



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE ANTICUERPOS
DE INHIBIR LA UNIÓN DEL VIRUS DEL
PAPILOMA HUMANO TIPO 16 (VPH 16) AL
RECEPTOR CELULAR HEPARÁN SULFATO”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

PRESENTA:

TANIA VALENTINA LÓPEZ PÉREZ



**FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM**

**DIRECTORA DE TESIS Y ESTUDIOS PROFESIONALES
DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA**



2004

**FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION I DE CIENCIAS BÁSICAS**



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.



GOBIERNO NACIONAL
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MEXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Estudio de la capacidad de anticuerpos de inhibir la unión del virus del papiloma humano tipo 16 (VPH 16) al receptor celular heparán sulfato"

realizado por Tania Valentina López Pérez

con número de cuenta 9744106-3 , quien cubrió los créditos de la carrera de:
Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Dra. Leticia Rocha Zavaleta
Propietario

Propietario M. en C. Emilio Joaquín Córdova Alarcón

Propietario Biol. Alfredo Alejandro Martínez Peñaloza

Suplente M. en C. María Guadalupe Ordaz Téllez

Suplente M. en I.I.B. Benito Estrada Mena

Consejo Departamental de
Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MEXICO
CARRERA DE BIOLÓGICA

Dedicatorias

A mis padres, Lulú y Lorenzo, por apoyarme, guiarme siempre y por preocuparse porque mi educación no se olvide del ámbito social.

A mi abuelita Mere, por cuidarme durante mucho tiempo y compartir agradables momentos juntas (vale vale, la basurita en el iris, ni peper, la penicilina y el peptobismol, los "hitasos", sagrada virgen, etc...) pero sobretodo para poder formar parte de "su orgullo nacional".

A la memoria de mis abuelos Sofía, Paco y Lorenzo, ya que no tuve la oportunidad de compartir con ellos estos momentos.

A mi hermano Paco, por no perder el sentido del humor, por hacerme reír cuando más lo necesito y para que empiece a respetarme (hay niveles).

A mi familia en general, mis tíos y primos, por soportarme (bueno, casi siempre) en mis cinco minutos de histeria (¡¡¡¡¿cinco minutos?!!!!).

A mi amiga Sara, esperando que ya no me quite las becas, que sea más puntual, que me siga invitando a los partidos de los pumas y por compartir su "ardillez" conmigo desde la prepa.

Al grupo Amazónico: Edén, Rocío, Fabiola, Mónica, Erika S. y Erika A. por ser mis amigas durante toda la carrera, ojalá que esto compense todas las veces en que las sutilmente me abrí.

A mis amigos Salvatore y Fer por los bailongos tan padres que nos hemos dado, esperando que no sean los últimos. A mi amigocha Ana, por todas las actividades sociales, deportivas y recreativas que hemos hecho juntas. Gracias a los tres, por sacarme de vez en cuando del laboratorio.

A Zenón Cano, por sus múltiples consejos en lo académico y personal, cuando sea grande quiero ser como tú "manito".

Al "Inge" Josué, por demostrar ser mi amigo desde la prepa y aunque no siempre nos vemos, es grato recibir un e-mail de un amigo con los mismos ideales.

Agradecimientos

A la Dra. Leticia Rocha, por su guía constante y por haber confiado en mi para la realización de este proyecto.

A mis sinodales: Emilio, Benito, Lupita y Alfredo por su apoyo en la revisión de ésta tesis, así como por sus comentarios que han enriquecido este trabajo.

A Irmix, por su apoyo en la preparación diaria de mis instrumentos de trabajo.

Al programa PROBETEL, UNAM por su apoyo otorgado para la realización de este trabajo.

Quien no conoce nada, no ama nada. Quien no puede hacer nada, no comprende nada. Quien nada comprende, nada vale. Pero quien comprende también ama, observa, conoce... Cuanto mayor es el conocimiento inherente a una cosa, más grande es el amor o el odio... Quien cree que todas las frutas maduran al mismo tiempo que las frutillas nada sabe acerca de las uvas.

Paracelso.

LISTA DE CONTENIDO.

Abreviaturas	1
1. Resumen	2
2. Introducción	3
3. Justificación	18
4. Objetivos	19
5. Métodos	20
6. Resultados	27
7. Discusión	48
8. Conclusiones	55
9. Perspectivas	56
10. Bibliografía consultada	57
11. Apéndice	66

ABREVIATURAS.

VPH	Virus del papiloma humano
VLP	Partículas pseudovirales (del inglés: Virus Like Particles)
SeCe	Secreciones cervicales
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés: Polymerase Chain Reaction)
C/E	Pacientes con evidencia clínica de infección por VPH
S/E	Pacientes sin evidencia clínica de infección por VPH
EvGI	Pacientes con eversión glandular
VPH(+)	Pacientes positivas a la presencia de DNA de VPH
VPH(-)	Pacientes negativas a la presencia de DNA de VPH
VPH16	Pacientes positivas a la presencia de DNA de VPH tipo 16
VPH≠16	Pacientes positivas a la presencia de DNA de VPH diferente al tipo 16
Pre-LEEP	Antes de la electro-cirugía (del inglés: Loop Electrosurgical Escisión Procedure)
Post-LEEP	Después de la electro-cirugía (del inglés: Loop Electrosurgical Escisión Procedure)

1. RESUMEN.

El virus del papiloma humano (VPH) es el principal factor de riesgo para el desarrollo de cáncer cervical. La infección persistente, principalmente con VPH de alto riesgo, precede al desarrollo de lesiones intraepiteliales en el cérvix y éstas a su vez al cáncer invasor. Evidencias experimentales indican que la participación del sistema inmune es importante para el control de la infección por VPH. La mayoría de los trabajos serológicos del VPH se ha enfocado al estudio de los anticuerpos sistémicos dejando de lado a los anticuerpos locales del cérvix. Sin embargo en los últimos años se ha reconsiderado la función que pueden tener los anticuerpos locales contra la infección por VPH, ya que el sistema inmunológico de las mucosas es la primer línea de defensa contra patógenos que infectan los epitelios. En este trabajo se encontró que entre el 47-63% de las mujeres infectadas por VPH presentan anticuerpos, en secreciones cervicales, capaces de inhibir la unión de VLP's de VPH16 a heparina. Más aún, la correlación entre la presencia de anticuerpos inhibitorios (previos a una infección) y la protección contra la infección por VPH resultó ser significativa ($p=0.028$). Estas observaciones sientan el primer indicio del papel que pueden jugar los anticuerpos locales frente a la infección por VPH, las cuales servirán de base para futuros estudios.

2. INTRODUCCIÓN.

2.1 Biología molecular del virus del papiloma humano.

Los virus del papiloma humano (VPH) pertenecen a la familia *Papovaviridae* y son responsables del desarrollo de lesiones epiteliales benignas y malignas en los mamíferos. Se dividen en tipos, subtipos y variantes de acuerdo al grado de homología entre sus genomas, con base en esto se calculan alrededor de 120 tipos diferentes de virus del papiloma. Los VPH también pueden ser clasificados de acuerdo al sitio de infección en cutáneos y mucosos.

La información genética de los VPH está almacenada en una doble cadena de DNA de un tamaño aproximado de 8,000 pb. El genoma viral se encuentra organizado en ocho genes, divididos en dos regiones, una de expresión temprana (E) y otra de expresión tardía (L). Además, cuenta con una región de control de la transcripción conocida como LCR (Figura 1).

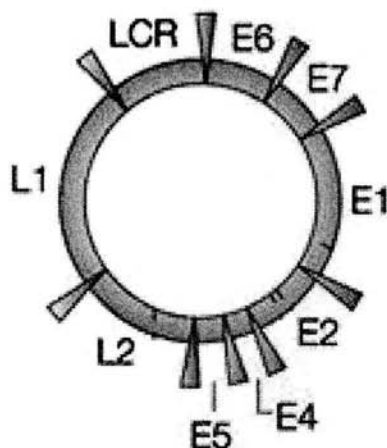


Figura 1. Organización genómica del VPH. Se encuentra dividido en tres regiones: las de expresión temprana E, las de expresión tardía L, y la región de control LCR no codificante. Imagen modificada de Tindle, 2002.

La región larga de control o LCR (por sus siglas en inglés, Long Control Region) es una secuencia no codificante que regula la transcripción a través de la interacción de proteínas virales y del hospedero.

Los genes de la región E codifican para proteínas relacionadas con el proceso de replicación viral. Las proteínas E1 y E7 llevan a cabo funciones de replicación del DNA viral, E1 funciona como helicasa dependiente de ATP y E7 induce la síntesis del DNA. Por otro lado, la proteína E2 es un factor activador de la transcripción que regula la expresión de las proteínas E6 (la cual también funciona como transactivador) y E7. La proteína E4 por su parte rompe citoqueratinas de las células infectadas y la proteína E5 llega a interactuar con receptores de membrana como el receptor derivado de plaquetas (PDGF por sus siglas en inglés, Platelet Derived Growth Factor). Las regiones L codifican para las proteínas L1 y L2 que se autoensamblan para formar la cápside del virus.

2.2 Interacción virus-hospedero.

Los VPH se replican específicamente en el núcleo de células epiteliales escamosas basales. La replicación de los VPH está íntimamente relacionada con la diferenciación de las células del epitelio (Figura 2). El epitelio escamoso está compuesto de 20 a 30 capas celulares, de las cuales solo la capa basal más interna está en división activa. Por lo anterior, el virus infecta las capas basales del epitelio escamoso a través de micro-heridas en el tejido que exponen a dichas capas. Posteriormente, el virus se establece en el núcleo de las células basales donde permanece en estado episomal, es decir sin integrarse al genoma celular, replicándose a tasas muy bajas, alrededor de 20 a 100 copias por célula, en sincronía con la división celular. Conforme las células epiteliales se van diferenciando y migrando, la replicación celular cesa y la replicación viral se estimula acumulándose hasta miles de viriones dentro del núcleo y comienza la expresión de los genes tardíos. Los VPH no presentan una fase lítica por lo que su propagación se da hasta que la célula epitelial se descama (Laimins, 1993; Einstein et. al., 2002; Sanclemente et. al., 2002).

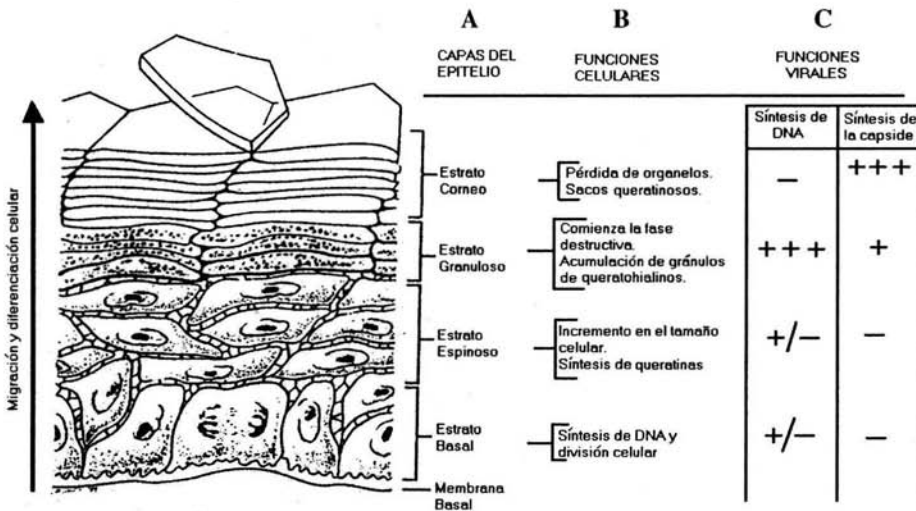


Figura 2. Representación de la diferenciación del epitelio y su relación con la infección por VPH. A) Estratos del epitelio, B) Funciones normales del epitelio durante su diferenciación, C) Funciones virales durante la infección del epitelio. Imagen modificada de Laimins, 1993.

En una infección viral normal el genoma del virus permanece en estado episomal; sin embargo en las lesiones malignas el genoma viral es integrado al genoma celular (Figura 3). El proceso por el cual se da la integración viral es aún desconocido, sin embargo se sabe que al integrarse el genoma viral se pierden comúnmente la región LCR o las funciones de E1 y E2. Esto permite una sobre expresión de las oncoproteínas virales que a su vez pueden interactuar con proteínas celulares supresoras de tumores, involucradas en el control del ciclo celular.

