



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA

**Unidad Multidisciplinaria De Investigación Experimental Zaragoza
(UMIEZ)**

**Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer Laboratorio de
Inmunología**

**Detección de anticuerpos específicos a partículas quiméricas tipo
virales constituidas por la proteína L1 y péptidos antigénicos de las
proteínas E6 y E7 de HPV-16 en sueros de pacientes con neoplasias
cervicales.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

BIOLOGA

P R E S E N T A

Brenda Martínez Carreño



DIRECTOR DE TESIS. Dra. María de Lourdes Mora García



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
AVENIDA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
PRESENTE.

Comunico a usted que la alumna **MARTÍNEZ CARREÑO BRENDA**, con número de cuenta **301040619**, de la carrera de Biología se le ha fijado el día **11** del mes de **junio** de 2013 a las **14:00 hrs.** para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE BIÓL. CARLOS MARTÍNEZ MONTOYA

VOCAL DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA

SECRETARIO M. en C. HUGO LÓPEZ MUÑOZ

SUPLENTE BIÓL. REYNALDA ROLDÁN PÉREZ

SUPLENTE M. en C. EDGAR LEDESMA MARTÍNEZ

El título de la tesis que presenta es: **Detección de anticuerpos específicos a partículas quiméricas tipo virales constituidas por la proteína L1 y péptidos antigénicos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 en sueros de pacientes con neoplasias cervicales.**

Opción de titulación: tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
México, D. F., a 22 de mayo de 2013.

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR
ZARAGOZA
DIRECCION

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Inmunobiología de la UMIEZ de la FES-Zaragoza, UNAM y en el Laboratorio de Inmunología y Cáncer de la UIMEO, H Oncología CMN SXXI IMSS y fue realizado gracias al apoyo financiero de los proyectos CONACYT No. 82827 y FIS/IMSS/PROT/876.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a todos los que me acompañaron en este camino, sin ustedes no lo habría logrado...

Mami, juntas logramos alcanzar este sueño que en algún momento vimos tan lejano, gracias a ti es que se hizo realidad, tu apoyo, cariño y comprensión fueron el motor que me impulsó. Este triunfo es de las dos, tus sacrificios y dedicación no han sido en vano. Este es el comienzo de un nuevo sueño para nosotras. Te amo más.

Tía Ene, siempre has estado pendiente de cada paso y has tenido palabras de aliento cuando las he necesitado. Muchas gracias tía querida, estás aquí en mi corazón.

Oswaldo, gracias por ser mi hermanito, eres la alegría de la casa. Nada de esto hubiera sido lo mismo sin ti. Así como tú siempre estás para mí yo siempre voy a estar para ti. Te adoro.

Javier, no olvidaré el apoyo que me has brindado, que la vida te lo multiplique. Siempre que lo necesites, ahí voy a estar.

Carlos, ha sido todo un honor trabajar a tu lado, ha sido una de las experiencias más bellas y enriquecedoras que he tenido, no tiene precio trabajar con la persona que amas. Este trabajo también es tuyo. No fue casualidad que la vida nos pusiera en el mismo camino y estoy muy agradecida por eso. Eres mi amigo, mi compañero y el mejor novio que pudiera desear. Gracias por todo. Te amo.

Mis queridos amigos, que llenan de magia mi vida, pues hacen que las tristezas desaparezcan y que la felicidad se multiplique, gracias por todos y cada uno de los bellos momentos que me regalaron, los guardo en mi corazón... Laurita, amiga fiel e incondicional y Chucho, mi loco amigo, compañeros de locuras, aventuras y cómplices de travesuras, han marcado mi vida. Elías y Raúl ustedes son del tipo de amigos que nunca se olvidan, desde el principio han estado cerca y espero que eso no cambie. Juan Carlos, te quiero mucho amiguito, me da mucho ser tu amiga. Sofí, Toño, Gil, Azu, Juan y Ceci, me da mucho gusto haberlos conocido, se han convertido en grandes amigos.

Amigos y compañeros de labo, les agradezco los buenos momentos y todas las experiencias y consejos que me compartieron.

A mi directora de tesis la Dra. Lourdes Mora le agradezco mucho por permitirme ser parte de su equipo de trabajo, por apoyarme y ayudarme siempre que la necesité.

Al Dr. Alberto Monroy gracias por el apoyo que me brindó y por los conocimientos recibidos durante mi estancia en el laboratorio.

Por último quiero agradecer muy particularmente a la M. en Bra. Judith Villavicencio, a la Dra. Rosalva Rangel, a la Dra. Yolanda L. Gómez, al Dr. Jorge Hernández y al Dr. Arturo Valle que son un ejemplo a seguir por su disciplina, constancia y compromiso con los estudiantes, ustedes fueron una pieza clave para que yo pudiera llegar a mi meta.

Brenda Martínez Carreño

ÍNDICE GENERAL

	No. de página
ÍNDICE DE ABREVIATURA.....	1
RESUMEN.....	2
1.- MARCO TEORICO.....	4
1.1.- Cáncer cérvicouterino y Virus de papiloma humano.....	4
1.1.2.- Virus del papiloma (HPV).....	7
1.2.- Cáncer cérvicouterino y respuesta inmune.....	10
1.3.- Vacunas para HPV.....	11
1.3.1.- Partículas tipo virales quiméricas (cVLP).....	13
2.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	15
3.- HIPÓTESIS.....	17
4.- OBJETIVOS.....	18
4.1.- Objetivo General.....	18
4.1.2.- Objetivos Particulares.....	18
5.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
5.1.- Partículas Quiméricas Tipo Virales (cVLPs).....	19
5.1.2.- ELISA para detección de anticuerpos anti-VLP.....	20
6.- RESULTADOS.....	21
6.1.- Obtención de sueros de pacientes con lesiones cervicales escamosas intraepiteliales tempranas (LSIL) y con cáncer invasor (CaCu I-IV) positivas a la infección por HPV-16.....	21
6.1.2.- Detección de anticuerpos IgG específicos a partículas quiméricas tipo virales (cVLP) en muestras de suero en pacientes con LSIL y CaCu.....	22
6.1.3.- Detección de anticuerpos IgG específicos a partículas tipo virales constituidas por la proteína L1 de HPV-16 (VLP-L1) en muestras de suero en pacientes con LSIL y CaCu.....	24
6.1.4.-Análisis comparativo de la presencia de anticuerpos contra cVLPs y VLP-L1 en sueros de pacientes con CaCu.....	27
6.1.5.-Análisis comparativo de la presencia de anticuerpos contra cVLPs y VLP-L1 en sueros de pacientes con LSIL.....	29

7.- DISCUSIÓN.....	31
8.- CONCLUSIONES.....	33
9.-PERSPECTIVAS.....	34
10.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	35

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS:

	No. de páginas
Figura 1. Muerte en mujeres por cáncer en México para el año 2002.....	5
Figura 2. Clasificación morfológica de la carcinogénesis del cuello uterino.....	5
Figura 3. Organización del genoma del HPV.....	7
Figura 4. Ciclo viral en el epitelio estratificado	9
Figura 5. Secuencias de epítopes de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 contenidas en la cVLP.....	19
Figura 6. Sueros de pacientes con LSIL y CaCu contienen anticuerpos que reconocen fuertemente a cVLP. Suero de pacientes con lesiones intraepiteliales de bajo grado (LSIL), de pacientes con cáncer cérvico uterino (CaCu), y de donadores normales fueron analizados mediante ELISA para determinar títulos de anticuerpos específicos a partículas quiméricas tipo virales (cVLP).....	23
Figura 7. Sueros de pacientes con CaCu contienen anticuerpos que reconocen a VLP-L1. Suero de pacientes con lesiones intraepiteliales de bajo grado (LSIL), de pacientes con cáncer cérvico uterino (CaCu), y de donadores normales fueron analizados mediante ELISA para determinar títulos de anticuerpos específicos a partículas tipo virales formadas por la proteína L1 de HPV-16 (VLP-L1).....	24
Figura 8. Sueros de pacientes con CaCu contienen anticuerpos que reconocen a cVLP y VLP-L1. Suero de pacientes con cáncer cérvico uterino (CaCu) fueron analizados mediante ELISA para determinar títulos de anticuerpos específicos a partículas tipo virales formadas por la proteína L1 de HPV-16 (VLP-L1) y partículas quiméricas tipo virales (cVLP).....	28
Figura 9. Sueros de pacientes con LSIL contienen anticuerpos que reconocen a cVLP. Suero de pacientes con lesiones intraepiteliales de bajo grado (LSIL) fueron analizados mediante ELISA para determinar títulos de anticuerpos específicos a partículas tipo virales formadas por la proteína L1 de HPV-16 (VLP-L1) y partículas quiméricas tipo virales (cVLP).....	29

TABLAS:

Tabla 1. Función de las proteínas del HPV.....	8
Tabla 2. Comparación de las vacunas preventivas Cervarix y Gardasil.....	12
Tabla 3. Edades de las pacientes con lesiones cervicales escamosas intraepiteliales tempranas (LSIL).....	21
Tabla 4. Edades de las pacientes con Cáncer Cérvico-Uterino (CaCu I-IV).....	21
Tabla 5. Estadios de las pacientes con Cáncer Cérvico-Uterino (CaCu I-IV).....	22

Tabla 6. Prueba *T* de Student de dos colas y análisis de varianza para determinar diferencias de anticuerpos específicos a cVLP en suero de pacientes con diagnóstico de LSIL y CaCu vs. Donadoras normales. Si, indica diferencias significativas $P < 0.05$ a un intervalo de confianza de 95%..... 23

Tabla 7. Prueba *T* de Student de dos colas y análisis de varianza para determinar diferencias de anticuerpos específicos a VLP-L1 en suero de pacientes con diagnóstico de LSIL y CaCu vs. Donadoras normales. Si, indica diferencias significativas $P < 0.05$ a un intervalo de confianza de 95%..... 25

Tabla 8. Tabla comparativa, se muestra el porcentaje de pacientes cuyos valores de absorbancia fueron mayores al límite de corte obtenido, con sus respectivos estadios clínicos de progresión..... 25

Tabla 9. Tabla comparativa, se muestra la correlación entre los valores de absorbancia de las pacientes con CaCu y los estadios clínicos de progresión..... 26

Tabla 10. Tabla comparativa, se muestra la correlación entre los valores de absorbancia de las pacientes con LSIL y las edades correspondientes..... 27

Tabla 11. Prueba *T* de Student de dos colas y análisis de varianza para determinar diferencias de anticuerpos específicos a cVLP vs. VLP-L1 en suero de pacientes con diagnóstico de CaCu. Si, indica diferencias significativas $P < 0.05$ a un intervalo de confianza de 95%..... 28

Tabla 12. Prueba *T* de Student de dos colas y análisis de varianza para determinar diferencias de anticuerpos específicos a VLP-L1 vs. cVLP en suero de pacientes con diagnóstico de LSIL. Si, indica diferencias significativas $P < 0.05$ a un intervalo de confianza de 95%..... 30

INDICE DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxiribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

CaCu: Cáncer cérvicouterino

CL: Células de Langerhans

DC: Dendritic cells (Células dendríticas)

HPV: Human Papillomavirus (Virus de papiloma humano)

NIC: Neoplasia intraepitelial cervical

NK: Natural Killers (Células asesinas naturales)

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay (Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima)

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de polimerasa)

FIGO: International Federation of Gynecology and Obstetrics (Federación Internacional de Ginecología y obstetricia)

LSIL: Lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado

MHC: major histocompatibility complex (Complejo principal de histocompatibilidad)

OMS: Organización mundial de la salud

ORF: Open reading frame (Marco de lectura abierta)

TH1: Linfocito que secretan linfocinas que favorece la respuesta celular

TH2: Linfocito que secretan linfocinas que favorece la respuesta humoral

VLP: Virus-like particle (Partícula tipo viral)

Resumen

Según la OMS (Organización mundial de la salud) el Cáncer Cervicouterino (CaCu) es la segunda causa de muerte más común entre las mujeres en el mundo con 300,000 decesos al año, el 80 % de los casos corresponde a los países en vías de desarrollo y cerca de 500,000 casos nuevos se presentan cada año, lo que representa un importante problema de salud pública. El CaCu se ha convertido en una causa importante de morbilidad y mortalidad entre las mujeres.

