



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

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

LABORATORIO DE INMUNOBIOLOGÍA

**IDENTIFICACIÓN DE LINFOCITOS T ESPECÍFICOS
HACIA ANTÍGENOS DERIVADOS DEL VIRUS DE
PAPILOMA HUMANO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

MARÍA DEL CARMEN ZARAGOZA ORTEGA

DIRECTOR: M EN C. JORGE HERNÁNDEZ MONTES.

MÉXICO, D. F

JUNIO, 2010.





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

A mis padres por ser mi ejemplo de vida, por apoyarme en todo momento y aun en los momentos más difíciles, por haberme dedicado gran parte de su vida para formarme, educarme, ser mis guías y a quien nunca podré pagar todos sus desvelos.

A mis hermanos por ser otros de mis grandes ejemplos y dedicarme tiempo cuando había dudas, por ser mis maestros de lucha y esfuerzo de que nunca hay imposibles y siempre hay que salir adelante para ser mejores personas.

A mi esposo y amigo por todo su apoyo y esfuerzo, por ser uno más de mis motivos para salir adelante, por estar conmigo siempre y en todo momento, por permitirme ser parte de su vida y por todo su amor. Te amo.

A mis suegros y cuñada por su gran apoyo y compañía por permitirme formar parte de su familia y ser como mis padres y como una hermana.

A mis amigas Claudia y Vianey por su gran amistad y por su compañía durante la carrera, por apoyarme en momentos difíciles y por sus consejos.

A mi Prof. el Maestro Jorge por todo su tiempo, paciencia y por sus sabios consejos para el desarrollo del trabajo y por su amistad.

A la Dr. Lourdes y el Dr. Alberto Monroy que me brindaron su apoyo para la realización de este trabajo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio Ivonne, Selene, Francisco Arturo, Luis y Pamela por hacer mas divertido el trabajo y el tiempo en el laboratorio.

Piensa que cada día es, por sí solo, una vida (Séneca)

*Quien piensa en fracasar, ya fracasó antes de intentar
Quien piensa en ganar, lleva ya un paso adelante
(Sigmund Freud)*

*Hay hombres que luchan un día y son buenos. Hay otros que luchan un año
y son mejores. Hay otros que luchan muchos años y son muy buenos. Pero
hay quienes luchan toda la vida, esos son imprescindibles (Bertolt Brecht)*

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunobiología (L-3) de la Unidad Multidisciplinaria de Investigaciones Experimentales de Zaragoza; Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México.

La realización de está tesis fue posible gracias al apoyo del programa: Beca Tesis de Licenciatura COMECYT- CONACYT 2009.

INDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	4

MARCO TEÓRICO

1. SISTEMA INMUNE	7
1.1 Inmunidad innata	8
1.2 Inmunidad adaptativa	9
1.2.1 Inmunidad humoral	11
1.2.2 Inmunidad celular	12
1.2.2.1 Ontogenia de Linfocitos T	13
1.2.2.2 Procesamiento antigénico y presentación antigénica a Linfocitos T	17
1.2.2.3 Receptor de Linfocito T (TCR)	20
1.2.2.4 Activación de Linfocitos T.....	21
2. VIRUS DE PAPILOMA HUMANO (VPH)	26
2.1 Ciclo e vida e infección del VPH.....	30
3. Cáncer cérvico-uterino y Virus de Papiloma Humano.....	31
4. El uso de pseudovirus y la respuesta inmune hacia el Cacu.....	33

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	35
----------------------------------	----

HIPÓTESIS	37
-----------------	----

OBJETIVOS.....	38
MATERIAL Y MÉTODOS.....	39
RESULTADOS.....	44
ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	54
CONCLUSIONES.....	60
PERSPECTIVAS.....	61
BIBLIOGRAFÍA.....	

ABREVIATURAS MÁS FRECUENTES

VPH	Virus de Papiloma Humano
CaCu	Cáncer Cérvico-uterino
I-VPH	Infección por Virus de Papiloma Humano
CMNSP	Células mononucleares de sangre periférica
CDs	Células dendríticas
VLP's	Partículas tipo virales
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
Ig	Inmunoglobulina
TCR	Receptor de linfocito T
APC	Células presentadoras de antígenos
Th	Linfocito T cooperador
Tc	Linfocito T citotóxico
NK	Células agresoras naturales
IL	Interleucina
ADN	Ácido desoxirribonucleico

RESUMEN

Existe evidencia de que la infección por ciertos genotipos de virus de papiloma humano (VPH) es una causa necesaria para el desarrollo del cáncer cérvicouterino (CaCu), y se sugiere que en condiciones normales, el sistema inmune es capaz de controlar y eliminar dicha infección. Por tal motivo es importante comprender la respuesta que se produce en la infección natural y en la inducida por la vacunación.

Para ello células mononucleares de sangre periférica (CMNSP) de mujeres que presentan infección por virus de papiloma humano (I-VPH) y sin I-VPH de acuerdo con el resultado de colposcopia, fueron incubados *in vitro* con antígenos de L1 del VPH -16 y -18 de la vacuna Cervarix® y con proteínas de la vacuna Infanrix Hexa® la cual contiene antígenos de toxoide diftérico, toxoide tetánico, tosferina, hepatitis B y tres tipos de virus de polio inactivados, para evaluar su activación se midió la proliferación, la producción de la citocina interferón-gamma y la expresión de la proteína CD69.

No se observó proliferación en respuesta a las proteínas L1 ni en el grupo con I-VPH ni en aquellas que no presentan I-VPH, a menos que las células efectoras fueran cocultivadas con células dendríticas (CDs) autólogas “cargadas” con la proteína L1. Sin embargo, sí fue observada una respuesta en ambos grupos aun sin el co-cultivo con CDs cuando se midió la respuesta hacia la vacuna Infanrix Hexa®, aunque las CMNSP de mujeres infectadas proliferaron menos que las mujeres sanas con una media de 7.5 de índice de proliferación y de 26.25, respectivamente ($p=0.016$). Ni Cervarix® ni Infanrix Hexa® indujeron una diferencia con respecto al control negativo ni para la producción de interferón gamma en ninguno de los dos grupos, y la expresión de CD69 sólo presentó una ligera diferencia en la muestra de una donadora sin I-VPH.

Por tanto, nuestros resultados sugieren que la respuesta inmune natural hacia el VPH es limitada, lo que implica la generación de números reducidos de células de memoria.

INTRODUCCIÓN

El cáncer cérvicouterino (CaCu) es la segunda causa de muerte debida a neoplasias malignas en la mujer, a nivel mundial, según la Organización Mundial de la Salud, con unas 300.00 muertes al año. El 80% de los casos corresponden a los países en vías de desarrollo y cerca de 500 000 casos nuevos se presentan cada año (Parkin *et al*, 1997).

Los virus del papiloma humano (VPH) se han encontrado en el 93% de todos los casos de cáncer invasor y de sus lesiones precursoras, por lo que se considera a la infección por este virus como el factor de riesgo más importante; además, causa otros carcinomas anogenitales, incluyendo el cáncer de pene (Castellanos, 2003). Se estima que al menos la mitad de las mujeres en el mundo se ha infectado por VPH en algún momento en su vida (Myers *et al*, 2000).

Estos virus han sido clasificados como de alto riesgo o de bajo riesgo, según el grado de transformación maligna que ocasionan en la célula infectada (Wharton and Tortoleto, 2000). Estudios epidemiológicos han demostrado que los tipos -6 y -11 usualmente causan verrugas benignas y que, ocasionalmente, se asocian con lesiones invasivas; de los tipos de alto riesgo, el VPH-16 es el tipo más frecuente, presente en 50% de los casos y junto con los tipos -18, -45, y -31 constituyen el 80% del cáncer cervical (Bosch *et al*, 1995).

Antecedentes científicos indican que las proteínas que constituyen la cápside del VPH son moléculas de alta capacidad inmunogénica y son capaces de activar al sistema inmune (Pinto *et al*, 2006). Basado en ello, dos vacunas que previenen la infección con los tipos -16 y -18 han sido introducidas recientemente al mercado. Estas vacunas están basadas en la proteína L1, el principal componente de la estructura de la cápside, la cual *in vitro* puede ensamblarse espontáneamente en partículas

semejantes a virus (VLP's, del inglés *virus like particles*) que se parecen a los viriones nativos en tamaño y forma, pero carecen de potencial infectante (Baker *et al*, 1991). Estas VLP's son capaces de estimular la generación de anticuerpos, además de inducir respuestas de células T de tipo específica detectable por proliferación, tanto de células T CD4 y CD8 y la producción *in vitro* de citocinas de tipo Th1 y Th2 (Pinto *et al*, 2003). El rol de estas respuestas juega un papel importante para elucidar la eficacia profiláctica de las vacunas contra el VPH.

Sin embargo, la naturaleza de la respuesta inmune inducida durante la infección natural, así como algunos aspectos de la inducida por vacunación no están totalmente comprendidos, por ejemplo: la determinación de qué proporción de respuestas de citocinas medidas corresponde a linfocitos CD4 y a CD8; la presencia de respuestas Th1 o Th2; la identificación de epítopes específicos involucrados en la respuesta de las células T hacia la vacunación; la determinación de si la vacunación induce respuestas T citotóxicas contra células infectadas con VPH; y la incidencia de la vacunación en los diferentes estadios de infección por VPH. Este conocimiento es importante para diseñar nuevas propuestas profilácticas y terapéuticas que conduzcan a la eliminación del virus y por consiguiente, limiten el desarrollo del CaCu.

Por tanto, en este trabajo evaluamos la capacidad de células mononucleares de sangre periférica (CMNSP) de muestras de mujeres con infección por VPH (I-VPH) y de mujeres negativas para la infección (I-VPH) de acuerdo al resultado colposcópico, para responder *in vitro* hacia la proteína L1 del VPH, como un reflejo de una posible respuesta *in vivo*. Para ello, medimos su proliferación mediante incorporación de timidina tritiada (^3H -TdR) y marcaje con carboxifluoresceína, además de la producción de interferón gamma y la expresión de la proteína CD69, como un marcador de activación. Según nuestras observaciones, la respuesta

inmune natural hacia el VPH es limitada, lo que implica la generación de números reducidos de células de memoria, tanto para las pacientes con I-VPH como en las donadoras sin I-VPH, y que se requiere de un eficiente procesamiento y una adecuada presentación de antígenos para demostrar tales respuestas de memoria con tan baja frecuencia.

MARCO TEÓRICO

1. SISTEMA INMUNE

El sistema inmune está formado por diversos mecanismos celulares y moleculares que protegen al organismo de infecciones por medio de la identificación y eliminación de agentes patógenos. Debido a que los patógenos abarcan desde virus hasta gusanos parásitos intestinales, esta tarea es extremadamente compleja y las amenazas deben ser detectadas con absoluta especificidad, distinguiendo los patógenos de las células y tejidos normales del organismo (Beck and Habicht, 1996). Además, se considera que la respuesta inmune es capaz de reconocer y eliminar a las células transformadas, aunque en algunas ocasiones, no es lo suficientemente efectiva para controlar el crecimiento celular anormal, lo que trae como consecuencia el desarrollo de un tumor (Grossman and Herberman, 1986).

El sistema inmunitario tiene cuando menos tres propiedades funcionales principales que lo diferencian de todas las otras defensas del cuerpo que constituyen la inmunidad innata. La primera es su especificidad extrema, es decir, la propiedad de reconocer un número grande de moléculas blanco distintas y responder a cada una de ellas de manera individual. La segunda, efectúa una discriminación en lo propio y lo extraño de manera que coexiste pacíficamente con todas las múltiples propiedades y otras materias orgánicas que constituyen al huésped, pero responde de modo enérgico contra sustancias extrañas incluso células y tejidos de otros organismos y la tercera, tiene memoria es decir, la propiedad de moldearse a partir de experiencias previas de manera que encuentros subsecuentes con un patógeno extraño particular originan respuestas más rápidas y vigorosas de las que se presentan en el encuentro inicial (Parslow *et al*, 2000).

El sistema inmune ha desarrollado una variedad de respuestas apropiadas para combatir a cada tipo de patógeno, aun cuando se trate de infecciones intracelulares o extracelulares. Asimismo, ha desarrollado dos tipos de mecanismos: innatos y adaptativos, cuya diferencia principal reside en las estructuras de reconocimiento de los patógenos, ya que los mecanismos efectores de destrucción son esencialmente similares (Regueiro, 2004) (Figura1).

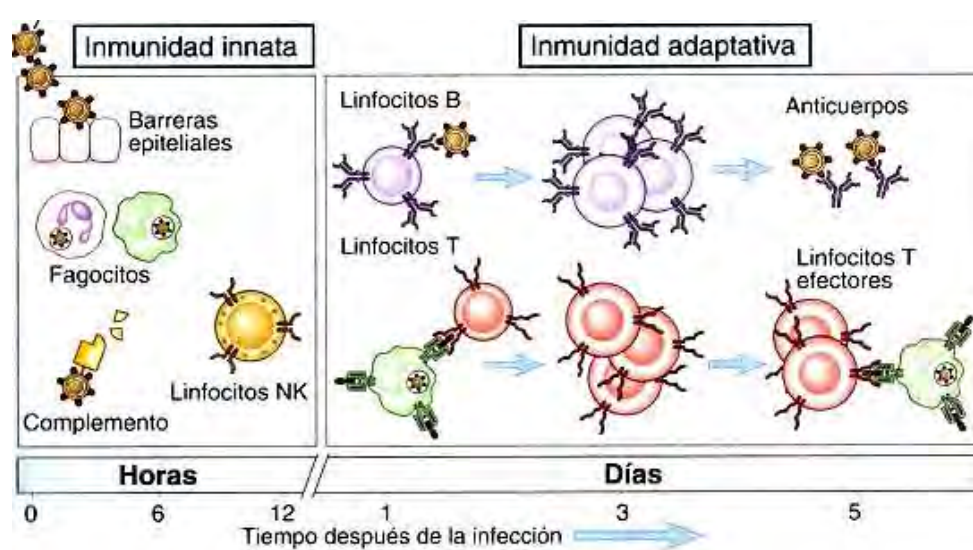


Figura 1. Tipos de mecanismos empleados por el sistema inmune (Tomado de Abbas y Litchman, 2004)

1.1 INMUNIDAD INNATA

Las primeras defensas con las que se enfrentan los agentes externos al intentar penetrar en el organismo son totalmente inespecíficas y están constituidas por las barreras anatómicas, de índole física, química o biológica características de cada localización (Collado, 2008). Posteriormente, la estrategia de la inmunidad innata no consiste en reconocer cada patógeno en particular, sino en reconocer un grupo de patrones moleculares altamente conservados y que son comunes a un

grupo o familia entera de patógenos y a pesar de ello, sus elementos son capaces de discriminar lo propio de lo ajeno y actuar de forma rápida en cuestión de segundos. Por ello todos los individuos de una misma especie nacen con la capacidad innata e inmediata de reconocer y destruir numerosos microorganismos con los que no hemos entrado en contacto previamente (Abbas y Lichtman, 2004).

Esta inmunidad se basa en la activación tanto de una serie de moléculas preformadas -las proteínas del complemento-, como de células -los fagocitos (monocitos/macrófagos y neutrófilos) e inflamocitos (mastocitos, basófilos y plaquetas)- que tienen receptores innatos para múltiples patógenos. Algunos mecanismos innatos no actúan inmediatamente, sino que inducen una respuesta a la infección, como las citocinas y otros mediadores que producen la inflamación (Regueiro, 2004).

Sin embargo, aunque la inmunidad innata es muy eficaz, no puede protegernos de todas las infecciones. La mayoría de los patógenos son seres unicelulares que se dividen rápidamente, y por tanto, pueden evolucionar muy rápido y llegar a evadir las defensas innatas de los vertebrados, cuya evolución es mucho más pausada. (Collado, 2008).

1.2 INMUNIDAD ADAPTATIVA

Debido a que la inmunidad innata no puede protegernos de todas las infecciones, los vertebrados han desarrollado una estrategia de reconocimiento que se conoce como la inmunidad adaptativa, específica o adquirida que le permite reconocer patógenos con los que nunca ha entrado en contacto, e incluso patógenos que ni siquiera existen todavía. Existen dos tipos de inmunidad específica: humoral y celular (Ganong, 2002).

La inmunidad humoral adaptativa es mediada por los linfocitos B los cuales sintetizan proteínas específicas denominadas anticuerpos o inmunoglobulinas. La inmunidad celular adaptativa es mediada por los linfocitos T, los cuales se maduran en el timo. La especificidad de los linfocitos B y T está determinada por receptores específicos que están presentes en las membranas de estas células (Roitt, 2000).

La base del reconocimiento de los patógenos es la gran variabilidad de los linfocitos B y T, presentes en nuestro organismo. Existen aproximadamente 10^{11} linfocitos B y T distintos, cada uno de los cuales porta un receptor específico para una molécula diferente, lo que en conjunto les permite reconocer casi cualquier estructura molecular de una forma específica. La generación de tanta variabilidad de linfocitos tiene sin embargo, una desventaja, y es que en realidad existen muy pocos específicos para cada patógeno. Por ello es necesario que los linfocitos se multipliquen previamente antes de adquirir suficiente número para eliminar el patógeno. Este periodo de proliferación requiere al menos una semana para desarrollarse, durante la cual el control de la infección por los mecanismos innatos es esencial para la supervivencia del individuo. Por otra parte, la inmunidad adaptativa es la base de la memoria inmunológica (Regueiro, 2004).

