

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

"DETECCION DE ANTICUERPOS ESPECIFICOS CONTRA EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO TIPO-16 (VPH-16) MEDIANTE PHAGE DISPLAY"

T E S I S

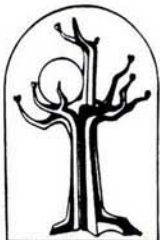
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

Q. C. HUGO ANIBAL SANTAMARIA SUAREZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. KAREN MANOUTCHARIAN AIRAPETIAN



BIOMÉDICAS

MEXICO, D. F.

ABRIL 2004



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

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

NOMBRE: Hugo Anibal

Santamaría Sudrez

FECHA: 20/04/04

FIRMA: 

La presente tesis doctoral se realizó en el
Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del
Instituto de Investigaciones Biomédicas de la
Universidad Nacional Autónoma de México
bajo la dirección del
Dr. Karen Manoutcharian Airapetian

A mi madre

Por su infinito cariño, dedicación y apoyo incondicional,

por ser mi mejor ejemplo de fortaleza,

y porque sin ella no lo hubiera logrado...

Eternamente gracias!

A mis familiares, Nina, Laura, Carmen, Jorge,

Jesús, Remi, Andreus, Carlos y Yarim,

por preocuparse por mi y ayudarme siempre.

A mi mejor amiga Cora, por su auténtica e

incondicional amistad, por sus ánimos y apoyo

en todo momento a pesar de la distancia.

A mis amigos: Xóchitl, Omar, Rocío, Carlos y Julio

por todos los buenos momentos que me han hecho pasar

y porque sé que siempre contaré con su amistad

A Eduardo por su compañía y cariño.

Agradecimientos:

Al Dr. Karen Manoutcharian por darme la oportunidad de trabajar con él, por todas sus enseñanzas, críticas, paciencia y por creer en mí.

A la Dra. Goar Gevorgian por toda su ayuda, interés y apoyo profesional.

Al Dr. Rafael Saavedra, por estar en mi comité tutorial, por sus consejos, orientación y ayuda.

A la Dra. Leticia Rocha por escucharme siempre, por su inmensa ayuda y por ser ejemplo de profesionalismo y calidad humana.

Al Dr. Víctor Raúl Gómez Román por impulsarme y compartir sus conocimientos, tiempo y entusiasmo conmigo.

Al Dr. César Raúl González Bonilla, por haber aceptado ser parte de mi comité tutorial, por todas sus opiniones, sugerencias y por interesarse en mi trabajo.

A los técnicos de laboratorio, Gonzalo Acero y Natasha Ivanovna, por su invaluable ayuda técnica, por todo lo que he aprendido de ustedes y por honrarme con su amistad.

A mis sinodales: Dr. Edmundo Lamoyi, Dr. Ruy Pérez Monfort, Dr. Vianney Ortiz, Dr. Alejandro García Carrancá y Dr. Mauricio Salcedo por sus atinados comentarios y sugerencias durante la revisión de mi tesis.

A mis compañeros del laboratorio Erik, Carmen y Yetzi por su cooperación, compañía y amistad.

A mis compañeras de Biomédicas: Marisela, Mónica y Erika por contar siempre con ustedes y por su amistad sincera.

A la Sra. Chuy por su cariño y por hacerme siempre sonreír.

A las secretarías de Biomédicas, Blanca y Verónica por su excelencia en el trabajo, ayuda diaria y amabilidad.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas y la gran Universidad Nacional Autónoma de México por haberme permitido entrar al fascinante e impredecible mundo de la ciencia y alcanzar esta meta.

RESUMEN

Esta tesis se realizó con la finalidad de encontrar y caracterizar biomoléculas que sirvan para el desarrollo de un nuevo método de inmunodiagnóstico para la detección de la infección causada por el Virus del Papiloma Humano tipo 16 (VPH-16). Este virus constituye el principal factor de riesgo para el desarrollo del Cáncer Cervicouterino (CaCu), una de las principales causas de muerte entre las mujeres mexicanas.

Para lograr este objetivo se recurrió a la biotecnología del phage display: el despliegue de péptidos o proteínas expresados en la superficie de fagos filamentosos. Con uso del phage display se pudieron identificar péptidos asociados al VPH reconocidos por anticuerpos específicos presentes en el suero de pacientes infectadas con el VPH-16. Mediante el uso de 3 bibliotecas comerciales de péptidos: una de 7 y otra de 12 aminoácidos y una más de 7 aminoácidos flanqueados por cisteínas, se pudieron identificar moléculas que corresponden o mimetizan a epítopos naturales del VPH. La mayoría de las clonas de fagos obtenidas no presentaron homología con alguna proteína del VPH-16 pero existe la posibilidad de que representen epítopos conformacionales o mimótopos del virus. También, se aislaron clonas que presentaron homología con la proteína L1 del VPH. Esta homología se encuentra en una región que forma un dominio conformacional (asa) expuesto sobre la superficie de L1 y que es potencialmente inmunodominante.

Por otro lado, se decidió producir 2 tipos de fagos recombinantes: uno que expresa la proteína L1 completa del VPH-16 y otro que expresa un dominio (asa), considerado inmunodominante, de L1 de VPH-16 y sus equivalentes en otros tres tipos de VPH (11, 18 y 31), todos ellos en la superficie de fagos filamentosos. Al probar estos fagos recombinantes en ELISA, demostraron que son reconocidos específicamente por un suero hiperinmune anti-L1 de conejo.

Se puede sugerir que la combinación de estas biomoléculas obtenidas por phage display, podría tener el potencial para la creación de un ensayo de diagnóstico serológico basado en ELISA, para la detección oportuna de la infección por VPH-16 en la población mexicana .

SUMMARY

The present work was realized to find and characterize biomolecules that can be used in a new immunodiagnostic method for the Human Papiloma Virus tipe 16 (HPV-16) infection. This virus has shown to be the principal risk factor in Cervical Cancer (CeCa) development, an important cause of death among mexican women.

In order to reach this objeotive, phage display technology (the expression of peptides or proteins on filamentous phage surface) was used. HPV-related peptides recognized by specific antibodies present in sera of HPV-16 infected women were identified using three diferent tipe of phage display peptide libraries: 7 and 12 amino acids and 7 amino acids with two flanking cysteins. The biopanning experiments with these peptide libraries were used to obtain and identify HPV epitopes or mimotopes. The majority of identified phage clones had no homology with HPV-16 proteins but they could represent some conformational epitopes or mimotopes. However, several phage clones that have homology with L1 protein of HPV-16 was isolated. The r region of this homology is located in an exposed conformational domain (loop), which is considered immunodominant, on L1 protein surface.

On the other hand, recombinant phages that express L1 protein of HPV-16 and an immunodominant loop of L1 protein of HPV-16 and its equivalent in other 3 types of HPV (11, 18 and 31) were generated. When these recombinant phages were tested in ELISA, they reacted specifically with anti-L1 hiperimmune rabbit serum.

The results of this study, suggest that the combination of these biomolecules obtained by phage display could be useful to produce a multicomponent immunodiagnostic ELISA-based assay for detection of HPV infection in mexican population.

ABREVIATURAS:

ABTS	2, 2' -Azino-di [3-etilbenziazolin sulfonato (6)] diamonio
BSA	Albúmina bovina sérica
CaCu	Cáncer cérvicouterino
C-terminal	Extremo carboxi-terminal
DNA	Ácido desoxirribonucléico
cDNA	DNA complementario
EGF	Factor de crecimiento epidermal
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima
HLA	Antígeno leucocitario de histocompatibilidad
HRP	Peroxidasa de rábano
IgG	Inmunoglobulina tipo G
IgA	Inmunoglobulina tipo A
sIgA	IgA secretoria
LCR	Región de control larga
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
N-terminal	Extremo amino-terminal
pb	Pares de bases (nucléidos)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
scFv	Fragmento variable de cadena sencilla
ufp	Unidades formadoras de placas
VLP	Partículas que semejan virus
VPB	Virus del papiloma bovino
VPH	Virus del papiloma humano

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Cáncer Cervicouterino (CaCu)	6
1.2 Virus del Papiloma Humano vs. Cáncer Cervicouterino	7
1.3 Biología del Virus del Papiloma Humano	9
1.3.1 Organización genómica	10
1.3.2 Ciclo de vida y patogénesis del VPH.....	17
1.3.3 Tipos virales	22
1.4 Respuesta inmunológica y otros factores de riesgo para el desarrollo de CaCu..	23
1.5 Métodos de diagnóstico para VPH-CaCu	26
1.6 Phage display	29
1.6.1 Tipos de bibliotecas	34
2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO	38
3. HIPÓTESIS	39
4. OBJETIVOS	
4.1 Objetivos particulares	39
5. MATERIALES Y MÉTODOS	
5.1 Material biológico	40
5.1.1 Material humano	40
5.1.2 Sueros de ratón anti-L1 de VPH-16	41
5.1.3 Sueros de conejo anti-L1 de VPH-16	41
5.1.4 Bacterias	41
5.1.5 Células de insecto	41
5.1.6 Células químicamente competentes	41
5.2 Identificación de anticuerpos en sueros de pacientes con infección por VPH-16 usando tres bibliotecas péptidos	42
5.2.1 Bioselección	42
5.2.2 Titulación de los fagos	43
5.2.3 Amplificación de los fagos	43
5.2.4 Purificación del DNA de cadena sencilla de los fagos	44
5.2.5 Secuenciación del DNA de cadena sencilla de los fagos	45
5.3 Análisis de Similitud de Secuencias	46
5.4 ELISA	46
5.5 Construcción de fagos híbridos con L1 VPH-16	48
5.5.1 Recuperación del genoma del VPH-16	48
5.5.2 Recuperación de la integración del gen L1	49
5.5.3 Amplificación de L1 mediante PCR	49
5.5.4 Preparación del producto de PCR	51
5.5.5 Preparación del vector pFACIB8	51
5.5.6 Clonación de L1 en pFACIB8 (ligación)	53
5.5.7 Transformación de células competentes	53
5.5.8 Selección y purificación del plásmido recombinante	54
5.5.9 Amplificación y rescate con fago helper	54
5.5.10 Titulación de fagos híbridos	55
5.5.11 Confirmación (Secuenciación y Western Blot)	56

5.6	Construcción de fagos híbridos con un <i>loop</i> inmunodominante del gen L1 de distintos tipos de VPH	58
5.6.1	Clonación de los <i>loops</i> del VPH 16,11, 18 y 31 en el pFACIB8	60
5.7	Obtención de Virus Like-Particles (VLPs)	62
5.8	ELISAs con fagos híbridos	64
6.	RESULTADOS	
6.1	Enriquecimiento de fagos mediante bioselección	65
6.2	Homología de las clonas con L1	66
6.3	Reconocimiento de fagos por sueros de pacientes	69
6.4	Bioselección con sueros de ratón anti-L1	71
6.5	Obtención de fagos híbridos que expresan L1	73
6.6	Obtención de fagos híbridos que expresan inmunodominios de L1.....	78
6.7	Reconocimiento de fagos híbridos en ELISA	80
7.	DISCUSIÓN	82
8.	CONCLUSIONES	89
9.	ANEXO	90
10.	REFERENCIAS	93
11.	ARTÍCULO DE PUBLICACIÓN	107

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer cervicouterino

Cáncer es el término común para designar a los tumores o neoplasias de naturaleza maligna. El cáncer comprende aproximadamente 150 enfermedades que exhiben dos características en común: 1) un crecimiento celular y 2) la capacidad para invadir y dañar tejidos normales ya sea localmente o a distancia (metástasis). Noventa por ciento de los cánceres humanos se originan en el epitelio (las capas de células que cubren la superficie del cuerpo y revestimientos de órganos internos y varias glándulas) y estos tipos de cáncer son llamados carcinomas, como los que se producen en el cuello de la matriz o cérvix uterino [1].

El origen histopatológico del Cáncer Cervicouterino (CaCu) es principalmente de tipo epidermoide, es decir, aquél que se origina en el epitelio plano estratificado que recubre el ectocérvix, y parte de la llamada zona de transición (parte del epitelio que se encuentra entre el ecto y endocérvix). El CaCu de tipo epidermoide se presenta en 85 a 90% de los casos mientras que el resto corresponde al de tipo adenoide, es decir, aquéllos denominados adenocarcinomas y que se originan en el epitelio cilíndrico de naturaleza glandular que tapiza el canal endocervical. Estos dos tipos histológicos se reconocen como los principales en la patología del CaCu, aunque también existen otros como el de células pequeñas, pero son muy raros.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el CaCu es el segundo tipo de neoplasia más frecuente en las mujeres a nivel mundial, es decir, es la 2ª causa de morbilidad y es además la 2ª causa de mortalidad por cáncer en la mujer. Los carcinomas del tracto anogenital, particularmente el CaCu, constituyen casi el 15% de todos los cánceres en las mujeres. De entre todas las neoplasias que se reportan a nivel mundial ocupa el 5º lugar en frecuencia (en general incluyendo tanto hombres como mujeres) [2].

Se sabe que de los 500 mil casos de CaCu que surgen cada año, el 80% corresponden a los países en vías de desarrollo debido a varios factores pero principalmente a una pobre cultura de prevención y deficiencia en el diagnóstico oportuno.

En el caso particular de México, al igual que en la mayoría de los países en vías de desarrollo, la situación del CaCu es aún más alarmante ya que constituye la principal causa de muerte por neoplasias en las mujeres. Además se ha mantenido en los últimos 20 años como la 2ª neoplasia en orden de frecuencia entre la población en general y la primera entre la población femenina, manteniéndose la tendencia de mortalidad estable en un rango de 6.4 a 9.3 defunciones por 100 mil mujeres. En nuestro país, entre los años de 1993 y 1994 se diagnosticaron un total de 16,442 casos de cáncer cervical invasivo y 9,135 carcinomas *in situ* lo que representó el 23 % de todas las neoplasias malignas en el país. Actualmente ocurren aproximadamente 4,600 muertes cada año debidas al cáncer cervical invasivo con una mortalidad estimada de 5.2 por 100 000 casos. Estadísticas recientes publicadas por la Secretaría de Salud demuestran que 16 mujeres mueren diariamente por CaCu en el país [3,4].

Por otro lado se ha visto que la frecuencia de la enfermedad se relaciona con la edad. En general esta patología en las mujeres mexicanas es poco frecuente antes de los 25 años de edad y muy frecuente en poblaciones de 35 a 59 años. El 53.5% de las mujeres con cáncer de cérvix se encuentran dentro de este rango siendo la edad promedio de 48 años. Cabe señalar que sólo el 26.7% de las mujeres con CaCu está en una etapa favorable para tener un tratamiento curativo en el momento del diagnóstico considerando que el CaCu es un cáncer 100% curable si se diagnostica a tiempo [5].

1.2 Cáncer Cervicouterino y el Virus del Papiloma Humano

El desarrollo de un cáncer ocurre cuando el DNA presente en un gen está alterado de tal manera que éste no puede instruir a la célula para producir una proteína determinada en una forma normal. La alteración del DNA puede ocurrir cuando se expone a radiaciones, cierto tipo de drogas o agentes químicos, o cuando ocurren algunas señales internas todavía sin

explicación. Estos factores pueden causar que el DNA del gen se rompa y se recombine incorrectamente o mute. Una vez que ocurren estos cambios, ciertos genes podrían transformarse en oncogenes (inductores de cáncer), mientras que otros genes llamados supresores de tumores o anti-oncogenes podrían inactivarse. Sin embargo, también existen casos en que se produce una proteína aberrante como consecuencia de la infección por un virus oncogénico, como lo es el Virus del Papiloma Humano (VPH) el cual introduce uno o varios oncogenes dentro de la célula. Una vez que han ocurrido todas estas desviaciones en la producción de las proteínas, la célula altera su tamaño, forma, características de superficie, replicación y conducta normales. De esta manera se convierte en una célula cancerosa [1,6,7].

El CaCu ha sido catalogado como una enfermedad de transmisión sexual ya que se considera que este tipo de cáncer es causado principalmente por infecciones de diversos tipos de VPH. Lo anterior se basa en el hecho de que el DNA de estos VPHs se ha localizado en casi el 99% de los casos confirmados como cáncer de cuello uterino [8, 9].

Entre 1974 y 1976, los investigadores comenzaron a postular y analizar un posible papel del VPH en el cáncer cervical [10, 11]. En 1976, se publicó un reporte que destaca la aparición de *coilocitos* (células epiteliales que después de la tinción y al observarse al microscopio presentan grandes zonas claras perinucleares o vacuolas) en los raspados cervicales lo cual indicaba la presencia de una infección por VPH. En ese estudio se sugirió que podría ser posible diferenciar entre lesiones benignas o verrugas que no progresan a cáncer cervical y –como se sospechaba inicialmente- las lesiones precursoras no virales que no progresan a cáncer cervical [12]. Esta idea fue apoyada gracias a la identificación de partículas del VPH en leves lesiones displásicas del cérvix. La displasia es un estado temprano en la progresión del cáncer el cual se caracteriza por un incremento en la proliferación celular y desarreglo en la arquitectura del tejido [13].

La demostración de heterogeneidad dentro de la familia del VPH [14] y el subsecuente aislamiento de tipos específicos a partir de verrugas genitales y papilomas laríngeos [15] (tumores benignos de la laringe) así como la aplicación de procedimientos de hibridación

de ácidos nucleicos (DNA y RNA) bajo condiciones de astringencia reducida (para analizar a los relacionados pero no idénticos tipos de VPH) [16], permitieron una nueva visión de la posible participación de las infecciones por VPH en los cánceres anogenitales. Los primeros tipos de VPH aislados directamente de biopsias de cáncer cervical fueron los tipos VPH-16 y VPH-18, lo cuales fueron clonados posteriormente en 1983 y 1984 respectivamente [17, 18], y esto inició una rápida expansión del campo.

En los siguientes cuatro años se llevaron a cabo los experimentos básicos que explicaron el papel del VPH en la etiología del CaCu tales como: 1) la expresión de genes virales específicos (como E6 y E7) se demostró en líneas celulares de cáncer cervical y en biopsias de cáncer [19]; 2) una abertura específica dentro de la molécula anillada de DNA del virus es necesaria para la integración del genoma viral [17]; y 3) la capacidad de inmortalización del DNA viral y de las oncoproteínas virales apoyaron las primeras sospechas [20, 21]. Poco después se demostró el requerimiento forzoso de la expresión de los oncogenes virales para mantener el fenotipo maligno en líneas celulares de cáncer cervical [22, 23].

Los 14 años subsecuentes han servido para tener una mejor comprensión de las funciones de los oncogenes virales y conocimiento más detallado de la historia natural de la infección por VPH. También se han realizado un número sustancial de estudios epidemiológicos que apuntan a los VPH de alto riesgo como la principal causa de CaCu. Estudios epidemiológicos apoyaron esta idea e indicaron que las infecciones persistentes del VPH eran el factor de riesgo más importante para el CaCu [24, 25].

1.3 Virus del Papiloma Humano

Los virus del papiloma pertenecen al género A de la familia *Papillomaviridae* a la cual también pertenecen los polyomavirus. Los papilomavirus son virus pequeños que miden aproximadamente 52 a 55 nm de diámetro, son circulares, sin envoltura y con una doble cadena de DNA. Estos virus se replican en el núcleo de las células del epitelio escamoso (epidermis o mucosa) causando diversas lesiones proliferativas en ellas [26].

Los virus del papiloma están ampliamente distribuidos en la naturaleza y son especie específicos, pueden infectar aves, algunos mamíferos (bovinos, caprinos, conejos, gatos, alces, venados, etc) y al humano. La mayoría de los virus del papiloma están asociados con lesiones hiperproliferativas del epitelio, tanto de la piel como mucosas (faringe, esófago o tracto genital), aunque se ha encontrado DNA del VPH en sitios como la cavidad bucal, ojo y pulmón [27, 28].

1.3.1 Organización genómica

A pesar de las diferencias en el tropismo por diversos epitelios y los distintos tipos de enfermedades hiperproliferativas que los papilomavirus producen, en su organización genómica son muy similares. El genoma de los VPH contienen entre 7200 y 8000 pares de bases y está dividido en 3 regiones: una región no codificadora llamada la región larga de control (LCR) y 2 regiones codificadoras que contienen 8 marcos de lectura abiertos (genes) (Figura 1.1) que son:

1. La región temprana *E* (early), que codifica para las proteínas expresadas en las primeras etapas de la infección, así como en las células ya transformadas. Está constituida por 6 genes: E1, E2, E4, E5, E6 y E7.
2. La región tardía *L* (late), la cual codifica para las proteínas estructurales de la cápside, expresadas en la etapa productiva de la infección. La constituyen los genes L1 y L2 [29].

Región Larga de Control (Long Control Región) LCR

La Región Larga de Control o LCR, comprende una secuencia no codificadora de aproximadamente 1 Kb de longitud y cubre cerca del 12% del genoma. La LCR contiene un conjunto de sitios de unión sobrelapados para diferentes activadores y represores transcripcionales, tanto virales como celulares. La LCR regula la transcripción de las regiones tempranas y tardías, además controla la producción de proteínas y partículas

virales. La LCR tiene como características principales las regiones ricas en A-T, tiene varios promotores de RNA polimerasa tipo II, así como de sitios de unión para factores de transcripción celular, elementos de respuesta a hormonas, etc [29, 30]. El promotor temprano, el cual dirige el inicio de la transcripción en sitios “upstream” (corriente arriba) del ORF de E6 se ha estudiado exhaustivamente en los tipos de VPH genitales. Este promotor se conoce como p97 en los VPH tipo 16 y 31 o como p105 en el VPH tipo 18. Los factores de transcripción que regulan estos promotores tempranos se unen a secuencias localizadas precisamente dentro del LCR [31].

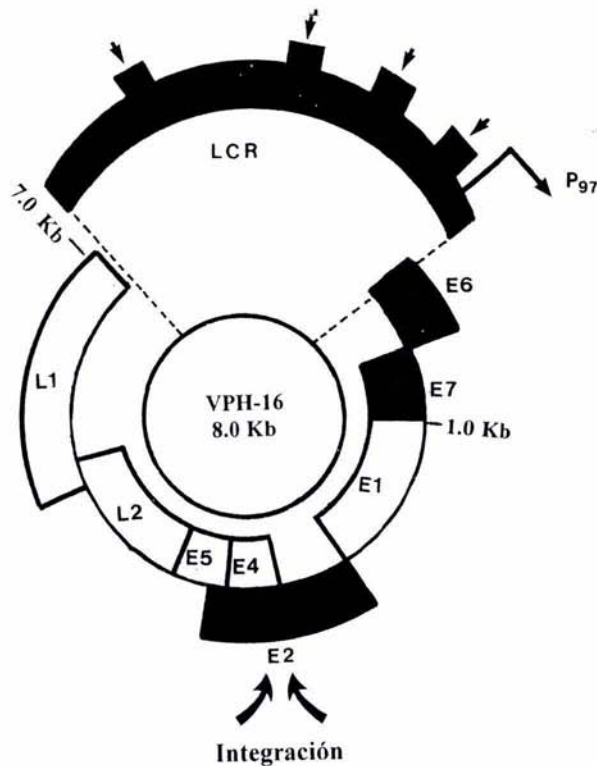


Figura. 1.1 Esquema de la organización genómica del VPH 16. El DNA de ~8.0 Kb puede dividirse en 3 regiones principales: la region larga de control (LCR), la región temprana (E1-E7) y la región tardía (L1-L2). La expresión de los genes tempranos, E6 y E7 principalmente, está dirigida por un promotor localizado en el nucleótido 97 (p97), el cual está regulado por los productos de E2. La proteína E2 se une a secuencias palindrómicas localizadas en la LCR (flechas). Durante la progresión maligna, el genoma viral frecuentemente se integra dentro de los cromosomas del hospedero. La integración usualmente ocurre a nivel del ORF de E2, rompiendo el gen.

Genes de expresión temprana

El marco de lectura abierto (open reading frame, ORF) del gen E1 es uno de los primeros genes que se expresa, junto con el gen E2, durante el inicio de la replicación del genoma de los VPHs y codifican para las proteínas E1 y E2 respectivamente.

E1 es una proteína con actividad de helicasa dependiente de ATP. La proteína E1 interactúa con la proteína E2 para la formación de un complejo específico sobre el origen de replicación viral e iniciarla. La proteína E2 incrementa sustancialmente la afinidad de la proteína E1 por el origen de replicación [32, 33].

El ORF de E2 del VPH produce una proteína que regula negativamente la transcripción del virus al unirse a una secuencia específica del DNA viral. La proteína E2 también está implicada en la inducción de la replicación del DNA del VPH a través de su asociación con la proteína E1. El dominio N-terminal de la proteína E2 se requiere para la transactivación, ya que se une a la proteína E1. Dependiendo del contexto del promotor, la proteína E2 puede actuar como un activador transcripcional o como un represor de la expresión génica viral [34]. La proteína E2 de longitud completa (E2-TA) forma dímeros a través de aminoácidos localizados en el extremo C-terminal, mientras el extremo N-terminal funciona como el dominio de activación [35]. La proteína E2 se une a secuencias palindrómicas que consisten de motivos ACCGN4CGGT [36]. El genoma del VPH del tipo genital contiene solamente 4 de estos sitios de unión. Las proteínas E2 de longitud completa del VPH han demostrado actuar solamente como represores de la transcripción en el LCR [37].

Los promotores de expresión de los genes E6/E7 del VPH-16 y VPH-18 son regulados negativamente por la proteína E2. Así, la pérdida de la expresión de E2 debido a la ruptura del genoma viral y su subsecuente integración en el genoma del hospedero está implicada en el desarrollo del cáncer cervical [19].

El ORF de E4 se expresa en las etapas finales de la infección junto con las proteínas de la cápside L1 y L2, cuando los viriones están siendo ensamblados y parece tener importancia para la maduración y replicación viral. E4 se sintetiza como una proteína de fusión con el amino-terminal de E1 [38]. La proteína E4 del VPH-16 no parece poseer propiedades transformantes, pero está asociada con la membrana celular y se acumula en el citoplasma. En los queratinocitos humanos, la proteína E4 induce el colapso de la red de citoqueratinas del citoplasma, lo que sugiere que estos cambios facilitan la liberación de las partículas virales. El colapso de la red de citoqueratinas puede causar zonas claras alrededor del núcleo celular o halos perinucleares característicos denominados coilocitos, los cuales se observan histológica y citológicamente en células infectadas por VPH [39].

La capacidad de proliferación, transformación e inmortalización (capacidad oncogénica) del VPH se atribuye a los 3 genes de expresión temprana restantes: E5, E6 y E7 y a sus respectivas proteínas, particularmente estas dos últimas.

El ORF de E5 codifica la proteína E5 que se expresa en las etapas más tempranas de la transformación neoplásica. La proteína E5 es altamente hidrofóbica y se encuentra en el compartimiento citoplasmático de las células. E5 ha sido asociada, aunque en menor grado que E6 y E7, en el proceso de malignización de la célula infectada por varias razones: su interacción inespecífica con los dominios intracelulares de receptores para factores de crecimiento celular (p.ej. receptor para el factor de crecimiento epidérmico). Se ha demostrado que la proteína E5 de VPH-16 puede incrementar la vida media del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF). La tirosin-cinasa de los receptores de factores de crecimiento, como el receptor EGF, inicia diversos eventos que resultan en la transcripción de una variedad de proto-oncogenes. Previamente, se ha demostrado que la expresión de c-jun, junB y c-fos se induce por la proteína E5 [40].

E5 también estimula el crecimiento de la célula al formar complejos con otros receptores de factores de crecimiento, como el receptor β de factor de crecimiento derivado de plaquetas y el receptor del factor estimulante de colonias-1 [41]. Se ha encontrado también, que la proteína E5 se asocia con proteínas del complejo principal de histocompatibilidad

clase I (MHC I), específicamente con la proteína transportadora de péptidos antigénicos TAP I lo cual afecta la presentación de los antígenos virales, evadiendo de esta manera el sistema inmunológico [42]. Recientemente, se ha demostrado que E5 además previene la apoptosis seguida del daño al DNA [43]. De cualquier manera, como las lesiones provocadas por la infección de VPH progresan ocasionalmente a cáncer cervicouterino, el DNA del virus que se encuentra en forma episomal frecuentemente llega a integrarse al DNA de la célula hospedera y una parte sustancial del genoma, que comúnmente incluye la secuencia que codifica para E5, es deletada. De esta manera, E5 no se encuentra necesariamente involucrada en los eventos tardíos de la carcinogénesis mediada por el VPH (ver sección de patogénesis del VPH) [19].

Se han descrito varias funciones para E6 y E7. Las primeras observaciones revelaron que E6 interactúa con p53 y E7 interactúa con Rb para bloquear la actividad de estos genes supresores de tumores [44]. Por ello, E6 y E7 son las denominadas oncoproteínas del VPH. Los genes E6 y E7 y sus respectivas proteínas se expresan constitutivamente en el tejido maligno y la inhibición de su expresión bloquea el fenotipo maligno de las células de cáncer cervical. Ambas oncoproteínas, E6 y E7, son capaces de immortalizar y alterar en forma independiente varios tipos de células humanas en cultivos de tejidos, pero la eficiencia se incrementa cuando ellas son expresadas juntas [45, 46].

El gen de E6 de los virus del papiloma codifica para la proteína E6, compuesta de 151 aminoácidos (en el VPH-16), con un tamaño de 18 kDa y puede encontrarse tanto en el compartimiento nuclear como citoplasmático de la célula [47]. La característica común de las proteínas E6 es la presencia de dos dedos de zinc con el consenso Cis-X-X-Cis, el cual es típico de aquellas proteínas que se unen al DNA. Los dedos de zinc de E6 también han sido implicados en funciones tales como la activación transcripcional, la transformación, immortalización y asociación con proteínas celulares. La proteína E6 altera el crecimiento celular al afectar a p53, la cual es una proteína celular supresora de tumores. La unión de la proteína E6 a p53 estimula la degradación de p53 celular a través de una vía proteolítica dependiente de ubiquitina [48]. Por lo tanto, los niveles celulares de p53 son bajos en las células que expresan E6 del VPH-16. La proteína E6 media actividades como la

inmortalización celular, la transformación, la formación de tumores y la apoptosis. Además, la proteína E6 modula la transcripción y actividad de telomerasa [49].

Algunas de estas funciones prominentes de la proteína E6 se originan de su interacción con la p53 y su consecuente degradación así como con la proteína pro-apoptótica BAK [50], lo cual resulta en la resistencia a la apoptosis y un incremento en la inestabilidad cromosómica. Además, la activación de la telomerasa y la inhibición postulada de la degradación de las cinasas de la familia SRC por la oncoproteína E6 parecen cumplir importantes funciones en la estimulación del crecimiento celular [51].

El ORF de E7 codifica para una proteína nuclear de cerca de 100 aminoácidos. Se sabe que E7 está unida al Zn^{2+} y que se fosforila por la caseína cinasa (CKII) [44]. Se ha demostrado que la proteína E7 es necesaria para la etapa productiva del ciclo de vida del VPH-16, así como para amplificar su DNA y expresar cantidades reducidas de la proteína L1, la cual se requerida para la producción del virus. Además la proteína E7 parece crear un ambiente favorable para la síntesis de DNA del VPH-16 al perturbar el programa de diferenciación de los queratinocitos e inducir la replicación del DNA del huésped [52] al afectar los factores de la maquinaria replicativa del hospedero tales como el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) [53] y al gen de la DNA polimerasa α [52]. La inducción de las proteínas de replicación del DNA del hospedero por la proteína E7 ocurre a través de la habilidad de E7 para secuestrar a la proteína supresora de tumores, el producto del gen del retinoblastoma, pRB, liberando el factor de transcripción celular E2F-1.

La forma no fosforilada de pRB es la forma activa que actúa como un regulador negativo del ciclo celular. Durante la transición a la fase S del ciclo celular, pRB es fosforilada y pasa a su forma inactiva. E2F-1 se une a pRB no fosforilada, formando un complejo que inactiva la transcripción celular. La fosforilación de pRB o la formación del complejo con la proteína E7 resulta en la liberación de E2F-1 permitiendo su función como activador transcripcional de genes celulares implicados en la síntesis de DNA celular y la progresión hacia la fase S del ciclo celular [54]. Cuando E7 libera indirectamente al factor de transcripción E2F de la inhibición de RB, sobreexpone al inhibidor de ciclinas INK4A. La

alta actividad resultante de E2F podría conducir a apoptosis en las células que expresan E7 [55]. Más aún, E7 estimula los genes de la ciclina A y ciclina E de la fase S [56], y parece bloquear la función de los inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas WAF1 (también conocidos como CIP1 o p21) y KIP1 (conocido como p27) [57]. Al inducir la amplificación de los centriolos, E7 también induce aneuploidía de las células que expresan E7, lo cual contribuye a la tumorigénesis [58].

E6 y E7 pueden immortalizar independientemente células humanas, pero con una eficiencia reducida [59, 60]; en cambio la función de cada una de ellas en conjunto resulta en un marcado incremento de la actividad transformante. Esto parece deberse a un interesante efecto complementario y sinérgico entre ellas. Como ya se mencionó, E6 parece ser degradado por INK4A, mientras que E7 evita esta inhibición mediante la activación directa de las ciclinas A y E. E6, en su momento, previene la apoptosis inducida por E7 al degradar las proteínas inductoras de la apoptosis p53 y BAK [56, 61].