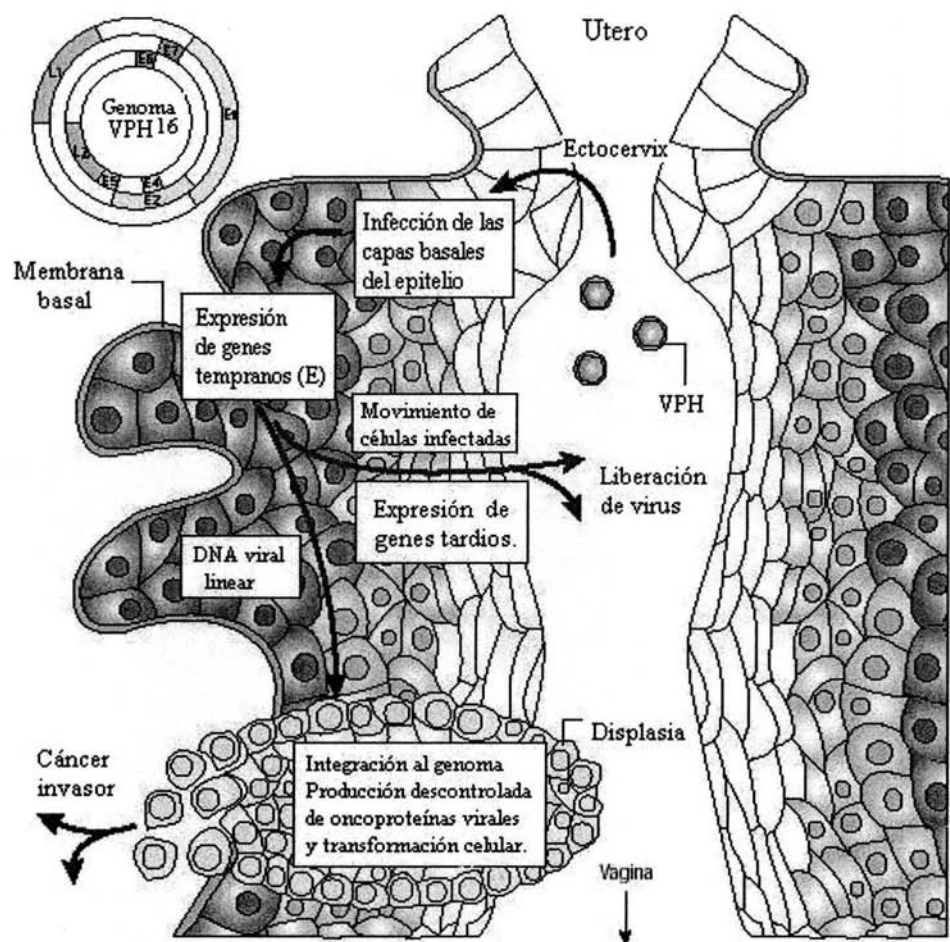


Figura 3. Representación de la infección típica por VPH y su relación con la transformación celular. Imagen modificada de Tindle, 2002.

La sobre-expresión de los productos de los genes E6 y E7 tienen “propiedades oncogénicas” pues participan en la inducción y en el mantenimiento del estado inmortalizado de células que contienen secuencias de VPH integrado, es decir, están involucrados en la transformación celular. (Werness et. al., 1990; Munger, 1993).

Por un lado E6 interacciona con la proteína anti-oncogénica p53 y promueve su degradación a través de una proteólisis dependiente de ubiquitina (Scheffner et. al., 1990). Esta situación impide que p53 lleve a cabo la transcripción específica de genes celulares como p21 y Bax que permiten llevar a la célula a un arresto celular o bien a apoptosis en caso de daño al DNA celular (Figura 4).

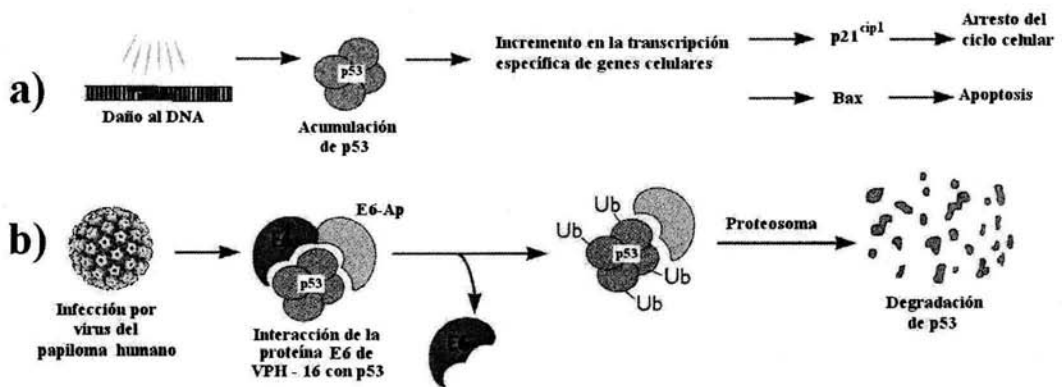


Figura 4. Interacción de E6 con p53. a) En ausencia de E6, p53 aumenta la transcripción específica de genes en respuesta al daño en el DNA. b) En presencia de E6, p53 es ubiquitinado para ser degradado por el proteosoma. Imagen basada en Flint et. al., 2000.

Por otro lado E7 interacciona con el producto del gen del retinoblastoma [Rb] (Dyson et. al., 1989), liberando al factor de transcripción E2F del complejo Rb-E2F induciendo la transcripción de genes involucrados en la progresión del ciclo celular. En ausencia de E7, Rb inhibe a E2F manteniendo a las células en estado quiescente (Figura 5).

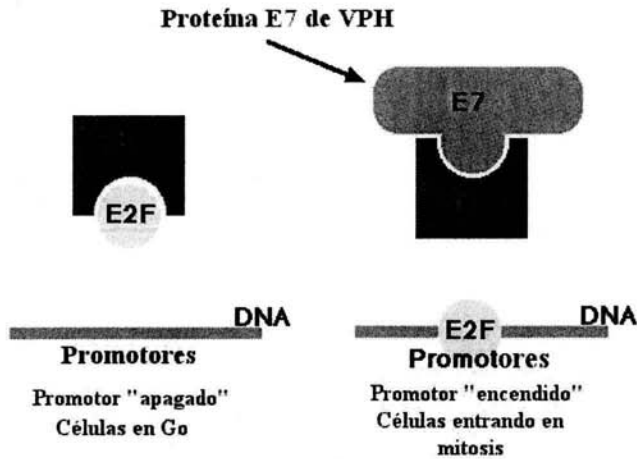


Figura 5. Acción de E7. Cuando Rb inhibe a E2F se mantiene a las células en estado quiescente, pero cuando E7 interactúa con Rb el factor E2F se libera y puede unirse a su secuencia blanco para iniciar la transcripción de genes involucrados en la progresión del ciclo celular. Imagen modificada de <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/T/TumorSuppressorGenes.html>

Estas dos oncoproteínas virales facilitan que una célula normal sufra la transformación hacia una célula neoplásica; sin embargo no todos los VPH generan lesiones premalignas. Los VPH que producen lesiones benignas se denominan de “bajo riesgo”, mientras que aquellos que producen lesiones malignas se denominan de “alto riesgo”. Dentro de estos últimos encontramos los VPH de los tipos 16, 18, 30, 31, 33, 35, 45, 51 y 52, asociados a cáncer cervical, siendo los tipos 16 y 18 los más frecuentes en la población que desarrolla cáncer cervical.

2.3 Unión del VPH a su célula blanco.

El primer paso en una infección viral es la unión del virus a un receptor específico en la superficie celular. Dado que el VPH no puede ser propagado *in vitro*, se han desarrollado partículas pseudovirales, VLP's por sus siglas en inglés (virus like particle), que mimetizan la estructura tridimensional de la cápside viral para ser utilizadas en ensayos inmunológicos. Se ha demostrado que VLP's de L1 de VPH son capaces de unirse a una variedad de diferentes tipos

celulares, en los que destacan HeLa, Caski y C33 por ser líneas celulares derivadas de cáncer cervical (Müller et. al., 1995; Yoon et. al., 2001). Los primeros estudios mostraron que al tratar las células con tripsina se reducía la unión de VLP's a las superficies celulares sugiriendo que el receptor a VPH era de naturaleza proteica (Müller et. al., 1995).

Se han propuesto dos candidatos a receptores del VPH, la α_6 integrina (Evander et. al., 1997; Yoon et. al., 2001) y el heparán sulfato (Joyce et. al., 1999; Giroglou et. al., 2001; Combita et. al., 2001). Ambos receptores se encuentran distribuidos en células epiteliales y endoteliales (Evander et. al., 1997). La α_6 integrina tiene como ligando natural a la laminina y el heparán sulfato a la colágena IV, por lo que se encuentran involucrados en las interacciones célula-matriz extracelular (Alberts et. al., 2000; Cooper, 2000). Sin embargo existe aún controversia sobre cual de estos receptores es determinante en la infección por VPH.

Respecto a la α_6 integrina, las evidencias experimentales muestran que anticuerpos dirigidos contra α_6 integrina son capaces de reducir (pero no de inhibir por completo) la unión de VLP's de L1 de VPH6 a células epiteliales (Evander et. al., 1997; Yoon et. al., 2001). Yoon et. al. (2001) mostraron que la cantidad de VLP's de L1 de VPH16 que se unen a diferentes líneas celulares depende del nivel de expresión de α_6 integrina en dichas células.

En cuanto al heparán sulfato experimentos ha demostrado que cuando las células son pretratadas con heparinasas (tipos I, II y III) se inhibe la unión de VLP's de L1 de VPH11 a queratinocitos (Joyce et. al., 1999), así como la transferencia de genes al interior de la célula por pseudoviriones de VPH de los tipos 11, 16, 18, 31, 33, 45, 58, 59 y 68 aún en presencia de α_6 integrina (Giroglou et. al., 2001; Combita et. al., 2001). Además, las células DG75 que no expresan α_6 integrina, pero si heparán sulfato son susceptibles a ser infectadas por VPH-33 (Giroglou et. al., 2001).

El heparán sulfato (HS) ha sido propuesto como un receptor por excelencia de organismos patógenos debido a que permanece expuesto en la superficie de las células y por la fácil interacción entre las proteínas y los grupos sulfato de las cadenas glicosiladas. La primera observación sobre la función del heparán sulfato como receptor viral se dio con los serotipos 1 y 2 del virus del herpes (Spear, 1993; Secchiero et. al., 1997). Más tarde se mostró que el virus de la varicela (Zhu et. al., 1995), el citomegalovirus (Compton et. al., 1993), el virus del dengue (Chen et. al., 1997; Germi et. al., 2002), el Virus de Inmunodeficiencia Humana (Ugolini et. al., 1999), adenovirus (2 y 5) (Dechecchi et. al., 2000), VPH tipos 11, 16 y 36 (Joyce et. al., 1999; Giroglou et. al., 2001; Combita et. al., 2001; Selinka et. al., 2002) e inclusive patógenos como la bacteria *Chlamydia* (Taraktchoglou et. al., 2001) y parásitos como el *Plasmodium falciparum* (Barragán et. al., 1999) utilizan al HS como receptor o al menos como un primer ligando entre las células y el patógeno.

En el caso específico de los virus el heparán sulfato es el primer paso en el proceso de infección, seguido de la interacción de las proteínas virales con otras proteínas celulares (generalmente relacionadas a la adhesión celular) que funcionan como receptores específicos para la internalización del virus (Spillmann, 2001). El virus del herpes tipo 1 interactúa con el HS para después interactuar con 1α -nectina y 1β -nectina y facilitar su entrada a la célula. El adenovirus tipo 2 utiliza HS como primer ligando y dos correceptores: la $\alpha_5\beta_5$ integrina y al receptor de factores de crecimiento de fibroblastos. Al respecto se ha propuesto que la interacción de HS y $\alpha_5\beta_5$ integrina es necesaria para la infección por adenovirus. Con base en las evidencias experimentales, se sugiere que el VPH podría estar utilizando una estrategia similar en la infección de las células epiteliales, proponiendo al heparán sulfato como la primer molécula de unión a la superficie celular, pero no la única ya que otras moléculas de superficie (incluida la α_6 integrina) podrían estar involucradas en la unión específica de un tipo de VPH en particular, así como en su internalización. Esta segunda interacción podría estar mediada por L2 pues cuando se utilizan VLP's que poseen L1 y L2 se incrementa la capacidad de pseudoviriones de transferir genes (Kawana et. al., 1998).

2.4 El heparán sulfato.

El HS es un proteoglicano que pertenece a la familia de los glicosaminoglicanos, está constituido por una secuencia de 20 a 100 unidades sucesivas de N- acetil-glucosamina (la cual se modifica por la adición de grupos sulfato) y ácido idurónico (Figura 6). Los azúcares se unen a una proteína núcleo a través de residuos de serina. El HS se puede encontrar como molécula de superficie celular (conocida como glipicano) o como molécula transmembranal (conocida como sindecano).

Los glipicanos comprenden 6 diferentes proteínas que en su extremo carboxilo terminal poseen un sitio de unión a glicosil fosfatidil inositol (GPI por sus siglas en inglés: glycosyl phosphatidyl inositol) a través del cual se une a la superficie celular (Figura 6). Las cadenas de HS se unen próximas al extremo carboxilo terminal, por lo que estas cadenas se encuentran muy cerca de la superficie celular. Los glipicanos poseen un dominio globular cercano al extremo amino terminal rico en cisteína (Belting, 2003).

Los sindecanos comprenden una familia de 4 genes que codifican para proteínas transmembranales en donde el largo dominio extracelular lleva unidas las cadenas de HS (Figura 6) y se encarga de las interacciones célula-célula, célula-matriz extracelular así como de la unión a diferentes factores de crecimiento (Rapraeger, 1995; Zimmermann et. al., 1999; Rapraeger, 2000; Belting, 2003). El pequeño dominio citoplasmático de los sindecanos posee dos regiones conservadas (conocidas como C1 y C2) separadas por una región variable (V) única para cada tipo de sindecano. A través de este dominio citoplasmático son capaces de interactuar con proteínas del citoesqueleto y transducir cascadas de señalización (Horowitz et. al., 1998; Zimmermann et. al., 1999; Simons et. al., 2001; Belting, 2003; Schulz et. al., 2003).

El patrón de expresión de los sindecanos está finamente regulado en los diferentes tipos celulares, tejidos y estados de desarrollo. En las células epiteliales el sindecano principal es el tipo 1, mientras que el tipo 2 y el tipo 3 son más comunes en fibroblastos y células neuronales respectivamente. Finalmente el tipo 4 se expresa ampliamente en diferentes tipos celulares.

