



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**DIFERENCIACIÓN CELULAR Y CÁNCER**

**UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL  
ZARAGOZA**

**LABORATORIO DE INMUNOBIOLOGÍA**

**ANÁLISIS INMUNOGÉNICO DE EPÍTOPES VACUNALES DE LA  
PROTEÍNA L2 DE HPV'S DE ALTO RIESGO EN EL MODELO DE RATA  
WISTAR**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

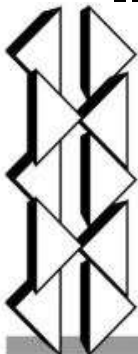
**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A**

**ÁLVAREZ HERNÁNDEZ VÍCTOR**

**DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA**

**México, D.F. 2015**



**FES  
ZARAGOZA**



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.



El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Inmunobiología de la UIDCC en la UMIEZ de la FES-Zaragoza UNAM, y en el Laboratorio de Inmunología y Cáncer de la UIMEO, H. Oncología CMN SXXI IMSS. Investigación realizada gracias al apoyo financiero: SE / CONACYT No. 190656 “Desarrollo de una vacuna prototipo liposomal y evaluación pre-clínica para tratamiento terapéutico contra la infección por virus del papiloma humano de alto riesgo”, y del programa FIS/IMSS/PROT/G10/876 “Sistema de identificación y adecuación de secuencias inmunogénicas de proteínas virales como blancos potenciales en la generación de vacunas terapéuticas contra el cáncer cérvico-uterino”.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco el apoyo principalmente de mi familia, de mis padres Fabián Álvarez Sandoval, Graciela Hernández Castillo y de mi hermano Manuel Álvarez Hernández; que a pesar de las circunstancias y adversidades que se imponían, siempre encontraron una manera de impulsarme a seguir adelante.

A la Dra. Lourdes Mora García y al Dr. Alberto Monroy García, por darme la oportunidad de integrarme a su grupo de trabajo que sin duda enriquecieron mi formación, además de su gran apoyo, observaciones y sugerencias que permitieron el desarrollo del presente proyecto.

Al Dr. Jorge Hernández Montes por su atenta asesoría durante la realización de los ensayos experimentales y la confianza que me ha brindado para la aclaración de dudas que hicieron posible el desarrollo de este trabajo.

A los miembros del jurado, el Dr. Benny Weiss Steider, M. en C. Luis Sánchez Sánchez, M. en C. Yolanda Córdova Galaviz, y a la M. en C. Itzen Aguiñiga Sánchez por las acertadas observaciones que sin duda enriquecieron el presente trabajo y las atenciones recibidas por su parte.

A mis primeros maestros de laboratorio de inmunobiología: Azucena, Luis, Vianey, César, Eva, Fany, y a mis estimables compañeros, Oscar, Gabriela, Estrella, Daniel y Carlos. A mi brazo derecho, compañera y amiga Itzel Montserrat. Gracias a todos por haber contribuido de alguna forma en mi formación.

Finalmente agradezco a mis amigos, Ángel, Gaby, Lili, César, Ignacio, Fidel, por su apreciable apoyo y por todas las experiencias vividas que compartimos en algún momento de la carrera que gracias a ustedes se han transformado en momentos inolvidables.

“El que quiera decir a otras personas la verdad, debe saber soportarla en sí mismo”

**Adolfo Kolping**

## INDICE

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>7</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>8</b>
<b>1. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>9</b>
1.1. Cáncer.....	9
1.2. Cáncer Cérvico Uterino (CaCu).....	9
1.3. CaCu y Virus del Papiloma Humano (HPV) .....	10
1.4. El HPV .....	11
1.5. Clasificación del HPV.....	11
1.6. Organización genómica del HPV .....	12
1.7. Ciclo replicativo del HPV .....	13
1.8. Inmunidad innata y adaptativa.....	16
1.9. Inmunidad humoral .....	18
1.10. Inmunidad celular .....	18
1.11. HPV y respuesta inmune.....	20
1.12. Vacunas contra el HPV .....	21
1.13. Vacunas contra el HPV de segunda generación .....	21
1.14. L2; la proteína menor de la cápside del HPV .....	22
<b>2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>24</b>
<b>3. HIPÓTESIS.....</b>	<b>25</b>
<b>4. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>26</b>
<b>4.1. OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>26</b>
<b>5. MATERIAL Y MÉTODO .....</b>	<b>27</b>
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>32</b>
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>45</b>
<b>8. CONCLUSIONES .....</b>	<b>48</b>
<b>9. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>49</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>50</b>

## **ABREVIATURAS FRECUENTES**

ADN	Ácido desoxirribonucleico
APC	Células presentadoras de antígeno
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
CaCu	Cáncer cérvico uterino
CIN	Neoplasia intraepitelial cervical
CRPV	Papilomavirus del conejo cola de algodón
D.O.	Densidad óptica
DC	Células dendríticas
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a la enzima
HPV	Virus de papiloma humano
ICTV	Comité internacional en taxonomía de virus
kDa	Kilodaltones
LCs	Células de Langerhans
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PBS	Solución buffer de fosfatos
PsV	Pseudoviriones
PVs	Papilomavirus
ROPV	Papilomavirus de rata
SEAP	Fosfatasa alcalina secretada
SFB	Suero fetal bovino
VLP	Partícula semejante al virus



**RESUMEN**

La infección por el virus del papiloma humano (HPV) es reconocida como un factor etiológico para el desarrollo del cáncer cérvico uterino (CaCu) de tal manera que se ha estimado que el HPV es responsable del 5,2% de todos los cánceres en el mundo (Zaldívar L. G., 2012; zur Hausen, 2002). La infección persistente con genotipos de HPV de alto riesgo es causa necesaria en el desarrollo del cáncer cervical. Aunque las actuales vacunas demuestran el potencial para erradicar el cáncer asociado al HPV, estas vacunas de primera generación pueden no ser los candidatos ideales, ya que no protegen contra otros tipos de HPV que también son oncogénicos, además su adquisición es costosa, especialmente en países en vías de desarrollo, los cuales aportan el 85% de todos los casos de CaCu (Roden R, et al, 2006). Dada esta situación es necesario el desarrollo de una vacuna ampliamente protectora y de bajo costo que provea amplia protección contra más tipos oncogénicos de HPV. Se ha descrito que el residuo 17-36 de la proteína menor de la cápside L2 es un epítipo altamente conservado en tipos divergentes de HPV (Alphs, 2008). Por esta razón, en el presente estudio se analizó la capacidad inmunogénica de péptidos de la secuencia 17-36 de la proteína L2 de HPVs de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 45, 58) en un modelo *in vivo* utilizando ratas de la cepa Wistar vacunadas con tres dosis de cada uno de los péptidos. La presencia de anticuerpos séricos de tipo IgG específicos a los péptidos se realizó mediante ensayos ELISA. Asimismo se produjeron pseudoviriones compuestos por proteína L1 y L2 de HPV-16 conteniendo a un gen reportero de fosfatasa alcalina. A pesar de que se detectaron títulos importantes de anticuerpos específicos hacia los péptidos de la proteína L2 de HPV-16, -18, -33, -45 y -58, la capacidad para neutralizar pseudoviriones de HPV-16 fue nula para los anticuerpos de los péptidos de HPV-16, -18, y 31; y marginal (10-20%) para los péptidos de HPV-33, -45, y -58. Se discute que la baja capacidad neutralizante de los anticuerpos generados se deba a la deficiente exposición del péptido 17-36 de la proteína L2 en los pseudoviriones, por lo que se requiere del establecimiento de un sistema que permita exponer dicha secuencia como ocurre en la infección natural a través de la acción de la enzima proconvertasa furina. Asimismo, la inclusión de estos determinantes antigénicos en el diseño de vacunas podría favorecer la protección ante HPVs filogenéticamente diferentes, debido a su alta homología.

## **1. MARCO TEÓRICO**

### **1.1. Cáncer**

El cáncer es comúnmente definido como un proceso que resulta de la acumulación de mutaciones somáticas en una célula normal, las cuales llevan a un crecimiento selectivo en estas células mutadas y en consecuencia una proliferación descontrolada, por lo que pueden diseminarse hacia órganos distantes en un proceso conocido como metástasis (Blanpain, 2013; INEGI, 2013) .

A nivel mundial, este padecimiento es responsable de un número importante de muertes. La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que en 2008 fallecieron 7.6 millones de personas, aproximadamente 13% del total de fallecimientos, y estima que para 2030 aumentará a 13.1 millones (OMS, 2013).

En la región de las Américas fallecieron 1.2 millones de personas en 2008 por cáncer; afectando a los hombres principalmente en la próstata, pulmón, colonorrectal y estómago; y las mujeres en la mama, pulmón, colonorrectal y cérvico-uterino (Organización Panamericana de la Salud OPS, 2013).

### **1.2. Cáncer Cérvico Uterino (CaCu)**

El CaCu es el segundo cáncer en frecuencia en mujeres de todo el mundo, y es en países en vías de desarrollo donde la mayoría de los casos ocurren. En México, es la segunda causa de muerte por tumores malignos en mujeres mexicanas de 20 años en adelante (INEGI, 2013).

La infección por el virus del papiloma humano (HPV) ha sido reconocida como un factor etiológico para el desarrollo del CaCu y se han descrito más de 120 tipos de HPV de los cuales aproximadamente una tercera parte de ellos son capaces de infectar el epitelio del tracto genital. Otros tumores relacionados con el HPV son del canal anal, vagina, vulva, pene y oral, de tal manera que se ha estimado que el HPV es responsable del 5,2% de todos los cánceres en el mundo (Zaldívar L. G., 2012; zur Hausen, 2002).

### 1.3. CaCu y HPV

Las investigaciones en relación a la etiología del CaCu han tenido un sustancial progreso en las últimas décadas en términos científicos y operacionales. Por décadas, el perfil epidemiológico de mujeres con CaCu fue sugerido como un proceso de transmisión sexual, lo que llevó a proponer distintos agentes infecciosos durante años. El desarrollo de la tecnología para determinar la presencia de ADN de HPV en muestras celulares a principios de los 1980s hizo posible el establecimiento del papel del HPV como una causa etiológica definitiva en el CaCu (Bosch et al., 2002).

Además existe evidencia acumulable de que el HPV está involucrado en una considerable proporción a los cánceres de vulva, vagina, canal anal, perianal, piel y pene. La asociación del HPV con el CaCu suministró los antecedentes y la justificación científica para el mejoramiento de programas citológicos y para el desarrollo de vacunas (Bosch et al., 2002).

Los HPV tienen tropismo por las células epiteliales, por lo que pueden producir infecciones tanto de piel como de mucosas. Los virus que son capaces de infectar las mucosas se dividen en genotipos de alto y bajo riesgo, de acuerdo a si su infección puede conducir o no al desarrollo de cáncer. Los HPV de bajo riesgo producen verrugas benignas en el tracto genital, y no son oncogénicos (Buck, 2008).

La infección está caracterizada por lesiones verrugosas y el tratamiento para su eliminación es costoso. Por otro lado, los HPV de alto riesgo causan lesiones mucho menos evidentes y son clasificados como potencialmente oncogénicos, ya que están asociados con más del 99% de los cánceres del cérvix (Walboomers et al, 1999; Zaldívar L. G., 2012).

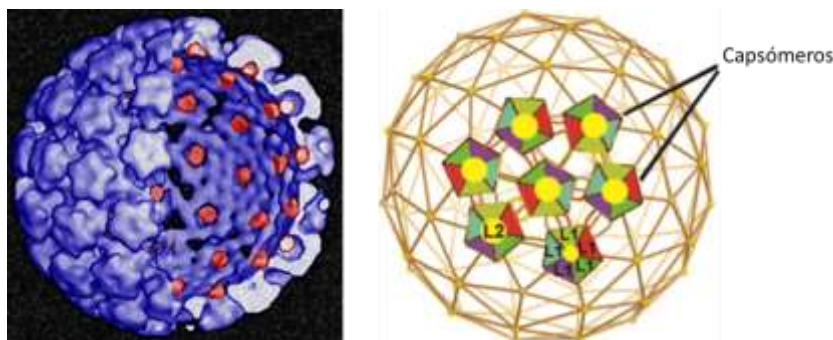
El número de HPVs de alto riesgo varía entre 13 y 19, pero los tipos HPV 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 56 y 58 conllevan constantemente a un alto riesgo. De estos, el HPV16 se encuentra en aproximadamente el 60% de todos los CaCu, y el HPV18 está involucrado en un 10-20%, mientras que los HPVs tipo 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 y 73 juntos constituyen el 20-30% restante de los CaCu (Buck, 2008).

El HPV ha sido implicado en el 85% del cáncer del canal anal, 50% del cáncer de vulva, vagina y pene, 20% del cáncer orofaríngeo y 10% del cáncer laríngeo y esofágico. A pesar de que la tasa de progresión carcinogénica es relativamente baja, las infecciones con HPV de alto riesgo se encuentran en la mayoría de los CaCu (Buck, 2008; Stanley M., 2012; zur Hausen, 2002).

#### 1.4. El HPV

Los HPVs son virus pequeños con un diámetro de aproximadamente 55-60 nm, con ADN de doble cadena, pertenecientes a la familia *Papillomaviridae*. Aunque el genoma viral puede variar ligeramente entre los diferentes tipos de HPV, se acepta que típicamente contienen cerca de 8000 pb y codifica en ocho marcos abiertos de lectura, los cuales son transcritos como ARNm policistrónicos. La cápside del virus está formada por dos proteínas. La proteína L1 es el elemento estructural primario, encontrándose 360 copias de la proteína organizada en 72 capsómeros en los viriones infectantes (Doorbar, J., 2012).

La proteína L2 es un componente menor del virión y se cree que puede estar presente en el centro de los capsómeros pentavalentes en los vértices del virión. Esta proteína L2 interviene en la entrada del virus a las células, en la localización de los componentes virales en el núcleo, en la unión al ADN, en la formación de la cápside y en la estabilidad, Fig. 1, (Malik H. 2014).



**Fig. 1.** Representación esquemática del HPV mostrando su simetría icosaédrica. Los capsómeros están compuestos de 5 proteínas L1 (representadas en colores) y una proteína L2. El genoma reside dentro de la cápside. Tomado y modificado de (Malik, *et al.*, 2014).

#### 1.5. Clasificación del HPV

Los papilomavirus (PVs) contienen ocho genes; uno de estos genes, el L1 codifica la proteína de la cápside principal, ésta es necesaria y suficiente para producir las VLPs usadas en las actuales vacunas. Éstos han sido referidos como “genotipos”; un nuevo genotipo es considerado cuando su genoma y secuencia del gen L1, es al menos un 10% distinto de cualquier otro genotipo. La clasificación de los tipos de PVs se basa principalmente en las similitudes de sus secuencias de nucleótidos y en algunas propiedades médicas y biológicas (Bernard, H. U., 2010).

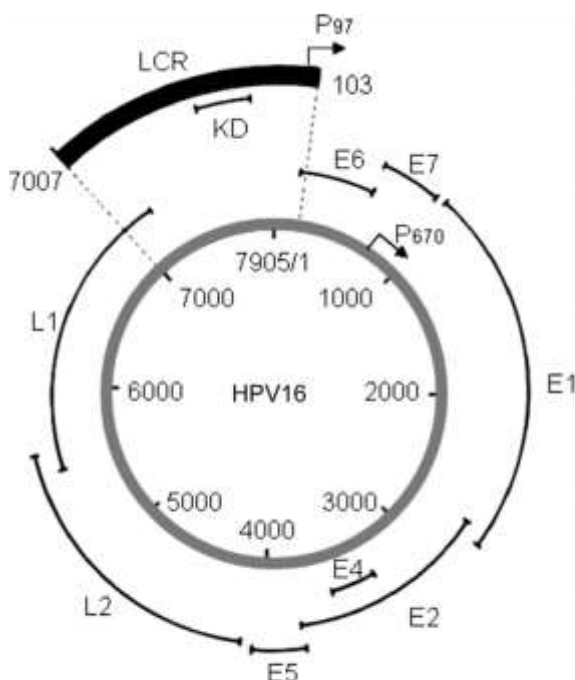
Los PVs fueron designados como una familia, *Papillomaviridae* por el Comité Internacional en Taxonomía de Virus (ICTV) y agrupó los PVs en géneros designados por letras griegas y en especies dentro de estos géneros. De Villiers et al. (2004) describió la topología de ramas filogenéticas, medidas cuantitativas en comparaciones de las secuencias y características biológicamente distinguibles (hospederos, tejido blanco, patogenicidad, y organización del genoma) que determina la clasificación de los PVs en el nivel de género (Bernard, H. U., 2010).