Se sabe que el factor etiológico más importante del cáncer cérvicouterino es el virus de papiloma humano (HPV por sus siglas en inglés) siendo los virus tipo 16 y 18 los más prevalentes y agresivos causando cerca del 70 % de las lesiones cancerosas.

Actualmente existen vacunas profilácticas basadas en la inmunización con partículas tipo virus o VLP (del inglés Virus Like Particles) conformadas por la proteína L1 (VLP-L1), que representa aproximadamente el 80% de la cápside viral, y que inducen una fuerte respuesta de anticuerpos neutralizantes con capacidad profiláctica. Asimismo se ha reportado que pacientes con infección por HPV y con lesiones premalignas y malignas del cuello uterino, presentan anticuerpos específicos a VLP-L1 y que los títulos de anticuerpos incrementan con el estadio de la enfermedad. Por otro lado, también es conocido que la presencia de anticuerpos específicos a las oncoproteínas E6 y E7 de HPV de alto riesgo, como lo es el HPV-16, se asocia fuertemente con la progresión de la enfermedad, debido a que la expresión de las oncoproteínas E6 y E7 es necesaria para mantener el estado transformado de las células malignas.

Nuestro equipo de trabajo en colaboración con el CINVESTAV Unidad Guanajuato, ha diseñado VLP quiméricas (cVLPs), basadas en la fusión de péptidos de las oncoproteínas virales E6 y E7 a la proteína L1. Éstas se generaron como proteínas recombinantes utilizando plantas de tabaco de la especie *Nicotiana benthamiana* como sistemas de expresión, tomando en cuenta sus bajos costos de producción; además de la ausencia del riesgo de contaminación por patógenos humanos, entre otras ventajas.

En el presente trabajo se evaluó mediante la técnica de ELISA, la capacidad de las cVLPs y VLP-L1 de HPV-16 para detectar anticuerpos específicos en sueros de 15 donadoras con un análisis de Papanicolaou normal, 22 de pacientes con lesiones cervicales escamosas intraepiteliales tempranas (LSIL) y 20 de pacientes con cáncer invasor (CaCu I-IV) positivas a la infección por HPV-16.

Las cVLPs permitieron detectar de manera diferencial, mayores títulos de anticuerpos específicos en pacientes con LSIL y con CaCu respecto a los detectados en sueros de donadoras normales; mientras que las VLP-L1 únicamente permitieron detectar títulos

altos de anticuerpos en pacientes con CaCu. Asimismo, las cVLPs permitieron detectar mayores títulos de anticuerpos en pacientes con LSIL y CaCu respecto a los detectados con VLP-L1. De manera interesante, los títulos más altos de anticuerpos específicos a cVLPs se encontraron en sueros de las pacientes con estadios clínicos más avanzados. Se sugiere que los péptidos E6 y E7 contenidos en las cVLPs puedan ser blancos antigénicos importantes en la detección de anticuerpos específicos en pacientes con LSIL y CaCu y por tanto pudieran ser importantes como marcadores serológicos en la progresión de la enfermedad.

1.- MARCO TEORICO

1.1.- Cáncer cérvico uterino y Virus de papiloma humano

Los cánceres humanos surgen a causa de una serie de alteraciones genéticas que modifican el comportamiento celular. El daño genético puede ser hereditario o presentarse como resultado de la exposición a carcinógenos exógenos o de procesos mutágenos dentro de la célula. Entre los cambios moleculares se encuentran, expresión excesiva, amplificación o mutación de oncogenes; falla en la función de un gen supresor tumoral a causa de una mutación o delección o por la subversión de moléculas supresoras tumorales a causa de una infección viral (Maxwell *et al.*, 2006).

De acuerdo con la Sociedad Americana del Cáncer 7,6 millones de personas murieron de cáncer en el 2007, ésta enfermedad causa cerca del 13% de todas las muertes a nivel mundial. Particularmente, el cáncer de cuello uterino (CaCu) se ha convertido en una causa importante de morbilidad y mortalidad entre las mujeres, sobre todo de países en desarrollo; significa la segunda causa de muerte por neoplasias malignas en mujeres mayores de 25 años (Castro *et al.*, 2010).

Uno de los descubrimientos más importantes en la investigación etiológica del cáncer de estos últimos 25 años, ha sido la demostración de que el principal factor asociado al desarrollo del CaCu es el virus del papiloma humano (HPV, por sus siglas en inglés) (López *et al.*, 2006).

Aunque la mayoría de las infecciones por HPV son autolimitantes, las infecciones persistentes con tipos de HPV de alto riesgo pueden provocar cáncer cervicouterino causando la muerte de aproximadamente 250,000 mujeres al año. (Malik *et al.*, 2009). En México, en el año 2002, se presentaron 12,512 nuevos casos de CaCu. Esta enfermedad fue la primer causa de muerte entre las mujeres mexicanas con cáncer, ocupando un 16.6% con respecto a otros cánceres (López *et al.*, 2006). (Figura 1).

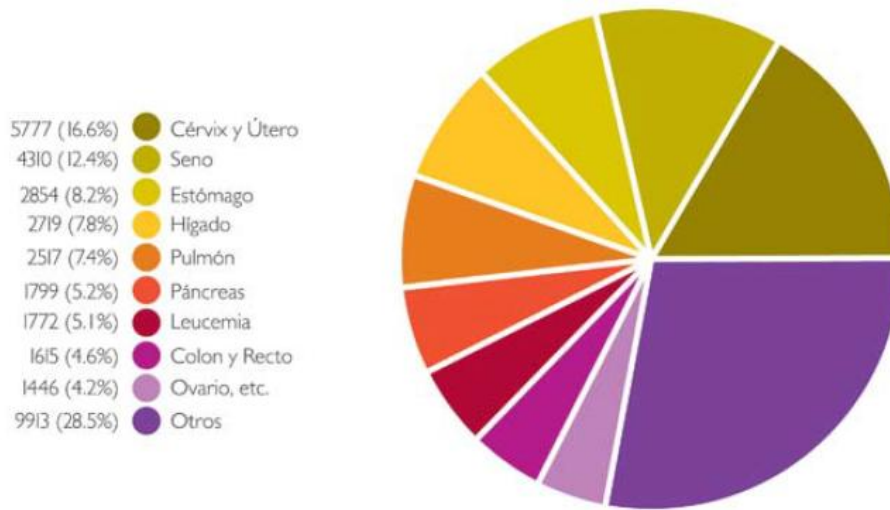


Figura 1. Muerte en mujeres por cáncer en México para el año 2002. Tomado y modificado de (López *et al.*, 2006).

El cáncer cervicouterino puede ser distinguido desde sus fases iniciales mediante estudios citológicos e histopatológicos. La clasificación morfológica de la carcinogénesis del cuello uterino consta de varias etapas que van desde: Epitelio Normal; Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC ó CIN por sus siglas en inglés) en sus tres grados NIC I, NIC II y NIC III; y por último el carcinoma invasor, desde grado I hasta el grado IV. (Carrasco, 2010). (Figura 2).

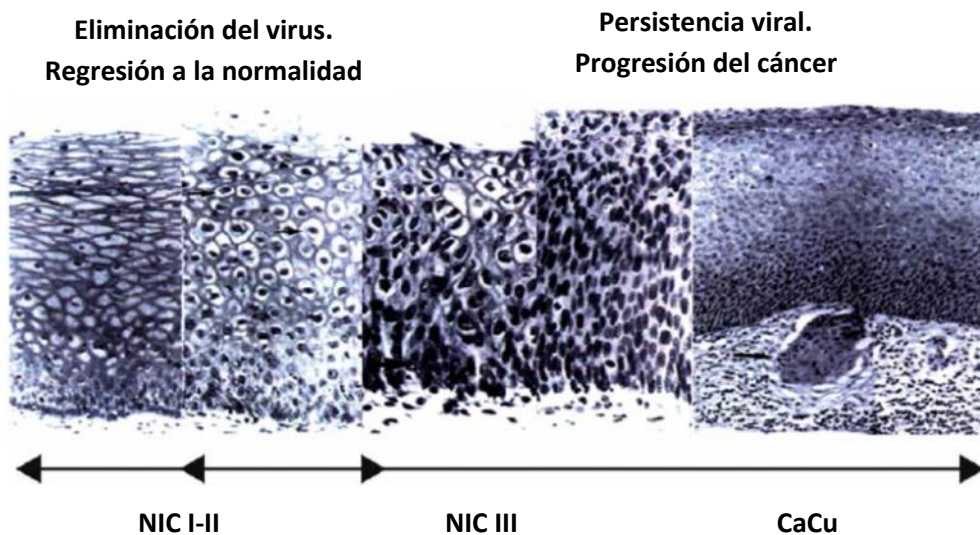


Figura 2. Clasificación morfológica de la carcinogénesis del cuello uterino. Tomado y modificado de (Cid, 2009).

Entre los factores de riesgo tradicionales del CaCu se encuentran: fumar, nivel de educación, número de embarazos, tiempo entre cada Papanicolaou y edad de la primera relación sexual (Mann *et al.*, 1990).

La diseminación es por contacto sexual y los órganos más susceptibles de infección con potencial de iniciar una transformación neoplásica son el cuello uterino (zona de transición) y la línea pectínea del canal anal (Sanjosé *et al.*, 2001).

El HPV es una de las infecciones de transmisión sexual más frecuentes en el mundo, misma que puede ser asintomática por largos periodos de tiempo (Walboomers *et al.*, 1999; Cutts *et al.*, 2007). La asociación cáncer-virus es particularmente fuerte con los tipos de HPV que se han denominado de alto riesgo (HPV-AR), principalmente HPV 16, 18, 31, 33, 35, 52, 56 y 58 (Hernández *et al.*, 2002). El tipo 16 y 18, originan el 70% de los casos de lesiones cancerosas (Castro *et al.*, 2010).

Se han determinado en la actualidad cerca de 100 tipos diferentes de HPV que pueden afectar al hombre (Xercavins *et al.*, 2002). Cada tipo existente fue clasificado de acuerdo a las diferencias en las secuencias de aminoácidos de la proteína L1, la cual es la más abundante en la cápside del virus (Day *et al.*, 2010). Los subtipos vienen definidos por una homología del 90-98%, y las variantes o polimorfismos presentan una homología superior al 98% (Xercavins *et al.*, 2002).

El virus del papiloma humano tipo 16 es la causa del 50% o más de los cánceres de cuello uterino en mujeres. La infección por HPV -16, es muy común en mujeres jóvenes sexualmente activas, sin embargo, la mayoría logra montar una respuesta inmune efectiva y clara contra la infección. Aproximadamente el 10% de los individuos desarrollan una infección persistente, y es esta cohorte de pacientes los que están en riesgo de progresar a cáncer con el desarrollo de lesiones precursoras de alto grado y carcinoma invasivo (Stanley *et al.*, 2007).

Las lesiones precursoras son crecimientos anormales de células escamosas del cuello uterino y se clasifican como lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado [LSIL o neoplasia intraepitelial cervical 1 (CIN 1)] o lesión intraepitelial escamosa de alto grado [HSIL o neoplasia intraepitelial cervical 2 (CIN2) - neoplasia intraepitelial cervical 3 (CIN3)]. La mayoría de las LSIL regresan espontáneamente, sin embargo, algunos LSIL progresan a HSIL. A medida que avanzan las LSIL se lleva a cabo la integración del ADN viral para llegar HSIL y se inicia eventos de transformación mediadas por dos proteínas oncogénicas E6 y E7. Aproximadamente dos tercios de HSIL se espera que persistan, y la probabilidad de que los HSIL no tratados, en particular CIN3, progresen a cáncer invasivo, es superior al 12%. Las mujeres con HSIL, por lo tanto suele tratarse con el procedimiento de escisión electroquirúrgica con asa (Kim *et al.*, 2012).