Por su parte, los linfocitos T no reconocen a los antígenos de forma soluble, sino que reconocen pequeños fragmentos de ellos (péptidos) asociados a las proteínas codificadas por el complejo principal de histocompatibilidad, o MHC (del inglés, *major histocompatibility complex*). Según el origen de los antígenos se pueden activar diferentes subpoblaciones de linfocitos T: los linfocitos T cooperadores ayudan a los linfocitos B a producir anticuerpos y a los macrófagos a destruir patógenos mediante fagocitosis, y los linfocitos T citotóxicos los cuales destruyen células infectadas por virus (Chothia, 1988).

1.2.1 INMUNIDAD HUMORAL

La inmunidad humoral es el principal mecanismo de defensa contra los microbios extracelulares y sus toxinas, está mediada por moléculas de la sangre y secreciones mucosas, denominadas anticuerpos los cuales son secretados por los linfocitos B; estos anticuerpos no eliminan al patógeno de manera directa sino que facilitan su destrucción por los mecanismos de la inmunidad innata (Abbas y Lichtman, 2004).

La activación de células B, su diferenciación en células plasmáticas secretoras de anticuerpos y células B de memoria, es desencadenada por antígenos y usualmente requiere de células T cooperadoras. Los anticuerpos contribuyen a la inmunidad de tres maneras principales: neutralizan a los virus y bacterias evitando la unión a moléculas específicas sobre la superficie de la célula blanco y su posterior entrada; cubren la superficie del patógeno para aumentar la fagocitosis (opsonización); y finalmente, los anticuerpos unidos a la superficie del patógeno, de manera alternativa pueden activar las proteínas del sistema del complemento (Janeway *et al*, 2005).

Los anticuerpos (también conocidos como inmunoglobulinas) son glucoproteínas los cuales pueden encontrarse de forma soluble en la sangre o en otros fluidos corporales de los vertebrados, disponiendo de una forma idéntica que actúa como receptor de los linfocitos B (Litman *et al*, 1993). El anticuerpo típico está constituido por unidades estructurales básicas, cada una de ellas con dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras de menor tamaño unidas por un puente disulfuro (Figura 2). Existen distintas modalidades de anticuerpo (isotipos), basadas en la forma de cadena pesada que posean.

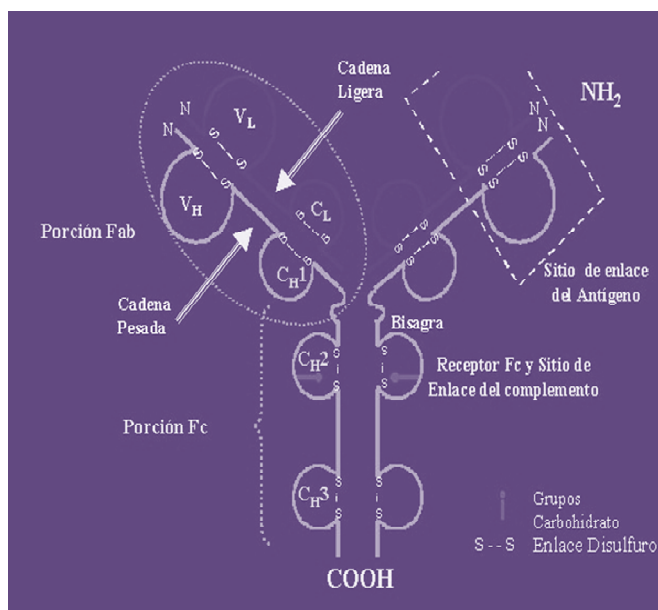


Figura 2. Estructura general de inmunoglobulina (Tomado de Aldecoa, 2000)

Se conocen cinco clases diferentes de isotipos en mamíferos conocidos como IgA, IgD, IgE, IgG e IgM que desempeñan funciones diferentes, contribuyendo a dirigir la respuesta inmune adecuada para cada distinto tipo de agente extraño que encuentran (Market and Papavasiliou, 2003).

Aunque la estructura general de todos los anticuerpos es muy semejante, una pequeña región del ápice de la proteína es extremadamente variable, lo cual permite la existencia de millones de anticuerpos, cada uno con un extremo ligeramente distinto. A esta parte de la proteína se le conoce como región hipervariable. Cada una de estas variantes se puede unir a un antígeno distinto, lo que genera una enorme diversidad de anticuerpos y permite al sistema inmune reconocer una diversidad igualmente elevada de antígenos, la única parte del antígeno reconocida por el anticuerpo se denomina epítipo (Kindt *et al*, 2007).

1.2.2 INMUNIDAD CELULAR

Los patógenos sólo son accesibles a los anticuerpos en la sangre y en los espacios extracelulares. Sin embargo, algunos patógenos intracelulares, tales como virus y algunas bacterias, son capaces de

sobrevivir y proliferar en el interior de los fagocitos y otras células del huésped, donde no pueden ser detectados por los anticuerpos. La destrucción de estos intrusos es función de los linfocitos T, que son responsables de las respuestas inmunitarias mediadas por células en la inmunidad adaptativa. Las respuestas ejercidas por células dependen de interacciones directas entre los linfocitos T y las células que exhiben el antígeno reconocido por las células T (Janeway *et al*, 2003).

El atributo que distingue el reconocimiento del antígeno que realizan la mayoría de las células T del que llevan acabo las células B, es la restricción en cuanto al MHC. En casi todos los casos, la participación de las moléculas MHC modifica la maduración de las células T progenitoras en el timo y la activación de células T maduras en la periferia; la posible diversidad antigénica de la población de células T se reduce durante la maduración por un proceso de selección que solo permite que maduren células T restringidas al MHC y no reactivas a lo propio, finalmente en las últimas etapas de la maduración pueden conducirse por dos vías de desarrollo diferentes, que generan dos subpoblaciones CD4⁺ y CD8⁺, distintas desde el punto de vista funcional, que muestran restricción a MHC clase II y clase I respectivamente (Kindt *et al*, 2007).

1.2.2.1 ONTOGENIA DE LINFOCITOS T

Las primeras células linfoides de un embrión humano aparecen en el tejido hematopoyético, aproximadamente a los dos meses de su vida intrauterina. Todas las células linfoides proceden de los centros del tejido hematopoyético, cuya localización y grado de actividad se modifican a medida que transcurre la gestación.

Este proceso parte de las células totipotenciales (del inglés *stem cell*, SC) presentes en la médula ósea y donde, dependiendo de los estímulos de

las proteínas Notch (N), se originarán los linfocitos T y B. En presencia de Notch-1 (N1) se induce al progenitor tímico temprano (ETP, *early thymic progenitor*), a partir de la cual derivarán todas las subpoblaciones de linfocitos T. Por el contrario en ausencia de N1 se induce el progenitor linfoide temprano (ELP, *early lymphoid progenitor*), de donde se derivaran los linfocitos B (Anaya *et al*, 2005).

El papel de las proteínas N en la diferenciación de los linfocitos es crucial. El estroma del timo presenta gran cantidad de ligandos para N, lo cual facilita la localización y diferenciación de los ETP en el timo; el ETP inicia en el timo el rearreglo y la expresión de los genes β , γ y δ del receptor de células T (TCR), en este momento no se expresan ni la proteína CD4 ni la proteína CD8, los cuales pueden ser identificados como linfocitos pro-T. Posteriormente, a partir de esta célula, ocurre una diferenciación que puede ser: a) hacia el linfocito T con receptor $\gamma\delta$, en una población minoritaria de linfocitos T periféricos que carecen de las moléculas de superficie CD4 y CD8 (también se encuentran en una pequeña proporción de timocitos, en linfocitos de epitelio intestinal y en algunas células dendríticas epidérmicas), la función de este tipo celular no está bien caracterizada, aunque se cree que juegan un papel importante en las enfermedades autoinmunes o b) linfocito pre-T el cual, gracias al proceso de selección de β , expresa la cadena β y una pre- α formando un preTCR $\alpha\beta$ (Kindt *et al*, 2007).

Posteriormente, la célula pre-T expresa los marcadores CD4 y CD8, quedando una célula doble positiva (DP: CD4+CD8+) y expresa también la cadena α del TCR para formar el verdadero TCR. Se da entonces la *selección positiva*, que es el proceso por el cual las células DPTCR $\alpha\beta$ + que se unen con baja afinidad a péptidos propios presentados en el contexto del MHC sobreviven, mientras que aquellas que no se unen mueren por apoptosis. Este proceso asegura que los linfocitos T maduros sean

restringidos al MHC siendo los compatibles con el MHC de clase I los CD4-CD8+ y los compatibles con los de clase II los CD4+CD8- (Rojas, 2004). Otro proceso que se lleva a cabo es el denominado *selección negativa* en donde las células que reconocen con alta avidéz o afinidad los péptidos propios son también eliminadas, asegurándose así la destrucción de células potencialmente reactivas (García, 1997). Finalmente, se tienen en el timo células T $\alpha\beta$ con un solo marcador CD4+ o CD8+ las cuales saldrán a la periferia para madurar en los tejidos linfoides periféricos donde serán activas y sufrirán proliferación y diferenciación (Abbas *et al*, 2003) (Figura 3).

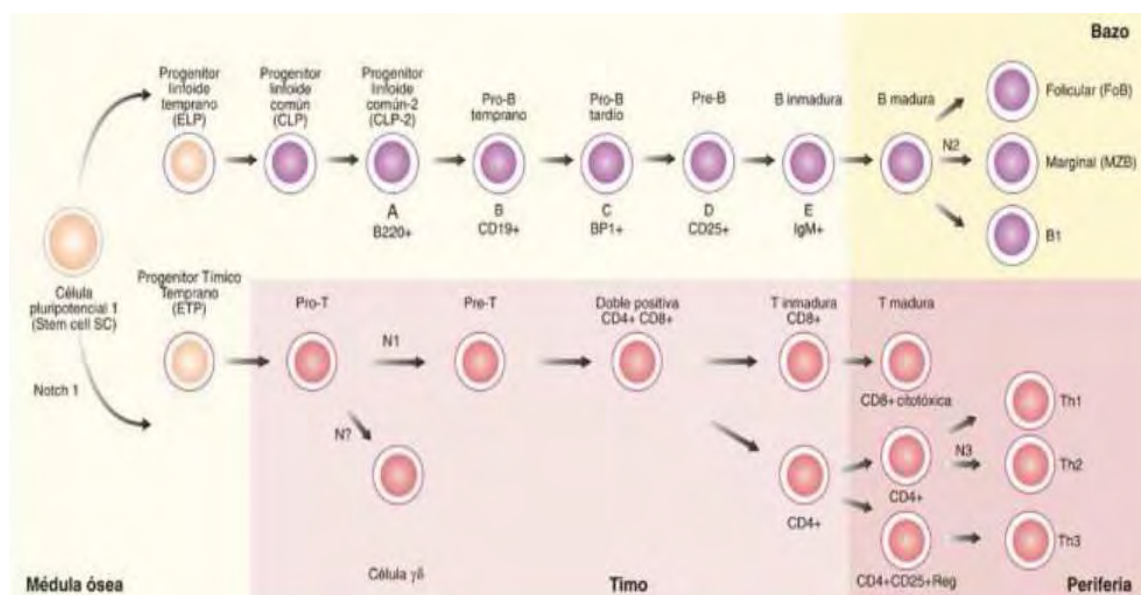


Figura 3. Ontogenia de linfocitos T y B (Tomado de Anaya *et al*, 2005).

Una vez que las células T han completado su desarrollo en el timo, entran al torrente sanguíneo. Al llegar a un órgano linfóide periférico dejan la sangre y migran a través de los tejidos linfoides, retornando vía linfática al torrente sanguíneo para recircular entre la sangre y tejidos linfoides periféricos. Las células T recirculantes maduras que no han tenido contacto con su antígeno específico se conocen como células T vírgenes;

para participar en una respuesta inmune adaptativa estas células deben reconocer a su antígeno específico presentado como un péptido asociado a la molécula del MHC en la superficie de la célula presentadora de antígenos, lo que la induce a proliferar y diferenciarse con lo que adquiere nuevas actividades para remover al antígeno. Estas células son llamadas T efectoras y actúan muy rápidamente cuando encuentran a su antígeno específico sobre otras células (células blanco). Debido a que el requerimiento para reconocer péptidos antigénicos es ser presentado por moléculas del MHC, todas las células T efectoras actúan sobre otra célula hospedero, no sobre los patógenos mismos (Córdova, 2003).

De acuerdo con el reconocimiento del antígeno, las células T vírgenes se diferencian dentro de varias clases funcionales de células T efectoras que son especializadas para diferentes actividades. Las células T CD8⁺ reconocen péptidos de patógenos presentados por moléculas del MHC clase I y todas ellas se diferencian en células T efectoras citotóxicas que reconocen y destruyen a las células infectadas (Murphy *et al*, 2008). Las células T CD4⁺ o “cooperadoras” (h, del inglés *helper*) tienen una capacidad funcional más flexible, una vez que reconocieron péptidos de patógenos “presentados” por moléculas del MHC clase II, es decir, pueden diferenciarse bajo distintos caminos que generan poblaciones efectoras con distintas funciones inmunológicas (Roitt *et al*, 1993). Las poblaciones efectoras CD4⁺ actualmente distinguidas son Th1, Th2, Th17 las cuales activan a su célula blanco y varias poblaciones de células T reguladoras las cuales tienen actividad inhibitoria que limita la extensión de la respuesta inmune. Sin embargo, estas células pueden ayudar a limitar el daño tisular causado por respuestas inmunológicas intensas contra patógenos (Belkaid and Rouse, 2005).

1.2.2.2 PROCESAMIENTO ANTIGÉNICO Y PRESENTACIÓN A LINFOCITOS T

Las principales funciones de los linfocitos T consisten en la defensa frente a microbios intracelulares y la activación de otras células, tales como macrófagos y linfocitos B. Los linfocitos T son capaces de interactuar con otras células porque sus receptores antigénicos solo pueden reconocer antígenos que se presentan en otras células. La tarea de presentar antígenos asociados a células para que sean reconocidos por los linfocitos T corre a cargo de proteínas especializadas que son codificadas por el locus denominado complejo principal de histocompatibilidad (MHC, del inglés *major histocompatibility complex*) (Rajagopal *et al*, 2004). Existen dos tipos principales de productos génicos del MHC, que se denominan moléculas del MHC de la clase I, que se expresan en todas las células nucleadas y de la clase II, que se expresan normalmente sólo en las células dendríticas, los linfocitos B, los macrófagos y algunos otros tipos celulares. Las moléculas clase I contactan con diferentes conjuntos de antígenos proteicos citosólicos (intracelulares) y presentan péptidos a los linfocitos T citotóxicos CD8+, en tanto que las moléculas clase II se asocian con antígenos que han sido endocitados, y presentan péptidos a los linfocitos T cooperadores CD4+ (Greenberg, 1991). El MHC en humanos se denomina genéricamente HLA (del inglés *Human leucocyte antigen*), en tanto que en ratón se denomina H-2.

El procesamiento antigénico consiste en la conversión de proteínas nativas en péptidos asociados a las moléculas codificadas en el MHC. Este proceso consta de la introducción de antígenos proteicos exógenos en el interior de las células presentadoras de antígenos (APC del inglés, *antigen presenting cell*) o la síntesis de antígenos en el citosol, la degradación proteolítica de esas proteínas en péptidos, la unión de los péptidos a las moléculas del MHC de las APC y la presentación de los complejos péptido-MHC en la superficie de las APC para que sean reconocidos por los

linfocitos T; estos procesos desempeñan un papel central en el inicio y mantenimiento de una respuesta inmunitaria adecuada frente al antígeno (Male *et al*, 2007)

En la presentación antigénica asociada al MHC de la clase II, se internalizan proteínas extracelulares en endosomas, donde las proteínas se escinden proteolíticamente por enzimas que actúan a pH ácido. Las moléculas del MHC recién sintetizadas en el retículo endoplásmico (RE) se transportan a los endosomas con una proteína asociada denominada cadena invariable (Ii), aquí la cadena invariable se degrada proteolíticamente y la molécula denominada *HLA-DM* elimina un pequeño péptido residual de la Ii denominado péptido de la cadena invariable asociado a la clase dos (*CLIP*), del sitio de unión peptídica de la molécula del MHC. Los péptidos que se generan a partir de las proteínas extracelulares entonces se unen a los lugares libres de la molécula del MHC de la clase II y el complejo péptido-MHC II se desplazan hacia la superficie celular, para ser presentado (Janeway *et al*, 2003)(Figura 4).