Genes de expresión tardía

La cápside del virus está constituida en un 95% por L1 y 5% por L2. El ORF de L1 codifica para la proteína principal de la cápside del virus, la cual tiene un tamaño de 50-60 kDa que forma 75 capsómeros pentaméricos, o unidades capsoméricas. La proporción de las proteínas L1 y L2 en la cápside es de 30:1 respectivamente. La secuencia del gen que codifica para L1 es la segunda secuencia más conservada, después de la secuencia del gen E1, entre los diferentes tipos de VPHs. La proteína L1 se expresa en grandes cantidades durante la infección por VPH-16 o en etapas de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) de bajo grado [62]. Por otro lado L1 es capaz de autoensamblarse para formar las partículas parecidas a virus, *virus like-particles* o VLPs [63]. Así mismo, L1 es la proteína más antigénica de los virus del papiloma y se han caracterizado varios epítomos lineales mediante proteínas de fusión producidas en bacterias [64]. Mediante el uso de VLPs de L1 del VPH-16 expresados en sistemas eucariontes, se han descrito epítomos conformacionales [65, 66]. Los VLPs también han servido para producir y detectar anticuerpos neutralizantes [67], y se ha demostrado que éstos son tipo específicos con la excepción de los tipos estrechamente relacionados [66, 68, 69].

El ORF de L2 codifica para la proteína menor de la cápside viral de 49-60 Kda y es considerada una de las proteínas con mayor variación en su secuencia entre los distintos tipos de VPHs. La proteína L2 no tiene capacidad para autoensamblarse como L1. Sin embargo, L2 es incorporada en los VLPs, probablemente en los vértices de la cápside, cuando se coexpresa con L1 [70]. La mayor parte de L2 se encuentra en la parte interna de la cápside y se requiere para la encapsulación del genoma viral [71]. No obstante, una pequeña porción de L2 está expuesta sobre la superficie de la cápside y es accesible a los anticuerpos, de los cuales un pequeño número son neutralizantes [72, 73]. L2 no se requiere para la unión de los viriones a la superficie celular (como sí lo es L1) y por lo tanto los anticuerpos neutralizantes contra L2 no afectan este proceso [74].

Aunque las 2 proteínas estructurales, L1 y L2 no se expresan en células precancerosas ni malignas, son importantes para el desarrollo de una vacuna preventiva o que actúe en las primeras etapas de la infección del VPH.

1.3.2 Ciclo de Vida y Patogénesis del VPH

El desarrollo de un CaCu avanzado a partir de una infección por VPH es un proceso lento, dada la capacidad de latencia propia del VPH. El ciclo de vida del VPH difiere de otras familias de virus: la infección requiere la capacidad de células epiteliales epidérmicas o mucosas que todavía son capaces de proliferar (células de la capa basal) [28]. La infección por el VPH ocurre a través de microlesiones del epitelio el cual expone las células basales que permiten la entrada del virus [26, 28]. Los virus penetran las células a través de la unión con receptores específicos, cuya identidad no se ha definido hasta la fecha, pero existen candidatos como la α_6 integrina [75] y proteoglicanos del tipo heparan sulfato [76]. Una vez que el virus se ha instalado dentro de estas células, su cápside protéica es degradada y el DNA del virus viaja hasta el núcleo celular donde se replica. **Figura 1.2.**

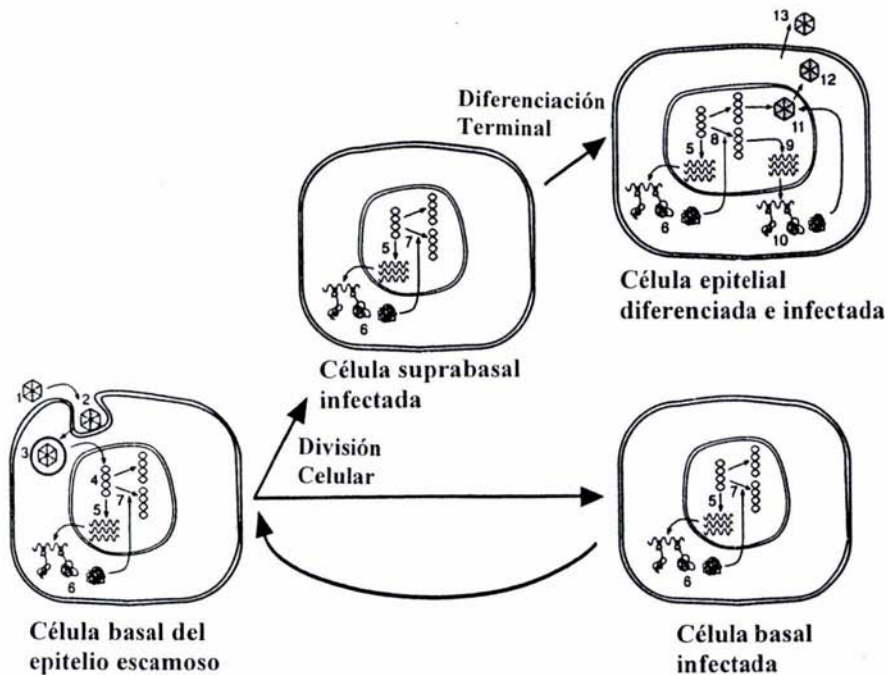


Figura 1.2 Ciclo de infección y replicación del VPH. Para poder desarrollar una verruga o papiloma, el virus debe primero infectar a una célula epitelial basal: Unión con algún receptor (α_6 integrina o heparansulfato) (1), endocitosis (2), transporte al núcleo, degradación de la cápside y liberación del DNA viral (3 y 4) transcripción de la región temprana (5), traducción de las proteínas tempranas (6), replicación del DNA viral en estado estable (7), todo ocurre en la célula basal y en la célula epitelial suprabasal infectada. Los eventos en el ciclo de vida viral conducen a la producción de partículas virales en los queratinocitos diferenciados: replicación del DNA viral vegetativo (8), transcripción de la región tardía (9), producción de las proteínas de la cápside L1 y L2 (10), ensamblaje de las partículas virales (11), rompimiento nuclear (12) y liberación del virus (13).

La replicación de los papilomavirus es un proceso complejo el cual puede ocurrir en 3 eventos distintos altamente regulados. El primero es la fase de establecimiento en la cual una sola o un pequeño número de partículas virales entran a una célula y el genoma se replica rápidamente produciendo de 50 a 100 copias por célula. Durante el segundo evento, la fase de mantenimiento, los episomas virales se replican en sincronía con los cromosomas celulares de las células basales en división y el número de copias se mantiene constante de 50 a 100 partículas virales por célula. Finalmente, en la fase de amplificación, las células infectadas dejan la capa basal y se diferencian, la replicación viral productiva ocurre en las capas superiores del epitelio, resultando en la síntesis de miles de copias por célula. [28, 77].

Cuando el DNA del VPH se instala en el núcleo de la célula hospedera pueden ocurrir 2 fenómenos: Uno de ellos es que el DNA viral permanezca en forma episomal, es decir, que se mantenga como una molécula independiente, al igual que un plásmido que se replica extracromosomalmente. En este caso, la expresión de los genes virales está suprimida ampliamente aunque la expresión limitada de genes virales específicos de expresión “temprana” (E5, E6, y E7) resulta en la proliferación aumentada de las células infectadas y su expansión lateral. Seguido de la maduración de las células suprabasales hacia capas superiores del epitelio, se inicia la expresión de los genes virales “tardíos”; el genoma viral circular entonces se replica y forma las proteínas estructurales. Los VPHs no poseen una fase lítica y generan cantidades muy pequeñas de viriones, los cuales pueden ser observados únicamente en las células maduras de las capas superiores del cérvix. En las capas superiores de la epidermis o mucosa se ensamblan las partículas virales completas y se liberan ayudadas por el proceso natural de envejecimiento y descamación de las células del estrato córneo donde los antígenos virales son expuestos e inducen la generación de una respuesta inmunológica [28, 78]. *Figura 1.3*

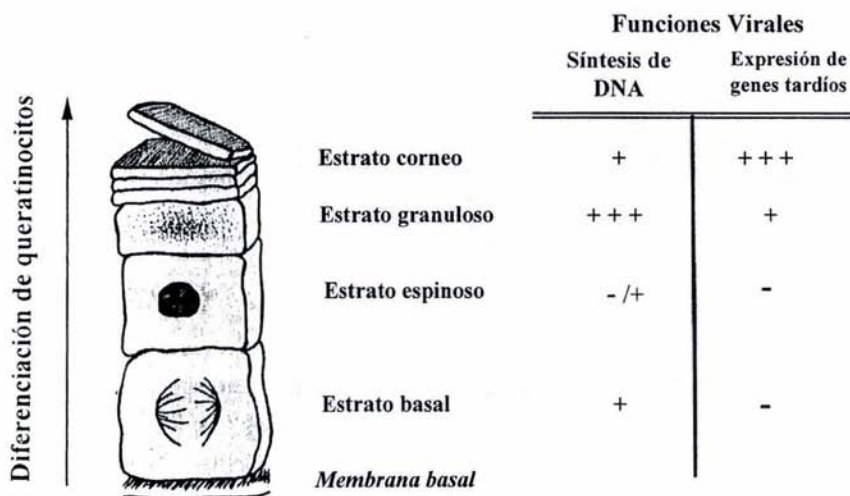


Figura 1.3 Diagrama esquemático de la diferenciación celular en un típico epitelio estratificado cervical, con las principales funciones del VPH. La infección del VPH ocurre a nivel de las células basales. La amplificación del DNA viral y la expresión de los genes tardíos están restringidos a las células suprabasales diferenciadas.

El segundo fenómeno que puede ocurrir después de que el VPH ha infectado la célula es el de la integración. En el curso del desarrollo del cáncer, la molécula de DNA del VPH frecuentemente llega a integrarse en el DNA de la célula hospedera. El DNA del VPH, en forma de anillo, la mayoría de las veces se abre en sitios dentro del ORF de E2, es decir, sufre una pequeña delección que raras veces es de más de 3 Kb, interrumpiendo así la continuidad de este gen (**Figura 1.1**) Parte de E2 y de los ORFs que están adyacentes a él (E4, E5 y parte de L2) generalmente están deletados después de la integración. La pérdida del gen E2, cuya proteína es precisamente el regulador negativo de la transcripción del genoma del virus (lo mantiene latente) trae como consecuencia la sobre-expresión del resto de los genes virales que logran mantenerse intactos. Desafortunadamente estos genes son por lo general los oncogenes E6 y E7 que a menudo están unidos a secuencias flanqueantes celulares y de esta manera la transcripción podría estar modulada (aumentada) por promotores flanqueantes de la célula hospedera. Además, la activación de la expresión del gen c-myc en muchos de los carcinomas cervicales se ha sugerido como resultado de la integración del DNA de VPH-16 y 18 cerca del gen c-myc [78, 79].

Se ha encontrado que el DNA viral está integrado dentro del genoma del hospedero en todos los casos de carcinoma cervical, en sus metástasis y en las líneas celulares derivadas. Las células que llevan consigo el DNA del VPH integrado crecen mejor *in vitro* y la integración se ha correlacionado con un pobre pronóstico y desarrollo de resistencia al tratamiento [18, 19].

La infección primaria por VPH al inicio resulta en lesiones precancerosas leves denominadas Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC). La mayoría de estas lesiones son eliminadas en los siguientes 6-12 meses después de aparecer, probablemente debido al sistema inmunológico del hospedero. De cualquier forma, un pequeño porcentaje de las lesiones persiste, progresa a NIC de alto grado, carcinoma *in situ*, y si se deja evolucionar sin intervención quirúrgica, a carcinoma de células escamosas o adenocarcinoma de cérvix [80, 81] **Figura 1.4**

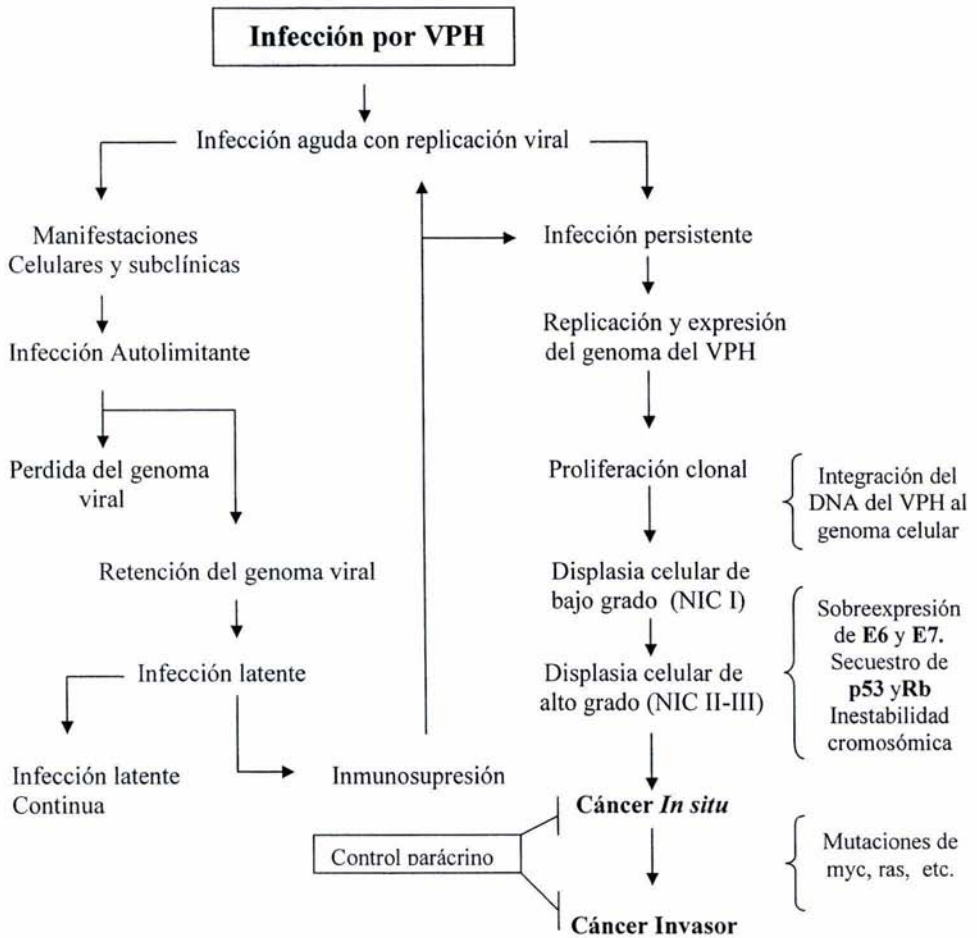


Figura 1.4. Historia natural del cáncer cervicouterino. La progresión de las células infectadas con VPH hacia lesiones de bajo grado (NIC I) y alto grado (NIC II-III), carcinoma *in situ* y cáncer invasor está determinado por la falla en los mecanismos de control intracelular. Estos incluyen a los inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas, a la cascada de señalización parácrina (inhibición en la síntesis de IFN- β) y una disminución del control inmunológico. Un aumento en el nivel de expresión de los oncogenes E6 y E7 resulta en un incremento de la inestabilidad genómica lo cual conduce a las células alteradas progresar hacia un crecimiento invasivo.

1.3.3. Tipos virales

Hasta la fecha se han identificado más de 150 tipos de VPH que infectan el epitelio humano (piel y mucosas), los cuales se han tipificado con base en las diferencias de sus secuencias genómicas. La clasificación de los virus del papiloma se basa en la comparación de las secuencias de regiones específicas de su genoma. Basados en el criterio adoptado por el *Papillomavirus Nomenclature Comité*, las secuencias de nucleótidos de los ORFs de L1, E6 y E7 de un nuevo tipo, no deben exceder el 90% de similitud de las secuencias correspondientes de los genomas de los VPHs ya conocidos y tipificados [27, 29, 82].

Más de 37 de estos 150 tipos de VPH se transmiten por vía sexual y son capaces de infectar el tracto anogenital inferior y 25 o más de estos tipos de VPH están asociados al desarrollo de algún tipo de cáncer, es decir, aquéllos denominados de “alto riesgo” entre los que destacan los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82. Los tipos de VPH encontrados primariamente en verrugas genitales y lesiones no malignas (epidermoplasias) son denominados de “bajo riesgo” tales como los tipos 6, 11, 30, 40, 42, 44, 54, 61, 70, 72 y 81 entre otros [83, 84, 85] (*Tabla 1*).

Estos tipos de VPH han surgido como uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de CaCu. Así mismo se ha demostrado que aproximadamente el 25% de los casos del cáncer oral contienen DNA de los mismos tipos de VPH que infectan el tracto anogenital. Por lo tanto, estos tipos de VPH han demostrado ser el principal factor de riesgo para la inducción de distintos tipos de cáncer en el humano [25, 86, 87].

Los tipos 16 (VPH-16) y 18 (VPH-18) son los más comúnmente asociados a tumores cervicales en la población mexicana y de Centroamérica [88, 89]. Un estudio reciente ha reportado que la prevalencia del VPH en cáncer cervical es del 99.7% [90]. Este dato parece indicar que el VPH es la causa principal del CaCu, lo cual cuestiona la existencia de aquellos tumores provenientes de carcinomas cervicales diagnosticados como VPH-negativos [91].

Tabla 1 Principales tipos de papilomavirus en lesiones genitales

Tipos de lesión genital	Tipo de VPH	
	Bajo Riesgo	Alto riesgo
Condiloma acuminata	6, 11, 42, 44, 53, 54	51, 83
Neoplasias Intraepiteliales	6, 11, 26, 30, 34, 40, 42, 43, 44, 54, 57, 59, 61, 62, 66, 70, 72, 81	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82
Cáncer cervical y otros cánceres anogenitales		16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82

1.4 Respuesta inmunológica y otros factores de riesgo para el CaCu.

Es un hecho que el sistema inmunológico es determinante en el control de las infecciones y lesiones causadas por el VPH. Esto puede deducirse indirectamente de la incidencia aumentada y persistencia prolongada de lesiones benignas, NICs y cánceres asociados al VPH en mujeres inmunosuprimidas [92]. También existe una evidencia clara de que la respuesta celular tipo Th es indispensable para la regresión de estas lesiones y tumores. Sin embargo la respuesta de anticuerpos neutralizantes también ejerce un papel importante en la eliminación del VPH y sus lesiones, de hecho se han detectado ambas respuestas inmunológicas (humoral y celular) en forma simultánea contra diversos antígenos de VPH durante el curso de la regresión [93, 94]. El escape del control inmunológico de NICs de alto grado y de carcinomas *in situ* parece estar basado en diferentes modificaciones del sistema presentador de antígenos, el cual podría involucrar al sistema de transporte antigénico, los receptores HLA y el sistema de reconocimiento celular para los antígenos presentados [95-97].

Existen datos que sustentan lo mencionado anteriormente: 1) Un gran número de carcinomas de células escamosas de cérvix tienen una pérdida en las moléculas de HLA-A,

-B, -C y β_2 microglobulina en parte o en todo el tumor. 2) La expresión de las moléculas de MHC clase I está alterada en al menos 40% de los carcinomas y los pacientes con pérdida del MHC I en etapas tempranas del cáncer tienen un mal pronóstico y 3) Virtualmente todas las lesiones benignas y premalignas del epitelio cervical que son analizadas, tienen MHC I no alterado [98]. Ahora se sabe que la evasión de los mecanismos de vigilancia del sistema inmunológico es un paso clave en la progresión de los tumores inducidos por el VPH.

Las infecciones por VPH de alto riesgo resultan en la progresión a cáncer cervical en solamente un pequeño porcentaje de las mujeres infectadas, después de un largo periodo de latencia [99]. En realidad la mayoría de las mujeres infectadas eliminan la infección mediante mecanismos inmunológicos. Por ello, una inmunosupresión duradera representa un factor de riesgo para la persistencia del DNA viral y progresión a lesiones de bajo grado, pero los factores que determinan la persistencia viral en otras mujeres no están del todo claros. Algunos resultan de las modificaciones de los genes celulares que influyen en la presentación de antígenos o en las cascadas de señalización que están comprometidos con la supresión de la transcripción de los oncogenes o de la función de las oncoproteínas virales. Otros factores afectan directamente la persistencia del DNA viral, por ejemplo, mediante la sobreexpresión de la transcripción de los oncogenes virales, mediante la modificación de la región promotora viral o mediante la amplificación del genoma viral persistente durante el proceso de integración [79].

Es un hecho que tanto la conducta como el inicio de una vida sexual activa a edad temprana y el número de parejas sexuales incrementan la posibilidad de adquirir la infección por VPH de alto riesgo. Además varios estudios sugieren que el desarrollo del CaCu depende de una variedad de factores que actúan juntos con los VPH de alto riesgo. Estos factores incluyen, además de la inmunosupresión y la predisposición genética del individuo, el tabaquismo, el uso de anticonceptivos hormonales, deficiencia de vitaminas y minerales en la dieta e infecciones con otros agentes microbiológicos tales como herpes simplex, bacterias y protozoarios [100, 101] (*Figura 1.5*).

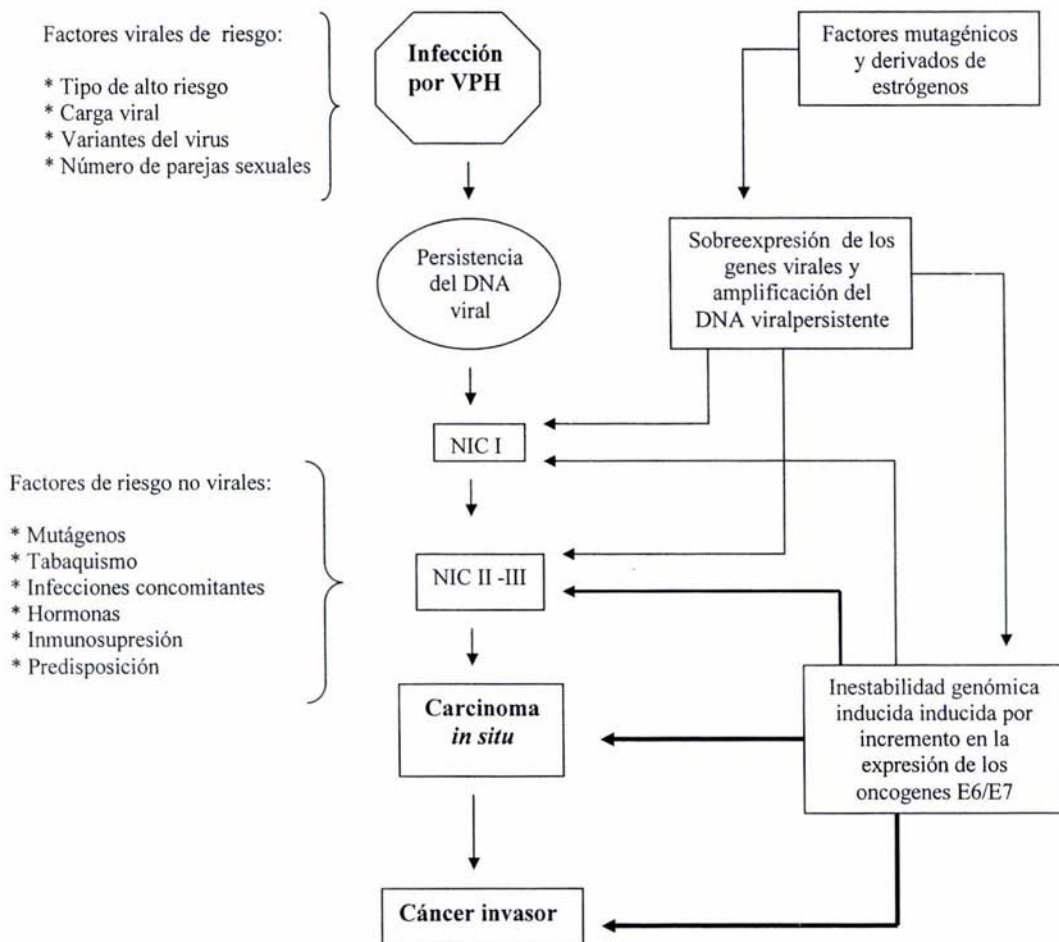


Figura 1.5 VPH y factores de riesgo no virales que contribuyen a la progresión maligna inducida por el VPH. Los factores de riesgo virales y no virales que influyen en la progresión de las células infectadas están enlistadas en el lado izquierdo. Los factores hormonales (estrógenos y sus derivados) activan al promotor del papilomavirus y facilita la immortalización de las células infectadas por el VPH. Los agentes mutagénicos amplifican el DNA persistente del VPH. Estos aumentan la progresión mediante la modificación de la cascadas de señalización celular que controlan la persistencia del VPH, o permiten el incremento de la expresión de los oncogenes virales.

1.5 Métodos de diagnóstico para VPH-CaCu

De acuerdo a todo lo anterior se puede decir que el principal agente causal del CaCu es el VPH. Esto nos permite deducir que este tipo de cáncer se puede prevenir si la infección por el VPH y las lesiones precancerosas se detectan y se tratan oportunamente. Para ello se requieren métodos de diagnóstico efectivos y accesibles a la población para que puedan aplicarse dentro de los programas de salud.

El método tradicional para el diagnóstico del CaCu y sus lesiones precursoras (NIC) ha sido, desde hace más de 50 años, la prueba citológica del Papanicolaou. Desde la introducción de esta prueba, la tasa de mortalidad por el CaCu ha disminuido drásticamente en los países desarrollados que han utilizado este sistema de diagnóstico como parte de un programa de prevención bien organizado y de amplia cobertura. Sin embargo, los programas de detección oportuna del CaCu basados en la prueba del Papanicolaou, no se han establecido correctamente en la mayoría de los países en desarrollo incluyendo a México, debido a la dificultad de establecer un buen control de calidad [102]. Entre los factores que impiden su éxito, se encuentran la “masificación” del ensayo, una insuficiente cobertura a nivel nacional y la baja concurrencia de las mujeres a los servicios de salud donde se realiza la prueba, que se ha visto también limitada por factores socioculturales propios de la idiosincrasia de los países latinoamericanos [103].

Actualmente también existen los métodos de diagnóstico basados en biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la captura de híbridos [104] que detectan la presencia del DNA del VPH. Ambos métodos presentan grandes inconvenientes tales como altos costos en su realización, instalación de laboratorios y equipos modernos y personal altamente calificado. Todo ello dificulta la disponibilidad de estos métodos en la población de los países en vías de desarrollo.

Por otro lado, los métodos de diagnóstico serológicos, basados en la detección de anticuerpos, pueden ser una alternativa en los países subdesarrollados. Sin embargo, hasta la fecha no existe ningún ensayo serológico que sea aplicado como método de diagnóstico para la detección de la infección por VPH en la población mexicana.

Es un hecho que la respuesta humoral es determinante para la protección, control y eliminación de la infección por VPH, pero además, la presencia de anticuerpos contra distintas proteínas del VPH también constituye un excelente marcador ya sea de una infección presente o de la huella de alguna infección pasada que dejó memoria inmunológica [105].

El desarrollo de un ensayo serológico para la detección del VPH se ha enfrentado a numerosos obstáculos metodológicos. Uno de ellos es la existencia de más de 35 tipos de VPH infectan el tracto genital y esto complica la detección y distinción entre los tipos de VPH de alto riesgo, es decir, aquellos asociados al cáncer cervicouterino. Entre los tipos de VPH de alto riesgo destacan el VPH-16 y VPH-18 que por su alta frecuencia son el centro de atención entre la población mexicana. Otro obstáculo importante es la no disponibilidad de antígenos virales puros debido a que aún no existe un método para que los papilomavirus puedan ser cultivados y purificados *in vitro*, aunque existen algunos intentos con relativo éxito [106] pero el alto costo y el bajo rendimiento son dos grandes inconvenientes en estos métodos.

Sin embargo existen otras alternativas para el uso de antígenos derivados del VPH en diversos métodos de diagnóstico como son: los péptidos sintéticos [107-109], proteínas recombinantes de VPH producidas en bacterias [108, 110] y más recientemente proteínas expresadas en sistemas eucariontes tales como las VLPs [111].

Con el uso de estos antígenos se ha demostrado que los anticuerpos IgG e IgA dirigidos contra las proteínas E2, E4, E6, E7, L1 y L2 del VPH-16 y VPH-18 se encuentran con más frecuencia y en títulos altos en sueros de mujeres que cursan en alguna de las 3 etapas de la enfermedad (infección por VPH, NIC y CaCu) en comparación con aquellas mujeres sanas [112-119]. En la **Tabla 2** se puede observar de manera semicuantitativa el perfil de anticuerpos contra los principales antígenos de VPH durante la evolución de la enfermedad el cual parece seguir un patrón: la presencia de anticuerpos anti-E4 es similar en los casos de displasia y cáncer cervical, la respuesta de anticuerpos anti-E6 es mucho más alta y está significativamente asociada al cáncer de cérvix invasivo y la incidencia de anticuerpos anti-

E7 es significativamente más alta en pacientes con CaCu que en aquellos con displasia cervical (NIC) o en individuos sanos. También se han encontrado anticuerpos anti-E6 y anti-E7 en pacientes inmunocomprometidos con cáncer no genital. Los anticuerpos anti-L1 y anti-L2 están asociados a la fase temprana de la displasia cervical, específicamente en la etapa de la infección activa por VPH.

Tabla 2. *Tendencia y perfil de anticuerpos dirigidos contra los distintos antígenos del VPH durante las distintas etapas de la enfermedad*

Etapa de la enfermedad	E2	E4	E6	E7	L1
Individuos sanos	+	+	---	---	+
Infección latente de VPH	++++	++	+	+	++
Infección aguda de VPH	++	+++	++	++	++++
NIC I	+	++++	++	++	+++
NIC II/ III	+	+++	+++	+++	++
Cáncer cervical	---	+++	++++	++++	+
Cáncer no genital	---	+	+++	+++	+

Pese a todo lo anterior, los datos que hasta la fecha se conocen con respecto al perfil de anticuerpos que de manera natural se generan contra las diferentes proteínas del VPH son discordantes e incompletos, ya que el tipo de inmunorreactivo utilizado, como base del método diagnóstico, ha variado y con él los resultados que reflejan la prevalencia de anticuerpos.

Los ensayos basados en la detección de anticuerpos utilizando péptidos sintéticos (inmunoblot y ELISA) sólo están restringidos a secuencias lineales de un antígeno y por ello la baja detección de anticuerpos. Por otro lado, aquellos métodos basados en el uso de proteínas completas (inmunofluorescencia, inmunoprecipitación, ELISA) son susceptibles de cambios conformacionales y tienen problemas de variabilidad. Sin embargo, las partículas intactas de VPH contienen epítomos inmunodominantes y tipo específicos.

Los análisis serológicos para la detección de la infección por HPV, como el Western blot e inmunoblot utilizando proteínas de fusión expresadas en bacterias, tienen las siguientes desventajas: 1) Los anticuerpos dirigidos contra epítomos conformacionales no son detectados debido a que estos epítomos son alterados por desnaturalización y 2) Las proteínas de fusión no sufren modificaciones postranscripcionales en bacterias.

Desde hace mucho tiempo el campo del diagnóstico clínico se ha esforzado por producir métodos de diagnóstico confiables para la detección de un gran número de enfermedades. Estos métodos, tanto los aprobados como los que se encuentran aún en fase de experimentación, deben de alcanzar las máximas normas de control de calidad que un método de diagnóstico ideal debe tener, es decir: sensibilidad, especificidad, sencillez, bajo costo y alcance para toda una población. La infección por el VPH y el CaCu son enfermedades que podrían prevenirse y tratarse cuando son diagnosticadas oportunamente. Por otro lado, la novedosa tecnología del Phage Display se puede considerar como una opción prometedora, no probada con anterioridad, en el desarrollo de un método de diagnóstico serológico para la infección por VPH.

1.6 Phage display

La búsqueda e identificación de moléculas de interés biológico ha tenido gran avance desde la aparición de la técnica llamada Phage Display. Esta poderosa herramienta ha captado la atención de la investigación y quizá sea una de las técnicas más importantes en los próximos años.

Phage display es el término universal para definir la expresión de péptidos o proteínas sobre la superficie de fagos filamentosos (Ff). Este método fue descrito por primera vez por Smith en 1985 y desde entonces ha sido usada en diversos estudios [120, 121].

La técnica del Phage Display consiste en un proceso en el cual un péptido o proteína es fusionado genéticamente a una proteína de la cubierta de un bacteriófago, lo cual resulta en

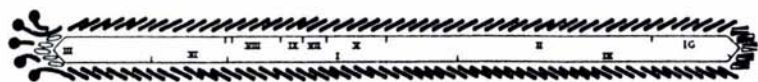
la expresión de una proteína o péptido fusionada sobre la superficie del fago, mientras que el DNA del fago contiene el gen que codifica para esta proteína o péptido [120]. Tal fusión aunada a la relativa sencillez de la manipulación *in vitro* e *in vivo* de los fagos, permiten la generación de moléculas ligando, con altas afinidades de unión, desplegadas en los fagos y en relativamente en poco tiempo (de 2 a 3 semanas) y que son obtenidas por varios pasos de selección [121, 122].

Los fagos filamentosos (género *Inovirus*) principalmente estudiados son el fl, fd y M13, los cuales comparten 98% de homología en su genoma [123]. El fago M13 es el más comúnmente utilizado en los procesos de phage display. En general los fagos filamentosos miden aproximadamente 6.5 nm de diámetro y 930 nm de longitud. La masa total de la partícula del fago se constituye en un 87% de proteína. El genoma está constituido por una molécula de DNA de cadena sencilla y covalentemente cerrada de cerca de 6400 nucleótidos. El DNA del fago se encuentra empaquetado en un cilindro flexible de proteínas que mide 1.5 a 2 nm de grueso y su peso aproximado entre 1.2 y 1.4 x 10⁷ Da. Estas proteínas se han denominado: proteína pVIII (la principal proteína de la cápside con 2700 copias por partícula de fago), las proteínas pVII y pIX (con 5 copias en cada uno de los extremos del fago) y las proteínas pIII y pVI (con 4 ó 5 copias cada una expresadas en el otro extremo del fago). El DNA se encuentra orientado dentro del virión por una región *hairpin* de 78 nucleótidos conocida como señal de empaquetamiento (PS), la cual siempre está localizada en el extremo del fago donde se encuentran las proteínas pVII y pIX [124].