1.1.2.- Virus del papiloma (HPV)

Actualmente se acepta que el virus del papiloma humano (HPV) es el principal agente etiológico infeccioso asociado al CaCu y las NICs (Hernández *et al.*, 2002), están ampliamente distribuidos en la naturaleza e infectan tanto aves como mamíferos; aunque los virus son absolutamente específicos para cada especie, por lo que los HPV sólo infectan a los seres humanos, el papilomavirus de conejo sólo infectan a los conejos, y así sucesivamente. Estos virus tienen una predilección por la infección de mucosas internas escamosas (Stanley *et al.*, 2007).

Este virus pertenece a la familia Papillomaviridae, es de tamaño pequeño, no encapsulado, con una estructura icosaédrica y una doble cadena de ADN circular de 7500 a 8000 pb (Concha, 2007) (Figura 3). La cápside del virión consta de dos proteínas L1 con un peso molecular de 55 KDa que constituye el 80% de la cápside del virus y L2, con un peso molecular de 53 KDa aproximadamente. (Xercavins *et al.*, 2002). Los HPV codifican sólo de 8 a 10 genes y la mayoría de los factores necesarios para la producción de virus del papiloma incluyendo aquellos implicados en la transcripción viral, traducción y replicación del ADN lo proporciona la célula huésped. La inmortalización de las células por HPV está restringida por los tipos de alto riesgo y es inducida por la asociación de las oncoproteínas E6 y E7 que regulan la proliferación celular (Hubert & Laimins, 2001).

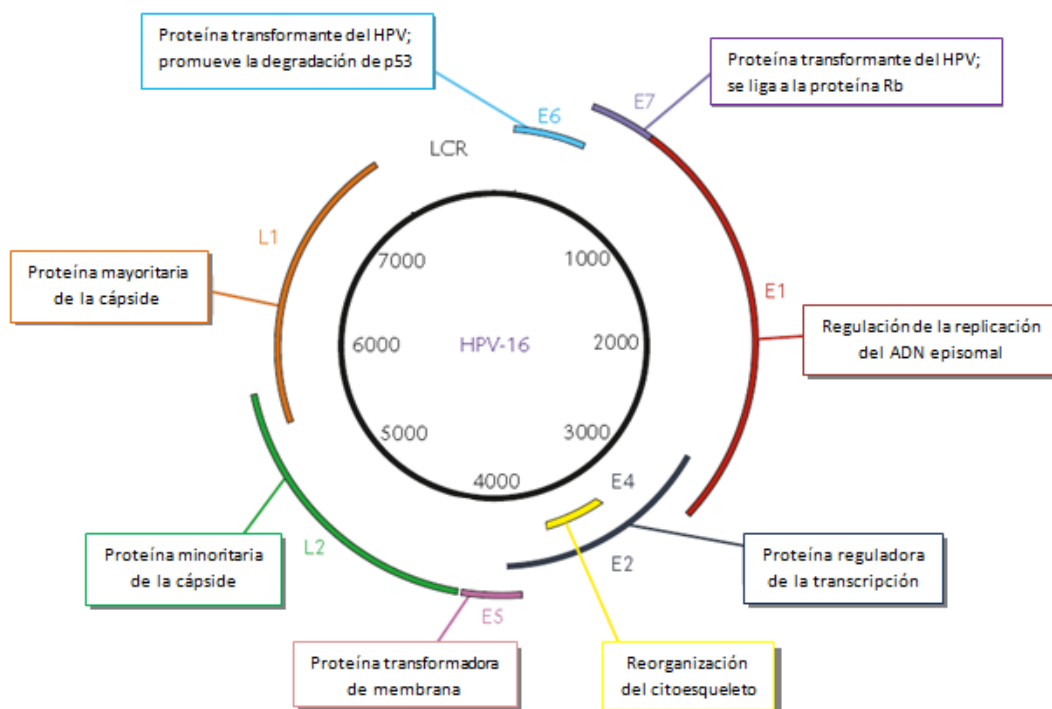


Figura 3. Organización del genoma del HPV. Tomado y modificado de (Lin *et al.*, 2010).

La transcripción del ADN viral se efectúa en una sola dirección siguiendo el sentido de las agujas del reloj. Los genes residen exclusivamente en una de las dos cadenas del ADN y se constituyen en ORF (*open reading frames*) o secuencias de lectura abierta (Xercavins *et al.*, 2002).

El genoma viral tiene la capacidad de codificar para estas dos proteínas llamadas proteínas tardías, y además codifica para otras seis proteínas denominadas proteínas tempranas (Tabla 1), las cuales son necesarias para la replicación del ADN viral (E1), la transcripción (E2) y la transformación (E5, E6 y E7) (Serra 1993; Muñoz *et al.*, 2003).

Funcionalmente están organizados en 3 regiones:

1. **Genes tempranos (E):** E1-E7 que codifican proteínas que funcionan como genes replicadores y reguladores y que se transcriben al inicio del ciclo vital del virus.
2. **Genes tardíos (L):** son L1 y L2 que codifican las proteínas de la cápside y que se expresan al final del ciclo vital del virus.
3. **Genes reguladores (LCR):** es la región larga de control que se encuentra entre las dos regiones descritas y contiene muchos de los elementos de control de la transcripción y regulación, es una región no codificante (Xercavins *et al.*, 2002).

Proteína viral	Función
E1	Helicasa, ATPasa, proteína de unión a ATP esencial para la replicación del ADN viral
E2	Factor de transcripción viral que se une a E1 facilitando el inicio de la replicación viral importante en la encapsidación del genoma
E4	Interactúa con proteínas del citoesqueleto, permitiendo el ensamblaje viral
E5	Actividad de regulación débil. Sobreregula los receptores de factores de crecimiento
E6	Se une a p53, dirigiéndola a degradación mediada por ubiquitinación. Con E7 inmoviliza los queratinocitos primarios
E7	Se une a la proteína del retinoblastoma (pRb), altera el punto de control G1/S. Coopera con E6 para inmortalizar a las células primarias
L1	Proteína mayoritaria de la cápside
L2	Proteína minoritaria de la cápside

Tabla 1. Función de las proteínas del HPV. (Stanley *et al.*, 2007).

Los HPV se pueden dividir en aquellos predominantemente relacionados con verrugas ano-genitales o condilomas benignos como los tipos de HPV-6 y -11, y aquellos

asociados con cánceres ano-genitales y lesiones precursoras (neoplasia intraepitelial) particularmente del cuello uterino: HPV-16, 18, 31, 33, 35 y 45 (Stanley *et al.*, 2007).

El ciclo vital del papilomavirus se produce de forma coordinada con la diferenciación y división celular del epitelio escamoso. El inicio de la infección se produce en las células basales del epitelio escamoso a través de microlesiones que exponen dicha capa al virus. La producción de viriones maduros, sin embargo, no se produce hasta la capa exterior del epitelio estando ligada la multiplicación viral al patrón normal de queratinización y diferenciación celular (Xercavins *et al.*, 2002).

El virus infecta a un subconjunto de células basales primitivas, células madre, con un bajo número de copias. En algún momento después de la infección hay una ronda de replicación del ADN viral que parece ser independiente del ciclo celular y que amplifica el número de copias virales a aproximadamente 50-100 copias por célula; hay pues, una fase de mantenimiento de plásmido o episomal, la expresión génica viral es mínima y, en particular, la expresión de los oncogenes E6 y E7 está bajo un control muy estricto, con transcripciones E6/E7 apenas detectables. E1 y E2 son esenciales en la transcripción y replicación viral, E4 se une a citoqueratinas y está implicada en la modificación de la red de citoesqueleto, E5 afecta a los receptores celulares de los factores de crecimiento; mientras que E6 y E7 son las principales proteínas de transformación (Di Bonito *et al.*, 2006). Cuando el queratinocito infectado entra en la etapa de la diferenciación, existe una enorme sobregulación de la expresión génica viral, la replicación del ADN viral se produce, hay amplificación del número de copias virales de por lo menos unas 1000 copias por célula, hay una abundante expresión de los genes tempranos E6 y E7 y la expresión de los genes tardíos del promotor tardío (Stanley *et al.*, 2007). (Figura 4).

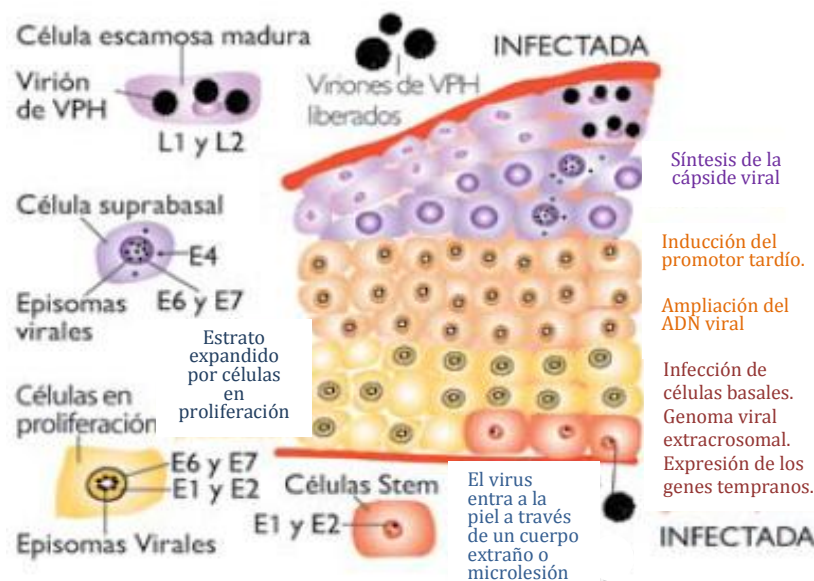


Figura 4. Ciclo viral en el epitelio estratificado. Tomado y modificado de (López *et al.*, 2006).

La interacción de la oncoproteína E7 con la proteína pRB (proteína de retinoblastoma supresora de tumor) y la oncoproteína E6 con la proteína supresora de tumor p53 juegan un papel central en el proceso de transformación de la célula. En las primeras etapas de la infección por HPV, las asociaciones proteína-proteína se cree que alteran el entorno celular para permitir el mantenimiento de los genomas virales. Desafortunadamente, estas mismas interacciones también crean un estado de inestabilidad genómica que ayuda en la transformación celular (Hubert & Laimins, 2001).

1.2.- Cáncer cérvicouterino y respuesta inmune

Los individuos sanos se encuentran protegidos contra los microorganismos por medio de diferentes mecanismos. Estos mecanismos de protección incluyen la inmunidad innata que es también llamada natural o nativa y son todas las medidas de resistencia congénitas que se activan y operan desde la primera vez que el cuerpo se enfrenta a un patógeno y la inmunidad adaptativa, que es un mecanismo de defensa mucho más evolucionado que es estimulado tras la exposición a agentes infecciosos, y cuya intensidad y capacidad defensiva aumenta después de una exposición posterior a un determinado organismo (Abbas *et al.*, 2003).

El sistema de inmunidad innata detecta el peligro o el daño en el tejido vía señalización de moléculas que normalmente no se encuentran exógenamente, como estructuras de manosa, proteínas de choque térmico, ADN, ARN, etc. Las células centinela, incluyendo células epiteliales, células dendríticas (DC) (o células de Langerhans (CL) en la piel), continuamente perciben el medio y se coordinan con efectores del sistema inmune innato (monocitos, macrófagos, NK) para la protección de los tejidos de las mucosas. Esto involucra la producción de moléculas inmunoreguladoras como Interferón- α , - β , y - γ (INFs), Factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), Factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) e interleucinas (IL-1, -6, -10, -12 y -15) que pueden tener efectos directos sobre el control de las células infectadas por el virus. Las DC o CL en el epitelio cervical, son células presentadoras de antígeno. La información integrada y adquirida por las DCs puede dar forma a la posterior célula T convirtiéndola en células T cooperadoras (Th, por sus siglas en inglés T helper) del tipo 1 o tipo 2 o T reguladoras. Una respuesta Th1 favorece la producción de células T efectoras citotóxicas que serían importantes en la limpieza de las células infectadas por el virus, mientras que una respuesta Th2 facilitará la estimulación de células B y su cambio de isotipo proporcionando la generación de anticuerpos neutralizantes (Stern, 2005).