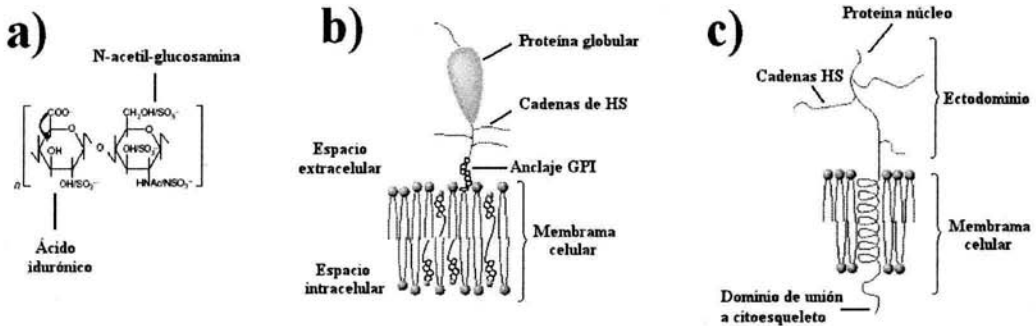


Figura 6. Organización de las cadenas de HS en moléculas de superficie celular. a) Estructura de las cadenas de HS b) Estructura de los glicoproteínas c) Estructura de los sindecanos. Imagen modificada de Belting, 2003.

Estudios recientes han mostrado que células pretratadas con heparinasa I presentan una mayor resistencia a la infección viral por VPH. Sin embargo, cuando las células son tratadas con fosfolipasa C no se observa efecto alguno (Selinka et. al., 2002; Shafti-Keramat et. al., 2003). La heparinasa corta las cadenas de HS en las regiones GlcNSO₃₋₁₋ del ácido idurónico, mientras que la fosfolipasa C hidroliza el GPI que une a los glicoproteínas a la superficie celular; esto sugiere que son los sindecanos (en particular el sindecano-1) los encargados del proceso de unión e infección por VPH.

La heparina es un análogo del heparán sulfato ya que poseen una estructura muy similar, excepto que la heparina contiene pocos grupos sulfato (Cooper, 2000). La mayoría de las proteínas de unión a heparina muestran una secuencia consenso de aminoácidos básicos cargados positivamente los cuales proveen de un sitio de interacción con los polisacáridos cargados negativamente. Joyce et. al., (1999) mostró que el extremo carboxilo terminal de L1 de VPH11

interactuaba con el heparán sulfato gracias a una región conservada de 15 residuos de aminoácidos de la forma XBBBBXB (donde X es cualquier aminoácido y B es lisina o arginina). Este patrón es similar al de las secuencias consenso identificadas en las proteínas de unión a heparina (XBBXBX y XBBBXXBX). Otros estudios proponen también al extremo carboxilo terminal de L1 como el encargado de la unión al receptor de heparán sulfato para los VPH tipos 11, 16 y 31 (Bousarghin et. al., 2003). Esto ha permitido la utilización de la heparina en ensayos de inhibición de la unión virus-receptor, pues cuando las VLP's son pretratadas con heparina se bloquea la unión de estas a las células.

2.5 La proteína L1.

Como ya se mencionó la cápside viral está compuesta por dos proteínas, L1 y L2; cabe resaltar que el 95% de las proteínas de la cápside corresponden a la proteína L1, el 5% restante corresponde a la proteína L2. La proteína L1 tiene un peso aproximado de 50-60 KD, se encuentra débilmente fosforilada y no se une al DNA; además puede interactuar consigo misma a través de puentes disulfuro. Los monómeros de la proteína L1 forman pentámeros, la cápside viral esta formada por aproximadamente 72 pentámeros.

La proteína L1 permanece en la superficie de la cápside, mientras que la proteína L2 se incorpora dentro del capsómero heicosáedrico del virus dejando la mayor parte de la proteína internalizada; sin embargo una pequeña porción de L2 es expuesta en la superficie de la cápside y es accesible a anticuerpos (Roden et. al., 2000). No obstante L1 es la proteína más antigénica de la cápside ya que presenta epítopes inmunodominantes y neutralizantes (Roden et. al., 2000). Esto es relevante dado que la infección viral se da a través de la interacción de la cápside con la superficie celular epitelial.

La proteína L1 puede autoensamblarse en presencia o ausencia de L2 para formar VLP's, varios sistemas de expresión han sido utilizados para dicho fin como células de insecto (Kirnbauer, 1992; Rose et. al., 1993), levaduras (Hofmann et. al., 1995; Sasagawa et. al., 1995) y bacterias (Li et. al., 1997; Xiaojiang et. al., 2001). Se ha determinado que el aminoácido del residuo 202 de L1 del VPH16 es determinante en el ensamble de las VLP's. La capacidad de las VLP's de mimetizar la estructura tridimensional de los viriones nativos han permitido utilizarlas como antígeno blanco en estudios inmunológicos (Figura 7).

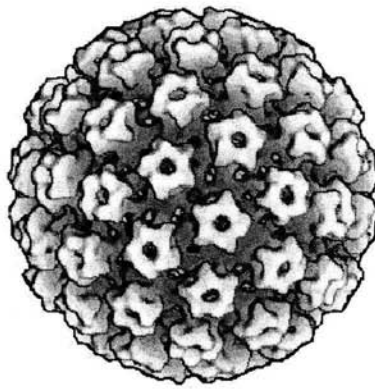


Figura 7. Estructura de la cápside del VPH. Imagen tomada de <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/T/TumorSuppressorGenes.html>

Xiaojiang et. al., (2000) han aportado valiosos datos sobre la estructura tridimensional de L1, encontrando que los loops de esta proteína poseen las variaciones de secuencia entre los diferentes tipos de VPH e incluso epítipes neutralizantes dominantes. Estos datos han permitido un mejor entendimiento de las regiones que se han propuesto como blancos potenciales de anticuerpos generados por infección de VPH o vacunación con VLP's.

La proteína L1 posee epítipes inmunodominantes que pueden ser lineales y/o conformacionales. Combata et. al., (2002) reportaron la existencia de un epítipe lineal que genera anticuerpos neutralizantes. Cuando la leucina 152 de L1 es reemplazada por fenilalanina los anticuerpos neutralizantes contra L1 pierden la capacidad de neutralizar VLP's de VPH16;

sugiriendo que mutaciones puntuales pueden hacer la diferencia entre la neutralización o la infectividad. Otro epítope importante ha sido encontrado en la región V5 de L1 de VPH16, la cual es reconocida por anticuerpos monoclonales capaces de neutralizar VLP's cuando se conserva la integridad de éstas (White et. al., 1999). Algunos epítopes pueden inducir reacción cruzada entre diferentes tipos de VPH, principalmente se han reportado entre los tipos 6, 11, 16, 31, 33, 45 y 58 (Christensen et. al., 1994; Christensen et. al., 2001; Combata et. al., 2002)

2.6 Respuesta inmunológica al VPH.

Frente a las infecciones el sistema inmunitario puede ejercer respuestas inmunes inespecíficas (inmunidad innata) y específicas contra el antígeno (inmunidad adaptativa). Dentro de las respuestas inespecíficas se encuentran las barreras físicas como el moco que impide la entrada del agente infeccioso o la producción de enzimas que alteran la naturaleza del antígeno. Las respuestas específicas se dividen en respuesta humoral y celular. La respuesta celular consiste en la activación de linfocitos T por el antígeno, capaces de destruir las células infectadas. Por otro lado, la respuesta humoral consiste en la generación de anticuerpos específicos contra el antígeno a través de la activación de los linfocitos B.

Los anticuerpos, son inmunoglobulinas que participan en la neutralización del agente infeccioso, la opsonización para la fagocitosis y la activación del complemento. Existen varios isotipos de anticuerpos y todos ellos son capaces de interactuar con el antígeno.

La inmunoglobulina más común en el suero es el isotipo IgG que presenta una estructura monomérica. Estos anticuerpos son principalmente sistémicos, es decir, son secretados en gran cantidad por tejidos linfoides periféricos (médula ósea, vaso y ganglios linfáticos) para salir a la circulación; pero también pueden encontrarse en una reducida proporción en las secreciones mucosas (Abbas et. al., 2000).

Los anticuerpos IgA pueden encontrarse en el suero como monómeros, pero son más abundantes en las secreciones mucosas donde presentan una estructura dimérica unida a través de la cadena J. Los anticuerpos IgA presentes en las secreciones mucosas reciben el nombre de sIgA (secretory IgA) ya que la inmunoglobulina es producida localmente por células plasmáticas de las mucosas y son transportadas desde el epitelio mucoso hasta la luz de los órganos por un componente secretor (Figura 8). Este componente secretor forma parte de un receptor que se expresa en las superficies laterales y basales de las células epiteliales mucosas llamado poli-Ig. Al ser secretada a la lamina propia, la IgA se une al receptor poli-Ig; el complejo IgA-poli-Ig es endocitado por la célula epitelial para liberar la IgA a la luz de los órganos por escisión proteolítica del componente secretor del resto del receptor poli-Ig (Abbas et. al., 2000).

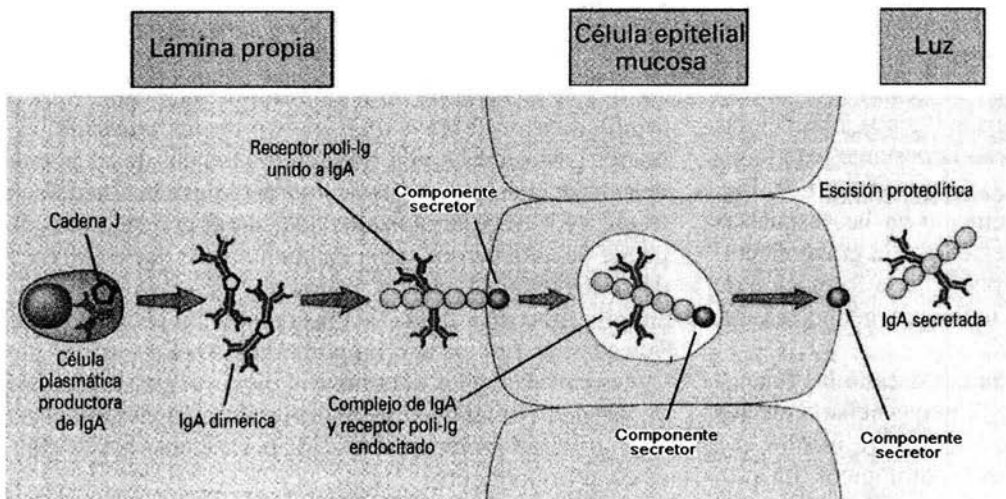


Figura 8. Transporte de IgA a través de las células epiteliales. Imagen modificada de Abbas, 2000.

La generación de anticuerpos dirigidos contra VPH solo se da después del contacto con el virus (Kjaer et. al., 2001) y su producción es tipo específica en relación con la presencia de DNA viral (Wang et. al., 1996; Sasagawa et. al., 1998; Bontkens et. al., 1999; Hagensee et. al., 2000; Wang, 2000). Mediante ensayo de ELISA se ha demostrado que las infecciones por VPH generan anticuerpos de los isotipos IgG e IgA tanto sistémicos como locales; ya que anticuerpos presentes en suero y secreciones cervicales reaccionan con VLP's intactas de diferentes tipos de VPH

(LeCann et. al., 1995; Wang et. al., 1996; Cubie et. al., 1998; Sasagawa et. al., 1998; Bontkes et. al., 1999; Wang et. al., 2000; Sasagawa et. al., 2003). Los estudios serológicos han demostrado que la presencia de anticuerpos IgA es considerada como un marcador de infecciones recurrentes (Bontkens et. al., 1999; Hagensee et. al., 2000; Wang, 2000).

Varios trabajos han demostrado que animales y mujeres inmunizadas con VLP's han sido capaces de generar anticuerpos neutralizantes en suero; ya que cuando las VLP's son pretratadas con dichos anticuerpos se inhibe la infección de células epiteliales, así como la transferencia de genes (Christensen et. al., 1994; Breitburd et. al., 1995; Rose et. al., 1998; Brown et. al., 2001; Christensen et. al., 2001; Combata et. al., 2002). A pesar de que la generación de anticuerpos neutralizantes es tipo específica, varios estudios han sugerido que los anticuerpos generados para un determinado VPH puede conferir protección frente a infecciones con nuevos tipos de VPH (Christensen et. al., 1994; LeCann et. al., 1995; Combata et. al., 2002).

La mayoría de los trabajos se han enfocado al estudio inmunológico de los anticuerpos presentes en suero dejando de lado a los anticuerpos de las secreciones cervicales, los cuales podrían estar funcionando como una primer línea de defensa frente a la infección por VPH, ya que se encuentran distribuidos justo en la zona de infección. Si los anticuerpos presentes en las secreciones cervicales son capaces de inhibir la unión del VPH a las células epiteliales entonces estarían jugando un papel muy importante en la regulación de la infección, y quizá en la defensa contra futuras infecciones o reinfecciones.

En este contexto, el presente trabajo se enfocó en el empleo de un sistema *in vitro* para determinar la capacidad de anticuerpos presentes en secreciones cervicales de inhibir la unión de VLP's de VPH16 a heparina, el cual es un análogo del receptor celular heparán sulfato.

3. JUSTIFICACIÓN.

En México, el cáncer ocupa la segunda causa de mortalidad general y el cáncer cervicouterino es la principal causa de muerte por neoplasias entre las mujeres mayores de 25 años. El principal factor de predisposición para el cáncer cervical es la infección por VPH16 (independientemente de otros factores de riesgo), el cual se ha detectado en el 99.7% de los tumores cervicales (SSA, 2002).

El VPH es uno de los virus más frecuentemente transmitidos por contacto sexual, se estima que el 75% de la población sexualmente activa se encuentra infectada con algún tipo de VPH (SSA, 2002). El VPH se mantiene asintomático por largos periodos de tiempo, por ello la mayoría de las personas desconoce que lo porta y su contagio se incrementa día con día.

