, Wang *et al.*, 1996). Asimismo, en mujeres con cáncer cervical escamoso y con infección de HPV-16, la frecuencia de encontrar anticuerpos contra VLP-16 aumenta en una razón de 4.7 veces (Carter *et al.*, 2001).

Respecto a la presencia de anticuerpos contra proteínas de transcripción temprana del HPV, se ha reportado una cero prevalencia contra péptidos de E2, E4 y E7, siendo las más elevadas para E4 (35%) y E2 (30%) (Hamiskova *et al.*, 1998). Los anticuerpos contra la proteína E7 se han asociado fuertemente a la presencia de cáncer cervical, mientras que la presencia de anticuerpos contra E4 se ha asociado a la presencia de condilomas y neoplasias intraepiteliales cervicales precursoras de cáncer NIC I-III (Jochmus *et al.*, 1989 y Pedroza *et al.*, 2000). Asimismo, la presencia de IgG dirigidos hacia la proteína E1, también ha sido asociada a neoplasias y cáncer (Hassen *et al.*, 2001) En el caso particular de E5, muy baja reactividad de anticuerpos IgA e IgG ha sido encontrada en pacientes con neoplasia cervical (Hassen *et al.*, 2001).

VACUNAS CONTRA EL VPH

Actualmente, existen dos tipos de vacunas que han sido generadas para contrarrestar la infección producida por VPH y el desarrollo de CaCu (Mandic y Vujkov, 2004): Las vacunas de tipo terapéuticas y las vacunas profilácticas; el objetivo de las vacunas terapéuticas radica en que son diseñadas para inducir la respuesta inmune celular capaz de erradicar la infección persistente con VPH o para erradicar células transformadas por oncoproteínas del VPH, mientras que: el propósito de las vacunas de tipo profilácticas es reducir la incidencia de CaCu por la prevención de la infección por el virus a través de la inducción de anticuerpos neutralizantes contra las proteínas de la cápside (L1 y L2) (Marcio y Hildegund, 2004 y Galloway, 2003).

Las vacunas profilácticas diseñadas para la prevención de la infección por VPH tienen como objetivo inducir inmunidad contra las proteínas estructurales tardías L1 y L2, además pueden suprimir la replicación del virus en individuos quienes fueron ya infectados, previniendo de esta forma la transformación de células blanco. En estos casos se han ideado vacunas quiméricas de VPH compuestas por partículas virales que incorporan a la proteína estructural L1 (Bubenik, 2002).

La cápside de la proteína L1 ha sido blanco para la inducción de anticuerpos neutralizantes utilizando ADN que codifica para esta proteína sintética en forma desnaturalizada o ensamblada en capsómeros o VLP's que simulan a viriones, pero sin contener el ADN codificante para los virus. Los VLP's han sido expresados en bacterias, baculovirus, levaduras, también en células de plantas incluyendo papas y tabaco (Marcio *et al.*, 2004). La vacunación con VLP's constituida de la proteína L1 de VPH-16, 18, 6 y 11 han inducido anticuerpos neutralizantes en varios modelos animales a los que protegen contra el desarrollo de lesiones (Mandic *et al.*, 2004).

En el caso particular de las vacunas profilácticas basadas en VLP's compuestas por la proteína L1 de VPH-16, su aplicación ha sido bien tolerada en humanos y es capaz de generar altos niveles de anticuerpos neutralizantes. Se han realizado estudios en los cuales fueron incluidas 2,392 mujeres jóvenes entre 16 y 23 años de edad las cuales recibieron 40 µg por dosis de VLP's con intervalos de tiempo de 0, 2 y 6 meses, y se encontró una respuesta en la cual las mujeres fueron seguidas en una media de 17.4

meses después de la vacunación y la incidencia de persistencia a la infección por VPH tipo 16 fue de 3.8%, estos autores concluyen que la administración de la vacuna con VLP del VPH-16 reduce la incidencia de ambas tanto de la infección por VPH-16 y de la NIC y que la inmunización a mujeres que no presentan el VPH-16, puede eventualmente reducir la incidencia de CaCu (Koutsky *et al.*, 2002).

En otro estudio realizado con VLP's del VPH-11, participaron voluntarios adultos sanos, esta vacuna fue tolerada e induce altos niveles de anticuerpos de unión y neutralizantes. Un marcado incremento en la linfoproliferación hacia antígenos del VPH-11 fue notado después de la segunda inmunización (Evans *et al.*, 2003). Éstos estudios, han demostrado que la generación de anticuerpos neutralizantes han sido altamente específicos hacia estructuras conformacionales de los VLP's utilizadas para la inmunización, de tal suerte que las vacunas profilácticas que actualmente se encuentran en el mercado son: una vacuna tetravalente (GARDASIL) producida por los laboratorios Merck la cual esta compuesta por VLP's de VPH-6,11 (Tipos de bajo riesgo) 16 y 18 (de alto riesgo) los principales tipos asociados a lesiones cervicales. En 4 estudios clínicos mundiales participaron 20,845 mujeres jóvenes entre 16 a 26 años, el análisis combinado mostró que la vacuna tetravalente GARDASIL (Tipos 6, 11, 16 y 18) fue 100% eficaz contra el CaCu, el cáncer vulvar y el cáncer vaginal, la vacuna GARDASIL también fue 99% eficaz contra las verrugas genitales (Muñoz, 2006).

La eficacia de la vacuna GARDASIL se evaluó en cuatro estudios clínicos Fase II y III, el primer estudio de Fase II evaluó el componente de VPH-16 de GARDASIL y el segundo evaluó todos los componentes de GARDASIL. Los estudios de Fase III, denominados FUTURE (siglas en inglés de Mujeres Unidas para Reducir Unilateralmente las Enfermedades Ecto- y Endocervicales), en conjunto dichos estudios evaluaron 22,342 mujeres con una media de edad de 20 años. Las participantes recibieron la vacuna o placebo el día de su ingreso, posteriormente a los 2 y 6 meses después. En los estudios se incluyó a personas que habían estado expuestas a alguno de los tipos del VPH de la vacuna antes del ingreso. En términos generales, 73 % de las participantes nunca habían estado expuestas a ninguno de los cuatro tipos de VPH al ingreso. Estas participantes tenían el riesgo de contraer infecciones y enfermedades causadas por los cuatro tipos de VPH presentes en la vacuna. GARDASIL fue sumamente eficaz para reducir la incidencia de NIC (de cualquier grado); de

adenocarcinoma *in situ*, de CaCu no invasor (NIC III) y de lesiones genitales externas, incluidos condilomas acuminados y las neoplasias intraepiteliales vulgares y vaginales (de cualquier grado). Con base a un análisis pre-especificado de las lesiones evidentes a partir de 30 días después de la primera dosis, se demostró que la vacuna ya era eficaz durante el curso del esquema de vacunación, de tres dosis (Garland, 2006). Otra vacuna producida por los laboratorios Glaxo (cervarix), solo incluye VLP's de VPH-16 y 18. Estas vacunas cotizadas en poco más de 100 dólares por dosis pueden conferir protección a la población femenina en aproximadamente 90 % ante el riesgo de contraer infección por estos tipos de VPH y eventualmente CaCu. Ya que los VPH-16 y 18 son frecuentemente expresados en el 70% de los tumores cervicales (Mc Neil, 2006 y Lowy y Frazer, 2006).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México, la infección por VPH y la incidencia de CaCu se incrementa día a día. Se ha estimado que más del 60 % de la población sexualmente activa está infectada por algún tipo de VPH, ello se debe a que la infección por VPH es asintomática y se mantiene latente por largos periodos, por lo que el contagio se propaga continuamente. En consecuencia, resulta indispensable establecer metodologías que permitan la detección oportuna de infecciones producidas por los tipos de VPH de alto riesgo (VPH-16, -18, -31, -33, -52, -58, etc.) que se asocian más frecuentemente con lesiones malignas del epitelio cervical (CaCu). Actualmente el Papanicolaou es el método de detección más utilizado debido a su bajo costo y relativa accesibilidad a la población; no obstante éste método no da información sobre los tipos de VPH infectantes. Asimismo, los métodos que permiten identificar y tipificar la infección por VPH a través del análisis del ADN viral mediante técnicas de PCR (del inglés Polimerase chain reaction, Reacción en Cadena de Polimerasa), hibridación in situ, captura de híbridos, etc., no son accesibles por su alto costo para la mayoría de la población. Por tanto, es necesario desarrollar métodos y técnicas de mayor accesibilidad a la mayoría de la población que permitan detectar de manera oportuna las infecciones producidas por VPH's. En este contexto, nuestro grupo de investigación ha identificado la secuencia 417-425 (péptido IHSMNSTIL) o P16 de la proteína L1 de VPH-16, la cual es altamente conservada entre secuencias L1 de varios tipos de VPH de alto riesgo asociados a CaCu, y es fuertemente reconocida por anticuerpos presentes en sueros de más del 90% de mujeres que presentan infección por virus de papiloma humano de alto grado (Rocha *et al.*, 2003). Por lo que este péptido antigénico, debido a su alta homología (60-90%) con secuencias de la proteína L1 de VPH de alto riesgo, puede ser de gran utilidad en la detección de infección por VPH. Por otro lado, gracias a la tecnología recombinante, se han podido sintetizar partículas similares a virus de VPH (VLPs), constituidas principalmente por las proteínas L1 de VPH-16-18, 6 y 11(vacuna GARDASIL). Mediante el uso de estas partículas se ha demostrado la generación de anticuerpos con capacidad protectora hacia posibles infecciones por VPH en grupos de personas vacunadas (Koutsky *et al.*, 2002). Tomando en consideración que individuos vacunados con GARDASIL generan anticuerpos de tipo específico, en este trabajo utilizamos al péptido P16 y a sus homólogos derivados de la proteína L1 de virus de alto riesgo como VPH-18 (IHSMNSSIL) (P18), VPH-31 (IHSMNPAIL) (P31), VPH-33