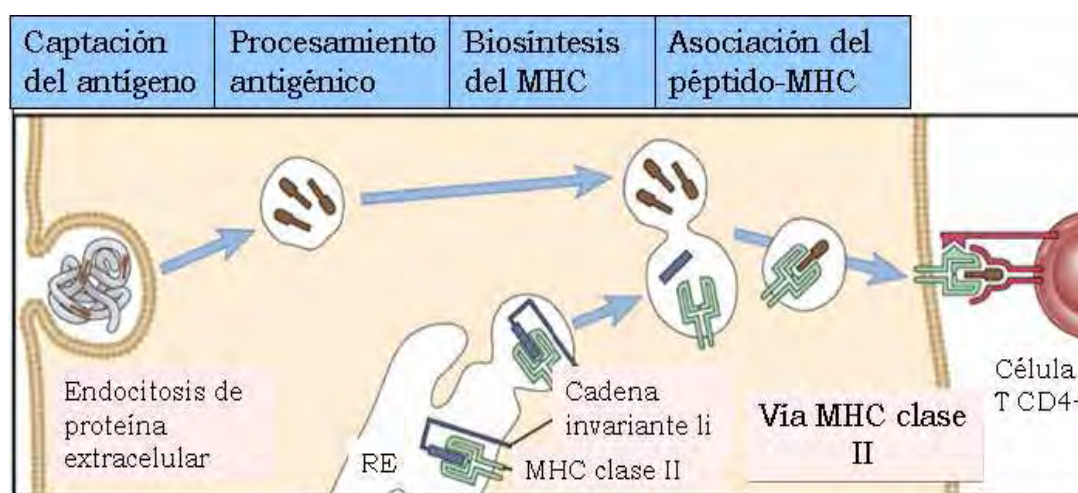


Figura 4. Esquema de procesamiento y presentación antigénica clase II (Tomado de Abbas and Litchman, 2004)

Para la presentación antigénica vía clase I, se degradan las proteínas citosólicas por medio del complejo multienzimático denominado proteasoma, lo que da lugar a péptidos con características que permiten unirse a moléculas del MHC de la clase I. Estos péptidos se transportan del citoplasma hacia el RE mediante un transportador dependiente de ATP denominado *TAP* (transportador asociado al procesamiento antigénico). Las moléculas MHC de clase I recién sintetizadas en el RE se asocian a la molécula β_2 -microglobulina y este dímero se une al complejo TAP y recibe péptidos transportados hacia el interior del RE. Los complejos estables formados por molécula del MHC de clase I y los péptidos unidos salen del RE hacia el complejo de golgi hacia la superficie celular (Van Endert *et al*, 1995) (Figura 5).

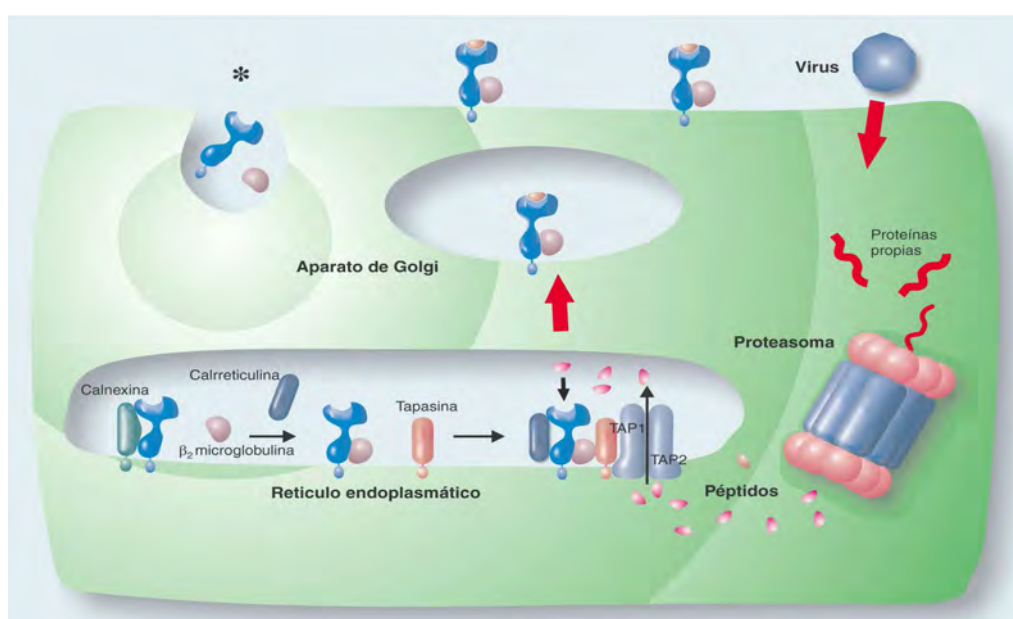


Figura 5. Esquema de procesamiento y presentación antigénica clase I de proteínas citosólicas (Tomado de Janeways *et al*, 2003)

1.2.2.3 RECEPTOR DE LINFOCITO T (TCR)

El receptor de linfocitos T (TCR del inglés, *T cell receptor*) es un receptor celular asociado a una vía de señalización intracelular se caracteriza por pertenecer a la familia de los receptores con actividad enzimática intrínseca y por poseer como ligandos a péptidos pequeños asociados con proteínas del MHC en la membrana plasmática de macrófagos y otras células presentadoras de antígenos (Call and Wucherpfennig, 2005).

El TCR está conformado por dos cadenas polipeptídicas polimórficas (alfa y beta o gamma y delta) similares a las inmunoglobulinas, sólo que nunca son secretadas: siempre están asociadas a la membrana celular, constan de una porción en ambas cadenas que atraviesa la membrana de la bicapa lipídica incluyendo un pequeño segmento que es intracelular, y se disponen una al lado de la otra unidas por enlaces de disulfuro. Asociado a las dos cadenas polipeptídicas polimórficas que constituyen las dos variantes del TCR, se encuentra un grupo de moléculas monomórficas de membrana llamado colectivamente CD3, formando así el *complejo TCR/CD3* (Michael *et al*, 2006). Cuando tiene lugar el reconocimiento antigénico entre el TCR y la molécula MHC que porta el antígeno, una señal es transmitida al interior de la célula por medio del CD3 y amplificada por coreceptores denominados CD4 y CD8 (proteínas de los linfocitos T que se unen a regiones no polimórficas de las APC) próximos al TCR, lo cual desencadena una cascada de reacciones bioquímicas en el citoplasma de la célula T, dando lugar al proceso de activación mediada por segundos mensajeros, lo que facilita la respuesta de la célula al estímulo externo (Williams and Kwon, 2004) (Figura 6).

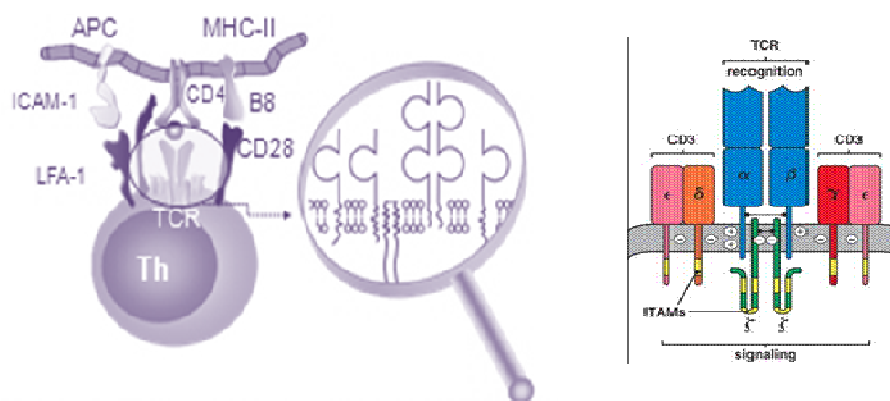


Figura 6. Receptor de linfocito T y otras moléculas implicadas en la activación. (Tomado de <http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular.pdf>)

1.2.2.4 ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T

Patógenos o antígenos que infectan sitios periféricos son típicamente atrapados en nódulos linfoides directamente de la corriente linfática del sitio de la infección. Los patógenos que se encuentran en el flujo sanguíneo son tomados en el bazo. Estos órganos linfoides secundarios contienen APC (macrófagos y células dendríticas) que eficientemente atrapan al antígeno para procesarlo y presentarlo a las células T vírgenes con lo que se determina la manera más apropiada para procesar al antígeno (Lydyard *et al*, 2000).

La activación de los linfocitos T se inicia cuando el TCR reconoce a un péptido “presentado” por la molécula MHC. La unión entre el TCR y el péptido junto a la molécula MHC tanto de clase I como II es específica. Sin embargo, para que la activación se inicie adecuadamente, se requiere además de la participación de TCR de otras moléculas accesorias presentes en la membrana de los linfocitos T, cuya función es la de contribuir al desarrollo de una respuesta inmune efectiva, facilitando la interacción entre las distintas células. Se forma así lo que se denomina sinapsis entre linfocitos T y la célula presentadora de antígeno (Steven, 2002).

Las principales moléculas que están implicadas en este fenómeno de reconocimiento son CD4, CD8, CD2, CD45 y CD28 y sus ligandos respectivos. Todas estas moléculas de adhesión también juegan un importante papel en la transducción de señales y activación de la célula T. Una vez activados los linfocitos T, éstos producirán prioritariamente citocinas o factores citotóxicos, según se trate de linfocitos T cooperadores (Th, h del inglés *helper*) o linfocitos T citotóxicos (Tc) respectivamente. De esta manera se desarrollará la respuesta inmune en la que están implicados estos linfocitos T (Smith *et al*, 2009) (Figura 7).

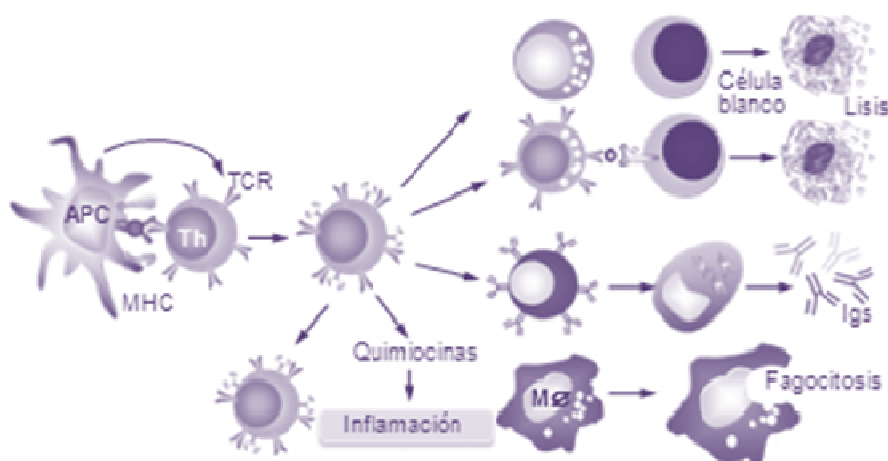


Figura 7. Proceso de activación de los linfocitos Th, Tc, NK y macrófagos. (Tomado de <http://inmunologiaenlinea.es/index.php>)

La respuesta de linfocitos T desencadenada por el reconocimiento antigénico, la coestimulación y otras señales constan de la secreción de citocinas, proliferación y diferenciación.

La secreción de las proteínas denominadas citocinas es una de las respuestas detectables más precoces de los linfocitos T tras el reconocimiento del antígeno; la principal citocina producida por los linfocitos T vírgenes es la interleucina 2 (IL2), que actúa como un factor de crecimiento para los linfocitos T. Cuando las condiciones de activación son diferentes, los linfocitos T vírgenes estimulados por antígenos pueden

diferenciarse en distintos subgrupos que secretan distintos tipos de citocinas y realizan diferentes funciones efectoras. Los subgrupos mejor definidos son las poblaciones Th1 y Th2 de los linfocitos CD4⁺ (Rincón *et al*, 2007). Las células Th1 se caracterizan por la secreción de interleucina 2 (IL2), interferón gamma (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral (TNF- β , linfoxina) las cuales estimulan la aparición de respuestas inflamatorias y son capaces de activar macrófagos y células citotóxicas, mientras que interleucina 4 (IL4) e interleucina (IL5) son las que definen a Th2 que inducirán la activación y expansión de los linfocitos B (Murria *et al*, 2006) (Figura 8).

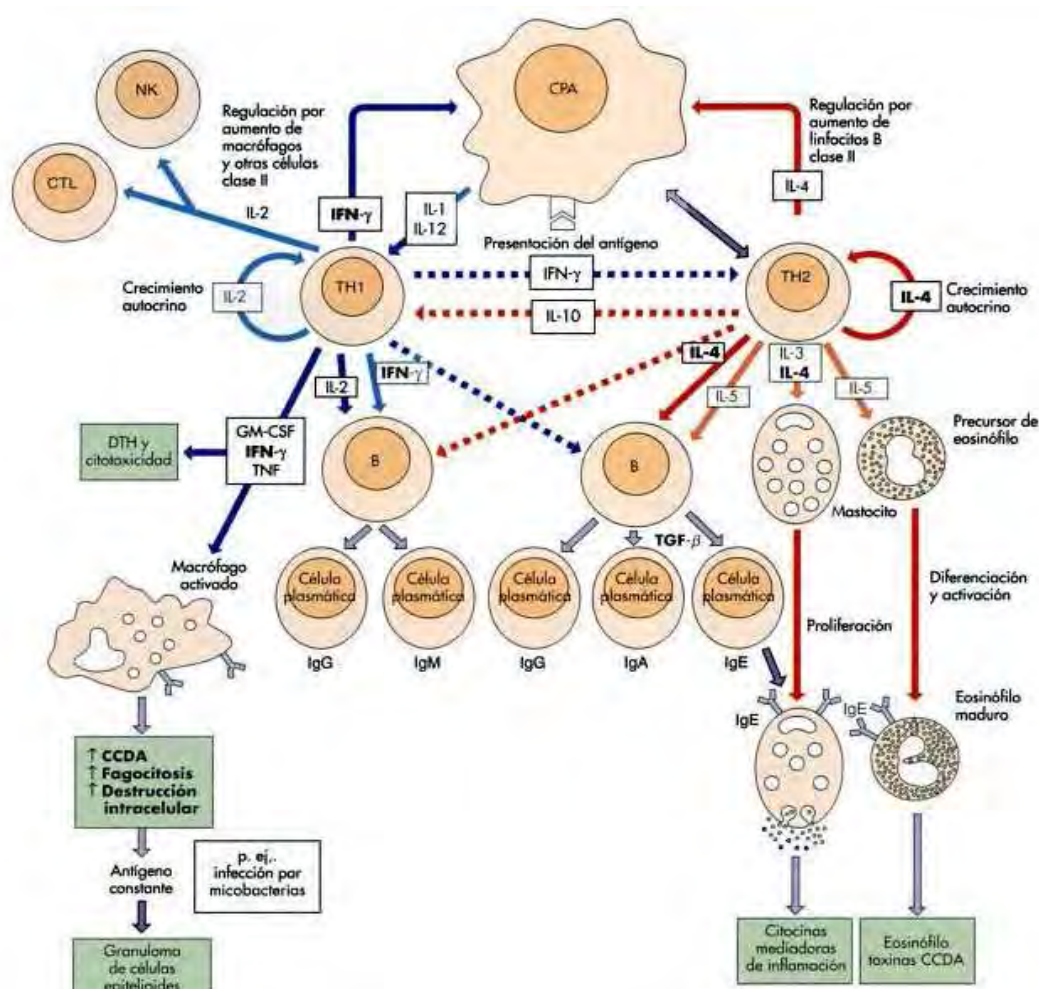


Figura 8. Citocinas producidas por los linfocitos Th1 y Th2 y sus funciones efectoras (Tomado de Murria *et al*, 2006)

En tanto, los linfocitos CD8⁺ activados estimulan la secreción de perforinas, las cuales permeabilizan la membrana de la célula blanco y posteriormente secretan unas proteasas denominadas granzimas en el interior de la células blanco, estas enzimas inician el proceso de apoptosis que conduce a la muerte de la célula blanco y la fragmentación de su ADN (Ácido Desoxirribonucleico) (Berg *et al*, 2008).

La producción de IFN- γ es controlada por citocinas secretadas por APC especialmente por la interleucina 12 (IL12). La función del interferón gamma está centrada en la intervención del macrófago en la inflamación y en la inmunidad adquirida durante la infección. El IFN- γ se encarga de orquestar la respuesta de los macrófagos y además también dirige la atracción de leucocitos y el crecimiento, maduración y diferenciación de muchos tipos celulares, refuerza la actividad de las células NK (del inglés *Natural Killer*) y regula la función de las células B, estimulando la síntesis de anticuerpos IgG opsonizantes y fijadores del complemento, que facilitan la fagocitosis de los microbios (Guidotti and Chisari, 2001).

Tras la estimulación antigénica, los linfocitos T también aumentan la expresión de receptores de muchas citocinas, además suelen identificarse por la expresión de proteínas de superficie recién sintetizadas denominados marcadores de activación, que se sintetizan junto con las citocinas. Uno de estos marcadores de activación es la cadena alfa del receptor de IL2 conocida como CD25, otra proteína importante denominada CD69, la cual es inducida en la activación de los linfocitos tanto *in vivo* como *in vitro*, esta molécula la cual parece ser la primera glicoproteína inducible de superficie adquirida durante la activación de células linfoides, está implicada en la proliferación de linfocitos y funciona como un receptor de señal que se transmite en los linfocitos, células NK y plaquetas (Marziol *et al*, 1999).

La proliferación de linfocitos T en respuesta al reconocimiento antigénico está mediada principalmente por una vía de crecimiento autócrino, en la que, los linfocitos T activados secretan sus propias citocinas estimuladoras del crecimiento y también expresan en su superficie los receptores de estas citocinas principalmente IL-2. (Schatz and Malissen, 2002). Parte de la progenie de estos linfocitos T proliferantes se diferencian en linfocitos T efectores, que eliminan los antígenos y pueden activar a otras células inmunitarias y otros en linfocitos de memoria de larga duración y funcionalmente quiescentes. La población de células de memoria es la responsable de que la respuesta inmunitaria tras exposiciones repetidas al mismo antígeno sea más potente y rápida (Nemec, 2001).

2. VIRUS DE PAPILOMA HUMANO (VPH)

El Género *Papillomavirus*, integrado en la Familia Papillomaviridae, es un grupo de virus conocido desde la antigüedad pero descrito por primera vez en la década de los años 1930s. Está ampliamente distribuido en la naturaleza e infecta a la mayoría de los mamíferos y aves, con la posible excepción del ratón de laboratorio. (García, 2007). Debido a que las proteínas de la cápside viral son antigénicamente muy similares entre sí, los papilomavirus no se clasifican por serotipos sino que atendiendo a las características de su ADN se clasifican según genotipos (Ferenczy *et al*, 1981). Contienen una doble hebra de ADN de 7800 a 7900 pares de bases, el virión mide 45-55nm y tiene una cápside icosaédrica compuesta por 72 capsómeros (60 hexámeros y 12 pentámeros) (Hebner and Laimins, 2006) (Figura 9).