Figura 1.6

Como su nombre lo indica, los fagos filamentosos necesitan algún tipo de bacterias que expresen pili para realizar el proceso de infección. Estos bacteriófagos, mediante el dominio N-terminal de su pIII, utilizan el extremo del pili F de la bacteria como un receptor para lograr la infección y por ello son específicos sólo para aquellas bacterias de la especie *Escherichia coli* que contengan el plásmido F⁺. Después de la retracción del pili y la penetración del genoma viral a través de la membrana bacteriana, la bacteria se replica y traduce su genoma así como el del fago. El ensamblaje de los fagos toma lugar en la membrana citoplasmática con ayuda de las proteínas pI y pIV [124, 125]. **Figura 1.6**

(A)



● pIII ▨ pVII - pIX
— pVIII ○ pVI

(B)

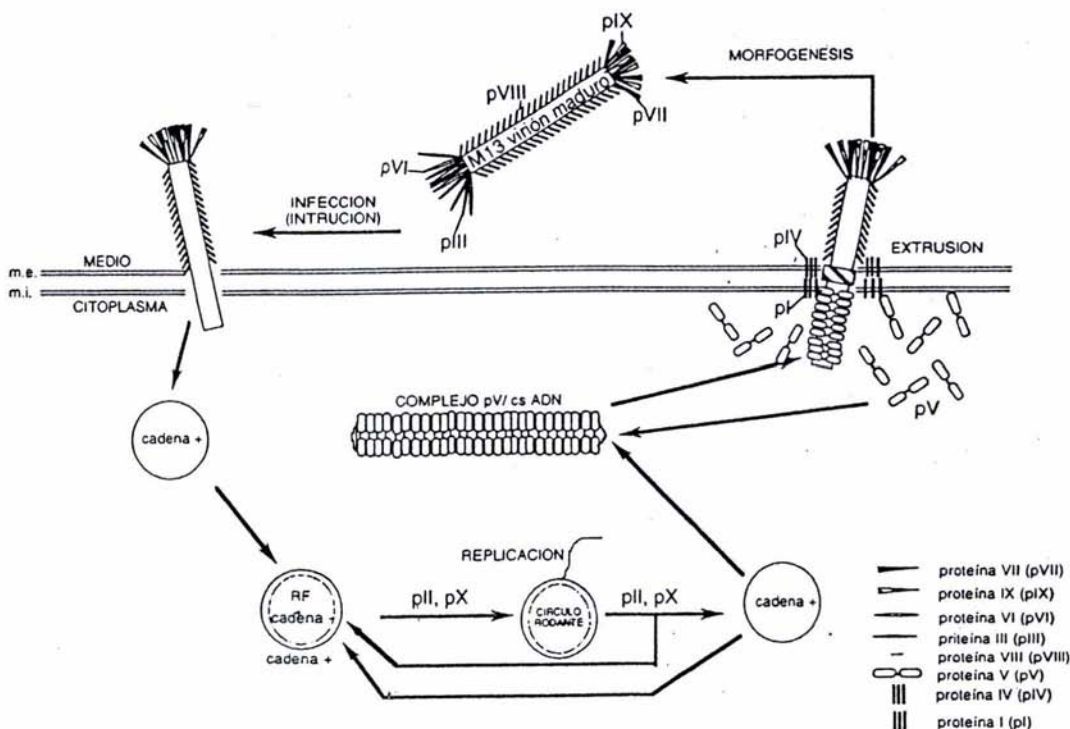


Figura 1.6 (A) Esquema del fago filamentosos y las proteínas de cubierta. (B) Esquema del ciclo de vida del bacteriófago M13. El fago filamentosos M13 reconoce el F' (pili) de las bacterias "macho" (F+) mediante el N-terminal de la proteína III. Al penetrar la cadena +, las proteínas II y X (pII y pX) interactúan en la replicación del DNA (circular rotante). La cadena + funciona como plantilla para la formación de la forma replicativa (RF) o para la formación del complejo constituido por la proteína V-cadena sencilla del DNA (pV/cSDNA). Cuando el complejo es dirigido hacia la membrana de la bacteria las proteínas I y IV ayudan en el proceso de la morfogénesis y la liberación del virión.

Durante el proceso de infección productiva los fagos Ff, a diferencia de los fagos líticos, no matan ni lisan a sus hospederos. Lo anterior es una gran ventaja de este sistema, ya que facilita enormemente los procesos de obtención y purificación de las partículas virales. Se sabe que hay un brote de cerca de 1000 partículas de fagos producidas en la primera generación después de la infección, y luego las bacterias producen cerca de 100 a 300 partículas por generación. Este proceso continúa durante varias generaciones, resultando en títulos de 10^{11} a 10^{12} partículas por ml de medio de cultivo [126, 127]. Posterior a los pasos de infección, replicación, amplificación y purificación, las partículas de fagos se someten a un proceso clave dentro de la metodología del phage display: la bioselección.

Durante la bioselección se prueban la afinidad de unión y reconocimiento de los fagos hacia moléculas blanco. Mediante este simple procedimiento de selección *in vitro* es posible una rápida identificación de ligandos y de sus respectivos blancos. La bioselección se lleva a cabo al incubar una biblioteca de péptidos, fragmentos de anticuerpos o proteínas expresados en fagos en una placa cubierta con el blanco, la cual se lava para eliminar los fagos que no se unen y se eluyen los fagos que se unieron específicamente. El fago eluido se amplifica en bacterias *E. coli* y posteriormente se llevan a cabo varios ciclos o rondas adicionales de unión-selección-amplificación para enriquecer el conjunto de fagos a favor de aquellos que expresan los péptidos que se unieron con mayor afinidad. Después de 3 ó 4 rondas, las clonas seleccionadas son caracterizadas mediante la secuenciación de su DNA [122]. **Figura 1.7**

Como ya se mencionó, la principal ventaja del Phage Display sobre otras tecnologías de mapeo de epítomos es la capacidad de trabajar con un gran número de péptidos a la vez (complejidad 10^9) y llevando a cabo rondas de bioselección pueden seleccionarse las clonas con más alta afinidad. El poder de esta tecnología radica en su habilidad para identificar regiones interactivas de proteínas u otras moléculas sin conocer al ligando o la naturaleza de la interacción. De esta forma, quizá sea posible identificar los agentes responsables de enfermedades con etiología y/o patogénesis desconocidas. Además, hay que resaltar la inmunogenicidad que se produce en la inmunización con fagos en diferentes modelos animales sin el uso de adyuvantes.

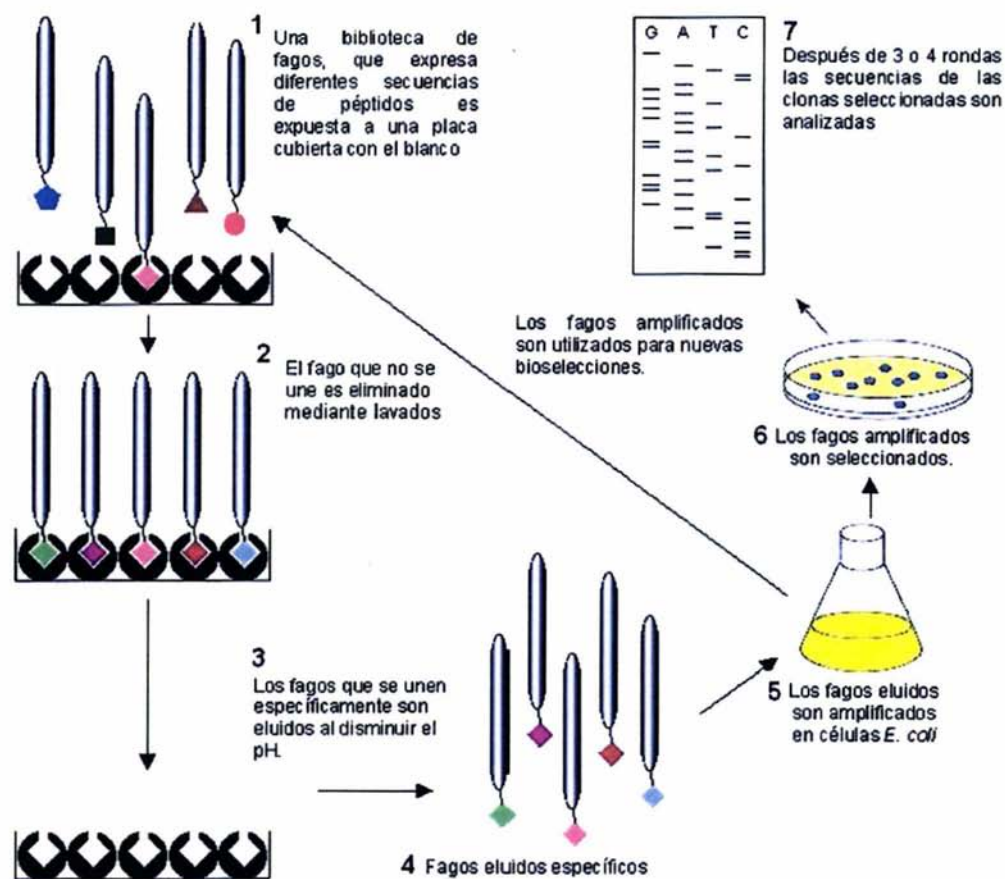


Fig. 1.7 Procedimiento del uso de bibliotecas de péptidos expresados en fagos filamentosos: Phage display. Durante la bioselección o *biopanning*, los fagos son incubados con la molécula blanco inmovilizada. Los fagos con poca afinidad son removidos mediante lavados y los fagos que permanecen unidos son eluidos. Los fagos eluidos son amplificados en bacterias *E. coli*, plaqueados y seleccionados para posteriormente caracterizar la secuencia del péptido.

Por todo ello y desde hace más de 15 años, la tecnología del phage display se ha convertido en una alternativa para el búsqueda y producción de agentes preventivos y terapéuticos así como para el desarrollo de métodos de diagnóstico de múltiples enfermedades [128].

1.6.1 Tipos de bibliotecas

Todas las proteínas de cubierta del fago filamentosos pueden ser fusionadas a péptidos y proteínas extrañas con diversos grados de éxito. Para la clonación y la expresión de estas moléculas, la mayoría de los vectores usados recurren principalmente a una de las proteínas menores de la cápside, pIII, o bien, a la proteína mayor de la cápside, pVIII para realizar tales fusiones. Estos vectores utilizados en Phage display pueden ser clasificados como Tipos 3, 3+3 y 33 para fusiones en pIII y como tipos 8, 8+8 y 88 para fusiones en pVIII como se describe a continuación. En el caso del sistema de expresión Tipo 3 (o Tipo 8), todas las copias de la proteínas de la cápside del fago (pIII o pVIII) contienen el inserto. Por otro lado, también se puede clonar el gen que codifica el inserto dentro de un DNA plasmídico llamado fagémido. Posterior a la clonación, el fago recombinante que contiene al fagémido, puede ser recuperado después de la infección de la bacteria mediante una coinfección con fago ayudador (*helper*) el cual lleva consigo los genes nativos de pIII o pVIII. De esta manera se pueden generar los fagos Tipo 3+3 (o Tipo 8+8) en los cuales solamente una fracción de las proteínas de la cápside del fago contienen péptidos o proteínas extrañas. Por último, si tanto los genes nativos y mutantes están incluidos en el genoma del fago, se pueden obtener los fagos Tipo 33 (o Tipo 88) [128].

Generalmente, en Phage display, los péptidos o proteínas extrañas se expresan como fusiones N-terminal en las proteínas de cubierta del fago [129]. Mientras que en el sistema Tipo 3 la pIII puede tolerar grandes insertos de proteína en todas sus copias (de 3 a 5), en el sistema Tipo 8 la pVIII puede expresar eficientemente sólo péptidos de 6 a 8 aminoácidos de longitud en 2700 copias por partícula de fago. En contraste, en el caso del Tipo 8+8/88 proteínas de mayor tamaño pueden ser fusionadas también a la pVIII del M13 mediante la generación de fagos híbridos en vez de fagos recombinantes [130, 131].

También existen otros sistemas de expresión en Phage display que se han empleado con menos frecuencia y que utilizan otras proteínas de la cápside del fago como son la pVI [132], pVII y la pIX [133].

En la clasificación de George Smith (1993) se encuentran los principales tipos de vectores de fagos filamentosos para clonación utilizados en phage display [130]. Con la tecnología del phage display se pueden construir y obtener varios tipos de bibliotecas. Las bibliotecas de péptidos expresados al azar y las bibliotecas de fragmentos de anticuerpos (Fab y scFv), así como las bibliotecas que expresan genes, fragmentos de DNA genómico y cDNAs se han generado para el mapeo fino de epítomos e identificación de antígenos o anticuerpos monoclonales [124]. Estos distintos tipos de bibliotecas se han utilizado principalmente para el estudio de interacciones de distinta naturaleza como son: antígeno-anticuerpo [129, 134], proteína-proteína [135], ligando-receptor [136], DNA-proteína [137], sustrato-enzima [138] y antagonismo [139], entre otros fenómenos de importancia biológica.

Bibliotecas de péptidos:

Incluyen a un gran número de péptidos de longitud determinada cuyas secuencias han sido generadas al azar, es decir, clonando oligonucleótidos sintéticos de longitud determinada pero con codones inespecíficos con el fin de variar los residuos de aminoácidos de cada posición [140]. Los péptidos de las bibliotecas están fusionadas a la región amino terminal de cualquiera de las proteínas de la cápside. Generalmente, el tamaño de los péptidos es pequeño y pueden ir desde 6 [129] hasta 38 aminoácidos [131]. Respecto a su estructura, los péptidos desplegados en la superficie de los fagos presentan conformación lineal, pero también existen aquellos cuyos péptidos forman estructuras secundarias tales como asas o *loops* (péptidos cíclicos) mediante puentes disulfuro formados por residuos de cisteínas [141] y α -hélices [142]. Las bibliotecas de péptidos al azar sirven para la identificación de epítomos/mimótopos reconocidos por anticuerpos o para la identificación de secuencias lineales mínimas que se unan a otras moléculas blanco como receptores de superficie celular, receptores citosólicos, proteínas intra y extracelulares, DNA y otras [143].

Particularmente, las bibliotecas de péptidos expresadas en fagos filamentosos han despertado el interés como una fuente de un gran número de epítomos y han sido usados ampliamente en estudios sobre la unión antígeno-anticuerpo. Se ha demostrado que la selección de bibliotecas de fagos con anticuerpos, pueden identificar epítomos lineales, así como mimótopos que asemejan epítomos tanto lineales, discontinuos o bien, de naturaleza no peptídica provenientes de diversos antígenos. Con ello se han podido identificar biomoléculas específicas de enfermedad y/o patógenos, como es el caso de pacientes con artritis reumatoide [144], esclerosis múltiple [145] o púrpura trombocitopénica autoinmune [146, 147], mediante el empleo de sueros, o bien, de aquellos pacientes con neurocisticercosis [148] mediante el uso de líquido cefalorraquídeo. También se han logrado identificar epítomos relacionados con el péptido β -amiloides asociado a la enfermedad de Alzheimer [149]. Dichos epítomos se han propuesto para el desarrollo de reactivos diagnósticos o preventivos.

Bibliotecas genómicas y de cDNA.

Consisten en la clonación y expresión de fragmentos de DNA, ya sea de DNA genómico o bien, de cDNA que codifiquen para proteínas completas o sólo ciertos dominios de éstas [150, 151]. En la mayoría de los casos, estas proteínas o sus dominios mantienen su actividad de unión o enzimática normal, aún cuando están fusionados y expresados a la región N-terminal de alguna de las proteínas de la cápside del fago. En ocasiones, para obtener las bibliotecas genómicas y de cDNA, el gen o genes de interés se tienen que fragmentar al ser clonados cuando sólo se desean expresar ciertas regiones, dominios o epítomos de una proteína en particular [152]. Estos fragmentos de DNA se obtienen generalmente por la digestión al azar y parcial de DNAsas o por PCR.

Las bibliotecas genómicas son utilizadas para investigar los aspectos funcionales y estructurales de antígenos, enzimas o proteínas involucradas en la transducción de señales [153].

Bibliotecas de anticuerpos:

Se producen a través de la clonación de fragmentos de genes de inmunoglobulinas en algún vector de expresión de fagos filamentosos. Los dos principales tipos de bibliotecas de anticuerpos que existen son: las bibliotecas que expresan fragmentos Fab de inmunoglobulinas y las bibliotecas que expresan fragmentos variables de cadena sencilla o scFv (single chain fragment variable) en la superficie del fago M13. Tales expresiones de los fragmentos de anticuerpos ocurren sin aparente pérdida de la actividad, especificidad y reconocimiento de los anticuerpos [154, 155]. Las regiones codificadoras de las cadenas V_L y V_H pueden ser obtenidas de ratones “inmunologicamente vírgenes” (*naives*) o de ratones inmunizados [156] o bien de células germinales [157, 158]. Las bibliotecas de fagos recombinantes que expresan anticuerpos han sido desarrolladas principalmente para ser dirigidas contra antígenos blanco, ya sean como moléculas solubles o como moléculas de superficie, con fines terapéuticos y de diagnóstico.

2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

Se sabe que en sueros humanos hay una alta respuesta a epítomos de reacción cruzada de HPV, y 85-90% de los sueros de individuos infectados reaccionan con partículas rotas de VPB (virus del papiloma bovino) en ELISA. Esto podría ser de gran ventaja para el desarrollo de un método de diagnóstico que estuviera basado en la detección de un antígeno (s) común para todos los tipos de VPH. Por el contrario, existen epítomos inmunodominantes tipo específicos en la proteína L1 de los distintos VPHs, lo que permitiría también crear un método de diagnóstico que pueda diferenciar entre cada uno de los tipos de VPH.

De cualquier modo, aunque existen métodos de diagnóstico serológico para la infección por VPH útiles a nivel de investigación y que pueden ser aplicados en el área clínica, aún no se utiliza ninguno de ellos en el diagnóstico de rutina de esta infección, es decir, no se han podido aplicar en la población abierta. Lo anterior es debido, principalmente, a la dificultad y costo en la obtención de los antígenos requeridos para estos métodos. Por ello, el diseño de nuevos inmuno-reactivos para un ensayo diagnóstico serológico multicomponente para la infección por VPH podría ser una buena alternativa.

En esta investigación se ha aplicado la tecnología de Phage display para caracterizar la especificidad de los anticuerpos presentes en sueros de pacientes infectadas con VPH-16, y con ello identificar los péptidos que corresponden a algunos de los epítomos naturales o mimótopos (secuencias de aminoácidos que semejan y/o mimetizan al epítomo original) del virus. Así, las moléculas ya identificadas podrían ser utilizadas para el desarrollo de un examen simple y sensible para la infección por VPH, combinando los epítomos específicos para la enfermedad.

Con el uso del phage display se pretende identificar epítomos del VPH-16 con base en ensayos de bioselección y ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISAs) y con ello tratar de establecer un método de diagnóstico serológico confiable combinando los diversos epítomos específicos para la infección por VPH.

3. HIPÓTESIS

Los epítomos o mimótopos del VPH-16 expresados en los fagos filamentosos (phage display) pueden ser candidatos para el desarrollo de un inmunodiagnóstico de la infección por VPH-16 en pacientes mexicanas.

4. OBJETIVO

Diseñar, producir y evaluar biomoléculas que sirvan para caracterizar la especificidad de los anticuerpos contra el VPH-16 en pacientes mexicanas.

4.1 *Objetivos particulares:*

- 1) Determinación de mimótopos/epítomos del VPH-16 mediante sueros de pacientes infectadas con VPH o que se encuentran en alguna etapa de NIC o CaCu, usando bibliotecas comerciales de péptidos (7 y 12 aminoácidos y 7 aminoácidos flanqueados con cisteínas) expresados en fagos filamentosos.
- 2) Caracterización de las clonas seleccionadas mediante la secuenciación de su DNA.
- 3) Construcción de fagos recombinantes que expresen el gen L1 completo del VPH 16 y dominios inmunodominantes también del gen L1 mediante clonación en fagos filamentosos.
- 4) Evaluación de la capacidad de las clonas obtenidas en los objetivos 1 y 3 para ser reconocidos específicamente por anticuerpos presentes en sueros de pacientes infectadas con VPH y con ello analizar su posible aplicación en el diseño de un nuevo método de diagnóstico serológico.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Muestras biológicas

5.1.1 *Material Humano*

Los sueros utilizados durante el proyecto fueron colectados en la Clínica de Displasias del Hospital General de México durante 1997, previa aceptación firmada por las pacientes involucradas. El panel de pacientes a partir del cual se está realizando el presente estudio consta de 100 mujeres, a las cuales se les realizó el diagnóstico citológico (Pap) y colposcópico antes de obtener sus muestras. Aquéllas que mostraron evidencia de la presencia del VPH fueron preseleccionadas. De cada una de las pacientes se tomó una biopsia del área infectada, una muestra de sangre y una de secreción cervical. También se les realizó la confirmación molecular por PCR para la presencia y tipificación del virus del papiloma utilizando los *primers* MY09-MY11, que comprenden una región de ~ 450 pb dentro de ORF de L1 del VPH. Al mismo tiempo se les realizó el ensayo serológico de ELISA para confirmar la presencia de anticuerpos dirigidos contra L1 de VPH-16 utilizando VLPs.

De este panel de 100 pacientes, se decidió utilizar una población de 36 pacientes, de las cuales 28 fueron diagnosticadas con infección por VPH, 6 con NIC y 2 con CaCu. Todas las 36 fueron positivas para la presencia de DNA del VPH 16. El principal parámetro para incluirlas al inicio del proyecto se basó en las lecturas más altas en un ELISA para anticuerpos anti-L1. Treinta y uno de 36 individuos tuvieron IgA del tipo secretorio anti-L1 en secreciones cervicales y 20 de 36 tenían niveles detectables de IgG en suero (DO>1.0). Como controles negativos se utilizaron sueros provenientes de 24 donadores de sangre clínicamente saludables, obtenidos en el Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

5.1.2 Suero de ratón anti-L1 de VPH-16 (VLP)

El suero hiperinmune de ratón anti-L1 se produjo inmunizando 2 ratones de la cepa BALB/c con 50 µg de VLP (L1-L2 de VPH-16) en PBS por vía subcutánea mediante un reto y 3 refuerzos cada 10 días. De la misma manera, se emplearon 3 ratones de la misma cepa como controles negativos, a los que sólo se les inoculó 100 µl de PBS estéril por la misma vía y con el mismo plan de inmunización.

5.1.3 Suero de conejo anti-L1 de VPH-16 (VLP)

El suero hiperinmune de conejo anti-L1 de VPH-16 fue generosamente donado por el Dr. Raphael Viscidi de la Medical School University of John Hopkins, E.U. El suero anti-L1 fue obtenido de conejos inmunizados con VLPs de VPH-16.

5.1.4 Bacterias

Escherichia coli cepa TG-1 con el operón *lac* deletado:

supE Δ(hsdM-mcrB)5(r_k⁻m_k⁻ McrB⁻)thi Δ(lac-proAB) [F' traD36, Lac^f Δ(lacZ)M15].

5.1.5 Células de insecto:

Las células Sf900 son derivadas del ovario de la larva del artrópodo *Spodoptera frugiperda*. Los stocks de células guardados a -70°C en nitrógeno líquido fueron donados por la Dra. Leticia Rocha (Ins.Inv. Biomédicas, UNAM).

5.1.6 Preparación de células químicamente competentes con RbCl

Se tomó una colonia de bacterias de la cepa TG1 y se sembró en 10 ml de medio LB. El cultivo se dejó incubar a 37°C toda la noche y posteriormente se tomó 1 ml del cultivo y se hizo una dilución del cultivo 1:100 (1 ml del cultivo + 100 ml del medio LB). Se dejó incubar a 37°C hasta que las bacterias alcanzaran una absorbancia en OD₆₀₀ de 0.5

(aproximadamente 2 hr) y después se dejó incubar el cultivo en hielo por 10 minutos. Pasado este tiempo se centrifugó a 4000 rpm por 10 min a 4°C y se desechó el sobrenadante. Las bacterias precipitadas se resuspendieron suavemente en 30 ml de la solución TFB-I frío (30 ml por cada 100 ml de cultivo). Las bacterias se incubaron en hielo por 30 minutos y posteriormente se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y las bacterias sedimentadas se resuspendieron muy suavemente en 4 ml de la solución TFB-II. Posterior a ello, se hicieron alícuotas de células competentes de 100 y 200 µl, las cuales después se sometieron a un choque de congelación en baño de hielo seco con etanol y posteriormente las alícuotas se guardaron a -70°C.

5.2 Identificación de epítomos/mimótopos usando tres bibliotecas de péptidos y sueros de pacientes con infección por VPH.

Para identificar epítomos/mimótopos de las proteínas del VPH-16 se usaron 3 bibliotecas comerciales de 7, 12 y 7 aminoácidos flanqueados por cisteínas expresados al azar en el extremo amino de la proteína pIII de la superficie del fago filamentoso M13 (New England Biolabs Inc., Beverly, USA).

5.2.1 Selección por afinidad de fagos: bioselección

La bioselección se llevó a cabo utilizando placas de microtitulación (Boehringer Mannheim, GMBH-Germany) las cuales estaban cubiertas con anticuerpos anti-Fc de IgG humano. Esta modificación permitió seleccionar únicamente inmunoglobulinas con su fragmento Fab libre y eliminar cualquier otra proteína presente en la muestra humana [159]. Se evaluaron 3 sueros de pacientes VPH-16 positivos (suero 25, suero 42 y suero 51), que tenían los más altos niveles de anticuerpos de tipo IgG e IgA anti-VLP de VPH-16 (DO>1.0). Los sueros se agregaron a las placas sensibilizadas usando una dilución 1:20 en solución amortiguadora de fosfatos (buffer) 7.2 (PBS 1X) agregando 50 µl por pozo y se incubaron durante 1.5 hr a 37 °C. Posteriormente, se lavaron las placas 5 veces con PBS 1X y se incubaron a 4 °C toda la noche con solución bloqueadora. Al siguiente día se tomaron 10 µl (10¹¹ fagos/ml) de las bibliotecas de péptidos y se diluyeron en 400 µl de una

solución de albúmina sérica bovina al 0.1%(PBS-BSA 0.1%). De esta dilución se tomaron 100 µl por pozo y permanecieron en incubación a 4 °C por 4 horas. Después de lavar las placas con PBS frío se dejó incubar con 100 µl de PBS 1X a temperatura ambiente por 30 minutos (para eliminar los fagos no específicos). Se quitó el sobrenadante y para eluir los fagos específicos que quedaron unidos a las placas se agregó a cada pozo 100 µl de HCl-glicina (0.2 M glicina/HCl a pH 2.2) dejándose 10 minutos a temperatura ambiente y después 10 minutos a 37 °C. Se colectó el eluido de los pozos y se neutralizó con 25 µl de Tris (2 M, pH 11.07). *Figura 1.7*

5.2.2 *Titulación de los fagos seleccionados*

Después de cada ronda de bioselección de cada uno de los experimentos se procedió a determinar el número de los fagos eluidos. Después de la primera ronda de cada experimento se hicieron diluciones seriadas 1:1000 en medio de cultivo 2YT a partir de los fagos eluidos de las bioselecciones anteriores. Posterior a la última dilución, se agregaron los fagos a 200 µl de bacterias TG-1 (de un cultivo de toda la noche, $DO_{600} \sim 0.5$) más 10 µl de Xgal /IPTG, se dejó incubar por 5 minutos a temperatura ambiente. Después se agregaron 4 ml de medio Top Agar (fundido), se mezcló y se vació en una caja de petri preparada con medio LB agar para dejarse incubar a 37 °C toda la noche. Al día siguiente se obtuvo el título contando las unidades formadoras de placas (pfu).

5.2.3 *Amplificación de los fagos*

Para amplificar el eluido, un día antes se cultivaron bacterias de *E.coli* TG-1 en 10 ml de medio 2xYT en agitación a 37 °C toda la noche. De estas bacterias se tomaron 500 µl que se agregaron a 50 ml de medio 2xYT más 390 µl de los fagos eluidos, se dejaron en agitación por 4.5 hr a 37 °C. Posteriormente, se centrifugó a 10 000 rpm (12 000 g) por 10 minutos a 4 °C. Se tomaron 40 ml del sobrenadante y se mezcló con 1/6 de polietilenglicol (PEG/NaCl) manteniéndose a 4 °C toda la noche. Después de 16 horas se centrifugó durante 15 minutos a 10 000 rpm a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 1 ml de TBS. Posteriormente se transfirió la suspensión a un tubo de

microcentrífuga y se centrifugó por 5 minutos a 13 200 rpm (16 100 g) a 4 °C. Se volvió a transferir el sobrenadante a otro tubo de microcentrífuga y se reprecipitó con 180 µl de PEG/NaCl y se incubó en hielo por 1 hr. Pasado este tiempo, se centrifugó 10 minutos a 13 200 rpm (16 100 g) a 4 °C, se tiró el sobrenadante, se recentrifugó 2 minutos a 4 °C y se desechó el sobrenadante. Se resuspendió el botón en 200 µl de TBS y se centrifugó 5 minutos a 4 °C, para eliminar cualquier residuo insoluble. Finalmente, se transfirió el sobrenadante a otro tubo de microcentrífuga y se obtuvo eluido amplificado, que posteriormente se tituló para tener $\sim 10^{13}$ fagos/ml. De esta forma, los fagos amplificados se usaron para realizar las siguientes rondas de bioselección.

A partir de la segunda bioselección de cada experimento se llevó a cabo la selección al azar de las clonas de cada eluido (el número de clonas seleccionadas fue de 8 a 10 en cada experimento). Cada una de las clonas seleccionadas se amplificó en 10 ml de medio 2xYT más 100 µl de bacterias *E.coli* TG-1. Se incubaron 4.5 hrs. en agitación a 37 °C. Los siguientes pasos son iguales a los llevados a cabo en la amplificación de los eluidos obtenidos de las bioselecciones.

Posteriormente, también se titularon cada una de las clonas amplificadas. Se hicieron diluciones seriadas 1:1000 en medio 2xYT. Después de realizar las diluciones, se agregaron los fagos en 200 µl de bacterias *E.coli* TG-1 (de un cultivo de toda la noche) más 10 µl de Xgal-IPTG, se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente y se transfirió a 4 ml de top agar fundido y de ahí a una caja de petri con medio LB sólido, dejándose incubar toda la noche a 37 °C. Al día siguiente, se calculó el título de los fagos.

5.2.4 Purificación de DNA de cadena sencilla (DNAss) de los fagos

Para la purificación de DNA de la cadena sencilla de las clonas seleccionadas al azar, se tomó 1 ml del sobrenadante de la primera centrifugación del proceso de amplificación de cada clona seleccionada, se le agregó 400 µl de PEG/NaCl y se mantuvo a temperatura ambiente por 10 minutos, después se centrifugó durante 10 minutos a 13,200 rpm (16 100 g), se desechó el sobrenadante y se recentrifugó 30 segundos. Después de desechar el

sobrenadante se agregaron 200 µl de buffer de yoduro y se resuspendió el botón, se agregaron 500 µl de etanol absoluto, se mezcló y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó 10 minutos a 13 200 rpm, se tiró el sobrenadante y se agregaron 200 µl de etanol al 70%. Después de centrifugar 1 minuto, se tiró el sobrenadante y el botón se suspendió en 15 µl de agua bidestilada. Para verificar la presencia del DNA, se tomaron 2 µl de la muestra y se analizó en un gel de agarosa al 1%.

5.2.5 *Secuenciación del DNA de cadena sencilla de los fagos*

La secuenciación del DNA de los fagos seleccionados se realizó mediante el uso del kit "T7 Sequenase versión 2.0 Quick-Denature plasmid sequencing" (Amersham Life Science, OH) y dATP α -S³⁵ como se describe a continuación. Se incubaron a 37 °C durante 10 minutos: 1.5 µl del primer (Secuencing Primer -96 gIII, New England Biolabs, USA) con 2 µl de "plasmid reaction buffer" y 12.5 µl de DNA purificado de cada una de las clonas de fagos (0.5-3 g de DNA). Después se incubó en hielo 10 minutos. A la mezcla anterior se le agregó 1 µl de DTT (ditiotretitol) 0.1 M, 2 µl de labeling mix (dNTPs de G, A, T, C; 7.5 M c/u), 0.5 µl de ATP α -S³⁵ (3.75×10^{-13} Ci), y 1 µl de enzima (4 unidades de polimerasa), dejándose incubar 5 minutos a 37 °C. Posteriormente en 4 tubos por reacción se agregaron 2.5 µl de ddNTPs (80 M) nucleótidos análogos de terminación (G, A, T, C), a los cuales se les agregó 4.5 µl de la mezcla anterior dejándose a 37 °C por 5 minutos. Posteriormente, a cada uno de los tubos se les agregó 4 µl de la solución stop y se incubaron a 75 °C por 3 minutos. Inmediatamente se agregaron 6 µl de cada una de las muestras en los carriles de un gel de poliacrilamida al 8%. Se corrió 4 horas y 30 minutos a 1800 V, se secó el gel en un secador de geles durante 60 minutos a 80 °C. Se transfirió a un cassette en donde se expuso a una placa de rayos X durante 72 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se reveló la placa y se llevó a cabo la lectura de la cadena complementaria (3'-5') para luego convertirla a la cadena codificadora (5'-3') y así, determinar la secuencia de los tripletes que codifican para cada uno de los aminoácidos de los péptidos expresados en los fagos seleccionados.

5.3 Análisis de homologías

La similitud de las regiones de aminoácidos entre los insertos de péptidos de las clonas seleccionadas y las secuencias de proteínas del VPH se analizaron en SWISS-PROT protein sequenase database usando el programa de computadora WU-BLAST 2., ALIGN y LALING del Servidor de Genestream Bioinformatics Resource (<http://xylian.igh.cnrs.fr/>).