En 2004, 16 grupos de PVs cumplieron con el criterio de género, y el alfabeto griego de las letras alfa a pi fue empleado para crear la nomenclatura. Los PVs humanos son miembros de cinco géneros (Alfa-, Beta-, Gamma-, Mu- y Nu) y dos géneros (Eta- y Theta-) consistieron de un tipo de PV de ave (Bernard, H. U., 2010; de Villiers et al., 2004).

Los genotipos oncogénicos de HPV con mayor impacto médico están incluidos dentro de las especies  $\alpha 9$  (HPV16, 31, 33, 58) y  $\alpha 7$  (HPV18, 45), una fracción significativa de los CaCu son causados por las especies  $\alpha 5$  (HPV51),  $\alpha 6$  (HPV56), y  $\alpha 11$  (HPV73) (Jagu, S., 2013).

#### 1.6. Organización Genómica del HPV

El genoma de todos los HPVs es de ADN de doble cadena y circular de aproximadamente 8000 pares de bases en tamaño. La clonación molecular y secuenciación del papilomavirus ha revelado una organización genómica típica en todos los miembros de la familia del HPV, con 8 o 9 marcos de lectura abierta encontrados en la cadena de ADN. El genoma del HPV se divide en tres regiones: I) una región codificante conteniendo los genes tempranos E1, E2, E4, E5, E6 y E7; II) una región conteniendo los genes tardíos que codifican la proteína mayor (L1) y la proteína menor (L2); y III) una región no codificante llamada región larga de control (LCR), localizada entre los genes L1 y E6 conteniendo los elementos reguladores involucrados en la replicación y transcripción del ADN viral. La Figura 2 muestra el genoma del HPV y las principales funciones de los productos génicos tempranos y tardíos (Tommasino, 2013).



Proteína Viral	Funciones
E1	Forma un complejo heterodímero con E2 y controla la replicación viral
E2	Regula el promotor de genes tempranos y junto con E1 la replicación viral
E4	Puede mediar las partículas liberadas por desestabilización de la red de citoqueratina
E5	Estimula señales mitogénicas por medio de factores de crecimiento
E6	Inactiva proteínas celulares y es una de las principales oncoproteínas virales
E7	Inactiva proteínas celulares y es una de las principales oncoproteínas virales
L1	Es la proteína de la cápside mayor y es componente de las vacunas profilácticas contra el HPV
L2	Es la proteína de la cápside menor

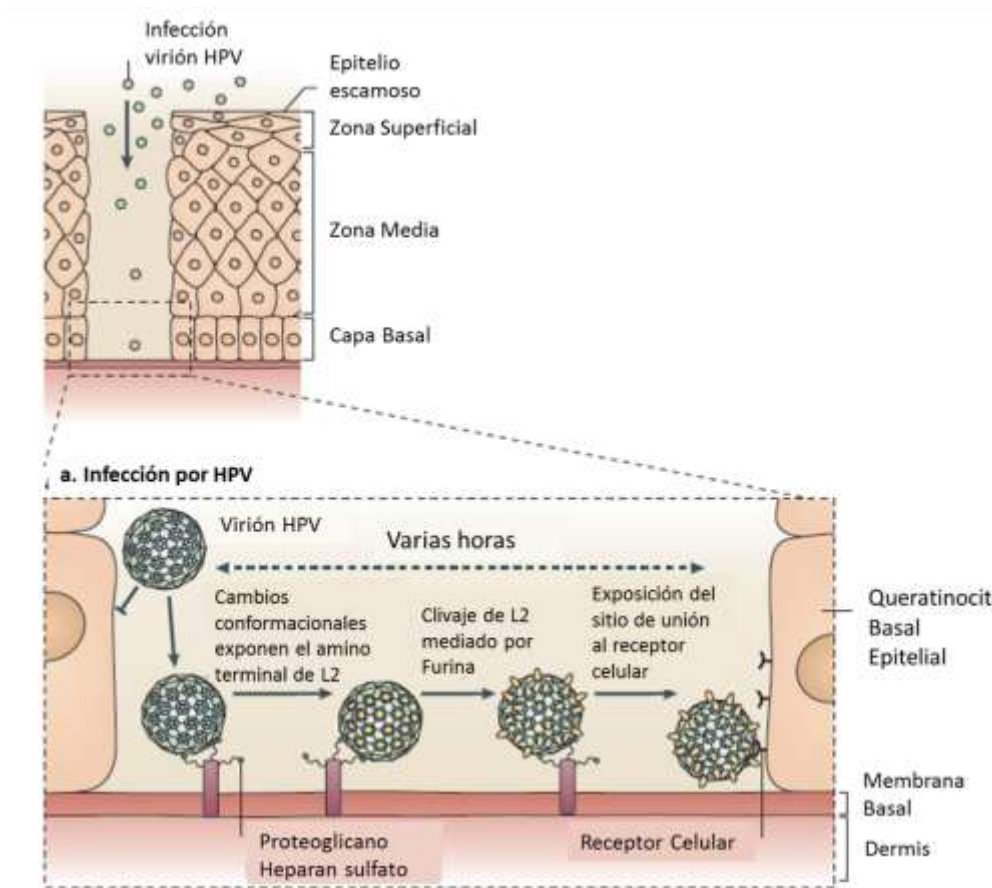
**Fig. 2.** El ADN de doble cadena del genoma de HPV16 está representado por un círculo gris marcado con el número de nucleótidos. Se muestran las posiciones de la región larga de control (LCR), los genes tempranos (E1-7) y los genes tardíos (L1 y L2). Los promotores tempranos y tardíos P97 y P670 se indican con flechas. Las principales funciones de los productos génicos tempranos y tardíos se enlistan en la tabla. Tomada y modificada de (Tommasino, 2013).

### 1.7. Ciclo Replicativo del HPV

Los HPVs son exclusivamente patógenos intraepiteliales, la infección y el crecimiento del virus es absolutamente dependiente de la expresión del programa completo de diferenciación del queratinocito (Doorbar, 2005). En el epitelio estratificado del ectocervix, la infección requiere la presencia de una micro lesión que permita a los viriones infecciosos acceder a la lámina basal para que de esta forma interactúe con receptores proteoglicanos heparán sulfato (Giroglou, 2001; Johnson, 2009).

Ocurren una serie de cambios estructurales en la cápside viral, los cuales incluyen clivaje por furina en L2, facilitando la transferencia a un receptor secundario en el queratinocito basal, el cual es necesario para la internalización del virus y la subsecuente transferencia del genoma viral al núcleo (Johnson,

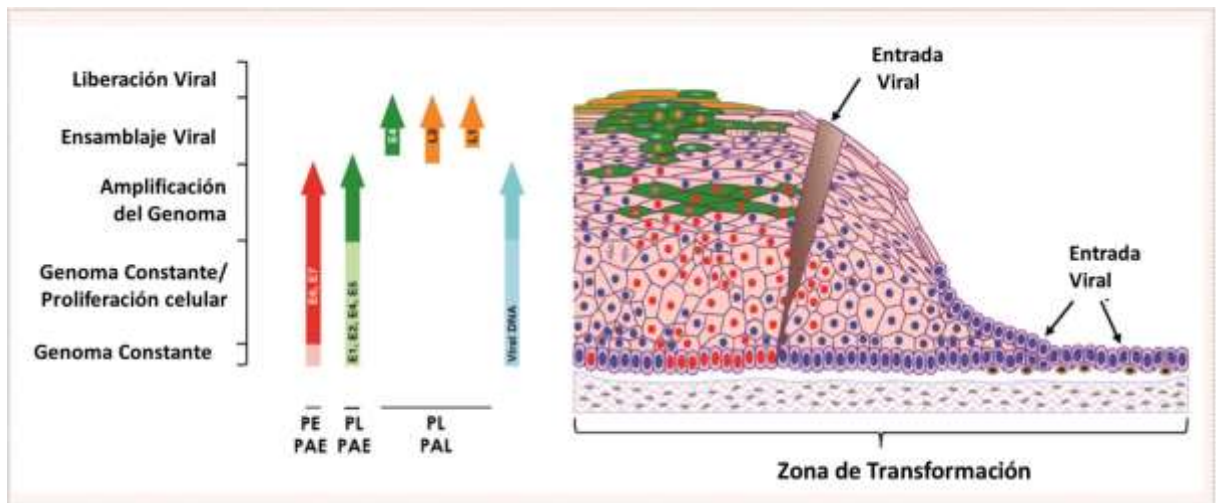
2009 ;Richards, 2006). Una vez internalizados, los viriones son transportados vía endosomal. El complejo DNA-proteína-L2 mejora la correcta entrada del genoma viral al núcleo, mientras que la proteína L1 es retenida en el endosoma para ser llevada a degradación lisosomal, Fig.3, (Doorbar, 2012).



**Fig. 3.** Mecanismo de infección del HPV en el epitelio cervical. **a.** Los viriones de HPV deben unirse a la membrana basal vía receptores proteoglicanos heparan sulfato. En un proceso que lleva varias horas sufren una serie de cambios conformacionales, comenzando con un clivaje en la proteína L2 (amarillo) mediado por furina que expone un sitio de unión en la proteína L1 (azul), permitiendo la unión a un receptor celular y la infección del queratinocito basal epitelial. Tomada y modificada de (Schiller, 2012).

Las células basales infectadas son reservorios de infección y en estas células el genoma viral es mantenido con un bajo número de copias episomal. Estas células se dividen y producen células hijas que son empujadas hacia la superficie epitelial. Una variedad de eventos en el ciclo de vida del virus son disparados en las diferentes etapas durante esta migración (Doorbar, 2012).

En lesiones (como CIN 1) causadas por tipos de HPV de alto riesgo (tal como HPV16), las células en las capas subyacentes expresan E6 y E7 controlando el ciclo celular y estimulando la división celular. En los estratos intermedios son necesarias proteínas para la amplificación del genoma encontrándose elevadas cantidades en estas células. Estas células expresan la proteína viral E4 y se encuentran en fase S o G2 del ciclo celular. En las capas superficiales las células salen del ciclo celular y en un subgrupo de células positivas a E4, las proteínas del virus L2 y L1 son expresadas, lo que permite el empaquetamiento del genoma viral amplificado (Fig. 4) (Doorbar, 2012).



**Fig. 4.** Ciclo de vida del HPV en epitelio cervical. El sitio de expresión de los productos génicos se muestra a la izquierda. PAE: Posición del sitio de poliadenilación temprana; PAL: Sitio de poliadenilación tardía; PE: Promotor Temprano, p97; PL: Promotor tardío, p670. Tomada y modificada de (Doorbar, 2012).

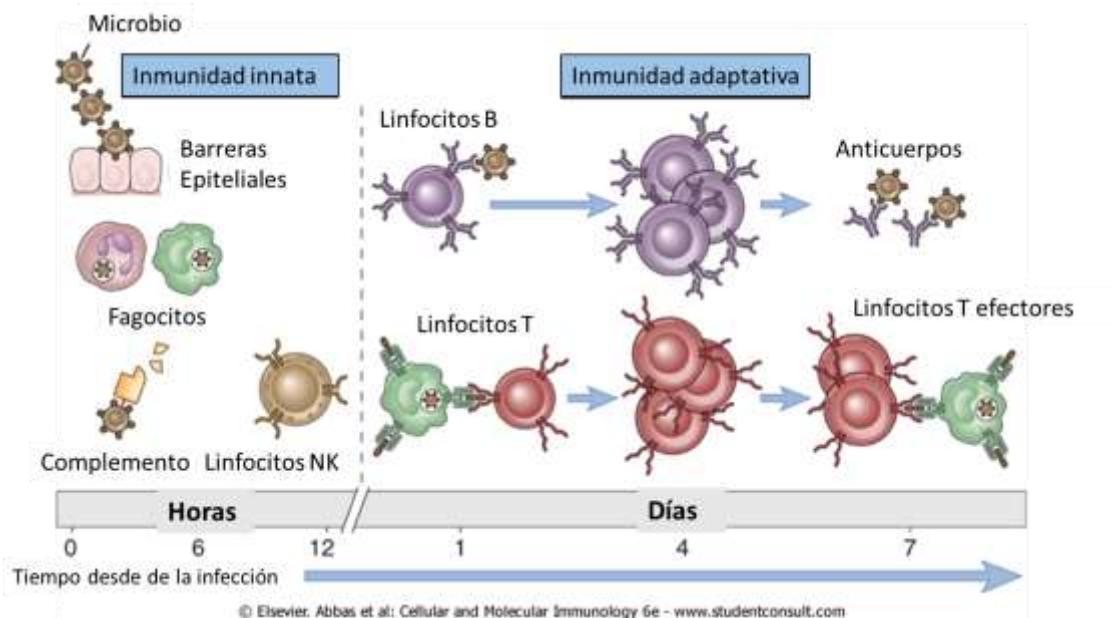


### 1.8. Inmunidad Innata y Adaptativa

La defensa contra los microorganismos tiene lugar a través de las primeras reacciones correspondientes a la inmunidad innata y las respuestas posteriores a cargo de la inmunidad adaptativa (Figura 5). La inmunidad innata (también llamada inmunidad natural) aporta la primera línea de defensa frente a los microbios. Está constituida por mecanismos de defensa celulares y bioquímicos ya instaurados incluso antes de contraerse la infección y preparados para responder con rapidez una vez producida (Abbas, 2012).

Estos mecanismos sólo reaccionan ante los microbios (y los derivados de las células dañadas), y responden básicamente de la misma manera cada vez que se repite una infección. Los principales componentes de la inmunidad innata son los siguientes: 1) barreras físicas y químicas, como los epitelios y las sustancias antimicrobianas formadas en sus superficies; 2) células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos) y linfocitos citolíticos naturales (NK); 3) proteínas sanguíneas, como los factores del sistema del complemento y otros mediadores de la inflamación; y 4) unas proteínas denominadas citocinas, que regulan y coordinan muchas de las actividades de las células encargadas de la inmunidad innata. Los mecanismos de la inmunidad innata son específicos para aquellas estructuras comunes a los grupos de microbios afines y no tienen por qué distinguir la existencia de diferencias sutiles entre las sustancias ajenas (Abbas, 2012).

A diferencia de la inmunidad innata, hay otras respuestas inmunitarias que son estimuladas por la exposición a los microorganismos infecciosos, cuya magnitud y capacidad defensiva crece con cada exposición sucesiva a un microorganismo concreto. Dado que esta forma de inmunidad aparece como respuesta a una infección y se adapta a ella, recibe el nombre de inmunidad adaptativa. El sistema inmunitario adaptativo tiene la capacidad de reconocer una gran cantidad de sustancias microbianas y no microbianas y de reaccionar frente a ellas. Además, posee dotes extraordinarios para distinguir entre los distintos microorganismos y moléculas, incluso los muy afines entre sí, y por esta razón también recibe la denominación de inmunidad específica, Figura 5, (Abbas, 2012).



**Fig. 5.** Inmunidad innata y adaptativa. Los mecanismos de la inmunidad innata aportan la primera defensa contra las infecciones. Las respuestas inmunitarias adaptativas surgen más tarde y consisten en la activación de los linfocitos. Tomado y modificado de (Abbas, 2008).