(IHAMNPDIL) (P33), VPH-52 (IHKMDATIL) (P52), VPH-58 (IHTMDSNIL) (P58), y de bajo riesgo de VPH-6 (IHTMNPSVL) (P6) y VPH-11 (IHTMNPSVL) (P11) para analizar la presencia de anticuerpos IgG específicos en sueros de ratones C57 BL/6 inmunizados con la vacuna GARDASIL, además de analizar el reconocimiento de sueros de ratones inmunizados con el péptido P16 y sus homólogos para reconocer VLP's de la vacuna GARDASIL, con la finalidad de evaluar la utilidad de estos péptidos en el monitoreo de la respuesta inmune hacia la proteína L1 de VPH-16, 18 y 6/11 usada como antígeno en la vacuna GARDASIL.

HIPÓTESIS

En estudios previos, hemos identificado que el péptido IHSMNSTIL correspondiente a la secuencia 417-425 de la proteína L1 del VPH-16, conserva alta homología con péptidos derivados de la proteína L1 de varios tipos de VPH tanto de alto como de bajo riesgo asociados al desarrollo de CaCu y a la formación de condilomas respectivamente; por otra parte, la vacunación con GARDASIL (VLP's de VPH-16, 18, 6 y 11) genera anticuerpos de tipo IgG específicos hacia diferentes sitios antigénicos de la proteína L1. Por lo tanto en un modelo *in vivo*, usando ratones de la cepa C57 BL/6 inmunizados con la vacuna GARDASIL se espera la generación de anticuerpos que reconozcan a los péptidos antigénicos homólogos; asimismo, se espera que ratones vacunados con los péptidos homólogos generen anticuerpos que reconozcan a los VLP's de la vacuna GARDASIL.

OBJETIVO GENERAL

Analizar la presencia de anticuerpos IgG específicos al péptido P16 (IHSMNSTIL), a sus homólogos y VLP's en sueros de ratones C57 BL/6 inmunizados con la vacuna GARDASIL y con el péptido P16 y sus homólogos respectivamente.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Obtener sueros de ratones hembra de la cepa C57 BL/6 inmunizados con la vacuna GARDASIL, con el péptido P16 y sus homólogos derivados de la proteína L1 de los VPH's 18, 31, 33, 52, 58, 6 y 11.
- 2.- Determinar la presencia de anticuerpos IgG específicos a la vacuna GARDASIL y a cada uno de los péptidos antigénicos P16 y sus homólogos.
- 3.- Analizar el reconocimiento de VLP's por anticuerpos Ig G específicos a los péptidos antigénicos P16 y sus homólogos.
- 4.- Evaluar si anticuerpos IgG de ratones inmunizados con la vacuna GARDASIL reconocen al péptido P16 y a sus homólogos.

MATERIALES Y MÉTODOS

ANTÍGENOS

En este estudio, se utilizaron los siguientes péptidos sintéticos (Invitrogen, USA) de la proteína L1 de VPH's de alto y bajo riesgo. El porcentaje de pureza de éstos péptidos fue mayor al 90%.

PROTEÍNA DE DONDE DERIVA EL PÉPTIDO	SECUENCIA DEL PÉPTIDO	POSICIÓN EN LA PROTEÍNA L1	% IDENTIDAD
L1 de VPH de alto riesgo			
16	IHSMNSTIL	417-425	Referencia
18	IHSMNSSIL	453-461	88.9
31	IHSMNPAIL	392-400	77.8
33	IHAMNPDIL	390-398	66.7
52	IHKMDATIL	421-429	66.7
58	IHTMDSNIL	416-424	66.7
L1 de VPH de bajo riesgo			
6	IHTMNPSVL	386-394	55.6
11	IHTMNPSVL	387-395	55.6

También se utilizó la vacuna recombinante tetravalente GARDASIL constituida por VLP's de las proteínas L1 de VPH tipo 16, 18, 6 y 11 (Merck Sharp Dohme, México).

MATERIAL BIOLÓGICO

De acuerdo con el programa de algoritmos de predicción (http://bimas.dcrn.nih.gov/cgi-bin/molbio/ken_parker_comboform), el péptido P16 presenta alta afinidad para asociarse al alelo H-2Db. Por esta razón, ratones hembra de la cepa C57 /BL6 de 6-8 semanas de edad con haplotipo H-2Db, fueron previamente inmunizados, tanto con la vacuna GARDASIL; como con el P16 y sus homólogos.

INMUNIZACIÓN

Los ratones fueron inmunizados de manera independiente, tanto con la vacuna GARDASIL (VLP's de la proteína L1 de VPH-16, 18, 6 y 11), como con cada uno de los péptidos, de acuerdo al siguiente esquema:

A) Inmunización con péptidos: 100 µg de cada uno de los péptidos se aplicaron vía cavidad intraperitoneal, en 4 inmunizaciones en grupos de 3 ratones. En la primera inmunización los péptidos aplicados fueron disueltos en PBS (del inglés, Phosphates buffer solution, Solución bufer de fosfatos) y emulsionados con adyuvante completo de Freund (Sigma, USA) en proporción 1:1 y en las tres posteriores inmunizaciones se utilizaron 100 µg de péptido emulsionado con adyuvante incompleto de Freund (Sigma USA) en proporción 1:1. El intervalo entre cada inmunización fue de 10-12 días.

B) Inmunización con GARDASIL: Un grupo de 9 ratones fue inmunizado en 3 ocasiones con 5 µg de la mezcla total de VLP's de la vacuna, con intervalo de 15 días entre cada inmunización.

OBTENCIÓN DE SUEROS

Al término de las inmunizaciones, los ratones fueron sangrados por punción en la vena orbital del ojo usando tubos capilares sin anticoagulante. Después, la sangre fue centrifugada a 5,000 rpm durante 4 minutos. Al término de este periodo, se colectaron los sueros correspondientes, se fraccionaron en alícuotas de 50 µl y se almacenaron en ultra congelación (-70°C) hasta su posterior uso.

ENSAYOS DE ELISA PARA DETECTAR ANTICUERPOS ESPECÍFICOS A PÉPTIDOS Y A LA VACUNA GARDASIL.

Los péptidos sintéticos fueron disueltos en solución amortiguadora de carbonatos-bicarbonatos pH 9.6 hasta obtener la concentración de 10 µg/ml. La vacuna fue disuelta en solución de PBS y llevada a una concentración final de 100 µg/ml. Además, 100 µL de estas soluciones fueron colocadas independientemente y por triplicado en pozos de placas de ELISA (EIA-ria 96 pozos fondo plano de alta afinidad de poliestireno no estériles sin tapa, Costar USA) e incubados durante toda la noche a 4°C. También se colocaron controles de fondo consistentes de pozos sin antígeno y controles negativos

consistentes del péptido irrelevante PNP (ASNENMETM) (Invitrogen, USA), derivado de la proteína A de la matriz del virus de influenza y con el péptido CL DB un derivado de la proteína L1.