La persistencia de la infección por HPV es la consecuencia de la incapacidad del sistema inmune del huésped para eliminar a las células infectadas. Esto puede ser debido al hecho de que el HPV se propaga sin causar lisis de los queratinocitos ni viremia. (Cid, 2009), pues el virus se empieza a transcribir y replicar con el inicio de la

diferenciación terminal de las células (Ochi H *et al.*, 2008). La proteína E6 de los tipos 16 y 18 de HPV tiene la capacidad de interactuar con proteínas celulares de la regulación del ciclo celular. Dentro de las proteínas que son degradadas, destaca la proteína p53. Los niveles de p53, son en general bastante bajos en líneas celulares positivas a HPV-16 y 18 y en células inmortalizadas por las oncoproteínas del HPV. (Talis *et al.*, 1998). La proteína E7 coopera con la E6 en la inmortalización de los queratinocitos, interactuando con proteínas reguladoras del crecimiento celular como p107 y p130, relacionadas con el gen pRB, ciclina A y los factores de transcripción de la familia AP1 (Concha, 2007).

También la infección persistente está inevitablemente ligada a mecanismos de evasión inmune. El HPV muestra diversos mecanismos para evadir el sistema inmune del hospedero, por ejemplo: mantiene las proteínas virales bajas en las células, expresa las proteínas de la cápside sólo en las capas externas del epitelio y por lo tanto fuera del alcance de las células presentadoras de antígeno, la inhibición de elementos de respuesta sensible como los interferones, y producción de citocinas reguladoras como TGF- β (Bolpetti *et al.*, 2010). Un número de observaciones indican que E7 de HPV 16 tiene un alto grado de homología con varias proteínas humanas, lo que podría facilitar el reconocimiento como antígeno propio (Cid, 2009).

A pesar de la capacidad de HPV para escapar de la inmunovigilancia, la infección por HPV frecuentemente evoca una respuesta inmune celular y humoral discreta. Los estudios serológicos basados en VLPs (Virus Like Particles) indican que en un 50% de los casos la infección por HPV provoca una respuesta humoral antigénica (IgG) contra regiones específica (epítopos conformacionales) de la cápside proteína (L1), que se correlaciona con la presencia de ADN viral en el frotis cervicales. En el 50% restante de la infección desaparece sin dejar tras de sí ninguna respuesta detectable de anticuerpos. Hay anticuerpos neutralizantes que se encuentran durante la regresión de lesiones inducidas por HPV. Además, la respuesta de anticuerpos contra E7 se observa en un alto porcentaje en casos de NIC y CaCu (Carter *et al.*, 2000).

1.3.- Vacunas para HPV

Hace poco más de 25 años se dio a conocer la asociación entre el cáncer cervicouterino y el virus del papiloma humano (HPV) lo cual, nos ayuda a comprender un poco mejor el desarrollo de la enfermedad, gracias a esto, se han podido implementar diversas estrategias para combatir este mal.

En 1991 reportaron que habían logrado sintetizar partículas semejantes a virus a las que denominaron VLPs, esto fue posible gracias a la expresión de los genes de HPV-16 (L1 y L2) en células eucariotas (células animales o levaduras) (Zhou *et al.*, 1991). La expresión de proteína nativa soluble L1 vía vectores procariotas fue generalmente no

exitosa; sin embargo en los 90's se mostró que si la proteína L1 era expresada vía sistemas de expresión eucariota, el ensamble de ésta ocurría produciendo cápsulas virales vacías. Subsecuentemente otros científicos refinaron el ensamble de VLPs y demostraron que el gen de L1 era suficiente para producir VLPs de HPV, las cuales al ser inyectadas intramuscularmente a humanos voluntarios, producían altos títulos de anticuerpos neutralizantes y una respuesta de células T específicas. Además los anticuerpos neutralizantes generados mediante inmunización con VLP L1 protegían a animales contra la infección viral y el desarrollo de papilomas (Zhou *et al.*, 1991; Da Silva *et al.*, 2007; Stanley 2010; Faridi *et al.*, 2011).

Hoy en día se han logrado desarrollar vacunas contra cuatro serotipos del virus, una de ellas es la vacuna recombinante tetravalente contra el HPV Gardasil de Laboratorios Farmacéuticos Merck. La otra vacuna es bivalente contra el HPV Cervarix de Laboratorios Glaxo Smith Kline, fue aprobada en julio de 2007 por la agencia Europea de Medicinas (EMA). Para mejorar el marco de seguridad y eficacia de la vacunación se han diseñado nuevas herramientas, las cuales van desde mejorar la selección antigénica, la utilización de coadyuvantes para incrementar la inmunogenicidad e incluso la investigación sobre nuevas vías de administración. (Rivera *et al.*, 2009). (Tabla 2). Actualmente se ha comprobado en diversas pruebas clínicas que las vacunas profilácticas para HPV son efectivas para evitar la infección.

	Cervarix	Gardasil
Elaborada por:	GlaxoSmithKline	Merck & Co
Tipos de HPV	16, 18	6, 11, 16 y 18
Dosis	20 µg HPV-16 L1 20 µg HPV-18 L1	20 µg HPV- 6 L1 20 µg HPV-11 L1 20 µg HPV-16 L1 20 µg HPV-18 L1
Fuente del antígeno	Baculovirus	Levadura
Adyuvante	AS04	225 µg de Aluminio
Precio aproximado	100 Dólares	120 Dólares
Edades aprobadas	10-25	9-26

Tabla 2. Comparación de las vacunas preventivas Cervarix y Gardasil. Tomado y modificado de (Lin *et al.*, 2010).

Dichas vacunas profilácticas son efectivas para generar anticuerpos neutralizantes en superficies mucosas, que previenen el desarrollo de lesiones precancerosas causadas por HPV-16 y 18 principalmente. Sin embargo, las mujeres que ya están infectadas con HPV oncogénico están en riesgo de desarrollar cáncer y las vacunas profilácticas actuales son ineficaces en estos casos. Esto hace necesario el desarrollo de vacunas terapéuticas encaminadas a inducir respuesta inmune celular contra antígenos de proteínas de expresión temprana como E6 y E7, los cuales a diferencia de las proteínas de la cápside, son expresados constitutivamente en lesiones precancerosas y tumores. Por consiguiente fue necesario producir VLP que consistieran de la fusión de proteínas L1 y/o L2 con proteínas transformantes E6 y/o E7, las cuales son constitutivamente expresadas en todas las células de CaCu y constituyen un blanco óptimo para la inmunoterapia de cáncer cervicouterino. Este tipo de partículas son denominadas partículas tipo virales quiméricas (cVLP) (Tindle 2002; Cid 2009).

1.3.1.- Partículas tipo virales quiméricas (cVLP)

Las partículas tipo virales o VLP's, son fuertemente inmunogénicas y además buenas candidatas para usarlas como vacunas profilácticas y terapéuticas contra la infección por HPV, ya que también han mostrado ser buenos vehículos para acarrear epítopes y genes (Xu *et al.*, 2006). De hecho, la construcción de VLPs quiméricas, al fusionar ciertos inmunógenos en determinadas áreas de las proteínas constitutivas de las VLPs, ha facilitado el acarreo de epítopes o polipéptidos para inducir respuesta inmune específica mediada por linfocitos T citotóxicos y linfocitos B. Varios péptidos antigénicos o polipéptidos derivados de la proteína E7 de HPV-16 han sido fusionados en ciertas secuencias de la proteína L1, sin afectar el ensamblaje estructural de la VLP y manteniendo sus propiedades inmunogénicas (Liu *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2005; Maclean *et al.*, 2007). La fusión de un epítope a la proteína L1 ofrece grandes ventajas, ya que teóricamente resulta en la exposición de 360 copias del mismo por cada partícula de VLP (Xu *et al.*, 2006).

Los baculovirus recombinantes y levaduras son los sistemas más utilizados para producir VLPs, sin embargo debido a los altos costos en su producción, éstos no son los ideales para ser utilizados en países en vías de desarrollo. De manera alternativa, el cultivo de plantas para la producción a gran escala de proteínas heterólogas, ha surgido como una opción importante, debido a que las ventajas que presenta el sistema vegetal sobre los demás sistemas de expresión son: modificaciones postraduccionales semejantes a células animales; no existe riesgo de contaminación del material con patógenos humanos; y permite mantener la estabilidad de la proteína de interés, mediante un almacenamiento conveniente (Teli *et al.*, 2004). Por otro lado, la eliminación de secuencias con función inhibitoria, encontradas en RNA mensajeros virales, ha sido un factor importante para lograr la producción constitutiva de proteínas virales en plantas transgénicas.

Empleando la tecnología en plantas, el Dr. Miguel Ángel Gómez Lim del CINVESTAV Guanajuato generó una partícula quimérica tipo viral (cVLP) constituida de la proteína L1 y epítopes de las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16, la cual fue producida en plantas de jitomate. Las proteínas sintetizadas por estas plantas se ensamblaron en partículas tipo virales, las cuales son estructuralmente idénticas a las contenidas en las vacunas comerciales con tamaño de 50-55 nm. Nuestro grupo determinó la inmunogenicidad de dicha partícula en un modelo de ratón C57BL/6. La administración de cVLP en esta cepa de ratón fue capaz de generar anticuerpos neutralizantes contra la cVLP y la inmunización con estas partículas mostró un efecto terapéutico ante el reto tumoral, lo cual sugirió que estas partículas pueden tener un potencial profiláctico y terapéutico al emplearse como vacuna (Paz *et al.*, 2009; Toledo, 2010; Tapia, 2010). Por otra parte, éstas cVLPs empleadas en ensayos de ELISA han permitido detectar mayores títulos de anticuerpos específicos en un grupo de mujeres con neoplasias intraepiteliales de bajo riesgo (NIC-1), positivas a la infección por HPV-16 y asociadas a varias parejas sexuales, que en donadoras normales negativas a infección por HPV (Monroy *et al.*, 2011).

Recientemente nuestro grupo de trabajo colaboró con el Dr. Gómez Lim en el diseño de una nueva cVLP conteniendo la proteína L1 de HPV-16 y péptidos antigénicos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 con especificidad para alelos HLA clase I de histocompatibilidad de alta frecuencia en la población Mexicana (Monroy *et al.*, 2007). La nueva cVLP fue producida en plantas de *Nicotiana benthamiana*, debido a que a través de este sistema se obtuvo una mayor eficiencia en la producción de las proteínas que constituyen a la partícula (MaClean *et al.*, 2007). Recientemente, nuestro grupo de investigación ha analizado previamente la capacidad de esta cVLP para generar anticuerpos específicos de amplia persistencia y con capacidad neutralizante comparable a los inducidos por VLP compuesta únicamente por la proteína L1 de HPV-16 (Castellanos 2010), sugiriendo que el arreglo de péptidos seroreactivos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 con la proteína L1 de HPV-16 en las cVLPs, permiten una mayor detección de anticuerpos asociados con la infección persistente por HPV-16 y el grado de evolución de la enfermedad.

2.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

El cáncer cervicouterino ocupa los primeros lugares como causa de muerte por cáncer en mujeres mexicanas, y el HPV de alto riesgo es el principal agente etiológico ligado al desarrollo de ésta neoplasia. Se ha estimado que más del 60 % de la población sexualmente activa está infectada por algún tipo de HPV, ello se debe a que la infección por HPV es asintomática y se mantiene latente por largos periodos, por lo que el contagio se propaga continuamente (Muñoz *et al.*, 2003). En consecuencia, resulta indispensable establecer metodologías que permitan la detección temprana de infecciones producidas por HPV (Malik *et al.*, 2009).

Gracias a la tecnología recombinante, se han podido sintetizar partículas tipo virales (VLPs), constituidas principalmente por la proteína L1 de varios tipos de HPV, permitiendo el uso de éstas partículas para estudios de la respuesta inmune contra HPV (Zhou *et al.*, 1991; Kirnbauer *et al.*, 1992; Hagensee *et al.*, 1993; Rose *et al.*, 1993).