Asimismo, a veces se le adjudica el nombre de inmunidad adquirida para poner de relieve que las potentes respuestas protectoras se adquieren por la experiencia. Los principales componentes de la inmunidad adaptativa son unas células llamadas linfocitos y sus productos de secreción, como los anticuerpos. En cambio, las sustancias ajenas que suscitan una respuesta inmunitaria

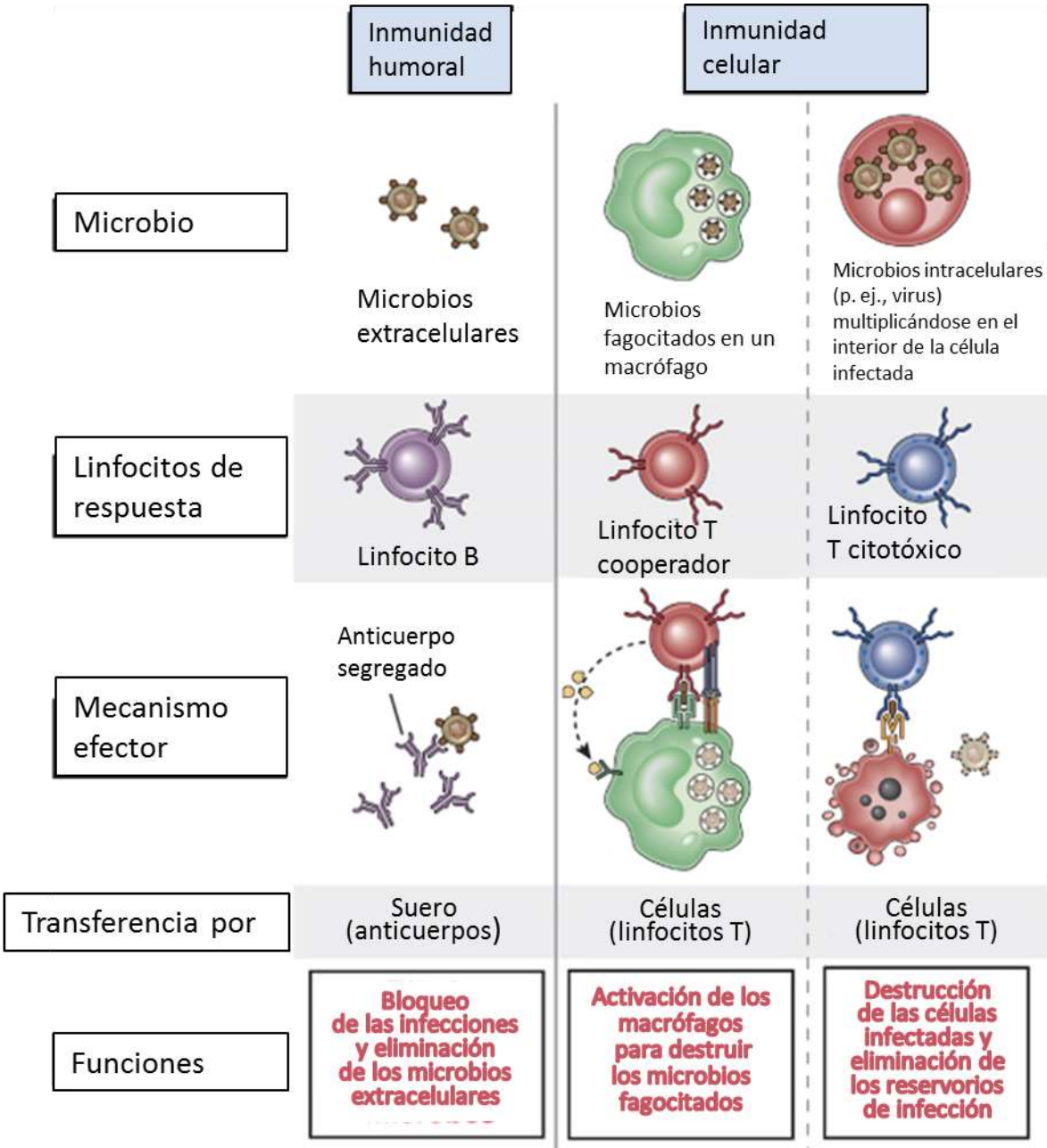
específica o que constituyen el blanco de tales respuestas son los antígenos. Existen dos tipos de respuestas inmunitarias adaptativas, llamadas inmunidad humoral e inmunidad celular, en las que intervienen componentes diferentes del sistema inmunitario (Abbas, 2012).

### 1.9. Inmunidad Humoral

La inmunidad humoral cuenta con moléculas presentes en la sangre y en las secreciones mucosas, que reciben el nombre de anticuerpos, producidas por unas células denominadas linfocitos B (o también células B). Los anticuerpos reconocen los antígenos microbianos, neutralizan la infectividad de los microorganismos y los marcan como una diana para su eliminación por diversos mecanismos efectores. La inmunidad humoral es el principal mecanismo de defensa contra los microbios extracelulares y sus toxinas, debido a que los anticuerpos segregados pueden unirse a ellos y contribuir a su destrucción (Figura 6). Los propios anticuerpos están especializados, y cada tipo diferente puede activar unos mecanismos efectores distintos. Por ejemplo, hay algunas clases que favorecen la ingestión de los microorganismos por las células del huésped (fagocitosis), mientras que otras se fijan a ellos y desencadenan la liberación celular de los mediadores de la inflamación (Abbas, 2012; Murphy, 2009; Roitt, 2008).

### 1.10. Inmunidad Celular

La inmunidad celular queda a cargo de los linfocitos T (también llamados células T). Los microbios intracelulares, como los virus y algunas bacterias, sobreviven y proliferan en el interior de los fagocitos y de otras células del huésped, donde los anticuerpos circulantes no los tienen a su alcance. La defensa contra estas infecciones corresponde a la inmunidad celular, que fomenta la destrucción de los microorganismos residentes en los fagocitos o la desaparición de las células infectadas para suprimir los reservorios de la infección (Figura 6) (Abbas, 2012; Murphy, 2009; Roitt, 2008).



© Elsevier. Abbas et al: Cellular and Molecular Immunology 6e - www.studentconsult.com

**Fig. 6.** Tipos de inmunidad adaptativa. En la inmunidad humoral, los linfocitos B segregan anticuerpos que impiden las infecciones y eliminan los microorganismos extracelulares. En la inmunidad celular, los linfocitos T cooperadores activan la supresión de los microbios fagocitados en los macrófagos o los linfocitos T citotóxicos (LTC) destruyen directamente las células infectadas. Tomado y modificado de (Abbas, 2012).

### 1.11. HPV y Respuesta Inmune

La respuesta inmune innata, la cual involucra a macrófagos, células asesinas (NK), y células T asesinas, juega un papel importante como la primera línea de defensa contra la infección por HPV. Sin embargo, la evasión del reconocimiento inmune es el principal marcador de la infección, ya que varias alteraciones de la inmunidad natural han sido reportadas en la infección por HPV (Torres, 2014).

El ciclo de infección del HPV está adaptado al programa de diferenciación de la célula blanco, el queratinocito, el cual provoca varios problemas importantes con respecto al reconocimiento inmune. Primero, la infección y el crecimiento vegetativo son completamente dependientes del programa de diferenciación del queratinocito, desde las células basales a las escamosas superficiales ya diferenciadas. El ciclo de infección completo toma largo tiempo, y en un óptimo escenario el tiempo desde la infección a la liberación viral es de aproximadamente 3 semanas, desde que éste infecta el queratinocito basal, avanza hacia la superficie del epitelio, sufre la diferenciación completa, y la descamación (Stanley, 2012).

En realidad, el período entre la infección y la aparición de la lesión es altamente variable y puede variar desde semanas a meses, sugiriendo que los virus efectivamente evaden las defensas del huésped. Además, no hay citolisis o muerte celular como consecuencia de la replicación y ensamblaje del virus, y por lo tanto no hay inflamación, así que por mayor que sea la duración del ciclo de infección, éste no liberará citocinas pro inflamatorias, importantes para la activación y migración de las células presentadoras de antígeno (APCs), tales como células de Langerhans (LCs), reclutamiento de células dendríticas (DCs) y macrófagos dentro del foco de infección. El HPV es un patógeno exclusivamente intraepitelial, no es llevado por la sangre y solo mínimas cantidades de virus son expuestos a las defensas inmunes. En efecto, los virus son prácticamente invisibles a las defensas del huésped, quienes ignoran la presencia de el patógeno por largos periodos (Stanley, 2012).

Existen regresiones de la lesión que son efectuadas por una respuesta inmune a proteínas tempranas. Se ha visto que en infecciones animales esta respuesta inmune es seguida por una seroconversión y producción de anticuerpos a la proteína mayor de la cápside L1, y esto probablemente también ocurre en humanos (Carter, 1996; Nicholls, 1999). En las infecciones no hay viremia y las partículas virales son liberadas desde la superficie del epitelio escamoso, con poco acceso a los canales vasculares y linfáticos, así como a los nódulos linfáticos, donde la respuesta inmune puede ser iniciada (Carter, 2000).

### 1.12. Vacunas contra el HPV

Las vacunas efectivas actuales contra el HPV han sido desarrolladas como resultado de la ingeniería genética o tecnología de DNA recombinante para producir un clon de la partícula viral, pero sin un genoma. El gen L1 y L2 del genoma viral fue subclonado en microorganismos tales como levaduras o baculovirus donde las proteínas son sobreexpresadas. Estas proteínas se autoensamblan espontáneamente en VLPs con una conformación que asemeja al auténtico virión (Malik, H. et al, 2014).

Las VLPs son altamente inmunogénicas e inducen altos títulos de anticuerpos policlonales cuando son administradas a grupos de animales y humanos. Dos versiones de vacunas contra el HPV a base de VLP compuesta de proteína L1 están actualmente disponibles en la mayoría de los países por los sistemas de salud, las cuales fueron puestas bajo licencia en 2006. La primera, una vacuna cuadrivalente (Gardasil, producida por Merck y Co. Inc.) compuesta por VLPs de cuatro HPVs: HPV-16 y HPV-18 (los principales causantes del CaCu) y HPV-6 y 11 (los causantes de verrugas genitales) (Kawana, K., 2012).

La segunda, una vacuna bivalente (Cervarix, producida por GlaxoSmithKline) compuesta por VLPs de solo dos tipos de HPV: HPV-16 y 18. Ambas vacunas han provisto casi el 100% de efectividad en la protección contra los tipos de HPV contenidos en las vacunas en los tratamientos clínicos que incluyeron a cientos de mujeres (Stanley M., 2012).

### 1.13. Vacunas contra el HPV de Segunda Generación

Aunque los tratamientos clínicos de Gardasil y Cervarix han sido extremadamente prometedores, estas vacunas de primera generación pueden no ser los candidatos ideales para una vacuna, ya que no protegen contra otros tipos de HPV que también son oncogénicos y su adquisición es costosa, especialmente en países en vías de desarrollo, los cuales aportan el 85% de todos los casos de CaCu (Roden R, et al, 2006).

En los últimos años, se están llevando a cabo investigaciones para desarrollar otras vacunas profilácticas que puedan ser efectivas contra un amplio rango de tipos de HPV, que tengan una mayor durabilidad, provean inmunidad a largo plazo con una dosis y sin refuerzos, sean económicas y con facilidad de uso, que sean profilácticas y terapéuticas, estables en un amplio rango de temperaturas y puedan ser administradas por métodos no invasivos como oral o nasalmente (Malik, H. et al, 2014; Roden R. et al., 2006).

Las vacunas profilácticas contra el HPV de segunda generación actualmente en tratamiento clínico, pueden tener ventajas sobre las vacunas de primera generación y posiblemente facilitar la integración con otras vacunas en los programas rutinarios de inmunización. La vacuna profiláctica de segunda generación contra el HPV más avanzada es una vacuna nonavalente (tratamiento clínico fase III). En comparación con la actual vacuna cuadrivalente, la nonavalente incluye cinco nuevos tipos de HPV oncogénicos (31, 33, 45, 52, y 58) y tiene el potencial de proveer un adicional 15-30% de reducción en la incidencia del cáncer cervical (Schiller, 2012).

Sin embargo, la complejidad de su manufactura puede incrementar notablemente los costos en relación a las vacunas ya autorizadas, Gardasil y Cervarix, lo que puede ser un impedimento para su implementación en países en vías de desarrollo, quienes aportan el 85% de todos los casos de cáncer cervical, y quienes carecen de recursos e infraestructura necesarios para un tamizaje citológico efectivo (Roden, 2006).

Además, el impacto de la vacuna nonavalente dependerá de varios factores tales como: la proporción de casos de cáncer atribuibles a tipos de HPV incluidos en la vacuna, la prevalencia de coinfecciones con múltiples tipos de HPV, y efectos de protección cruzada de la vacuna contra otros tipos oncogénicos no incluidos en la vacuna (Jagu, 2013; Roden, 2006).

Lo anterior hace necesario el desarrollo de vacunas profilácticas para prevenir la infección contra una amplia variedad de genotipos de HPV oncogénicos, cuya manufactura, distribución y costos no repercuta en una mayor erogación para su implementación en países en vías de desarrollo.

#### 1.14. L2; la proteína menor de la cápside del HPV

La arquitectura básica del virión del papilomavirus es una cápside icosaédrica con un diámetro de 55-60 nm. Cada virión contiene 360 copias de la proteína L1. Ésta se ensambla en formas de cinco unidades llamadas capsómeros y la cápside está formada por la asociación de 72 capsómeros. También contiene un número no definido de proteínas L2, aunque se estima que están en una proporción 1:5 L2 a L1. Esta proteína es de menos de 500 a.a. de longitud, lo cual corresponde a una masa molecular estimada de aproximadamente 55 KDa (Buck, 2008; Pastrana, 2005; Stanley, 2012; zur Hausen, 2002).

Estudios de unión de anticuerpos sugieren que L2 está predominantemente oculta bajo la superficie del virión, aunque su configuración es desconocida. Un estudio detallado usando antisueros a péptidos sobrepuestos cubriendo la secuencia entera de L2 de HPV16 sugirió que varias regiones (residuos 32-81, 212-231, 272-291 y 347-381) son accesibles en la superficie de las VLPs.

Asimismo, en otros estudios se identificaron epítopes neutralizantes en L2 de HPV16 sugiriendo que sólo los primeros 120 a.a del amino terminal son disponibles para su unión (Wang, 2013).

Como una propuesta alternativa en la preparación de una vacuna multivalente para ampliar la protección se está llevando a cabo la identificación de un antígeno conservado y de protección cruzada (Schiller, 2012). Recientes estudios demuestran que la vacunación con la proteína menor L2 de la cápside protege en varios modelos animales, esta protección es mediada por anticuerpos neutralizantes que reconocen estructuras lineales de las proteínas y tienen una capacidad neutralizante para una amplia variedad de tipos de HPV, aunque los títulos producidos por vacunación con L2 son mucho más bajos que los producidos por vacunas de VLP-L1 (Roden, 2006).

Sin embargo, los anticuerpos neutralizantes producidos específicos a L2 son ampliamente cross-neutralizantes y proveen protección cruzada en modelos animales; la vacunación con L2 de HPV-16 protege contra el papilomavirus de cola de conejo (CRPV) y papilomavirus oral de conejo (ROPV) (Gambhira, 2007). Entonces, se están encaminando esfuerzos para mejorar la inmunogenicidad de L2 y el desarrollo para estudios clínicos de vacunas a base de L2. El potencial para usar un solo antígeno sugiere que las vacunas de L2 tienen potencial como una alternativa de bajo costo o complemento a las vacunas de VLP-L1 (Roden, 2006; Schiller, 2012).

Los estudios realizados en los últimos años muestran que los epítopes de la proteína L2 del HPV que generan una respuesta inmunológica significativa en ratones y conejos, generalmente están comprendidos entre los residuos de aminoácidos que van del ~11- 88 encontrados en ocho tipos de HPV mucosal (6, 16, 18, 31, 39, 51, 56, 73), y los residuos que están en los aminoácidos que van del 17-36, 32-51 y 65-81 (Jagu, 2013).



## 2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente, el CaCu representa un problema de salud pública en México por ser la segunda causa de muerte en mujeres por cáncer en el país (INEGI, 2013). Esta enfermedad se encuentra fuertemente asociada (cercana al 100%) con la infección por el virus de papiloma humano (HPV) de alto riesgo, en donde HPV-16 es el tipo de papiloma carcinogénico más comúnmente encontrado en los tumores de cuello uterino a nivel mundial (Walboomers et al, 1999).

En los últimos años se han llevado a cabo estudios en el ámbito del desarrollo de vacunas profilácticas y terapéuticas de segunda generación que provean protección contra el HPV; esto es debido a que las vacunas existentes (Gardasil y Cervarix) no son lo suficientemente efectivas en la protección contra otros tipos de HPV (diferentes al tipo 16 y 18, que también son importantes en la asociación con el desarrollo de CaCu) y su adquisición es de alto costo (Roden R, et al, 2006).

Estudios realizados recientemente, han demostrado que el extremo amino terminal de la proteína L2 de HPV, es importante en el mecanismo de interacción del virión con la membrana de la célula blanco durante la infección natural. Asimismo, se ha reportado que en la región correspondiente a la secuencia 11-88 de la proteína L2, el epítopo 17-36 es capaz de inducir anticuerpos con capacidad neutralizante (Jagu, 2013).