Al día siguiente, se realizaron 2 lavados con 300 μ l de TBS-Tween 20 al 0.1 % por cada pozo. Posteriormente, los pozos fueron cubiertos con 200 μ l de solución bloqueadora compuesta por TBS-Tween 0.1% y BSA (del inglés, Bovine serum albumin, Albúmina sérica bovina al 1% e incubados durante 2 horas a 37°C. Después de este tiempo, los pozos fueron lavados 4 veces con TBS-Tween 20 al 0.1 % (300 μ l de solución por cada pozo). En seguida, los sueros de ratones inmunizados con cada uno de los péptidos y con la vacuna GARDASIL fueron diluidos 1:1000 en solución de bloqueo y se colocaron 100 μ l de cada dilución en los pozos correspondientes, con la finalidad de determinar el reconocimiento específico de cada anti-suero hacia los péptidos y/o hacia los VLP's de la vacuna. Después de 2 horas de incubación a 37°C, se realizaron 6 lavados con 300 μ l de TBS-Tween 20 al 0.1 % por cada pozo. Para revelar el reconocimiento de los anti-sueros hacia los péptidos, se utilizó un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón acoplado a fosfatasa alcalina (Sigma USA), el cual se diluyó 1:5000 en solución de bloqueo y se colocaron 100 μ l de esta solución en cada pozo. Después de incubar a 37°C durante 2 horas, se realizaron 8 lavados con 300 μ l de TBS-Tween 20 al 0.1 % por cada pozo y se adicionaron 100 μ l de una solución de sustrato de fosfatasa alcalina (Sigma USA).

Después de incubar la placa a 37°C durante 30-60 minutos, la reactividad enzimática de la fosfatasa fue determinada mediante el desarrollo de color amarillo detectado en un lector de placas de ELISA (Molecular Devices) a una longitud de onda de 405 nm.

TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE RESULTADOS

Los ensayos se realizarán por triplicado, se determinará el promedio y la desviación estándar de los valores de anticuerpos encontrados en cada inmunización. A los valores obtenidos de los sueros problemas (ratones inmunizados con péptidos o VLP's) se les restará el valor obtenido de fondo (pozos sin péptido o VLP). Para comparar los títulos de anticuerpos específicos a cada péptido que reconocen a las VLP's se utilizará un análisis de varianza no paramétrica.

RESULTADOS

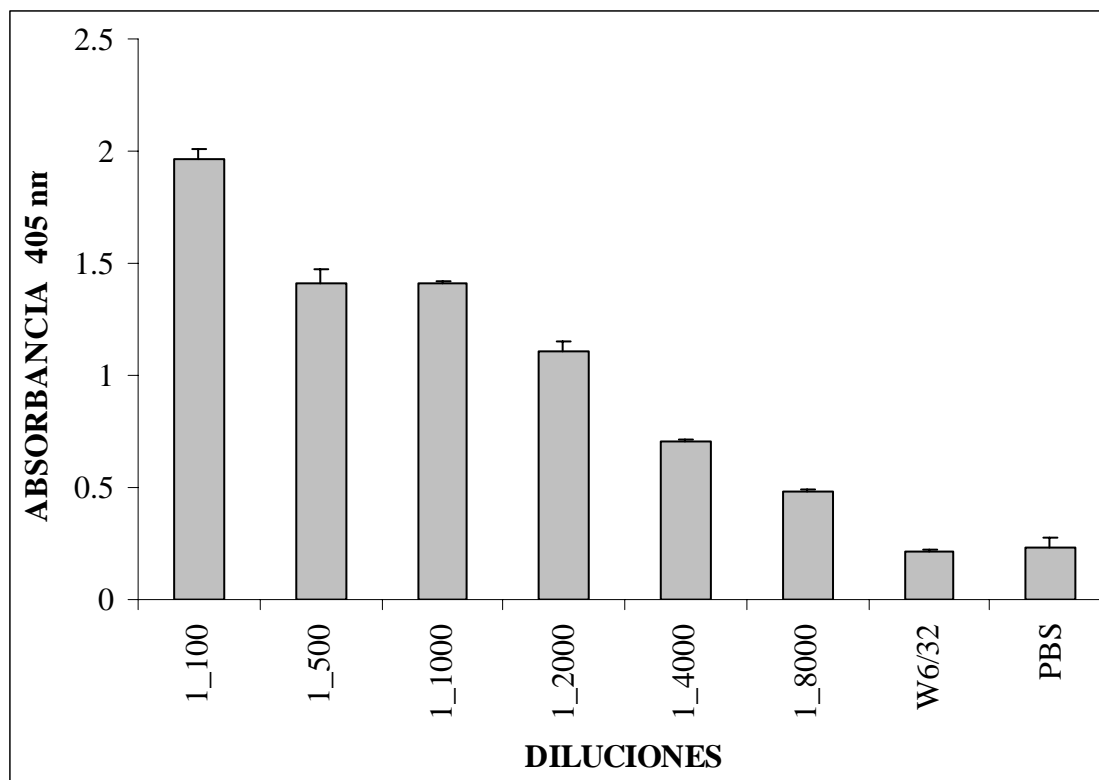
DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IgG ESPECÍFICOS A LA VACUNA GARDASIL.

Se utilizó el modelo de inmunización de ratones hembra de la cepa C57 BL/6 para generar anticuerpos específicos hacia las proteínas L1 de las VLP's que constituyen la vacuna GARDASIL. Se obtuvieron sueros de ratones antes de iniciar el esquema de inmunización (pre-inmunes) y quince días después de cada inmunización. La detección de anticuerpos IgG específicos hacia los VLP's de la vacuna GARDASIL fue cuantificada para cada inmunización mediante la técnica de ELISA.

La inducción de anticuerpos IgG específicos hacia VLP's de la vacuna GARDASIL, fue obtenida desde la primera inmunización. Los resultados muestran que 15 días después de la primera inmunización se obtuvieron sueros de los ratones y se evaluaron los títulos de anticuerpos en varias diluciones, el título más alto de anticuerpos correspondió a la dilución 1:100 con 1.97 de D.O (Densidad óptica); mientras que, el título más bajo correspondió a la dilución 1:8000, que mostró una D.O de 0.48, aproximadamente el doble de la obtenida con los controles negativos, secundario y anticuerpo irrelevante de isotipo IgG (anticuerpo monoclonal W6/32) (Tabla 5 y Gráfica 1).

DILUCIÓN DE ANTICUERPOS-VLP's	TÍTULOS DE ANTICUERPOS
1:100 µl	1.97
1:500 µl	1.40
1:1000 µl	1.41
1:2000 µl	1.10
1:4000 µl	0.70
1:8000 µl	0.48
PBS	0.23
P.I. (Péptido Irrelevante) W6/32	0.21

Tabla 5. Reactividad de sueros de ratones inmunizados con GARDASIL contra VLP's contenidos en la vacuna GARDASIL (Proteína L1 de VPH-16, -18, -11 y -6).