La capacidad del individuo de levantar una respuesta inmunológica efectiva frente a la infección es crucial, ya que una infección persistente por VPH (especialmente por VPH de alto riesgo como los tipos 16 y 18) es un importante factor de riesgo para desarrollar lesiones epiteliales premalignas que más tarde puedan derivar en un cáncer invasor.

Dado que el virus del papiloma humano no es un virus sistémico, el estudio de la respuesta inmunológica local tanto celular como humoral frente a la infección se vuelve indispensable para comprender los procesos involucrados en la respuesta fisiológica frente a la infección, así como para el desarrollo de nuevas estrategias en su diagnóstico, tratamiento y prevención

4. OBJETIVOS.

Objetivo General

- ☞ Evaluar la capacidad de anticuerpos presentes en secreciones cervicales de inhibir la unión de VLP's de VPH16 a heparina.

Objetivos Particulares

- ☞ Emplear un sistema *in vitro* para evaluar la inhibición de la unión de VLP's a heparina.
- ☞ Estudiar la capacidad de anticuerpos presentes en secreciones cervicales de mujeres infectadas y no infectadas por VPH de inhibir la unión de VLP's a heparina.
- ☞ Evaluar la relación entre la presencia de anticuerpos inhibitorios y la ausencia de infección.

5. MÉTODOS.

5.1 Población de estudio.

Los grupos de estudio fueron seleccionados de una población de pacientes atendidas en el Centro Nacional de Clínicas de Displasias (CENACLID) del Hospital General de México. Todas las pacientes fueron sometidas a un estudio de colposcopia para determinar la presencia de infecciones por VPH. El análisis colposcópico fue realizado por un especialista, quien visualizó el cérvix con un colposcopio Zeiss OPMI-1 (Carls Zeiss Inc.) tras la aplicación de una solución de ácido acético al 15%. La presencia de una mancha blanca, conocida como lesión acetoblanca, debido a la reacción del epitelio con el ácido acético fue considerada como la evidencia clínica de la presencia de una infección por VPH. Por otro lado, la presencia de tejido glandular evertido en la zona de transformación, en ausencia de una lesión acetoblanca fue diagnosticado como una eversión glandular. Finalmente, la ausencia de ambas imágenes colposcópicas fue indicativo de un tejido cervical normal. Después de realizado el diagnóstico colposcópico se formaron tres grupos de estudio: mujeres sin evidencia colposcópica de infección por VPH (S/E, n=113), pacientes con evidencia colposcópica de infección por VPH (C/E, n=93) y pacientes con eversión glandular (EvGI, n=130).

Todas las mujeres dieron su consentimiento para participar en el presente estudio y contestaron un cuestionario acerca de factores de riesgo para el desarrollo de cáncer cervical. De cada una de las mujeres participantes se obtuvo una biopsia de tejido cervical y una muestra de secreciones cervicales (SeCe). Para el caso de las mujeres sanas las biopsias fueron tomadas de dos cuadrantes opuestos de la zona de transformación. En el caso de las pacientes con infección por VPH, la biopsia fue tomada del tejido acetoblanco, mientras que en las pacientes con eversión glandular se tomó la muestra del tejido glandular evertido. Las muestras de tejido se colocaron para su transportación en tubos estériles conteniendo 500µl de PBS estéril (Apéndice A.1) y fueron procesadas el mismo día. Por otro lado, las secreciones cervicales fueron obtenidas

mediante el lavado del cérvix con 1ml de PBS estéril previo a la colocación del ácido acético. Los lavados cervicales fueron centrifugados a 13,000 rpm por 5min para retirar los restos celulares, y fueron almacenados a -20°C hasta su utilización.

5.2 Determinación de la presencia de VPH por PCR.

Todos los reactivos utilizados en el aislamiento y amplificación del DNA fueron proporcionados por Gibco BRL. Las muestras de tejido cervical fueron tratadas con proteinasa K como se reportó previamente (Kaye et. al., 1994). El DNA fue extraído con fenol-cloroformo y precipitado con etanol. El DNA del VPH fue amplificado usando los primers generales MY09 (5' CGT CCM ARR GCA WAC TGA TC 3') y MY11 (5' GCM CAG GGW CAT AAY ATT GC 3') que amplifican un fragmento de 450 pb del gen L1 de los VPH's tipos 6,11,16,18 y 33 (Manos et. al., 1989). 100 ng de DNA genómico fueron desnaturalizados por calor a 95°C por 30 seg. La alineación de los primers se llevó a cabo a 45°C durante 30 seg y la extensión a 72°C por 60 seg. El ciclo se repitió 30 veces. Los productos del PCR se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 2%, el cual fue teñido con bromuro de etidio y se visualizó en un transiluminador de luz UV.

Para determinar la presencia de VPH16 se amplificó la región larga de control utilizando los primers LCR-f (5' GGG GTA CCT CGG TTG CAT GCT TTT TGG C 3') y LCR-r (5' GGT CTA GAC GGT TTG CAC ACA CCC ATG T 3') (Karlsen et. al., 1996), siguiendo el protocolo antes descrito, a excepción de que la temperatura de alineamiento de los primers que en este caso fue de 54°C.

5.3 Cultivo celular.

La línea celular derivada de tejido ovárico de la pupa de *Spodoptera frugiperda* (Sf9) fue cultivada a 27°C en medio GRACE'S (Gibco) complementado con suero fetal de bovino (Gibco) al 10% y 50 µg/ml de gentamicina (Genkova) en cajas de Petri para cultivo de tejidos de 50 cm² (Nun Brand Products). Las cajas fueron selladas con parafilm para evitar el intercambio de gases que modifican el pH del medio. Las células fueron resemebradas cuando alcanzaron el 80% de confluencia.

Para su preservación por congelación, las células fueron cultivadas hasta alcanzar un 90% de confluencia. Dado de que las células Sf9 crecen en monocapa, éstas fueron despegadas con un gendarme y centrifugadas a 2500 rpm por 4min. El botón celular fue resuspendido en 1ml de medio de congelación (Apéndice A.2) y fue transferido a un criovial estéril (Costar Corporation) colocado previamente a 4°C. Las células se incubaron a -20°C por 1hr y posteriormente a -80°C por 24hrs. Finalmente las células fueron almacenadas en nitrógeno líquido.

Para su descongelación, los crioviales con células Sf9 fueron retirados del nitrógeno líquido con pinzas y se colocaron en un baño de agua a 37°C con agitación constante hasta que se descongelaron. Inmediatamente después las células fueron transferidas a un tubo eppendorf estéril conteniendo 1ml de medio GRACE'S complementado con suero fetal de bovino. Las células fueron centrifugadas a 2500 rpm por 4min con el fin de eliminar el dimetil sulfoxido (DMSO) contenido en el medio de congelación. El botón celular fue resuspendido en 1ml de medio y sembrado en cajas Petri para cultivo de tejidos estériles.

5.4 Producción de VLP's.

Las VLP's fueron obtenidas mediante el sistema de expresión de baculovirus recombinante. El baculovirus recombinante usado para la expresión de las VLP's del VPH16 fue donado por el Dr. John Schiller (National Institute of Health, Bethesda, MA, USA) y fue usado para infectar células Sf9. Se sembraron 1×10^6 células Sf9 en cajas Petri para cultivo de tejidos estériles y se incubaron por 2 hrs para permitir su adhesión a la superficie plástica. Antes de la infección las células se revisaron al microscopio para confirmar la adhesión celular en monocapa. El medio fue retirado y se adicionaron 900 μ l de medio GRACE'S complementado con suero fetal de bovino, posteriormente las células fueron infectadas con baculovirus recombinante a una multiplicidad de infección (MOI) de 10. La células se incubaron por 1hr a 27°C con una ligera agitación cada 15min para asegurar que el virus cubriera a todas las células. Transcurrido el tiempo, se completó con medio GRACE'S complementado con suero fetal de bovino a un volumen final de 7ml.

Para la obtención de VLP's las células fueron incubadas por 72hrs y se continuó con el proceso descrito en la sección 5.5. Para la obtención de baculovirus, las células infectadas se incubaron por 4 días a 27°C. El medio fue retirado y centrifugado a 2500 rpm por 5min. El sobrenadante, que contenía el baculovirus, se guardó en tubos eppendorf estériles en alícuotas de 1ml para ser almacenados a -80°C.

5.5 Extracción y purificación de VLP's.

Para la extracción y purificación de VLP's se siguió el protocolo reportado por Cubie, et. al., (1998). Células Sf9 fueron cultivadas hasta alcanzar un 80% de confluencia a 27°C y fueron infectadas con baculovirus por el método antes descrito y se comprobó la expresión de L1 por inmunohistoquímica (Sección 5.7). Tras 72hrs de infección las células fueron colectadas por raspado de la superficie en crecimiento y fueron centrifugadas 4min a 2,500 rpm. El botón celular fue resuspendido en 15ml de PBS. Los núcleos fueron separados por centrifugación a 5,000 rpm durante 10min y el botón celular fue resuspendido en 4ml de PBS, posteriormente se sonicó en

hielo por 30seg. El lisado resultante se colocó en una solución de sacarosa al 40% (w/v) en PBS y se centrifugó a 34,000 rpm por 2hrs en un rotor Beckman SW 55 Ti. La pastilla fue resuspendida en 2ml de PBS y se sonicó por 10seg en hielo. Se agregó cloruro de cesio (CsCl) a una densidad de 1.33g/ml en PBS, la mezcla CsCl-lisado fue centrifugada durante 16hrs a 45,000 rpm. Después de la centrifugación, 2 fases fueron observadas en el tubo y se colectaron por separado. La densidad de las fracciones colectadas fueron determinadas con un refractómetro, se colectó la fracción con densidad de 1.30g/ml la cual contenía las VLP's. La fracción fue diluida con PBS y el CsCl fue retirado por centrifugación. La pastilla fue resuspendida en PBS y guardado en alícuotas en una concentración de 1mg/μl a 4°C.

5.6 Inmunohistoquímica.

Para determinar la expresión de la proteína L1 en la línea celular Sf9 infectada por baculovirus se realizó una inmunohistoquímica utilizando el kit para tinción de tejidos Zymed. En cajas para cultivo de tejido estériles se introdujeron portaobjetos estériles y se sembraron 1×10^6 células Sf9 y se incubaron por 2hrs a 27°C. Posteriormente se llevó a cabo el método de infección antes descrito. Transcurridas 72hrs, las células Sf9 fueron fijadas con 1ml de acetona al 100% a 4°C por 10min. Los portaobjetos fueron transferidos a una cámara húmeda. Se adicionaron 100μl de peróxido de hidrógeno al 30% en metanol absoluto y se incubaron 10min a temperatura ambiente. Se lavaron dos veces con PBS por 2min. Se adicionaron 100μl de la solución bloqueadora y se incubó a temperatura ambiente por 10min. Se realizaron dos lavados con PBS por 2min y posteriormente se adicionaron 100μl del anticuerpo policlonal de conejo anti-L1 (Zymed) en una dilución 1:100 en PBS+BSA al 2% (Apéndice A.3) y se incubó por 1hr. Después de dos lavados de 2min con PBS, se adicionaron 100μl del anticuerpo secundario biotinilado y se incubó por 30min. Después de 3 lavados con 1ml de PBS conteniendo Tween 20 al 0.05% por 2min, se adicionó la solución que contenía estreptavidina acoplada a fosfatasa alcalina y se incubaron 15min a temperatura ambiente. Se realizaron dos lavados más con 1ml de PBS por 2min y se cubrieron las células con la solución que contiene el cromógeno para incubarse por 10min. Finalmente se lavó con 1ml de agua+Tween 20 al 0.05% (Apéndice A.4) y se contratiñó con azul de metileno por 10min a temperatura ambiente.

5.7 Caracterización de VLP's.

Con la finalidad de determinar la integridad estructural de las VLP's obtenidas, se realizó un ensayo de ELISA utilizando tres anticuerpos específicos que reconocen diferentes epítopes de la cápside viral. Los anticuerpos primarios anti-L1 utilizados fueron el anticuerpo policlonal de conejo anti-L1 (Zymed), que reconoce un epítipo lineal de L1 altamente conservado en los diferentes tipos de virus de papiloma, el anticuerpo monoclonal de ratón 33L1-7 que reconoce un epítipo lineal de L1 del VPH16 y el anticuerpo monoclonal de ratón 16L1-56E que reconoce un epítipo conformacional de la cápside del VPH16 y además es un anticuerpo neutralizante. Los anticuerpos 33L1-7 y 16L1-56E, fueron donados por el Dr. Martin Sapp (Institute for Medical Microbiology and Higiene, University of Mainz, Germany). Como anticuerpos secundarios se utilizaron los anticuerpos acoplados a fosfatasa alcalina: anti-ratón IgG+A+M (H+L) (Zymed) que reconoce inmunoglobulinas de ratón y el anticuerpo anti-conejo IgG (H+L) (Zymed) que reconoce inmunoglobulinas de conejo.

En una placa de 96 pozos de fondo plano (Maxisorp, Brand Products) se adicionaron 100ng/pozo de VLP y se incubó a 4°C durante toda la noche. Se realizaron 4 lavados con TBS-Tween 20 al 0.1% (TBS-T, Apéndice A.5). La placa se bloqueó con solución TBS-Tween 20 al 0.1% + 2% BSA (TBS-T-BSA, Apéndice A.6) a 37°C por 2hrs y posteriormente se realizaron 4 lavados con TBS-T. A continuación, en cada pozo se adicionaron 100µl de los anticuerpos primarios antes mencionados diluidos 1:100 en TBS-T-BSA, incubándose por 2hrs a 37°C. Después de 4 lavados con TBS-T, 100µl de los anticuerpos secundarios diluidos 1:100 en TBS-T-BSA fueron adicionados a los pozos y fueron incubados por 90min a 37°C. Las placas se lavaron 4 veces más con TBS-T. Una tableta de sustrato para fosfatasa alcalina (Sigma 104) fue diluida en 5ml de dietanolamina al 10% [pH 9.8] (Apéndice A.7), de esta solución se adicionaron 100µl/pozo y se incubó por 15min. La reacción fue detenida con 50µl de hidróxido de sodio 1M (Apéndice A.8). La absorbancia se leyó en un lector de ELISA (Biotec Instrument) a una longitud de onda de 405nm.