Tomando en consideración que los HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-45 y HPV-58 de alto riesgo son genotipos más frecuentemente asociados a lesiones de CaCu a nivel mundial y en nuestro país (Peralta-Rodríguez, et al., 2012), en el presente trabajo se analizó la capacidad de péptidos derivados de las secuencias de aminoácidos 17-36 de la proteína L2 de estos tipos de HPV de alto riesgo para generar anticuerpos con capacidad neutralizante en ratas de la cepa Wistar. Todo ello, con la finalidad de que los resultados obtenidos en este estudio sean de gran importancia para generar prototipos vacunales de amplio espectro contra la infección por HPVs de alto riesgo.

### **3. HIPÓTESIS**

Se ha descrito que el extremo amino terminal de la proteína L2 de la cápside interviene en la unión de los viriones de HPV con receptores de membrana de la célula blanco durante el proceso infeccioso. Asimismo, se ha reportado que anticuerpos dirigidos hacia el epítotope 17-36, altamente conservada en la proteína L2 de los diferentes HPVs, son capaces de neutralizar a pseudoviriones y evitar su introducción a la célula blanco. En consecuencia, si se inmunizan ratas de la cepa Wistar con péptidos de la secuencia 17-36 de la proteína L2 de HPV de los tipos 16, 18, 31, 33, 45 y 58, entonces se inducirán anticuerpos con capacidad de neutralizar pseudoviriones compuestos por las proteínas L1 y L2 de HPV-16 y evitarán su entrada a células blanco.

#### **4. OBJETIVO GENERAL**

Analizar la capacidad de los péptidos de la secuencia 17-36 de la proteína L2 de HPV-16, 18, 31, 33, 45 y 58 para inducir anticuerpos neutralizantes de pseudoviriones compuestos por las proteínas L1 y L2 de HPV-16.

#### **4.1. OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1)** Inducir anticuerpos específicos a péptidos de la secuencia 17-36 de la proteína L2 de HPV-16, 18, 31, 33, 45 y 58 en ratas de la cepa Wistar.
  
- 2)** Generar pseudoviriones compuestos por las proteínas L1 y L2 de HPV-16.
  
- 3)** Determinar la capacidad de los anticuerpos anti péptidos 17-36 de la proteína L2 de HPV-16, 18, 31, 33, 45 y 58, para neutralizar pseudoviriones compuestos por las proteínas L1 y L2 de HPV-16.

## 5. MATERIAL Y MÉTODO

### Péptidos de proteína L2

Los péptidos que se emplearon durante las inmunizaciones corresponden a las secuencias 17-36 de la proteína L2 de diferentes tipos de HPV de alto riesgo y se muestran a continuación:

Péptido #	Secuencias	Tipo de HPV
Péptido 1	(QLYKTCKQAGTCTTDIIPKV)	HPV 16
Péptido 2	(DLYKTCKQSGTCTTDVVPKV)	HPV 18
Péptido 3	(QLYQTCKAAGTCPSDVITKI)	HPV 31
Péptido 4	(QLYQTCKATGTCPDVIPKV)	HPV 33
Péptido 5	(DLYRTCKQSGTSPDVIKVK)	HPV 45
Péptido 6	(QLYQTCKASGTCPDVIPKV)	HPV 58

**Tabla 1.** Secuencias de las proteínas de L2 (17-36) utilizadas en inmunizaciones.

### Inmunización de ratas Wistar con péptidos de la proteína L2

- **Ratas**

Para la inmunización se usaron 7 grupos de ratas hembra, cada uno con 3 ratas de la cepa Wistar de 6-8 semanas de edad, y se mantuvieron en condiciones estándar de bioterio, con alimento y agua *ad libitum* conforme a la NOM-062-ZOO-1999, Diario Oficial de la Federación, 22 de agosto de 2001, que hace referencia a las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

- **Inmunizaciones**

Las ratas Wistar fueron inmunizadas intraperitonealmente recibiendo 3 dosis en intervalos de 10 días entre cada inoculación de acuerdo al siguiente esquema de inmunización (Tabla 2).

DIAS	INOCULO
<b>Día 0</b> <b>Primera dosis</b>	Péptido + Adyuvante de Freund Completo
	PBS + Adyuvante Completo
<b>Día 10</b> <b>Segunda dosis</b>	Péptido + Adyuvante de Freund Incompleto
	PBS + Adyuvante Incompleto
<b>Día 20</b> <b>Tercer dosis</b>	Péptido + Adyuvante de Freund Incompleto
	PBS + Adyuvante Incompleto
<b>Día 30</b>	Exanguinación

**Tabla 2.** Esquema de inmunización de ratas Wistar.

La primera inmunización consistió de una dosis de 100 µg de cada uno de los péptidos emulsionados en proporción 1:1 con adyuvante completo de Freund (Sigma, USA); para las dos inmunizaciones siguientes de igual manera la concentración de péptido fue la misma con adyuvante incompleto de Freund.

Mientras que en el grupo control se utilizó PBS (Solución Buffer de Fosfatos) en proporción 1:1 con adyuvante completo de Freund para la primera inmunización, y con adyuvante incompleto de Freund para las siguientes dos inmunizaciones.

- **Obtención del material biológico**

Transcurridos 30 días a partir de la primera inmunización se procedió a exanguinar a los organismos de cada uno de los grupos. Posteriormente la sangre obtenida se centrifugó a 8000 rpm durante 15 minutos para finalmente obtener el suero, el cual se almacenó en congelación a una temperatura de -20 °C para su uso posterior en los ensayos de detección de anticuerpos por ELISA y ensayos de neutralización.

### **Detección de anticuerpos anti-péptidos por ELISA**

La detección de anticuerpos se realizó mediante la técnica de ELISA (del inglés *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), en la cual, los péptidos fueron disueltos en buffer de carbonatos a una concentración de 1µg/ml. Después se colocaron 100 µl de los péptidos disueltos en placas de 96 pozos fondo plano

por triplicado para cada muestra y se incubaron una hora a 37°C; transcurrido este tiempo se incubó durante toda la noche en refrigeración a 4°C.

Al día siguiente se realizaron 2 lavados con 300 µl/pozo de TBS-Tween 20 al 0.1%, los pozos se cubrieron posteriormente con 200 µl de solución bloqueadora compuesta por TBS-Tween 20 al 0.1% y 2% de albumina sérica bovina (BSA al 2%) y se incubó la placa durante 2 horas a 37° C. Transcurrido este tiempo los pozos fueron lavados 4 veces con 300 µl de TBS-Tween 20 al 0.1%, enseguida se adicionaron 100 µl de anticuerpo primario (suero de ratas inmunizadas) a una dilución de 1:50, diluido en BSA al 2% y se incubó por dos horas a 37° C.

Después se lavó la placa 6 veces con 300 µl/pozo de TBS-Tween 20 al 0.1% y se agregó el anticuerpo secundario. Para revelar la cantidad de anticuerpos presentes en los sueros de rata que reconocieron los péptidos se utilizó el anticuerpo secundario goat anti-rat acoplado a fosfatasa alcalina (Sigma, USA), diluido 1:2500 en BSA al 2% y se colocaron 100 µl en cada pozo para dejar incubar por dos horas a 37° C.

Pasadas las dos horas se lavó 8 veces con 300 µl/pozo de TBS-Tween 20 al 0.1% y se adicionaron 100 µl de una solución de 0.03 gramos de sustrato para fosfatasa alcalina (Sigma USA), por cada 5ml de solución de Dietanolamina y se incubó una hora más a 37°C. La reactividad enzimática de la fosfatasa se determinó por la formación de un producto de color, la cual se detectó con un lector de placas para ELISA (Molecular Devices) a una longitud de onda de 405 nm.

### **Generación de pseudoviriones L1/L2 de HPV-16 (PsV)**

Con el objetivo de evaluar la capacidad neutralizante de los anticuerpos anti péptidos detectados en los sueros de los organismos inmunizados, se generaron pseudoviriones constituidos por cápsides compuestas de las proteínas L1 y L2 de HPV-16 que contenían un plásmido reportero pYSEAP (codificante para fosfatasa alcalina secretada).

Para la obtención de pseudoviriones de HPV-16 se utilizó el protocolo propuesto por Pastrana D. *et al*, 2004; en el cual, los plásmidos: p16L1h y p16L2h (donados por el Dr. John Schiller NHI Bethesda, USA) que tienen un codón modificado para las proteínas L1 y L2 de HPV-16 fueron utilizados para transfectar la línea celular 293TT. La transfección simultánea de estos plásmidos y del plásmido reportero fue realizada para generar pseudoviriones, los cuales se purificaron en gradientes de densidad de Optiprep (Gibco, USA) y en ultracentrifugación a 50,000 rpm durante tres horas (Pastrana D *et al*, 2004).

- **Transfección de células 293TT**

Las células 293TT fueron cultivadas en cajas Petri de 10 cm<sup>2</sup> con medio de cultivo RPMI (Gibco, USA) adicionado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y suplementado con aminoácidos no esenciales (100x), piruvato de sodio (100x) y 2-Mercaptoetanol (1000x). Una vez adheridas las células, se adicionaron a cada caja los plásmidos p16L1h, p16L2h, y pSEAP en combinación con TurboFect (ThermoScientific), solución que permite la entrada de los plásmidos a la célula.

- **Cosecha y maduración de Pseudoviriones (PsV).**

En esta sección, los PsV son liberados de las células 293TT con buffer de lisis y son madurados por simple incubación del lisado celular durante una noche a 37 °C. Los pseudoviriones madurados son solubilizados por adición de cloruro de sodio al lisado, el cual permite la clarificación del lisado.

Después de 72 horas de incubación, las células fueron desprendidas con Verseno y colectadas en un tubo cónico de 50 mL para ser centrifugadas. Enseguida se lavaron dos veces con PBS y se pasaron a dos tubos eppendorf para VLP de 2 mL, se centrifugaron por 5 minutos a 3000 rpm y se añadieron 500 µL de buffer de lisis a cada botón celular. Los tubos se incubaron por 24 horas a 37 °C mezclando los tubos por inversión cada 20 minutos durante las primeras 2 horas de incubación.

Al día siguiente se le agregó a cada tubo 0.17 volúmenes de NaCl 5M y se mantuvieron en hielo durante 30 minutos. Enseguida se centrifugaron por 20 minutos a 5000 gravedades en una centrífuga refrigerada a una temperatura de 4 °C. Los sobrenadantes se recolectaron en tubos eppendorf de baja retención de proteínas y se almacenaron en refrigeración a 4 °C.

Para identificar la presencia de proteína L1 conformada en VLP y verificar la eficiencia de la transfección se realizó un ensayo ELISA en la cual se evaluó el lisado obtenido a diferentes diluciones usando como anticuerpo primario suero de niña vacunada con tres dosis de la vacuna Gardasil y como control negativo se utilizó lisado obtenido de células no transfectadas. Además se realizó un ensayo ELISA en el cual se incluyeron diluciones de lisado desnaturalizado obtenido de células tranfectadas.

- **Purificación por gradiente de Optiprep**

En esta fase, los PsV fueron purificados por ultracentrifugación en un gradiente de fases de Optiprep. El Optiprep es el nombre comercial de una solución de iodixanol al 60% (peso/volumen), el cual primeramente se preparó al 46% para ser diluido a 27%, 33% y 39% usando solución PBS/0.8M NaCl. Una vez preparados los gradientes se vertieron cuidadosamente en tubos de polialómero de 10 mL colocando 2.5 mL de cada concentración (39%, 33% y 27%) y para permitir la difusión del gradiente se dejó por una hora a temperatura ambiente.

El lisado celular obtenido se vertió suavemente en el tubo sobre la superficie del gradiente, se centrifugó por 3 horas a 50,000 rpm a una aceleración/desaceleración suave y a una temperatura de 16 °C, con un rotor SW80ti en una ultracentrífuga (Beckman Coulter).

- **Recolección y análisis de fracciones**

Después de la centrifugación, una banda uniforme color gris pudo ser ligeramente visible en un tercio del gradiente, indicando la presencia de pseudoviriones en esa fracción. Para la recolección de las fracciones del gradiente se desecharon los 2 mL superficiales del gradiente y subsecuentemente se colectaron 15 fracciones de 250 µL cada una en tubos para microcentrífuga eppendorf de baja retención.

Para determinar la presencia de proteína L1 conformacional se realizó un ELISA analizando todas las fracciones obtenidas, y la infectividad de los pseudoviriones se calibró en células blanco 293TT mediante la incubación directa con diferentes dosis de pseudoviriones, evaluándose mediante lecturas en un lector de placas para ELISA (Molecular Devices).

### **Ensayos para evaluar la neutralización de PsV de HPV-16**

Con el objetivo de evaluar la capacidad neutralizante de los anticuerpos anti L2 contenidos en los sueros obtenidos de los animales inmunizados, se realizaron ensayos de neutralización empleando como células blanco a células 293TT que fueron sembradas en placas de 96 pozos 24 horas previas al ensayo, a una concentración de 10,000 células/pozo en 100µL de medio RPMI sin rojo de fenol suplementado con 10% de SFB previamente desactivado.



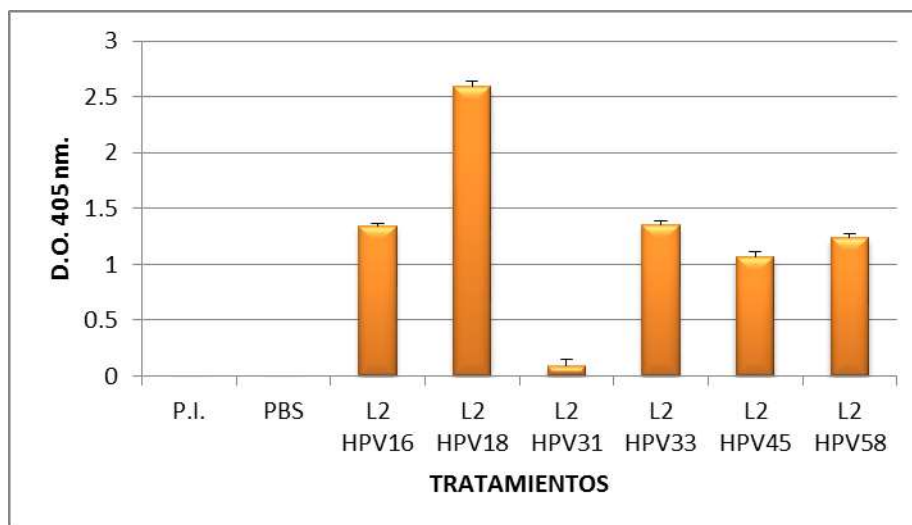
Al día siguiente, los pseudoviriones fueron mezclados con los sueros anti péptidos L2 a diferentes diluciones (1:10, 1:50, 1:250). Después de 20 minutos de incubación a temperatura ambiente se colocaron en los medios celulares las soluciones de pseudoviriones a cada pozo. Los siguientes controles fueron incluidos: células no tratadas, células tratadas solo con pseudoviriones, y células tratadas con pseudoviriones en presencia de anticuerpos monoclonales neutralizantes.

La detección de SEAP (fosfatasa alcalina secretada) en el sobrenadante de los cultivos celulares fue realizada 72 horas después del ensayo con un lector de placas para ELISA (Molecular Devices). Todas las muestras fueron realizadas por triplicado y los datos se analizaron gráficamente con el programa Excel.

## **6. RESULTADOS**

- **Detección de anticuerpos en sueros de ratas inmunizadas con péptidos L2 HPV**

Después de aplicar las tres inmunizaciones con los péptidos de la secuencia 17-36 de la proteína L2 de HPV-16, -18, -31, -33, -45, y -58 (Tabla 1) a las ratas de la cepa Wistar, se procedió a exanguinar a los animales 10 días después. Los sueros obtenidos a partir de la sangre, fueron utilizados para determinar la presencia de anticuerpos IgG anti-péptidos de L2. Al evaluar la reactividad de los sueros contra los respectivos péptidos, se lograron detectar valores altos de anticuerpos en los grupos de ratas inmunizadas con los péptidos de L2 HPV-16, 33, 45, 58 con densidades ópticas (D.O.) desde 1 a 1.35. El valor más alto de anticuerpos se observó en el grupo de ratas inmunizadas con el péptido L2 HPV-18, obteniéndose una densidad óptica D.O. de 2.58; mientras que el valor más bajo se detectó en el grupo inmunizado con el péptido L2 HPV-31, cuya D.O. fue de 0.087 (Fig. 7). Cabe mencionar que en el grupo tratado con PBS y en el grupo no inmunizado no se detectaron anticuerpos.