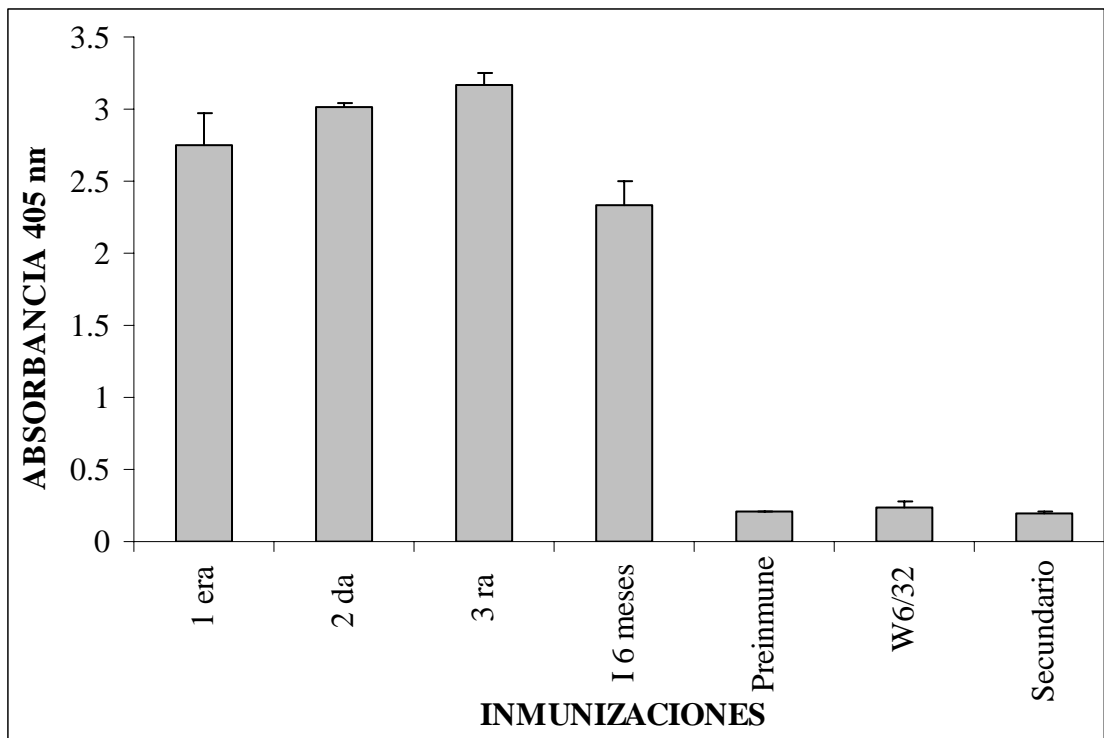


Gráfica 1. Reactividad de sueros de ratones inmunizados con la vacuna GARDASIL contra VLP's contenidos en la vacuna (Proteína de VPH-16, -18, -11 y -6). W6/32 anticuerpo irrelevante anti-MHC clase I, PBS sueros de ratones inmunizados con solución amortiguadora de fosfatos.

Por otra parte, se hicieron determinaciones de anticuerpos en los sueros de ratones con dos y tres inmunizaciones. Como puede observarse en la Tabla 6 y Gráfica 2, los títulos de anticuerpos obtenidos en las inmunizaciones complementarias no cambiaron respecto a los obtenidos en la primera inmunización (2.7 D.O), puesto que después de la segunda inmunización el título fue de (3.0 D.O) y después de la tercera inmunización la D.O fue de 3.1. Cabe mencionar que en ratones que recibieron 4 inmunizaciones, los títulos de anticuerpos no cambiaron respecto a los obtenidos en la tercera inmunización (datos no mostrados). Por otro lado, en ratones que recibieron el esquema completo de inmunizaciones (3 inmunizaciones) los títulos de anticuerpos anti-VLP's se mantuvieron altos en promedio (2.3 D.O) (Tabla 6 y Gráfica 2).

SUEROS	NÚMERO DE INMUNIZACIONES	TÍTULOS DE ANTICUERPOS
Anticuerpos hacia la vacuna GARDASIL	Primera	2.74
	Segunda	3.01
	Tercera	3.16
	I. 6. M	2.32
Preimmune		0.20
P.I. (W6/32)		0.23
Secundario		0.19

Tabla 6. Títulos de anticuerpos específicos contra VLP's en sueros de ratones C57 BL/6 inmunizados con la vacuna GARDASIL



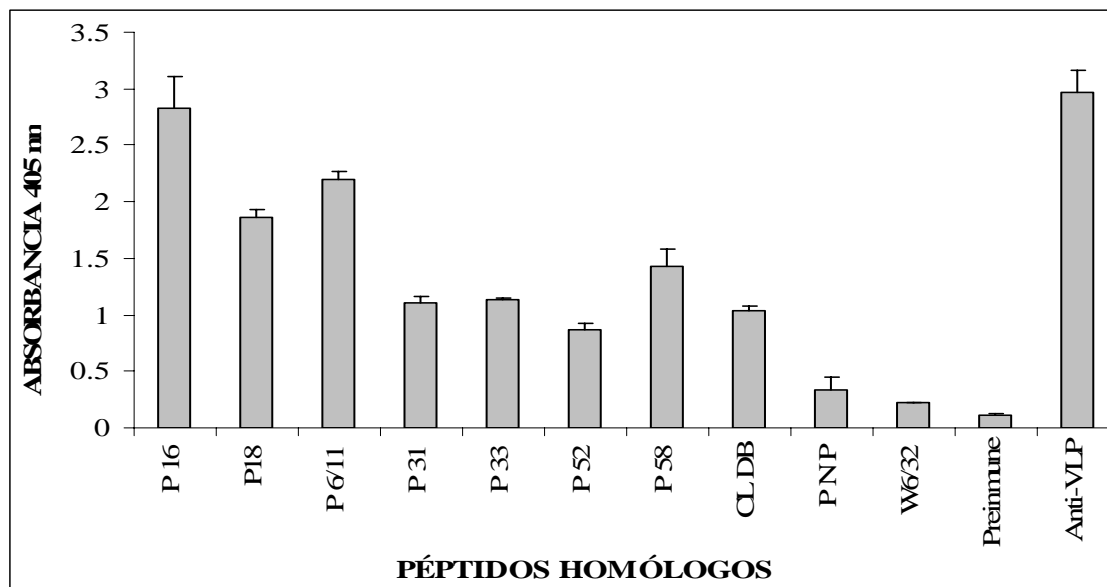
Gráfica 2. Títulos de anticuerpos específicos contra VLP's después de inmunizar en ratones de la cepa C57 BL/6. Preimmune, suero de ratones sin inmunizar. W6/32, anticuerpo irrelevante anti-MHC clase I. Secundario, anticuerpo IgG conejo anti-ratón acoplado a fosfatasa alcalina. Dilución de anticuerpos 1:100.

ANTICUERPOS IgG DE RATONES VACUNADOS CON GARDASIL RECONOCEN AL PÉPTIDO ANTIGÉNICO P16 Y A SUS HOMÓLOGOS.

Con la finalidad de evaluar si ratones inmunizados con la vacuna GARDASIL generan anticuerpos que reconocen al péptido antigénico IHSMNSTIL (P16) y a sus homólogos, se procedió a evaluar mediante ensayos de ELISA la presencia de anticuerpos específicos a estos péptidos en ratones vacunados con GARDASIL. Como puede observarse en la tabla 7 y gráfica 3, los sueros de ratones que recibieron las tres dosis de GARDASIL, presentaron altos títulos de anticuerpos IgG específicos hacia VLP's de la vacuna (2.97 D.O) y hacia los péptidos P16 (IHSMNSTIL) (2.8 D.O), P18 (IHSMNSSIL) (1.9 D.O) y P6/11 (IHTMNPSVL) (2.2 D.O) que derivan de las proteínas L1 de los tipos de VLP's contenidos en la vacuna. De manera interesante, también se observaron títulos altos de anticuerpos hacia los péptidos homólogos derivados de la proteína L1 de VPH's de alto riesgo: VPH-31 (IHSMNPAIL) (1.1 O.D), VPH-33 (IHAMNPDIL) (1.13 D.O), VPH-52 (IHKMDATIL) (0.86 O.D), VPH-58 (IHTMDSNIL) (1.43 D.O), denotando entonces cierta reactividad cruzada, probablemente debida a la alta homología entre P16 con los demás péptidos. En contraste, no se encontraron títulos importantes de anticuerpos dirigidos hacia el péptido irrelevante PNP (ASNENMETM) de la proteína M de influenza A (0.4 D.O) o hacia el péptido denominado CL DB (0.31 D.O) derivado de la proteína L1 de HPV-16. Asimismo, ni sueros de ratones pre-inmunes (D.O promedio de 0.109), ni el anticuerpo utilizado como isotipo control (W6/32) promedio de 0.218 D.O mostraron reactividad alguna hacia los péptidos analizados.

SUEROS	PÉPTIDO	TÍTULOS DE ANTICUERPOS
ANTICUERPO VLP (GARDASIL)	IHSMNSTIL (HPV-16)	2.82
	IHSMNSSIL (HPV-18)	1.85
	IHSMNPAIL (HPV-31)	1.10
	IHAMNPDIL (HPV-33)	1.13
	IHKMNATIL (HPV-52)	0.86
	IHTMDSNTIL (HPV-58)	1.43
	IHTMNPSVL (HPV-6)	2.20
	IHTMNPSVL (HPV-11)	2.20
	CL DB	0.32
	P N P	0.34
P.I	W6/32	0.21
Preimmune		0.10
C.P (Control positivo) ANTI-VLP		2.97

Tabla 7. Sueros de ratones inmunizados con la vacuna GARDASIL contienen anticuerpos que reconocen al péptido P16 y sus homólogos derivados de la proteína L1 del VPH de alto y bajo riesgo.