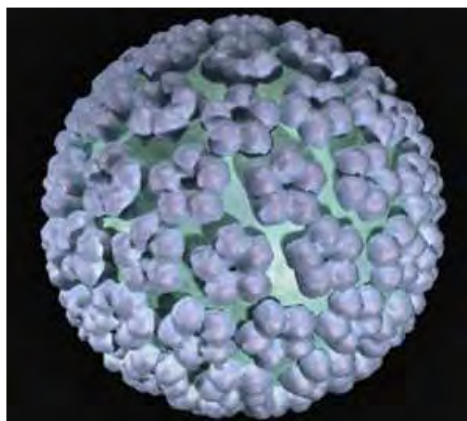


Figura 9. Virus de papiloma humano (Tomado de bp3.blogger.com/.../77hbcXs6d3w/s320/virus2.jpg)

Es un virus con un genoma de tamaño limitado que no codifica enzimas limitantes de la replicación viral y por tanto, depende de la maquinaria genética de la célula huésped y de su replicación para reproducirse. Tiene preferencia por las células metaplásicas y del estrato basal del epitelio inmaduro del cérvix, las cuales poseen actividad mitótica, y se presentan con mayor frecuencia en mujeres jóvenes, en la zona de

transformación cervical; una vez infectadas, con su proliferación favorecen la progresión e infección del virus (Tewari *et al*, 2000).

El genoma del VPH se ha dividido en 3 regiones: la región E (*early* o temprana), la región L (*late* o tardía) y una región no codificante pero sí reguladora denominada LCR (del inglés, *long control región*) o bien URR (del inglés, *upstream regulatory region*) (Taja *et al*, 1996) (Figura 10).

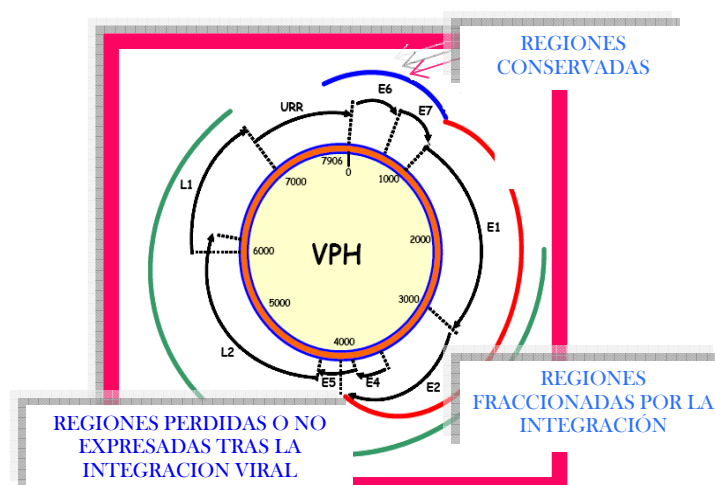


Figura 10. Mapa genético del Virus de Papiloma Humano (Tomado de Andujar, 2004)

La URR es un segmento de ADN de aproximadamente 400 pares de bases adyacente al origen de la replicación viral, no codifica proteínas virales. En su lugar contiene secuencias a las que se unen factores de transcripción tanto de tipo positivo como negativo. Controla la transcripción y con ello la síntesis de proteínas de las regiones temprana y tardía. Debido a su capacidad de unir gran número de factores específicos de transcripción, juega un papel crítico, determinando las posibilidades de infección y genotipos para un determinado huésped (Andujar, 2004).

La región temprana (del inglés, *early region*: E) contiene seis regiones codificantes (E1, E2, E4, E5, E6, E7) de las cuales, la E6 y E7 generan proteínas con alto poder oncogénico, lo que se traduce en un poder transformante y de inmortalización celular. El resto de segmentos sintetizan proteínas propias de la estructura y función del virus. E1 codifica dos proteínas requeridas para la replicación extracromosómica del ADN viral y para completar su ciclo vital. En E2 se codifican dos proteínas que en cooperación con las de E1 son necesarias para la replicación extracromosómica. La proteína E4 parece ser importante para la maduración y replicación viral, la proteína E5 está localizada en la membrana celular, previniendo la acidificación de los endosomas, y estimulando la actividad transformadora del receptor del factor de crecimiento epidermal, contribuyendo a la oncogenicidad de VPH y de esta manera podría estimular la proliferación de las células infectadas por el VPH (Maufort *et al*, 2007).

La región tardía (del inglés, *late region*: L) contiene dos regiones codificantes: L1 y L2, que generan proteínas que forman parte de la cápside viral, de la cual, la L1 constituye aproximadamente el 90%; ambas tienen la capacidad de generar anticuerpos que pueden ser detectados en pacientes infectadas. De la región L2 se codifican proteínas de menor tamaño dando mayor variabilidad interespecies de la cápside viral. La transcripción de L1 y L2 está regulada por factores reguladores de transcripción que se producen únicamente en aquellas células epiteliales más diferenciadas de la capa superficial del cérvix; esto explica porqué la producción de viriones y el efecto citopático es más pronunciado en las lesiones histológicamente de más bajo grado (Beutner, 1997) (Figura 11).

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

Figura 11. Proteínas del VPH y sus funciones (Chen *et al*, 1995)

Como se mencionó anteriormente, la clasificación de los virus de papiloma se basa en diferencias en su secuencia de ADN y en la búsqueda de asociación entre los diferentes tipos de VPH y condilomas, lesiones intraepiteliales y neoplasias invasivas (Ferenczy *et al*, 1981). En la actualidad se han catalogado más de 120 tipos diferentes de VPH, de los cuales aproximadamente 40 pueden infectar el tracto anogenital y otras áreas mucosas del cuerpo (Schiffman and Castle, 2003). Datos procedentes de 11 estudios de casos y controles realizados en diferentes países exploraron la asociación entre la infección por VPH y cáncer de cérvix identificando 15 tipos virales como de alto riesgo oncogénico (VPH-AR) 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82, además de 11 tipos que se han catalogado como de bajo riesgo (VPH-BR) 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 (Muñoz *et al*, 2003). Los VPH de alto riesgo más comunes son el 16, detectable en aproximadamente el 60% de todos los cánceres, y el 18, presente en cerca del 10% (Castellsagué X, 2007).

2.1 CICLO DE VIDA E INFECCION DEL VPH

La infección por virus de papilomas ocurre a través de abrasiones en el epitelio, que exponen a las células de la capa basal a la entrada de las partículas virales. Una vez en el interior, el ciclo del virus está íntimamente unido al programa de diferenciación de las células y aprovechando la maquinaria celular se replica y se propaga (García, 2007).

El ciclo vital del VPH se inicia con la infección de la capa basal de las células epiteliales, donde el genoma viral expresa a las proteínas E1 y E2, lo cual se asocia a los procesos de replicación y transcripción del ADN viral. Posteriormente, las proteínas E5, E6, y E7 son capaces de inducir la proliferación de las células basales y para-basales, provocando alteraciones a nivel de células epiteliales (Sekaric, 2008). Finalmente en las capas más superficiales de la epidermis se expresan las proteínas L1 y L2 que constituyen a la cápside y conducen al posterior ensamblaje de las partículas virales (Figura 12).

En las lesiones en las que se localizan VPH de bajo riesgo (VPH-BR), éstos se encuentran en forma episómica, aislados del genoma celular. Los VPH de alto riesgo (VPH-AR) por el contrario, pueden integrarse en el genoma de la célula huésped o de las células neoplásicas. La integración resulta en la expresión permanente de las oncoproteínas E6 y E7 implicadas en los procesos de replicación, transcripción y transformación celular (Tian Y, 2007), que son las que constituyen el mayor determinante en la inducción y mantenimiento del fenotipo maligno, implicado en el proceso de oncogénesis (Concha, 2007).

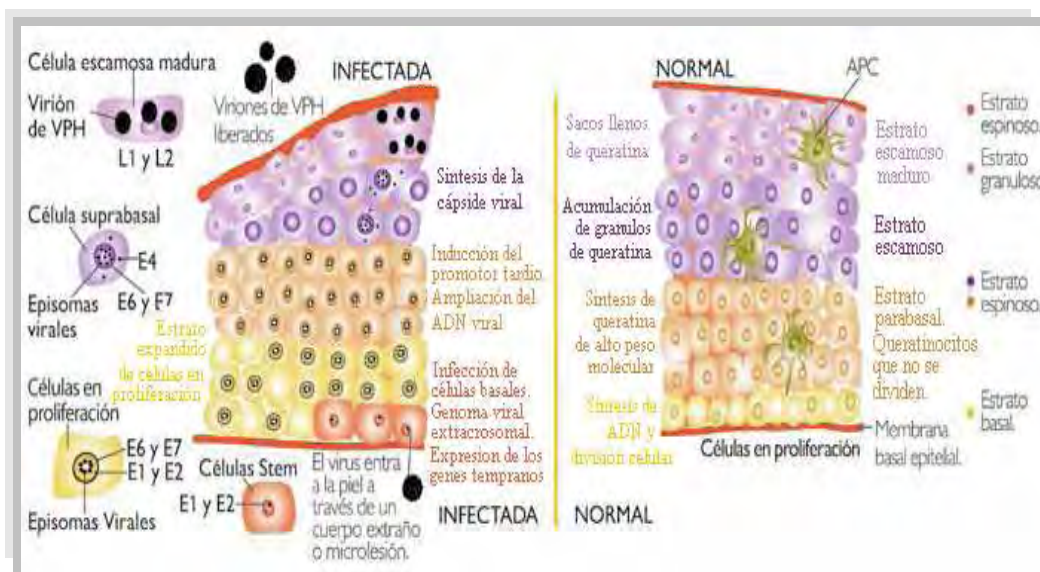


Figura. 12 Ciclo de vida e infección por VPH (Tomado de Frazer, 2004).

Arquitectura de la célula epitelial estratificada de cérvix y expresión de las proteínas virales después de la infección. Las células germinales normales se dividen a lo largo de la membrana basal y maduran verticalmente a través del epitelio sin división posterior (derecha). Después de que el virus infecta estas células en la membrana basal (izquierda), se expresan las proteínas tempranas bajo las cuales las células que están en división se expanden verticalmente y la diferenciación celular es retrasada e incompleta. Las proteínas virales se expresan secuencialmente con la diferenciación y los viriones se producen en las superiores del epitelio. Las células presentadoras de antígenos (APC) son abatidas en la célula infectada.

3. CÁNCER CÉRVICO-UTERINO Y VIRUS DE PAPILOMA HUMANO

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres de los países en desarrollo. Después del cáncer de mama, es el más frecuente en el sexo femenino y ocupa el segundo lugar entre todas las neoplasias malignas; la mayor incidencia se reporta en las mujeres con edades comprendidas entre los 40 y 50 años (Warton and Tortoleto, 2000). Se estima que el CaCu causa alrededor de 500,000 muertes al año en el mundo. En países en desarrollo, su incidencia llega hasta 40 por 100,000 mujeres (Franco, 2001).

Estudios epidemiológicos del CaCu han demostrado que esta entidad se comporta como una enfermedad de transmisión sexual, y diversos

factores de riesgo parecen estar involucrados en su desarrollo. Los de mayor asociación son inicio temprano de relaciones sexuales, número de parejas sexuales, infecciones virales y bacterianas, hábitos reproductivos, uso de anticonceptivos orales, hábitos dietéticos y tabaquismo, entre otros. Sin embargo, múltiples estudios han concluido que el factor definitivo en la etiología del CaCu es la infección del cérvix por algunos tipos VPH pues se encuentra asociado en un 97.7% a éste (Muñoz, 1992).

Esta enfermedad tiene una historia natural de larga evolución que inicia con los cambios en el epitelio cervical (displasias), que gradualmente van acentuándose hasta que en un término de 12 a 13 años se transforman en carcinoma invasor (Meijer, 1998). Sin embargo, no todas las displasias evolucionan a cáncer, la mayoría son transitorias y sólo cerca del 25% desarrollan una lesión intraepitelial de bajo grado (LSIL del inglés *low-grade squamous intraepithelial lesion*). Después, sólo del 20 a 40% de estas LSIL progresarán a lesiones intraepiteliales de alto grado (HSIL del inglés *high-grade squamous intraepithelial lesion*). Esto significa que aquellas mujeres que en alguna ocasión adquieren una infección por VPH, sólo el 5 ó 10% de ellas desarrollarán una HSIL, mientras que cerca del 90% de las mujeres infectadas no mostrarán evidencia alguna del tipo viral adquirido después de 12 a 36 meses (Hildesheim, 1994).

Además al cáncer de cérvix, una buena proporción de cáncer anal, perianal, vulvar y de pene se encuentran fuertemente asociados con infecciones por VPH. Evidencias epidemiológicas sugieren que estos tipos de cáncer también son enfermedades transmitidas sexualmente, puesto que mujeres con múltiples parejas sexuales e inicio de vida sexual activa a edades tempranas y sin protección predisponen a la obtención de infecciones por VPH (Zur Hausen, 1999).

Además, en los datos epidemiológicos se muestran varias evidencias celulares y moleculares que fundamentan la asociación de VPH con el desarrollo de cáncer cérvico-uterino (Zur Hausen, 2000) tales como:

- ♦ La presencia regular de ADN del VPH en tumores de biopsias en respectivos especímenes.
- ♦ La demostración de la expresión de oncogenes virales (E6 y E7) en las células tumorales.
- ♦ La identificación de las propiedades de transformación de estos genes.
- ♦ El requerimiento de la expresión de E6 y E7 para el mantenimiento del fenotipo maligno en las células de cáncer cervical.
- ♦ La interacción de las oncoproteínas virales con las proteínas de regulación de la proliferación de la célula hospedera.

4. EL USO DE PSEUDOVIRUS Y LA RESPUESTA INMUNE HACIA EL CACU

Un avance fundamental para el estudio de la respuesta inmune contra el VPH así como el desarrollo de las propuestas profilácticas contra el CaCu, fue el descubrimiento de que la proteína L1 de la cápside del VPH expresada de manera artificial en sistemas recombinantes puede ensamblarse espontáneamente como partículas semejantes a virus (VLP, del inglés *virus-like particles*) (Xu, 2006), ya sea individualmente o en conjunto con la proteína L2. Las partículas tipo-virus retienen la capacidad inmunogénica del virus sin portar el potencial transformante contenido en el genoma, y su disponibilidad ha permitido su uso para el estudio de la inmunidad contra el VPH en modelos animales y como antígenos en ensayos inmuno-enzimáticos (ELISA) para la detección de anticuerpos específicos en el suero de pacientes con infección por VPH (Christensen *et al*, 1996). El uso de VLP como inmunógenos da como

resultado la producción de anticuerpos específicos hacia la proteína L1 y su estructura altamente organizada y repetitiva sugiere su uso como adyuvante de la respuesta inmune y potencialmente pueden ser propuestos como acarreadores incluso de proteínas de otros virus o de antígenos tumorales (Schiller *et al*, 2001).

Dos vacunas basadas en VLP de los tipos 16,18 y una de ellas además con los tipos 6 y 11, se encuentran disponibles comercialmente y han demostrado la capacidad para proteger en contra de una infección persistente por el VPH la cual, es el principal factor de riesgo para el desarrollo de cáncer cervical. Sin embargo, aun cuando los resultados obtenidos son muy promisorios, quedan por resolver algunas cuestiones relacionadas con los mecanismos que participan en la protección conferida. Por ejemplo, queda por ser determinada la persistencia de la protección conferida por la vacunación y la participación de los distintos tipos de respuestas inmunes en el control de la lesión; la generación de anticuerpos específicos está suficientemente documentada y su magnitud es empleada como un parámetro de la efectividad y duración de la inmunización con VLP u otros inmunógenos derivados de VPH, y la producción de anticuerpos y su posterior seroconversión implican la función de los linfocitos T cooperadores; sin embargo, no es tan claro si participan también los linfocitos T citotóxicos. (Heino *et al*, 1995 y Urquiza, *et al* 2005).

Por tanto, las VLP pueden ser de utilidad como fuente de antígenos en ensayos *ex vivo* para evaluar la naturaleza de la respuesta inmune tanto celular como mediada por anticuerpos, durante la infección natural por el VPH, así como la naturaleza de la inmunidad conferida mediante la vacunación.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres de los países en desarrollo, presentándose la mayor incidencia en las mujeres con edades comprendidas entre los 40 y 50 años (Warton and Tortoleto, 2000). Se estima que el CaCu causa alrededor de 500,000 muertes al año en el mundo. En países en desarrollo, su incidencia llega hasta 40 por 100,000 mujeres (Franco, 2001).

La epidemiología del CaCu ha demostrado que esta entidad se comporta como una enfermedad de transmisión sexual, y diversos factores de riesgo parecen estar involucrados en su desarrollo. Sin embargo, múltiples estudios han concluido que el factor definitivo en su etiología es la infección del cérvix por algunos tipos VPH, pues se encuentra asociado en un 97.7% a éste (Muñoz, 1992).