**Fig. 7. Detección de anticuerpos anti-péptidos de L2 en sueros ratas Wistar.** Ratas de la cepa Wistar (n=3) fueron inmunizadas con tres dosis de 100µg de cada uno de los péptidos sintéticos de la secuencia 17-36 de proteína L2 de HPV-16, -18, -31, -33, -45, y -58. Diez días después de la tercera inmunización se evaluó mediante ensayo de ELISA la reactividad de los sueros hacia los propios péptidos. D.O, densidad óptica. Cada ensayo se hizo por triplicado.

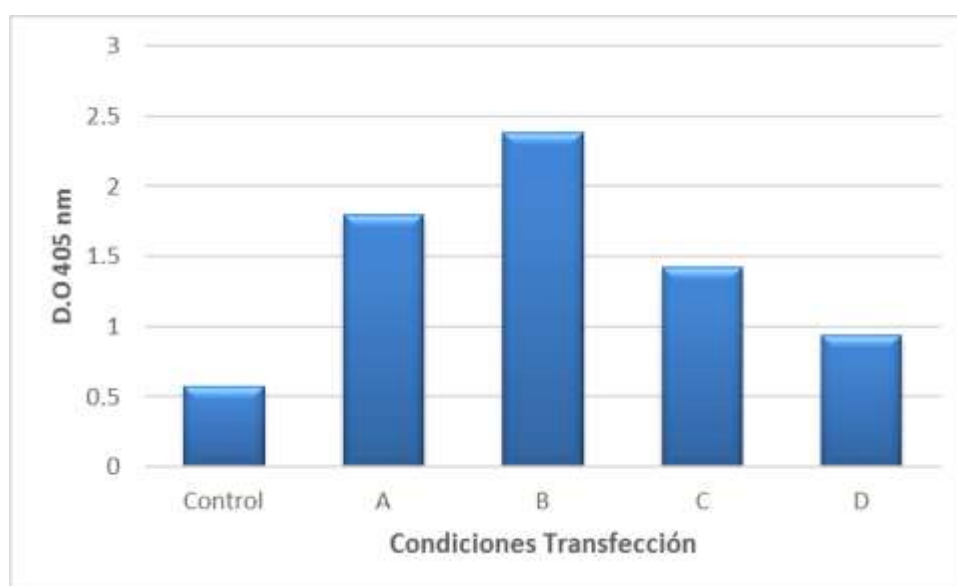
- **Obtención de los pseudoviriones y análisis de su capacidad actividad infectante.**

Con la finalidad de obtener pseudoviriones para evaluar la capacidad neutralizante de los anticuerpos anti-peptidos L2 inducidos en las ratas Wistar mediante inmunización, se utilizó un sistema de transfección de las células 293TT con los genes L1 y L2 de HPV-16, empleando a los plásmidos pL1h y pL2h respectivamente, así como del gen de fosfatasa alcalina pSEAP de acuerdo a Pastrana D et al 2004. Inicialmente se evaluaron diferentes condiciones para transfectar a la línea celular 293TT, para ello se probaron cuatro tratamientos de distintas cantidades de los plásmidos en combinación con liposomas (Turbofect, TF). Se sembraron 30,000 células 293TT en cajas de 6 pozos, 24 horas después de su adherencia cada pozo fue tratado con una condición diferente tal y como se muestra en la Tabla 3. Después de 72 horas de incubación los sobrenadantes de cada pozo fueron analizados para evaluar la actividad de fosfatasa alcalina secretada (Fig. 8), obteniéndose que el tratamiento B fue el que indujo una mayor actividad de fosfatasa alcalina en las células

293TT. En consecuencia se tomaron estas condiciones para la generación de los pseudoviriones.

TRATAMIENTO	CANTIDADES PLÁSMIDOS Y TF
A	(2µg/µl L1 + 2µg/µl L2 + 2µg/µl SEAP) + 4µlTF
<b>B</b>	<b>(2µg/µl L1 + 2µg/µl L2 + 2µg/µl SEAP) + 2µlTF</b>
C	(1µg/µl L1 + 1µg/µl L2 + 1µg/µl SEAP) + 4µlTF
D	(1µg/µl L1 + 1µg/µl L2 + 1µg/µl SEAP) + 2µlTF

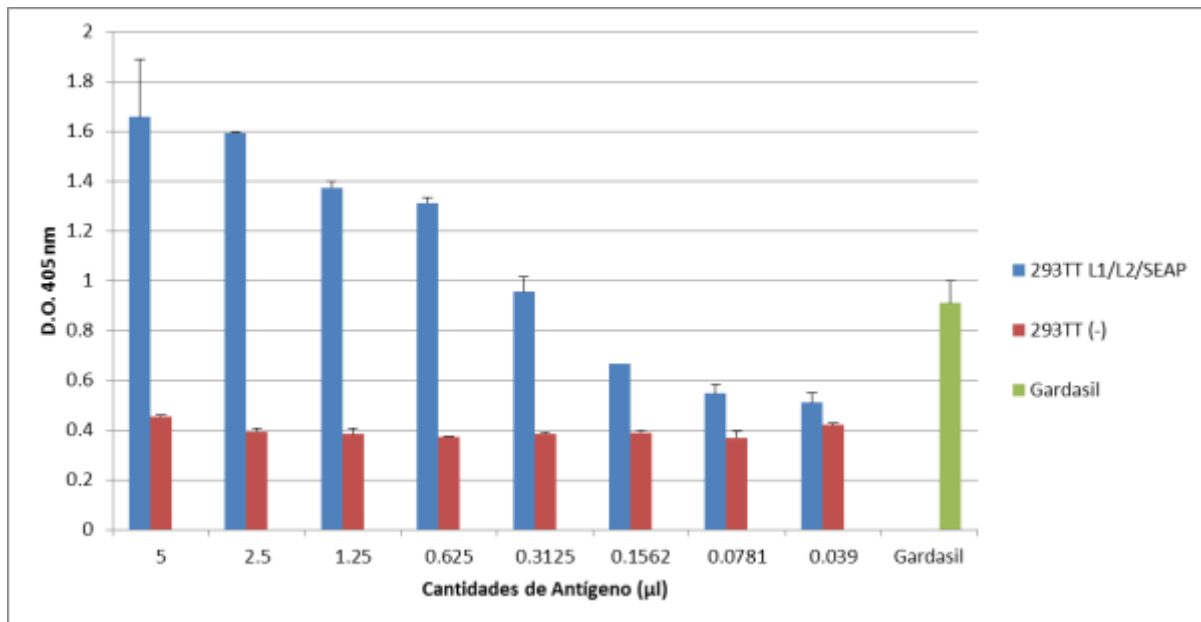
**Tabla 3.** Condiciones utilizadas para generar pseudoviriones a través de la transfección de las células 293TT con los plásmidos pL1h (L1), pL2h (L2), pSEAP (SEAP), y liposomas (TF).



**Fig. 8.** Actividad de fosfatasa alcalina inducida en células 293TT tratada con diferentes cantidades de los plásmidos pL1h, pL2h, pSEAP y de liposomas TF (Tabla 3). D.O. Densidad óptica.

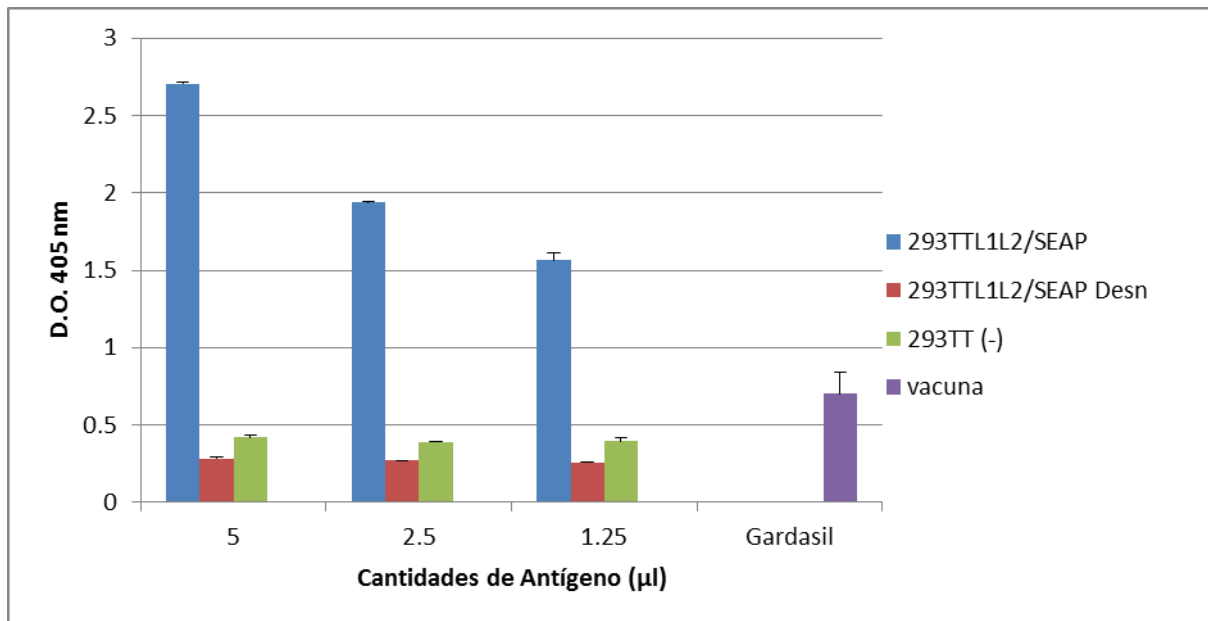
- **Detección de proteína L1 conformacional en lisados obtenidos de células 293TT transfectadas con los plásmidos pL1h, pL2h y pSEAP.**

Para determinar si los pseudoviriones generados en las células 293TT mediante las condiciones de transfección (B) eran reconocidos por anticuerpos anti-L1 de HPV-16 generados en niñas vacunadas con la vacuna Gardasil, los cuales se sabe que reconocen de manera conformacional a las VLPs (Schiller, 2000), se realizaron ensayos de ELISA empleando diferentes cantidades (0.039-5 $\mu$ L) de los lisados obtenidos de las células 293TT transfectadas. Por otro lado, como control negativo se colocaron lisados obtenidos de células no transfectadas, diluidos de igual manera que el lisado proveniente de células transfectadas. Además como control positivo se utilizaron VLPs de la vacuna Gardasil. De manera importante se observó que los lisados de las células 293TT transfectadas, fueron detectados fuertemente por los anticuerpos de las niñas vacunadas con Gardasil, al igual que las VLPs derivadas de la propia vacuna (Fig. 9), sugiriendo fuertemente la presencia de pseudoviriones en los lisados de las células transfectadas. Cabe mencionar que la detección de la proteína L1 disminuyó a medida que se colocaron en la placa de ELISA menores cantidades de lisado de las células 293TT transfectadas; mientras que al colocar las mismas cantidades de lisados de células 293TT no transfectadas, no se detectó la presencia de la proteína L1 de HPV-16 (Fig. 9), sugiriendo entonces que las células 293TT transfectadas con los tres diferentes plásmidos fueron capaces de generar pseudoviriones.



**Fig. 9. Los pseudoviriones generados en células 293TT son reconocidos por anticuerpos anti-L1 de HPV-16.** Lisados de células 293TT transfectadas con los genes L1 y L2 de HPV-16, y de fosfatasa alcalina (293TT L1/L2/SEAP), así como de células 293TT sin transfectar (293TT(-)), fueron analizados mediante ELISA para detectar la presencia de la proteína L1 de HPV-16 empleando sueros de niñas vacunadas con Gardasil. VLPs de la vacuna Gardasil fueron utilizadas como control positivo. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

Por otra parte, para conocer si los pseudoviriones presentaban una estructura conformacional, lisados de las células 293TT transfectadas con los genes L1 y L2 de HPV-16, y de fosfatasa alcalina (293TT L1/L2SEAP), fueron desnaturalizados por ebullición y analizados por ELISA empleando anticuerpos de niñas vacunadas con Gardasil. La detección de la proteína L1 de los pseudoviriones disminuyó fuertemente en los lisados tratados por ebullición, en relación con aquellos que no fueron tratados, o con VLPs de la vacuna Gardasil (Fig. 10), observándose que los lisados tratados mostraron valores de D.O muy similares a los encontrados en los lisados de las células 293TT sin transfectar. Lo cual nos permite sugerir que los pseudoviriones están constituidos de la proteína L1 y presentan una estructura similar a VLPs de la vacuna Gardasil.

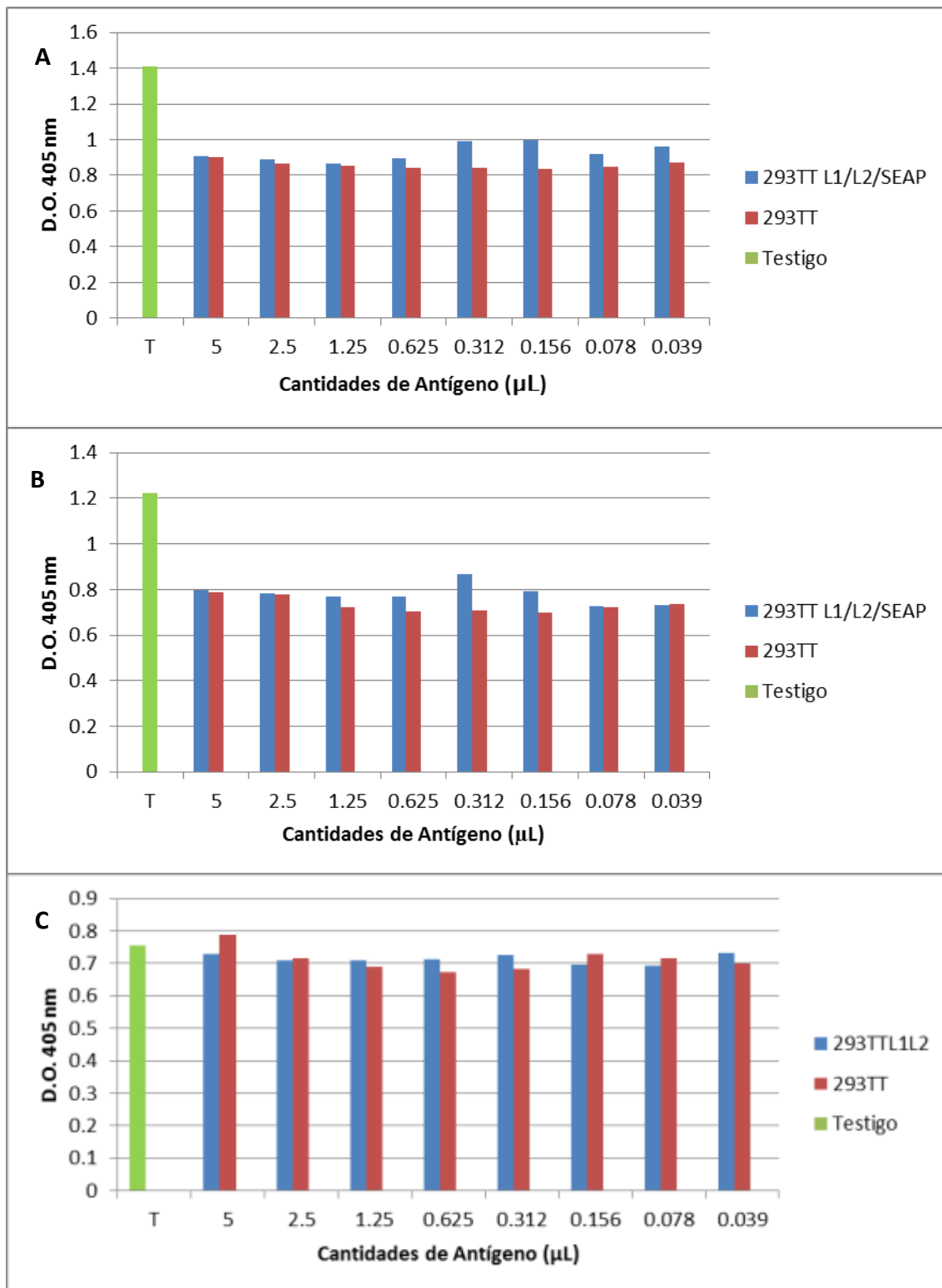


**Fig. 10. Los pseudoviriones generados en las células 293TT presentan una estructura conformacional.** Ensayos de ELISA fueron realizados con lisados de células 293TT transfectadas con los genes L1 y L2 de HPV-16, y de fosfatasa alcalina (293TT L1/L2SEAP), ya sea previamente tratados con ebullición (293TTL1L2/SEAP Desn), o sin tratar (293TTL1L2/SEAP); asimismo, lisados de células 293TT sin transfectar (293TT(-), o VLPs de la vacuna Gardasil, fueron utilizados como controles negativo y positivo respectivamente. La detección de las VLPs se realizó empleando sueros de niñas vacunadas con Gardasil. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