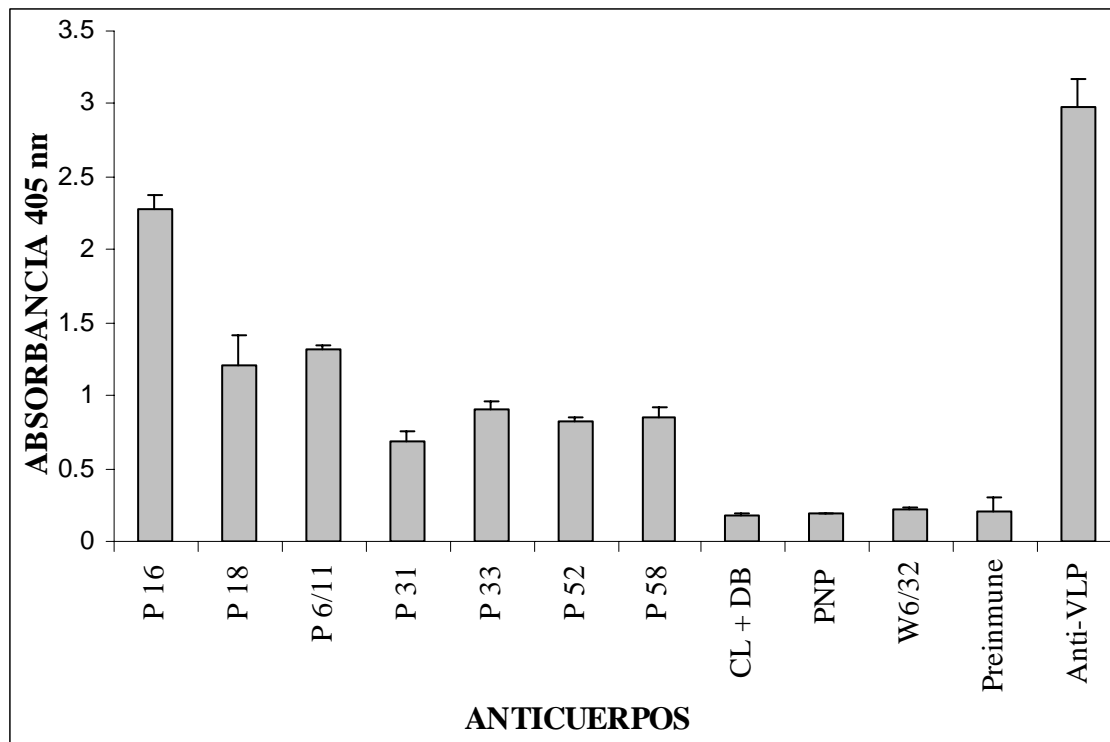
Grafica 3. Sueros de ratones inmunizados con la vacuna GARDASIL contienen anticuerpos que reconocen a los péptidos P16, P18, P6 y P11. Péptido CL+ DB un derivado de la proteína L1. El péptido irrelevante PNP derivado de la proteína A de la matriz del virus de influenza. Preimmune, suero de ratones sin inmunizar. Suero Anti-VLP fue utilizado como control positivo. La dilución utilizada de cada anticuerpo en los ensayos de ELISA fue de 1:100.

Anticuerpos específicos a los péptidos antigénicos, P16 y sus homólogos, reconocen a VLP's de la vacuna GARDASIL.

Para analizar si los sueros de ratones inmunizados con P16 y los péptidos homólogos a éste, reconocían secuencias dispuestas en las estructuras de los VLP's contenidos en la vacuna GARDASIL (VLP 16,18, 6 y 11), se procedió a analizar mediante ELISA la reactividad de dichos sueros. En la tabla 8 y gráfica 4 se muestra que los sueros anti-P16, -P18, -P11 y -P6, reconocen fuertemente a los VLP's contenidos en la vacuna GARDASIL cuya D.O es de 2.27, 1.2, 1.3 y 1.3 respectivamente. No obstante, los sueros de los ratones inmunizados con los péptidos homólogos 31, 33, 52 y 58 mostraron también cierta reactividad cruzada hacia los VLP's de la vacuna GARDASIL, aunque de menor intensidad respecto a los VLP's de la vacuna. Esto nos permite sugerir que las secuencias correspondientes al péptido P16 y sus homólogos en la estructura de los VLP's, son sitios antigénicos expuestos en la estructura de los VLP's.

ANTICUERPOS	VLP's (GARDASIL)	TÍTULOS DE ANTICUERPOS
Anti IHSMNSTIL (HPV-16)	VLPs (HPV-16,18, 6 y 11)	2.27
Anti IHSMNSSIL (HPV-18)		1.20
Anti IHSMNPAIL (HPV-31)		0.68
Anti IHAMNPDIL (HPV-33)		0.91
Anti IHKMNATIL (HPV-52)		0.81
Anti IHTMDSNIL (HPV-58)		0.85
Anti IHTMNPSVL (HPV-6)		1.31
Anti IHTMNPSVL (HPV-11)		1.31
CL + DB		0.18
PNP		0.19
P.I (W632)		0.22
Control Positivo ANTI-VLP		2.97
Preinmune		0.20

Tabla 8. Anticuerpos anti-péptidos P16 y sus homólogos reconocen a VLP's contenidos en la vacuna GARDASIL.



Gráfica 4. Los anticuerpos anti- P16, P18, y P6/11 reconocen fuertemente a VLPs de la proteína L1 contenidos en la vacuna GARDASIL. Péptido CL + DB, un derivado de la proteína L1. El péptido irrelevante PNP, derivado de la proteína A de la matriz del virus de influenza. Preimmune, suero de ratones sin inmunizar. El suero Anti-VLP fue utilizado como control positivo. La dilución utilizada de cada anticuerpo en los ensayos de ELISA fue de 1:100.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

La inmunización de individuos con la vacuna GARDASIL, ha mostrado hasta ahora (después de 7 años de haberse iniciado los esquemas de inmunización de fase clínica II), resultados muy importantes respecto a la inmunidad protectora, puesto que la protección se acerca al 100% en el grupo de personas vacunadas respecto a los grupos de individuos que recibieron placebo, en los cuales la incidencia de infección natural por VPH es cercana al 20% en las edades seleccionadas para este fin (15-23 años) (Koutzky *et al.*, 2002, Mc Neil, 2006, Muñoz, 2006, Garland, 2006 y Lowy y Schiller, 2006). Esta protección ha sido conferida esencialmente a la producción de anticuerpos neutralizantes, que tienen la propiedad de reconocer estructuras conformacionales de las VLP's y por tanto son requeridos para evitar la entrada de viriones naturales a las células del epitelio cervical cuando ocurre una eventual exposición al virus (Mandic y Vujkov, 2004). Esto se explica porque las VLP's de los VPH's producidas de manera sintética, son estructuras icosaédricas de 72 capsómeros compuestos cada uno por pentámeros de la proteína L1 (Sapp *et al.*, 1995 y Marcio *et al.*, 2004), dando lugar a una estructura de aproximadamente 360 monómeros de la proteína L1, por lo que varios sitios antigénicos conformacionales y lineales de la proteína L1 quedan expuestos de manera repetida y potencialmente pueden inducir la generación de anticuerpos específicos.