Estudios sobre la historia natural de la infección por VPH demuestran que la mayoría de las mujeres jóvenes se infectan en las edades de mayor actividad sexual, con una frecuencia de infección que puede llegar a ser mayor al 50% en las mujeres adolescentes y adultas jóvenes; se considera que el sistema inmune es capaz de controlar y eliminar dicha infección por acción de la inmunidad innata, o posteriormente mediante la activación de una respuesta específica de tipo celular y la creación de anticuerpos dirigidos contra las proteínas del virus. Por tanto, la mayoría de las mujeres infectadas experimentan una resolución espontánea, con la eliminación total del virus en el transcurso de 24 meses (Goldie *et al*, 2003). No obstante, en algunas ocasiones, la respuesta inmune no es lo suficientemente efectiva y tras un periodo de persistencia de la infección, generalmente largo, las partículas del ADN viral que se encuentra en forma episomal, sufren un proceso de integración al genoma celular y con ello una serie de acontecimientos que

conducen a un bloqueo de proteínas con funciones importantes en el ciclo celular y como consecuencia el desarrollo del tumor. Por tal motivo, se considera que la inducción de una respuesta inmune adecuada es importante para evitar o incluso revertir el desarrollo de una neoplasia debida a la infección por el VPH.

Con la finalidad de evaluar algunas características de la respuesta inmune celular en las etapas tempranas de la infección por VPH, en este trabajo evaluamos la respuesta de activación in vitro de células mononucleares de sangre periférica debida a la incubación con antígenos de VPH y diferentes a VPH, provenientes de un grupo de pacientes positivas con una lesión aparente de VPH, en comparación con un grupo control.

HIPÓTESIS

Las partículas tipo virales (VLP's) consistentes de la proteína L1 recombinante de HPV 16 conservan las propiedades inmunogénicas de los virus sin el potencial infectante. Por tanto, el cultivo in vitro de leucocitos de sangre periférica en presencia de VLPs conducirá a la activación de linfocitos T de memoria, que hayan entrado en contacto con antígenos del virus dentro del organismo. Dicha respuesta de activación será más fuerte en pacientes con infección por VPH, que en donadores sin una infección aparente.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la presencia de linfocitos T específicos hacia antígenos de la proteína L1 del VPH y hacia antígenos no relacionados en muestras de sangre periférica de pacientes con infección aparente por VPH y donadoras sin infección aparente por VPH.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener leucocitos de sangre periférica de pacientes con infección aparente por VPH, de donadores que sin infección aparente, y de jóvenes inmunizadas con la vacuna Gardasil®.
- Evaluar la proliferación de linfocitos T CD4+ y CD8+ provenientes de pacientes con infección y de donadoras que no presentan infección de VPH, en respuesta a la incubación in vitro con antígenos de VPH y no relacionados, en comparación con un grupo control proveniente de jóvenes inmunizadas con la vacuna Gardasil®.
- Evaluar la producción de interferón gamma de linfocitos T CD4+ y CD8+ de pacientes con infección y de donadoras que no presentan infección por VPH.
- Evaluar la expresión de la molécula marcadora de activación CD69 en linfocitos T CD4+ y CD8+ de pacientes con infección y de donadoras que no presentan infección por VPH.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico

Consistió en muestras sanguíneas de pacientes con infección aparente por virus del papiloma humano (I-VPH) (rango de edad 20-35 años) y en muestras sanguíneas de donadores con diagnóstico negativo para I-VPH (rango de edad 20-46 años) de acuerdo con el diagnóstico del personal médico de la Clínica de Colposcopia de la Fundación Cruz Talonia, según su procedimiento colposcópico. Como testigo, fueron incluidas muestras de sangre periférica de mujeres vacunadas con tres dosis de la vacuna comercial Gardasil® (rango de edad 12-22 años) consistentes en partículas semejantes a los tipos de VPH -6-, -11, -16, y -18.

Antígenos

Para los estudios *in vitro* se utilizaron partículas tipos virales (VLP's) constituidas por la proteína L1 de HPV-16, -18 la vacuna comercial Cervarix®. Como control positivo fue empleada la vacuna Infanrix Hexa® compuesta por antígenos de toxoide diftérico, toxoide tetánico, tosferina, hepatitis B y tres tipos de virus de polio inactivados.

Obtención de sangre periférica

Las muestras de sangre periférica fueron obtenidas por el método de punción venosa de la fosa anticubital (cubital mediana), tanto de donadoras con I-VPH como sin I-VPH. Esta clasificación se basó en el procedimiento realizado por el personal de la Clínica de Colposcopia de la Fundación Cruz Talonia, en que con ayuda de un colposcopio y un espejo vaginal, se procedió a introducir un hisopo impregnado con ácido acético al 5%, y después de un minuto se pudo apreciar el sitio de la lesión con la apariencia blanquecina.

Para la toma de sangre venosa se utilizaron 3 tubos vacutainer de 6 ml con anticoagulante ACD (ácido cítrico, citrato de sodio y dextrosa,

Becton Dickinson, USA). Posteriormente las muestras de sangre periférica fueron centrifugadas a 2000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos, después de este tiempo pudieron observarse dos fases. El plasma sanguíneo (fase superior) fue colectado y almacenado en alícuotas a -4°C, para otros procedimientos mientras que el paquete celular (fase inferior) fue utilizado para la obtención de leucocitos de sangre periférica.

Obtención de Leucocitos de Sangre Periférica de jóvenes inmunizadas con la vacuna Gardasil®, de pacientes que presentan infección y de donadoras que no presentan infección

Células mono-nucleares de sangre periférica (CMNSP) fueron obtenidas mediante el uso de un gradiente de Histopaque® (Sigma, USA). Para ello, 20 mL de sangre periférica obtenida en presencia de ACD fueron centrifugados a 2000 rpm durante 10 minutos para separar el plasma. El paquete celular fue resuspendido en SAF (solución amortiguadora de fosfatos) y llevado a un volumen total de 35ml, los cuales fueron depositados sobre 10ml de Histopaque® (Sigma, USA) en un tubo cónico de 50ml, y centrifugados durante 20 minutos a 1000 rpm y 5 minutos más a 2000 rpm para formar dos fases. Las CMNSP fueron transferidas a un nuevo tubo cónico para ser lavadas dos veces con SAF, para finalmente ser resuspendidas en medio de cultivo de IMDM-12440 (Gibco, USA) suplementado con 10% de plasma humano (IMDM-10P) para realizar los ensayos correspondientes, o mantenidas en crio-preservación en IMDM (Gibco, USA) con 50% de suero fetal de bovino (SFB) (Gibco, USA) y 10% de dimetilsulfoxido (DMSO) hasta su uso posterior.

Determinación de proliferación celular mediante la incorporación de timidina tritiada (³H-TdR).

Para evaluar la proliferación celular, las CMNSP fueron sembradas en placas de 96 pozos de fondo U (Costar, USA) a una densidad 4×10^5 células/pozo en presencia de 1 μ l de la vacuna Cervarix® (GlaxoSmithKline Biologicals, Bélgica) ó 1 μ l/pozo de Infanrix Hexa® (GlaxoSmithKline Biologicals, Bélgica), así como un testigo sin estímulo en medio de cultivo IMDM-10P (Gibco, USA). Después de cinco días de cultivo, las células fueron marcadas con 0.5 μ Ci/pozo de timidina tritiada (Perkin Elmer, Wellesley, MA) durante 16 horas para entonces ser cosechadas (Beckman Coulter, USA), y finalmente obtener las cuentas por minuto emitidas por las muestras resultantes mediante un contador automático de centelleo (Skatron, USA). Los resultados fueron expresados como cuentas por minuto.

Determinación de proliferación celular mediante la generación de células dendríticas y marcaje con carboxifluoresceína (CFSE).

Alternativamente, CMNSP no adherentes fueron marcadas con éster-diacetato de Carboxifluoresceína (Sigma, USA) para ello 4×10^5 células fueron co-cultivadas con células dendríticas autólogas “cargadas” con 1 μ l/pozo de la proteína L1 de los VPH-16 y -18 de la vacuna Cervarix® en placas de 96 pozos de fondo U (Costar, USA) con medio de cultivo IMDM- 12440 (Gibco, USA) y 10% plasma humano. El marcaje se realizó mediante incubación con el reactivo a una concentración de 200 μ M en un ml de SAF durante 15 minutos a temperatura ambiente. Para la generación de células dendríticas (CDs), CMNSP adherentes fueron cultivadas en medio de cultivo IMDM-10P (Gibco, USA) en presencia de 20ng/ml de rhIL-4 y 30ng/ml de rhGM-CSF (R&D, Systems) por 6 días para dar lugar a CDs inmaduras. Estas CDs fueron además incubadas por una hora en presencia o ausencia de 1 μ l de la vacuna Cervarix® (GlaxoSmithKline Biologicals, Bélgica) como fuente de antígenos. Finalmente, fueron inducidas a madurar por 48 horas de incubación con 20 μ g/ml del adyuvante Poli I:C (ácido poliriboinosinico-poliribocitidílico, un ARN sintético de doble cadena, Amersham

Biosciences, USA). Además, en este ensayo se incluyó otro control consistente en 2µL/pozo de fitohemaglutinina (PHA) (Sigma, USA). Después de 6 días de co-cultivo, las células fueron marcadas con 25ng/50µl SAF de anti CD4/PE y 25ng/50µl SAF CD8/APC (R&D, Systems) durante 30 minutos a 4°C. El análisis de células teñidas se realizó con un citómetro de flujo de cuatro colores FACSCalibur™ (BDImmunocytometry Systems, San José, CA). Entre 30000 y 50000 eventos fueron adquiridos y analizados utilizando CELL QUEST PRO™ software para obtener los porcentajes de células CD4+ y CD8+ proliferantes, por disminución de la marca con CFSE, empleando el software WinMDI.

Determinación de la producción de INF-gamma intracelular

Para evaluar la activación de células T hacia antígenos derivados de la proteína L1 del VPH, 4x10⁵ CMNSP fueron sembradas con IMDM-10P (Gibco, USA) en placas de 96 pozos de fondo U (Costar, USA) en presencia de 1µl/pozo de la vacuna Cervarix® ó 1µl/pozo de Infanrix Hexa®, así como un testigo sin estímulo y un testigo positivo con PHA. Para la determinación de INF-gamma intracelular, después de 16 horas de cultivo fue adicionada Brefeldina-A (Sigma, USA) a una concentración final de 10µM por 4 horas más. Transcurrido este tiempo, las células fueron colectadas, fijadas, permeabilizadas de acuerdo con las instrucciones del proveedor de los reactivos CytoFix/CytoPerm y Perm/Wash (Beckton Dickinson, USA) posteriormente fueron marcadas con 25ng/50µl SAF de anticuerpos anti-IFN-g/FITC, 25ng/50µl SAF anti-CD8/APC y 25ng/50µl SAF anti-CD4/PE (R&D, Systems) por incubación a 4°C durante 30 minutos. Las células así tratadas fueron evaluadas con un citómetro de flujo de cuatro colores FACSCalibur™ (BDImmunocytometry Systems, San José, CA). Entre 30000 y 50000 eventos fueron adquiridos y analizados utilizando CELL QUEST PRO™ software para obtener los porcentajes de

células CD4+ y CD8+ productoras de IFN-gamma bajo los diferentes tratamientos, empleando el software WinMDI.

Determinación de la expresión del marcador CD69.

Para evaluar la expresión de CD69 como un marcador de activación de células T en respuesta hacia antígenos derivados de la proteína L1 del VPH, 4×10^5 CMNSP fueron sembradas en placas de 96 pozos de fondo U(Costar, USA) con IMDM-10P (Gibco, USA) en condiciones semejantes al apartado anterior, y transcurrido el tiempo de cultivo las células fueron marcadas con 25ng/ 50µl SAF anti-CD69/FITC, 25ng/ 50µl SAF anti-CD8/APC y 25ng/ 50µl SAF anti-CD4/PE (R&D, Systems) por incubación a 4°C durante 30 minutos, para finalmente evaluar los porcentajes de células CD4+CD69+ y CD8+CD69+ bajo los diferentes tratamientos mediante un citómetro de flujo de cuatro colores FACSCalibur™ (BDImmunocytometry Systems, San José, CA). Entre 30000 y 50000 eventos fueron adquiridos y analizados utilizando CELL QUEST PRO™ software y empleando el software WinMDI.

RESULTADOS

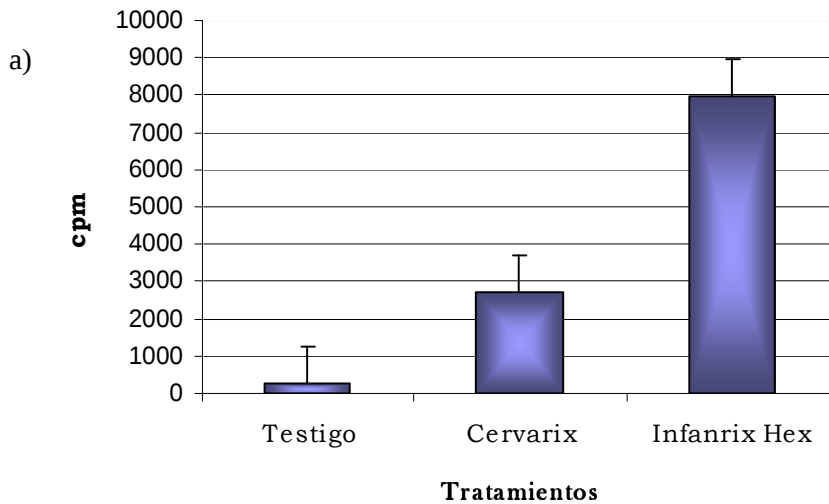
Obtención de muestras biológicas

Para este estudio se obtuvieron muestras biológicas de 20 mujeres con infección por virus de papiloma humano (I-VPH), de acuerdo con el examen de colposcopia y de 20 mujeres negativas para esta infección de acuerdo con el mismo criterio. De todas ellas fue obtenida una muestra de sangre periférica de la cual se aislaron las células mononucleares empleadas en los ensayos descritos posteriormente.

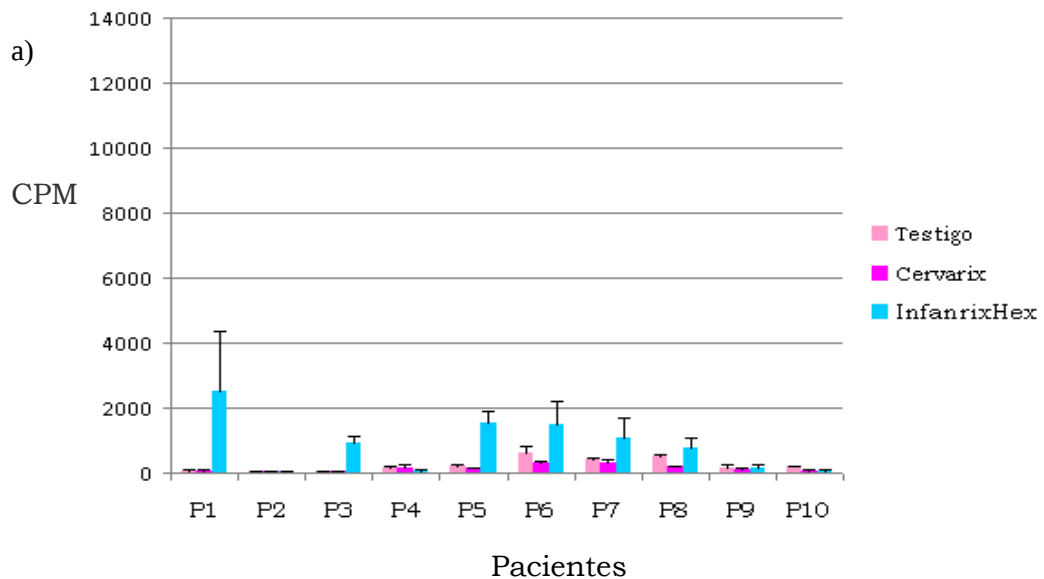
Determinación de la proliferación *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica de pacientes y donadoras sin infección en presencia de la proteína L1 de los VPH tipos 16 y 18.