- **Calibración de la infectividad en células blanco 293TT con los pseudoviriones.**

Con la finalidad de estandarizar la cantidad de pseudoviriones necesarios para llevar a cabo la pseudoinfección óptima de células 293TT (células blanco), y de esta forma establecer las condiciones para evaluar la capacidad neutralizante de los anticuerpos contenidos en los sueros de ratones inmunizados con los péptidos de la proteína L2 de los diferentes HPVs, se realizaron ensayos con diferentes cantidades de los lisados crudos de las células 293TT que habían sido transfectadas con los plásmidos pL1h, pL2h y pSEAP, en placas de 96 pozos conteniendo diferentes cantidades de células 293TT (10,000-30,000 células por pozo). Después de 72 hrs de cultivo, se tomaron muestras de 100uL de sobrenadantes de cada pozo y se analizó la actividad de la fosfatasa alcalina segregada al adicionar el sustrato correspondiente. Como se puede observar en la Figura 11, únicamente en las placas donde se sembraron 10,000 y 20,000 células y con las cantidades de 0.312 y 0.156 microlitros de lisados se logró detectar una ligera actividad de la enzima. Por otro lado, tomando en consideración que la solución de lisado contiene detergente, y que

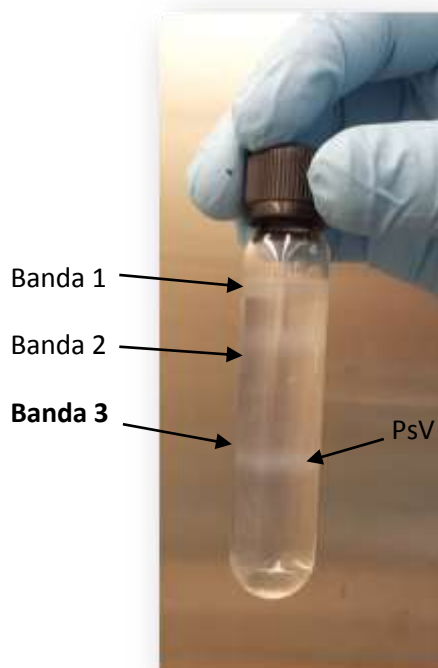
a mayores cantidades de 0.312uL de lisado empleado para analizar la actividad infectiva de los pseudoviriones producía daño a las células 293TT, se procedió a realizar una purificación de pseudoviriones empleando un gradiente de concentración a través de ultracentrifugación.



**Fig. 11. Lisados de células 293TT transfectadas con los plásmidos pL1h, pL2h y pSEAP producen actividad de fosfatasa alcalina.** Cantidades diferentes de lisados de células 293TT transfectadas fueron colocadas en placas de 96 pozos conteniendo diferentes cantidades de células 293TT: 10,000 (A), 20,000 (B), y 30,000 (C). Después de 72 hrs de incubación, se tomaron muestras de 100uL de los sobrenadantes y se analizó la actividad de la enzima al adicionarle sustrato para fosfatasa alcalina. Como testigo (T) se emplearon solo células 293TT. La actividad de fosfatasa alcalina también fue analizada en lisados de células 293TT sin transfectar (293TT).

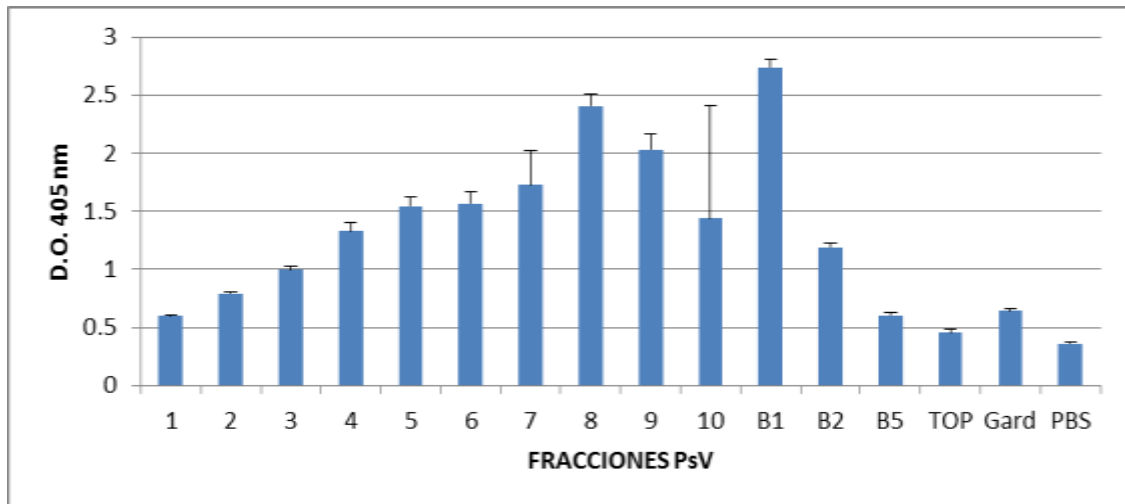
### Purificación de los pseudoviriones y análisis de su actividad infectiva.

Después de llevar a cabo la ultracentrifugación de los lisados de las células transfectadas, a través de un gradiente de densidad con iodixanol, se obtuvieron esencialmente tres bandas de material a lo largo del gradiente, además de un botón al final del tubo (Figura 12). Para conocer las fracciones con mayor enriquecimiento en el contenido de pseudoviriones, se colectaron alícuotas de 250µL desde la parte superior del tubo hasta el final del mismo (botón) y se realizó un ensayo de ELISA empleando sueros de niñas vacunadas con Gardasil. La mayor detección de pseudoviriones se observó en la banda No. 3 (Fig.12), que corresponde a las fracciones 8, 9, 10 y la fracción 1 del boton (B1) (Fig. 13).



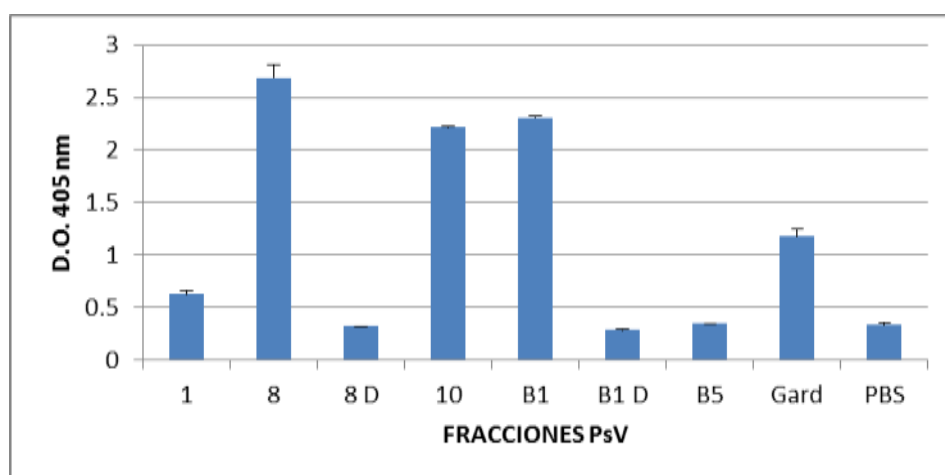
**Fig. 12.** Separación de lisados de células 293TT en gradiente de iodixanol. Lisados de células 293TTT transfectadas con los plásmidos pL1h, pL2h y pSEAP, fueron separadas mediante ultracentrifugación a 50,000 rpm en una gradiente de iodixanol al 27%, 33% y 39%. Se indican las bandas de material separadas y la de mayor enriquecimiento de pseudoviriones (PsV).





**Fig. 13. Detección de la proteína L1 de HPV-16 en fracciones de lisados de células 293TT transfectadas.** Células 293TT fueron transfectadas con los plásmidos pL1h, pL2h y pSEAP durante 72 hrs, posteriormente fueron lisadas y sometidas a un gradiente de centrifugación con iodixanol, se colectaron 10 fracciones de 250µL del gradiente y 3 de la parte residual (B1, B2 y B5), y una del fondo del tubo (TOP). VLPs de gardasil (gard) fueron utilizadas como control positivo. La presencia de la proteína L1 de HPV-16 fue determinada en ensayo de ELISA tomando una pequeña alícuota de cada fracción. D.O, densidad óptica. PsV, pseudoviriones. Los ensayos se hicieron por triplicado.

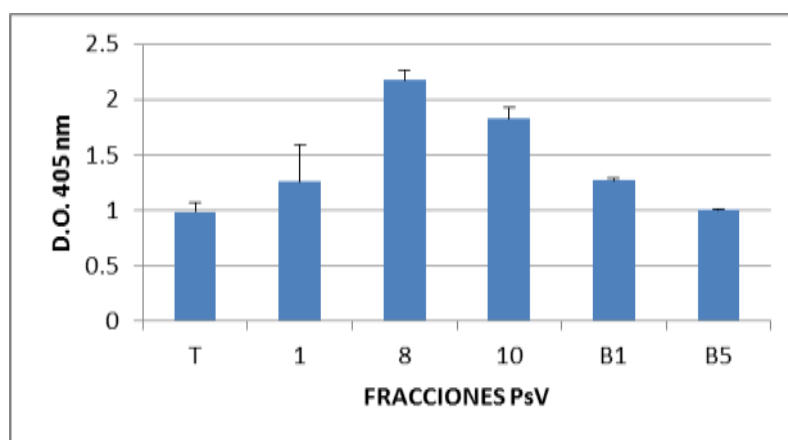
Para determinar si los pseudoviriones tienen una conformación de VLPs, se realizó un ensayo de ELISA en el cual muestras de las fracciones 8 y B1, que mostraron un mayor contenido de proteína L1 de HPV-16, fueron desnaturalizadas por ebullición, lo que resultó en una fuerte disminución en la detección de estas partículas con sueros de niñas vacunadas (Fig. 14).



**Fig. 14. Detección de proteína L1 conformacional en fracciones seleccionadas de pseudoviriones purificados.** Muestras de las fracciones de pseudoviriones purificados por gradiente de densidad fueron sometidas a desnaturalización (D) por ebullición, posteriormente se realizó un ensayo de ELISA con sueros de niñas vacunadas con gardasil para analizar su reconocimiento. D.O, densidad óptica. Las muestras se evaluaron por triplicado.

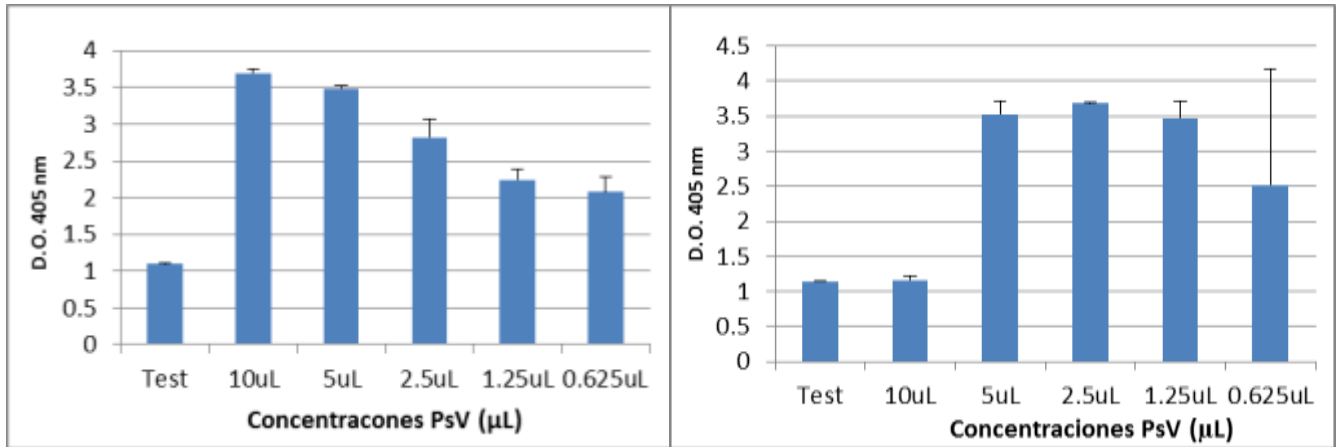
- **Calibración de la infectividad en células blanco 293TT con PsV purificados**

Por otro lado, la capacidad infectiva de las fracciones enriquecidas 1, 8, 10, B1 y B5 de los pseudoviriones fue evaluada en células 293TT. El resultado mostró que las fracciones 8-10 mostraron una mayor capacidad infectiva, al inducir mayores actividad de la fosfatasa alcalina secretada (SEAP) al sobrenadante (Fig. 15) mientras que las fracciones 1 y B1 mostraron actividad marginal. La fracción B5 fue negativa en actividad, ya que su actividad fue similar al de VLPs de la vacuna gardasil utilizadas como testigo negativo.



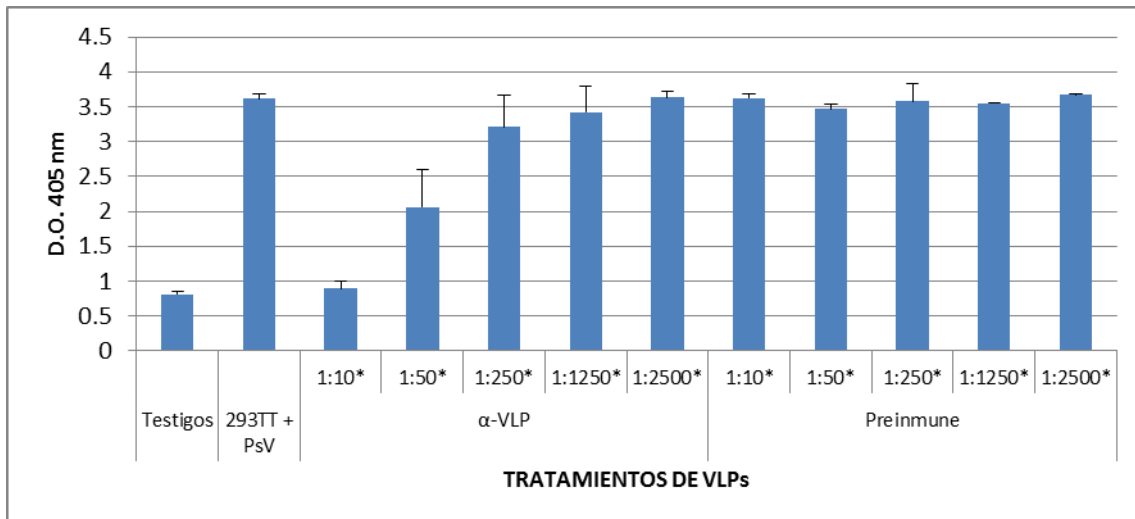
**Fig. 15. Actividad infectante de pseudoviriones purificados.** Fracciones enriquecidas de los pseudoviriones purificados fueron evaluados por su capacidad para infectar células 293TT, después de incubar 30,000 células/pozo en una placa de 24 pozos en presencia de las diferentes fracciones durante 72hrs, se analizó la actividad de fosfatasa alcalina secretada. D.O, densidad óptica. T, VLPs de gardasil se utilizaron como testigo negativo. Cada muestra se hizo por triplicado.

Para optimizar la cantidad de pseudoviriones purificados en los ensayos de neutralización de los anticuerpos anti-péptidos de L2, se hicieron infecciones de 10,000 células 293TT en placas de 96 y 24 pozos, probando distintas cantidades de pseudoviriones. De acuerdo con los resultados, se observó que en placas de 96 pozos se requiere menor cantidad (1.25uL) de pseudoviriones para poder infectar a las células blanco, en comparación con la cantidad requerida en las placas de 24 pozos (5uL), Fig. 16.



**Fig. 16. Optimización de la cantidad de pseudoviriones para infectar a células 293TT.**  $10^4$  células 293TT fueron cultivadas en placas de 96 (A) y 24 pozos (B) y diferentes cantidades de pseudoviriones (PsV) fueron adicionadas. Después de 72 hrs se analizó la actividad de fosfatasa alcalina secretada. VLPs de gardasil fueron utilizadas como control negativo (Test).