Tomando en cuenta las consideraciones anteriores y en vista de las observaciones previas realizadas por nuestro grupo de investigación, en donde se ha observado que más del 90% de pacientes que cursan con infecciones por VPH de alto riesgo, presentan anticuerpos específicos hacia el péptido antigénico IHSMNSTIL de la proteína L1 de VPH-16 (Rocha, 2004), nos llevó a proponer que este péptido es un determinante antigénico de la proteína L1 de VPH-16 y por tanto cuando el individuo se expone al agente infeccioso, como ocurre de manera natural en las pacientes con infección por VPH, o durante el proceso de vacunación con VLP's, se pudieran generar anticuerpos específicos hacia este péptido. Por esta razón, en el presente estudio utilizamos el modelo de inmunización *in vivo* con VLP's de la vacuna GARDASIL, para averiguar si ratones hembra de la cepa C57 BL/6 inmunizados con VLP's generan anticuerpos específicos hacia el péptido IHMNSTIL y hacia sus homólogos derivados de las proteínas LI de VPH's de alto riesgo como VPH-18 (IHSMNSSIL) (P18), VPH-31

(IHSMNPAIL) (P31), VPH-33 (IHAMNPDIL) (P33), VPH-52 (IHKMDATIL) (P52), VPH-58 (IHTMDSNIL) (P58) y de VPH's de bajo riesgo como son VPH-6 (IHTMNPSVL) (P6) y VPH-11 (IHTMNPSVL) (P11), los cuales se encuentran frecuentemente asociados con neoplasias malignas y benignas del cuello uterino a nivel mundial (Muñoz *et al.*, 2003).

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo, la inmunización de ratones hembra de la cepa C57 BL/6 con la vacuna GARDASIL, mostró altos títulos de anticuerpos específicos hacia VLP's a partir de la primera inmunización. De manera interesante, en sueros de estos ratones inmunizados, también se detectaron anticuerpos específicos hacia los péptidos homólogos P16, P18, P6 y P11 que forman parte de las proteínas L1 de las VLP's contenidas en la vacuna GARDASIL. Asimismo estos sueros tuvieron reactividad cruzada hacia los péptidos P31, P33, P52 y P58, derivados de las proteínas L1 de VPH's de alto riesgo, debido muy probablemente a la alta homología que existe entre los péptidos P16 y P18 con los péptidos P31, P33, P52 y P58. Por otro lado, la reactividad cruzada también fue observada al evaluar los títulos de anticuerpos de ratones inmunizados con los péptidos, ya que los sueros de ratones inmunizados con los péptidos P16, P18, P6 y P11 reconocieron fuertemente a las VLP's de la vacuna GARDASIL, asimismo los sueros de ratones inmunizados con los péptidos P31, P33, P52 y P58 mostraron títulos importantes de anticuerpos hacia las VLP's. Estos resultados refuerzan la idea de que la secuencia de P16 y sus homólogos corresponden a un determinante antigénico expuesto en la proteína L1 de los VPH's, puesto que estas secuencias se localizan en el asa que se forma entre las alfa hélices α 2- α 3 de la estructura de la proteína L1 descrita por Chen *et al.*, 2000. Esta región además interacciona con las alfa hélices α 4- α 5 de otra proteína L1 para formar los amarres de 5 unidades de L1 que constituyen cada uno de los capsómeros de la estructura icosaédrica del virión, por lo que varias de estas regiones quedan expuestas al reconocimiento por anticuerpos.

Por otra parte, en las etapas iniciales de la infección por VPH a nivel cervical, vulvar o anogenital, la producción de anticuerpos específicos hacia la proteína L1 es lenta y los títulos suelen ser bajos en la mayoría de los individuos infectados (Carter *et al.*, 1996, Kirnbauer *et al.*, 1994, Wikström *et al.*, 1995 y Villa *et al.*, 2005). El tiempo de

conversión de los anticuerpos producidos inicialmente con isotipo IgM al isotipo de memoria IgG, puede durar alrededor de 6-12 meses durante la infección persistente. En este contexto, varios ensayos inmunológicos han sido desarrollados para detectar anticuerpos específicos hacia la proteína L1 en individuos que cursan con infección persistente. La mayoría se han basado en el uso de cápsidas intactas de los viriones de VPH-16, a través de partículas sintéticas similares a virus o VLP's. En varios estudios serológicos, usando VLP de VPH-16 (Carter *et al.*, 1996 y Kirnbauer *et al.*, 1994), se ha demostrado que la infección por VPH es seguida por una respuesta inmune humoral hacia las proteínas de la cápsida viral y que los anticuerpos anti-VLP pueden ser indicadores de infecciones pasadas y presentes. Se ha encontrado que del 50 al 60% de las mujeres infectadas por VPH, tienen anticuerpos contra VLP de HPV-16. A diferencia de otros tipos de VPH, VPH-16 tiene varios subtipos y serológicamente presentan reacción cruzada (Yamada *et al.*, 1995 y Cheng *et al.*, 2000). Por otro parte, muy pocos estudios se han enfocado hacia la identificación de epítopes lineales de la proteína L1 de VPH cuya reactividad de anticuerpos ha sido limitada principalmente hacia VPH-16 (Heino *et al.*, 1995 y Urquiza *et al.*, 2005). Por ejemplo, en investigaciones recientes se ha mostrado que péptidos de la proteína L1 de VPH-16, expuestos en la superficie de los capsómeros, pueden ser útiles para detectar anticuerpos en pacientes con CaCu infectadas por VPH tipo 16, con una sensibilidad de 92%-97% y una especificidad de 89-95%, indicando que dichos péptidos pueden ser excelentes herramientas para usar una escala amplia de pruebas serológicas en población de mujeres con un alto desarrollo de carcinoma cervical (Urquiza *et al.*, 2005). En el caso particular del péptido IHSMNSTIL, nuestro grupo de investigación también encontró alta sensibilidad (96%) y especificidad (90%) para detectar anticuerpos específicos en mujeres que presentaban infecciones por VPH de alto riesgo, no sólo VPH-16 (Rocha *et al.*, 2004). Esto puede explicarse por el hecho de que el péptido P16 corresponde a una secuencia que conserva alta homología (67-90%) con péptidos derivados de VPH's de alto riesgo y de acuerdo con su posición en la proteína es un sitio altamente expuesto. En apoyo a esta aseveración, se ha observado que secuencias más largas que incluyan aminoácidos contiguos al péptido P16 tanto en la posición carboxilo como amino terminal, no son reconocidas por anticuerpos IgG presentes en mujeres positivas a infecciones por VPH-16. En un estudio realizado en donde usó un péptido que incluía 9 aminoácidos en el extremo amino terminal y uno en la porción carboxilo terminal de P16, no encontró reactividad de anticuerpos hacia este péptido largo. De manera similar

en un estudio reciente, en donde se utilizó un péptido de 20 aminoácidos que incluían de manera parcial a los aminoácidos IHSM de P16 en la parte carboxilo terminal, tampoco encontraron reactividad de anticuerpos en mujeres con infección por VPH-16 (Andersson *et al.*, 1996).

En conclusión, los resultados mostrados en este trabajo nos permiten sugerir que el péptido IHSMNSTIL en la proteína L1 de VPH-16 y sus homólogos derivados de las proteínas L1 de VPH's de alto riesgo son altamente inmunogénicos, debido a su propiedad de inducir la generación de anticuerpos específicos, tanto de manera lineal (como péptidos sintéticos) o formando parte de la estructura conformacional de la proteína. Entonces se podría pensar que durante las infecciones persistentes producidas por virus de papiloma humano se puedan generar anticuerpos que reconozcan al péptido P16 o a sus homólogos, dependiendo del tipo viral infectante. Lo cual sería de gran relevancia para considerar el uso del péptido P16 y de sus homólogos para utilizarse en las infecciones virales persistentes producidas por VPH's de alto riesgo. Por otra parte, los resultados sugieren que el péptido P16 y sus homólogos (P18, P6, P11, P31, P33, P52 y P58) son secuencias inmunogénicas conformacionalmente expuestas en la estructura de las VLP's.

CONCLUSIONES

- La inmunización de ratones hembra de la cepa C57 BL/6 con la vacuna GARDASIL indujo altos títulos de anticuerpos específicos hacia VLP's a partir de la primera inmunización.
- Los anticuerpos específicos a los péptidos P16 (IHSMNSTIL) derivado de la proteína L1 del VPH 16, así como de sus homólogos derivados de HPV-18 (IHSMNSSIL) (P18), VPH-6 (IHTMNPSVL) (P6) y VPH-11 (IHTMNPSVL) (P11) reconocieron fuertemente a VLP's de la vacuna GARDASIL (VLP L1 de VPH-16, -18, -6 y -11).
- Los anticuerpos específicos a los péptidos P31 (IHSMNPAIL) derivado de VPH-31, P33 (IHAMNPDIL) de VPH-33, P52 (IHKMDATIL) de VPH-52 y P58 (IHTMDSNIL) de VPH-58, tuvieron reactividad cruzada con VLP's de la vacuna GARDASIL.
- Suero de ratones inmunizados con la vacuna GARDASIL mostraron reconocimiento específico hacia los péptidos P16, P18, P6 y P11 y también mostraron reactividad cruzada hacia los péptidos P31, P33, P52 y P58.
- El péptido antigénico p16 y sus homólogos pueden ser útiles en la detección de anticuerpos IgG en individuos vacunados con GARDASIL.