5.4 ELISA con las clonas de fagos seleccionadas y sueros de pacientes seropositivas para VPH 16.

Para comprobar la reactividad de las clonas con los sueros de las cuales fueron obtenidas se realizó el siguiente formato de ELISA.

Se sensibilizó una placa para ELISA de 96 pozos (Nunc Maxi Sorp, Denmark) con 100µl/pozo de un anticuerpo de cabra anti-IgG humano [Goat Anti-human IgG (Fc), Zymed Laboratories Inc, Sn. Fco. California, USA] diluido 1:200 en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS 1X, pH 7.4) y se incubó 1 hr a 37 °C. Se realizaron 4 lavados con PBS-Tween 0.1% y se utilizaron 200 µl/pozo de una solución bloqueadora para ELISA (Blocking Reagent for ELISA, Boehringer Mannheim, Germany) para cubrir los sitios de unión inespecíficos de la placa, dejándose incubar una hora a 37 °C. Se realizaron 4 lavados con PBS-Tween 0.1%. Al día siguiente, se agregaron 100µl/pozo de los sueros VPH-16 positivos en una dilución 1:100 en PBS-BSA 1% y se incubó 1.5 horas a 37 °C. Se hicieron 4 lavados con PBS-Tween 0.1% y se agregaron 100 µl/pozo de las clonas de los fagos (10^9 /pozo) en PBS-BSA 0.1% incubándose 3.5 horas a 4 °C. Se hicieron 4 lavados con PBS-Tween 0.1% y se agregaron 100 µl/pozo de un anticuerpo monoclonal anti-M13 conjugado con peroxidasa (HRP/anti M13 Monoclonal Conjugate, Amersham Pharmacia Biotech Inc. NJ, USA) en una dilución 1:2500 en PBS-BSA 1% dejándose en incubación 1 hora a 37 °C. Se hicieron 4 lavados con PBS-Tween 0.1% y se agregó 100 µl del sustrato para peroxidasa (ABTS single solution, Zymed Laboratories Inc. Sn. Fco. California, USA). Se midió la absorbancia a 405 nm en un lector de placas automático.

Las clonas más reactivas fueron seleccionadas para probarse en ELISA con un panel de sueros de pacientes VPH-16 positivas y para ellos se realizaron tres tipos de ELISA:

1) En el primer grupo de experimentos, se realizaron como se describen en trabajos previos [18,19, 20], 10^{10} ufp de clonas de fagos correspondientes diluidas en 100 μ l de PBS (pH 7.4) se agregaron a cada pozo de la microplaca y se incubaron toda la noche a 4 °C. El suero humano se diluyó 1:100 en PBS/ 1% BSA. Posteriormente se utilizaron anticuerpos de cabra anti-IgG humano conjugados con peroxidasa y el sustrato ABTS (Single Solution) (todos de Zymed Laboratories Inc.). Todas las muestras fueron probadas por duplicado. La absorbancia se midió a 405 nm .

2) En el segundo grupo de experimentos, los pozos de las microplacas se cubrieron primero con anticuerpo monoclonal anti-M13 (Amersham) diluido en PBS, y después de bloquear las placas con PBS/BSA 3%, se agregaron las clonas de fagos (10^{11} /ml). Después de 2 horas de incubación a 37 °C, las placas se lavaron con PBS-Tween 20, se agregó el suero humano y los siguientes pasos se realizaron como se describe arriba.

3) En el tercer grupo de ensayos, se repitió el proceso de bioselección para el ELISA: las placas fueron cubiertas con anti-IgG humano de ratón, bloqueadas con PBS/BSA, luego se agregó el suero humano y las placas se incubaron a 37 °C. Después del lavado, se agregaron las clonas de fagos, se incubó por 2 horas a 4 °C y se adicionó el anticuerpo monoclonal anti-M13 de ratón conjugado con HRP (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA). El sustrato ABTS fue usado para detectar los fagos capturados por los anticuerpos presentes en sueros humanos. Para el ELISA en el que se emplearon sueros de ratón anti-VLPs, el formato varió ligeramente: las placas se sensibilizaron con anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón, después se agregaron los sueros de ratón hiperinmune, seguido de las clonas de fagos a probar. Posterior a ello, se agregó un anticuerpo anti-M13 biotinilado y por último, se adicionó el anticuerpo conjugado con peroxidasa anti-biotina y la reacción se reveló con el sustrato ABTS.

5.5 Construcción de fagos recombinantes que expresan L1 del VPH 16

Para la construcción de fagos que expresen la proteína L1 del VPH 16 fusionado a la proteína pVIII de la superficie del fago se utilizó el fagémido pFACIB8, un vector del fago M13, se realizó la siguiente estrategia experimental:

5.5.1 Recuperación del genoma del VPH-16

El gen L1 se obtuvo a partir de un plásmido construido denominado pTHPV16 el cual fue donado gentilmente por el Dr. Jaime Berumen. Como el pTHPV16 fue construido a partir de la clonación del genoma completo del VPH 16 (8 Kb), dentro del vector pUC18 (2.5 Kb) en el sitio *Bam HI*, se realizó una digestión con la enzima de restricción que reconoce este sitio. El **cuadro 5.1** muestra los componentes de la reacción de restricción, la cual se incubó 1-2 hr a 37°C.

Cuadro 5.1
Restricción del pTHPV16 con la enzima *Bam HI*

Reactivo	Volumen
DNA pTHPV16 (0.3 µg/µl)	10 µl
Buffer R3 10x	5 µl
Enzima <i>Bam HI</i>	2 µl
H ₂ O miliQ	33 µl
Total	50 µl

Posteriormente, la restricción se sometió a electroforesis en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1% con bromuro de etidio y se observó bajo luz UV. Con la ayuda de un marcador de peso molecular de DNA se determinó la banda correspondiente al genoma completo del VPH16 (8 Kb). Esta última fue cortada del gel con una hoja de bisturí estéril. El fragmento del gel se fundió a 65°C durante 5-10 minutos y el DNA se eluyó del gel con la ayuda del estuche comercial *Concert Rapid Gel Extraction System* (Gibco BRL - Life technologies). Una vez purificado el DNA de VPH16 se resuspendió en agua ultra pura estéril.

5.5.2. Recuperación de la integridad del gen L1 (autoligación)

Después de eluir y obtener el DNA del VPH 16, se realizó una reacción de autoligación para recuperar la continuidad de L1 que es precisamente donde se encuentra el sitio *Bam HI*. La reacción de ligación se llevó a cabo con la enzima *ligasa T4* (Invitrogen) incubando la reacción a 16°C toda la noche (12-16 hr). En el siguiente cuadro (5.2) se describe el protocolo para la autoligación:

Cuadro 5.2
Autoligación del genoma deVPH 16

Reactivo	Volumen
DNA VPH 16 (0.05 µg/µl)	27 µl
Buffer ligase 5x	8 µl
Enzima <i>T4 ligasa</i> (5 U/µl)	2 µl
H ₂ O miliQ	3 µl
Total	40 µl

Una vez finalizada la reacción de autoligación, se procedió a una nueva purificación del DNA autoligado mediante el kit comercial *GFX-DNA Purification* (Invitrogen) y se eluyó con agua ultra pura estéril.

5.5.3. Amplificación del gen L1 mediante PCR

Se procedió a realizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el gen L1 con la enzima *Platinum Taq polimerasa* (Gibco) y los oligonucleótidos (*primers*) (Gibco-BRL) diseñados específicamente para ello. En el **cuadro 5.3** se muestra con detalle los componentes de la PCR y en el **cuadro 5.4** se muestran las condiciones y ciclos utilizados para llevar a cabo la PCR. Los *primers* amplifican un fragmento de 1592 pb desde la posición 5561 a la 7153 que corresponde íntegramente al gen L1 del VPH16. Además, estos *primers* se diseñaron y fabricaron de tal manera que presentaran los sitios de restricción adecuados para su subsecuente clonación en el vector pFACIB8 tal y como se muestra a continuación:

Primer 5' (5'-3'):

ATA TGA ATT CAA GAT ATC GGT ACC AAT GCA GGT GAC TTT TAT TTA CAT CCT
Eco RV *5561 pb ----* *5' gen L1*

AGT T
--- 5584 pb

Primer 3' (5'-3'):

GCT AAG ATC TAC GGC CGT GTC GAC CAG CTT ACG TTT TTT GCG TTT AGC AGT
Bgl II *7153 pb---* *3' gen L1*

TGT
--7136 pb

Cuadro 5.3
Protocolo de PCR para amplificar el gen L1 del VPH16

Reactivo	Volumen
DNA VPH 16 (0.04 µg/µl)	4 µl
Buffer 10x	10 µl
Mezcla de dNTPs (2 mM c/u)	10 µl
MgCl ₂ 25 mM	2 µl
Primer 5' LIRK (10 µM)	6 µl
Primer 3' LIBES (10 µM)	6 µl
Enzima <i>Taq polimerasa</i> (5 U/µl)	1 µl
H ₂ O miliQ	61 µl
Total	100 µl

Cuadro 5.4
Condiciones de PCR para amplificar el gen L1 del VPH16

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (mins: segs)	Ciclos
1	95	5:00	1
2.1	94	0:30	30
2.2	66	1:00	
2.3	72	1:30	
3	72	10:00	1
4	4	∞	

El producto de la PCR fue analizado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio y con la ayuda de un marcador de peso molecular de DNA (ladder 100 pb, *Gibco*). Posterior a ello se purificó la reacción total mediante el *GFX PCR DNA Purification Kit* (Invitrogen) y se eluyó el DNA con agua ultra pura estéril.

5.5.4. Preparación y digestión de los sitios de restricción del gen L1 producto del PCR

Para poder clonar el inserto L1, producto de PCR, fue necesario someterlo a una doble digestión para cortar los sitios de restricción con *EcoRV* y *Bgl II* que se encontraban en los extremos 5' y 3' respectivamente, ya que estos sitios estaban incluidos dentro de la secuencia de los primers utilizados para amplificar el gen. La doble digestión con las enzimas *EcoRV* y *Bgl II* (New England BioLabs) se realizó a 37°C durante 2 horas. Posterior a ello se inactivó a 65°C durante 20 minutos. Se repurificó el DNA de la reacción mediante el kit comercial antes mencionado. En el **cuadro 5.5** se muestran los detalles de la doble digestión simultánea.

Cuadro 5.5
Doble digestión del gen L1 producto de PCR

Reactivo	Volumen
DNA L1/PCR (0.2 µg/µl)	5 µl
Buffer R3 10x	3 µl
Enzima <i>EcoRV</i>	1 µl
Enzima <i>Bgl II</i>	1 µl
H ₂ O miliQ	20 µl
Total	30 µl

5.5.5 Preparación y digestión del vector del fagémido pFACIB8

El vector de fago pFACIB8 Este vector se preparó con el fin de subclonar en él al gen L1, producto de PCR. Para ello, primero se cortó al fagémido con la enzima de restricción *EcoRI* (New England BioLabs) incubando la reacción 1-2 h a 37°C e inactivando la enzima posteriormente a 65°C durante 20 min. En el **cuadro 5.6** aparecen los detalles de la digestión. La efectividad de la restricción se comprobó del modo antes mencionado.

Cuadro 5.6
Digestión del fagémido pFACIB8

Reactivo	Volumen
DNA pFACIB8 (0.2 µg/µl)	30 µl
Buffer R3 10x	6 µl
Enzima <i>EcoRI</i>	2 µl
H ₂ O miliQ	22 µl
Total	60 µl

Posterior a ello, se corrió toda la reacción para ser eluida del gel mediante el kit de purificación de DNA y así obtener únicamente el DNA del vector cortado. El DNA se eluyó con de agua miliQ estéril. Una vez purificado el DNA del pFACIB8 cortado con *EcoRI*, se sometió a una reacción con *T4 polimerasa* (New England BioLabs), incubándola a 11°C durante 15 min. Inmediatamente después se llevó al hielo para frenar la reacción. Los detalles aparecen en el *cuadro 5.7*

Cuadro 5.7
Llenado de los extremos cohesivos de pFACIB8

Reactivo	Volumen
DNA pFACIB8 (0.1 µg/µl)	40 µl
Buffer T4 pol. 5x	20 µl
DDT (100 mM)	0.5 µl
dNTPs (2 mM)	5 µl
Enzima <i>T4 DNA polimerasa</i> (10U/µl)	2 µl
H ₂ O miliQ	32.5 µl
Total	100 µl

Se prosiguió con una extracción de fenol-cloroformo (1:1) y el DNA del fagémido se precipitó con acetato de sodio y etanol frío y se incubó a -20°C toda la noche. Después de precipitar y lavar el DNA, éste se resuspendió en agua miliQ. Una vez que el fagémido pFACIB8 fue cortado con *EcoRI* y llenado con *T4 polimerasa*, se procedió a cortar en el segundo sitio de restricción con *BamHI* después de haber purificado el DNA igual que las veces anteriores como lo muestra el *cuadro 5.8*

Cuadro 5.8
Segunda restricción de pFACIB8 con la enzima Bam HI

Reactivo	Volumen
DNA pFACIB8 (0.05 µg/µl)	30 µl
Buffer R3 10x	4 µl
Enzima <i>Bam HI</i>	1 µl
H ₂ O miliQ	5 µl
Total	40 µl

5.5.6 Clonación de L1 en el vector pFACIB8

Una vez purificada la reacción y el DNA de pFACIB8 doblemente cortado se sometió a una reacción de defosforilación con una fosfatasa alcalina de intestino de cabra (CIAP, Gibco). Posterior a la defosforilación y su respectiva purificación, el DNA del vector pFACIB8 ya preparado se sometió a una reacción de ligación junto con el DNA del inserto L1 también ya preparado (ver sección 5.6.5) la enzima *T4 ligasa* (Invitrogen). El protocolo de la ligación con todos sus detalles aparece en el siguiente *cuadro 5.9*

Cuadro 5.9
Protocolo de ligación para clonar L1 en el vector pFACIB8

Ligación	Inserto L1 50 ng/µl	Vector F8 50 ng/µl.	Buffer 5x T4 ligasa	Enzima T4 ligasa 5 u/µl	H ₂ O	Volumen Final	Tiempo/temperatura
<i>LIF8</i>	12	3 µl	4 µl	1 µl	--	20 µl	14-16 h/ 16°C
<i>C_{neg}</i>	---	3 µl	4 µl	1 µl	12 µl	20 µl	14-16 h/ 16°C

5.5.7. Transformación de células competentes con los productos de la ligación

Se añadieron 5 µl de ambas reacciones de ligación a 100 µl de *E.coli* cepa TG1 químicamente competentes (ver sección 5.2.6) Se incubó la mezcla (bacterias + DNA) sobre hielo durante 30 min. y después se sometió a un choque térmico de 42°C durante 2 minutos. Enseguida, se incubaron las bacterias sobre hielo durante un minuto adicional justo antes de añadirles 900 µl de medio SOC. Las bacterias transformadas se colocaron en

una incubadora 37°C con agitación constante (~170rpm) durante 1 hora. Posteriormente se tomaron 200 µl de las bacterias transformadas y se sembraron en cajas de Petri con medio LB-agar suplementado con 50 µg/ml de ampicilina. Las cajas se dejaron incubar a 37°C durante toda la noche (8-10 hrs).

5.5.8 Selección, amplificación y purificación del DNA plasmídico.

De las cajas de Petri, se seleccionaron 3 colonias al azar que crecieron en un medio selectivo con ampicilina. Éstas se cosecharon con un asa bacteriológica estéril y se inocularon en 10 ml de medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml) + 1 ml de glucosa al 20% en tubos *Falcon* de 50 ml. Las bacterias se incubaron a 37°C durante toda la noche en agitación constante. Al día siguiente se tomaron 2 ml de cada cultivo y cosecharon las bacterias por centrifugación y se sometieron a lisis alcalina (minipreps) [160] para purificar el DNA de los plásmidos. Una vez obtenidos, los 3 DNAs se resuspendieron en agua ultra pura estéril y se tomó una alícuota de cada uno para verificar la clonación del inserto-L1 en el vector-fagémido mediante una restricción con la enzima *Bam HI* para linearizar el plásmido y luego a una doble restricción con *Acc* y *Eag* (New England BioLabs) para separar el inserto del vector. A estos plásmidos así obtenidos se les designó L1F8-1, L1F8-2 y L1F8-3 y se les almacenó a -20°C.

5.5.9 Producción y amplificación de los fagos recombinantes mediante el rescate con fago helper.

Se tomaron 100 µl del stock de bacterias con glicerol guardado a -20°C que contenían la construcción denominada L1F8-1. Se agregaron a 10 ml de medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml) + glucosa al 20%. El cultivo se incubó a 37°C durante 3 hr y posterior a ello se centrifugó 10 min a 4000 rpm para sedimentar las bacterias transformadas e inmediatamente después se desechó el sobrenadante. El pellet de bacterias se resuspendió en 10 ml de medio 2YT suplementado con ampicilina (100 µg/ml) y se le agregaron 80 µl de fago helper (*Helper Phage M13KO7*, Invitrogen). Se incubaron a 37°C durante 30 min sin agitación. Posteriormente se agregaron los 10 ml de cultivo a 500 ml de medio 2YT en un matraz de 2 lts, ya que la oxigenación abundante es determinante en el

crecimiento de las bacterias. El medio se suplementó con ampicilina (100 µg/ml) y kanamicina (75 µg/ml) y se incubaron a 37°C en agitación constante toda la noche. Debido a que el plásmido presenta resistencia a la ampicilina y el fago helper a la kanamicina, únicamente aquellas bacterias que contengan los 2 tipos de DNA al mismo tiempo y que se esté dando la recombinación entre ambos dentro de ellas, es decir, produciéndose los fagos recombinantes, serán capaces de sobrevivir y crecer en presencia de ambos antibióticos. Al día siguiente se centrifugó el cultivo a 5000 rpm durante 15 minutos y se obtuvo el sobrenadante donde se encuentran los ahora fagos recombinantes. De este sobrenadante se tomó una alícuota de 1 ml para purificar el DNA de cadena sencilla (DNAss) tal y como se describe en la sección 5.3.4. Se continuó procesando el resto del sobrenadante agregándole 40 ml (~1/6) de PEG-NaCl y se dejaron precipitando los fagos a 4°C toda la noche.

Finalmente se concluyó la purificación de los fagos recombinantes. Después de ~16 horas de precipitación con PEG, el sobrenadante se centrifugó durante 15 minutos a 10 000 rpm a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el botón de fagos se resuspendió en 1 ml de TBS. Después se transfirió la suspensión a un tubo de microcentrífuga y se centrifugó por 5 minutos a 13 200 rpm (16 100 g) a 4 °C. Se volvió a transferir el sobrenadante a otro tubo de microcentrífuga de 2 ml y se reprecipitó con 180 µl de PEG/NaCl y se incubó en hielo por 1 hora. Después, se centrifugó 10 minutos a 13 200 rpm (16 100 g) a 4 °C, se tiró el sobrenadante, se recentrifugó 2 minutos más a 4 °C y se desechó el sobrenadante. Se resuspendió el botón en 2 ml de TBS y se centrifugó 5 minutos a 4 °C, para eliminar cualquier residuo insoluble. De esta forma se transfirió el sobrenadante a otro tubo de microcentrífuga de 2 ml y se obtuvieron así los fagos recombinantes amplificados, que posteriormente se titularon para conocer su concentración final por ml.

5.5.10 Titulación de los fagos recombinantes

Una vez purificados los fagos recombinantes se procedió a determinar el número de los fagos por ml de 2 maneras diferentes. En ambas se hicieron 3 diluciones seriadas 1:1000, tomando inicialmente 1 µl del stock de fagos recombinantes suspendidos en TBS y se diluyó en 1 ml de medio de cultivo 2YT y se mezcló. De esta primera dilución se tomó 1 µl y se repitió el mismo paso para la segunda y tercera diluciones. Posterior a la última

dilución, se tomó un volumen determinado de ésta y se agregó a 200 μ l de bacterias TG1 (de un cultivo de toda la noche, $DO_{600} \sim 0.5$) y se dejó incubar por 5 minutos a temperatura ambiente. Después de este paso se realizaron 2 tipos de sembrado para la titulación. En el primero de ellos se agregaron 4 ml de medio Top Agar (fundido), se mezcló y se vació en una caja de Petri preparada con medio LB agar y se dejó incubar a 37 °C toda la noche. Al día siguiente se obtuvo el título contando las unidades formadoras de placas (pfu). En el segundo tipo de sembrado, los 200 μ l de bacterias incubadas con los fagos de la última dilución se plaquearon en una caja de Petri con LB agar con ampicilina (50 μ g/ml). Por otro lado se hizo lo mismo con otros 200 μ l de bacterias infectadas con los fagos de la última dilución pero se plaquearon en una caja de Petri con LB agar con kanamicina (37.5 μ g/ml). Ambas también se dejaron incubar a 37 °C toda la noche. Al día siguiente se obtuvo el título contando las colonias crecidas en el medio.

5.5.11 Comprobación de la obtención los fagos recombinantes.

Para comprobar que realmente se obtuvieron fagos recombinantes que expresan la proteína L1 del VPH16 en su superficie, se realizaron 3 metodologías: secuenciación del DNA, Western blot y ELISA (ver sección 5.8)

1) Secuenciación del DNA de cadena sencilla de los fagos recombinantes

Para confirmar la presencia del gen L1 fusionado al gen pVIII dentro del genoma del fago, se realizó la secuenciación manual del DNA de cadena sencilla de los fagos recombinantes. La metodología a seguir está descrita en la sección 5.3.5 salvo que en este caso, el *primer* utilizado para realizar la secuenciación no fue el que se usa para secuenciar insertos fusionados con el gen III (Secuencing Primer -96 gIII) sino el *primer* 3' F8 para secuenciar los insertos de DNA fusionados al gen VIII del fago M13.

2) *Western-Blot de fagos recombinantes*

Los ensayos de Western-blot para confirmar la presencia de la proteína L1 expresada en los fagos recombinantes se realizó mediante una electroforesis de proteínas en un gel de acrilamida-SDS al 10%. Se realizaron 2 electroforesis de proteínas bajo las mismas condiciones pero con fines distintos. Para ello, primero se aplicaron las muestras en el gel concentrador. En este caso las muestras utilizadas fueron stocks de fagos recombinantes LIF8 purificados y su respectivo control negativo (fago M13 nativo) los cuales fueron previamente cuantificados mediante la técnica de Bradford. Con los datos obtenidos se realizó una curva estándar para determinar la concentración de proteínas. En este caso se agregaron 10^{11} fagos/ml que equivalían a 1 μ g de proteína pura y al mismo tiempo el marcador de peso molecular para proteínas. Antes de agregar las muestras se hirvieron para desnaturalizar las proteínas y se mezclaron con el buffer de carga 2x. Después de agregar las muestras, se realizó la electroforesis a una corriente: 7.5 mA, voltaje: 60 V y potencia máxima ilimitada durante toda la noche.

Después de llevarse a cabo la electroforesis, se obtuvieron los geles de corrida (donde corrieron las muestras). Uno de los geles se utilizó para realizar en él una tinción con azul de Coomassie. Se colocó el gel en un recipiente se le agregó 75 ml de la solución de tinción (ác. acético al 5% + metanol 10%) y se dejó incubar en baño de agua a 55°C durante 20 min en agitación suave y constante. Posteriormente se reemplazó la solución de tinción con 70 ml de solución de tinción fresca + 7 ml del colorante de Coomassie y se incubó a 55 °C durante 30 min con agitación suave. Después de esto, se eliminó la solución de tinción y se agregaron 100 ml de la solución de enjuague-decolorante (ácido acético 7%) y se incubó durante 4 horas a 50°C en agitación suave reemplazando la solución decolorante cada 30 min. hasta que se pudo observar el gel transparente.

El otro gel se trasladó a una cámara de electrotransferencia y se colocó junto con una hoja de nitrocelulosa y se aplicó la corriente a 0.7 A y un voltaje de 90 V. Se dejó transfiriendo durante 2 hr y después se desmontó la nitrocelulosa, la cual se lavó varias veces con TNT 1x. Posterior a ello se incubó con solución de bloqueo durante 2 hr. La parte de la

nitrocelulosa que contenía al marcador de pesos moleculares se cortó para posteriormente teñirla con rojo Ponceau al 0.3% en ácido tricloroacético al 3% por 10 min y se enjuagó con ácido acético al 5% y se dejó secar. El resto de las muestras se lavaron varias veces con el buffer de lavado y después se cortó la nitrocelulosa en varias tiras para agregar después los sueros correspondientes a cada uno: suero hiperinmune de conejo anti-L1 comercial obtenido de VLPs rotas (Zymed y Dako) y suero de conejo control ambos diluidos 1:800 en TNT 1x/BSA 1%. Se dejaron incubar a 4°C toda la noche con agitación leve. Al día siguiente se lavaron varias veces y se les agregó el anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina anti-IgG de conejo diluido 1:10000 en BSA 1% o leche descremada al 2% ambas en sol. TNT 1x y finalmente se reveló con el sustrato NBT-BCIP (1 ml/tira). Se incubaron 15 min a temperatura ambiente y se paró la reacción con 1 ml de solución de EDTA 5 mM durante 15 min. Finalmente se enjuagaron las tiras con agua bidestilada y se dejaron secar.

5.6 Construcción de fagos recombinantes que expresan un dominio inmunodominante del gen L1 del VPH 16 y sus equivalentes en los tipos 11, 18 y 31.

Se diseñaron 4 oligonucleótidos de ~90 pb tomando como patrón la secuencia de DNA del VPH-16 que comprende desde el nucleótido 5777 hasta el 5840 que se encuentra dentro del gen L1 (residuo His 73 al residuo Gly 93) y las secuencias equivalentes de los otros 3 tipos de VPH se obtuvieron por alineamiento de homologías. Estos oligonucleótidos se diseñaron en base a la secuencia codificadora (5'-3') y se le adicionaron en cada uno de sus extremos, una pequeña secuencia extra que incluía un triplete para cisteína (*TGT*). Además, en la secuencia adicionada al extremo 5' se le agregó parte del sitio de restricción de *EcoRI*. Cada una de estas secuencias eran complementarias a cada uno de los 2 *primers*, 5' y 3', este último llevaba consigo parte del sitio de restricción *BamHI*. La secuencia de ambos primers y de los oligonucleótidos de cada uno de los dominios (asas) se muestra a continuación:

Primer 5' An51: 5'- AGCCGAACAG-3'

Primer 3' An 52: 5'- GATCAACACCATA -3'
Bam HI

Oligonucleótidos que contienen las secuencias de los dominios inmunodominantes de distintos tipos de VPH para clonar en el vector pFACIB 8

Oligo L16 (VPH 16):

5' AA TTC TGT TCG GCT ^{5777- L1} CAT CCT TAT TTT CCT ATT AAG AAG CCT AAT AAT AAT
Eco RI Primer 5' An51

AAG ATT CTG GTT CCT AAG GTT TCG GGT TGT TAT GGT GTT 3'
L1 - 5840
Primer 3' An52

Oligo L11 (VPH 11):

5' AA TTC TGT TCG GCT ^{5906-L1} CAT CCT TAT TAT TCG ATT AAG AAG GTT AAT AGT ACT
Eco RI Primer 5' An51

GTT GTT CCT AAG GTT TCG GGT TGT TAT GGT GTT 3'
L1-5962
Primer 3' An52

Oligo L18 (VPH 18):

5' AA TTC TGT TCG GCT ^{5751- L1} AAT CCT TAT TTT CGT GTT CTT GCT GGT GGT GGT AAT
Eco RI Primer 5' An51

AAG CAG GAT ATT CCT AAG GTT TCG GCT TGT TAT GGT GTT 3'
L1-5813
Primer 3' An52

Oligo L31 (VPH 31):

5' AA TTC TGT TCG GCT ^{5680-L1} CAT CCT TAT TAT TCG ATT CCT AAG TCG GAT AAT CCT
Eco RI Primer 5' An51

AAG AAG ATT GTT GTT CCT AAG GTT TCG GGT TGT TAT GGT GTT 3'
L1-5756
Primer 3' An52

5.6.1 Clonación de los dominios inmunodominantes de distintos tipos de VPH en el vector pFACIB 8

La clonación se realizó como se muestra el esquema de la **Figura 5.3**. Cada uno de los 4 oligonucleótidos que sirvieron como templados se sometieron a una simple reacción de *annealing* (pegado) en el termociclador junto con los 2 primers 5'-An51 y 3'-An52 como se muestra en el siguiente cuadro:

Cuadro 5.10
Reacción de *annealing*

Reactivo	Volumen
Templado [L11, L16, L18 o L31] (1µg/µl)	5 µl
Primer 5' (5 ng/µl)	30 µl
Primer 3' (2.5 ng/µl)	60 µl
Buffer TE	5 µl
Total	100 µl



Programa de *annealing* en el termociclador
95 °C bajando 2°C / 30 seg

Posterior al *annealing* se purificaron cada una de las reacciones mediante precipitación con acetato de sodio + etanol absoluto. Se incubaron a -20°C/1 hr y se centrifugaron en una microcentrífuga a 13000 rpm por 15 min. Inmediatamente después se desechó el sobrenadante y los botones se lavaron 2 veces con etanol al 70% y después se dejaron secar por aireación a temperatura ambiente. Finalmente se resuspendieron los botones de DNA en 50 µl de agua ultra pura estéril y se confirmó la recuperación del DNA de cada una de las 4 purificaciones mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio.

Una vez realizadas las reacciones de *annealing* con los distintos templados para cada tipo de VPH, se procedió a realizar la clonación de estos insertos en el vector pFACIB8. El

vector se cortó doblemente con las enzimas *EcoRI* y *BamHI* y purificó de la misma manera como se describe en la sección 5.6.6 con la única diferencia que en este caso no se llenaron ninguno de los extremos cortados. Así mismo se defosforiló tal y como se describe en la sección 5.6.7. Posteriormente se procedió a realizar la reacción de ligación con la enzima *T4 ligasa USB* como se muestra en el siguiente cuadro:

Cuadro 5.11
Protocolo de ligación para clonar los loops en el vector pFACIB8

Ligación	Inserto 0.3 µg/µl.	Vector F8 0.1 µg/µl	Buffer 10x T4 ligasa	Enzima T4 ligasa	H ₂ O	Volumen Final	Tiempo/temperatura
<i>L16</i>	15 µl	3 µl	2 µl	1 µl	--	20 µl	14-16 h/ 16°C
<i>L11</i>	15 µl	3 µl	2 µl	1 µl	--	20 µl	14-16 h/ 16°C
<i>L18</i>	15 µl	3 µl	2 µl	1 µl	--	20 µl	14-16 h/ 16°C
<i>L31</i>	15 µl	3 µl	2 µl	1 µl	--	20 µl	14-16 h/ 16°C
<i>C_{neg}</i>	---	3 µl	2 µl	1 µl	14 µl	20 µl	14-16 h/ 16°C

Posterior a la ligación, se procedió a realizar las transformaciones con las células químicamente competentes tal y como se describe en la sección 5.6.8. Después de la transformación se tomaron 3 colonias de cada una de las 4 cajas, se cultivaron y se les extrajo el DNA plasmídico mediante minipreps (ver sección 5.6.8). Una vez obtenidos los DNAs de cada colonia, se sometieron a una doble digestión con las enzimas *EcoRI* y *BamHI* para observar el patrón de liberación del inserto correspondiente mediante electroforesis. Finalmente, a partir de las colonias que dieron un patrón de restricción positivo, se procedió a realizar la producción y amplificación de los fagos recombinantes mediante el rescate con fago helper tal y como se describe en la sección 5.6.10.

La comprobación en la obtención de fagos recombinantes que expresen los loops inmunodominantes de la proteína L1 del VPH 16, 11, 18 y 31 en la superficie de los fagos, se logró por secuenciación del DNAs y ELISA.

5.7 Obtención de Virus Like-Particles (VLPs)

Las células Sf900 fueron utilizadas para la infección primaria y subsecuente purificación y propagación de los virus recombinantes. Los cultivos de Sf900 se mantuvieron a 27°C en medio de Grace TC-100 (Gibco-BRL) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 0.5% (inactivado por calor) y sin antibiótico y en constante agitación suave (90 rpm). Se hicieron revisiones periódicas al microscopio para descartar contaminaciones en los cultivos. Los cultivos de células se mantuvieron durante 3 o 4 días hasta alcanzar una confluencia del 80% en monocapa que equivale aproximadamente a 3×10^6 cel/ml. De los cultivos ya mencionados, se tomaron alícuotas tanto para proseguir con la producción de VLPs, la cual se realizó mediante la infección de los subcultivos de las células Sf900 en suspensión. Para ello se infectaron 1.4×10^9 células en un volumen de adsorción de 140 ml de medio de Grace conteniendo 0.5% de FBS bajo condiciones estériles con los baculovirus recombinantes que expresan las proteínas L1/L2 del VPH 16 que fueron proporcionados gentilmente por la Dra. Leticia Rocha del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Para el proceso de infección se utilizaron los baculovirus recombinantes con un múltiplo de infección (moi) de 10 unidades formadoras de placas (ufp) por célula y el tiempo de adsorción fue de 3 horas a 27°C en una agitadora a 0.1 ciclos/segundo. Las células se centrifugaron en un tubo de polipropileno de 50 ml (Costar) durante 10 min a 1000 rpm en una centrífuga Beckman TJ-6, el inóculo se removió y las células se resuspendieron en un volumen suficiente para obtener una densidad de 2.5×10^6 células/ml con medio de Grace conteniendo 0.5% de FBS en frascos "spinners". Las células se incubaron a 90 rpm durante 6 días a 27 °C en presencia de inhibidores de proteasas: leupeptina (2.5 µg/ml) y aprotinina (2.5 µg/ml) que se añadieron cada 24 horas para minimizar la degradación de las proteínas recombinantes por acción de las proteasas celulares. Posteriormente se observaron las células infectadas al microscopio para constatar que están siendo infectadas y produciendo los baculovirus recombinantes de acuerdo a sus características morfológicas (**figura 5.1**). El cultivo se cosechó y el medio se clarificó por centrifugación durante 10 min a 1000 rpm en una centrífuga Beckman J2-21. El medio clarificado fue extraído con un volumen igual de freón y centrifugado por 15 min a 3000 rpm en una centrífuga Beckman J2-21. La fase

acuosa se recuperó y fue cargada sobre un colchón de sacarosa al 40% en PBS y se centrifugó durante 2 hr a 34 000 rpm en un rotor SW55 (Beckman) para sedimentar las VLPs contenidas en el medio. Los precipitados se resuspendieron en 200 μ l de PBS durante toda la noche a 4 °C. Las VLPs se purificaron por ultracentrifugación a equilibrio en gradientes de cloruro de cesio (1.33 gr de CsCl/ml) durante 16 hr a 45,000 rpm en un rotor SW 55 Ti para ultracentrífuga Optima (Beckmann). Las bandas opalescentes visibles en el gradiente se colectaron con una micropipeta. La fracción correspondiente a las VLPs se diluyó en buffer TNC y se sedimentó por ultracentrifugación durante 120 min a 35000 rpm en un rotor SW50.1 (Beckmann), las VLPs se resuspendieron en PBS y se almacenaron a 4°C. La cantidad de proteína se cuantificó por el método colorimétrico de Bradford (Biorad) mediante una curva estándar con gamma globulina como proteína control. Las densidades ópticas se obtuvieron en un lector de ELISA a una longitud de onda de 570 nm. La confirmación de la purificación y obtención de VLPs se realizó mediante ELISA utilizando el suero de conejo anti-VLP de L1 del VPH-16 (Gráfica 1, sección 6.7).