Tomando como base las condiciones establecidas para la generación de pseudoviriones y su optimización para la infección de células 293TT para los ensayos de neutralización de anticuerpos anti-L2, se procedió a analizar previamente la capacidad neutralizante de sueros obtenidos de niñas vacunadas con Gardasil, los cuales tienen anticuerpos específicos contra la proteína L1 de HPV-16. Considerando que los pseudoviriones obtenidos están constituidos en gran parte por la proteína L1 de HPV-16, PsV purificados fueron previamente incubados durante 20 minutos a temperatura ambiente con sueros diluidos (1:10, 1:50, 1:250, 1:1250, 1:2500) de niñas vacunadas con Gardasil y sueros pre-inmunes de las mismas niñas. Posteriormente se llevó a cabo la infección y después de 72 hrs se analizó la cantidad de fosfatasa alcalina secretada. Se observó que la infección es inhibida en las diluciones 1:10, 1:50 y 1:250 con el suero inmune, mientras que ninguna de las diluciones de los sueros pre-inmunes de niñas vacunadas mostró actividad neutralizante (Fig. 17).

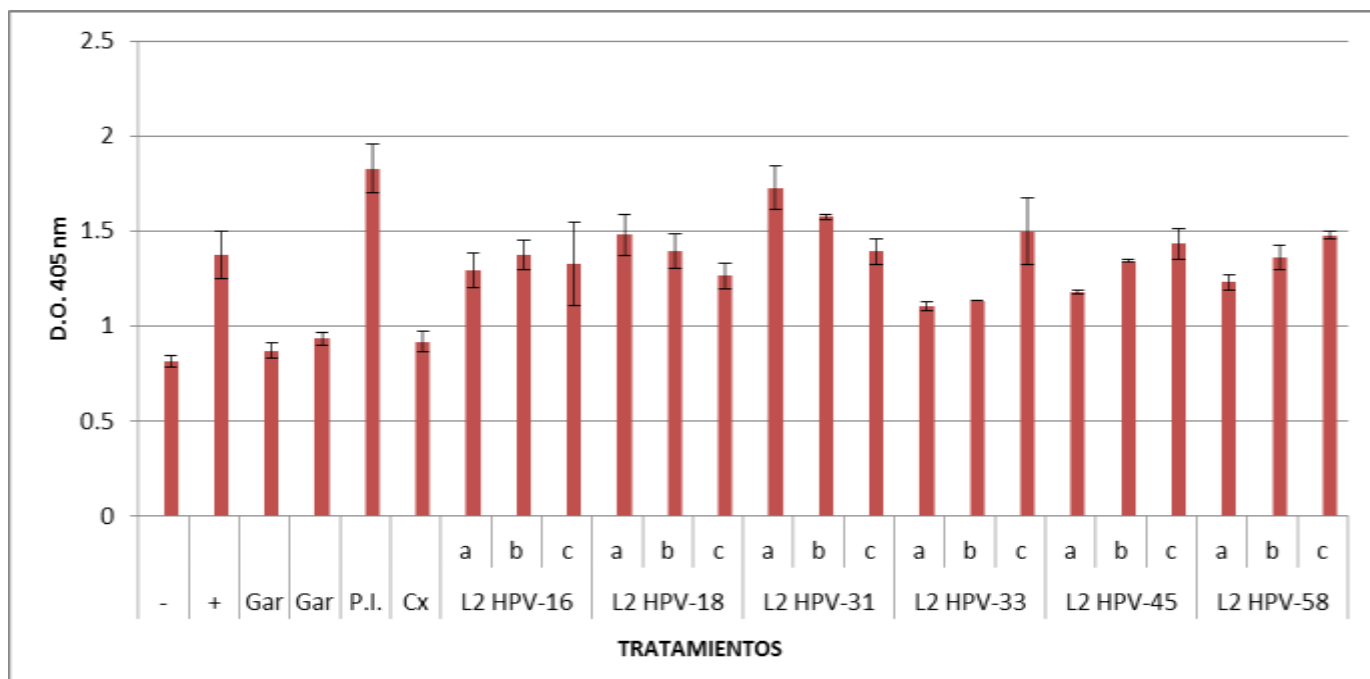


**Fig. 17. Sueros de niñas vacunadas con Gardasil neutralizan la infección de pseudoviriones hacia las células 293TT.** Pseudoviriones (PsV) purificados fueron incubados a temperatura ambiente durante 20min con diferentes diluciones (1:10- 1:2500) de sueros obtenidos de niñas vacunadas con gardasil ( $\alpha$ -VLP) o sueros pre-inmunes de las mismas niñas. Posteriormente fueron añadidos a placas de 96 pozos conteniendo  $10^4$  células 293TT. Después de 72 hrs de cultivo, se analizó la actividad de la fosfatasa alcalina secretada. Pseudoviriones en ausencia de sueros (293TT + PsV) fueron utilizados como control positivo de infección, mientras que VLPs de la vacuna gardasil como control negativo (Testigos). D.O, densidad óptica.

- **Ensayo de Neutralización con Sueros anti L2-HPV**

Con el objetivo de analizar la capacidad de los anticuerpos anti péptidos de L2 de tipos de HPV de alto riesgo inducidos en la cepa de ratas Wistar, para neutralizar pseudoviriones compuestos por proteínas L1 y L2 de HPV-16, se realizó un ensayo de neutralización *in vitro* en el cual los sueros anti péptidos L2 fueron diluidos seriadamente a 1:10, 1:50 y 1:250, incubados previamente con los PsV y adicionados a las células 293TT.

Al determinar la actividad de la fosfatasa alcalina secretada (SEAP) se encontró que los anticuerpos anti péptidos de L2-HPV 16, 18 y 31 no tienen un efecto inhibitorio para neutralizar la infección de los pseudoviriones, detectándose valores de la actividad de SEAP similares al control positivo de infección. Sin embargo, se puede observar que la actividad inhibitoria de los sueros correspondientes a los péptidos de L2-HPV 33, 45, y 58 es ligeramente neutralizante con un 10-20% de inhibición de la infección, principalmente cuando el suero se diluye 1:10 y 1:50 en el caso del suero anti L2 HPV-33, y 1:10 para el suero anti L2 HPV-45 y 58 (Fig. 18).



**Fig. 18. Actividad neutralizante de pseudoviriones de HPV-16 mediada por anticuerpos anti-péptido 17-36 de la proteína L2 de HPVs de alto riesgo.** Sueros obtenidos de ratas Wistar inmunizadas con péptidos (secuencia 17-36) de la proteína L2 de HPV-16, -18, -31, -33, -45 y -58, en diluciones 1:10 (a), 1:50 (b) y 1:250(c), fueron incubados con pseudoviriones de HPV-16 y posteriormente adicionados a células 293TT para analizar su capacidad de inhibir la infección por los pseudoviriones. En la gráfica se muestra la actividad de fosfatasa alcalina secretada. Como control positivo (+) se muestra la actividad de pseudoviriones en ausencia de anticuerpos; y como control negativo (-) a células 293TT sin pseudoviriones. Sueros de niñas vacunadas con gardasil (Gar), sueros de ratas inmunizadas con Cervarix (Cx), y preinmunes (PI) en presencia de pseudoviriones también fueron utilizados. Ensayo realizado por triplicado.

## 7. DISCUSIÓN

Las actuales vacunas contra el HPV, bajo licencia por la FDA, basadas en VLPs de L1 representan un gran avance para la salud pública y demuestran el potencial para prevenir el cáncer asociado al HPV mediante la vacunación profiláctica. Sin embargo, aún existen obstáculos para su implementación global como su costo y manufactura. Cabe destacar que aproximadamente el 85% de muertes por cáncer cervical ocurre en países en vías de desarrollo (Parkin, 2005; Roden, 2006).

La mayoría de estos países carecen de un cuadro citológico y programas de intervención, escenarios en los cuales las vacunas contra el HPV son necesarias. Además de seguridad y efectividad, las propiedades de las vacunas que pueden facilitar su implementación global incluyen el bajo costo, ampliar la protección contra todos los tipos de HPV oncogénicos, pocas dosis, y estabilidad a temperatura ambiente. Las actuales vacunas son costosas, y están dirigidas solo a un subgrupo de genotipos de HPV oncogénicos, requieren refrigeración y son necesarias tres dosis (Jagu, 2013; Roden, 2006).

La inmunidad de las vacunas a base de VLPs de L1 es restringida al tipo específico de HPV que componen a estas vacunas. Entonces, una de las dificultades asociadas a la manufactura de las actuales vacunas es la necesidad de incluir VLPs de L1 de múltiples genotipos de HPV para proteger contra los más de 15 tipos de HPV oncogénicos (Roden, 2006). Estudios recientes demuestran que la vacunación con la proteína menor L2 de la cápside, es capaz de proteger contra la infección por PVs en varios modelos animales. Se ha identificado que esta protección es mediada por anticuerpos neutralizantes que reconocen estructuras lineales del extremo aminoterminal de la proteína L2 y tienen una capacidad neutralizante para una amplia variedad de tipos de HPV, aunque los títulos producidos por vacunación con L2 son mucho más bajos que los producidos por vacunas de VLP-L1 (Roden, 2006; Tumban, 2013; Wang, 2013). Los estudios realizados en los últimos años muestran que los epítopes de la proteína L2 del HPV que generan una respuesta inmunológica significativa en ratones y conejos, generalmente están comprendidos entre los residuos de aminoácidos que van del ~11- 88 encontrados en ocho tipos de HPV mucosal (6, 16, 18, 31, 39, 51, 56, 73), y los residuos que están en los aminoácidos que van del 17-36, 32-51 y 65-81 (Jagu, 2013). En estudios recientes se ha demostrado que la vacunación con el péptido 17-36 de L2-HPV16 induce la generación de anticuerpos ampliamente neutralizantes en conejos (Gambhira R, et al. 2007).

Tomando en cuenta las consideraciones anteriores nos llevó a proponer que péptidos homólogos de la secuencia 17-36 de la proteína L2 pertenecientes a genotipos de HPV de alto riesgo, pueden ser utilizados como determinantes antigénicos de la proteína L2 para la generación de prototipos vacunales de amplio espectro. Para ello, en el presente estudio se utilizaron ratas hembra de la cepa Wistar como modelo de inmunización con los péptidos de la secuencia 17-36 de la proteína L2 de HPV-16, -18, -31, -33, -45 y -58, con la finalidad de analizar su inmunogenicidad para generar anticuerpos con capacidad neutralizante.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, la inmunización de ratas hembra de la cepa Wistar con los péptidos de L2, mostró altos títulos de anticuerpos específicos particularmente hacia los péptidos de L2 de HPV-16, -18, -33, -45 y -58, mostrando ser altamente inmunogénicos. Resultados similares se han descrito en varios estudios donde se ha demostrado previamente que la vacunación con el epítipo 17-36 de L2 HPV16 protege a ratones Balb/c contra el reto vaginal con pseudoviriones de HPV-16 y de HPV-45, los cuales son evolutivamente divergentes, ya que pertenecen a las especies 9 y 7 respectivamente del género alfa de los HPVs (Alphs, 2008; de Villiers EM, et al. 2004). Asimismo, se ha reportado que la inmunización de conejos con el péptido 17-36 de L2-HPV16 induce protección cruzada contra la infección cutánea del papilomavirus del conejo de cola de algodón (CRPV) y la infección con el papilomavirus de rata (ROPV). Por otra parte, también se ha reportado que la transferencia pasiva de suero de conejos inmunizados con péptidos de L2 HPV-16 a ratones, provee protección cuando se reta vaginalmente con pseudoviriones de HPV-16 (Jagu, 2013). Estos reportes nos sugieren que la inmunización con péptidos de L2 de HPV-16, particularmente de la secuencia 17-36, pueden proteger de manera cruzada contra la infección por diferentes tipos de PVs. En consecuencia, en nuestro estudio se procedió a analizar si anticuerpos generados por los péptidos de la proteína L2 de los diferentes tipos oncogénicos de HPV, además de ser inmunogénicos tenían actividad neutralizante contra pseudoviriones de HPV-16. Por tanto, se estableció un modelo de pseudoinfección empleando células 293TT como células blanco, con pseudoviriones compuestos por las proteínas L1 y L2 de HPV-16 conteniendo el gen de fosfatasa alcalina (SEAP) en su interior, previamente reportado por el grupo de Pastrana *et al*, 2004. La pseudoinfección fue evaluada como la cantidad de fosfatasa alcalina liberada por las células infectadas en el sobrenadante. En consecuencia, el bloqueo de la entrada de los pseudoviriones a las células blanco por los anticuerpos anti-péptidos de L2 de los diferentes tipos de HPV, nos permitiría conocer su capacidad neutralizante. Por otra parte, cabe mencionar que la generación de pseudoviriones estructurales fue demostrada a través del uso de anticuerpos anti L1 de HPV-16 contenidos en sueros de niñas vacunadas con Gardasil, los cuales se sabe reconocen de manera conformacional a las VLPs compuestas

por la proteína L1, y por el hecho de que su desnaturalización mediante ebullición, anuló el reconocimiento por dichos anticuerpos. Otro aspecto importante, fue el hecho que también se demostró que los pseudoviriones purificados a través de un gradiente de densidad mediante ultracentrifugación, fueron capaces de inducir la producción de fosfatasa alcalina al ponerlos en cultivo durante 72 hrs con las células 293TT.

De acuerdo con nuestros resultados, a pesar que los péptidos de la proteína L2 de HPV-16, -18, -33, -45 y -58 fueron inmunogénicos, se encontró que su actividad neutralizante hacia pseudoviriones de HPV-16 fue de solo un 10-20% con los sueros de ratas inmunizadas con L2 de HPV-33, 45 y 58. En este sentido, aún existe controversia de que regiones de L2 están expuestas en la superficie de la cápside de las partículas virales maduras, pero se ha estudiado que ciertas regiones del extremo aminoterminal de L2 pueden ser expuestas en la superficie durante los eventos tempranos de la infección viral (Buck and Trus, 2012). Existen estudios que revelan que la exposición de L2 en la cápside viral ocurre cuando se da un cambio conformacional por la unión de la cápside a receptores proteoglicanos heparan sulfato en la membrana basal donde la partícula es susceptible al clivaje de una enzima proconvertasa llamada furina (Day and Schiller, 2009). Se ha visto que tipos de PV disminuyen su infectividad en exposición con inhibidores de furina, además células deficientes en furina no son infectadas, y una mutación puntual del sitio de clivaje de furina también hace a los viriones partículas no infecciosas (Richards et al., 2006). En consecuencia, resulta importante el clivaje de L2 por furina para subsecuentes cambios conformacionales y se pueda llevar a cabo el proceso de infección.

Una posible explicación al fenómeno observado en nuestros resultados es que los pseudoviriones de HPV16 que se generaron, no exponen el extremo amino terminal de L2, debido probablemente a la ausencia de furina, y por tanto, no hay inducción de un cambio conformacional en las cápsides de los pseudoviriones para exponer los aminoácidos correspondientes de la proteína L2 y por tanto permitir la unión de los anticuerpos a la partícula viral para llevar a cabo su actividad neutralizante.

En un estudio publicado recientemente se propone que los actuales ensayos de neutralización *in vitro* proporcionan medidas insensibles de la inhibición de la infección por anticuerpos, subestimando el potencial protector de L2 y diseñan un ensayo de neutralización que se asemeja a los modelos de infección *in vivo*, en el cual adicionan una mezcla de pseudovirus, heparina y furina a los cultivos resultando 100 veces más sensible para la detección de anticuerpos neutralizantes que en el ensayo estándar (Day P. M. et al. 2012).

Teniendo esto en consideración, resulta relevante incluir métodos de este tipo en nuestros ensayos de neutralización que hagan posible una mejor simulación del proceso de infección *in vivo* en los ensayos *in vitro* y así saber si



efectivamente si los anticuerpos generados en los organismos presentan actividad neutralizante.

## **8. CONCLUSIONES**

De acuerdo a los resultados obtenidos en ensayo ELISA péptido-específico, la inmunización de ratas de la cepa Wistar con péptidos de L2 HPV (secuencias 17-36) indujo anticuerpos específicos en los organismos contra los péptidos L2 HPV 16, 18, 33, 45 y 58.

Con las condiciones adecuadas para la transfección se lograron generar pseudoviriones compuestos de proteínas L1 y L2 de HPV-16 que fueron detectados tanto en lisados en crudo, como en PsV purificados.

Las pseudoinfecciones realizadas muestran que los pseudoviriones generados son funcionalmente infectantes en células 293TT.

Los sueros correspondientes a organismos inmunizados con los péptidos de L2-HPV 16, 18 y 31 no tuvieron un efecto neutralizante en PsV de HPV-16. Mientras que los sueros correspondientes a los péptidos de L2-HPV 33, 45, y 58 mostraron una ligera actividad neutralizante con un 10-20% de inhibición de la infección.