PERSPECTIVAS

La inmunización con el péptido 16 y sus homólogos tiene la capacidad de inducir anticuerpos, que son capaces de identificar VLP's de la proteína L1 de VPH por lo que sería de suma importancia saber si estos anticuerpos presentan la capacidad de neutralizar a partículas virales (pseudoviriones).

En el presente estudio se demostró que tanto en suero de ratones vacunados con la vacuna GARDASIL, como suero de ratones inmunizados con el péptido 10 y sus homólogos, muestran reactividad cruzada hacia diferentes péptidos (31, 33, 52 y 58), por lo que será de gran interés conocer si en suero de mujeres inmunizadas con la vacuna GARDASIL, presenta la misma reactividad cruzada, hacia estos péptidos o hacia otros.

BIBLIOGRAFIA

Abbas, A., Lichtman, A., Pober, J. 2000. Inmunología celular y molecular. Madrid. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana. pp. 189-193.

Andersson, E. A., Dillner, J., Hagmar, B., Schiller, J., Sapp, M., Forssman, L. and Milsom I. 1996. Comparison of development of serum antibodies to HPV 16 and HPV 33 and acquisition of cervical HPV DNA among sexually experienced and virginal young girls. A longitudinal cohort study *Sex Transm Dis* 23: 234-238.

Berkhout, J. M. R., Tieben, M. L, Smits, H. L., Bavinick, N. B. J, Vermeer, J. B. and Ter, S. J. 1995. Nested PCR approach for detection and typing of Epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus types in cutaneous cancers from renal transplant recipients. *J Clin Microbiol.* 33: 690-95.

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

Bubenik J. 2002. Animal models for development of therapeutic HPV 16 vaccines. *Int J Oncology.* 20 :207-212.

Campo, M. S. 1995. Infection by bovine papillomavirus and prospects for vaccination. *Trends microbial.* 3: 92-97.

Carter, J. J, Madeleine, M. M, Shera, K., Schwartz, S. M., Cushing, H. K. L, Wipf, G. C., Porter, P., McDougall, J.K., Galloway, D.A. 2001. Human Papillomavirus 16 and 18 L1 serology compared across anogenital cancer sites. *Cancer Res.* 61: 1934-40.

Carter, J. J., Koutsky, L., Wipf, G., Chistensen, N., Lee, S. K., Kuypers, J., Kiviat, N. and Galloway, D. 1996. The natural history of humanpapillomavirus type 16 capsid antibodies among a cohort of university women. *J Inf Dis.* 174: 927-936.

Chen, S. Garcea, R., Golbeg, I., Casini, G., Harrison, S. 2000. Structure of small virus-like particles assembled from the L1 Protein of human papillomavirus 16. *Molecular Cell*. 5: 557-567.

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

Doherty, P. C. 1993. Cell mediated Cytotoxicity. *Cell*. 75:607-612.

Doherty, P. C., Sam, H. and Trip, R. A. 1994. CD8+ T-cell to viruses. *Curr. Opin. Immunol*. 7:547-552.

Dyson, N., Howley, P. M. and Munger, K., Harlow, E. 1989. The human papillomavirus-16 E-7 oncoprotein is able to bind to retinoblastoma gene product. *Science* 243: 934-937.

Evans, T. G, Bonnez, W. and Rose, R. C. 2003. A phase 1 study of a recombinant viruslike particle vaccine against human papillomavirus type 11 in healthy adult volunteers. *J Infect Dis*. 183:1485-93.

Fehrmann, F., Klumpp, K. and Laimins, L. 2003. Human papillomavirus type 31 E5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation. *J Virol*. (77) 5: 2819-2831.

Frazer, I. H. 2004. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev Immunol*. (4) 1: 46-54.

Galloway DA. 2003. Is vaccination against HPV a possibility? *Lancet* 351. (Suppl 3): 22-4.

Galloway, D. A., Mc Dugall, J. K. 1996. The disruption of cell cycle checkpoints by papillomavirus oncoproteins contributes to anogenital neoplasia. *Sem. Cancer Biol.* 7: 309-315.

Garland, S. 2006. Efficacy of a quadrivalent HPV (types 6, 11, 16, 18) L1 VLP vaccine against external disease: Future 1 analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*6:150-156

Genther, S., Sterling, S., Duensing, S., Müngerm, K., Sattler, C. and Lambert Paul. 2003. Quantitative role of the human papillomavirus type 16 E5 gene during the productive stage of the viral life cycle. *J. Virol.* (77) 5:2832-2842.

Goldie, S. J, Kuntz, K. M, Weinstein, M. C, Freedberg, K. A, Welton, M. L. and Palefsky, J. M. 1999. The clinical effectiveness and cost-effectiveness of screening for anal squamous intraepithelial lesions in homosexual and bisexual HIV-positive men. *JAMA.* 281: 1822-29.

Greer, C. E, Wheeler, C. M, Ladner, M. B, Beutner, K., Couyne, M. Y., Liang, H., Lengerberg, A., Yen, T. S. B. and Raltson, R. 1995. Human papillomavirus (VPH) type distribution and serological response to VPH type 6 virus-like particles in patients with genital warts. *J Clin Microbiol.* (33) 8: 2058-63.

Guzmán, R. L., Alcocer, G. J. M. y Madrid, M. V. 1998. Perspectivas para el desarrollo de vacunas e inmunoterapia contra cáncer cérvico-úterino. *Salud Pública Mex.* 40:38-46.

Hamiskova, E., Ludvikova, V., Smahel, M., Sapp, M., Vonka, V. 1998. Prevalence of antibodies to human papillomavirus in in the general population of the Czech Republic. *Int. J Cancer.* 77:689-694.

Hamiskova, E., Novak, J., Hofmannová, V., Muñoz, N., Bosch, F. X., De Sanjosé, S., Shah, K., Roth, Z. and Vonka, V. 1994. Presence of antibodies to seven human papillomavirus type 16-derived peptides in cervical cancer patients and healthy controls. *J. Inf. Dis.* 170: 1424-1431.

Hassen, E., Chaï eb, A., Bouaouina, N., Khairi, H., Remadi, S., Chouchane, L. 2001. Strategies for detection of papilloma-virus specific antibodies. *Mod. Asp. Immunobiol.* 2:8-12.

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

Janeway, C.A and Travers P. 1997. *Inmunobiology the immune system in health and disease.* Ed. Curr. Biol. Limit. New York. USA. pp. 254.

Jochmus, K. I., Schneider, A., Braun, R., Kimming, R., Koldovsky, U., Schneiweis, K. E., Seedorf, K., Gissman, L. 1989. Antibodies against the human papillomavirus type 16 proteins in human sera: Correlation of anti-E7 reactivity with cervical cancer. *J Natl Cancer Inst.* 81: 1698- 1704.

Kirnbauer, R., Hubbert, N. L., Wheeler, C. M., Becker, T. M., Lowy DR, Schiller JT. A 1994. Virus-like particle enzyme-linked immunosorbent assay detects serum antibodies in a majority of women infected with human papillomavirus type 16. *J Natl Cancer Inst.* 86:494–9.

Koutsky, L. A, Ault, K. A. and Wheeler, C. M. 2002. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N Engl J Med.* 347:1645–1651.

Lazcano, P, E., Hernández, A.M., López, C.L., Alonso de R. P., Torres, L. A., González, L.G. and Romieu, I. 1996. Factores de riesgo reproductivo e historia de la vida sexual asociados a cáncer cervical en México. *Rev Invest Clin.* 47: 377-85.

Lazcano, P. E. *Salud Pública México.* 2007. (49): 1:32-34.

Lowy, D. R. and Frazer, I. H. 2003. Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 111-6.

Lowy, D. R. and Schiller, J. T. 2006. Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J Clinical Inv.* 116: 1167-1173.