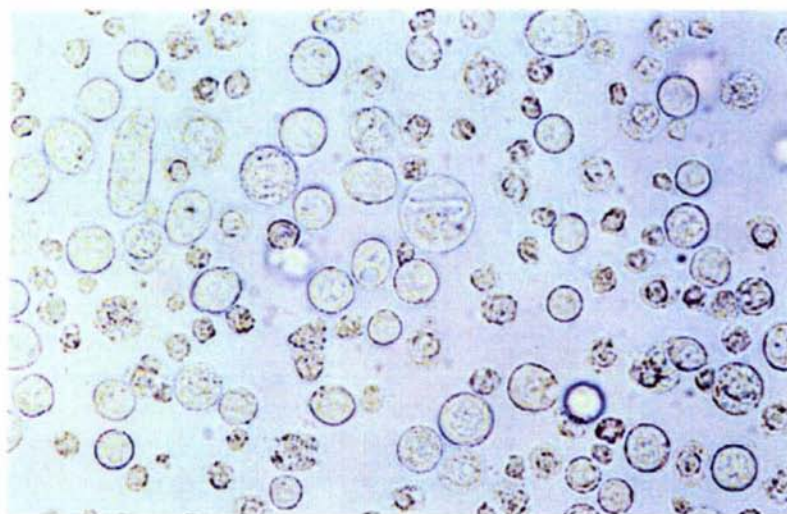


Figura 5.1 Cambios morfológicos inducidos en células de insecto por baculovirus. Las células Sf900 observadas al microscopio (40x) presentan diversas alteraciones tales como aumento de tamaño y numerosas vacuolas citoplasmáticas debido a la infección aguda por baculovirus recombinantes que expresan las proteínas L1/L2 del VPH (VLPs).

5.8 ELISAs con fagos recombinantes

Para comprobar la reactividad de las clonas de los fagos recombinantes que expresan tanto la proteína L1 (L1F8) como los dominios inmunodominantes (L16, L11, L18 y L31), se realizaron ELISAs con suero de conejo hiperinmune anti-L1(VLP) del VPH-16 y su respectivo control (suero de conejo no relacionado). Los ELISAs se realizaron mediante el siguiente formato:

Se sensibilizó una placa de microtitulación (para ELISA) de 96 pozos (Nunc Maxi Sorp, Denmark) con el extracto de las VLPs 50 ng/100µl/pozo, diluidas en buffer de carbonatos, como antígeno control positivo y en otros pozos se agregaron los fagos recombinantes a una concentración de 10^{11} fagos/100µl/pozo. En este caso el antígeno control negativo fue el fago M13 silvestre (sin inserto alguno) y se agregó a la misma concentración que el resto de los fagos. Los fagos se diluyeron en PBS 1x, pH 7.4. Después de agregar los antígenos a la placa se dejaron incubar a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se lavaron 4 veces con solución de lavado (Tween al 0.1% en PBS 1x), se bloqueó con una solución de BSA al 2% en PBS 1x para cubrir los sitios de unión inespecíficos de la placa y se dejó incubar 1 hora a 37°C. Después del bloqueo, se lavó la placa nuevamente 4 veces con la solución de lavado y se agregaron 100µl/pozo del suero de conejo (tanto del inmunizado con VLPs como del inmunizado con un antígeno no relacionado) diluido 1:4000 en PBS-BSA1%. La placa se incubó 1 hr a 37 °C y después se lavó como ya se mencionó. Posteriormente se agregó el anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (HRP de Amersham Pharmacia Biotech Inc. NJ, USA) en una dilución 1:10000 en PBS-BSA 1% dejándose en incubación 1 hora a 37 °C. Se lavó la placa como siempre y después se agregó el sustrato para peroxidasa (ABTS single solution, Zymed Laboratories Inc. Sn. Fco. California, USA). Finalmente se midió la absorbancia a 405 nm en un lector de ELISAs automático.

6. RESULTADOS

6.1. El proceso de bioselección aumenta el enriquecimiento de los fagos más afines.

Con el objeto de obtener los fagos más específicos por los anticuerpos anti-VPH, se probaron tres distintos tipos de bibliotecas de péptidos expresados en fagos: una de 7 y otra de 12 aminoácidos y una más de 7 aminoácidos flanqueados por cisteínas. Con ellas se realizaron 8 experimentos con 3 muestras de suero de pacientes que previamente habían demostrado estar infectadas por VPH-16. Además, estas 3 pacientes tenían altos niveles de anticuerpos IgG anti-L1 de VPH-16 en suero y anticuerpos IgAs anti-L1 VPH-16 en secreciones cervicales (Abs.>1.0)[161]. Se realizaron tres rondas de biopanning en cada experimento. Después de la primera ronda, se eluyeron cerca 10^4 o 10^5 fagos de la mezcla inicial de 10^{11} fagos, en 7 de los 8 experimentos. Posterior a la tercera ronda del biopanning, la cantidad de fagos seleccionados por afinidad, permaneció igual en tres experimentos con respecto a la segunda ronda pero se incrementó 10 veces con respecto a la primera. Sin embargo, en otro experimento la cantidad de fagos se incrementó 100 veces aunque en otro disminuyó 10 veces con respecto a la segunda ronda (**Tabla 3**).

Tabla 3. Aumento en la población de fagos provenientes de 3 bibliotecas de péptidos durante las rondas de bioselección utilizando sueros de pacientes VPH positivas.

<i>Suero/Biblioteca</i>	1ª Ronda		2ª Ronda		3ª Ronda	
	A	B	A	B	A	B
25/7	10^{11}	4.4×10^4	10^{12}	6.4×10^6	10^{12}	4×10^8
25/12	10^{11}	4.9×10^4	10^{12}	4.8×10^6	10^{12}	1×10^7
42/7	10^{11}	5.2×10^4	10^{12}	7.2×10^6	10^{12}	4×10^7
42/9	10^{11}	3.9×10^5	10^{12}	2.5×10^7	10^{12}	9.2×10^7
42/12	10^{11}	8×10^2	10^{12}	1.3×10^6	10^{12}	1.6×10^5
51/7	10^{11}	7.2×10^4	10^{12}	2×10^6	10^{12}	4×10^7
51/9	10^{11}	1.4×10^5	10^{12}	4×10^6	10^{12}	5.9×10^6
51/12	10^{11}	1×10^4	10^{12}	7.8×10^5	10^{12}	3.6×10^5

A = El número total de fagos agregado a la placa cubierta con anticuerpos.

B = El número total de fagos eluidos de las placas cubiertas con anticuerpos después de cada ronda.

Los datos anteriores tentativamente demuestran que hubo un enriquecimiento de la población de los fagos más afines y la eliminación de aquellos menos afines en cada ronda de bioselección. Por lo tanto se puede pensar que existe una capacidad de reconocimiento y selección específicas durante el proceso de bioselección.

6.2 Las secuencias de las clonas seleccionadas forman consensos y algunas tienen homología con la proteína L1 de VPH 16.

Ciento cuarenta y una unidades formadoras de placas (ufp) se seleccionaron al azar después de la tercera ronda de cada uno de los 8 experimentos realizados. Posterior a ello, se obtuvieron las secuencias de DNA de los insertos peptídicos de cada una de estas 141 clonas de fagos. Las secuencias de aminoácidos correspondiente a cada inserto peptídico se dedujeron a partir de las secuencias de DNA de cada una de las clonas de fagos. Estas secuencias de aminoácidos se encuentran resumidas en la **Tabla 4**. Todos los péptidos en el grupo A tienen residuos de metionina (M) en la posición 1 y residuos de lisina (K) en la posición 7. En todos los péptidos del grupo B está conservado el residuo de metionina en la posición 1. Una de las secuencias (FHENWPS) se encontró 10 veces, dos de las secuencias (SPYDGFSAARRG y SPINNTKPHEAR) se encontraron 9 veces, una secuencia (MPMTPAK) se encontró 8 veces, otra secuencia (MKIPNNKLFLPV) se encontró 4 veces y tres secuencias se encontraron 2 veces cada una (MHPSNSKSPPRH, QTIGNAKPLGRV, SDSHVGKLSLAH). El hallazgo de estos consensos demuestra la capacidad de selección específica del phage display por ciertas secuencias parecidas.

La comparación de secuencias entre los insertos peptídicos de las clonas seleccionadas y proteínas de VPH 16 reveló algunas homologías. Así, los péptidos SPINNTKPHEAR y MKIPNNKLFLPV, seleccionados 9 y 4 veces respectivamente, tienen homología con parte de la secuencia de la proteína L1 de VPH 16 (**Tabla 5**). Otras 5 clonas mostradas en la misma tabla tienen homología con la misma región de L1 de VPH-16. Esto demuestra que con las bibliotecas de péptidos se pudieron identificar epítomos lineales de nuestro antígeno de interés (L1 de VPH 16).

Grupo A

MPVNDTK	(51-7)
MPPCNYK	(51-7)
MKVSNSK	(51-7)
MKVSNHKDIPPL	(42-12)
MHPSNSKSPPRH ²	(42-12)
MKIPNNKLF ⁴	(25-12)
MPMTPAK ⁸	(42-7)
MPLQNSK	(42-7)
MRPDNAK	(42-7)
MPLVSQK	(42-7)
MRLETSK	(42-7)

Grupo B

MSSQFYQ	(25-7)
MKVNILR	(51-7)
MSPRFPQ	(51-7)
MPLTQKD	(42-7)
MPLTQKD	(42-7)
MPLSQNVAPFRT	(42-12)
MPSESHTSVPT	(25-12)
MHQTTAQPLRSP	(25-12)
CMPYGSLAC	(51-9)
CMNKPAYAC	(42-9)
CMKNMKQPC	(51-9)

Secuencias sin consenso:

TISRTGI	(51-7)	AASMRTELAHSK	(25-12)	APYKLAMRDQA	(42-12)
LKLRHLP	(51-7)	THMQGWWWKPPW	(25-12)	QTIGNAKPLGRV ²	(42-12)
SASHPPP	(51-7)	GSGLPLYMLWLT	(25-12)	KDQTNYP	(42-7)
DPASLFH	(51-7)	LPLGQHQFNPSG	(25-12)	GKTTAAS	(42-7)
GLLTAYV	(51-7)	SGMMSNATIANV	(25-12)	WAPYMTN	(42-7)
TLQALPS	(25-7)	ANQSLPDRLYKS	(25-12)	GEADFNM	(42-7)
WTYSPIA	(25-7)	KLALSNGAIAQP	(25-12)	CSSGPIAPC	(42-9)
SLPKMLS	(25-7)	LSDTQAVYSADN	(25-12)	CALHPPPQC	(42-9)
ARLLFGI	(25-7)	QPIENYKLMPT	(25-12)	CKEGKSPC	(42-9)
FQRDDL	(25-7)	QLPTILGVPTQP	(25-12)	CNASTSMQC	(42-9)
LHSRPLP	(25-7)	AAPDDVLPNPAR	(25-12)	CTKMKKNIC	(42-9)
SCFFGRL	(25-7)	RFNPDQAPSWPP	(25-12)	CNKLSRPVC	(42-9)
NAMSPPA	(25-7)	HAHSRMLSPMP	(51-12)	CPVYKPC	(42-9)
FHLSTAS	(25-7)	SPINNTKPH ⁹	(51-12)	KHARTSE	(25-7)
NRLHAYP	(25-7)	TLKLQIRLPETI	(51-12)	QTATLTY	(25-7)
AMGYQHP	(25-7)	QLNKIQHFTTNS	(51-12)	CAKVVQADC	(42-9)
HLVCRPS	(25-7)	IKIWTRKASLAM	(51-12)	CTHPEILFC	(42-9)
IVQLTQW	(25-7)	AKFNNARIPGFM	(51-12)	CQLDSQKIC	(51-9)
YSHADTM	(25-7)	FVPQLNLHTPKN	(51-12)	CLEASYFRC	(51-9)
AGNDRMH	(25-7)	KESPTNHKTRLW	(51-12)	CSPLTHAIC	(51-9)
IANYYGG	(25-7)	SPYDGFSAARRG ⁹	(42-12)	CNTRLLHNC	(51-9)
CDATTLH	(25-7)	SDSHVGKLSLAH ²	(42-12)	CIPASGQTC	(51-9)
DSFTPRA	(25-7)	SPLFLDQRSLTP	(25-12)	CYETGPWAC	(51-9)
FVAHSP	(25-7)	PSACWEAGAPSR	(25-12)	CNFTHPGYC	(51-9)
SPIAPPR	(25-7)	NAPPPLFWSHQW	(25-12)	CAEPNNLLC	(51-9)
DMGPGRS	(25-7)	IVGTGPQPSSTV	(25-12)	CNSSMNSC	(51-9)
FHENWPS ¹⁰	(25-7)	HDQTLPGGVRLH	(42-12)	CTLSHGpsc	(51-9)

Tabla 4. Resumen de las secuencias de las clonas de fagos aisladas en los ensayos de bioselección usando sueros de los pacientes 25, 42 y 51 con las bibliotecas de 7, 9 y 12 aminoácidos. Los residuos idénticos se encuentran en negrillas. Los números en los paréntesis indican el ensayo en el cual se obtuvo la clona con dicha secuencia (no. de suero-tipo de biblioteca). El superíndice indica el número de veces que se aisló la clona con la misma secuencia en forma independiente.

P I K K P N N N K	L1 de VPH 16
M K I P N N - K L F L P V	(25-12) ⁴
S P I N N T K P H E A R	(51-12) ⁹
M K V S N S K	(51-7)
M K V S N H K D I P P L	(42-12)
M <i>H</i> P S N S K S P P R H	(42-12)
M P L Q N S K	(42-7)
M R P D N A K	(42-7)

Tabla 5. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de insertos peptídicos de las clonas de fagos seleccionadas por phage display y que tienen homología con la proteína L1 de VPH 16 (secuencia de residuos de aminoácidos de la Prolina 77 hasta el residuo de Lisina 85). Las letras en negrilla indican residuos idénticos y las letras cursivas indican residuos homólogos. Los números entre paréntesis indican los experimentos de selección en los cuales se obtuvieron las clonas de fagos mencionadas (número del suero seguido de un número que indica la longitud del péptido en la biblioteca utilizada). El superíndice indica el número de veces que se aisló la clona con esa secuencia en forma independiente.

Mediante el uso del programa Swiss-PDB Viewer versión 3.7 (b2) y la secuencia de la proteína L1 del VPH16 obtenida del Protein Databank Database, se elaboró un modelo tridimensional de la proteína L1 (**Figura 6.1**). En el modelo, se identificó la región de la proteína de L1 (la secuencia de residuos de aminoácidos de la Prolina 77 hasta el residuo de Lisina 85 : PIKKPNNNK) que compartía similitud con las secuencias de la **Tabla 5**. Esta región forma parte de una asa que se encuentra expuesta y que en 1990, Müller y colaboradores reportaron como un posible epítipo inmunodominante [162].

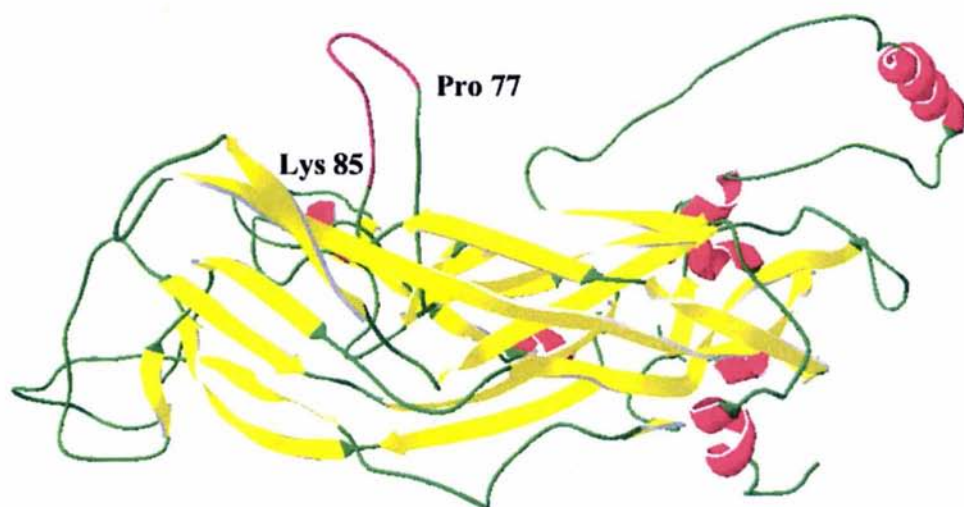


Figura 6.1 Modelo de un monómero de la proteína L1 del VPH-16. La estructura incluye los residuos 20-474. La secuencia de residuos de aminoácidos de la Pro 77 hasta el residuo de Lys 85 (PIKKPNNK), forman parte de una asa que se encuentra expuesta y que anteriormente había sido reportado como un posible epítipo de L1 [162].

6.3 Clonas de fagos seleccionadas son reconocidas en ELISA por sueros de pacientes infectadas con HPV.

Las propiedades de unión y de reconocimiento de las clonas de fagos seleccionadas se analizaron en ELISA. En todos los ELISAs con fagos, la especificidad del reconocimiento fue confirmada mediante el uso de un fago no relacionado (B1A), obtenido de otro experimento [148]. Así, 17 de 36 sueros de pacientes mostraron reactividad con al menos una de las clonas de fagos como se puede observar en la **Tabla 6**, y ninguno de estos sueros reaccionó con el fago no relacionado. Solamente 2 de 24 sueros control reaccionaron con una de las clonas positivas. Las clonas de fagos con la secuencias SPINNTKPHEAR (clona 25/12-3) y MKIPNNKFLPV (clona 51/12-13) reaccionaron con 8 de los 15 sueros HPV 16 positivos y no se observó reacción con ninguno de los 24 sueros control. En resumen, 17 de 36 (48%) sueros de pacientes reaccionó con al menos una clona de fago seleccionada durante los biopannings, y solamente 2 de 24 sueros control mostraron reacción con las clonas seleccionadas.

Tabla 6. Algunas de las clonas de fagos seleccionadas que reaccionan en ELISA con 17 sueros de pacientes VPH positivas.

Suero:	B1A*	42-7-3*	42-7-5*	42-7-7*	42-7-16*	25-12-13*	51-12-3*
<i>HPV13</i>	0.394	ND	ND	0.715	ND	ND	ND
<i>HPV20</i>	0.213	0.479	0.398	0.482	0.385	ND	ND
<i>HPV27</i>	0.248	1.159	0.623	0.934	0.688	0.83	0.4
<i>HPV42</i>	0.205	1.496	0.927	2.026	1.698	ND	ND
<i>HPV51</i>	0.23	ND	ND	0.801	0.632	0.29	0.61
<i>HPV56</i>	0.090	0.447	0.225	0.120	0.139	ND	ND
<i>HPV72</i>	0.367	ND	ND	0.727	0.590	ND	ND
<i>HPV75</i>	0.205	ND	ND	0.532	0.288	ND	ND
<i>HPV80</i>	0.365	ND	ND	0.352	0.635	ND	ND
<i>HPV83</i>	0.237	ND	ND	0.634	0.198	ND	ND
<i>HPV93</i>	0.163	0.292	0.210	0.748	0.163	0.309	0.65
<i>HPV98</i>	0.229	ND	ND	0.494	0.291	0.25	0.2
<i>HPV25</i>	0.21	0.29	0.24	0.3	0.16	1.46	1.34
<i>HPV66</i>	0.2	ND	ND	0.31	ND	0.42	0.28
<i>HPV19</i>	0.179	ND	ND	ND	ND	0.27	0.51
<i>HPV76</i>	0.21	ND	ND	0.27	ND	1.44	0.385
<i>HPV24</i>	0.2	ND	ND	1.37	ND	0.28	1.55

Nota: Solamente el suero que tuvo una lectura de absorbancia superior a la del control negativo y con al menos una clona de fago está incluido en esta tabla. Los resultados están expresados como un valor promedio de los duplicados. Los valores positivos se encuentran en negrillas. Cada suero incluido fue positivo en al menos 2 experimentos independientes. Se utilizaron 24 sueros de mujeres sanas donadoras de sangre como controles negativos. 22 de estos sueros tuvieron valores de absorbancia <0.2. * *Nomenclatura de las clonas de fagos analizadas.*

6.4 La bioselección con suero de ratón inmunizado con L1 de VPH-16 (VLP) produjo clonas que expresan secuencias peptídicas consenso.

Una biblioteca comercial de 7 aminoácidos flanqueados por cisteínas se sometió a un proceso de bioselección (sección 5.2.1) utilizando para ello un suero anti-L1 de VPH-16 obtenido de ratones inmunizados con L1 (VLP) del VPH-16. Después de 3 rondas de bioselección se aislaron 44 clonas de fagos que posteriormente se sometieron a ELISA para determinar el porcentaje de reconocimiento de las IgGs del suero hiperinmune anti-L1 de ratón. Como antígeno control positivo se utilizaron VLPs (L1 de VPH-16) y como control negativo se utilizó a un fago (B1A) obtenido de otro experimento [148]. De acuerdo a las lecturas obtenidas, se seleccionaron para su posterior secuenciación. Después de obtener las secuencias de aminoácidos de cada uno de los insertos, se pudo demostrar que las 31 clonas que resultaron positivas en ELISA, presentaron entre ellas una alta homología en sus secuencias peptídicas (**Tabla 7**) y algunas de ellas se seleccionaron más de una vez (3, 4 y 44; 6, 23 y 35; 11 y 12; 16 y 31 y 34 y 40). Sin embargo, estas clonas presentaron un 0% de homología lineal con la proteína L1.

Por otro lado, también se secuenciaron las 8 clonas que al ser probadas en ELISA dieron lecturas negativas. Los resultados demostraron que las secuencias obtenidas de estas clonas no presentaron ninguna homología en comparación con aquéllas que sí resultaron ser positivas en ELISA (**Tabla 8**).

Lo anterior demostró una gran capacidad de phage display para seleccionar y producir clonas de fagos altamente reactivas y que son reconocidas específicamente por anticuerpos dirigidos contra el antígeno nativo (en este caso VLP de L1 de VPH-16). A pesar de que el análisis de homologías reveló que ninguna de las secuencias de estas clonas representaba algún epítipo lineal de la proteína L1, se puede pensar que estas secuencias representan uno o varios epítipos conformacionales de L1.

Tabla 7. Secuencias de clonas de fagos de la biblioteca c7c seleccionadas con suero anti-VLP de ratón y *positivas* en ELISA.

No.de la clona	Secuencia de aminoácidos	O.D con suero anti- VLP	O.D con suero normal
2	A C R R W M H P N C	1.756	0.248
3, 4, 44	A C R L Y M N H L C	1.354	0.197
6, 23, 35	A C R P Y M L H L C	1.463	0.163
7	A C K P Y M L H W C	1.483	0.410
8	A C P T F A L H L C	1.682	0.424
9	A C R S Y M S H L C	1.808	0.600
10	A C N I K H D P F C	1.579	0.267
11, 22	A C R P Y M T H L C	1.584	0.419
12	A C R P N M S H L C	0.588	0.225
14	A C R P W M L P W C	1.528	0.495
15	A C P M W A A H L C	1.502	0.402
16, 31	A C R P F M S H L C	1.491	0.130
20	A C R P Y M Q H L C	0.532	0.232
24	A C R P W M H E P C	1.254	0.090
25	A C P S F A W D I C	0.963	0.065
26	A C P L W A K H L C	0.494	0.056
27	A C R P W M H V P C	1.182	0.065
28	A C R P W M S Y L C	1.321	0.101
30	A C P Q W A W H I C	0.739	0.057
33	A C R P D M S H L C	1.141	0.056
34, 40	A C T G I G V T I C	1.018	0.105
38	A C P T W A R H L C	0.575	0.0475
41	A C R P W M H H V C	1.057	0.075
42	A C R P W M Q P W C	0.864	0.067

Tabla 8. Secuencias de las clonas de fagos de la biblioteca c7c seleccionadas con suero anti-VLP de ratón y *negativas* en ELISA:

No. de la clona	Secuencia de aminoácidos	OD con suero anti-VLP	OD con suero normal
15	A C M T W F G T P C	1.502	1.402
18, 19, 39	A C T G P G P W F C	1.728	1.528
21	A C T N R A T T P C	0.334	0.353
36	A C G P Y E T M H C	0.0665	0.068
37	A C P W P K L K S C	0.112	0.085
43	A C T D T T K A L C	0.076	0.070

Nota: Los residuos de alanina (A) y cisteínas (C) que aparecen de forma invariable, forman parte de la construcción de las bibliotecas de 7 aminoácidos flanqueados por cisteínas.

6.5 Obtención de fagos recombinantes que expresan L1 del VPH 16

La construcción de los fagos que expresan la proteína L1 del VPH 16 fusionado a la proteína pVIII de la superficie del fago M13 se logró después de llevar a cabo la estrategia experimental que se muestra en la **Figura 6.2**

El gen L1 se obtuvo a partir de un plásmido denominado pTHPV16. Ya que el pTHPV16 se construyó clonando el genoma completo del VPH 16 (8 Kb) dentro del vector pUC18 (2.5 Kb) en el sitio *Bam HI*, para poder obtener el genoma del VPH-16 se tuvo que realizar precisamente una reacción de restricción con la enzima *Bam HI* (**Figura 6.2**).

El patrón de electroforesis reveló que la digestión con *Bam HI* produjo 2 bandas: una de 8 Kb y otra de 2.5 Kb correspondiente al genoma del VPH 16 y al de pUC18, respectivamente.

Después de eluir y obtener el DNA del VPH 16 se realizó una reacción de autoligación. Como el genoma del VPH 16 estaba linearizado en el sitio *Bam HI* para su clonación en pUC18 y este sitio se encuentra precisamente dentro del gen L1 evidentemente la integridad de este gen estaba interrumpida. Para recuperar la continuidad de L1 que era el gen de interés, se realizó una reacción de autoligación

Una vez autoligado el genoma del VPH-16 se procedió a realizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con la cual se logró amplificar el gen L1 del VPH-16. El producto obtenido fue un fragmento de 1592 pb que corresponde al tamaño del gen L1 del VPH-16 el cual fue analizado mediante electroforesis en un gel de agarosa y se determinó mediante un marcador de peso molecular de DNA (**Figura 6.3**).

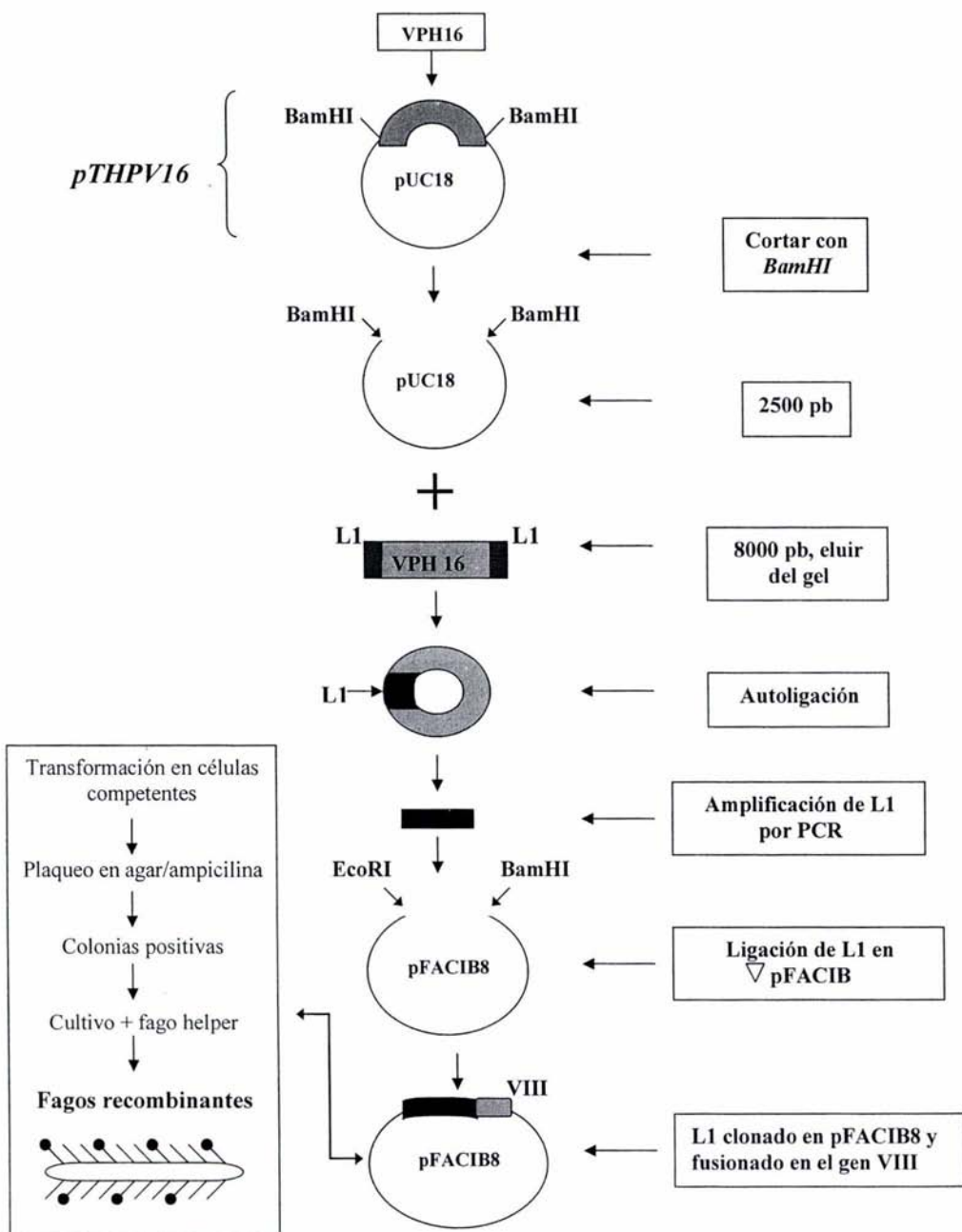


Figura 6.2 Pasos que se siguieron para clonar y expresar el gen L1 del VPH-16 en la proteína VIII del fago filamentosos M13.

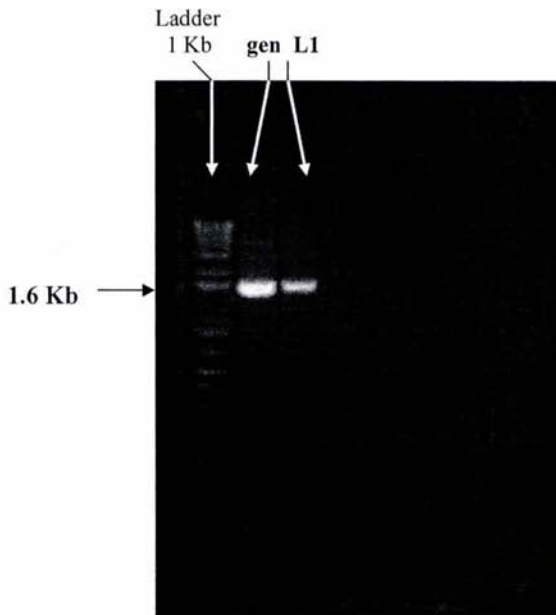


Figura 6.3 Obtención del gen L1 por PCR. La electroforesis en gel de agarosa revela la obtención del gen L1 del VPH-16 como producto de PCR. (1): Marcador de DNA (ladder) de 1 Kb; (2) y (3): Gen L1 de ~1.6 Kb provenientes de 2 diferentes ensayos.

Para poder clonar el inserto L1 como producto de PCR, se sometió el DNA a una doble digestión para cortar los sitios de restricción con *EcoRV* y *Bgl II* que se encontraban en los extremos 5' y 3' respectivamente y por otro lado se preparó al vector de fago pFACIB8. Este vector es un fagémido, es decir un plásmido que es capaz de replicar su DNA pero no de producir partículas virales, ya que a diferencia de un fago filamentoso, carece de genes del fago M13 para su ensamblaje. Este fagémido pFACIB8 porta el sitio de origen de replicación de *E.coli* y M13, el gen VIII de M13 y además el gen de la β -lactamasa que otorga resistencia a la ampicilina. Este vector se usó con el fin de subclonar en él al gen L1.