5.8 Ensayo de adhesión de VLP's a heparina.

Placas de 96 pozos de fondo plano fueron cubiertas con 100µl de heparina [5,000UI/ml] (Pisa Farmacéutica Mexicana) diluida 1:250 en PBS estéril e incubadas toda la noche a 4°C. Las placas fueron lavada 4 veces con TBS-T. Los sitios de unión inespecífica fueron bloqueados con TBS-T-BSA durante toda la noche a 4°C. Posterior al tiempo de bloqueo las placas fueron lavadas 4 veces con TBS-T.

A continuación se adicionaron 50ng/pozo de VLP's y se incubaron 1hr a 4°C. Se realizaron 4 lavados con TBS-T. y se adicionaron 100 µl/pozo del anticuerpo monoclonal de ratón 16L1-56E diluido 1:500 en TBS-T-BSA. Las placas se incubaron por 2hrs a 37°C. Se realizaron 4 lavados con TBS-T y se adicionó 100 µl/pozo del anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina anti-ratón IgG+A+M (H+L) (Zymed), diluido 1:500 en TBS-T-BSA. Las placas se incubaron por 90min a 37°C. Se realizaron 4 lavados con TBS-T. Una tableta de sustrato para fosfatasa alcalina fue diluida en 5ml de dietanolamina al 10% (pH 9.8) y se adicionaron 100µl/pozo de esta solución. Las placas se incubaron por 1hr a 37°C. Finalmente, la reacción fue detenida con 50µl de hidróxido de sodio 1M. La absorbancia se leyó en un lector de ELISA a una longitud de onda de 405nm. Para el estudio de los anticuerpos presentes en las SeCe se incubaron 50µl de las SeCe (diluidos en 50µl TBS-T-BSA) con 50ng de VLP's en un tubo eppendorf durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, las muestras fueron transferidas a los pozos de las placas ya bloqueadas y se continuó con el proceso descrito.

5.9 Análisis estadísticos.

Los datos fueron ordenados en tablas de contingencia de 2 por 2 para ser analizados por la prueba de Chi² corregida por Yates. Se consideró un nivel de significancia básico de $p=0.05$ en todas las pruebas, intervalos de confianza del 95% fueron calculados usando fórmulas estándar.

6. RESULTADOS.

6.1 Análisis clínico y molecular de la presencia de VPH.

En el presente estudio se incluyeron 271 mujeres de una población abierta, a todas se les practicó un análisis colposcópico del cual se obtuvieron los siguientes resultados: 34% (n=93) presentaron una lesión acetoblanca y fueron consideradas como pacientes con evidencia clínica de infección por VPH (C/E), 42% (n=113) no presentaron una lesión acetoblanca y fueron consideradas como pacientes sin evidencia clínica de infección por VPH (S/E). Finalmente el 24% (n=65) restante presentó tejido glandular evertido en la zona de transformación y ausencia de lesión acetoblanca lo cual fue diagnosticado como pacientes con eversión glandular (EvGI).

Para corroborar la presencia del VPH en las biopsias de las pacientes analizadas colposcópicamente, se realizó un PCR general con los primers MY09 y MY11 para detectar 5 tipos de VPH. Posteriormente, se realizó un PCR específico para VPH16 utilizando los primers LCR-f y LCR-r.

En la figura 9 se observa la fotografía tomada de un gel representativo de la amplificación de un segmento de L1 de VPH mediante PCR utilizando los primers MY9/11. En la figura 10 se observa la fotografía tomada de un gel representativo de la amplificación de la región LCR del VPH16 mediante PCR utilizando los primers LCR-f y LCR-r.

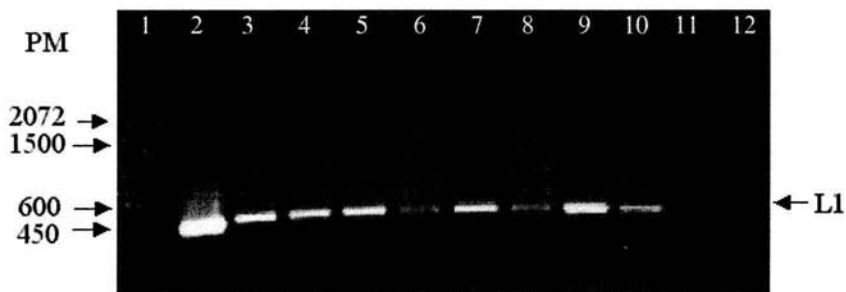


Figura 9. Amplificación de un segmento de L1 de VPH mediante PCR usando los primers MY9/11. Los carriles se distribuyen de la siguiente manera: 1. Marcadores de peso molecular, 2. Control positivo (DNA de la línea celular SiHa, positiva al VPH16), 3-11. Biopsias cervicales humanas y 12. Control negativo (H_2O_d .)

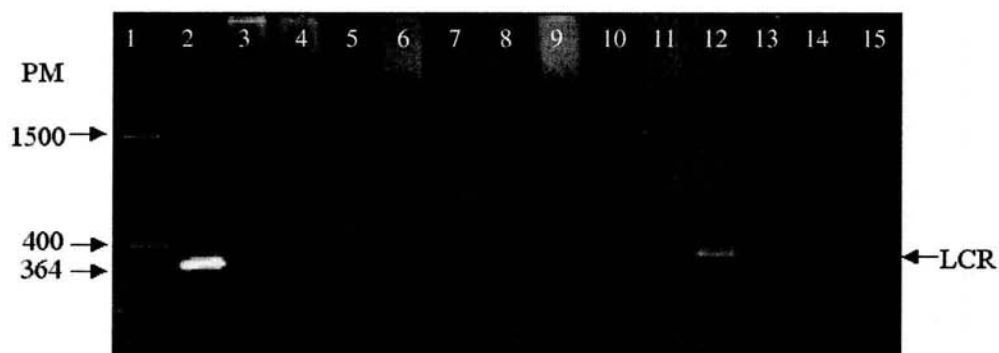


Figura 10. Amplificación de la región de control del VPH16 mediante PCR usando los primers LCR-f y LCR-r. Los carriles se distribuyen de la siguiente manera: 1. Marcadores de peso molecular, 2. Control positivo, 3-14. Biopsias cervicales humanas y 15. Control negativo (H_2O_d).

Como resultado del análisis molecular de la presencia de VPH, la población fue dividida en pacientes positivas a la presencia de DNA de VPH en general [VPH(+)], pacientes negativas a la presencia de DNA de VPH [VPH(-)] y pacientes positivas a la presencia de DNA de VPH16 (VPH16) (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados de los análisis clínico y molecular de la presencia de VPH.

Diagnóstico clínico (n)	Diagnóstico molecular		
	VPH(-) (%)	VPH(+)* (%)	VPH16** (%)
S/E (113)	7 (6)	106 (94)	13 (12)
C/E (93)	12 (13)	81 (87)	66 (71)
EvGl (65)	44 (68)	21 (32)	10 (15)

S/E.- Pacientes sin evidencia clínica de infección por VPH

C/E.- Pacientes con evidencia clínica de infección por VPH

EvGl.- Pacientes con eversión glandular

VPH (-).- Pacientes negativas a la presencia de DNA de VPH

VPH (+).- Pacientes positivas a la presencia de DNA de VPH

VPH16.- Pacientes positivas a la presencia de VPH16.

* Para determinar la presencia de DNA de VPH se realizó la prueba de PCR utilizando los primers generales MY09 y MY11.

** Para determinar la presencia de VPH16 se realizó la prueba de PCR utilizando los primer específicos de VPH16 LCR-f y LCR-r.

6.2 Estudio de la inhibición de la unión de VLP's a heparina.

El VPH se une a su célula blanco utilizando al heparán sulfato como co-receptor. Por lo tanto, en este trabajo se analizó si los anticuerpos inducidos por la infección genital por VPH pueden inhibir la unión a heparina.

Las muestras de SeCe de todas las pacientes fueron sometidas a un ensayo de inhibición de la unión de VLP's de VPH16 a heparina, la cual es un análogo del heparán sulfato. En estos ensayos las VLP's fueron incubadas con las SeCe previo a permitir su unión a heparina. Se utilizaron como control negativo las mismas VLP's incubadas con PBS en ausencia de anticuerpos. Como control positivo se incubaron VLP's con el anticuerpo monoclonal neutralizante 16L1-56E, el cual se sabe que inhibe la unión de VLP's a heparina.

Los valores de densidad óptica (D.O.) obtenidos en cada ensayo para el anticuerpo 16L156E se utilizaron para determinar la capacidad de anticuerpos presentes en las SeCe de inhibir la unión de VLP's a heparina. De esta forma, se consideró como anticuerpo inhibitorio de la unión a aquellos que poseían un valor de D.O. menor o igual a la del anticuerpo 16L1-56E. A partir de ahí se llevó a cabo un análisis de las proporciones de pacientes capaces de inhibir la unión de VLP's a heparina en cada grupo.

En las pacientes S/E el 42% (n=47) de las mujeres presentaron anticuerpos capaces de inhibir la unión de VLP's a heparina mientras que en el 58% (n=66) restante no hay inhibición de la unión (Figura 11).

Pacientes sin evidencia clínica de infección por VPH

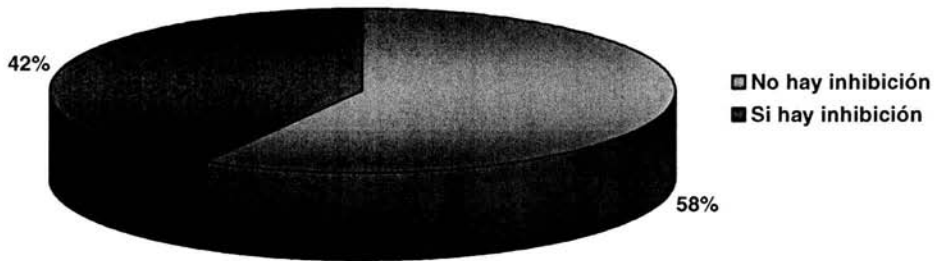


Figura 11. Inhibición de la unión de VLP's a heparina por mujeres sin evidencia clínica de infección. En rojo se muestra la proporción de pacientes (n=47) que presentan anticuerpos capaces de inhibir la unión de VLP's de VPH16 a heparina y en azul se muestra la proporción de pacientes (n=66) que no presentan anticuerpos capaces de inhibir la unión de VLP's de VPH16 a heparina.

En las pacientes C/E el 53% (n=49) de las mujeres presentaron anticuerpos capaces de inhibir la unión de VLP's a heparina mientras que en el 47% (n=44) restante no hay inhibición de la unión (Figura 12).

Pacientes con evidencia clínica de infección por VPH

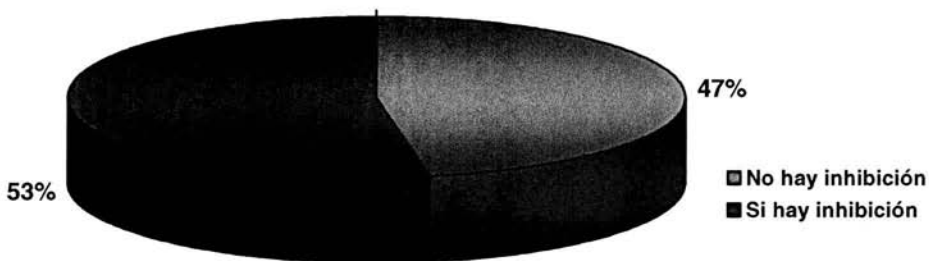


Figura 12. Inhibición de la unión de VLP's a heparina por mujeres con evidencia clínica de infección. En rojo se muestra la proporción de pacientes (n=49) que presentan anticuerpos capaces de inhibir la unión de VLP's de VPH16 a heparina y en azul se muestra la proporción de pacientes (n=44) que no presentan anticuerpos capaces de inhibir la unión de VLP's de VPH16 a heparina.

Las proporciones de mujeres con anticuerpos inhibitorios de la unión de VLP's a heparina en los grupos de pacientes S/E y C/E fueron comparadas entre si para determinar si existía una diferencia entre los grupos. Como resultado del análisis estadístico se observó que la diferencia entre las proporciones de mujeres con anticuerpos capaces de inhibir la unión a heparina entre ambos grupos no fue estadísticamente significativa ($p = 0.147$) como se muestra en la tabla 2. En la figura 13 se muestra el porcentaje de inhibición de unión a heparina por los anticuerpos presentes en las SeCe de cada grupo.

Tabla 2. Características de la población dividida por diagnóstico colposcópico.

	Número de pacientes con anticuerpos que si inhibieron la unión a heparina. (%)	Número de pacientes con anticuerpos que no inhibieron la unión a heparina (%)	Total
Pacientes C/E	49 (53)	44 (47)	93
Pacientes S/E	47 (42)	66 (58)	113
Total	96	110	206

S/E.- Pacientes sin evidencia clínica de infección por VPH

C/E.- Pacientes con evidencia clínica de infección por VPH

Los datos fueron agrupados en tablas de contingencia de 2 por 2 y analizados por la prueba de Chi² corregida por Yates ($p= 0.147$).