Se ha demostrado que existe una fuerte asociación entre la presencia de anticuerpos que reaccionan específicamente a la proteína L1 que conforma a las VLPs de HPV, y el desarrollo de lesiones cervicales o la progresión de estas lesiones a cáncer cervicouterino (Heim *et al.*, 2002; Viscidi *et al.*, 1997). Por otro lado, también se ha encontrado que la presencia de anticuerpos específicos a VLPs de HPV, no necesariamente son indicativos de la infección viral ya que la detección de anticuerpos es fuertemente asincrónica con la infección y la respuesta de anticuerpos a proteínas de HPV invariablemente no ocurre durante una infección natural, por lo que la presencia de anticuerpos anti VLPs puede también denotarnos infecciones pasadas. Sin embargo, varios estudios concuerdan en que la presencia de anticuerpos específicos a los antígenos tumorales E6 y E7 son considerados como el mejor marcador para la progresión de cáncer cervicouterino, debido a que la respuesta de anticuerpos a estas proteínas es influenciada por la integración del virus a las células epiteliales, al estado de la enfermedad e incluso al tamaño tumoral (Lehtinen *et al.*, 2003; Park *et al.*, 1997).

Recientemente nuestro grupo de trabajo en colaboración con el grupo de investigación del CINVESTAV de Guanajuato generó en plantas de *Nicotiana benthamiana*, partículas quiméricas tipo virales (cVLPs); constituidas por la proteína L1 y un rosario de péptidos derivados de las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16 altamente inmunogénicos, debido a su capacidad de inducir respuesta de linfocitos T citotóxicos a partir de sangre periférica de pacientes con neoplasias cervicales (Monroy *et al.*, 2007), y por otro lado, por su capacidad de ser reconocidos por anticuerpos específicos

presentes en muestras séricas de pacientes con NIC-I infectados por HPV-16 (Monroy *et al.*, 2011). Debido a que las cVLPs generadas por nuestro grupo de trabajo contienen a los péptidos antigénicos de las proteínas de E6 y E7 de HPV-16, en el presente trabajo se analizó la capacidad de estas cVLPs para detectar la presencia de anticuerpos específicos en sueros de pacientes con lesiones cervicales escamosas intraepiteliales tempranas (LSIL) y cáncer invasor (CaCu I-IV) positivas a la infección por HPV-16. El empleo de estas partículas para detectar anticuerpos específicos de manera diferencial en las pacientes, será de gran importancia para evaluar la evolución de la infección y el pronóstico de la misma para progresar a CaCu.

3.- HIPÓTESIS.

Es conocido que las partículas tipo virales (VLPs) compuestas por la proteína L1 de HPV de alto riesgo, son antígenos de gran importancia en la detección de respuesta inmune humoral contra la infección por HPV. De hecho, se ha encontrado una fuerte asociación entre la seropositividad de anticuerpos a VLPs y el desarrollo de lesiones cervicales o la progresión de estas lesiones a cáncer cervicouterino. Asimismo, se sabe que la presencia de anticuerpos específicos a los antígenos tumorales E6 y E7 es considerada como uno de los marcadores más importantes en la progresión del cáncer cévico-uterino. Por otro lado, nuestro grupo de investigación ha generado cVLPs constituidas por la proteína L1 y péptidos de las proteínas E6 y E7 de VPH-16 que son reconocidos por anticuerpos de mujeres con LSIL e infección por VPH-16. En consecuencia, se espera que la reactividad de anticuerpos contra cVLPs en mujeres con lesiones cervicales escamosas intraepiteliales tempranas (LSIL) y cáncer invasor (CaCu) y positivas a la infección por VPH-16 incremente conforme progrese la enfermedad.

4.- OBJETIVOS.

4.1.- Objetivo General

- Analizar la capacidad de partículas quiméricas tipo virales constituidas por la proteína L1 y péptidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 (cVLP), para detectar de manera diferencial anticuerpos específicos en sueros de pacientes con lesiones cervicales escamosas intraepiteliales tempranas (LSIL) y cáncer invasor (CaCu I-IV) positivas a la infección por HPV-16.

4.1.2.- Objetivos Particulares

- Obtener sueros de pacientes con lesiones cervicales escamosas intraepiteliales tempranas (LSIL) y con cáncer invasor (CaCu I-IV) positivas a la infección por HPV-16.
- Determinar la presencia de anticuerpos IgG específicos a cVLPs en suero de pacientes con LSIL y CaCu.
- Determinar la presencia de anticuerpos IgG específicos a VLP-L1 en suero de pacientes con LSIL y CaCu.
- Analizar de manera comparativa la presencia de anticuerpos contra cVLPs y VLP-L1 en sueros de pacientes con CaCu.
- Analizar de manera comparativa la presencia de anticuerpos contra cVLPs y VLP-L1 en sueros de pacientes con LSIL.

5.- MATERIALES Y MÉTODOS.

Pacientes. Para este estudio se incluyeron 20 muestras de suero de pacientes diagnosticadas con Cáncer Cervico-Uterino (CaCu I-IV) provenientes de Hospital de Cancerología y 22 muestras de suero de pacientes con lesiones cervicales escamosas intraepiteliales tempranas (LSIL) atendidas en la Clínica de Displasias de la Fundación Cruz-Talonia y en la Clínica de Displasias del Hospital General de México. Todas las pacientes fueron positivas a la infección por HPV-16. La tipificación del VPH se realizó con anterioridad por la técnica de PCR en muestras epiteliales cervicales.

Además se utilizaron 15 sueros de donadoras normales que fueron obtenidos de mujeres que acuden a control ginecológico en el Hospital General de Zona de Troncoso, las cuales resultaron con un análisis de Papanicolaou normal.

5.1.- Partículas Quiméricas Tipo Virales (cVLPs).

En este trabajo se utilizaron partículas tipo virales cVLP y VLP-L1 producidas en plantas. Las partículas quiméricas tipo virales constituidas de la proteína L1 y epítopes de las proteínas oncogénicas E6 y E7 de HPV-16 (cVLP) y las partículas tipo virales constituidas por la proteína L1 de HPV-16 (VLP-L1) utilizadas en este estudio, fueron expresadas de forma transitoria en plantas de *Nicotiana benthamiana* y se purificaron en el Laboratorio de Plantas Tropicales y Salud Humana del CINVESTAV Guanajuato (Castellanos, 2010) y fueron cuantificadas en nuestro laboratorio mediante la técnica de ELISA (Osorio, 2011).

La secuencia quimérica unida a la proteína L1 que conforma a la cVLP, consta de 5 epítopes de la proteína E6 y 3 de la proteína E7 de HPV-16 (Fig. 5). Estos epítopes fueron definidos por nuestro grupo de trabajo y tienen especificidad para alelos HLA clase I (HLA-A2, y -B35) de alta frecuencia en la población Mexicana (Monroy *et al.*, 2007).

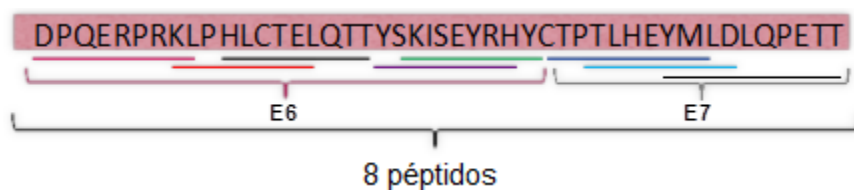


Fig. 5 Secuencias de epítopes de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 contenidas en la cVLP (Don, 2013).

5.1.2.- ELISA para detección de anticuerpos anti-VLP

La determinación de anticuerpos específicos a las VLPs en suero de pacientes, se llevó a cabo por medio del Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas, también conocido como ELISA como previamente se reportó (Monroy *et al.*, 2011).

Brevemente, se utilizaron placas de 96 pozos de fondo plano (Corning, USA), donde se incubaron cVLPs a una concentración de 100ng por pozo diluido en PBS estéril, durante 2 horas en oscuridad total a 37°C; posteriormente se refrigeró a 4°C por toda una noche. Al día siguiente, se realizaron 2 lavados con TBS/Tween 20 al 2%, seguido de un bloqueo con TBS/Tween y Albúmina bovina sérica (BSA) al 2% (200 µL/pozo) por 2 horas a 37°C en oscuridad. Cumplido el bloqueo, se realizaron 4 lavados a la placa con TBS/Tween 20 al 2% y se añadió el anticuerpo primario (suero de las pacientes) en proporción 1:100 (Anticuerpo: Buffer de Carbonatos) y posteriormente se incubó a 37°C en oscuridad durante 2 horas. Terminado el tiempo de incubación, se realizaron 6 lavados con TBS/Tween 20 al 2% y después se agregó anticuerpo secundario cabra antihumano acoplado a fosfatasa (Sigma, EUA) en una dilución 1:5000 (anticuerpo : PBS estéril) que se incubó durante 2 horas a 37°C en oscuridad. Terminada la incubación se procedió a lavar 8 veces la placa con TBS/Tween 20 al 2%, después se le agregó a los pozos un agente generador de color (100µL por pozo), que consiste en 0.03g de fosfatasa alcalina por cada 5 mL de dietanolamina (el agente cromógeno generó un color amarillo). Finalmente, se incubaron a 37°C en oscuridad durante una hora, y se detectó la reacción enzimática en un lector de placas (Molecular Devices) a 405 nm.

Las muestras fueron ensayadas en tres pozos sin cVLPs para definir la reactividad no específica. El valor final de las determinaciones se obtuvo restando la reactividad inespecífica del promedio de las absorbancias obtenidas en presencia de las VLPs. El valor de corte para determinar la seroreactividad se obtuvo mediante la distribución de absorbancia de un grupo de 15 muestras de mujeres normales a los péptidos (Monroy *et al.*, 2011) y fue definido como la absorbancia promedio +3 desviaciones estándar descartando la inespecificidad.

Para comparar si existe alguna diferencia estadística significativa entre los diferentes grupos de pacientes y donadoras normales, se emplearon las pruebas *T* de Student de dos colas y análisis de varianza. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad PRISM 5 para Windows (GraphPad Software, Inc.)

6.- RESULTADOS

6.1.- Obtención de sueros de pacientes con lesiones cervicales escamosas intraepiteliales tempranas (LSIL) y con cáncer invasor (CaCu I-IV) positivas a la infección por HPV-16.

De las 22 mujeres con LSIL incluidas en este estudio el 50% tenía menos de 30 años, mientras que, ninguna de ellas rebasó la edad de 50 años. El otro 50% restante de las pacientes oscilaba entre los 30 y los 49 años de edad (Tabla 3).

LSIL

Edad (años) n=22	%
<30	50
30-39	31.8
40-49	18.1
>50	0

Tabla 3. Edades de las pacientes con lesiones cervicales escamosas intraepiteliales tempranas (LSIL)

Contrariamente, de las 20 mujeres con CaCu incluidas en este estudio el 50% tenía más de 50 años y sólo un 10% de ellas menos de 30 años. Un 40% de las pacientes se encontraba entre los 30 y los 49 años de edad (Tabla 4).

CaCu

Edad (años) n=20	%
<30	10
30-39	5
40-49	35
>50	50

Tabla 4. Edades de las pacientes con Cáncer Cérvico-Uterino (CaCu I-IV)

De las 20 muestras de pacientes con CaCu un 40% presentaron Estadio III de la enfermedad que de acuerdo a la clasificación de tumores FIGO, el carcinoma se extiende hacia la pared pelviana, en el examen rectal, todas las zonas están invadidas por el cáncer entre el tumor y la pared pelviana, el tumor afecta el tercio inferior de la vagina. (Tabla 5).

N=20		%
Estadio I	IB1	25
	IB1	
	IB2	
	IB2	
Estadio II	IIA	30
	IIA	
	IIB	
	IIB	
	IIB	
Estadio III	IIIA	40
	IIIA	
	IIIA	
	IIIB	
	IIIB	
	IIIB	
	IIIB	
Estadio IV	IVB	5

Tabla 5. Estadios de las pacientes con Cáncer Cérvico-Uterino (CaCu I-IV)

6.1.2.- Detección de anticuerpos IgG específicos a partículas quiméricas tipo virales (cVLP) en muestras de suero en pacientes con LSIL y CaCu.