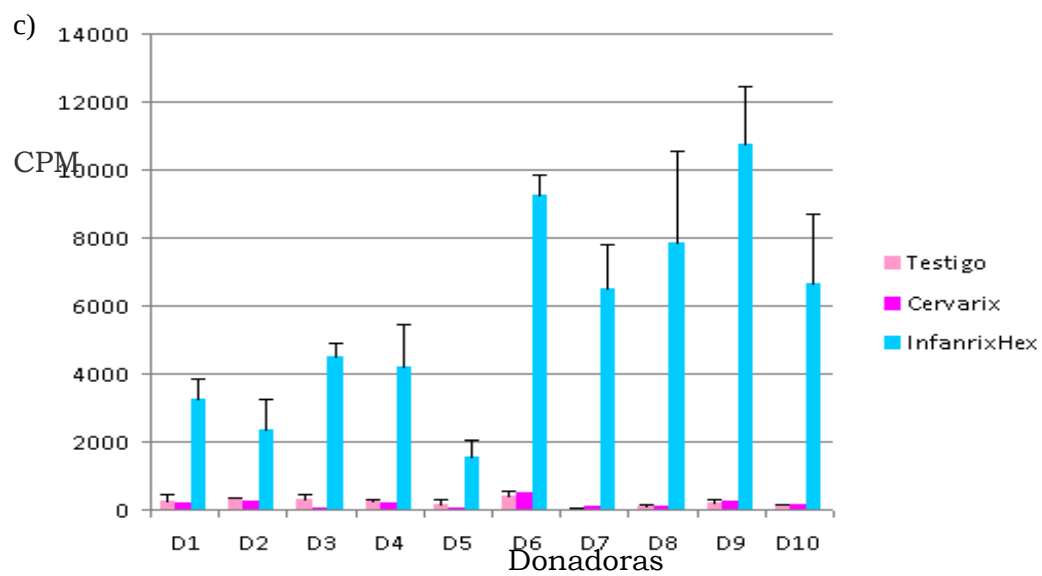
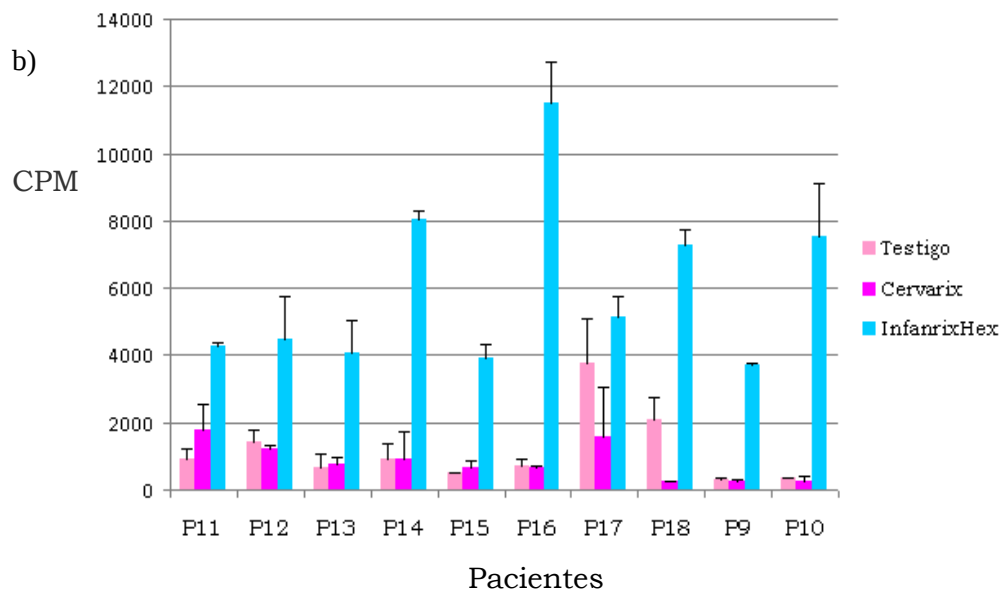
Con la finalidad de comparar la activación inducida por la proteína L1 del VPH en CMNSP de pacientes con infección y de donadoras sin infección, se realizaron diversos ensayos comenzando por evaluar la proliferación celular; para ello, las CMNSP fueron puestos en cultivo en presencia de 1µl de la proteína L1 de los VPH tipos 16 y 18 proveniente de la vacuna comercial Cervarix® durante 5 días de cultivo y posteriormente se determinó la incorporación de timidina tritiada (³H-TdR). El ensayo se llevó a cabo en células de jóvenes vacunadas con la fórmula comercial Gardasil® (L1 de HPV-6, -11, -16 y -18) y se observó una proliferación mayor de las células incubadas con antígeno, en comparación con el testigo, con lo que se demuestra que el ensayo para evaluar la proliferación *in vitro* inducida por la proteína L1 es funcional, y sirve como control positivo (Gráfica 1); posteriormente se realizó el ensayo con CMNSP de mujeres con I-VPH y con mujeres sin I-VPH, en donde se observó que ni las mujeres que presentan infección ni las donadoras sanas respondieron proliferando en respuesta a las proteínas L1 (Gráfica 2 a-d). Sin embargo, sí fue observada una respuesta en ambos grupos cuando las CMNSP fueron incubadas con la vacuna Infanrix Hexa®, la cual contiene antígenos de toxoide diftérico, toxoide

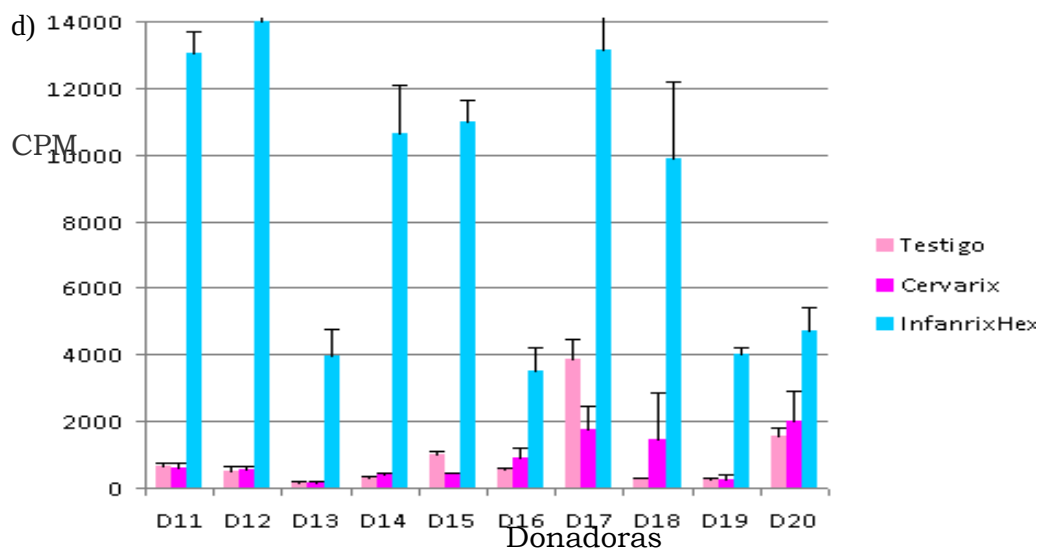
tetánico, tosferina, hepatitis B y tres tipos de virus de polio inactivados (Gráfica 2 a-d). Además, esta respuesta presenta una gran diferencia, ya que las células de mujeres infectadas proliferaron menos que las de mujeres sanas con una media de 7.5 de índice de proliferación y de 26.25, respectivamente (diferencia significativa con $p= 0.016$) (Gráfica 3).



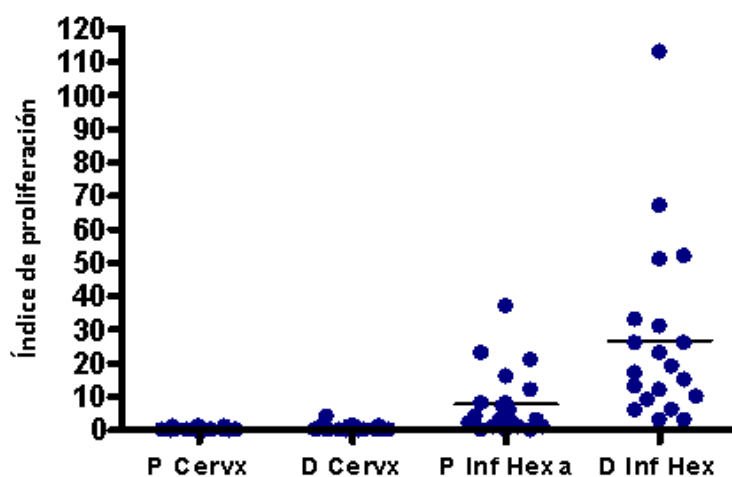
Gráfica 1. Evaluación de la proliferación mediante la incorporación de timidina tritiada (3H-TdR) después de 5 días de cultivo en presencia de Cervarix (HPV -16 y -18) e Infanrix Hexa, en CMNSP de tres jóvenes inmunizadas con la vacuna comercial Gardasil (HPV-16, -18, -6 y -11), cpm: cuentas por minuto.







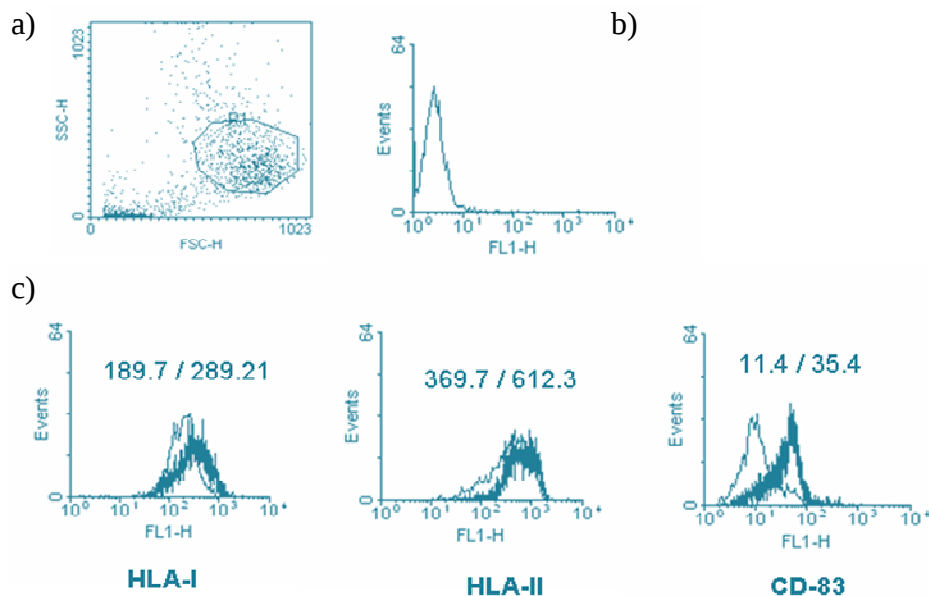
Gráficas 2. Evaluación de la proliferación mediante la incorporación de timidina tritiada ($^3\text{H-TdR}$) después de 5 días de cultivo en presencia de antígenos de VPH (Cervarix®) y de toxoide, diftérico, toxoide tetánico, tosferina, hepatitis B y polio (Infanrix Hexa®) en 10 muestras de CMNSP de mujeres infectadas por VPH (a y b) y 10 de mujeres sanas (c y d).



Gráfica 3. Índice de proliferación de CMNSP de pacientes con I-VPH (P) y donadoras sin I-VPH (D) inducida por la incubación *in vitro* con las vacunas Cervarix® (Cervx) e Inf Hexa® (Inf Hex) con una media de 7.5 para mujeres infectadas y de 26.25, para aquellas que no presentan infección (diferencia significativa con $p=0.016$).

Evaluación de la maduración de células dendríticas mediante la expresión de HLA I y II y el marcador CD83.

Adicionalmente, para evaluar si otras condiciones de activación *in vitro* podían inducir la proliferación de las CMNSP bajo el estímulo de la proteína L1 de VPH, estas células fueron puestas en co-cultivo con células dendríticas autólogas “cargadas” con la proteína L1 de los VPH-16 y -18. Previo al ensayo de proliferación, evaluamos la maduración de las CDs en ausencia de la proteína L1, indicado por un aumento de las moléculas de histocompatibilidad clase I y clase II, y el marcador de maduración CD83. Para ello, las células fueron cosechadas y marcadas con anticuerpos anti HLA I, anti HLA II y anti CD83 y evaluadas por citometría de flujo. Observamos un aumento de la expresión de HLA I (con un porcentaje de 289.21 en comparación con la línea basal de 189.7) y HLA II (con un porcentaje de 612.3 respecto a 369.7), además de un aumento en la expresión de CD83, indicando una activación y maduración de las células dendríticas (Gráfica 4).



Gráfica 4. Determinación de la obtención y maduración de células dendríticas, derivadas a partir de CMNSP adherentes. a) Restricción de la población de células dendríticas (R1); b) Autofluorescencia; c) Expresión de las moléculas HLA I, HLA II y el marcador CD83 en células dendríticas (línea delgada) y células dendríticas incubadas con poli I:C (línea gruesa).

Determinación de la proliferación *in vitro* de linfocitos T de sangre periférica de pacientes y donadoras sin infección inducida por células dendríticas “cargadas” con la proteína L1 de los VPH tipos 16 y 18.

Para este ensayo de proliferación, CMNSP no adherentes de dos pacientes con I-VPH, fueron marcadas con carboxifluoresceína y después de 6 días de co-cultivo con CDs fueron marcadas además con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8 y su proliferación fue evaluada por citometría de flujo. En general porcentaje de proliferación fue mayor en los co-cultivos con células dendríticas que en los cultivos que incluyeron únicamente VLPs; sin embargo, obtuvimos una diferencia en los porcentajes de proliferación de células T CD4+ inducida con células dendríticas/Cervarix® con respecto a su control en dos pacientes (1.78% a 6.2% para la paciente 2 y de 0.84% a 2.19% para la paciente 1) así como con respecto a los linfocitos CD8+ (0.65% a 2.4% y 2.3% a 5.7%, respectivamente) (Gráfica 5).

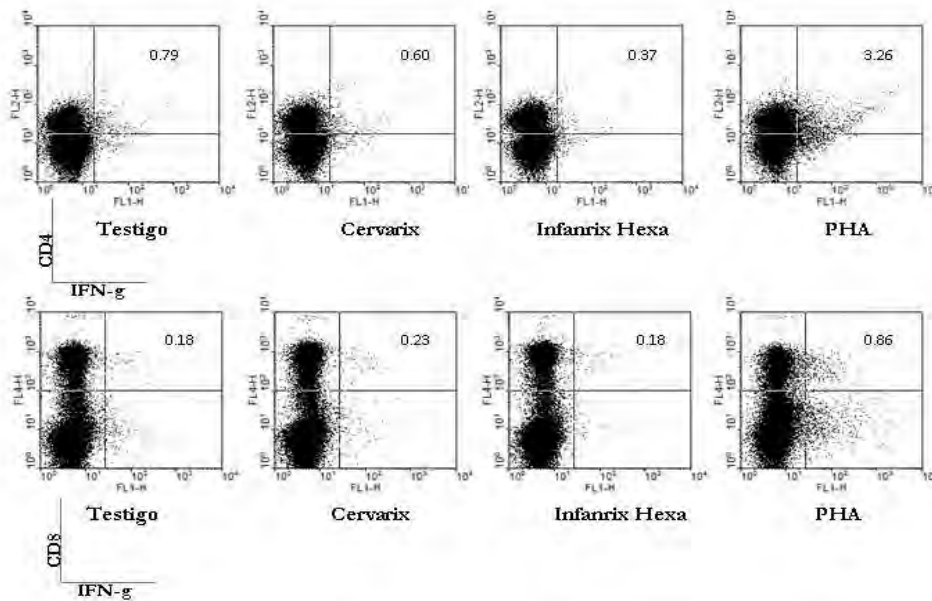
% de proliferación de CMNSP de pacientes con I-VPH en respuesta a Cervarix.				
	CD4+	CD4-	CD8+	CD8-
Paciente 2				
Testigo	0.27	0.92	0.06	0.88
Cervarix	0.28	3.03	0.19	2.88
Infan Hex	0.91	4.41	0.36	4.68
Cel Dendr-	1.78	2.99	0.65	3.93
Cel Dendr+	6.2	16.63	2.4	20.09
PHA	17.53	75.27	29.64	62.73
Paciente 1				
Testigo	0.17	0.08	0.69	1.75
Cervarix	0.33	0.98	0.43	2.43
Infan Hex	0.59	4.58	0.69	6.37
Cel Dendr-	0.84	1.8	0.51	2.3
Cel Dendr+	2.19	4.34	1.19	5.7
PHA	23.71	64.53	34.01	55.73

Gráfica 5. Tabla con los porcentajes de proliferación de linfocitos CD4+ y CD8+ inducida por co-cultivo con CDs “cargadas” con antígenos de L1 de los VPH-16 y -18, en muestras de dos pacientes con I-VPH. Cel Dendr-: co-cultivo con células dendríticas maduras; Cel Dendr+: co-cultivo con células dendríticas maduras y cargadas con Cervarix®.

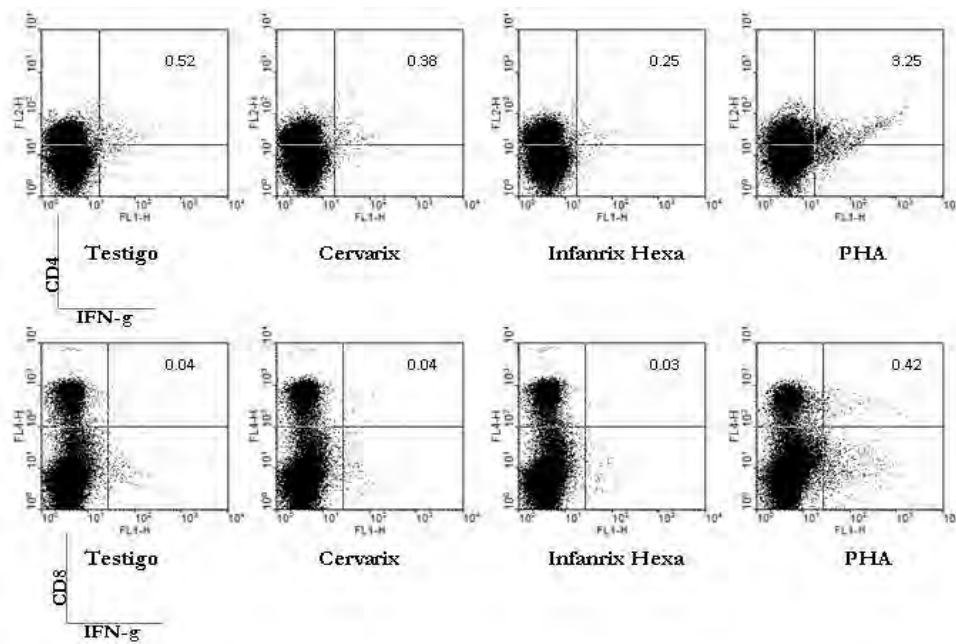
Determinación de la producción de interferón gamma en CMNSP de pacientes y donadoras sin infección en presencia de la proteína L1 de los VPH tipos 16 y 18.