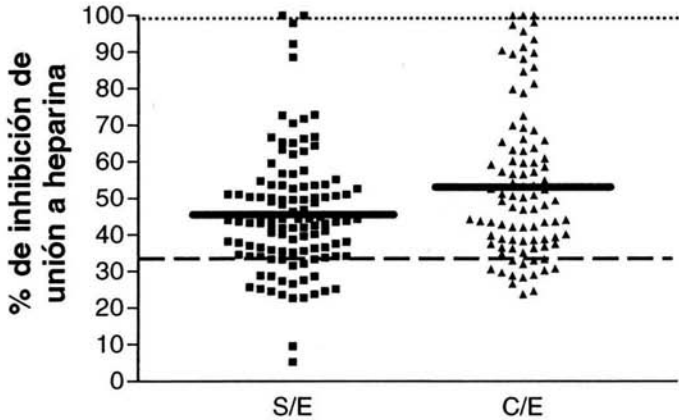


Figura 13. Inhibición de la unión a heparina. Se muestra el porcentaje de inhibición de unión de VLP's a heparina inducido por los anticuerpos presentes en las SeCe de pacientes sin evidencia clínica de infección por VPH (S/E) y en pacientes con evidencia clínica de infección por VPH (C/E). Las líneas gruesas representan la media de cada grupo. La línea punteada representa el valor promedio del control negativo. La línea cortada representa el valor promedio del control positivo. Cada punto de la gráfica representa una paciente.

Estos resultados indican que la respuesta entre mujeres clínicamente infectadas es igual a la respuesta de mujeres clínicamente sanas. Puesto que el análisis colposcópico no es capaz de detectar una infección de VPH antes de que esta provoque la aparición de una lesión visible, es posible que dentro del grupo de mujeres S/E existan pacientes que se encuentran infectadas por VPH en una fase preclínica. Por lo anterior se decidió llevar a cabo un análisis molecular para determinar si existen mujeres infectadas por el VPH dentro del grupo de pacientes clínicamente sanas.

Para determinar de una manera más sensible que la colposcopia la presencia de DNA de VPH en las pacientes S/E y C/E, se realizó la prueba de PCR utilizando los primers generales MY09 y MY11. Como resultado de esta prueba se observó que el 94% (n=112) de las pacientes S/E fueron positivas a la presencia de DNA de VPH, mientras que 6% (n=7) restante fue negativa a la presencia de DNA de VPH, (Figura 14). Este hecho podría estar asociado con la observación de que algunas mujeres consideradas clínicamente sanas son positivas a la presencia de anticuerpos contra VPH.

Presencia de DNA viral en mujeres sin evidencia clínica de infección por VPH

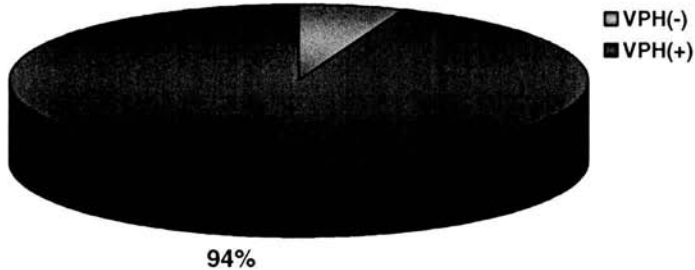


Figura 14. Presencia de DNA viral en mujeres sin evidencia clínica de infección por VPH. En rojo se muestra la proporción de pacientes positivas a la presencia de DNA de VPH [VPH(+)] (n=112) y en azul la proporción de pacientes negativas a la presencia de DNA de VPH [VPH(-)] (n=7).

En las pacientes C/E el 87% (n=81) de las mujeres fue positiva a la presencia de DNA de VPH mientras que el 13% (n=12) restante fue negativo a la presencia de DNA de VPH, (Figura 15).

Presencia de DNA viral en mujeres con evidencia clínica de infección por VPH

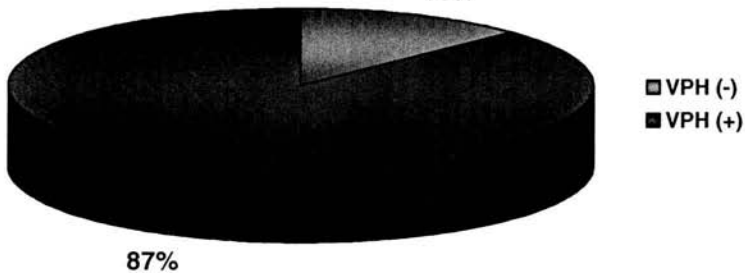


Figura 15. Presencia de DNA viral en mujeres con evidencia clínica de infección por VPH. En rojo se muestra la proporción de pacientes positivas a la presencia de DNA de VPH [VPH(+)] (n=81) y en azul la proporción de pacientes negativas a la presencia de DNA de VPH [VPH(-)] (n=12).

Las proporciones de pacientes VPH(+) y VPH(-) de los grupos S/E y C/E fueron comparados entre sí para determinar si existía alguna diferencia entre ellos. Como resultado del análisis estadístico se obtuvo que la diferencia en el número de mujeres infectadas por VPH entre las pacientes S/E y C/E no es estadísticamente significativas ($p= 0.125$) (Tabla 3). Estos resultados nos indican que tanto en pacientes clínicamente sanas como en pacientes clínicamente infectadas existe igual proporción de mujeres VPH(+).

Tabla 3. Presencia de DNA viral en las mujeres divididas por diagnóstico colposcópico.

	Número de pacientes VPH(+)* (%)	Número de pacientes VPH(-) (%)	Total
Pacientes C/E	112 (94)	7 (6)	119
Pacientes S/E	81 (87)	12 (13)	93
Total	193	19	212

S/E.- Pacientes sin evidencia clínica de infección por VPH

C/E.- Pacientes con evidencia clínica de infección por VPH

VPH(+) Pacientes positivas a la presencia de DNA de VPH

VPH(-) Pacientes negativas a la presencia de DNA de VPH

* Para determinar la presencia de DNA de VPH se realizó la prueba de PCR utilizando los primers generales MY09 y MY11.

Los datos fueron agrupados en tablas de contingencia de 2 por 2 y analizados por la prueba de Chi² corregida por Yates ($p= 0.125$).

A partir de estos resultados se decidió analizar si la proporción de anticuerpos capaces de inhibir la unión de VLP's a heparina en mujeres VPH(+) diferían de las mujeres VPH(-). De las pacientes S/E y C/E se obtuvo un total de 206 mujeres, de las cuales el 91% (n=187) fue positiva a la presencia de DNA de VPH, mientras que solo el 9% (n=19) fue negativa a la presencia de DNA de VPH. En las pacientes VPH(+) el 48% (n=89) sí presentó anticuerpos capaces de inhibir la unión de VLP's a heparina mientras que el 52% (n=98) de las pacientes no presentó anticuerpos capaces de inhibir la unión de VLP's a heparina (Figura 16).

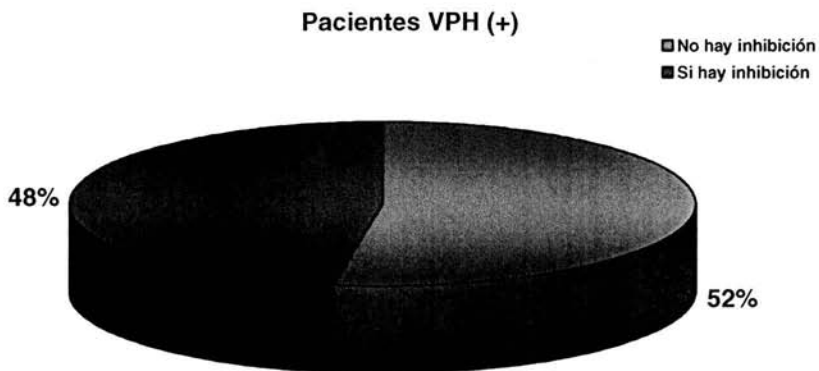


Figura 16. Inhibición de la unión de VLP's a heparina por mujeres positivas a la presencia de DNA de VPH. En rojo se muestra la proporción de pacientes (n=89) que presentan anticuerpos capaces de inhibir la unión de VLP's de VPH16 a heparina y en azul se muestra la proporción de pacientes (n=98) que no presentan anticuerpos capaces de inhibir la unión de VLP's de VPH16 a heparina.

En las pacientes VPH(-) el 37% (n=7) sí presentó anticuerpos capaces de inhibir la unión de VLP's a heparina mientras que el 63% (n=12) de las pacientes no presentó anticuerpos capaces de inhibir la unión de VLP's a heparina (Figura 17).

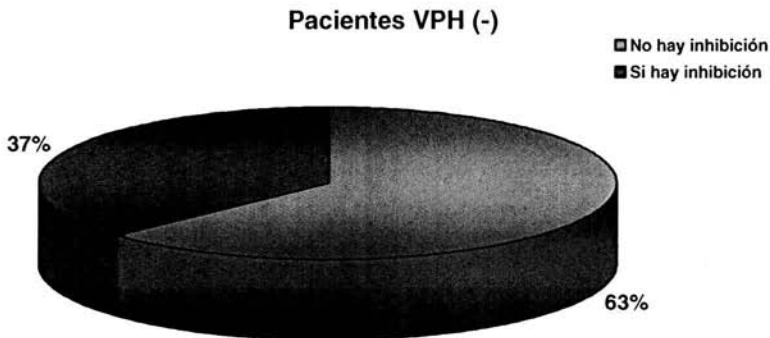


Figura 17. Inhibición de la unión de VLP's a heparina por mujeres negativas a la presencia de DNA de VPH. En rojo se muestra la proporción de pacientes (n=7) que presentan anticuerpos capaces de inhibir la unión de VLP's de VPH16 a heparina y en azul se muestra la proporción de pacientes (n=12) que no presentan anticuerpos capaces de inhibir la unión de VLP's de VPH16 a heparina.

Las proporciones de mujeres con anticuerpos inhibitorios de la unión de VLP's a heparina en los grupos de pacientes VPH(+) y VPH(-) fueron comparadas entre si para determinar si existía una diferencia entre los grupos. Como resultado del análisis estadístico se observó que la diferencia entre las proporciones de mujeres con anticuerpos capaces de inhibir la unión a heparina entre ambos grupos no fue estadísticamente significativa ($p = 0.513$) como se muestra en la tabla 4. Estos resultados sugieren que tanto las pacientes VPH(+) como las pacientes VPH(-) presentan anticuerpos capaces de inhibir la unión de VLP's a heparina.

Tabla 4. Inhibición de la unión de VLP's a heparina por la población dividida por diagnóstico molecular.

	Número de pacientes con anticuerpos que si inhibieron la unión a heparina. (%)	Número de pacientes con anticuerpos que no inhibieron la unión a heparina. (%)	Total
Pacientes VPH(+)*	89 (48)	98 (52)	187
Pacientes VPH (-)	7 (37)	12 (63)	19
Total	96	110	206

VPH(+) Pacientes positivas a la presencia de DNA de VPH

VPH(-) Pacientes negativas a la presencia de DNA de VPH

* Para determinar la presencia de DNA de VPH se realizó la prueba de PCR utilizando los primers generales MY09 y MY11.

Los datos fueron agrupados en tablas de contingencia de 2 por 2 y analizados por la prueba de Chi² corregida por Yates ($p=0.513$).

Puesto que las VLP's utilizadas en los ensayos de inhibición de unión a heparina se produjeron a partir de la secuencia de L1 del VPH16, se realizó la prueba de PCR utilizando los primers específicos de VPH16 LCR-f y LCR-r para determinar el número de mujeres positivas a la presencia de DNA de VPH16. Como resultado de esta prueba de las 187 pacientes VPH(+), 79 de ellas fueron positivas para la presencia de DNA de VPH16. A partir de estos resultados se analizaron las proporciones de mujeres con anticuerpos capaces de inhibir la unión del VLP's de VPH16 a heparina.

En las pacientes VPH16 el 52% (n=41) de las mujeres presentaron anticuerpos capaces de inhibir la unión de VLP's a heparina, mientras que el 48% (n=38) restante no presento anticuerpos capaces de inhibir la unión de VLP's a heparina (Figura 18).

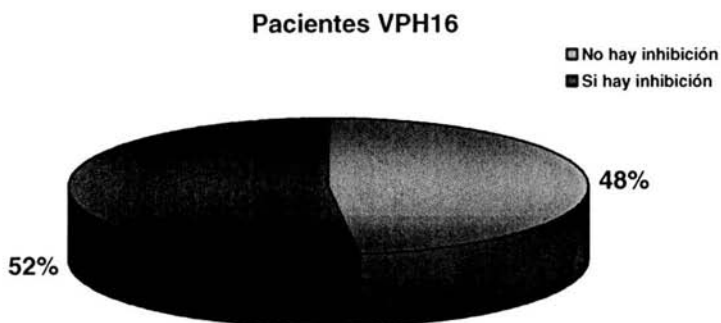


Figura 18. Inhibición de la unión de VLP's a heparina por mujeres positivas a la presencia de DNA de VPH16. En rojo se muestra la proporción de pacientes (n=41) que presentan anticuerpos capaces de inhibir la unión de VLP's de VPH16 a heparina y en azul se muestra la proporción de pacientes (n=38) que no presentan anticuerpos capaces de inhibir la unión de VLP's de VPH16 a heparina.

En las pacientes VPH(+) para VPH diferente a VPH16 (VPH \neq 16) el 44% (n=48) de las mujeres presentó anticuerpos capaces de inhibir la unión de VLP's a heparina, mientras que el 56% (n=60) restante no presentó anticuerpos capaces de inhibir la unión de VLP's a heparina (Figura 19).