Mandic, A. and Vujkov, T. 2004. Human papillomavirus vaccine as new way of preventing cervical cancer: a dream or the future? *Annals of Oncology.* 15: 197-200.

Marais, D., Rose, R. C., Lane, C., Aspinal, S., Bos, P. and Williamson, A.L. 2000. Seroresponses to virus like particles of human papillomavirus types 16, 18, 31, 33, and 45 in San People in Southern Africa. *J Med Virol.* 60:331-336.

Marcio, O. L. and Hildegund, C. J. 2004. Human papillomavirus-associated cervical cancer: Prophylactic and therapeutic vaccines. *Gene Ther Mol Biol.* 8:291-306.

Matlashewski, G. 1989. The cell biology of human Papillomavirus transformed cells. *Anticancer Res.* 9:1447-1456.

McIntyre, M. C., Ruesh, M. N., Laimins, L. A. 1996. Human papillomavirus E7 oncoprotein binds a single form of cyclin E in a complex with cdk2 and p107. *Virology.* 215: 73-82.

McNeil C. 2006. Coming soon: Cervical cancer vaccines, and array of public health issues. *J Nat Cancer Inst.* 98: 432-435.

Middleton, K., Peh, W., Southern, S., Griffin, H., Sotlar, K. and Nakahara, T., El-Sherif, A., Morris, L. and Seth, R. 2003. Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *J. Virol.* (77) 19:10186-10201.

Molijn, A., Kleter, B., Quint, W. and Doorn, L. J. 2005. Molecular diagnosis of humanpapillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol.* 32 (Suppl.):43-51.

Monroy, G. A., Weiss, S. B., Hernández, M. J. Ortiz, N. V. F., Bañuelos, P. A. Acosta, A. A., Díaz, Q. A., López, G. C. M., Herbert, G., Granados, J., De Leo C., Silva, L. R.M. and Mora, G. M. L. 2002. Identification of two homologous antigenic peptides derived from L1 HPV-16 and 18 proteins specific for the HLA-B*3901 allele. *Arch Virol.* 147: 1933-1942.

Muñoz, N. 2006. A review of phase III clinical data for the quadrivalent human papillomavirus vaccine (GARDASIL). *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 274-282.

Muñoz, N., Bosch, F. X. and De Sanjosé, S. 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 348: 518-527.

Nakawaka, M., Viscidi, R., Deshmukh, I., Da Costa, M., Palefsky, J. M., Farhat, S., Moscicki, B. 2002. Time course of humoral and cell-mediated immune responses to human papillomavirus type 16 in infected women. *Clin. Diagnostic Lab Imm.* (9) 4: 877-882.

Palefsky, J. M. 2000. Anogenital squamous cell cancer and its precursors: Natural history, diagnosis and treatment. In: *Infectious causes of cancer: Targets for intervention.* Ed. Goedert J. J. Humana Press. USA. 263-88.

Pandero, A. 2000. *Biología molecular en la clinica.* Ed. McGraw-Hill Interamericana. México. pp 131-134.

Pedroza, A., Cruz, A., Esquivel, F., De la Torre, F., Berumen, J. and Gariglio, P. 2000. High prevalence of serum antibodies to Ras and type 16 E4 proteins of human

papillomavirus in patients with precancerous lesions of uterine cervix. Arch Virol. 145: 603-623.

Rocha Z, Ambrosio P, Mora G, Cruz F, Hernandez M, Weiss B, Ortiz V, Monroy A. 2004. Detection of antibodies against a human papillomavirus (HPV) type 16 peptide that differentiate high-risk from low-risk HPV-associated low-grade squamous intraepithelial lesions. J General Virol. 85: 1-8.

Sapp, M. Volppers, C., Muller, M. and Steck, R. E. 1995. Organization of the major and minor capsid proteins in human papillomavirus type 33 virus-like particles. J Gen Virol. 76: 2407-2412.

Sasagawa, T., Pushko, P., Steers, G., Grschmeissner, S. E., Hjibagheri, M.A. and Finch, J. 1995. Synthesis and assembly of virus-like particles of human papillomaviruses type 6 and type 16 in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Virology. 206: 126-135.

Schiller, J. T. and Roden, R. B. S. 1995. Papillomavirus-like particles. Papillomavirus Rep. 6:121-128.

Stone, K. M., Karem, K. L., Sternberg, M. R., McQuillan, G. M., Poon A. D., Unger, E. R., Reeves, W. C. 2002. Seroprevalence of humanpapillomavirus type 16 infection in the United States. J Inf Dis.186: 1396-1402.

Torroella, K. M., Morsberger, S., Carrillo, A., Mohar, A., Meneses, A., Ibarra, M., Ghaffari, A. M., Solorza, G., and Shah, K. V. 1998. HPV prevalence among mexican women with neoplastic and normal cervixes. Gynecologic Oncol. 70: 115-120.

Urquiza, M., Guevara, T., Espejo, F., Bravo, M., Rivera, Z. and Patorroyo, M. 2005. Two L1-peptidos are excelente tools for serological detection of HPV-associated cervical carcinoma lesions. Elsever 332: 224-232

Villa, L. L., Costa, R., Petta, C., Andrade, R., Ault, K., Giuliano, A., Wheeler, C., Koutsky, L., Malm, C. and Lehtinen, M. 2005. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *Lancet Oncol.* 6: 271-278.

Walboomers, J. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M, Bosch, F. X., Kummer, J. A. and Shah, K. V. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 189:1: 12-9.

Wang, Z., Hansson, B. G., Forslund, O., Dillner, L., Sapp, M., Schiller, J. T., Bjerre, B., Dillner, J. 1996. Cervical mucus antibodies against human papillomavirus type 16, 18, and 33 capsids in relation to presence of viral DNA. *J Clin Microbiol.* 3056-3062.

Warness, B., Levin, A. J. and Howley, P.M. 1990. Association of human papillomavirus-types 16 and 18 E6 protein with p53. *Science* 248: 76-79.

Wideroff, L., Schiffman, M., Nonnenmacher, B., Gubert, N., Kirnbauer, R., Greer, C., Lowry, D., Lorinez, A., Manos, M., Glass, A., Scott, D., Sherman, M., Kurman, R., Buckland, J., Tarone, R. and Schiller, J. 1995. Evaluation of seroreactivity of human papillomavirus type 6 among patients with condiloma acuminata or new asymptomatic infection. *J Med Virol.* 46: 368-374.

Wikström, A., Van, D. G. J. J., Quint, W. G. V., Schiller, J. T., and Dillner, J. 1995. Identification of human papillomavirus seroconversions. *J Gen Virol.* 76: 529-39.

Yamada, T., Wheeler, C. M., Halpern, A. L., Stewart, A. C. M., Hildesheim, A. and Jenison, S. A. 1995. Human papillomavirus-16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments. *J Virol.* 69:7743-7753.

Zur, H. H. 2000. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J. Nat. Can. Inst.* 92: 690-698.

Zur, H. H. 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. Nature Publishing Group. 2:342-350.

Zur, H. H. Viruses in human cancers. *Eur J Cancer.* 1999. (35) 14:1878-85.

http://bimas.dcrtnih.gov/cgi-bin/molbio/ken_parker_comboform

<http://cat.middlebury.edu/~chem/chemistry/class/bio/ch322/ribosome/images/L1>

<http://www.hon.ch/HON/P.html>

APÉNDICE

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Buffer de carbonato y bicarbonatos

Solución A:

Carbonato de sodio 0.1M (5.29 g/500ml de agua)

Solución B.

Bicarbonato de sodio 0.1M (4.2 g/500ml de agua)

Adicionar solución A a la solución B hasta que el pH sea de 9.6. Guardar todas las soluciones en refrigeración.

TBS-Tween al 0.1%

6.5g de tris base, 8.7g de cloruro de sodio para 1 L de agua destilada. Ajustar el pH a 7.6. Adicionar tween 20 al 0.1%. Guardar en refrigeración.

Solución bloqueadora

6.5g de tris base, 8.7g de cloruro de sodio para 1 L de agua destilada. Ajustar el pH a 7.6. Adicionar Tween 20 al 0.1%. De esta solución se toman 100 ml y se le adicionan 2 g de albúmina bovina sérica. Guardar en refrigeración.

Dietanolamina al 10 %

Disolver 10 ml de Dietanolamina en 100 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 9.8. Guardar en refrigeración y proteger de la luz.