Mediante ensayos de ELISA se determinó la presencia de anticuerpos en los sueros de estas pacientes. Para ello los sueros fueron diluidos a una concentración 1:100 en PBS y se utilizó como antígeno en las placas de ELISA a las cVLP a una concentración de 1µg/ml. Los resultados muestran que los sueros de las pacientes con LSIL y CaCu presentaron una mayor reactividad hacia las cVLP en comparación con aquellos provenientes de las donadoras normales (Figura 6). Los títulos de anticuerpos en suero de pacientes con LSIL y CaCu fueron significativamente mayores que los encontrados en los suero de donadoras normales ($p < 0.05$) (Tabla 6).

Títulos de anticuerpos específicos a partículas quiméricas tipo virales (cVLP).

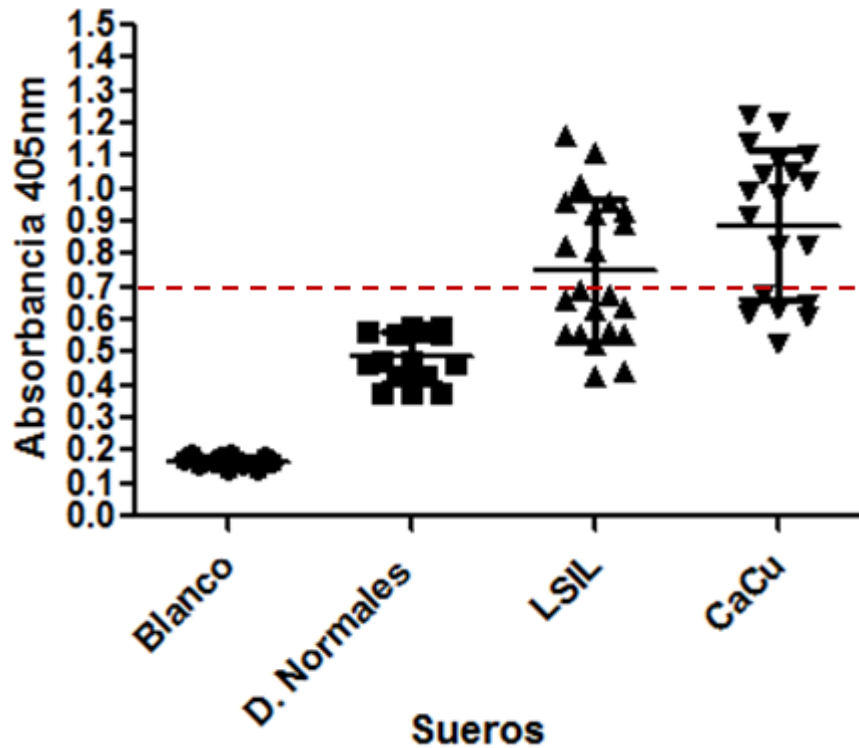


Fig. 6 Sueros de pacientes con LSIL y CaCu contienen anticuerpos que reconocen fuertemente a cVLP. Suero de pacientes con lesiones intraepiteliales de bajo grado (LSIL), de pacientes con cáncer cérvico uterino (CaCu), y de donadores normales fueron analizados mediante ELISA para determinar títulos de anticuerpos específicos a partículas quiméricas tipo virales (cVLP).

Diferencias Estadísticas Significativas	Prueba T ($P < 0.05$)	Prueba F (Varianzas)
LSIL vs. CaCu	NO	NO
CaCu vs. normal	SI	SI
LSIL vs. normal	SI	SI

Tabla 6. Prueba *T* de Student de dos colas y análisis de varianza para determinar diferencias de anticuerpos específicos a cVLP en suero de pacientes con diagnóstico de LSIL y CaCu vs. Donadoras normales. Si, indica diferencias significativas $P < 0.05$ a un intervalo de confianza de 95%.

6.1.3.- Detección de anticuerpos IgG específicos a partículas tipo virales constituidas por la proteína L1 de HPV-16 (VLP-L1) en muestras de suero en pacientes con LSIL y CaCu.

Igualmente, a través de ensayos de ELISA se determinó la presencia de anticuerpos en los sueros de las pacientes con LSIL y CaCu. Para ello los sueros fueron diluidos a una concentración 1:100 en PBS y se utilizó como antígeno en las placas de ELISA a las VLP-L1 a una concentración de 1µg/ml. Se pudo observar que hubo más altos títulos de anticuerpos contra VLP-L1 en el suero de pacientes con CaCu que en los sueros de donadoras normales, no así con los sueros de pacientes con LSIL que prácticamente no hubo anticuerpos contra VLP-L1 al igual que en las donadoras normales (Figura 7). Se muestra una diferencia estadística significativa entre las pacientes normales y con LSIL contra las pacientes con un diagnóstico de CaCu ($p < 0.05$) (Tabla 7).

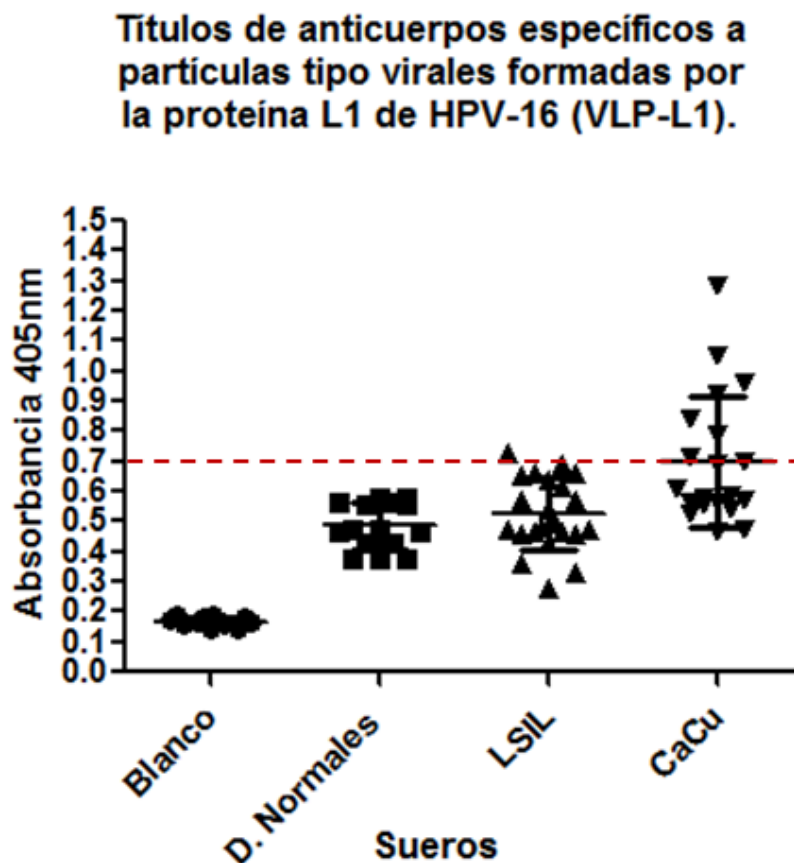


Fig. 7 Sueros de pacientes con CaCu contienen anticuerpos que reconocen a VLP-L1. Suero de pacientes con lesiones intraepiteliales de bajo grado (LSIL), de pacientes con cáncer cérvico uterino (CaCu), y de donadores normales fueron analizados mediante ELISA para determinar títulos de anticuerpos específicos a partículas tipo virales formadas por la proteína L1 de HPV-16 (VLP-L1).

Diferencias Estadísticas Significativas	Prueba T (P < 0.05)	Prueba F (Varianzas)
LSIL vs. CaCu	SI	SI
CaCu vs. normal	SI	SI
LSIL vs. normal	NO	NO

Tabla 7. Prueba T de Student de dos colas y análisis de varianza para determinar diferencias de anticuerpos específicos a VLP-L1 en suero de pacientes con diagnóstico de LSIL y CaCu vs. Donadoras normales. Si, indica diferencias significativas P<0.05 a un intervalo de confianza de 95%.

De las 20 muestras de pacientes con CaCu, 13 presentaron títulos por arriba del valor de corte, lo que significa que la reactividad hacia la cVLP es de 65% en las pacientes con diagnóstico de CaCu. Las pacientes mostraron una reactividad menor cuando se enfrentaron a las VLP-L1; sólo 6 de ellas rebasaron el valor de corte, que equivale a un 30% de la población, menos de la mitad de lo obtenido con la cVLP. Así mismo, se muestra también que los estadios clínicos de las pacientes que rebasaron la línea de corte fueron de los estadios más avanzados de acuerdo a la clasificación de tumores FIGO. Para las pacientes con LSIL la respuesta hacia la cVLP fue 10 veces más fuerte que para la VLP-L1. (Tabla 8).

ANTÍGENO

	cVLP HPV-16			VLP-L1 HPV-16	
	Número de muestras	# de pacientes con Ab> del valor de corte	Estadio Clínico	# de pacientes con Ab> del valor de corte	Estadio Clínico
SUEROS CaCu	20	13 (65%)	3 (IB2)	6 (30%)	2 (IB2)
			2 (IIB)		2 (IIB)
			3 (IIIA)		1 (IIIB)
			5 (IIIB)		1 (IVB)
LSIL	22	10 (45.4%)		1 (4.5%)	

Tabla 8. Tabla comparativa, se muestra el porcentaje de pacientes cuyos valores de absorbancia fueron mayores al límite de corte obtenido, con sus respectivos estadios clínicos de progresión.

Para observar si hay una correlación entre la reactividad de anticuerpos contra cVLPs y VLP-L1 en mujeres con CaCu y la progresión de la enfermedad, se compararon las absorbancias obtenidas con el estadio de la enfermedad. Se muestra que más altos títulos de absorbancia se obtuvieron en los estadios más avanzados de la enfermedad contra la cVLP a diferencia de los títulos de anticuerpos obtenidos contra la VLP-L1 (Tabla 9).

cVLP >1	VLP L1 >.9	Edad	Estadio
	0.96	44	
	0.786	53	
0.918	1.284	48	IIB
1.051		47	IB2
1.044		81	IIIB
0.829		53	IIB
0.829	0.712	67	IB2
1.204	0.925	50	IB2
1.226	1.048	30	IIIB
1.144		55	IIIB
0.991		53	IIIA
1.085		52	IIIB
1.104		57	IIIA
1.021		49	IIIB
0.983		57	IIIA

Tabla 9. Tabla comparativa, se muestra la correlación entre los valores de absorbancia de las pacientes con CaCu y los estadios clínicos de progresión.

De la misma manera en los sueros de las pacientes con LSIL retadas contra la cVLP y la VLP-L1 los títulos de absorbancias muestran que sólo 1 de las pacientes enfrentadas a la VLP-L1 obtuvo títulos apenas sobre la línea de corte (>0.7), mientras que 10 de los sueros de las pacientes enfrentados a la cVLP obtuvieron valores superiores a 0.9 (Tabla 10).

cVLP >.9	VLP-L1 <.7	Edad
0.959		31
0.923		29
1.013		17
0.928		35
0.959		21
0.824		39
0.812		29
0.896		17
1.166	0.727	47
1.109		42

Tabla 10. Tabla comparativa, se muestra la correlación entre los valores de absorbancia de las pacientes con LSIL y las edades correspondientes.

6.1.4.-Análisis comparativo de la presencia de anticuerpos contra cVLPs y VLP-L1 en sueros de pacientes con CaCu.

Se comparó la respuesta de anticuerpos específicos a antígenos cVLP y VLP-L1 en suero de pacientes con CaCu, se graficó la absorbancia obtenida en estos ensayos. La gráfica nos muestra que los títulos de anticuerpos en suero de pacientes con CaCu contra antígenos de cVLP fueron mayores respecto a los obtenidos con la VLP-L1 (Fig. 8). Los títulos de anticuerpos en suero de pacientes con CaCu fueron significativamente mayores cuando se enfrentaron a la cVLP que cuando se enfrentaron a la VLP-L1 ($p < 0.05$) (Tabla 11).