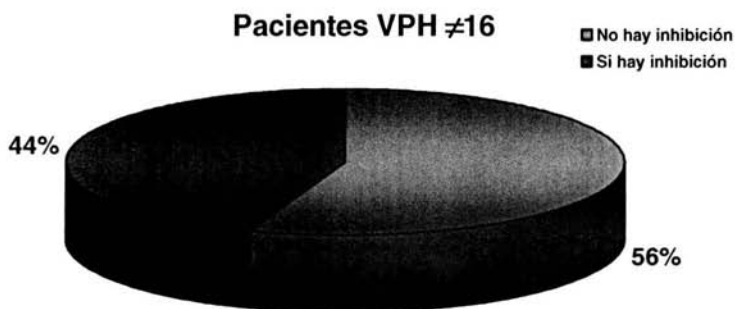


Figura 19. Inhibición de la unión de VLP's a heparina por mujeres positivas a la presencia de DNA de VPH diferente a VPH16. En rojo se muestra la proporción de pacientes (n=48) que presentan anticuerpos capaces de inhibir la unión de VLP's de VPH16 a heparina y en azul se muestra la proporción de pacientes (n=60) que no presentan anticuerpos capaces de inhibir la unión de VLP's de VPH16 a heparina.

En la figura 20 se observa el porcentaje de inhibición de unión de VLP's a heparina producido por los anticuerpos presentes en las SeCe de cada paciente de los grupos diagnosticados molecularmente.

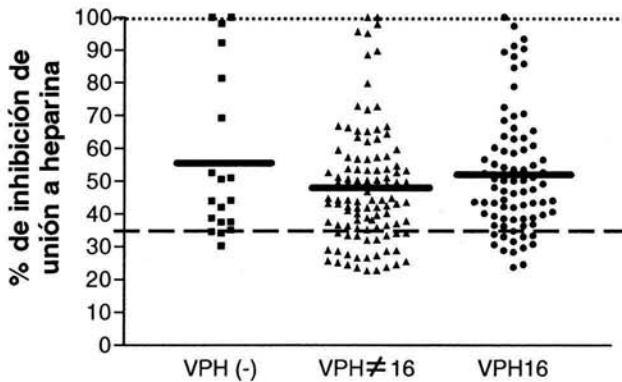


Figura 20. Diagnóstico molecular. Se muestra el porcentaje de inhibición de unión de VLP's a heparina por los anticuerpos presentes en las SeCe de pacientes negativas a la presencia de DNA de VPH [VPH(-)], pacientes positivas a la presencia de DNA de VPH (VPH≠16) y pacientes positivas a la presencia de VPH16 (VPH16). Las líneas gruesas representan la media de cada grupo. La línea punteada representa el valor promedio del control negativo. La línea cortada representa el valor promedio del control positivo. Cada punto de la gráfica representa una paciente.

Las proporciones de mujeres con anticuerpos inhibitorios de la unión de VLP's a heparina en los grupos de pacientes VPH≠16 y VPH16 fueron comparadas entre si. Como resultado del análisis estadístico se observó que la diferencia entre las proporciones de mujeres con anticuerpos capaces de inhibir la unión a heparina entre ambos grupos no fue estadísticamente significativa ($p = 0.390$) como se muestra en la tabla 5. Estos datos sugieren que diferentes tipos de VPH son capaces de inducir la producción de anticuerpos capaces de inhibir la unión de VLP's a heparina.

Tabla 5. Características de la población dividida por diagnóstico molecular.

	Número de pacientes con anticuerpos que si inhibieron la unión a heparina. (%)	Número de pacientes con anticuerpos que no inhibieron la unión a heparina. (%)	Total
Pacientes VPH16**	41 (52)	38 (48)	79
Pacientes VPH≠16*	48 (44)	60 (56)	108
Total	89	98	187

VPH ≠16.- Pacientes positivas a la presencia de DNA de VPH diferente a VPH16.

VPH16.- Pacientes positivas a la presencia de DNA de VPH16.

* Para determinar la presencia de DNA de VPH se realizó la prueba de PCR utilizando los primers generales MY09 y MY11.

** Para determinar la presencia de VPH16 se realizó la prueba de PCR utilizando los primer específicos de VPH16 LCR-f y LCR-r.

Los datos fueron agrupados en tablas de contingencia de 2 por 2 y analizados por la prueba de Chi² corregida por Yates ($p= 0.390$).

6.3 Correlación entre la presencia de anticuerpos inhibitorios de la unión de VLP's a heparina y la protección contra la infección por VPH.

Los resultados obtenidos indican que en algunas mujeres la infección por VPH induce la producción de anticuerpos capaces de inhibir la unión de VLP's a heparina. Dado que el VPH requiere unirse al heparán sulfato para infectar a su célula blanco, consideramos importante investigar si la presencia de estos anticuerpos inhibitorios en SeCe podría proteger en contra de la infección por el virus *in vivo*. Para realizar esta investigación, se incluyó en el trabajo un grupo de mujeres con diagnóstico clínico de eversión glandular (EvGl). En un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio se demostró que el tejido glandular evertido representa un riesgo aumentado para infección por VPH (ªRocha-Zavaleta et. al., 2003). Por lo anteriormente expuesto, las mujeres que presentan una eversión glandular son sometidas a una cirugía para eliminar el tejido glandular de riesgo, esta cirugía es conocida como LEEP (por sus siglas en inglés: Loop Electrosurgical Escisión Procedure). Ocho semanas después de la intervención las pacientes han recuperado el epitelio extraído, y se sabe que en un cierto porcentaje de ellas también adquiere una infección por VPH.

En este trabajo se analizaron 65 pacientes con eversión glandular, de quienes se obtuvieron muestras de tejido y de SeCe antes del LEEP y ocho semanas después de la intervención. Se determinó la presencia de VPH por PCR en las muestras de tejido cervical, y la presencia de anticuerpos inhibitorios de la unión a heparina en las SeCe. Los resultados de estos análisis se muestran en la Tabla 6. Antes de la operación 21 (32%) pacientes resultaron positivas a la presencia de VPH, de ellas 10 pacientes fueron positivas a la presencia de VPH16. Ocho semanas después del LEEP el porcentaje de pacientes positivas a la infección por VPH aumento a 42 (65%), de la misma forma el número de mujeres con VPH16 aumento a 36. Por otro lado, antes de la operación el 68% de las pacientes presentó anticuerpos inhibitorios (n=44). Interesantemente, este porcentaje disminuyó a 32% (n=21) ocho semanas después del LEEP.

Tabla 6. Pacientes con eversión glandular.

	Pacientes con eversión glandular. n(%)	
	Pre-LEEP	Post-LEEP
Inhibición de la unión a heparina		
Positivo	44 (68)	21 (32)
Negativo	21 (32)	44 (68)
Diagnóstico molecular		
VPH (-)	44 (68)	23 (35)
VPH (+)*	21 (32)	42 (65)
VPH16**	10 (15)	36 (55)

Pre-LEEP.- Antes de la operación

Post-LEEP.- Después de la operación

VPH (-).- Pacientes negativas a la presencia de DNA de VPH

VPH (+).- Pacientes positivas a la presencia de DNA de VPH

VPH16.- Pacientes positivas a la presencia de VPH16.

* Para determinar la presencia de DNA de VPH se realizó la prueba de PCR utilizando los primers generales MY09 y MY11.

** Para determinar la presencia de VPH16 se realizó la prueba de PCR utilizando los primer específicos de VPH16 LCR-f y LCR-r.

Los datos muestran que la proporción de mujeres infectadas antes del LEEP fue significativamente menor que la proporción de pacientes infectadas después de la operación ($p= 0.0001$). Esto sugiere que durante el período de recuperación post-LEEP las mujeres son más susceptibles a la infección. Sin embargo, nuestros datos también muestran cambios en la presencia de anticuerpos inhibitorios en estas mujeres, por lo tanto, con la finalidad de determinar si la existencia previa de anticuerpos inhibitorios podría tener algún efecto sobre la probabilidad de adquirir una infección por VPH, se comparó la presencia de anticuerpos y la de VPH en todas las pacientes.

Primeramente se analizaron aquellas mujeres que antes de la operación fueron negativas a la presencia de VPH. De este grupo de 42 mujeres, se observó que 28 (66.6%) presentaban anticuerpos inhibitorios (Tabla 7). El análisis del tejido cervical post-LEEP mostró que 25 mujeres de este grupo adquirieron una infección por VPH, mientras que 17 permaneció negativa a la presencia de VPH. El estudio de anticuerpos demostró que, del grupo de mujeres que se infectaron solo el 56% presentó anticuerpos inhibitorios antes de la operación, mientras que en el grupo que permaneció sin infección el 82% de las mujeres presentó anticuerpos inhibitorios. Más aún, los datos obtenidos después de la operación muestran que el porcentaje de pacientes con anticuerpos inhibitorios disminuyó en un 70% en el grupo de mujeres que se infectó, en contraste con una disminución de solo el 35% en el grupo que se mantuvo sin infección.

Tabla 7. Mujeres VPH(-) antes de la operación.

	Pre-LEEP	Post-LEEP
Número de pacientes con anticuerpos que si inhibieron la unión a heparina. (%)	28 (66.6)	13 (30.9)
Número de pacientes con anticuerpos que no inhibieron la unión a heparina. (%)	14 (33.4)	29 (69.1)
Número de mujeres VPH(-)	42(100)	17 (40.5)
Número de mujeres VPH(+)*	0 (0)	25 (59.5)

Pre-LEEP.- Antes de la operación

Post-LEEP.- Después de la operación

VPH (-).- Pacientes negativas a la presencia de DNA de VPH

VPH (+).- Pacientes positivas a la presencia de DNA de VPH

* Para determinar la presencia de DNA de VPH se realizó la prueba de PCR utilizando los primers generales MY09 y MY11.

La asociación estadística entre la presencia de anticuerpos inhibitorios antes de la operación y la ausencia de infección post-LEEP resultó ser significativa ($p = 0.027$). Por otro lado la asociación entre la ausencia de anticuerpos inhibitorios después de la operación y la presencia de infección post-LEEP también resultó ser significativa ($p = 0.028$). Estos datos sugieren que la ausencia de los anticuerpos después de la operación aumenta el riesgo de adquirir una infección por VPH.

Posteriormente se analizaron aquellas mujeres que antes de la operación fueron positivas a la presencia de VPH. De este grupo de 20 mujeres, se observó que 14 (70%) presentaban anticuerpos inhibitorios (Tabla 8). El análisis del tejido cervical post-LEEP mostró que 14 mujeres de este grupo permanecieron positivas a la presencia de VPH, mientras que 6 se volvieron negativas a la presencia de VPH. El estudio de anticuerpos muestra que, del grupo de mujeres que permanecieron infectadas el 85.7% presentó anticuerpos inhibitorios antes de la operación, mientras que en el grupo de mujeres que se volvieron negativas a la presencia de DNA de VPH el 33.3% de mujeres presentó anticuerpos inhibitorios.

Los datos obtenidos después de la operación muestran que el porcentaje de pacientes con anticuerpos inhibitorios disminuyó en un 58% en el grupo de mujeres que permaneció infectada, en contraste con la disminución del 16.6% en el grupo de mujeres que se volvió negativa a la presencia de DNA de VPH. La asociación estadística entre la presencia de anticuerpos inhibitorios antes de la operación y la ausencia de infección post-LEEP resultó ser no significativa ($p = 0.07$). Por otro lado la asociación entre la ausencia de anticuerpos inhibitorios después de la operación y la presencia de infección post-LEEP resultó ser no significativa ($p = 0.539$). Estos datos sugieren que la presencia de anticuerpos después de la operación en mujeres previamente infectadas no disminuye el riesgo de adquirir una infección por VPH.

Tabla 8. Mujeres VPH(+) antes de la operación.

	Pre-LEEP	Post-LEEP
Número de pacientes con anticuerpos que si inhibieron la unión a heparina. (%)	14 (70)	7 (35)
Número de pacientes con anticuerpos que no inhibieron la unión a heparina. (%)	6 (20)	13 (65)
Número de mujeres VPH(-)	0 (0)	6 (30)
Número de mujeres VPH(+)*	20 (100)	14 (70)

Pre-LEEP.- Antes de la operación

Post-LEEP.- Después de la operación

VPH (-).- Pacientes negativas a la presencia de DNA de VPH

VPH (+).- Pacientes positivas a la presencia de DNA de VPH

* Para determinar la presencia de DNA de VPH se realizó la prueba de PCR utilizando los primers generales MY09 y MY11.

7. DISCUSIÓN.

El VPH es considerado el principal factor de riesgo para el desarrollo del cáncer cervical. Se ha observado que la infección persistente, principalmente con VPH de alto riesgo, precede al desarrollo de lesiones intraepiteliales en el cérvix y éstas a su vez al cáncer invasor. La mayoría de las infecciones por VPH desaparecen después de algunos meses (Evander et. al., 1995; Ho et. al., 1998), incluso se sabe que algunas lesiones pre-malignas pueden revertir (Syrjanen et. al., 1997; Duggan et. al., 1998). Sin embargo, no todas las mujeres son capaces de eliminar la infección y posteriormente presentan lesiones avanzadas. Evidencias experimentales indican que la participación del sistema inmune es importante para el control de la infección por VPH. Por esta razón en el presente estudio se evaluó la capacidad de anticuerpos presentes en mujeres infectadas por VPH para inhibir la unión del virus a heparina.