Finalmente se logró la clonación mediante una reacción de ligación y después de transformar células competentes se obtuvieron, a partir de 3 colonias escogidas al azar, los fagémidos a los cuales se les designó L1F8-1, L1F8-2 y L1F8-3. Una vez obtenidos, los

DNAs de estas 3 clonas se sometieron a una restricción con la enzima *Bam HI* para linearizar el plásmido con la cual se obtuvo una banda de ~4.6 Kb. Posteriormente se sometió a una doble restricción con *Acc* y *Eag* (New England BioLabs) para separar el inserto del vector y con lo cual se obtuvieron dos bandas de 1.6 Kb y 3 Kb correspondientes a L1 y a pFACIB-8 respectivamente (dato no mostrado). Así se pudo comprobar la clonación del inserto-L1 en el vector-fagémido. La producción y amplificación posteriores de estos fagos se logró mediante el rescate con fago helper. Por último, los fagos recombinantes amplificados se titularon y la concentración final obtenida fue de 10^{13} ufp/ml.

Los fagos recombinantes que expresan la proteína L1 del VPH 16 fusionada a la proteína de superficie pVIII del fago filamentosos, sólo lo hacen en un 30% del total de las 2700 unidades de la proteína pVIII, es decir, aproximadamente 900 de estas unidades pueden estar fusionadas en su N-terminal a la proteína L1. El hecho de que realmente se obtuvieron fagos recombinantes que expresan la proteína L1 del VPH16 en su superficie, se pudo demostrar además de la secuenciación de DNA (sección 5.5.11-1), mediante Western blot y ELISA como se explica a continuación.

6.5.1 Comprobación de la expresión de L1 en los fagos recombinantes LIF8 mediante Western-blot

Se realizaron ensayos de Western-blot para confirmar que la proteína L1 del VPH-16 estaba siendo realmente expresada como una proteína de fusión en la superficie de los fagos recombinantes. Después de la electrotransferencia, las bandas de proteínas se revelaron mediante el uso de sueros comerciales de conejo anti-L1. Como estos sueros comerciales fueron obtenidos a partir de conejos inmunizados con VLPs rotas, probablemente parte de los anticuerpos producidos están dirigidos contra epítomos que se encontraban escondidos y que después fueron expuestos. Tales epítomos, al parecer relevantes, se mantuvieron a pesar de que las proteínas L1 recombinantes se sometieron a condiciones desnaturalizantes durante el proceso del Western-blot. Según el marcador de peso molecular para proteínas, los resultados revelaron la presencia de una banda extra de ~60 kDa correspondiente al peso molecular de L1. Esta banda sólo se pudo observar en el patrón obtenido a partir del fago recombinante LIF8 y no así en el proveniente del fago control (M13) (**Figura 6.4**).

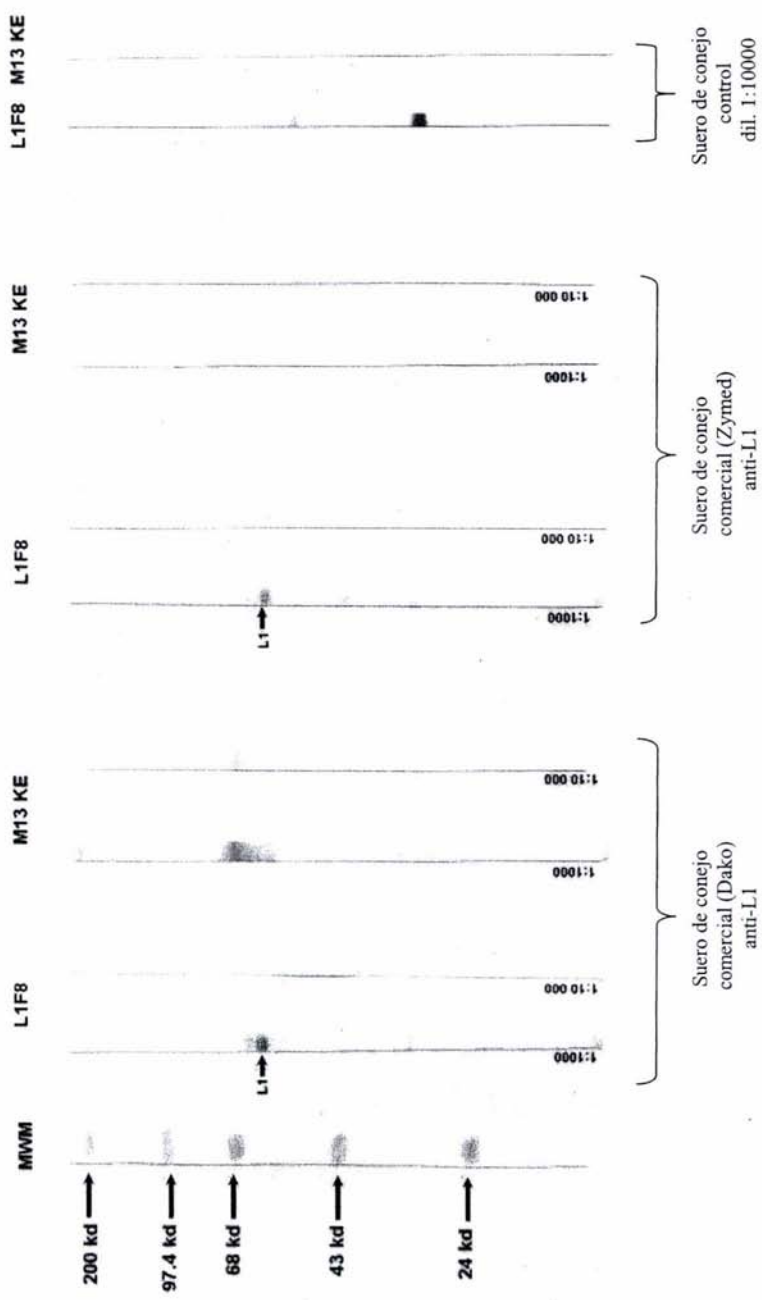


Figura 6.4 Anticuerpos anti-L1 reconocen la proteína L1 expresada en los fagos recombinantes. El Western blot muestra una banda correspondiente a la proteína L1 (~60 kDa) del VPH-16 obtenida a partir del fago recombinante L1F8 y revelada por anticuerpos anti-L1 provenientes de sueros de conejo inmunizados con VLPs (L1 del VPH-16). Las diluciones de cada suero aparecen en la parte inferior de cada tira de nitrocelulosa.

6.6 Obtención de fagos recombinantes que expresan un dominio inmunodominante de la proteína L1 del VPH 16 y sus equivalentes en los tipos 11, 18 y 31.

La clonación de un dominio (asa) potencialmente inmunodominante comprendido entre los residuos de aminoácidos de la Pro 77 hasta el residuo de Lys 85 de la proteína L1 del VPH-16 [162] y sus equivalentes en los tipos 11, 18 y 31 se logró fusionando estos dominios a la proteína pVIII de la superficie del fago M13. Se escogieron los dominios del VPH 11 (de bajo riesgo) y del VPH 18 y 31 (de alto riesgo) con el fin de poder discriminar específicamente entre VPH-16 y otros tipos de VPH también frecuentes entre la población. Para ello, también se utilizó el fagémido pFACIB8 como vector y 4 oligonucleótidos junto con sus respectivos pares de *primers* para generar los insertos. Estos oligonucleótidos se diseñaron tomando como patrón la secuencia de DNA del VPH 16 que comprende desde el nucleótido 5777 hasta el 5840 que se encuentra dentro del gen L1 (residuo His 73 al residuo Gly 93) y se le añadieron residuos de cisteínas en cada uno de sus extremos para formar un dominio conformacional, además de pequeñas secuencias que incluían los sitios de restricción para de *EcoRI* y *Bam HI* en los extremos 5' y 3' respectivamente. El tamaño total de estos 4 oligonucleótidos en promedio fue de 90 pb. Las secuencias equivalentes de los otros 3 tipos de VPH se obtuvieron por alineamiento de homología como se aprecia en la siguiente tabla:

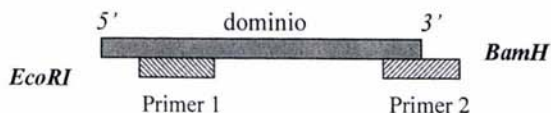
Tabla 9. Secuencia de aminoácidos de un dominio inmunodominante dentro de L1

VPH 16:	73-	H P Y F P I K K P N N - N K I L V P K V S G	-93
VPH 11:	46-	H P Y Y S I K K V N - - - K T V V P K V S G	-74
VPH 18:	107-	N P Y F R V P A G G G - N K Q D I P K V S A	-129
VPH 31:	49-	H P Y Y S I P K S D N P K K I V V P K V S G	-68

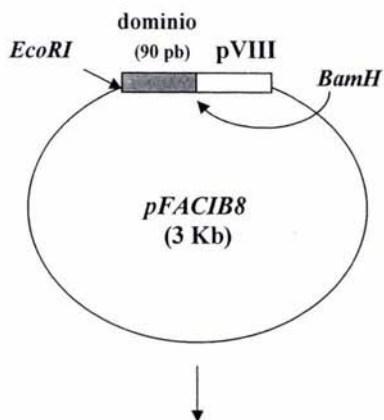
* En *negrillas* aparecen los residuos de aminoácidos que son iguales a los del VPH 16.

La clonación del dominio pronosticado como inmunodominante dentro de L1 del VPH-16 y sus equivalentes en los tipos de VPH-11, 18 y 31 se realizó como se muestra en el esquema de la **Figura 6.5**. Los 4 fagos recombinantes así construidos se denominaron: L11, L16, L18 y L31.

1) *Annealing*:



2) *Ligación*:



Comprobación de la clonación de los dominios en pF8:

*Patrón de restricción: ∇ *EcoRI* = Positivo
∇ *BamHI* = Negativo

* Secuenciación manual: Secuencia completa
(80-100 pb)

* ELISA

Figura 6.5 Esquema de la clonación de los inmunodominios del VPH-16, 11, 18 y 31 en el fagémido pFACIB8 y sus métodos de comprobación.

La demostración de que la clonación del DNA que codifica para estos 4 dominios en el gen VIII del fago M13 fue exitosa se realizó mediante 2 digestiones con las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI* (**Figura 6.6**) y por secuenciación del DNA de los insertos. El patrón de restricción demostró que aquellas clonas que resultaron negativas a la digestión con *BamHI* (ya que este sitio se pierde durante la clonación del inserto en el vector) y positivas a la digestión con *EcoRI* (este sitio se conserva después de la clonación) fueron justamente las que portaban el inserto del dominio de L1.

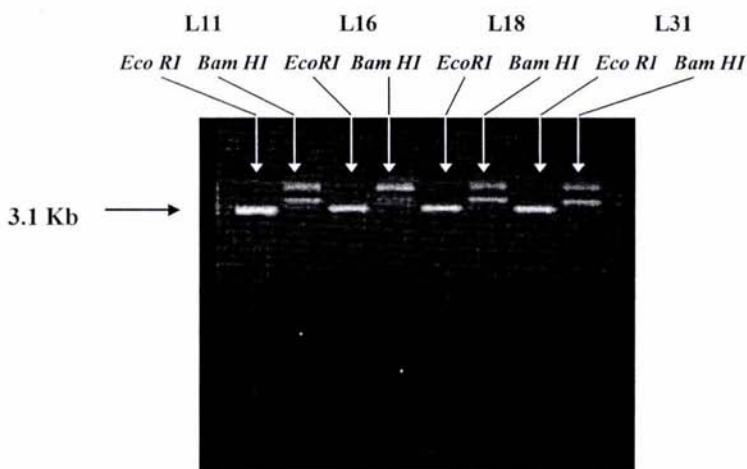


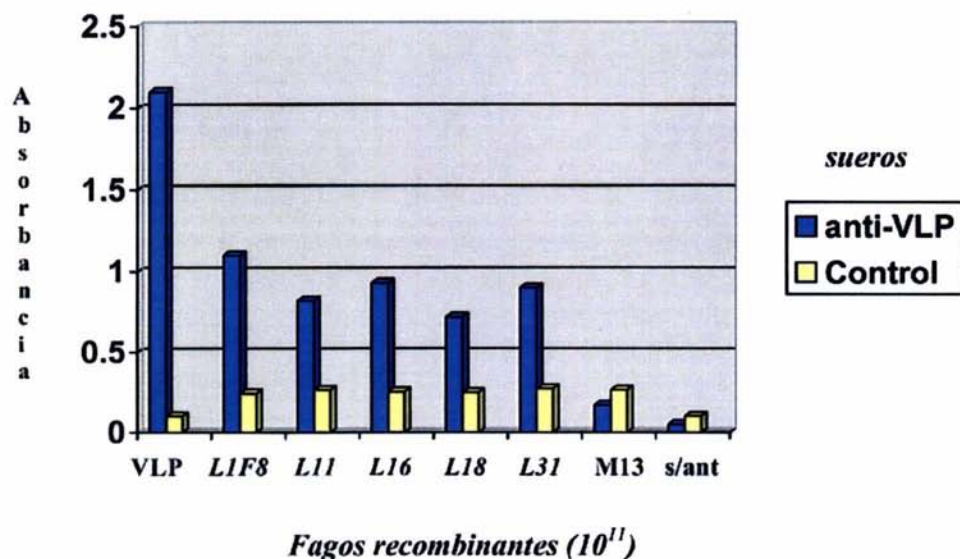
Figura 6.6 Patrón de restricción de fagos recombinantes con inmunodominios de la proteína L1 del VPH-16. La electroforesis en gel de agarosa revela el patrón de restricción correspondiente al DNA de los 4 fagos recombinantes que tienen clonado los 4 dominios inmunodominantes del gen L1 de distintos tipos de VPH. La digestión positiva con *EcoRI* produjo una sola banda de ~3.1 Kb (plásmido linearizado) mientras que la digestión con *BamHI* fue negativa y el plásmido se mantuvo íntegro, por lo tanto se observan varias bandas (plásmido circularizado y relajado).

6.7 Reconocimiento de los 5 fagos recombinantes por un suero específico anti-L1.

Por otro lado se realizaron experimentos de ELISA para corroborar indirectamente la expresión de L1 de VPH-16 en la superficie del fago filamentoso mediante el reconocimiento de anticuerpos específicos dirigidos contra esta proteína. Para ello se utilizó un suero de hiperimmune de conejo anti-L1 de VPH-16 (VLPs) como suero control positivo

y un suero de conejo inmunizado con un antígeno no relacionado proveniente de otro experimento [147], como control negativo. En este caso el antígeno que sirvió como control negativo fue el fago M13 nativo. Las lecturas obtenidas por ELISA demostraron que el fago recombinante L1F8 era altamente reactivo con el suero anti-L1 y por lo tanto, reconocido específicamente por los anticuerpos anti-L1 (**Gráfica 1**).

Por otro lado, también se probaron en el mismo ELISA, los fagos L11, L16, L18 y L31 para analizar su reactividad con anticuerpos específicos anti-L1 y con ello demostrar la expresión de dominios inmunodominantes en la superficie del fago M13. Las lecturas obtenidas en ELISA demostraron que los 4 fagos recombinantes fueron reconocidos específicamente por el suero de conejo anti-L1 (**Gráfica 1**) lo que mantiene la posibilidad de que estos dominios estén expuestos en la proteína L1 nativa y sean potencialmente inmunodominantes. Además, esto también indica que los dominios expresados en la superficie del fago están conservando sus características antigénicas originales.



Gráfica 1. Reconocimiento de los 5 fagos híbridos por el suero de conejo anti-L1 en ELISA. Se utilizó como antígeno control positivo a las VLPs de L1 del VPH 16 y como controles negativos al fago M13 nativo y al bloqueador BSA (s/antígeno). Un suero de conejo no relacionado se utilizó como control negativo.

7. DISCUSIÓN

La identificación de epítomos-mimótopos por anticuerpos de sueros de pacientes infectadas con VPH es posible utilizando una colección de péptidos expresados al azar en fagos filamentosos (phage display). Durante este estudio, se realizaron experimentos basados en la tecnología de phage display y para ello se utilizaron sueros de pacientes VPH positivas en donde los anticuerpos funcionaron como moléculas blanco. También utilizamos 2 tipos de bibliotecas comerciales de péptidos expresados en fagos: un tipo de biblioteca expresaba péptidos lineales (7 y 12 aa.) y el otro tipo expresaba péptidos cíclicos (c-7aa-c). El enlace disulfuro entre los residuos de cisteínas restringe las conformaciones que el péptido es capaz de adoptar, permitiendo así, una conformación que debería unirse más estrechamente a los anticuerpos que la misma secuencia lineal. Un inconveniente de la biblioteca cíclica es que un péptido específico puede estar restringido en una conformación no adecuada para un enlace de alta afinidad. Sin embargo, es difícil de predecir cual biblioteca producirá más ligandos para un anticuerpo y por ello fue que en este estudio se utilizaron ambos tipos de bibliotecas. Con estas bibliotecas se logró la identificación de epítomos y mimótopos específicos del virus del papiloma humano tipo 16.

Los sueros humanos policlonales contienen una colección de diferentes tipos de anticuerpos con un amplio rango de afinidades y especificidades. Entre estos anticuerpos existe un grupo de anticuerpos específicos para una enfermedad y los cuales pueden hacer posible la distinción entre individuos enfermos y sanos. El uso de bibliotecas de péptidos con sueros de mujeres infectadas con VPH-16, podrían proporcionar clonas que reconozcan los anticuerpos relacionados con la enfermedad. Durante los experimentos de bioselección, se observó el aumento del título conforme se realizan más rondas de bioselección. Esto es debido al enriquecimiento de la población de clonas capaces de unirse específicamente a los anticuerpos presentes en el suero de las pacientes VPH-16 positivas. Una de las formas para incrementar el porcentaje de clonas específicas podría ser la sustracción de fagos que reaccionen con los anticuerpos que no son específicos para infección o enfermedad, mediante el uso de sueros de individuos sanos antes de llevar a cabo la bioselección con los sueros positivos. Sin embargo, estudios previos, tanto propios como de otros grupos de investigación donde se utilizó phage display [163], se ha demostrado que la sustracción de

fagos no específicos mediante el uso de sueros controles negativos no mejoró significativamente la biblioteca de péptidos. Por lo tanto, en este estudio se pusieron a reaccionar directamente las bibliotecas comerciales con el suero total como se describió en la sección de materiales y métodos.

Durante el proceso de bioselección, al pasar de una ronda a otra, la población de fagos específicos se fue enriqueciendo como se demostró al titular el eluido de cada una de las rondas. Después de la tercera ronda de bioselección, las clonas de fagos se seleccionaron y sus insertos se secuenciaron. Después del análisis de las secuencias de péptidos de las clonas de fagos obtenidas, se seleccionaron tanto aquéllas que tuvieron secuencias idénticas como aquéllas que tuvieron alguna homología lineal con la proteína L1 de VPH-16. Sin embargo, en uno de los experimentos en donde se utilizó el suero de la paciente 42 y la biblioteca peptídica de 7 aminoácidos, todas las clonas seleccionadas al azar y secuenciadas se utilizaron para experimentos posteriores. Una de estas clonas fue reactiva con un pequeño panel de sueros de pacientes infectadas con VPH-16, a pesar de que esa clona no tuvo ninguna homología con otras clonas ni con VPH-16. Se puede sugerir que el inserto peptídico de este fago podría mimetizar un epítipo conformacional o lineal de una de las proteínas virales del VPH. Para prevenir la pérdida de clonas de fagos potencialmente útiles, sería apropiado primero probar todas las clonas seleccionadas al azar con el suero usado en el experimento de selección y después de secuenciar los insertos del fago de todas las clonas positivas, probarlas entonces en ELISA con un panel de sueros de pacientes y de individuos sanos (controles). De cualquier manera, este planteamiento podría ser apropiado en estudios donde hay suficiente cantidad de sueros, como es el caso de sueros de conejo o de ratón inmunizados. En este caso en particular, se contaban con cantidades limitadas de suero de pacientes infectadas con VPH-16 y por ello se tuvo que seguir la estrategia descrita.

Es interesante notar que dos secuencias de péptidos expresados en dos clonas de fagos, SPINNTKPHEAR (clona 51-12-3) y MKIPNNKLFLPV (clona 25-12-13), aislados en experimentos diferentes tuvieron una homología en su secuencia con una región de la principal proteína de la cápside L1 de VPH-16. Más aún, esta región se encuentra dentro de

un dominio (asa) expuesto en la superficie de la proteína L1 como se demostró al explorar la estructura tridimensional de L1 en el Protein Databank Database. Al parecer esta región es un posible epítopo de la molécula de L1 [162].

Otro fago con inserto peptídico de secuencia distinta, MPMPAK (42-7-16), se aisló varias veces y fue reconocido por varios sueros de pacientes VPH16 positivas y no así por sueros controles. Sin embargo, este péptido no mostró ninguna homología lineal con proteínas virales del papilomavirus al hacer el análisis de comparación de secuencias en la base de datos. Por lo tanto, se puede pensar que esta secuencia podría representar un mimótopo de un epítopo conformacional. La conservación de los motivos MP(X)₄K y MK (X)₄K en varias clonas de fagos aisladas con diferentes bibliotecas y sueros de mujeres infectadas con VPH, indica que estos aminoácidos pueden ser importantes en el reconocimiento por el sitio de unión al antígeno de anticuerpos de individuos infectados con VPH. Cabe mencionar que también existe la posibilidad de que estos motivos no correspondan realmente a algún epítopo del VPH y sí al de algún otro patógeno que hayan tenido en común todas estas mujeres. Para demostrar cualquiera de las dos posibilidades se podrían realizar experimentos de ELISA en los cuales se pongan a prueba todas estas clonas de fagos con sueros de mujeres infectadas con VPH (caracterizados para la presencia de anticuerpos anti-L1) y sueros de mujeres controles (negativas tanto para la infección como para la presencia de anticuerpos anti-L1). Así se podría aceptar o descartar la relación directa de estas clonas de fagos con la infección por el VPH.

Por otro lado, varias clonas de fagos con diferentes secuencias en sus insertos peptídicos y obtenidas en diferentes ensayos de bioselección, reaccionaron positivamente en ELISA al menos con un suero VPH positivo proveniente del panel de muestras de pacientes. Estos resultados parecen indicar que los sueros de individuos infectados con papilomavirus, contienen una colección de anticuerpos que reconocen diferentes epítopos de la cápside del VPH. Por lo tanto, un sólo epítopo, a menos que sea inmunodominante, no es suficiente para poder establecer un método de diagnóstico serológico basado en el reconocimiento de epítopos o mimótopos de VPH. Todo indica que lo ideal es utilizar una mezcla de varias

clonas de fagos que previamente hayan sido evaluadas y catalogadas como candidatas para establecer un ensayo inmunológico para detectar anticuerpos anti-VPH-16.

Las bioselecciones realizadas con sueros de ratón inmunizado con L1 de VPH-16, empleando una biblioteca de 7 aminoácidos flanqueadas por cisteínas, produjeron clonas con una alta homología entre sus insertos peptídicos. Únicamente aquellas clonas que presentaron un consenso similar en sus secuencias, reaccionaron positivamente en ELISA con suero de ratón anti-L1, no así aquellas clonas con secuencias totalmente diferentes. Lo anterior corroboró la eficacia y poder de selección específica de la técnica del phage display. Sin embargo, al realizar el análisis comparativo de cada una de las secuencias con algún epítipo lineal de la proteína L1 no se encontró ninguna homología (sección 5.6) con la secuencia original de esta proteína en todos los tipos de VPH reportados hasta ahora. Lo anterior alberga la posibilidad de que todas las secuencias obtenidas de estos fagos corresponden a varios epítopos conformacionales de L1 y que en un futuro pueden ser probadas con sueros de humanos para evaluar su capacidad inmunorreactiva.

Cabe destacar que la idea de clonar y expresar la proteína L1 completa del VPH-16 fue con el objeto de poder crear un fago recombinante que pudiera expresar al antígeno nativo incluyendo todos sus epítopos lineales y conformaciones, y con ello, aumentar la posibilidad de ser reconocidos por anticuerpos específicos dirigidos con el VPH-16. La proteína L1 nativa forma un pentámero, el cual constituye un capsómero, dentro de la cápside del VPH, la cual está constituida por 72 de estos capsómeros. A diferencia del VPH, la proteína L1 fusionada a la proteína de superficie pVIII del fago recombinante *LIF8*, se expresa como un solo capsómero pentamérico. Sin embargo, a pesar de no estar unida con otros capsómeros como ocurre en la cápside del virus nativo, cada capsómero de la proteína L1 de *LIF8* se expresa en un 15-30% del total de las 2700 unidades de la proteína pVIII. Por lo tanto, aproximadamente 400-900 unidades de la proteína VIII tienen fusionada en su N-terminal a la proteína L1, lo suficiente como para hacer de estos fagos recombinantes, biomoléculas potencialmente inmunogénicas y antigénicas. De hecho, este es el primer estudio en donde se ha podido clonar una proteína del VPH en fagos filamentosos y probar su capacidad inmunorreactiva mediante ELISA. Según estos

resultados, se pudo demostrar que el fago recombinante *LIF8* es reconocido por un suero de conejo con un alto título de anticuerpos anti-L1 del VPH-16 (VLPs) (**Gráfica 1**). Lo anterior deja abierta la posibilidad de que estos fagos recombinantes también puedan ser reconocidos por anticuerpos humanos producidos durante una infección por VPH.

Así mismo, se logró la clonación y expresión de un dominio (asa) potencialmente inmunodominante de la proteína L1 del VPH-16 [162] en la proteína pVIII de la superficie del fago. De la misma manera se clonaron los dominios equivalentes en el VPH-11 (de bajo riesgo), VPH-18 y 31 (ambos de alto riesgo). La creación de estos 4 fagos recombinantes, *L11*, *L16*, *L18* y *L31* respectivamente, fue con el fin de pudieran ser reconocidos por anticuerpos específicos para uno u otro tipo de VPH. Así, se podría diseñar un método de inmunodiagnóstico altamente específico que pudiese discriminar entre el tipo VPH-16 y otros tipos de VPH también altamente frecuentes entre la población. Sin embargo, los resultados revelaron que estos 4 fagos recombinantes fueron reconocidos indistintamente en ELISA por el mismo suero de conejo anti-L1 de VPH-16, ya que los 4 tipos de fagos dieron lecturas muy similares (**Gráfica 1**). Lo anterior puede ser atribuido a la relativa homología que existe en la secuencia de aminoácidos de estos dominios de los distintos tipos de VPHs (**Tabla 7**). Aunque este dominio inmunodominante ocupa la misma región conformacional en la proteína L1 de la mayoría de los VPHs, también presenta algunas diferencias entre las secuencias de aminoácidos. Estas diferencias varían de acuerdo a la cercanía filogenética que existe entre los distintos tipos de papilomavirus, por ejemplo, el VPH-31 es un tipo cercano al VPH-16, no así el VPH-18. En base a esto, se pensó que estas pequeñas diferencias en la secuencia de estos dominios, eran suficientes para que los anticuerpos anti-L1 del VPH-16 pudieran discriminar específicamente entre uno u otro tipo, o al menos entre los VPHs de alto o bajo riesgo. Por el contrario, los resultados demostraron que los anticuerpos producidos por un mismo tipo de VPH también pueden reconocer dominios similares de la proteína L1 de otros tipos de VPH. Al parecer, las similitudes que existen en la secuencia de aminoácidos de estas regiones son mucho más determinantes que las escasas diferencias entre ellas respecto al reconocimiento de este epítipo por los anticuerpos específicos anti-L1. Cabe destacar que L1 es la proteína más

conservada entre los distintos tipos de VPHs y a pesar de que este dominio es potencialmente inmunodominante, también está conservado dentro de L1.

La decisión de utilizar fagos que expresen epítomos/mimótopos de L1, dominios inmunodominantes de L1 o la proteína L1 completa del VPH-16, se basó en el hecho de que los anticuerpos dirigidos contra esta proteína son los principales marcadores humorales durante la etapa aguda de una infección por VPH. La presencia de anticuerpos (del tipo IgG principalmente) anti-L1 es reflejo de una infección actual o pasada por el VPH. Por lo tanto, se pensó en el uso de fagos relacionados con L1 para establecer las bases de un futuro método de serodiagnóstico que pudiera detectar indirectamente la infección por VPH-16, como una alternativa a los distintos métodos de diagnóstico que actualmente existen. Estos últimos, desafortunadamente no reúnen las características necesarias para detectar eficaz y oportunamente la infección por VPH de alto riesgo ya que son laboriosos, costosos y no son accesibles para la mayoría de población.

Para demostrar que estos fagos relacionados o derivados de L1 del VPH-16, realmente pueden funcionar para crear un método de inmunodiagnóstico para la infección por el VPH-16, es necesario hacer pruebas posteriores directamente con sueros humanos tanto de individuos infectados como de individuos sanos para determinar su sensibilidad y especificidad. Además, es necesario contar con un panel mayor de sueros bien caracterizados y aplicar el estudio a la población abierta.

Es importante señalar que, en caso de que el método de diagnóstico serológico aquí propuesto demuestre realmente su eficacia en la detección del VPH, su aplicación puede ser el de una prueba de tamizaje. Esto significa que en caso de resultar la prueba positiva, las pacientes serían canalizadas para que se les realicen otras pruebas confirmatorias ulteriores, tales como el papanicolaou, colposcopia, PCR o captura de híbridos. El motivo por el cual este método basado en phage display tenga el carácter de tamizaje es debido al alto índice de seroprevalencia que existe entre la población, es decir, un gran porcentaje de la población mexicana es seropositivo para el VPH. Ya que el VPH es considerado endémico de nuestro país, muchos individuos han sido expuestos a este virus en algún momento de su vida. Por lo tanto, un resultado que revele la presencia de anticuerpos contra el VPH no

necesariamente es indicativo de una infección actual debido a la memoria que genera el sistema inmunológico. Así, el potencial de este método de inmunodiagnóstico puede radicar en su uso como complemento, es decir, junto con otros métodos como los mencionados anteriormente, ya que se ha demostrado que el uso de varias pruebas de diagnóstico en conjunto aumentan significativamente la sensibilidad y especificidad para la detección del VPH/CaCu.

Finalmente, cabe destacar que este es el primer reporte en el que se utilizó la tecnología de phage display para la identificación de epítomos relacionados con VPH y clonación de la proteína L1 en fagos filamentosos. Los estudios realizados sobre un limitado grupo de pacientes infectadas con VPH e individuos controles sanos, así como el uso de sueros de animales inmunizados con L1 de VPH-16, demuestran que una combinación de varios epítomos o antígenos específicos para el VPH obtenidos mediante phage display, podría servir para la creación de un ensayo de diagnóstico multicomponente para la infección por VPH-16. Con ello podría hacerse posible la prevención del cáncer más común en las mujeres mexicanas.

8. CONCLUSIONES

- ❖ Utilizando bibliotecas de péptidos expresados en fagos se seleccionaron clonas que son reconocidas por anticuerpos anti-VPH-16 y se identificaron posibles epítomos y/o mimótopos de la proteína L1 del VPH-16.
- ❖ Se encontraron similitudes entre las secuencias de los péptidos obtenidos y la proteína L1 del VPH-16. Estas secuencias pueden representar epítomos lineales.
- ❖ Se produjeron fagos híbridos con la proteína L1 del VPH-16 que son reconocidos específicamente por un suero hiperinmune de conejo anti-L1, lo cual los convierte en candidatos potenciales para ser utilizados como inmunorreactivos.
- ❖ La combinación de varios tipos de fagos asociados a la proteína L1 puede servir para la creación de un método de inmunodiagnóstico multicomponente, después de ser sometidos a múltiples pruebas entre la población y su potencial diagnóstico puede ser aumentado al ser usado como un complemento junto con otros métodos de diagnóstico.

ANEXO

Medios de Cultivo y Soluciones

Medios de Cultivo

LB (Luria Bertani)*

- 10 g Bacto-Tryptone
- 5 g de extracto de levadura
- 5 g de NaCl

Top Agar*

- 10 g de Bacto-Tryptone
- 5 g de extracto de levadura
- 5 g de NaCl
- 1 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$

Medio 2xYT*

- 16 g de Bacto-Tryptone
- 10 g de extracto de levadura
- 5 g de NaCl

Medio mínimo*

- Na_2HPO_4 0.6%
- KH_2PO_4 0.3%
- NH_4Cl 0.1%
- NaCl 0.05%
- Agarosa 1.5%
- Glucosa 20%
- Tiamina 1%
- $MgSO_4$ 1 M

* Por litro de agua; esterilizar por autoclave.