Comparación entre títulos de anticuerpos de VLP-L1 vs. cVLP en sueros de pacientes con CaCu.

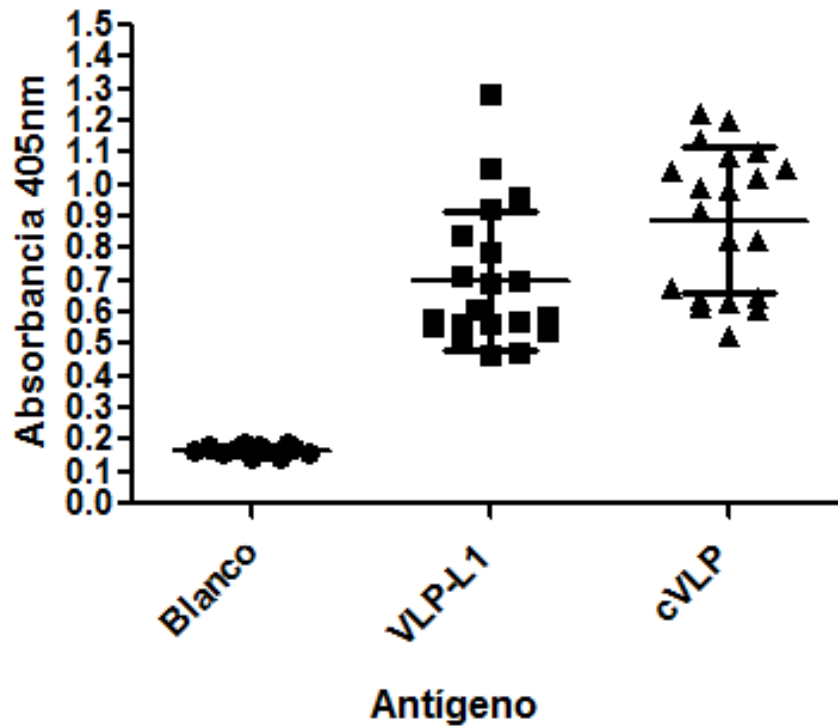


Fig. 8 Sueros de pacientes con CaCu contienen anticuerpos que reconocen a cVLP y VLP-L1. Suero de pacientes con cáncer cérvico uterino (CaCu) fueron analizados mediante ELISA para determinar títulos de anticuerpos específicos a partículas tipo virales formadas por la proteína L1 de HPV-16 (VLP-L1) y partículas quiméricas tipo virales (cVLP).

Diferencias Estadísticas Significativas	Prueba T (P < 0.05)	Prueba F (Varianzas)
cVLP vs. VLPL1	SI	NO

Tabla 11. Prueba T de Student de dos colas y análisis de varianza para determinar diferencias de anticuerpos específicos a cVLP vs. VLP-L1 en suero de pacientes con diagnóstico de CaCu. Si, indica diferencias significativas P<0.05 a un intervalo de confianza de 95%.

6.1.5.-Análisis comparativo de la presencia de anticuerpos contra cVLPs y VLP-L1 en sueros de pacientes con LSIL.

Para comparar la respuesta de anticuerpos específicos a antígenos cVLP y VLP-L1 en suero de pacientes con LSIL, se graficó la absorbancia obtenida en estos ensayos. Los resultados muestran que los sueros de las pacientes con LSIL presentaron una mayor reactividad hacia las cVLP en comparación con los títulos de anticuerpos contra VLP-L1, ya que estos últimos se encuentran por debajo de la línea de corte (Figura 9). Los títulos de anticuerpos específicos a cVLP en suero de pacientes con LSIL fueron significativamente mayores que los encontrados con la VLP-L1 ($p < 0.05$) (Tabla 12).

Comparación entre títulos de anticuerpos de VLP-L1 vs. cVLP en sueros de pacientes con LSIL.

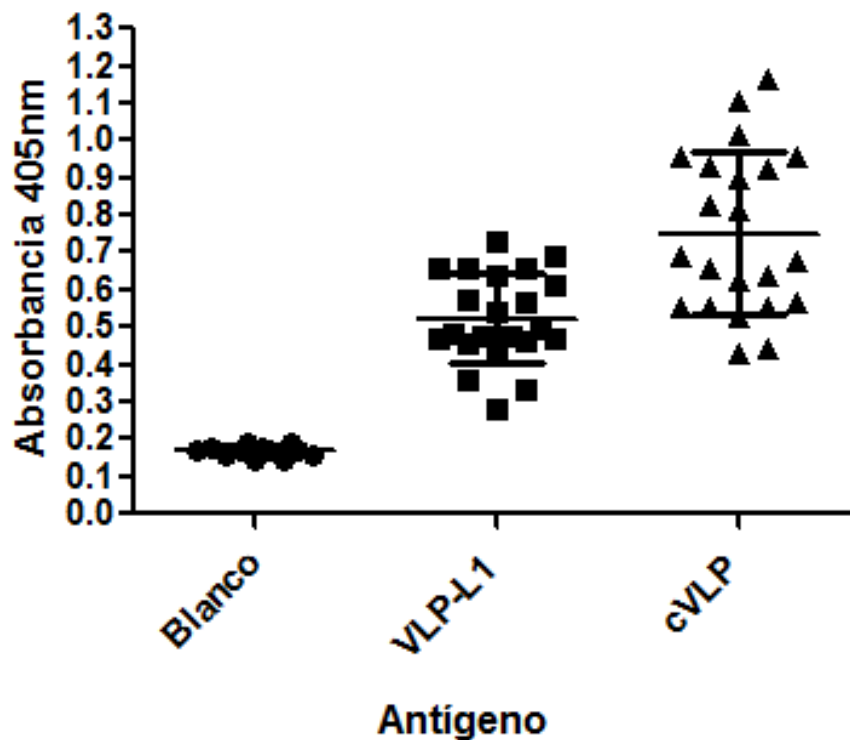


Fig. 9 Sueros de pacientes con LSIL contienen anticuerpos que reconocen a cVLP. Suero de pacientes con lesiones intraepiteliales de bajo grado (LSIL) fueron analizados mediante ELISA para determinar títulos de anticuerpos específicos a partículas tipo virales formadas por la proteína L1 de HPV-16 (VLP-L1) y partículas quiméricas tipo virales (cVLP).

Diferencias Estadísticas Significativas	Prueba T (P < 0.05)	Prueba F (Varianzas)
cVLP vs. VLPL1	SI	SI

Tabla 12. Prueba *T* de Student de dos colas y análisis de varianza para determinar diferencias de anticuerpos específicos a VLP-L1 vs. cVLP en suero de pacientes con diagnóstico de LSIL. Si, indica diferencias significativas $P < 0.05$ a un intervalo de confianza de 95%.

7.- DISCUSIÓN

Los estudios serológicos son importantes para comprender la historia natural de las infecciones por HPV, y durante los últimos 15 años, se han hecho esfuerzos para desarrollar ensayos serológicos genotipo-específicos confiables. La presencia de anticuerpos IgG específicos a VLPs de la proteína L1 de HPV-16 en sangre periférica, revela una exposición persistente a la infección por el virus y ha sido reportada como un marcador de progresión de la enfermedad (Sasagawa *et al.*, 1996; Heim *et al.*, 2002; Viscidi *et al.*, 1997). No obstante, la presencia de anticuerpos específicos a los antígenos tumorales E6 y E7 se ha considerado como el mejor marcador para la progresión a cáncer cervicouterino, debido a que la respuesta de anticuerpos es influenciada por la integración del virus a las células infectadas, a la transformación celular, al estado de la enfermedad y al tamaño tumoral (Lehtinen *et al.*, 2003; Park *et al.*, 1997; Viscidi *et al.*, 1993).

Recientemente hemos generado en colaboración con el CINVESTAV de Guanajuato, partículas quiméricas tipo virales (cVLPs); constituidas por la proteína L1 y una secuencia de péptidos derivados de las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16 altamente inmunogénicas en plantas de *Nicotiana benthamiana*. Por consiguiente en el presente trabajo se analizó la capacidad de estas cVLPs para detectar de manera diferencial la presencia de anticuerpos específicos en sueros de pacientes con lesiones cervicales escamosas intraepiteliales tempranas (LSIL) y cáncer invasor (CaCu I-IV) positivas a la infección por HPV-16.

Los resultados mostraron que los sueros de las pacientes con LSIL y CaCu contienen anticuerpos que reconocen fuertemente a la cVLP, generando una detección más sensible de anticuerpos IgG específicos utilizando cVLP frente a los obtenidos con la VLP que contienen sólo la proteína L1 de HPV-16 (VLP-L1), la cual fue utilizada como control experimental. El hecho de que altos títulos de anticuerpos hayan sido detectados por ELISA usando la cVLP que contiene epítopes de E6 y E7 puede indicar no sólo la persistencia de la infección por el VPH-16, sino que en las pacientes se está dando la expresión de estas proteínas (Müller *et al.*, 1992; Rosales *et al.*, 2001).

La respuesta sérica hacia la VLP-L1 de HPV-16 comparada con la cVLP en los sueros de las pacientes (ya sea LSIL o CaCu) fue menor, lo cual nos puede estar indicando que los sueros de las pacientes están reconociendo los epítopes de las proteínas E6 y E7 además de L1 de HPV-16 contenidas en la cVLP y que la especificidad fue debido a éstos péptidos antigénicos (Monroy *et al.*, 2011). Así mismo, la presencia de anticuerpos específicos para E6 y E7 de HPV-16 ha sido frecuentemente asociados con un incremento del riesgo de avance de la enfermedad hacia estadios más

avanzados que podrían desembocar en un cáncer invasor (Müller *et al.*, 1992; Rosales *et al.*, 2001).

Por otra parte, al comparar los títulos de anticuerpos obtenidos con sueros de pacientes con CaCu que reconocieron a la cVLP y los diferentes grados de avance del cáncer, se obtuvo que existió una correlación entre los títulos más altos de anticuerpos y los estadios más avanzados de la enfermedad. Con respecto a los pacientes con LSIL, los títulos de anticuerpos más altos que se obtuvieron fueron igualmente con la cVLP. Estos resultados sugieren que la cVLP tiene la capacidad de ser reconocido por anticuerpos específicos en diferentes grados de avance del cáncer. Como se sabe E6 y E7 son proteínas constitutivas del virus y una vez que se integran al ADN del hospedero no dejarán de expresarse a lo largo de toda la enfermedad, pues estos genes son indispensables para la inmortalización celular. Por consiguiente, la cVLP puede ser útil en la detección de anticuerpos en estadios tempranos de la enfermedad para detectar casos que puedan correr más riesgo de desarrollar una neoplasia maligna.

En un reciente estudio realizado por nuestro grupo de investigación se reportó una detección mejorada de anticuerpos IgG específicos por el método de ELISA utilizando una partícula tipo viral compuesta por epítopes seroreactivos de E6 y E7 fusionada con L1 de HPV-16, comparada con la VLP que sólo contienen la proteína L1, en suero de pacientes con NIC-1 positivos a infección por HPV-16 (Monroy *et al.*, 2011). En este trabajo reportamos, la reactividad de anticuerpos de pacientes con LSIL y CaCu contra una nueva partícula quimérica constituida por una secuencia formada por 5 epítopes de E6 y 3 de la proteína E7 de HPV-16. Estos epítopes fueron definidos por nuestro grupo de trabajo y tienen especificidad para alelos HLA clase I (HLA-A2, y -B35) de alta frecuencia en la población Mexicana. Se pudo demostrar que esta nueva cVLP es igualmente eficiente para detectar anticuerpos específicos IgG en suero de pacientes con LSIL, además de en suero de pacientes con CaCu en diferentes estadios de la enfermedad.

Finalmente, creemos que el ELISA descrito en este trabajo puede llegar a ser una herramienta útil para evaluar el riesgo de progresión a cáncer en las mujeres que presentan altos títulos de anticuerpos en suero, específico para L1 más epítomos de E6 y E7. La detección óptima de anticuerpos específicos para antígenos E6 y E7 en conjunción con los que son específicos para L1 en etapas iniciales de la enfermedad pueden ser importantes para evaluar el resultado clínico de la infección viral y la posible progresión de la infección a cáncer cervicouterino.