Para la detección de interferón gamma intracelular, CMNSP de mujeres con I-VPH y mujeres que no presentan infección fueron

cultivadas en presencia de la proteína L1 de la vacuna Cervarix® y de los otros antígenos de la vacuna Infanrix Hexa® y de PHA como control positivo. Después de 24h la citocina fue evaluada por citometría de flujo, obteniendo como resultado que para los dos grupos (I-HPV y sin I-HPV) no hubo una diferencia en los porcentajes de células CD4+ ni CD8+ productoras de interferón gamma del testigo con respecto a las células expuestas a las vacunas, aun cuando el ensayo es funcional y las células son viables como lo demuestra la respuesta hacia el activador policlonal PHA. En las gráficas 6 y 7 se muestran los resultados para una paciente y una donadora respectivamente, como ejemplos representativos, de un total de 10 muestras, y en la gráfica 8 se muestra una tabla con los porcentajes de células positivas para IFN gamma de todas las muestras incluidas en este ensayo.



Gráfica 6. Dot plots representativo de la evaluación de la producción de interferón gamma en células CD4+ y CD8+ en una muestra de CMNSP de paciente infectada con VPH con diferentes tratamientos después de 20h de cultivo.



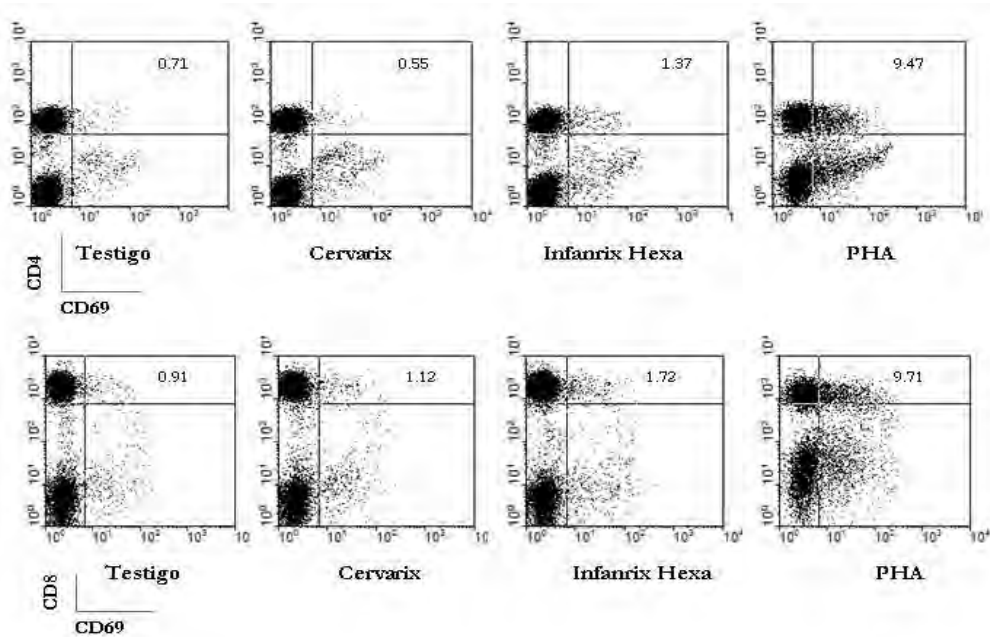
Gráfica 7. Dot plots representativos de la evaluación de la producción de interferón gamma en células CD4+ y CD8+ en una muestra de CMNSP de donadora sin infección por VPH con diferentes tratamientos después de 20h de cultivo.

% de células que expresan CD69									
Células CD4+					Células CD8+				
tratamiento					tratamiento				
PACIENTE	Testigo	Cervarix	Infan hex	PHA	PACIENTES	Testigo	Cervarix	Infan hex	PHA
P1	1.39	1.33	1.01	12.63	P1	3.16	2.8	1.68	9.7
P2	1.15	1.05	0.81	7.37	P2	4.05	3.67	1.47	4.09
P3	1.84	1.62	1.05	5.6	P3	2.4	2.25	1.51	30.17
P4	1.49	0.81	0.9	7.77	P4	3.22	3.19	1.76	19.07
P5	1.12	1.92	0.73	14.07	P5	4.61	5.7	2.41	20.07
D. SANAS					D. SANAS				
D1	1.22	0.9	0.96	8.73	D1	2.49	2.57	2.21	13.2
D2	1.15	1.05	0.93	14.99	D2	1.41	1.52	1.28	8.12
D3	0.71	0.55	1.37	9.47	D3	0.91	1.2	1.72	9.71
D4	1.49	1.68	1.92	7.02	D4	0.75	0.72	0.93	9.71
D5	0.63	0.70	0.86	6.24	D5	1.46	1.87	1.67	16.63

Grafica 8. Tabla general de porcentajes de células tanto CD4+ como CD8+ de los diferentes grupos que producen interferón gama con respecto a cada uno de los tratamientos.

Determinación de la expresión de la molécula CD69 en CMNSP de pacientes y donadoras sin infección en presencia de la proteína L1 de los VPH tipos 16 y 18.

Y finalmente, otra manera de medir la activación celular es mediante la expresión de la molécula denominada CD69 donde CMNSP de mujeres con I-VPH y mujeres sin I-VPH fueron cultivadas en presencia de la proteína L1 de la vacuna Cervarix® y de otros antígenos de la vacuna Infanrix Hexa® y de PHA como control positivo. Después de 5 días la expresión de la molécula CD69 fue evaluada por citometría de flujo, obteniendo como resultado que para los dos grupos (tanto en mujeres infectadas como en mujeres sin infección) no hubo una diferencia significativa en los porcentajes de células CD4+ y CD8+ que expresan CD69 del grupo testigo con respecto a las células expuestas a las vacunas, excepto para una muestra de donadora sin I-VPH en donde los porcentajes obtenidos para los linfocitos CD4+ son de 0.71% para el testigo, 0.55% respecto a la proteína L1 de la vacuna Cervarix® y 1.37% a los antígenos de la vacuna Infanrix Hexa® correspondientes y para linfocitos CD8+ se observó una mayor diferencia con los siguientes porcentajes 0.91%, 1.12%, 1.72% respectivamente. A pesar de no observar diferencia en los porcentajes, el ensayo es funcional y las células son viables como lo demuestra el activador policlonal PHA. En la gráfica 9 se muestran los resultados para una donadora, como ejemplos representativos y en la gráfica 10 se muestra una tabla con los porcentajes de células positivas de todas las muestras incluidas en este ensayo.



Gráfica 9. Dot plots representativos de porcentajes de linfocitos CD4+ y CD8+ que expresan CD69 de una muestra de CMNSP de mujer sin infección por VPH después de 20h de cultivo.

% de células que expresan CD69									
Células CD4+					Células CD8+				
tratamiento					tratamiento				
PACIENTE	Testigo	Cervarix	Infan hex	PHA	PACIENTES	Testigo	Cervarix	Infan hex	PHA
P1	1.39	1.33	1.01	12.63	P1	3.16	2.8	1.68	9.7
P2	1.15	1.05	0.81	7.37	P2	4.05	3.67	1.47	4.09
P3	1.84	1.62	1.05	5.6	P3	2.4	2.25	1.51	30.17
P4	1.49	0.81	0.9	7.77	P4	3.22	3.19	1.76	19.07
P5	1.12	1.92	0.73	14.07	P5	4.61	5.7	2.41	20.07
D. SANAS					D. SANAS				
D1	1.22	0.9	0.96	8.73	D1	2.49	2.57	2.21	13.2
D2	1.15	1.05	0.93	14.99	D2	1.41	1.52	1.28	8.12
D3	0.71	0.55	1.37	9.47	D3	0.91	1.2	1.72	9.71
D4	1.49	1.68	1.92	7.02	D4	0.75	0.72	0.93	9.71
D5	0.63	0.70	0.86	6.24	D5	1.46	1.87	1.67	16.63

Gráfica 10. Tabla general de porcentajes de células tanto CD4+ como CD8+ de los diferentes grupos que expresan CD69 con respecto a cada uno de los tratamientos.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

La infección por el Virus de Papiloma Humano es transmitida sexualmente y está fuertemente asociada con el desarrollo del cáncer cérvico-uterino (Kjaer *et al*, 1996). Aunque cerca de 30 tipos genitales han sido descritos, el VPH-16 es responsable de 50-60% de cánceres cervicales (Muñoz N *et al*, 2003). Sin embargo, la infección por VPH-16 en el tracto genital no necesariamente lleva a una enfermedad maligna; muchas mujeres logran eliminar la infección espontáneamente en un periodo de 48 meses a partir de la detección del virus (Moscicki *et al*, 1998). Fuertes evidencias sugieren que la inmunidad celular es crítica en la resolución y control de la infección natural por el VPH (Scott *et al*, 2001), y al respecto, varios estudios proveen información acerca de la respuesta de células T CD4+ hacia el HPV16, usando proteínas de fusión, péptidos o VLP's tanto en pacientes como en aquellos que no presentan infección, mientras el rol natural que ocurre con los linfocitos T citotóxicos (CD8+) en la regresión de la infección no ha sido probada (Steele *et al*, 2005).

Con la finalidad de evaluar la naturaleza de la respuesta inmune en la infección natural por VPH en el presente estudio se evaluó la capacidad de células mononucleares de sangre periférica (CMNSP) de muestras de 20 mujeres con infección por VPH y de 20 negativas para I-VPH de acuerdo al resultado colposcópico, para responder *in vitro* hacia la proteína L1 del VPH, la cual constituye el 90% de cápside viral y que experimentalmente y con propósitos de vacunación ha demostrado ser altamente antigénica (Pinto *et al*, 2003). Para ello, medimos su proliferación mediante incorporación de timidina tritiada (³H-TdR) y marcaje con carboxifluoresceína, además de la producción de interferón gamma y la expresión de la proteína CD69, como un marcador de activación.

Diversos trabajos han reportado la existencia de una respuesta celular *in vitro* hacia las proteína oncogénica E6 y hacia la proteína reguladora E2 del VHP16, en alrededor del 60% de donadores sanos, lo cual refleja una adecuada respuesta *in vivo* para la eliminación de la infección (de Jong *et al*, 2004). Una observación de ese tipo fue extendida por el mismo grupo para la proteína L1, principal constituyente de la cápside (Van Poelgeest *et al*, 2006). Sin embargo, otros autores detectan una frecuencia menor cuando evalúan dicha respuesta, probablemente debido a las diferencias en las estrategias experimentales empleadas. Al respecto, nuestros resultados muestran una ausencia de proliferación tanto en las mujeres con I-VPH como sin I-VPH cuando fueron incubados con proteínas de la cápside de los VPH tipos 16 y 18, constituidas por la proteína L1, lo cual nos indica que la respuesta natural hacia estas proteínas es limitada en ambos grupos de mujeres que conformaron nuestras muestras.

En contraste, sí observamos proliferación de CMNSP de jóvenes vacunadas con la preparación comercial Gardasil®, constituida por proteínas L1 de los HPV 16 y 18 en forma de cápsides, cuando fueron incubadas *in vitro* con dichas proteínas, lo que indica que bajo nuestras condiciones experimentales podemos detectar una respuesta de activación de células T en respuesta a dicha proteína, siempre que la muestra proceda de un individuo que generó una respuesta significativa *in vivo*, como es el caso de las jóvenes vacunadas, pero no así el de las pacientes ni de las donadoras sanas. Sin embargo, cabe la posibilidad de que algunos de los individuos incluidos en nuestro estudio hayan tenido un contacto presente o previo *in vivo* con alguno de los VPH-16 y -18, pero bajo condiciones diferentes a las producidas por la vacunación, dadas las estrategias del virus para evadir al sistema inmune.

Además, las CMNSP de nuestros grupos de estudio, con y sin I-VPH sí proliferaron *in vitro* en respuesta a otros antígenos provenientes

de microorganismos con potencial infectivo (toxoides diftérico, toxoides tetánico, tosferina, hepatitis B y tres tipos de virus de polio inactivados). Por tanto, podemos suponer que efectivamente, la respuesta hacia la proteína de L1 de VPH 16 es limitada en las muestras incluidas, lo cual puede deberse a una falta de exposición *in vivo* a este tipo de virus o a que por naturaleza, la respuesta hacia este patógeno es poco eficiente. En otro ensayo, las CMNSP de las paciente 2 y paciente 1 mostraron una mayor proliferación cuando fueron incubadas en presencia de células dendríticas “cargadas” con la proteína L1 de HPV16 y 18, en comparación con células dendríticas no cargadas. Las células dendríticas presentan con la mayor eficiencia antígenos a las células T efectoras; por tanto, cabe la posibilidad de que existan células T de memoria específicas hacia la proteína L1 con un requerimiento mayor para ser activadas que las obtenidas mediante la vacunación; queda para ser evaluado con mayor profundidad si las células dendríticas cumplen ese requerimiento para activar a las células T de memoria, o si inducen una activación o *priming in vitro*.

Por otra parte, si bien ambos grupos de muestras (I-VPH y no I-VPH) proliferan *in vitro* ante el estímulo antigénico que representa la vacuna Infanrix Hexa®, existe una diferencia significativa en la magnitud con que responde cada uno, siendo mayor en el grupo de donadoras sin I-VPH, en más de 300%. Esta diferencia en la proliferación puede representar una menor capacidad intrínseca de respuesta por parte de los linfocitos T de las pacientes con I-VPH en comparación a las donadoras sin dicha infección, la cual no pudo ser detectada mediante el re-estímulo con la proteína L1 debido a la deficiente respuesta natural que se genera contra esta proteína. Tal deficiencia en la respuesta de las células T en los individuos con infección por VPH, sobre todo en los estadios más avanzados, constituye actualmente un importante campo de investigación; entre las posibles causas que se han sugerido para explicar esa deficiencia se encuentran la presencia de células T reguladoras en una alta frecuencia

(Visser *et al*, 2007), así como un sesgo negativo en la secreción de citocinas que favorecen la acción citotóxica de los linfocitos T CD8+ (Giannini *et al*, 1998), mediante mecanismos que no han sido completamente dilucidados. Nuestros resultados sugieren que existe tal deficiencia en la capacidad de respuesta antigénica, pero que no se limita a la presentación de antígenos derivados del VPH, y que por tanto, no se generan como consecuencia de la infección por el virus.

Los cultivos celulares a corto plazo, como los realizados en este trabajo, tienen la ventaja de que sus resultados reflejan con mayor fidelidad el estado de memoria de las células T que están siendo evaluadas, en comparación con cultivos a mayor plazo o bajo condiciones de estimulación más complejas, que pueden favorecer la activación *in vitro* de células aunque éstas no hayan tenido un reconocimiento del antígeno *in vivo*; sin embargo, es probable que en estos cultivos no sean reactivadas todas las propiedades de las células T de memoria, como lo pueden ser la secreción de interferón gamma y la expresión de la proteína CD69. En nuestros ensayos, no detectamos la producción de interferón gamma en ninguna de las muestras analizadas, aun cuando los controles consistentes en la incubación en presencia de fitohemaglutinina mostraron que las células pueden producir esa citocina y que el ensayo podía detectarlo por citometría de flujo. Algo semejante observamos para CD69 donde la respuesta positiva en las muestras estudiadas fue mínima. En el caso de las donadoras sin infección aparente tampoco observamos una respuesta de proliferación significativa, aun cuando se ha reportado que la mayoría de los individuos adultos resultan infectados con algún tipo de VPH principalmente al inicio de su vida sexual. De acuerdo con ello, como se mencionó anteriormente, la estimulación *in vitro* de CMNSP de donadores sanos con péptidos derivados de la proteína L1 del VPH 16 resultó en la activación de las muestras de 14 sujetos de un total de 20 incluidos en dicho estudio. La diferencia con nuestros resultados puede deberse a los métodos empleados para la detección de las células

activadas, pues en el trabajo referido y en otros (Van Poelgeest *et al*, 2006), el número de células positivas detectadas mediante la técnica de ELISPOT corresponde a porcentajes sumamente pequeños de las muestras totales, que resultan difícilmente detectables mediante citometría de flujo. De cualquier modo, estos resultados reflejan una respuesta inmune limitada hacia la proteína L1 del HPV tanto en sujetos que han logrado controlar la infección natural como en sujetos con manifestaciones clínicas importantes.

Otra diferencia es el uso de péptidos sintéticos y proteínas totales para la estimulación antigénica, puesto que ha sido observado que los primeros generan respuestas más fuertes que las segundas, probablemente debido a que reducen la necesidad de “procesamiento” para la obtención de antígenos (Cheng *et al*, 2005). En nuestro sistema experimental, empleamos proteínas L1 ensambladas con un alto grado de organización (VLPs), lo cual requiere de un mayor trabajo para generar y presentar antígenos en comparación con el uso de péptidos sintéticos, y que por tanto, pudo contribuir a las diferencias en los resultados obtenidos. Acorde con ello, están las observaciones referidas anteriormente y otras de que cuando en el sistema se emplean como “presentadoras” de antígeno a células dendríticas -caracterizadas por su alta capacidad de procesamiento y presentación antigénica-, “cargadas” con VLP de VPH16/18 fue inducida una mayor proliferación de CMNSP, que no mostraron tal respuesta en el ensayo previo (Davidson *et al*, 2003).

En conjunto, nuestras observaciones están de acuerdo con los resultados obtenidos por Stern y colaboradores (Davidson *et al*, 2003) respecto a que la respuesta inmune natural hacia el VPH es limitada, lo que implica la generación de números reducidos de células de memoria, y que por tanto se requiere de un eficiente procesamiento y una adecuada presentación de antígenos para demostrar tales respuestas de memoria con tan baja frecuencia.