Esto sugiere que a pesar de la inducción de anticuerpos específicos a péptidos de la proteína L2 de HPV, éstos no son capaces de unirse lo suficiente al pseudovirión para efectuar una mayor actividad neutralizante.

Asimismo, el fenómeno observado puede explicarse por la falta de exposición de aminoácidos de la proteína L2 en los pseudoviriones que pudieran ser regiones blanco para la unión de los anticuerpos específicos.

Por otro lado, la ausencia de un cambio conformacional en la partícula viral impide la exposición de aminoácidos de la proteína L2, proceso que ocurre durante el mecanismo de infección del HPV *in vivo*.

## 9. PERSPECTIVAS

La inmunización con péptidos homólogos de la secuencia 17-36 de la proteína L2 de HPVs de alto riesgo tienen la capacidad de inducir anticuerpos específicos, sin embargo, para conocer su actividad neutralizante, es necesario implementar *in vitro* o *in vivo*, un sistema que permita monitorear su potencial neutralizante, ya sea empleando furina para inducir cambio conformacional en el pseudovirion y permitir que los anticuerpos respectivos reconozcan al extremo aminoterminal de la proteína L2 como sucede *in vivo*; o a través de pseudoinfección con los pseudoviriones marcados con proteína verde fluorescente o fluorosceína.

Por otro lado sería interesante diseñar partículas tipo virales quiméricas conteniendo epítopes inmunogénicos de L2 para mejorar la respuesta inmune y de esta manera analizar la capacidad neutralizante de los anticuerpos inducidos empleando los sistemas antes mencionados. Todos estos resultados encaminados a la optimización de una nueva vacuna que suministre amplia protección contra la mayor parte de tipos de HPV oncogénicos.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Alphas, Hannah H., et al. 2008. Protection against heterologous human papillomavirus challenge by a synthetic lipopeptide vaccine containing a broadly cross-neutralizing epitope of L2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(15), 5850-5855.
- Abbas, A. K., Lichtman A., Pillai S. 2012. *Inmunología Celular y Molecular*. 7ª edición. Elsevier. Madrid pp. 6-27
- Abbas, A. K., 2008. *Inmunología Celular y Molecular*. 6 ed. Elsevier. Madrid pp. 3-19.
- Bernard, H. U., Burk, R. D., Chen, Z., van Doorslaer, K., zur Hausen, H., & de Villiers, E. M. 2010. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, 401(1), 70-79.
- Blanpain, C. 2013. Tracing the cellular origin of cancer. *Nature cell biology*, 15(2), 126-134.
- Bosch, F. X., & Muñoz, N. 2002. The viral etiology of cervical cancer. *Virus research*, 89(2), 183-190.
- Bosch, F. X., Lorincz, A., Munoz, N., Meijer, C. J. L. M., & Shah, K. V. 2002. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *Journal of clinical pathology*, 55(4), 244-265.
- Buck, C. B., & Trus, B. L. 2012. The papillomavirus virion: a machine built to hide molecular Achilles' heels. In *Viral Molecular Machines* (pp. 403-422). Springer US.
- Buck, C. B., Cheng, N., Thompson, C. D., Lowy, D. R., Steven, A. C., Schiller, J. T., & Trus, B. L. 2008. Arrangement of L2 within the papillomavirus capsid. *Journal of virology*, 82(11), 5190-5197.
- Carter, J. J., Koutsky, L. A., Wipf, G. C., Christensen, N. D., Lee, S. K., Kuypers, J., & Galloway, D. A. 1996. The natural history of human papillomavirus type 16 capsid antibodies among a cohort of university women. *Journal of Infectious Diseases*, 174(5), 927-936.

- Carter, J. J., Koutsky, L. A., Hughes, J. P., Lee, S. K., Kuypers, J., Kiviat, N., & Galloway, D. A. 2000. Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. *Journal of Infectious Diseases*, 181(6), 1911-1919.
- Christensen, N. D., Kreider, J. W., Kan, N. C., & Diangelo, S. L. 1991. The open reading frame L2 of cottontail rabbit papillomavirus contains antibody-inducing neutralizing epitopes. *Virology*, 181(2), 572-579.
- Da Silva, D. M., Pastrana, D. V., Schiller, J. T., & Kast, W. M. 2001. Effect of preexisting neutralizing antibodies on the anti-tumor immune response induced by chimeric human papillomavirus virus-like particle vaccines. *Virology*, 290(2), 350-360.
- Day, P. M., & Schiller, J. T. 2009. The role of furin in papillomavirus infection. *Future microbiology*, 4(10), 1255-1262.
- Day, P. M., Pang, Y. Y. S., Kines, R. C., Thompson, C. D., Lowy, D. R., & Schiller, J. T. 2012. A human papillomavirus (HPV) in vitro neutralization assay that recapitulates the in vitro process of infection provides a sensitive measure of HPV L2 infection-inhibiting antibodies. *Clinical and Vaccine Immunology*, 19(7), 1075-1082.
- De Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U., & zur Hausen, H. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324(1), 17-27.
- Don López C. A. 2013. Estudio inmunogénico de partículas tipo virales de la proteína L1 del Virus de Papiloma Humano tipo 16 (HPV-16) y de su quimera con epítopes vacunales de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 generadas en plantas de *Nicotiana benthamiana*. Tesis de maestría. FES Zaragoza. UNAM. p 68.
- Doorbar, J. 2005. The papillomavirus life cycle. *Journal of clinical virology*, 32, 7-15.
- Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I. G., Stoler, M., Broker, T. R., & Stanley, M. A. 2012. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*, 30, F55-F70.
- Gambhira, R., Karanam, B., Jagu, S., Roberts, J. N., Buck, C. B., Bossis, I., & Roden, R. B. 2007. A protective and broadly cross-neutralizing

- epitope of human papillomavirus L2. *Journal of virology*, 81(24), 13927-13931.
- Fleury, M. J. J., Touze, A., Alvarez, E., Carpentier, G., Clavel, C., Vautherot, J. F., & Coursaget, P. 2006. Identification of type-specific and cross-reactive neutralizing conformational epitopes on the major capsid protein of human papillomavirus type 31. *Archives of virology*, 151(8), 1511-1523.
  - Giroglou, T., Florin, L., Schäfer, F., Streeck, R. E., & Sapp, M. 2001. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *Journal of virology*, 75(3), 1565-1570.
  - Hagensee, M. E., Olson, N. H., Baker, T. S., & Galloway, D. A. 1994. Three-dimensional structure of vaccinia virus-produced human papillomavirus type 1 capsids. *Journal of virology*, 68(7), 4503-4505.
  - HarperDM, F. E., & Wheeler, C. 2006. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. *Lancet*, 367, 1247.
  - INEGI. 2013. Estadísticas vitales, base de datos. Recuperado el 9 de enero de 2014 de: [www.inegi.org.mx](http://www.inegi.org.mx).
  - Jagu, S., Kwak, K., Karanam, B., Huh, W. K., Damocharan, V., Chivukula, S. V., & Roden, R. B. 2013. Optimization of multimeric human papillomavirus L2 vaccines. *PloS one*, 8(1), e55538.
  - Jagu, S., Karanam, B., Gambhira, R., Chivukula, S. V., Chaganti, R. J., Lowy, D. R., & Roden, R. B. 2009. Concatenated multitype L2 fusion proteins as candidate prophylactic pan-human papillomavirus vaccines. *Journal of the National Cancer Institute*, 101(11), 782-792.
  - Jagu, S., Kwak, K., Schiller, J. T., Lowy, D. R., Kleanthous, H., Kalnin, K., & Roden, R. B. 2013. Phylogenetic considerations in designing a broadly protective multimeric L2 vaccine. *Journal of virology*, 87(11), 6127-6136.
  - Jenkins, D. 2008. A review of cross-protection against oncogenic HPV by an HPV-16/18 AS04-adjuvanted cervical cancer vaccine: importance of virological and clinical endpoints and implications for mass vaccination in cervical cancer prevention. *Gynecologic oncology*, 110(3), S18-S25.

- Johnson, K. M., Kines, R. C., Roberts, J. N., Lowy, D. R., Schiller, J. T., & Day, P. M. 2009. Role of heparan sulfate in attachment to and infection of the murine female genital tract by human papillomavirus. *Journal of virology*, 83(5), 2067-2074.
- Kawana, K., Adachi, K., Kojima, S., Kozuma, S., & Fujii, T. 2012. Therapeutic human papillomavirus (HPV) vaccines: a novel approach. *Open Virol J*, 6(Sup 2), 264-269.
- Kiatpongsan, S., Campos, N. G., & Kim, J. J. 2012. Potential benefits of second-generation human papillomavirus vaccines. *PloS one*, 7(11), e48426.
- Kirnbauer, R., Booy, F., Cheng, N., Lowy, D. R., & Schiller, J. T. 1992. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(24), 12180-12184.
- Kirnbauer, R., Taub, J., Greenstone, H., Roden, R., Dürst, M., Gissmann, L., & Schiller, J. T. 1993. Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *Journal of virology*, 67(12), 6929-6936.
- Liu, W. J., Gissmann, L., Sun, X. Y., Kanjanahaluethai, A., Müller, M., Doorbar, J., & Zhou, J. 1997. Sequence close to the N-terminus of L2 protein is displayed on the surface of bovine papillomavirus type 1 virions. *Virology*, 227(2), 474-483.
- Malik, H., Khan, F. H., & Ahsan, H. 2014. Human papillomavirus: current status and issues of vaccination. *Archives of virology*, 159(2), 199-205.
- Moscicki, A. B. 2008. HPV vaccines: today and in the future. *Journal of adolescent health*, 43(4), S26-S40.
- Murphy, K., & Travers, P. 2009. Walport Mark. Inmunobiología de Janeway. Séptima edición. Mc Graw Hill. pp. 111-459.
- Muñoz, N. 2000. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *Journal of clinical virology*, 19(1), 1-5.
- Nicholls, P. K., Klaunberg, B. A., Moore, R. A., Santos, E. B., Parry, N. R., Gough, G. W., & Stanley, M. A. 1999. Naturally occurring,

nonregressing canine oral papillomavirus infection: host immunity, virus characterization, and experimental infection. *Virology*, 265(2), 365-374.

- Organización Mundial de la Salud [OMS]. 2013. Cáncer. Nota descriptiva N° 297. Recuperado el 5 de diciembre de 2013, de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- Organización Panamericana de la Salud [OPS]. 2013. El cáncer en las Américas. Recuperado el 9 de enero de 2014, de: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=292%3Acancer&catid=1866%3Ahsd0201a-cancer-home&Itemid=3855&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=292%3Acancer&catid=1866%3Ahsd0201a-cancer-home&Itemid=3855&lang=es)
- Osorio A. 2011. Análisis de la generación de anticuerpos neutralizantes específicos en ratones inmunizados con partículas quiméricas semejantes al virus de papiloma humano (VLPq) tipo 16 obtenidas en plantas de tabaco. Tesis de Licenciatura. FES Zaragoza. UNAM. p17.
- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., & Pisani, P. 2005. Global cancer statistics, 2002. *CA: a cancer journal for clinicians*, 55(2), 74-108.
- Pastrana, D. V., Gambhira, R., Buck, C. B., Pang, Y. Y. S., Thompson, C. D., Culp, T. D., & Roden, R. B. 2005. Cross-neutralization of cutaneous and mucosal Papillomavirus types with anti-sera to the amino terminus of L2. *Virology*, 337(2), 365-372.
- Peralta-Rodríguez, R., Romero-Morelos, P., Villegas-Ruíz, V., Mendoza-Rodríguez, M., Taniguchi-Ponciano, K., González-Yebra, B., & Salcedo, M. 2012. Prevalence of human papillomavirus in the cervical epithelium of Mexican women: meta-analysis. *Infect Agent Cancer*, 7(1), 34.
- Pineo, C. B., Hitzeroth, I. I., & Rybicki, E. P. 2013. Immunogenic assessment of plant-produced human papillomavirus type 16 L1/L2 chimaeras. *Plant biotechnology journal*, 11(8), 964-975.
- Richards, R. M., Lowy, D. R., Schiller, J. T., & Day, P. M. 2006. Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(5), 1522-1527.

- Roden, R. B., Yutzy, W. H., Fallon, R., Inglis, S., Lowy, D. R., & Schiller, J. T. 2000. Minor capsid protein of human genital papillomaviruses contains subdominant, cross-neutralizing epitopes. *Virology*, 270(2), 254-257.
- Roden, R., & Wu, T. C. 2006. How will HPV vaccines affect cervical cancer?. *Nature Reviews Cancer*, 6(10), 753-763.
- Roden, R. B., Greenstone, H. L., Kirnbauer, R., Booy, F. P., Jessie, J., Lowy, D. R., & Schiller, J. T. 1996. In vitro generation and type-specific neutralization of a human papillomavirus type 16 virion pseudotype. *Journal of virology*, 70(9), 5875-5883.
- Roitt, I.M., Brostoff, J., y Male, D. 2004. Immunology. Ed. Panamericana. pp. 13-41.
- Roitt, I. M., et al. 2008. Inmunología. Fundamentos. Ed. Panamericana. pp. 20-40.
- Rybicki, E. P. 2009. Plant-produced vaccines: promise and reality. *Drug Discovery Today*, 14(1), 16-24.
- Schiller, J. T., & Lowy, D. R. 2012. Understanding and learning from the success of prophylactic human papillomavirus vaccines. *Nature Reviews Microbiology*, 10(10), 681-692.
- Schiller, J. T., & Lowy, D. R. 2000. Papillomavirus-like particle vaccines. *JNCI Monographs*, 2000(28), 50-54.
- Sehr, P., Rubio, I., Seitz, H., Putzker, K., Ribeiro-Müller, L., Pawlita, M., & Müller, M. 2013. High-throughput pseudovirion-based neutralization assay for analysis of natural and vaccine-induced antibodies against human papillomaviruses. *PloS one*, 8(10), e75677.
- Slupetzky, K., Gambhira, R., Culp, T. D., Shafti-Keramat, S., Schellenbacher, C., Christensen, N. D., & Kirnbauer, R. 2007. A papillomavirus-like particle (VLP) vaccine displaying HPV16 L2 epitopes induces cross-neutralizing antibodies to HPV11. *Vaccine*, 25(11), 2001-2010.
- Stanley, M. A. 2012. Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. *Clinical microbiology reviews*, 25(2), 215-222.



- Tommasino, M. 2014. The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 26, pp. 13-21). Academic Press.
- Torres-Poveda, K., Bahena-Román, M., Madrid-González, C., Burguete-García, A. I., Bermúdez-Morales, V. H., Peralta-Zaragoza, O., & Madrid-Marina, V. 2014. Role of IL-10 and TGF- $\beta$ 1 in local immunosuppression in HPV-associated cervical neoplasia. *World journal of clinical oncology*, 5(4), 753.
- Tumban, E., Peabody, J., Peabody, D. S., & Chackerian, B. 2011. A pan-HPV vaccine based on bacteriophage PP7 VLPs displaying broadly cross-neutralizing epitopes from the HPV minor capsid protein, L2. *PLoS one*, 6(8), e23310.
- Tumban, E., Peabody, J., Peabody, D. S., & Chackerian, B. 2013. A universal virus-like particle-based vaccine for human papillomavirus: longevity of protection and role of endogenous and exogenous adjuvants. *Vaccine*, 31(41), 4647-4654.
- Walboomers, J. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., & Munoz, N. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of pathology*, 189(1), 12-19.
- Wang, J. W., & Roden, R. B. 2013. L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology*, 445(1), 175-186.
- Zhang, T., Xu, Y., Qiao, L., Wang, Y., Wu, X., Fan, D., & Xu, X. 2010. Trivalent Human Papillomavirus (HPV) VLP vaccine covering HPV type 58 can elicit high level of humoral immunity but also induce immune interference among component types. *Vaccine*, 28(19), 3479-3487.
- Zaldívar Lelo de Larrea, G., Martín Molina, F., Sosa Ferreyra, C. F., Ávila Morales, J., Lloret Rivas, M., Román Lara, M., & Vega Malagón, G. 2012. Cáncer cérvicouterino y virus del papiloma humano. *Revista chilena de obstetricia y ginecología*, 77(4), 315-321.
- zur Hausen, H. 2009. Papillomaviruses in the causation of human cancers—a brief historical account. *Virology*, 384(2), 260-265.
- zur Hausen, H. 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Reviews Cancer*, 2(5), 342-350.