8.- CONCLUSIONES

Las VLP-L1 permitieron detectar mayores títulos de anticuerpos en sueros de pacientes con CaCu respecto a sueros de pacientes con LSIL y donadoras normales.

Las cVLPs permitieron detectar mayores títulos de anticuerpos específicos en sueros de pacientes con LSIL y con CaCu respecto a sueros de donadoras normales.

Las cVLPs permitieron detectar mayores títulos de anticuerpos en sueros de pacientes con LSIL y CaCu respecto a las VLP-L1.

Los títulos de anticuerpos específicos a cVLPs correspondieron de manera directa con el estadio de evolución de la enfermedad, en los estadios más avanzados se encontraron los títulos más altos de anticuerpos.

Se sugiere que la presencia de epítopes de la proteína E6 y de la proteína E7 de HPV-16 en las cVLPs sean blancos antigénicos importantes para la detección de anticuerpos específicos en sueros de pacientes con LSIL y CaCu.

9.-PERSPECTIVAS

Analizar el uso de estas partículas cVLPs para determinar anticuerpos en mujeres con co-infecciones con diferentes tipos de HPV.

Ampliar el uso de cVLPs en la detección de anticuerpos en HSIL y LSIL para evaluar el riesgo de progresión a cáncer cervical.

10.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abbas A., Lichtman A., Pillai S., 2010, Cellular and molecular immunology, Ed. Saunders/Elsevier.

Bolpetti A., Silva J., Villa L., Lepique A., 2010, Interleukin-10 production by tumor infiltrating macrophages plays a role in human papillomavirus 16 tumor grown. *Immunology* 11:27

Carrasco M., 2010, Neoplasia Intraepitelial Cervical grado II y III: Estudio morfométrico de sus diferencias y relación con el Virus del Papiloma Humano, Tesis Doctoral, Universidad Internacional de Cataluña.

Carter J., Koutsky L., Hughes J., Lee S., Kuypers J., Kiviat N., Galloway D., 2000, Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. *J Infect Dis* 181:1911-1919.

Castellanos A., 2010, Determinación de la respuesta inmune en modelo murino contra cVLP del virus del papiloma humano 16 (VPH-16) expresadas en plantas. Tesis de maestría. CINVESTAV IPN, unidad Irapuato.

Castro M., Arellano M., 2010, Acceso a la información de mujeres con VPH, displasia y cáncer cervical in situ. *Salud Pública de México*, vol. 52.

Cid A., 2009, Therapeutic vaccines against human papillomavirus and cervical cancer. *The Open Virology Journal*, 3:67-83.

Concha M., 2007, Diagnóstico y terapia del virus papiloma humano. *Infectología práctica*.

Cutts F., Franceschi S., Goldie S., Castellsague X., Sanjose S., Garnett G., 2007, Human papillomavirus and HPV vaccines: a review. *Bull World Health Organ*.

Hagensee M., Yaegashi N., Galloway D., 1993, Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins. *J Virol*, 67:315-322.

Day P., Kines R., Thompson C., Jagu S., Roden R., Lowy D., Schiller J., 2010, In Vivo Mechanisms of Vaccine-Induced Protection against HPV Infection, *Cell Host & Microbe*.

Di Bonito P., Grasso F., Mochi S., Accardi L., Donà M., Branca M., Costa S., Mariani L., Agarossi A., Ciotti M., Syrjänen K., Giorgi C., 2006, Serum antibody response to Human papillomavirus (HPV) infections detected by a novel ELISA technique based on

denatured recombinant HPV16 L1, L2, E4, E6 and E7 proteins, *Infectious Agents and Cancer* 1:6.

Heim K., Widschwendter A., Pirschner G., Wieland U., Awerkiew S., Christensen N., Bergant A., Marth C., Höpfl R., 2002, Antibodies to human papillomavirus 16 L1 virus-like particles as an independent prognostic marker in cervical cancer, *Am J Obstet Gynecol* 186:705-711.

Hernández D., Apresa T., Alvarado I., García A., Guido M., González J., 2002, Virus de papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR) y neoplasia intraepitelial cervical (NIC) en mujeres de dos hospitales de la Ciudad de México. *Invest Clin*.

Hubert W., Laimins L., 2001, The action of E6 and E7 of human papillomaviruses in cellular immortalization and transformation. In: Rosental, L.J. (Ed). Mechanisms of DNA tumor virus transformation. *Monogr Virol*. 23: 44-63.

Kim K., Greenfield W., Cannon M., Coleman H., Spencer H., Nakagawa M., 2012, CD4+ T-cell response against human papillomavirus type 16 E6 protein is associated with a favorable clinical trend. *Cancer Immunol Immunother* 6:63-70

Kirnbauer R., Booy F., Cheng N., Lowy D., Schiller J., 1992, Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic, *Proc Natl Acad Sci USA* 89:12180-12184.

Lazcano E., Desafíos en la introducción de vacunas profilácticas contra VPH en países latinoamericanos. *Salud pública*, 49: 218. 2007.

Lehtinen M., Pawlita M., Zumbach K., Lie K., Hakama M., Jellum E., Koskela P., Luostarinen T., Paavonen J., Pukkala E., Sigstad E., Thoresen S., Dillner J., 2003, Evaluation of antibody response to human papillomavirus early proteins in women in whom cervical cancer developed 1 to 20 years later, *Am J Obstet Gynecol* 188:49-55.

Lin K., Doolan K., Hung C., Wu T., 2010, Perspectives for Preventive and Therapeutic HPV Vaccines. *J Formos Med Assoc* 4–24.

Liu W., Liu X., Zhao K., Leggatt G., Frazer I., 2000, Papillomavirus virus like particles for the delivery of multiple cytotoxic T cell epitopes. *Virology*, 273: 374–382,

Liu H., Li W., Lei T., Zheng J., Zgang Z., Yan X., Wang Z., Wang Y., Si, L., 2005 Expression of human papillomavirus type 16 L1 protein transgenic tobacco plants. *Acta Biochim Biophys Sin*, 37:153-158.

López S., Lizano M., 2006, Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia no termina, *Cancerología* 1:31-55.

Mann V., Loo S., Brenes M., Brinton L., Rawis J., Green M., Reeves W., Rawis W., 1990, Occurrence of IgA and IgG antibodies to select peptides representing human papillomavirus type 16 among cervical cancer cases and controls. *Cancer Research* 50: 7815-7819.

Macleán J., Koekemoer M., Oliver A., Stewart D., Hitzeroth I., Rademacher T., Fischer R., Williamson A., Rybicki E., 2007, Optimization of human papillomavirus type 16 (HPV-16) L1 expression in plants: comparison of the suitability of different HPV-16 L1 gene variants and different cell-compartment localization, *Journal of General Virology*, 88:1460–1469.

Malik Z., Hailpern S., Burk R., 2009, Persistent antibodies to HPV virus-like particles following natural infection are protective against subsequent cervicovaginal infection with related and unrelated HPV, *Viral Immunology* 6:445-449.

Maxwell L., Berchuck A., 2006, Ginecología oncológica práctica. McGraw Hill.

Muñoz N., Bosch F., Sanjosé S., Herrero R., Castellsagué X., Shah K., Snijders P., Meijer C., 2003, Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, 348:518-527.

Monroy A., Gómez M., Weiss B., Paz G., Hernández J., Pérez K., Tapia Y., Toledo M., Santiago E., Sánchez H., Mora M., 2011, A novel HPV 16 L1-based chimeric virus-like particle containing E6 and E7 seroreactive epitopes permits highly specific detection of antibodies in patients with CIN 1 and HPV-16 infection, *Virology Journal* 8:59.

Monroy A., Hernández J., Mora M., 2007, Identification of epitopes from L1, E6, and E7 proteins of the HPV-16 and 18 types and its implication for diagnosis and treatment of cervical carcinoma, *Advances in Cancer Research*, Ed. Manual Moderno, UNAM y PUIS. pp:1-32.

Müller M., Viscidi R., Sun Y., Guerrero I., Hill P., Shah K., Bosch F., Muñoz N., Gissmann L., Shah K., 1992, Antibodies to HPV-16 E6 and E7 proteins as markers for HPV-16 associated invasive cervical cancer. *Virology*, 187:508-514.

Ochi H., Kondo K., Matsumoto K., Oki A., Yasugi T., Furuta R., Hirai Y., Yoshikawa H., Kanda T., 2008, neutralizing antibodies against human papillomavirus types 16, 18, 31, 52 and 58 in serum samples from women in Japan with low-grade cervical intraepithelial neoplasia, *Clin Vaccine Immunol* 15:1536-1540.

Park J., Park D., Kim C., Ahn H., Um S., Park S., Kim S., Namkoong S., 1997, HPV-16-Related Proteins as the Serologic Markers in Cervical Neoplasia, *Gynecologic Oncology* 69:47-55.

Paz G., Monroy A., Mora M., Reynaga C., Hernández J., Weiss B., Gómez M., 2009, An HPV 16 L1-based chimeric human papilloma virus-like particles containing a string of epitopes produced in plants is able to elicit humoral and cytotoxic T-cell activity in mice, *Virology* 6:2.

Rivera P, Zuñiga D., 2009, Infección por VPH, vacunas y nuevas tendencias.

Roitt I., Delves P., 2008, Inmunología: Fundamentos 11va Edición, Ed. Médica Panamericana.

Rosales R., López M., Cortes R., 2001, Antibodies against human papillomavirus (HPV) type 16 and 18 E2, E6 and E7 proteins in sera: correlation with presence of papillomavirus DNA, *J Med Virol* 4:736-744.

Rose R., Bonnez W., Reichman R., Garcea R., 1993, Expression of human papillomavirus type 11 L1 protein in insect cells in vivo and in vitro assembly of virus like particles, *J Virol* 67:1936-1944.

Sanjosé S., Bosch F., Castellsagué X., 2001, Virus del papiloma humano: riesgo oncogénico y nuevas oportunidades para la prevención. *Ginecología oncológica*.

Sasagawa T., Inoue M., Lehtinen M., Zhang W., Gschmeissner S., Hajibagheri M., Finch J., Crawford L., 1996, Serological responses to human papillomavirus type 6 and 16 virus-like particles in patients with cervical neoplastic lesions, *Clin Diagn Lab Immunol* 3:403-410.

Stanley M., 2010, HPV - immune response to infection and vaccination.

Stanley M., Pett M., Coleman N., 2007, HPV: from infection to cancer. *Biochemical Society Transactions*, 35(6): 1456-1460.

Stern P, 2005, Immune control of human papillomavirus (HPV) associated anogenital disease and potential for vaccination. *J of Clinical virology* 32S:S72-S81.

Teli N., Timoko M., 2004, Recent developments in the use of transgenic plants for the production of human therapeutics and biopharmaceuticals, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 79: 125–145.

Viscidi R., Kotloff K., Clayman B., Russ K., Shapiros S., Shah K., 1997, Prevalence of Antibodies to Human Papillomavirus (HPV) Type 16 Virus-Like Particles in Relation to Cervical HPV Infection among College Women, *Clin Diagn Lab Immunol* 4:122-126.

Viscidi R., Sun Y., Tsuzaki B., Bosch F., Munoz N., Shah K., 1993, Serologic response in human papillomavirus-associated invasive cervical cancer. *Int J Cancer*, 55:780-784

Walboomers J., Jacobs M., Manos M., Bosch F., Kummer J., Shah K., Snijders P., Peto J., Meijer C., Munoz N., 1999, Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide, *J Pathol* 189:12-19.

Xercavins J., Gil A., Centeno C., 2002, Virus y cáncer cervical. *Ginecología Oncológica*.

Xu Y., Zhang Y., Xu X., Song G., 2006, Papillomavirus-like particles as vehicles for the delivery of epitopes or genes, *Arch Virology* 151:2133-2148.

Zhou J., Sun X., Stenzel D., Frazer I., 1991, Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles, *Virology* 185:251-257.