CONCLUSIONES

- ♣ Células mononucleares de sangre periférica (CMNSP) de mujeres que presentan I-VPH y negativas para I-VPH no mostraron proliferación en respuesta a las proteínas L1 del VPH -16 y -18, sin embargo sí fue observada una respuesta cuando las células efectoras fueron co-cultivadas con células dendríticas (CDs) autólogas “cargadas” con la proteína L1. En ambos grupos fue observada una respuesta cuando las CMNSP fueron incubadas con la vacuna Infanrix Hexa® con una media de 7.5 de índice de proliferación respecto a las mujeres infectadas y de 26.25 para las que no presentan infección.

- ♣ Además CMNSP no mostraron una diferencia de respuesta para la producción de interferón gamma en ninguno de los dos grupos (I-VPH y sin I-VPH), y la expresión de CD69 sólo presentó una ligera diferencia en la muestra de una donadora sin I-VPH, cuando fueron cultivadas en presencia de la vacuna Cervarix® e Infanrix Hexa®.

- ♣ Las respuestas observadas anteriormente indican que la respuesta inmune natural hacia el VPH es limitada, por lo tanto se requiere de un eficiente procesamiento y una adecuada presentación de antígenos para demostrar tales respuestas de memoria con tan baja frecuencia.

PERSPECTIVAS

Considerando que en este estudio las muestras fueron analizadas mediante cultivos a corto plazo, sería conveniente llevar a cabo pruebas de cultivos a largo plazo para observar si la activación de linfocitos T requiere de un mayor periodo de tiempo, además se observó que el uso de células dendríticas aumenta la respuesta y la hace más eficiente entonces sería importante determinar el papel que juega estas células y finalmente también es importante determinar el patrón de citocinas tanto Th1 como Th2 y las células T reguladoras para definir el papel que juega la respuesta inmune celular en contra del VPH

ANEXOS

FORMA FARMACÉUTICA Y FORMULACIÓN DE LA VACUNA CERVARX®

Dosis de 0.5 ml contiene:

Proteína L1 del virus del papiloma humano tipo 16 ¹	20 µg
Proteína L1 del virus del papiloma humano tipo 18 ¹	20 µg
3-O-desacil-4'-monofosforil lípido A (MPL) ²	50 µg
Hidróxido de aluminio hidratado	0.5 mg Al ³⁺

Agua inyectable, c.b.p. 0.5 ml.

¹Proteína L1 en la forma de partículas no infecciosas semejantes al virus (VLP) producida mediante tecnología de ADN recombinante usando un sistema de expresión del baculovirus.

²El sistema adyuvante AS04, patentado por GlaxoSmithKline, está compuesto de hidróxido de aluminio y 3-O-desacil-4'-monofosforil lípido A (MPL) (véase Farmacocinética y farmacodinamia).

FORMA FARMACÉUTICA Y FORMULACIÓN DE LA VACUNA INFANRIX HEXA®

Vacuna DTPa-HBV-IPV dosis de 0.5 ml contiene:

Toxoide diftérico no menos de	30 U.I.
Toxoide tetánico no menos de	40 U.I.
Toxoide pertussis	25 mcg
Hemaglutinina filamentosa (HAF)	25 mcg
Pertactina	8 mcg
Antígeno de superficie de hepatitis B ADN-r	10 mcg
Virus de polio inactivado tipo 1	40 UD

Virus de polio inactivado tipo 2	8 UD
Virus de polio inactivado tipo 3	32 UD
Agua inyectable, c.b.p. 0.5 ml.	
Conjugado de polisacárido cápsular de <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b 10 mcg	
Toxoide tetánico (unido covalentemente)	20-40 mcg

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. 4ª ed. Saunders Company. (2003); 125-160.
- Abbas AK, Lichtman AH. Inmunología celular y molecular. Mc Graw-Hill Interamericana. (2004); 189-193.
- Aldecoa BF. Anticuerpos Monoclonales como Terapia Antineoplásica. Anales de la Facultad de Medicina. (2000); 62: 350-356.
- Anaya MC, Cañas CD, Cervera RS, Correa PV. Auto inmunidad y enfermedad autoinmune. Corporación para investigaciones biológicas. (2005); 71-82.
- Andújar SM. Virus y Cáncer. Biocancer. (2004); 1:7-11.
- Baker TS, Newcomb WW, Olson NH, Cowser LM, Olson C, Brown J C. Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. Biophys J. (1991); 60:1445-1456.
- Beck G, Habicht GS. Immunity and the Invertebrates. Scientific American. (1996); Nov: 60-66
- Belkaid Y, Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. Nat Immunol. (2005); 6:353-60.
- Berg J, Stryer L, Tymoczko J. Bioquímica. 6ta ed. Reverte. (2008); 965-969.
- Beutner K. Human papillomavirus and human disease. Am J Med (1997); 102: 9-14
- Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. J Natl Cancer Inst. (1995); 87: 796-802.
- Call ME, Wucherpfennig KW. The T cell receptor: critical role of the membrane environment in receptor assembly and function. Annu Rev Immunol. (2005); 23: 101-25.

- Castellanos MM. Cáncer cervicouterino y el VPH: Opciones de detección. Med UNAM. (2003); 46: 63-66.
- Castellsagué X. Vacunas frente al virus del papiloma humano (VPH): incorporación del pediatra en la lucha contra el cáncer de cuello uterino Revista Pediatría de Atención Primaria (2007); 4: 21-43.
- Cheng WF, Lee NC, Su YN, Chang CM, Hsiao CW, Chen CA y Hsieh YC. Induction of human papillomavirus type 16-specific immunologic responses in a normal and an human papillomavirus-infected populations. Immunology. (2005); 115:136-149.
- Chen JJ, Reid CE, Band V, Androphy EJ. Interaction of Papillomavirus E6 oncoproteins with a putative calcium-binding protein. Science. (1995); 269: 529-531.
- Christensen ND, Lee SK, Kuypers J, Kiviat N, Galloway DA, Carter JJ, Koutsky LA, Wipf GC. The natural history of human papillomavirus type 16 capsid antibodies among a cohort of university women. J Infect Dis. (1996); 174: 927-936.
- Collado VM. et al. El sistema inmune innato I: sus mecanismos. Revista Complutense de Ciencias Veterinarias. (2008); 2: 1-16.
- Concha RM. Diagnosis and treatment of human papilloma virus. Revista Chilena Infectol. (2007); 24: 209-214.
- Cordova A. Fisiología dinámica. Elsevier España. (2003); 243-254.
- Chothia C. The outline structure of the T-cell alpha/beta receptor. EMBO J. (1988); 7: 3745-3755.
- Davidson JE, Sehr P, Faulkner LR, Parish LJ, Gaston K, Moore AR, Pawlita M, Kitchener CH y Stern LP. Human papillomavirus type 16 E2- and L1-specific serological and T-cell responses in women with vulval intraepithelial neoplasia. (2003); 84: 2089-2097.
- de Jong A, van Poelgeest MIE, van der Hulst JM, Drijfhout JW, Fleuren GJ, Melief CJM, Kenter G, Offringa R, Van der Burg SH. Human papillomavirus type 16-positive cervical cancer is associated with impaired CD4+ T cell immunity against early antigens E2 and E6. Cancer Res (2004); 64:5449-5455.

- Ferenczy A, Braun L, Shah KV. Human papillomavirus (HPV) in condylomatous lesions of cervix. *Am J Surg Pathol* (1981); 5: 661-670.
- Franco EL. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *CMAJ*. (2001); 7:164.
- Frazer IH. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev Immunol*. (2004); 4:46-54.
- Ganong FW. Fisiología Médica. Manual moderno. (2002); 500-570.
- García FT. Fundamentos de Inmunobiología. 1a ed. UNAM. (1997); 395-420.
- García SA, et al. Virus de Papiloma Humano. Situación actual, vacunas y perspectivas de su utilización. CNM. Instituto de Salud Carlos III. (2007); 1:1-8.
- Giannini SL, Al-Saleh W, Piron H. Cytokine expression in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix: implications for the generation of local immunosuppression. *Clin Exp Immunol* (1998); 113:183-9.
- Goldie SJ, Grima D, Kohli M, Wright TC, Weinstein M, Franco E. A comprehensive natural history model of HPV infection and Cervical cancer to estimate the clinical impact of a prophylactic HPV 16/18 vaccine. *Int J Cancer*. (2003); 106: 896-904.
- Greenberg PD. Adoptive T cell therapy of tumors: mechanisms operative in the recognition and elimination of tumor cells. *Adv. Immunol*. (1991); 49: 281-355.
- Grossman Z and Herberman RB. Immune surveillance without immunogenicity. *Immunol Today* (1986); 7: 128-131.
- Guidotti LG and Chisari FV. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol* (2001); 19: 65-91.
- Hebner CM and Laimins LA. Human papillomavirus: Basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol*. (2006); 16: 83-97.

- Heino P, Skyldberg B, Rantala I, Hagmar B, Kreider R, Kirnbauer R y Dillner J. Human papillomavirus type 16 capsids expose multiple type-restricted and type-common antigenic epitopes. *J Gen Virol.* (1995); 76: 1141-1153.
-
- Hildesheim A. Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *J Infect Dis.* (1994); 169: 235 -240.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. *Immunobiología: El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad.* 2da ed. Elsevier. (2003); 1-32.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchick MJ. *Immunobiology.* 6ta ed. Garland Science. (2005); 367-459.
- Kjaer SK, van den Brule AJ, Bock JE. Human papillomavirus the most significant risk determinant of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* (1996); 65:601–606.
- Kindt TJ, Golsby RA, Osborne BA. *Inmunología de Kuby.* Mc Graw-Hill Interamericana. (2007); 76- 106.
- Litman GW, Rast JP, Shamblott MJ. Phylogenetic diversification of immunoglobulin genes and the antibody repertoire. *Mol Biol Evol* (1993); 1: 60–72.
- Lydyard PM, Whelam A, Fanger MW. *Instant notes in immunology.* Bios Scientific Publisher Limited. (2000). 32-137.
- Male D, Brostoff J, Roth DB, Roitt I. *Inmunología.* Elsevier Mosby. (2007); 127-235.
- Maufort JP, Williams SM, Pitot HC, Lambert PF. Human papillomavirus 16 E5 oncogene contributes to two stages of skin carcinogenesis. *Cancer Res.* (2007); 67: 106-112.
- Market FE and Papavasiliou N. Recombination and the Evolution of the Adaptive Immune System (2003); 16.
- Marziol R, Mauel J, Betz CS. CD69 and regulation of the immune function. *Immunopharmacology and Immunotoxicology.* (1999); 21:565-582.

- Michael SK, Mark MD, and Garcia KC. Deconstructing the Form and Function of the TCR/CD3 Complex. *Immunity*. (2006); 24:133–139.
- Meijer, CJLM et al. HPV typing and testing in gynaecological pathology: Has the time come?. *Histopathology*. (1998); 33: 83-86.
- Moscicki AB, Shiboski S, Broering J. The natural history of human papillomavirus infection as measured by repeated DNA testing in adolescent and young women. *J Pediatr*. (1998); 132:277–284.
- Murphy K, Travers P, Walport M. *Inmunobiology*. 7a ed. Garland Science Taylor and Francis Group LLC. (2008). 322-377.
- Murria RP, Rosenthal KS, Pfaller AM. *Microbiología médica*. 5ta ed. Elsevier. (2006); 95-159.
- Myers ER, McCrory DC, Nanda K, Bastian L, Matchar DB. Mathematical model for the natural history of human papillomavirus infection and cervical carcinogenesis. *Am J Epidemiol*. (2000); 151: 1158-71.
- Muñoz N. The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: a population-based case-control study in Colombia and Spain. *Int J Cancer*. (1992); 52:743-749.
- Muñoz N, Bosch FX, De Sanjose S. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. (2003); 348:518-527.
- Nemec M. Lymphocyte activation and effector functions. *Curr. Opin. Immunol*. (2001); 265:265.
- Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J. Cancer incidence in five continents. International Agency for Research on Cancer, Lyon; IARC. Scientific Publications. (1997); 3: 143.
- Parslow GT, Terr IA, Suites PD. *Inmunología básica y clínica*. 9a ed. Manual moderno. (2000): 65-89.
- Pinto LA, Edwards J, Castle PE, Harro CD, Lowy DR, Schiller JT, Wallace D, Kopp W, Adelsberger JW, Baseler MW, Berzofsky JA, Hildesheim A. Cellular immune responses to human papillomavirus (HPV)-16 L1 in healthy volunteers immunized with recombinant HPV-16 L1 virus-like particles. *J Infect Dis*. (2003); 188: 327–338.

- Pinto LA, Viscidi R, Clayton D. H, Troy J. K, García-Piñeres AJ, Trivett M , Demuth F, Douglas RL, Schiller JT, Berzofsky JA, Hildesheim A. Cellular immune responses to HPV-18, -31, and -53 in healthy volunteers immunized with recombinant HPV-16 L1 virus-like particles. *Virology*. (2006); 353: 451- 462.
- Rajagopal D, Bal V, George A, Rath S. Diversity & overlap in the mechanisms of processing protein antigens for presentation to T cells. *Indian J Med Res*. (2004); 120: 75-85.
- Regueiro JR. *Inmunología Biología y patología del sistema inmune*. 3ª ed. Editorial Médica panamericana. (2004); 1-8
- Rincón LO, Pareja RL, Jaramillo S. Virus de papiloma Humano, respuesta inmune y cáncer cervical: una relación compleja. *Revista colombiana de ginecología y obstetricia*. (2007); 58: 202-212.
- Roitt MI, Brostoff J, Male KD. *Immunology*. 3a ed. Mosby. (1993); 55-62.
- Roitt MI. *Inmunología Fundamentos*. 10ªed. Editorial Médica Panamericana. (2000); 204.
- Rojas MW. *Inmunología*. 13ªed. Corporación para Investigaciones Biológicas. (2004); 130-144.
- Schiffman M, Castle PE. Human papillomavirus: epidemiology and public health. *Arch Pathol Lab Med*. (2003); 127: 930-934.
- Scott M, Nakagawa M, Moscicki AB. Cell-mediated immune response to human papillomavirus infection. *Clin Diagn Lab Immunol* (2001); 8:209-220.
- Schatz DG y Malissen B. Lymphocyte development. *Curr Opin Immunol*. (2002); 14:183-185.
- Schiller TJ, Lowy RD, Kirnbauer R, Booyt F, Cheng N. Papillomavirus Li major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Medical Sciences*. (2001); 89: 12180-12184.
- Sekaric P. Binding of HPV 16 E6 to E6AP is not required for activation of hTERT. *J Virol*. (2008); 82:71-76.

- Smith GJ, Koretzky G, Jordan MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol.* (2009). 27:591–619.
- Steele JC, Mann CH, Rookes S, Rollason T, Murphy D, Freeth MG, Gallimore PH, Roberts S. T-cell responses to human papillomavirus type 16 among women with different grades of cervical neoplasia. *British Journal of Cancer* (2005); 93: 248–259.
- Steven AF. *Immunology and Evolution of infection Disease.* Princeton University Press. (2002); 13- 20.
- Taja CL, Salas GM, Salcedo VM. Molecular bases of papillomavirus and polyomavirus carcinogenesis. *Salud Publica Mex.* (1996); 38: 47-57.
- Tewari KS, Taylor JA, Liao SY, DiSaia PJ, Burger RA, Monk BJ. Development and assessment of a general theory of cervical carcinogenesis utilizing a severe combined immunodeficiency murine-human xenograf model. *Gynecol Oncol.* (2000); 77: 137-148.
- Tian Y. Expression and significance of Smad2/3 and HPV16 E7 in cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma. *Ai Zheng.* (2007); 26:967-971.
- Urquiza M, Guevara T, Espejo F, Bravo M, Rivera Z, Patorroyo M.. Two L1-peptidos are excellent tools for serological detection of HPV-associated cervical carcinoma lesions. *Elsevier.* (2005): 224-232.
- Van Endert PM, Riganelli D, Greco G, et al. The peptide-binding motif for the human transporter associated with antigen processing. *J Exp Med.* (1995); 182:1883-95.
- Van Poelgeest MIE, Nijhuis ER, Kwappenberg KM, Hamming IE, Drijfhout JW, Fleuren GJ, Van der Zee AGJ, Melief CJM, Kenter GG, Nijman HW, Offringa R and Van der Burg Sjoerd H. Distinct regulation and impact of type 1 T-cell immunity against HPV16 L1, E2 and E6 antigens during HPV16-induced cervical infection and neoplasia. *Int J Cancer.* (2006); 118: 675–683.
- Visser J, Nijman HW, Hoogenboom BN, Jager P, van Baarle D, Schuurin E, Abdulahad W, Miedema F, van der Zee AG, and Daemen T. Frequencies and role of regulatory T cells in patients with (pre)malignant cervical neoplasia. *Clinical and experimental immunology.* (2007); 150: 199–209.

- Wharton T, Tortoleto LG. Cancer Medicine. American Cancer Society. 5 ed. (2000). Cap 112.
- Williams MS, Kwon J. T cell receptor stimulation, reactive oxygen species, and cell signaling. Free Radic Biol Med. (2004); 37: 1144-51.
- Xu YF. Papillomavirus-like particles as vehicles for the delivery of epitopes or genes. Arch Virology. (2006). 151:2133-2148.
- Zur Hausen H. Inmortalization of human cells and their malignant conversion by high risk human papillomavirus genotypes. Semin Cancer Biol. (1999) 9: 405-409.
- Zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. J Nat Can Inst. (2000); 92:690-698.