Soluciones

PEG/NaCl (8000) 40%*

- NaCl 5M
- Polietilenglicol (PEG) 400g/l

TBS*

- 50 nM Tris-HCl (pH 7.5)
- 150 mM NaCl

TBE

- Tris 54g/l
- Ácido bórico 27.5 g/l
- EDTA, 20 ml

PBS

- 0.01 M de KH_2PO_4
- 1 M Na_2HPO_4
- 1.37 M NaCl
- 0.027 M KCl
- pH 7.0

Buffer de Yodo

- 10 mM Tris-HCl pH 8.0
- 1 mM EDTA
- 4 M NaI

Buffer de Elución

- 0.2 M Glicina-HCl (pH 2.2)

* Esterilizar por autoclave

TFB-I (500 ml) **

- 30 mM Acetato de Potasio (1.47 g)
- 50 mM MnCl₂ (4.94 g)
- 100 mM RbCl (6.04 g)
- 10 mM CaCl₂ (0.74 g)
- 15% glicerol (75.0 g)
- pH 5.8

TNT 10x

- NaCl (90 g)
- Tris (trizma base sigma) (12.1 g)
- 800 ml H₂O miliQ
- pH 8.0
- 5 ml Tween 20
- Aforar a 1lt con H₂O miliQ

Buffer de electrodos

- Trizma-base (6g)
- Glicina (28.8 g)
- SDS (1 g)
- Aforar a 5 lt con H₂O bidestilada

Buffer de lavado (Western blot)

- Tris 25 mM
- Glicina 192 mM
- pH 8.3

5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosidasa (X-gal) / isopropil-β-D-tiogalactopiranosida (IPTG)

- 1 g X-Gal
- 1.25 g IPTG
- disolver en 25 ml de dimetil formamida
- Mantener a -20°C

** Esterilizar por filtración

TFB-II (500 ml)**

- 10 mM MOPS (1.04 g)
- 75 mM CaCl₂ (5.50 g)
- 10 mM RbCl (0.60 g)
- 15% Glicerol (75.0 g)
- pH 7.0

Buffer de carga (de muestra) 2x

- SDS (2.5 g)
- Tris 1M pH 6.8 (6.25 ml)
- 2-mercaptoetanol (5.0 ml)
- Azul de bromofenol (5 mg)
- Glicerol (10 ml)
- H₂O bidestilada p/aforar a 50 ml

Buffer de transferencia

- Tris 25 mM
- Glicina 192 mM
- Metanol 20%
- pH 8.3
- Desgasificar 30 min con vacío

Geles

Gel de agarosa 1%

- 1 g de agarosa
- 100 ml de TBE 1X
- 0.5 μ l de bromuro de etidio

Gel de poliacrilamida 8%

- 39.6 g Urea
- 26.4 ml Agua
- 16 ml Acrilamida/Bisacrilamida 38:2
- 8 ml TBE 10X
- 675 μ l Persulfato de Amonio
- 25 μ l TEMED

Gel de poliacrilamida-SDS 10%

- Sol. Acrilamida (30%) bisacrilamida (0.8%) (10 ml)
- H₂O miliQ (12 ml)
- Tris 1.5 M pH 8 (7.5 ml)
- SDS 10% (0.3 ml)
- Mezclar y desgasificar 5 min con vacío
- Persulfato de amonio 10% (0.15 ml)
- Temed (10 μ l)

Gel concentrador

- H₂O miliQ (9.1 ml)
- Sol. Acrilamida (30%) bisacrilamida (0.8%) (1.7 ml)
- Tris 1M pH 6.8 (1.6 ml)
- SDS 10% (0.125 ml)
- Mezclar y desgasificar 5 min con vacío
- Persulfato de amonio 10% (0.062 ml)
- Temed (6.2 μ l)

9. REFERENCIAS

1. <http://www.cancerresearch.org/immwhat.html>. "Cancer and the immune system: the vital connection". *Cancer Research Institute*.
2. The World Health Organization Report. Bridging the gaps. *Geneva: WHO*, 1995.
3. Secretaría de Salud, Dirección General de Epidemiología, *Histopathological Registry of Malignant Neoplasia, SSA*, México. 1996
4. Lazcano Ponce E.C. et al. Programa de detección oportuna del cáncer cervical en México. Diagnóstico situacional. *Revista del Instituto Nacional de Cancerología*. 1996; 42:123-140.
5. <http://www.histolab.com.mx/pap.html>. "Cómo prevenir el cáncer de la matriz?".
6. Pearson P.L. and Van Der Luijt R.B. The genetic análisis of cancer. *J.Int.Med*. 1998; 243: 413-417.
7. Benítez Bribiesca L. Biología de la célula neoplásica. Su importancia para la oncología clínica. *Rev. Med. IMSS*, 1987; 25:457-467.
8. Walboomers J., Jacobs M., Manos m., Bosh X., Kummer A., Shah K., Snijders P., Peto, J., Meijer, C. and Muñoz N. Human Papillomavirus is necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathology*, 1999; 189: 12-19.
9. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer from basic studies to clinical applications. *Nat. Rev. Cancer*.2002; 2:342-350.
10. zur Hausen H., Meinhof W., Sheiber W. and Bornkamm G.W. Attempts to detect virus specific DNA sequences in human tumors: I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *Int. J. Cancer*, 1974; 13: 650-656.
11. zur Hausen H. Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr.Top.Microbiol.Immunol*. 1977; 78: 1-30.
12. Meissels A. and Fortin R. Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic patterns. *Acta Cytol*. 1976; 20: 505-509.
13. Della Torre G., Pilotti S., de Palo G. and Rilke, F. Viral particles in cervical condylomatous lesions. *Tumori*. 1978; 64:459-463.
14. Gissmann L. and zur Hausen H. Human papillomaviruses physical mapping and genetic heterogeneity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1976; 73: 1310-1313.

15. Gissmann L., Diehl V., Schultz-Caulon H. and zur Hausen H. Molecular cloning and characterization of human papillomavirus DNA from a laryngeal papilloma. *J.Virol.* 1982; 44: 393-400.
16. Law M.F., Lancaster W.D. and Howley P.M. Conserved polynucleotide sequences among the genomes of papillomaviruses. *J. Virol.* 1979; 32: 199-207.
17. Dürst M., Gissmann L., Ikenberg H. and zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 1983; 80: 3812-3815.
18. Boshart M. et al. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer and in cell lines derived from genital cancer. *EMBO J.* 1984; 3: 1151-1157.
19. Schwartz E. et al. Structure and transcription of human papillomavirus type 16 and 18 sequences in cervical carcinoma cells. *Nature*, 1985; 314: 111-114.
20. Dürst M., Dzarlieva-Petrusevska R.T., Boukamp P., Fusenig N.E. and Gissmann L. Molecular and cytogenetic analysis of immortalized human primary keratinocytes obtained after transfection with human papillomavirus type 16 DNA. *Oncogene*, 1987; 1: 251-256.
21. Pirisi L., Yasumoto S., Fellery M., Doninger J.K. and DiPaolo J.A. transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. *J.Virol.* 1987; 61: 1061-1066.
22. van Knebel Doeberitz M., Rittmüller C., zur Hausen H. and Dürst M. Inhibition of tumorigenicity of cervical cancer cells in nude mice by HPV E6-E7 antisense RNA. *Int. J. Cancer* 1992; 51: 831-834.
23. von Knebel Doeberitz M., Rittmüller C., Aengeneindt F., Jansen-Dürr P. and Spitkovzky D. Reversible repression of papillomavirus oncogene expression in cervical carcinoma cell: consequences for the phenotype and E6-p53 and E7-pRb interactions. *J. Virol.* 1994; 68:2811-2821.
24. Muñoz N. et al. The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: a population based case-control study in Colombia and Spain. *Int. J.Cancer* 1992; 52: 743-749.
25. Bosh F.X. et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer. Study group. *J. Natl.Cancer Inst.* 1995; 87: 796-802.
26. Taichman L., La Porta R. The expression of papillomaviruses in epithelial cells. In *The papovaviridae*, New York plenum Pres. 1987.

27. van Ranst M., Tachezy R., Delius H., Burk R. Taxonomy of the human papillomaviruses. *Papillomavirus Rep.* 1983; 4: 61-65.
28. Laimins LA. The biology of human papilloviruses: from warts to cancer. *Infect. Agents Dis.* 1993; 2: 74-86.
29. Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M. and Chanock R.M. Papillomaviridae: the viruses and their replication. *Fundamental Virology.* Lippincott-Raven Publisher. New York USA. Pp. 1996. p947-948.
30. Tureck LP. The structure, function and regulation of papillomaviral genes in infection and cervical cancer. *Adv. Virus Res.* 1994; 44: 305-356.
31. Chang T., Chan W., Bernard U. and Klock G. Transcriptional activation of HPV-16 by the nuclear factor 1, AP-1, steroid receptors and possibly a novel transcription factor. *Nucleic Acids Res.* 1989; 18:465-470.
32. Berg M. and Stenlund A. Functional interactions between papillomavirus E1 and E2 proteins. *J. Virol.* 1997. 71: 3853-3863.
33. Rocque WJ., Porter DJT., Barnes JA., Dixon EP, Lobe DC and Pahl G. Replication-associated activities of purified human papillomavirus type 11 E1 helicase. *Prot. Express. Purif.* 2000; 18 (2) 148-159.
34. Nishimura A., Ono T., Ishimoto A., Dowhanick J., Fize MA., Howley P. and Sakai H. Mechanisms of human papillomavirus E2-mediated repression of viral oncogene expression and cervical cancer cell growth inhibition. *J. Virol.* , 2000; 74: 3752-3760.
35. McBride A., Bolen JB and Howley PM. E2 polypeptides encoded by BPV-1 form dimers through the common carboxyl-terminal domain-transactivation is mediated by the conserved amino-terminal domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989; 86:510-514.
36. Androphy E., Lowy RD. and Schiller JT. Bovine papillomavirus E2 transactivating gene bind to specific sites in papillomavirus DNA product. *Nature*, 1987; 325: 70-73.
37. Bernard BA., Bailly C., Lenoir MC., Darmon F., Thierry F. and Yaniv M. The human papillomavirus type 18 (HPV18). E2 gene product is a repressor of the HPV18 regulatory region in human keratinocytes. *J. Virol.* 1989; 63: 4317-4324.
38. Doorbar J., Ely S., Sterling J., McLean C. and Crawford L. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature*, 1991; 352 : 824-827.

39. Park TW., Fujiwara H. and Wright C. Molecular biology of cervical cancer and its precursors. *Cancer Supplement*. 1995; 76: 1902-1913.
40. Hsieh CH., Tsao YP., Wang CH., Han CP., Chang JL., Lee JY. Nad Chen SL. Sequence variants and functional analysis of human papillomavirus type 16 E6 gene in clinical specimens. *Arch. Virol* 2000; 145: 2273-2284.
41. Hwang ES., Nottoli T. and Dimmaio D. The HPV16-E5 protein: expression, detection and stable complex formation with transmembrane proteins in COS cell. *Virology*, 1995; 211: 227-233.
42. Zhang BY., Li P., Wang E., Brahmi Z., Dunn KW., Blum JS, Roman A. The E5 protein of human papillomavirus type 16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratinocytes treated with interferon-gamma. *Virology* 2003; 310 (1): 100-108.
43. Zhang B., Spandau DF. and Roman A. E5 protein of human papillomavirus type 16 protects human foreskin keratinocytes from UV B-irradiation-induced apoptosis. *J.Virol*. 2002; 76: 220-231.
44. Munger K., Scheffner M., Huibregtse JM and Howley PM. Interactions of HPV E6 and E7 with tumor suppressor gene products. *Cancer Surv*. 1992; 12:197-217.
45. Münger K., Pheps WC., Bubb V., Howley PM. And Schlegel R. The E6 and E7 genes of human papillomavirus type 16 are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J.Virol* 1989; 63:4417-4423.
46. Mc Dougall JK. immortalization and transformation of human cell by human papillomavirus. *Curr.Top Microbiol.Immunol*. 1994; 186:101-119.
47. Androphy E., Hubbert NL., Schiller JT and Lowy DR. Identification of the HPV16-E6 protein from transformed mouse cells and human cervical carcinoma cell lines. *EMBO* 1987, 6:989-992.
48. Werness BA., Levine AJ and Howley PM. A association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990; 248: 76-79.
49. Rapp L. and Chen JJ. The papillomavirus E6 proteins. *Biochemical Biophys. Acta*. 1998. F1-F19.
50. Jackson S., Harwood C., Thomas M., Banks L. and Storey A. Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV-16 E6 proteins. *Genes Dev*. 2000; 14: 3065-3073.
51. Veldman T., Horikawa I., Barrett JC and Schlegel R. Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoproteins. *J.Virol*. 2001; 75: 4467-4472.

52. Flores, E., Allen-Hofman BL., Lee D. and Lambert P. The human papillomavirus type 16 E7 oncogene is required for the productive stage of the viral cycle. *J.Virol* 2000; 74: 6622-6631.
53. Demeter LM., Stoler MH., Broker TR and Chow LT. Induction on proliferating cell nuclear antigen in differentiated kertainoytes of human papillomavirus-infected lesions. *Hum. Pathol.* 1994; 25:343-348
54. Dyson N., Howley PM., Münger K., and Harlow E. The human papillomavirus 16 E7 oncoprotein is able to bind to retinoblastoma gene product. *Science* 1989; 243: 934-937.
55. Kiyono T. et al. Both Rb/p16INK4 an inactivation and telomerase activity one required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 1998; 396:84-88.
56. Zerfass K. et al. Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. *J. Virol.*1995; 69: 638-639.
57. Zerfass-Thome K. et al. Inactivation of the CDK inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene* 1996; 13: 2323-2330.
58. Duensing S., Duensing A., Crum CP. And Münger K. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein induced abnormal centrosome synthesis is an early event in the evolving malignant phenotype. *Cancer Res.* 2001; 61: 2356-2360.
59. Band V., Zaycowski D., Kulesa V., and Sager R. Human papillomavirus DNAs immortalize normal human mammary epithelial cell and reduce their growth factor requirements. *Proct.Natl.Acad.Sci.USA.* 1990; 87: 463-467.
60. Halbert CT., Demers GW. and Galloway DA. The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human of human epithelial cells. *J.Virol.* 1991; 65: 473-478.
61. Thomas M. and Banks L. Inhibition of BAK-induced apoptosis by HPV-18 E6. *Oncogene* 1998; 17: 2943-2954.
62. Matsumoto K., Yashikawa and Taketoni V. Balance of IgG subclasses toward human papillomavirus type 16 (HPV16) L1 capsids is a possible predictor for the regression of HPV 16 positive cervical intraepithelial neoplasia. *Biochem. Biophy. Research Commun.* 1999. 258: 128-131.
63. Chen X., Casini G., Harrison S. and Garcea R. Papillomavirus capsid protein expression in *Escherichia coli*: purification and assembly of HPV11 and HPV16. *J.Mol.Biol.* 2001; 307: 173-182.

64. Kulski J., Sadleir J., Kelsall S., Cicchini M., Shellman G., Peng S., and Frazer I. Type specific and genotype cross reactive B epitopes of the L1 protein of HPV 16 defined by a panel of monoclonal antibodies. *Virology*. 1998; 243: 275-282.
65. Wang Z., Christensen N., Shiller JT. and Dillner J. A monoclonal antibody against human papillomavirus type 16 blocks the serological reactivity of most human sera. *J.Gen.Virol*. 1997; 78: 2209-2215.
66. White W., Wilson S., Palmer-Hill F., Woods R., Ghim S-J., Hewitt L., Goldman M., Burke S. and Suzich J. Characterization of a major neutralizing epitope of human papillomavirus type 16 L1. *J.Virol*. 1999; 73: 4882-4889.
67. Christensen ND., Deillner J., Eklund C., Carter JJ., Wipf GC., Reed CA., Cladel NM. And Galloway DA. Surface conformational and linear epitopes on HPV16 and HPV18 L1 virus-like particles as defines by monoclonal antibodies. *Virology* 1996; 223 (1): 174-184.
68. Roden RB., Hubbert NL., Kirnbauer R., Christensen ND., Lowy DR. and Shiller JJ. Assesment of the serological relatedness of genital human papillomavirus and hemagglutination inhibition. *J.Virol* 1996; 70:3298-3301.
69. Giroglou T., Sapp M., Lane C., Fligge C., Christensen ND., streck RE. and Rose R. Immunological analyses of human papillomavirus capsides. *Vaccine* 2001; 19:1783-1793.
70. Kirnbauer R., Taub J., Greenstone H. et al. Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16, L1 and L1 plus L2 introvirus-like particles. *J.Virol* 1993; 67:6923-6936.
71. Roden RB., Greenstone H., Kirnbauer R., Booy F., Jessie J., Lowy DR. and Schiller JT. *In vitro* generation and type-specific neutralization of a human papillomavirus type 16 virion pseudotype. *J. Virol*. 1996; 70: 5874-5883.
72. Kawana K., Matsumoto K., Yoshikawa H., Taketani Y., Kawana T., Yoshike K., and Kanda T. A surface immunodeterminant of human papillomavirus type minor capsid protein L2. 1998; 245: 353-359.
73. Roden RB., Yutzi IV., Fallon R., Inglis S., Lowy DR and Shiller JT. Minor cpasid protein of human genital human papillomavirus contains subdominant, cross-neutralizing epitopes. *Virology* 2001; 270:254-257.
74. Gaukroger JM., Chandrochud LM., O'Neil BW., Grindaly GL., Knowless G. and Campo MS. Vaccination of cattle with bovine papillomavirus type 4 L2 elicits the production of virus-neutralizing antibodies. *J.Gen.Virol*. 1996; 77:1577-1583.

75. Evander M., Frazer Y., Payne E., Mei QI., McMillan J. Identification of the α_2 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J. Virology* 1997, 71: 2449-2456.
76. Shafiqi-Keramat S., Handisurya A., Kriehuber E., Meneguzzi G., Slupetzky K., Kimbauer R. Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. *J. Virol.* 2003, 77(24): 13125-13135.
77. zur Hausen, H. Papillomavirus infections: a major cause of human cancer. *Biochem Biophys Acta* , 1996; 1288: F55-F78.
78. Lambert P. Papillomavirus DNA replication. *J. Virol.* 1991. 65: 3417-3420.
79. Lazo PA. The molecular genetics of cervical cancer. *Br. J. Cancer* 1999; 80 (12): 2008-2018.
80. Koss LG. Cytologic and histologic manifestations of HPV infection of the female genital tract and their clinical significance. *Cancer* 1987; 71: 8186-8194.
81. Singer A., Ho L., Terry G. and Kwie TS. Association of human papillomavirus with cervical cancer and precancer 1995. p105-129. In A. Mindel (ed). *Genital Warts: Human Pap. Infection*. Edwar Arnold. London.
82. Bernard HU., Chan SY., Manos M., Ong CK., Villa LL., and Delius H. Identification and assessment of known and novel human papillomavirus by polimerase chain reaction amplification restriction fragment length polymorfism, nucleotide sequence and phylogenetic a lgorithms. *J. Infect. Dis.* 1994; 170:1077-1085.
83. Muñoz N, Bosh FX, de Sanjose S, Herrero R, castellsague X, Shah KV, Snijders PJ and Meijer CJ. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Eng. J. Med.* 2003; 348: 518-527
84. Villa LL. Human Papillomavirus and Cervical Cancer, in *Advances in Cancer Research*. (Vandle, GF and Klein G) 1997. Vol.71. *Academic Press*, USA.
85. Jacobs MV., Walboomers J., Snijders P., Voorhoorst F., Verheijen R., Franssen-Daalmeijer N. and Meijer C. Distribution of 37 mucosotropic HPV types in women with cytologically normal cervical smears the age related patterns for high-risk types *Int. J Cancer* 2000; 87: 221-227.
86. Pfister H. Human Papillomavirus and genital cancer. *Adv. Cancer Res.* 1987; 48:113-147.
87. Barrasco R., De Brux J., Croissant O. et al. High prevalence of papillomavirus associated to penile intraepithelial neoplasia in sexual partners of women with cervical intraepithelial neoplasia. *N. Eng. J. Med.* 1987; 317:916-923.

88. Berumen J., Casas L., Segura E., Amescua J. and García Carrancá A. Genome amplification of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical carcinomas is related to the retention of E1/E2 genes. *Int. J.Cancer*. 1994. 56:640-645.
89. Hernández-Ávila M., Berumen J. and Lazcano E. Human Papilloma Virus 16-18 infection and cervical cancer in México: A case control study. *Arch. Med. Res.* 1997; 28:265-271.
90. Walboomers J., Jacobs M., Manos m., Bosh X., Kummer A., Shah K., Snijders P., Peto, J., Meijer, C. and Muñoz N. Human Papillomavirus is necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathology*, 1999; 189: 12-19.
91. Walboomers JMM and Meijer, CJLM. Do HPV-negative cervical carcinoma exist? *J. Pathol.* 1997; 181:253-254.
92. Petry KU et al. Cellular immunodeficiency enhances the progression of human papillomavirus associated cervical lesions. *Int. J. Cancer*. 1994; 57:836-840.
93. Jenson AB., Kurman RJ. and Lancaster WD. Tissue effects and host response to human papilloma infection. *Dermatol Clin.* 1991; 9; 203-209.
94. Höpfl R et al. Spontaneous regression of CIN and delayed-type hypersensitivity to HPV-16 oncoprotein E7. *Lancet* 2000; 356: 1985-1986.
95. Spataro V., Norbury C and Harris AL. The ubiquitin-proteasome pathway in cancer. *Br.J.Cancer* 1998; 77: 448-455.
96. Bornstein J. et al. interferon- β and $-\gamma$ but not tumor necrosis factor α , demonstrate immuno-regulatory effects on carcinoma cell lines infected with human papillomavirus. *Cancer* 1997; 79:924-934.
97. Ghaderi M., et al. Tumor necrosis factor α -11 and DRIS-DQ (B*0602) haplotype increase risk for cervical intraepithelial neoplasia in human papillomavirus 16 seropositive women in Northern Sweden. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 9. 1067-1070. (2000).
98. Gostout BS., Poland GA., Calhoun ES., Sohni YR., Giuntoli RL., McGovern RM., Sloan JA., Cha SS and Persing DH. TAP1, TAP2 and HLA-DR2 alleles are predictors of cervical cancer risk. *Gynecol. Oncology* 2003; 88 (3): 326-332.
99. zur Hausen H. Papillomavirus infections: major cause of human cancers. *Biochem. Biophys. Acta.* 1996. 1288. F55-F78.
100. Thomas DB., Ray RM and Qin Q. Risk factors for progression of squamous cell cervical carcinoma in situ to invasive cervical cancer: results of a multinational study. *Cancer Causes & Control.* 2002; 13 (7): 638-690.

101. Ames N, Bruce and Wakimoto Patricia. Are vitamin and mineral deficiencies a major cancer risk? *Nature Rev. Cancer*.2002. Vol. 2; 694-704.
102. Lazcano-Ponce E., Moss S., Alonso de Ruiz, P., Salmeron J. and Hernández M. cervical cancer screening in developing countries: Why is ineffective? The case of Mexico. *Arch. of Med. Res.* 1999; 30:240-250.
103. Hernández M., Lazcano-Ponce E., Alonso de Ruiz P. and Romiev I. Evaluation of cervical cancer screening programme in México: a population-base case-control study. *Int. Epidem. Assoc.* 1998 , 27: 370-376.
104. Cautlé F., Mayrand MH., Provencher D. and Franco E. The future of HPV testing in clinical laboratories and applied virology research. *Clin. Diagn. Virol.* 1997; 8: 123-141.
105. Dillner Joakim. The serological response to papillomaviruses. *Cancer Biol.* 1999; 9: 423-430.
106. Delvenne P., Hubert P., Jacobs N., Giannini SL., Havard L., Renard I., Saboulard D., and Boniver J. The organotypic culture of HPV-transformed keratinocytes: an effective in vitro model for the development of new immunotherapeutic approaches for mucosal (pre) neoplastic lesions. *Vaccine* 2001; 19: 2557-2564.
107. Hamsikova E., Novak J., Hofmannova V., Muñoz N., Bosh FX., Sanjose S., Shah K., Roth Z., and Vonka V. Presence of antibodies to seven human papillomavirus type 16-derived peptides in cervical cancer patients and healthy control. *J.Infec. Dis.* 1994; 170: 1424-1431.
108. Nindl Y., Benites-Bribiesca L., Berumen J., Fisher S., Gross G., López-Carrillo L., Müller, Vazquez Curiel A. y Gissmann L. Antibodies against linear and conformational epitopes of the papilloma virus (HPV) type 16 E6 and E7 oncoproteins in sera of cervical patients. *Arch. of Virology* 1994; 137:341-353.
109. Dillner J., Wikland F., Lenner P. et al. Antibodies against linear and conformational epitopes of HPV type 16 that independently associate with incident of cervical cancer. *Int. J.Cancer* 1995. 60:377-382.
110. Dillner J., Dillner L., Utter G., and Ekland C. Mapping of linear epitopes of human papillomavirus type 16 that independently associate with incident of cervical cancer. *Int.J.Cancer* 1995; 60: 377-382.
111. Kirbauer R., Taub J., Greenstone H., roden R., Durts M., Gissmann L., Lowy DR. and Shiller JT. Efficient self assembly of human papillomavirus type 16 L1-L2 into virus-like particles. *J. Virol.* 1993; 67:6929-6936.

112. Jochmus-Kudielka, I., Schneider, A., Braun, R., Kimmig, R., Koldovsky, U., Schneweis, K.E., Seedorf, K., and Gissmann, L., Antibodies against the human papillomavirus type 16 early proteins in human sera: Correlation of anti-E7 reactivity and cervical cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 81, 1698-1704, 1989.
113. Mann, V.M., de Lao, S.L., Brenes, M., Brinton, L.A., Rawls, J.A., Green, M., Reeves, W.C., Rawls, W.E., Occurrence of IgA and IgG antibodies to select peptides representing human papillomavirus type 16 among cervical cancer patients and controls. *Cancer Res.* 50, 7815-7819, 1990.
114. Kochel, H.G., Monazahian, M., Sievert, K., Hohne, M., Thomssen, C., Teichmann, A., Arendt, P., and Thomssen, R., Occurrence of antibodies to L1, L2, E4 and E7 gene products of human papillomavirus types 6b, 16 and 18 among cervical cancer patients and controls. *Int. J. Cancer* 48, 682-688, 1991.
115. Muller, M., Viscidi, R.P., Sun, Y., Guerrero, E., Hill, P.M., Shah, F., Bosch, F.X., Munoz, N., Gissmann, L., Shah, K.V., Antibodies to HPV 16 E6 and E7 proteins as markers for HPV 16-associated invasive cervical cancer. *Virology* 187, 508-514, 1992.
116. Rocha-Zavaleta, L., Jordan, D., Pepper, S., Corbitt, G., Clarke, F., Maitland, N.J., Sanders, C.M., Arrand, J.R., Stern, P.L., and Stacey, S.N., Differences in serological IgA responses to recombinant baculovirus-derived human papillomavirus E2 protein in the natural history of cervical neoplasia. *Br. J. Cancer* 75, 1144-1150, 1997.
117. Meschede, W., Zumbach, K., Braspenning, J., Scheffner, M., Benitez-Bribiesca, L., Luande, J., Gissmann, L., and Pawlita, M., Antibodies against early proteins of human papillomaviruses as diagnostic markers for invasive cervical cancer. *J. Clin. Microbiol.* 36, 475-480, 1998.
118. Wideroff, L., Schiffman, M., Haderer, P., Armstrong, A., Greer, C.E., Manos, M.M., Burk, R.D., Scott, D.R., Sherman, M.E., Schiller, J.T., Hoover, R.N., Tarone, R.E., and Kirnbauer, R., Seroreactivity to human papillomavirus types 16, 18, 31, and 45 virus-like particles in a case-control study of cervical squamous intraepithelial lesions. *J. Infect. Dis.* 180, 1424-1428, 1999.
119. Hagensee, M.E., Koutsky, L.A., Lee, S.-K., Grubert, T., Kuypers, J., Kiviat, N.B., and Galloway, D.A., Detection of cervical antibodies to human papillomavirus type 16 (HPV-16) capsid antigens in relation to detection of HPV-16 DNA and cervical lesions. *J. Infect. Dis.* 181, 1234-1239, 2000.
120. Scott J. and Smith G. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* 1990; 249: 386-390.

121. Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 1985; 228: 1315-1317.
122. Smith GP, Scott JK. Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Methods Enzymol* 1993; 217: 228-257.
123. Van Wezenbeek PM, Hulsebos TJM, Schoemakerk JGG. Nucleotide sequence of the filamentous bacteriophage M13 DNA genome: comparison with phage fd. *Gene* 1980; 11: 129-148.
124. Marvin DA. Filamentous phage structure, infection and assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1998; 8: 150-158.
125. Frost LS. Conjugative pili and pilus-specific phages. In *Bacterial conjugation* (Clewell DB. ed) 1993; 189-221. Plenum, New York.
126. Russel M. Protein-protein interactions during filamentous phage assembly. *J. Mol. Biol.* 1993; 231: 689-687
127. Russel M. Phage assembly: a paradigm for bacterial virulence factor export. *Science* 1994; 265: 612-614.
128. Manoutcharian K, Gevorkian G, Cano A, Almagro JC. Phage displayed biomolecules as preventive and therapeutic agents. *Current. Pharm. Biotec.* 2001; 2: 217-223.
129. Smith GP. Surface display and peptide libraries. *Gene* 1993; 128: 1-2.
130. Wilson DR. and Finlay BB. Phage display: applications, innovations and issues in phage and host biology. *Can. J. Microbiol.* 1998; 44: 313-329.
131. Rodi DJ. and Makowski L. Phage display technology finding a needle in a vast molecular haystack. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1999; 10: 87-93.
132. Huftan EE., Moerkerk PT., Meulemans EV., De Bruine a., Arends JW. and Hoogenboom HR. Phage display cDNA repertoires: the pVI display system and its applications for the selection of immunogenic ligands. *J.Immunol. Meths.* 1999. 1(2): 39-51.
133. Makowski L. Structural constraints on the display of foreign peptides on filamentous bacteriophages. *Genes* 1993; 1:5-11.
134. Cwirla SE, Petters EA, Barrett RW, Dower WJ. Peptides of phage: a vast library of peptides for identifying ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 87: 6378-6382
135. Lowman HB, Bass SH, Simpson N, Wells JA. Selecting high-affinity binding proteins by monovalent phage display. *Biochemistry* 1991; 30: 10832-10838.

136. Lowman HB, Wells JA. Affinity maturation of human growth hormone by monovalent phage display. *J. Mol. Biol.* 1993; 234: 564-578.
137. Choo Y, Klug A. Selection of DNA binding sites for zinc fingers using rationally randomized DNA reveals code interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91: 11168-11172.
138. Soumillion P, Jespers L, Bouchet M, Marchand-Brynaert J, Winter G, Fastrez J. Selection of beta-lactamase on filamentous bacteriophage by catalytic activity. *J. Mol. Biol.* 1994; 237: 415-422
139. Martín F, Toniatti C, Salvati AL, Venturini S, Sollazzo M. The affinity selection of a minibody polypeptide inhibitor of human interleukin-6. *EMBO J.* 1994; 13: 5303-5309.
140. Smith GP, Scott JK. Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Methods Enzymol.* 1993; 217: 228-257.
141. O'Neil KT, Hoess RH, De Grado WF. Identification of novel peptide antagonists for GPIIb/IIIa from a conformationally constrained phage peptide library. *Proteins* 1992; 14: 509-515.
142. Rebar EJ, Pabo CO. Zinc finger phage: affinity selection of fingers with new DNA-binding specificity. *Science* 1994; 263: 671-673.
143. Adda CG, Anders RF, Tilley L, Foley M. Random sequence libraries displayed on phage: identification of biologically important molecules. *Comb. Chem. High Throughput Screen* 2002; 5: 1-14.
144. Dybwad, A., Forre, O., Kjeldsen-Kragh, J., Natvig, J.B., and Sioud, M., Identification of new B cell epitopes in the sera of rheumatoid arthritis patients using a random nanopeptide phage library. *Eur. J. Immunol.* 23,3189-3193, 1993.
145. Cortese, I., Tafi, R., Grimaldi, L.M.E., Martino, G., Nicosia, A., and Cortese, R., Identification of peptides specific for cerebrospinal fluid antibodies in multiple sclerosis by using phage libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 11063-11067, 1996.
146. Gevorkian, G., Manoutcharian, K., Almagro, J.C., Govezensky, T., and Dominguez, V., Identification of a autoimmune thrombocytopenic purpura-related epitopes using phage-display peptide library. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 86, 305-309, 1998.
147. Gevorkian G., Manoutcharian K., Govezensky, T., Cano J., Dominguez V., Santamaría H., Larralde C. Identification of mimotopes of platelet autoantigens associated with autoimmune thrombocytopenic purpura. *J. Autoimmun.* 15, 33-40, 2000.

148. Manoutcharian, K., Sotelo, J., Garcia, E., Cano, A., Gevorkian, G., Characterization of cerebrospinal fluid antibody specificities in neurocysticercosis using phage display peptide library. *Clin. Immunol.* 91, 117-121, 1999.
149. Kang CK., Jayasinha V. and Martin PT. Identification of peptides that specifically bind A beta (1-40) amyloid *in vitro* and amyloid plaques in Alzheimer's disease brain using phage display. *Neurobiol. Dis.* 2003; 14: 146-156.
150. Wu H, Yang WP, Barbas CF . Building zinc fingers by selection: toward a therapeutic application. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92: 344-348.
151. Djonegoro BM, Benedik MJ, Wilson RC. Bacteriophage surface display of an immunoglobulin-binding domain of Staphylococcus aureus protein A. *Biotechniques* 1994; 12: 169-172.
152. Cramer R, Suter M. Display of biologically active proteins on the surface of filamentous phages: A cDNA cloning system for selection of functional gene products linked to the genetic information responsible for their production. *Gene* 1993; 137: 69-75.
153. Jacobsson K., Frykberg, L. Phage display shot-gun cloning of ligand-binding domains of prokaryotic receptors approaches 100%. Correct clones. *BioTechniques* 1996; 20:1070-1081.
154. Barbas CF, Kang A, Lerner R, Benkovic S. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surface: the gene III site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; 88: 7978-7982.
155. Barbas CF. Synthetic human antibodies. *Nat. Med.* 1995; 1: 837-839.
156. Gram H, Marconi LA, Barbas CF, Kang AS. In vitro selection and affinity maturation of antibodies from a naïve combinatorial immunoglobulin library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89: 3576-3580.
157. Clackson T, Hoogenboom HR, Griffiths AD, Winter, G. Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature (London)* 1991; 352: 624-628.
158. Hoogenboom HR, Winter G. By passing immunization. Human antibodies from synthetic repertoires of germlines VH genes segments rearranged in vitro. *J. Mol. Biol.* 1992; 227: 381-388.
159. Vladon P. and Sharff M. Enhancement of ELISAs for screening peptides in epitope phage display libraries. *J. Immun. Meth.* 1996; 197: 171-179.

160. Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (J.Sambrook, E.F.Fritsch and T.Maniatis, E ds.), pp. 4.29- 4.30. 2nd. E d. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
161. Rocha-Zavaleta, L., Barrios, T., García-Carrancá, A., Valdespino, V., y Cruz-Talonia, F. 2001. Cervical secretory immunoglobulin A to human papillomavirus type 16 (HPV 16) from HPV 16 infected women inhibit HPV 16 virus like particles-induced hemagglutination of mouse red blood cells. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2001; 31: 47-55.
162. Müller M., Gawsepohl H., Martynoff G., Frank R. and Brasseur R. Identification of seroreactive regions of human papillomavirus type 16 proteins E4, E6, E7 y L1. *J. Gen. Virol.* 1990; 71: 2709-2717.
163. Folgori A., Tafi R., Meola A., Felici F., Galfre G., Cortese R., Monaci P. and Nicosia A. A general strategy to identify mimotopes of pathological antigens using random peptide libraries and human sera. *EMBO J.* 1994; 13:2236-2243.

ARTÍCULO
DE
REVISIÓN

Identification of Peptide Sequences Specific for Serum Antibodies from Human Papillomavirus-Infected Patients Using Phage Display Libraries

H. Santamaria, K. Manoutcharian, L. Rocha, E. Gonzalez, G. Acero, T. Govezensky, L. I. Uribe,*
A. Olguin,* J. Paniagua,* and G. Gevorkian

*Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70228, Ciudad Universitaria, C.P. 04510 Mexico, D.F., Mexico; and *Laboratorios Silanes, Amores 1304, C.P. 03100 Mexico, D.F., México*

Three random phage display peptide libraries were screened with sera from human papillomavirus (HPV)-infected patients to characterize the specificities of antibodies present in patients' sera and to identify molecules that correspond to or mimic natural epitopes; 141 phage clones were randomly selected in three rounds of bioselection and their binding properties were analyzed in ELISA using sera from 36 patients with confirmed HPV 16 infection and 24 healthy control female blood donors. Sixteen of 36 (44%) patients' sera reacted with at least 1 phage clone, and only 2 of 24 female donors' sera showed positive reaction with 1 of the selected clones. We conclude that the combination of various disease-specific epitopes generated by screening of phage display peptide libraries may potentially lead to a multicomponent diagnostic assay for the early detection of HPV infection and precancerous cervical lesions, making possible the prevention of one of the most common cancers in women. © 2001 Elsevier Science

Key Words: phage display peptide library; human papillomavirus; cervical cancer.

INTRODUCTION

Cervical cancer is the second most common cancer among women worldwide and is the leading cause of cancer mortality in women in many developing countries (1). Cervical cancer has been shown to have a central causal agent—human papillomavirus (HPV). The existence of HPV-negative cervical carcinomas has been questioned (2) and an overall HPV prevalence of 99.7% among cervical cancers worldwide has been reported (3). These data provide evidence that cervical cancer could be prevented by interfering with HPV infection. The key to prevention is the timely identification and management of precancerous cervical lesions through accessible and effective screening programs. Screening for cervical cancer and its precursors has traditionally been performed by Papanicolaou test,

and since the introduction of organized cytological cervical cancer screening 50 years ago, the mortality rate from cervical cancer had dramatically decreased in the developed world (1). However, screening programs based on the Pap smear are not well established in most developing countries where precise quality control is difficult. The absence of HPV-negative cervical carcinomas strengthens the rationale for HPV testing in combination with the Pap test in large screening programs in developing countries. Currently existing PCR- and hybrid capture-based HPV-detecting systems are probably not suitable for application in developing countries because of their costs and the necessity of modern laboratory facilities as well as highly skilled personnel. A sensitive immunological test for HPV infection would be appropriate in these countries but it does not yet exist. The development of an immunological HPV-detection system has been hampered by a number of methodological obstacles. It is known that more than 35 HPV types infect the genital tract, complicating the detection and distinction of cancer-associated HPV viruses. Another principal difficulty is the unavailability of pure viral antigens since papillomaviruses cannot be grown in tissue culture systems. In most serological studies focused on the development of immunological tests for diagnosis of cervical cancer and its precursors either synthetic peptides representing epitopes of HPV or bacterially produced fusion proteins have been used. It has been shown that antibodies directed to the E2, E4, E6, E7, L1, and L2 proteins of HPV 16 and HPV 18 were more frequently found in sera from patients with cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia (CIN) than in healthy women (4–11). However, a clinically useful screening or monitoring test for cervical cancer, CIN, or HPV infection has not been developed and the design of novel immunoreagents for a multicomponent diagnostic assay would have a great potential.

Over the last years, phage display peptide libraries, first described by Scott and Smith (12), have raised

interest as a source of a large number of epitopes and have been used widely in studies on antigen-antibody binding (13, 14). It has been shown that by the screening of phage libraries with monoclonal or polyclonal antibodies, linear epitopes as well as mimotopes that mimic linear, discontinuous, and even nonpeptidic epitopes of antigen could be identified. By screening phage display peptide libraries with sera or cerebrospinal fluid samples from patients with rheumatoid arthritis (15), multiple sclerosis (16), autoimmune thrombocytopenic purpura (17, 18), or neurocysticercosis (19), disease-specific epitopes have been selected and proposed for the development of diagnostic or preventive reagents. In the present study we apply phage display technology to characterize the specificities of antibodies present in sera from cervical cancer-, CIN-, and HPV-16-infected patients to identify peptides that correspond to or mimic natural epitopes. The identified molecules could be used for the development of a sensitive and simple test for HPV infection, combining the most disease-specific epitopes.

MATERIALS AND METHODS

Human Sera

The collection of serum samples from patients attending the Centro Nacional de Clinicas de Displasias at the Hospital General de Mexico collected in 1997 was used. This study population consisted of 36 individuals referred to for colposcopy because of an abnormal Pap test. Among these patients 6 had a diagnosis of CIN and 2 had cervical cancer. All patients were confirmed to be infected by HPV 16 (HPV 16 was detected previously by PCR). When tested for the presence of specific anti-HPV 16 virus-like particle (VLP) antibodies, 31 of 36 individuals had sIgA in cervical secretion samples and 20 of 36 had detectable levels of IgG in sera (21). Also, sera from 24 clinically healthy blood donors obtained at Banco Central de Sangre, Centro Medico Nacional Siglo XXI, Mexico, were used as controls.

Affinity Selection of Phages by Biopanning

Selection of phages by biopanning was performed as described in our previous works (18, 19). Three phage display peptide libraries from New England Biolabs (Beverly, MA) were used. The displayed random peptides are expressed at the N-terminus of a minor coat protein (pIII) of M13 phage. In two libraries 7- and 12-mer peptides are linear. The third library is a constrained one, where 7-mer peptides are displayed between flanking cysteine residues. In all biopanning experiments Nunc MaxiSorp (Roskilde, Denmark) microplates coated with mouse anti-human IgG (Fc re-

gion) (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA) were used. Human sera were diluted in phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.1% bovine serum albumin (BSA); 10^{11} plaque-forming units (PFU) from the original library were used in the first round and the same amount of amplified eluate (10^{12}) was used in all subsequent rounds.

DNA Sequencing

Single-stranded DNA was prepared from the purified phage as described by Sambrook *et al.* (20). T7 Sequenase version 2.0 Quick-Denature plasmid sequencing kit (Amersham, UK) and [α - 32 S]dATP (Amersham) were used according to the manufacturer's instructions.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Three types of ELISA were performed. In the first set of experiments carried out as described in our previous works (18, 19), 10^{10} PFU of corresponding phage clones diluted in 100 μ l of PBS (pH 7.4) were added to each well of Nunc MaxiSorp microplates and incubated overnight at 4°C. Human sera were diluted 1:100 in PBS/1% BSA. Goat anti-human IgG and antibodies conjugated with HRP and ABTS Single Solution (all from Zymed Laboratories Inc.) were used. All samples were tested in duplicate. The absorbance was measured at 405 nm. In the second set of experiments Nunc MaxiSorp microplates were coated first with anti-M13 monoclonal antibody (Amersham) diluted in PBS, and after plates were blocked with PBS/3% BSA, phage clones (10^{11} /ml) were added. After 2 h incubation at 37°C, plates were washed with PBS-Tween 20, human sera were added, and the subsequent steps were performed as described above. In the third set of experiments, the biopanning process was mimicked: microtiter plates were coated with mouse anti-human IgG antibodies and blocked with PBS/BSA, then human sera were added, and plates were incubated at 37°C. After washing, phage clones were added, plates were incubated 2 h at 4°C, and mouse anti-M13 monoclonal antibody was conjugated with HRP (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ). ABTS Single Solution was used to detect phage captured by antibodies present in human sera.

HPV 16 VLP, kindly provided by Dr. R. Viscidi (Johns Hopkins University School of Medicine), were used as antigen in ELISA at a concentration of 5 μ g/ml to determine the presence of anti-HPV 16 IgG antibodies in human sera. Human sera were diluted 1:200, and all subsequent steps were performed as described for phage ELISA (types 1 and 2). In competition ELISA the synthetic peptide PIKPPNNKILVLPKVS, pre-

pared in our laboratory by Fmoc strategy and purified by high-performance liquid chromatography, was used. Sera were incubated with peptide 1 h at room temperature before adding to plates coated with HPV 16 VLP.

Homology Search

Regions of amino acid similarity between peptide inserts of the selected clones and sequences in the SWISS-PROT protein sequence database were studied using the WU-BLAST 2 computer program ("default" parameters were used).

RESULTS

Screening of Three Random Peptide Libraries with Sera from HPV-Infected Patients

Three phage display peptide libraries of hepta-, nona-, and dodecapeptides fused to the minor coat protein of phage M13 were screened in eight experiments with three serum samples from patients with confirmed HPV 16 infection. All three patients had high levels of specific anti-HPV 16 VLP IgG antibodies in sera and sIgA antibodies in cervical secretion samples ($OD > 1.0$) (21). Two of the three libraries used in this study displayed linear hepta- and dodecapeptides, while in the third library heptapeptides were displayed between two flanking cysteine residues.

Three rounds of biopanning were performed in each experiment. After the first round, about 10^4 and 10^5 phages of the initial 10^{11} phages were eluted in seven screening experiments, with the exception of the experiment with the dodecapeptide library and serum from patient 42, where 8×10^2 phage were recovered (Table 1). The number of input phage in all subsequent rounds was 10^{12} . As shown in Table 1, the amount of retained phage in the second round increased nearly

100-fold in five experiments, 10-fold in two experiments, and 1000-fold in screening the dodecapeptide library with serum from patient 42. Finally, after the third round of biopanning, the amount of affinity-selected phage remained the same in three experiments, increased 10-fold in three experiments, increased 100-fold in one experiment, and decreased 10-fold in the experiment in which the dodecapeptide library was screened with serum from patient 42.

The 141 plaques were randomly selected from the plated eluates after the third round of all eight experiments and DNA sequences of inserts of these clones were determined. The deduced amino acid sequences of peptide inserts are summarized in Fig. 1. All peptides in group A have methionine residues at position 1 and lysine residues at position 7. In all peptides in group B the methionine residue at position 1 is conserved. One sequence (FHENWPS) was found 10 times, two sequences (SPYDGFSAARRG and SPINNTKPHEAR) were found 9 times, one sequence (MPMTPAK) was found 8 times, another one (MKIPNNKLFLPV) was found 4 times, and three (MHPSNSKSPPRH, QTIGNAKPLGRV, SDSHVGKLSLAH) were found twice.

Sequence comparison between peptide inserts of selected clones and HPV 16 proteins revealed some homologies. Thus, peptides SPINNTKPHEAR and MKIPNNKLFLPV, selected nine and four times, respectively, bear sequence similarity with HPV 16 L1 protein (Fig. 2). Another five clones shown on Fig. 2 have homology with the same region of HPV 16 L1.

Phage ELISA with Sera from HPV-Infected Patients and Blood Donors

The binding properties of selected phage clones were analyzed by ELISA. All phage clones selected in screening experiments with serum from patient 42 and

TABLE 1
Affinity Selection of Phages That Bind to Antibodies Present in Sera from HPV-Infected Individuals in Eight Biopanning Experiments

Serum/library	First round		Second round		Third round	
	In ^a	Out ^b	In	Out	In	Out
25/7	10^{11}	4.4×10^4	10^{12}	6.4×10^6	10^{12}	4×10^5
25/12	10^{11}	4.9×10^4	10^{12}	4.8×10^6	10^{12}	1×10^7
42/7	10^{11}	5.2×10^4	10^{12}	7.2×10^6	10^{12}	4×10^7
42/9	10^{11}	3.9×10^5	10^{12}	2.5×10^7	10^{12}	9.2×10^7
42/12	10^{11}	8×10^5	10^{12}	1.3×10^6	10^{12}	1.6×10^5
51/7	10^{11}	7.2×10^4	10^{12}	2×10^6	10^{12}	4×10^7
51/9	10^{11}	1.4×10^5	10^{12}	4×10^6	10^{12}	5.9×10^5
51/12	10^{11}	1×10^4	10^{12}	7.8×10^5	10^{12}	3.6×10^5

^a The total number of phage added to the Ab-coated plate.

^b The total number of phage eluted from Ab-coated plates after each round.

Group A		Group B	
MPVNDTK	(51-7)	MSSQFYQ	(25-7)
MPPCNYK	(51-7)	MKVNLRL	(51-7)
MKVSNSK	(51-7)	MSRPFQ	(51-7)
MKVSNHKDIPLP	(42-12)	MPLTKQD ²	(42-7)
MHPSNSKSPRH ²	(42-12)	MPLSQNVAPERT	(42-12)
MKIPNNKLFPLV ⁴	(25-12)	MPSHSTVSPST	(25-12)
MPMTPAK ⁴	(42-7)	MHQTTAQLRSP	(25-12)
MPLQNSK	(42-7)	CMPYGLAC	(51-9)
MRPDNAK	(42-7)	CMNKPAYAC	(42-9)
MPLVSQK	(42-7)	CMKNMKQPC	(51-9)
MRLTSK	(42-7)		

Miscellaneous sequences

TISRTGI	(51-7)	AASMRLEAHSK	(25-12)	APYKAMRDQA	(42-12)
LKLRHLP	(51-7)	THMQGWWWSKPV	(25-12)	QTIGNAKPLGRV ²	(42-12)
SASHPPP	(51-7)	GSGLPLYMLWLT	(25-12)	KDQNTYP	(42-7)
DPASLFP	(51-7)	LPLQHQFNPSG	(25-12)	GKTTAAS	(42-7)
GLLTAYV	(51-7)	GFMSNATIANG	(25-12)	WAPYMTN	(42-7)
TLQALPS	(25-7)	ANQSLPDRLYKS	(25-12)	GEADFNM	(42-7)
WTYSPIA	(25-7)	KLALSNGAIAQP	(25-12)	CSSGPIAPC	(42-9)
SLPKMLS	(25-7)	LSDTQAVYSADN	(25-12)	CALHPPPPC	(42-9)
ARLLFGI	(25-7)	QPIENYKLMSPST	(25-12)	CKEGKSPC	(42-9)
QRDRLP	(25-7)	QLPTLGVPTQP	(25-12)	CNASTSMQC	(42-9)
LHSRPL	(25-7)	AAPDDVLPNPAR	(25-12)	CTKMKKNIC	(42-9)
SCFFGRL	(25-7)	RFPDQAPSPPP	(25-12)	CNKLSRPVC	(42-9)
NAMSPPA	(25-7)	HAHSRMLSPMP	(51-12)	CPVYKPC	(42-9)
FHLSTAS	(25-7)	SPINNTKPHEAR ²	(51-12)	KHARTSE	(25-7)
IRNYGG	(25-7)	TLKLRILPEI	(51-12)	QTATLY	(25-7)
NRLHAYP	(25-7)	QNKIQHFTNS	(51-12)	CAKVVQADC	(42-9)
AMGYQHP	(25-7)	IKLWTRKASLAM	(51-12)	CTHPELFC	(42-9)
HLVCRPS	(25-7)	AKFNARIPGFM	(51-12)	CQLDSQKIC	(51-9)
IVQLTQW	(25-7)	FVPQLNLHTPKN	(51-12)	CLEASFRFC	(51-9)
YSHADTM	(25-7)	KSPINHTKRLW	(51-12)	CSPLTHAIC	(51-9)
AGNDRMH	(25-7)	SPYDGFSAARRG ²	(42-12)	CNTRLLHNC	(51-9)
LANYYGG	(25-7)	SDSHVGLSLAH ²	(25-12)	CIPASGQTC	(51-9)
CDATTLH	(25-7)	SPLFLDQRLSTP	(25-12)	CYETGPWAC	(51-9)
DSFTPA	(25-7)	PSACWEAGAPSR	(25-12)	CNFTHPGYC	(51-9)
FVAHSPP	(25-7)	NAPPLFWSHQW	(25-12)	CAEPNLLC	(51-9)
SPIAPPR	(25-7)	IVGTGPPSSTV	(25-12)	CNSSMNSC	(51-9)
DMGGRS	(25-7)	HDQILPGGVRHL	(42-12)	CTLSHGSPC	(51-9)
FHENWPS ¹⁰	(25-7)				

FIG. 1. Summary of sequences of phage clones isolated in biopanning experiments using sera from patients 25, 42, and 51 and libraries of hepta-, nona-, and dodecapeptides. Identical residues are highlighted in bold letters. Numbers in parenthesis indicate the screening experiment in which the mentioned phage clone was obtained (serum number followed by a number that indicates the length of the peptide in the library). Superscripts indicate how many times each sequence was independently isolated.

the heptapeptide library were first tested by ELISA with serum 42 and two control negative sera performing all three types of ELISA described under Materials and Methods. Since 8 of 18 clones bear the same insert sequence, only 11 different clones were tested in these ELISA. Phage clones that bound strongly to serum from patient 42 (Table 2) were further analyzed in ELISA with sera from other HPV-infected individuals as well as with sera from control female blood donors (Table 3). In these sets of experiments the second and the third types of ELISA described under Materials and Methods were performed and the best results were obtained using the third type of ELISA. In all phage ELISA experiments the specificity of binding was confirmed by using nonrelated phage B1A, selected in our previous work and expressing the dodecapeptide SH-VPRIGGNFW. By this means we excluded the background interaction of patient sera with the phage par-

P I K K P N N N K	HPV 16 L1
M K I P N N - K L F L P V	(25-12) ⁴
S P I N N K P H E A R	(51-12) ⁹
M K V S N S K	(51-7)
M K V S N H K D I P P L	(42-12)
M H P S N S K S P P R H	(42-12)
M P L Q N S K	(42-7)
M R P D N A K	(42-7)

FIG. 2. Alignment of the amino acid sequences of peptide inserts of the selected clones that have homology with HPV 16 L1 protein. Bold letters indicate identical residues, and italic letters indicate homologous residues. Numbers in parenthesis indicate the screening experiment in which the mentioned phage clone was obtained (serum number followed by a number that indicates the length of peptide in library). Superscripts indicate how many times each sequence was independently isolated.

title itself and demonstrated the specific interaction with the peptide insert of an affinity-selected positive phage clone. Thus, 16 of 36 patient serum samples showed reactivity with at least 1 of the phage clones listed in Table 2, and none of these sera reacted with control nonrelated phage. Only 2 of 24 sera from female blood donors reacted weakly with 1 of the positive clones (Table 3).

Phage clones with peptide inserts SPINNTKPHEAR (phage 25-12-3) and MKIPNNKLFPLV (phage 25-12-13) reacted with 8 of 15 HPV 16 VLP-positive sera tested (Table 3), and no reaction was observed with sera from 24 female blood donors (Table 3).

In summary, 16 of 36 (44%) patients' sera reacted at least with one phage clone selected in biopanning experiments, and only 2 of 24 female donors' sera showed a positive reaction with the selected clones.

TABLE 2

Reactivity of Serum from Patient 42 with Phage Clones from a Bioselection Experiment with a Heptapeptide Library^a

Phage clone	OD 405 _{nm}		
	HPV 42 ^b	NEG 1 ^c	NEG 2
B1A	0.153	0.212	0.187
42-7-3	0.868	0.213	0.463
42-7-5	1.041	0.381	0.376
42-7-7	1.461	0.763	0.556
42-7-15	0.811	0.307	0.258
42-7-16	1.194	0.245	0.232

^a The results obtained in the third type of ELISA described under Materials and Methods are presented.

^b The results are expressed as an average value of duplicates. Positive values are in boldface.

^c Four sera from healthy female blood donors were used as negative controls and all had mean OD values < 0.2.

TABLE 3
Reactivity of Sera from HPV-Infected Patients with Phage Clones in ELISA

Sera	HPV 16 VLP	B1A	42-7-3	42-7-5	42-7-7	42-7-16	25-12-13	51-12-3
HPV13	1.52	0.394	ND	ND	0.715	ND	ND	ND
HPV20	1.06	0.213	0.479	0.398	0.482	0.385	ND	ND
HPV27	1.37	0.248	1.159	0.623	0.934	0.688	0.83	0.4
HPV42	0.94	0.205	1.496	0.927	2.026	1.698	ND	ND
HPV51	0.77	0.23	ND	ND	0.801	0.632	0.29	0.61
HPV56	2.6	0.090	0.447	0.225	0.120	0.139	ND	ND
HPV72	0.146	0.367	ND	ND	0.727	0.590	ND	ND
HPV75	0.68	0.205	ND	ND	0.532	0.288	ND	ND
HPV80	0.85	0.365	ND	ND	0.352	0.635	ND	ND
HPV83	0.69	0.237	ND	ND	0.634	0.198	ND	ND
HPV93	1.27	0.163	0.292	0.210	0.748	0.163	0.309	0.65
HPV98	1.48	0.229	ND	ND	0.494	0.291	0.25	0.2
HPV25	1.09	0.21	0.29	0.24	0.3	0.16	1.46	1.34
HPV19	2.33	0.179	ND	ND	ND	ND	0.27	0.51
HPV76	0.92	0.21	ND	ND	0.27	ND	1.44	0.385
HPV24	1.21	0.2	ND	ND	1.37	ND	0.28	1.55

Note. The third type of ELISA described under Materials and Methods was performed. Only serum that had a positive OD value at least with one phage clone is included in this table. The results are expressed as an average value of duplicates. Positive values are in boldface. Each serum included was positive in at least two independent experiments. The cutoff values were calculated as the mean of negative sera plus 3 SD for each phage and were 0.38 for phage clone 42-7-3; 0.34 for phage clone 42-7-5; 0.4 for phage clone 42-7-7; 0.2 for phage clone 42-7-16; 0.61 for phage clone 25-12-13; and 0.21 for phage clone 51-12-3. In addition, the reactivity of each serum sample was considered positive with the corresponding phage if it was higher than that with control nonrelated phage.

DISCUSSION

In this study we performed screening experiments using patient sera and two types of phage display libraries containing linear and cyclic peptide inserts for the identification of HPV infection-specific epitopes/mimotopes. Since our previous studies as well as results reported by other groups (22) indicated that the subtraction of nonspecific phages by using control negative sera did not significantly "purify" the library, in this study we applied a commercial library directly to patient sera immobilized on plates as described in our reports (18, 19). After the third round of biopanning, phage clones were randomly selected and their inserts were sequenced. After analysis of peptide sequences of phage clones, those with the identical sequence of insert as well as with some homology with HPV 16 L1 were selected for further studies. However, in one experiment with serum from patient 42 and the heptapeptide library all randomly selected and sequenced clones were used for further characterization, and one of them, despite the absence of any homology and any consensus motif with other clones, appeared to be strongly positive with a number of HPV-infected patients. We suggest that the peptide insert of this phage could mimic a conformational epitope of a viral protein. In order to prevent the loss of potentially useful phage clones, it would seem appropriate first to test all the randomly selected clones with the serum sample used in the screening experiment and, after sequencing of phage inserts of all positive clones, then to test them in

ELISA with a panel of patients' and healthy individuals' sera. However, this approach could be appropriate in studies where there is a sufficient amount of serum, as for example, in the case of rabbit or mouse immune sera. In our case, we had limited amounts of HPV-infected patient sera and were forced to follow the described strategy (18, 19).

It is interesting to note that two peptide sequences of phage inserts (SPINNTKPHEAR and MKIPNNKLFPLV) isolated multiple times using two different serum samples had a sequence homology with the same region of HPV 16 major capsid protein L1 (Fig. 2) and, most strikingly, that this region is within a loop exposed on the surface of the L1 protein as assessed by exploring the 3D structure at the Protein Databank Database, pointing to this region as a possible immunogenic epitope of the molecule. Although phage clones expressing SPINNTKPHEAR and MKIPNNKLFPLV peptides were specifically recognized by various HPV-16-positive sera, however, a synthetic peptide, PIKKPNNKILVVKVSG, comprising this loop did not abolish the interaction of HPV 16 L1 protein with human sera (data not shown), suggesting that polyclonal sera may contain a collection of antibodies recognizing different epitopes of whole protein molecule, and a single epitope, if it is not a immunodominant one, is not sufficient to inhibit the reaction between HPV 16 L1 protein and polyclonal sera. Another explanation is that the mentioned epitope could be a conformational one, and a linear peptide synthesized in this study could not compete with L1 protein.

Phage with another sequence of peptide insert found multiple times (MPMTPAK) was recognized by various HPV-16-positive sera; however, this peptide did not show any homology with viral proteins. We hypothesized that this sequence may represent a mimotope of a conformational epitope. The conservation of the MP(X)₂K and the MK(X)₂K motifs in various phage clones affinity-selected with different libraries and different HPV-positive serum samples indicates that these amino acids may be critical for peptides to acquire a structure that fits the antigen-binding site of a fraction of anti-HPV 16 antibodies.

Another interesting fact was that phage clones with the peptide insert FHENWPS were isolated 10 times using serum from patient 25 and a heptapeptide library; however, this phage did not react with any other HPV-16-positive serum. It is important to note, that the same peptide insert, FHENWPS, was found in 60% of phage clones isolated after panning of the heptapeptide library with an anti- β -1,2-linked mannoside monoclonal antibody (mAb) capable of protecting animals from disseminated candidiasis (23). Authors showed that anti-FHENWPS antibodies recognized *Candida albicans* cell walls, thus confirming that this peptide is a mimotope of *C. albicans*-derived β -1,2-linked mannoses. Patient 25 proved to be infected by *C. albicans*, and the selection of phage with the FHENWPS insert sequence was due to this infection.

In conclusion, our studies on a limited group of patients and healthy controls suggest that a combination of various disease-specific epitopes generated by the screening of phage display peptide libraries with patients' sera may potentially lead to a multicomponent diagnostic assay for the detection of HPV infection and precancerous cervical lesions, making possible the prevention of one of the most common cancers in women. This is the first report on using phage display technology for the identification of HPV-related epitopes. Additional studies with the remaining phage clones not yet tested in this report and a larger panel of sera from HPV-infected patients will be required, together with screening of phage libraries with sIgA antibodies present in cervical secretion samples from these patients, in order to develop an immunodiagnostic clinical test for HPV infection.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Carmen Bautista, Yetzi Robles, and Natalia N. Kopitina for technical assistance. This study was supported by National Institutes of Health Grant R21CA82100-01 to G.G. We appreciate financial support from Silanes Laboratories, Mexico. All sera were kindly provided by Dr. Fernando Cruz-Talonia from the Centro Nacional de Clinicas de Displasias at the Hospital General de Mexico.

REFERENCES

- Soler, M. E., New technologies in cervical cancer precursor detection. *Curr. Opin. Oncol.* **12**, 460-465, 2000.
- Walboomers, J. M. M., and Meijer, C. J. L. M., Do HPV-negative cervical carcinomas exist? *J. Pathol.* **181**, 253-254, 1997.
- Walboomers, J. M. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., Snijders, P. J. F., Peto, J., Meijer, C. J. L. M., and Muñoz, N., Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* **189**, 12-19, 1999.
- Jochmus-Kudielka, I., Schneider, A., Braun, R., Kimmig, R., Koldovsky, U., Schneeweis, K. E., Seedorf, K., and Gissmann, L., Antibodies against the human papillomavirus type 16 early proteins in human sera: Correlation of anti-E7 reactivity and cervical cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **81**, 1698-1704, 1989.
- Mann, V. M., de Lao, S. L., Brenes, M., Brinton, L. A., Rawls, J. A., Green, M., Reeves, W. C., and Rawls, W. E., Occurrence of IgA and IgG antibodies to select peptides representing human papillomavirus type 16 among cervical cancer patients and controls. *Cancer Res.* **50**, 7815-7819, 1990.
- Kochel, H. G., Monazahian, M., Sievert, K., Hohne, M., Thomsen, C., Teichmann, A., Arendt, P., and Thomsen, R., Occurrence of antibodies to L1, L2, E4 and E7 gene products of human papillomavirus types 6b, 16 and 18 among cervical cancer patients and controls. *Int. J. Cancer* **48**, 682-688, 1991.
- Muller, M., Viscidi, R. P., Sun, Y., Guerrero, E., Hill, P. M., Shah, F., Bosch, F. X., Muñoz, N., Gissmann, L., and Shah, K. V., Antibodies to HPV 16 E6 and E7 proteins as markers for HPV 16-associated invasive cervical cancer. *Virology* **187**, 508-514, 1992.
- Rocha-Zavaleta, L., Jordan, D., Pepper, S., Corbitt, G., Clarke, F., Maitland, N. J., Sanders, C. M., Arrand, J. R., Stern, P. L., and Stacey, S. N., Differences in serological IgA responses to recombinant baculovirus-derived human papillomavirus E2 protein in the natural history of cervical neoplasia. *Br. J. Cancer* **75**, 1144-1150, 1997.
- Meschede, W., Zumbach, K., Braspenning, J., Scheffner, M., Benitez-Bribiesca, L., Luande, J., Gissmann, L., and Pawlita, M., Antibodies against early proteins of human papillomaviruses as diagnostic markers for invasive cervical cancer. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 475-480, 1998.
- Wideroff, L., Schiffman, M., Haderer, P., Armstrong, A., Greer, C. E., Manos, M. M., Burk, R. D., Scott, D. R., Sherman, M. E., Schiller, J. T., Hoover, R. N., Tarone, R. E., and Kirmbauer, R., Seroreactivity to human papillomavirus types 16, 18, 31, and 45 virus-like particles in a case-control study of cervical squamous intraepithelial lesions. *J. Infect. Dis.* **180**, 1424-1428, 1999.
- Hagensee, M. E., Koutsky, L. A., Lee, S.-K., Grubert, T., Kuypers, J., Kiviat, N. B., and Galloway, D. A., Detection of cervical antibodies to human papillomavirus type 16 (HPV-16) capsid antigens in relation to detection of HPV-16 DNA and cervical lesions. *J. Infect. Dis.* **181**, 1234-1239, 2000.
- Scott, J. K., and Smith, G. P., Searching for peptide ligands with epitope library. *Science* **249**, 386-390, 1990.
- Grihalde, N. D., Chen, Y. C. J., Golden, A., Gubbins, E., and Mandecki, W., Epitope mapping of anti-HIV and anti-HCV monoclonal antibodies and characterization of epitope mimics using a filamentous phage peptide library. *Gene* **166**, 187-195, 1995.
- Germaschewski, V., and Murray, K., Screening a monoclonal antibody with a fusion-phage display library shows a discontinuity in a linear epitope within preS1 of hepatitis B virus. *J. Med. Virol.* **45**, 300-305, 1995.

15. Dybwad, A., Forre, O., Kjeldsen-Kragh, J., Natvig, J. B., and Sioud, M., Identification of new B cell epitopes in the sera of rheumatoid arthritis patients using a random nanopeptide phage library. *Eur. J. Immunol.* **23**, 3189–3193, 1993.
16. Cortese, I., Tafi, R., Grimaldi, L. M. E., Martino, G., Nicosia, A., and Cortese, R., Identification of peptides specific for cerebrospinal fluid antibodies in multiple sclerosis by using phage libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 11063–11067, 1996.
17. Bowditch, R. D., Tani, P., and McMillan, R., Characterization of autoantigenic epitopes on platelet glycoprotein IIb/IIIa using random peptide libraries. *Blood* **88**, 4579–4584, 1996.
18. Gevorkian, G., Manoutcharian, K., Almagro, J. C., Govezensky, T., and Dominguez, V., Identification of autoimmune thrombocytopenic purpura-related epitopes using phage-display peptide library. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **86**, 305–309, 1998.
19. Manoutcharian, K., Sotelo, J., Garcia, E., Cano, A., and Gevorkian, G., Characterization of cerebrospinal fluid antibody specificities in neurocysticercosis using phage display peptide library. *Clin. Immunol.* **91**, 117–121, 1999.
20. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., Small scale preparation of single-stranded bacteriophage M13 DNA. In "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis, Eds.), pp. 4.29–4.30. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
21. Rocha-Zavaleta, L., Barrios, T., Garcia-Carranca, A., Valdespino, V., and Cruz-Talonia, F., Cervical secretory immunoglobulin A to human papillomavirus type 16 (HPV16) from HPV16-infected women inhibit HPV16 virus-like particles-induced hemagglutination of mouse red blood cells. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **31**, 47–51, (2001).
22. Folgori, A., Tafi, R., Meola, A., Felici, F., Galfre, G., Cortese, R., Monaci, P., and Nicosia, A., A general strategy to identify mimotopes of pathological antigens using only random peptide libraries and human sera. *EMBO J.* **13**, 2236–2243, 1994.
23. Jouault, T., Fradin, C., Dzierszinski, F., Borg-Von-Zepelin, M., Tomavo, S., Corman, R., Trinel, P. A., Kerckaert, J. P., and Poulain, D., Peptides that mimic *Candida albicans*-derived beta-1,2-linked mannosides. *Glycobiology* **11**, 693–701, 2001.

Received April 25, 2001; accepted with revision September 14, 2001; published online November 6, 2001