Inicialmente el ensayo de inhibición de unión a heparina reveló que el 53% de las mujeres con evidencia clínica de infección presentaron anticuerpos capaces de inhibir la unión de VLP's a heparina. Esto concuerda con varios estudios que han reportado la presencia de anticuerpos IgG e IgA en el 50-60% de las mujeres infectadas por VPH (Kirnbauer et. al., 1994; Le Can et. al., 1995; Carter et. al., 1996; Sasagawa et. al., 1996; Bontkes et. al., 1999; Nakagawa et. al., 2002). La presencia del virus fue corroborada por PCR y se observó que el 87% de las mujeres C/E fue positiva a la presencia de DNA viral. Estos datos nos sugieren que la infección por VPH induce la producción de anticuerpos capaces de inhibir la unión de VLP's a heparina.

Interesantemente el 42% de las mujeres sin evidencia clínica de infección presentó anticuerpos capaces de inhibir la unión de VLP's a heparina, esto podría deberse a la presencia de una infección viral subclínica, que no puede ser detectada por la colposcopia. La colposcopia es un método utilizado en varios países para el diagnóstico de infección por VPH y lesiones asociadas gracias a la presencia de una lesión acetoblanca, el mecanismo por el cual la infección por VPH produce una lesión acetoblanca aún se desconoce. En la infección por VPH existe una

etapa preclínica en la cual las células infectadas no producen una lesión acetoblanka y por lo tanto no puede ser detectado por colposcopia. Sin embargo, durante la fase de infección preclínica el virus puede ser detectado por métodos moleculares. Por lo tanto, la presencia del DNA viral en las pacientes S/E fue corroborada por PCR utilizando los primers generales MY9/11. Como resultado se demostró que en el grupo diagnosticado como pacientes clínicamente sanas el 94% de las mujeres se encontraba infectada por algún tipo de VPH, esto explicaría la presencia de anticuerpos inhibitorios. Estos resultados coinciden con observaciones previas realizadas en nuestro laboratorio (^bRocha-Zavaleta et. al., 2003), donde se encontró que las mujeres infectadas por VPH presentan anticuerpos sIgA e IgG dirigidos contra L1 en secreciones cervicales aún cuando no presenten una patología visible de infección.

Un hallazgo interesante en nuestro trabajo fue que al analizar un grupo de mujeres sin evidencia molecular de infección por VPH, se observó que algunas de estas mujeres presentaron anticuerpos inhibitorios. La proporción de pacientes con anticuerpos inhibitorios fue del 48% en mujeres VPH(+) y del 37% en mujeres VPH(-), la diferencia entre ellas no fue significativa ($p = 0.513$). Tomando en cuenta la alta prevalencia de infección por VPH en la población, una explicación a estas observaciones es que la existencia de anticuerpos en pacientes VPH(-) sean producto de infecciones pasadas que fueron eliminadas. Esto concuerda con la observación previa de un estudio realizado en nuestro laboratorio, en el que se encontró la presencia de anticuerpos dirigidos contra la proteína L1 en las secreciones cervicales estudiadas. Se ha demostrado que la producción de anticuerpos contra VPH solo ocurre después de un contagio con el virus (Anderson-Ellestrom et. al., 1996; Kjaer et. al., 2001). Otros estudios (Wang et. al., 1996; Hagensee et. al., 2000) han detectado anticuerpos sistémicos y locales en mujeres que no presentan DNA viral y en ambos trabajos se asoció a infecciones pasadas. Se ha determinado que los anticuerpos generados por una infección pasada pueden persistir por largos periodos de tiempo. En un estudio de seguimiento realizado por Sasagawa et. al., (2003) se encontró que los anticuerpos IgA e IgG generados por una infección por VPH persisten en las SeCe durante un periodo que va desde 9 hasta 15 meses.

Es importante recordar que las VLP's utilizadas en este estudio se produjeron a partir de la secuencia de L1 de VPH16, por lo que se determinó la presencia de específica de VPH16 dentro de las mujeres VPH(+) por PCR utilizando los primers LCR-f y LCR-r. Se observó que el 52% de las mujeres VPH16 presentaron anticuerpos capaces de inhibir la unión de VLP's a heparina, mientras que el 44% de las mujeres infectadas con algún tipo de VPH diferente al VPH16 presentó anticuerpos inhibitorios. El análisis estadístico indicó que la proporción de mujeres con anticuerpos inhibitorios entre los grupos VPH \neq 16 y VPH16 fue similar ($p = 0.396$). Estas observaciones sugieren que diferentes tipos de VPH inducen la producción de anticuerpos capaces de inhibir la unión de VLP's de VPH16 a heparina.

Interesantemente, los datos parecen indicar que los anticuerpos generados contra la infección de un VPH diferente al VPH16 son capaces de inhibir la unión de VLP's de VPH16 a heparina por lo que los anticuerpos estudiados podrían estar generando reacción cruzada. Estos datos contradicen las observaciones hechas por otros investigadores, los cuales plantean que la generación de anticuerpos neutralizantes contra VPH es tipo-específica (Christensen et. al., 1994; Christensen et. al., 1996; Wang et. al., 1996; Wang et. al., 2000; Giroglou et. al., 2001). Sin embargo en dos trabajos posteriores, se observó que mujeres infectadas por VPH de los tipos 16, 18, 31, 33 y 58 generaban anticuerpos sistémicos que disminuían el riesgo de adquirir nuevas infecciones con VPH relacionados, sugiriendo que esto se debía a reacción cruzada (Combita et. al., 2002; Ho et. al., 2002). Dado que las evidencias experimentales hasta el momento no han sido contundentes, no se puede descartar la posibilidad de que la presencia de anticuerpos inhibitorios se deba a una infección pasada por VPH16. Por lo tanto, es necesario hacer un estudio más profundo para poder determinar las especificidad de los anticuerpos estudiados.

Los dominios de unión a heparán sulfato son altamente conservados en las proteínas que tienen como ligando a esta molécula. Joyce et. al., (1999) demostró que en el extremo carboxilo terminal de L1 se encuentra la secuencia XBBBBXB (donde B es lisina o arginina) la cual es muy similar a las secuencias de unión a heparán sulfato presentes en otras proteínas. Otros estudios proponen también al extremo carboxilo terminal de L1 como el encargado de la unión al heparán sulfato para los VPH tipos 11, 16 y 31 (Bousarghin et. al., 2003). Es posible que al ser el

heparán sulfato co-receptor para diferentes tipos de VPH (Giroglou et. al., 2001, Combata et. al., 2001; Selinka et. al., 2002; Shafti-Keramat et. al 2003,) el epitope que permite la unión del virus a éste sea también una secuencia conservada en los diferentes tipos de VPH (como ocurre en proteínas celulares) y esto genere la reacción cruzada observada en nuestro estudio. Para determinar si esta secuencia de unión a heparán sulfato es conservada deben realizarse alineamientos múltiples de la secuencia de aminoácidos de L1 de diferentes tipos de VPH y determinar si la identidad de dichas secuencias es mayor al 20%.

Con los datos obtenidos en este estudio no podemos asegurar que los anticuerpos estudiados sean capaces de neutralizar al virus, para ello se requiere realizar experimentos de infección con pseudoviriones. Los pseudoviriones consisten en un plásmido de DNA empaquetado dentro de VLP's y son utilizados como vehículos para transferir genes dentro de las células (Unckell et. al., 1997; Kawana et. al., 1998; Touzé et. al., 1998). Combata y colaboradores (2001) utilizaron pseudoviriones de VPH 16, 18, 31, 33, 39, 45, 58, 59 y 68, que contenían el gen luciferasa, para transfectar células Cos7. En este estudio se observó que al pre-incubar los pseudoviriones con heparina se reducía la transferencia de genes dentro de las células. Por otro lado, Selinka et. al., (2002) observaron que al pre-incubar células Cos7 con heparinasa, se inhibía la transferencia de genes al interior de la célula por pseudoviriones de VPH33. Puesto que se ha observado que la transferencia de genes a través de pseudoviriones de VPH depende de heparán sulfato, consideramos que es un modelo apropiado para determinar si los anticuerpos inhibitorios de la unión a heparina bloquean la entrada del virus a la célula.

Una forma para estudiar si los anticuerpos inhibitorios presentes en las SeCe son capaces de proteger contra una infección es a través de estudios de seguimiento. En este estudio se incluyó un grupo de mujeres que presentó eversión glandular. Se sabe que el tejido glandular evertido puede ser fácilmente traumatizado, por ello el riesgo de infección por VPH y otros patógenos es mayor (Dowe et. al., 1999; Jacobobson et. al., 2000; Moscicki et. al., 2001; ^aRocha-Zavaleta et. al., 2003). En estudios previos hechos en nuestro laboratorio se observó que las mujeres que presentan EvGI son más susceptibles de sufrir una infección por VPH que aquellas

mujeres que no presentan EvGI (Rocha-Zavaleta et. al., 2003). Por esta razón, este tipo de pacientes es sometida a una operación para retirar el tejido evertido. Se sabe que durante el periodo de recuperación del epitelio, aproximadamente ocho semanas, existe una proporción de mujeres que se reinfecta, o adquiere una infección de novo. Dadas sus características, estas pacientes conforman un grupo de estudio de seguimiento adecuado. Por lo tanto, en nuestro trabajo estudiamos la presencia de anticuerpos inhibitorios en mujeres con EvGI antes y después de la intervención quirúrgica, y lo asociamos con la adquisición de infecciones por VPH.

Se observó que antes de la operación el 68% de las mujeres presentó anticuerpos inhibitorios, mientras que ocho semanas después de la misma sólo el 32% de las mujeres presentó anticuerpos inhibitorios. Nos pareció interesante que aunado a esto, se observó que el número de mujeres infectadas aumentó hasta un 65% después de la operación. Esto podría deberse a una inmunosupresión local producida por la operación que se les practicó a las pacientes, lo cual a su vez podría explicar el aumento en el número de mujeres infectadas. Estudios hechos en nuestro laboratorio concuerdan con estos datos, ya que hemos observado que el título de anticuerpos presentes en las secreciones cervicales de las pacientes disminuye después de la operación (datos no publicados). Por otro lado se ha demostrado que pacientes inmunodeprimidas, ya sea por transplantes, infección por VIH u otra razón, son más susceptibles a la infección por VPH y generalmente presentan infecciones persistentes o lesiones asociadas avanzadas (Halpert et. al., 1986; Laga et. al., 1992).

Para determinar la correlación entre la presencia de anticuerpos inhibitorios y la protección contra la infección por VPH, analizamos un grupo de pacientes con EvGI que antes de la operación eran negativas a la presencia de DNA viral. Interesantemente en las mujeres que adquirieron una infección post-operativa la proporción de mujeres con anticuerpos inhibitorios disminuyó en un 70% mientras que en aquellas mujeres que permanecieron negativas a la presencia de DNA la proporción de mujeres con anticuerpos inhibitorios disminuyó solo en un 35%. La presencia de DNA viral después de la operación podría ser explicada por la disminución de los anticuerpos inhibitorios, lo cual hace más susceptibles a la mujeres de infectarse con VPH

durante el periodo de recuperación; más aún podemos inferir que la existencia de anticuerpos inhibitorios previos a la infección reducen el riesgo de una nueva infección. Estas observaciones concuerdan con un estudio de seguimiento realizado por Wang y colaboradores (1996) en donde observaron las fluctuaciones de anticuerpos IgA e IgG de SeCe durante varios meses. Sus resultados mostraron que al detectar bajos títulos de anticuerpos en las SeCe se reducía la posibilidad de protección frente a una nueva re-infección. Algo similar se ha observado en los anticuerpos sistémicos, Ho y colaboradores (2002) observaron que la persistencia conjunta de anticuerpos IgG e IgA reducía en un 53% el riesgo de re-infección.

Por otro lado se estudió un grupo de mujeres con EvGI que antes de la operación fueron positivas a la presencia de DNA. Después de la operación el 70% de las mujeres permanecieron infectadas y la proporción de mujeres con anticuerpos inhibitorios se vio reducida en un 58%. Estos datos parecieran contradecir nuestras observaciones anteriores, pues sugieren que la presencia de anticuerpos inhibitorios en mujeres previamente infectadas no disminuye el riesgo de adquirir una nueva infección. Una probable explicación es que los anticuerpos no son capaces de eliminar una infección establecida. Los anticuerpos solo pueden interactuar con los viriones cuando éstos se encuentran fuera de la célula, una vez que el virus ha infectado a la célula los anticuerpos no pueden interactuar con él. Para eliminar una célula infectada es necesario que se desarrolle una respuesta inmunológica celular, ya que solo los linfocitos T son capaces de destruirlas.

Ésta hipótesis es apoyada por trabajos previos en los que se observó que los anticuerpos locales IgA e IgG no son capaces de eliminar una infección establecida, sugiriendo que para ello es necesario una respuesta inmune celular (Bontkes et. al., 1999). En un trabajo posterior Nakagawa et. al., (2002) estudió un grupo de mujeres infectadas por VPH16 y encontró que al inicio de la infección el 50% de las mujeres presentó anticuerpos sistémicos anti-L1 y ninguna presentó linfocitos T citotóxicos (CTL), al cabo de unos meses las mujeres eliminaron la infección y todas presentaron anticuerpos y CTL's. Por otro lado Kawana et. al., (2002) encontró que en las lesiones de bajo grado de mujeres que presentaban anticuerpos neutralizantes en suero

poseían un menor número de copias de DNA viral que aquellas lesiones de mujeres que no poseían anticuerpos neutralizantes. Más aún, observaron que las lesiones con un bajo número de copias de DNA viral, podían revertir. Aún cuando estos datos parecen contradecir las observaciones previas, los autores no descartan la posibilidad de que la respuesta inmunológica celular podría ser indispensable para la eliminación de la infección.

De acuerdo a los estudios previos y a las observaciones obtenidas en nuestro estudio sugerimos que la respuesta humoral local podría estar jugando un papel primordial en el control de la infección al impedir una infección de novo o bien al evitar una re-infección por los virus producidos en las células infectadas. Sin embargo es necesario que conjuntamente se de la activación de una respuesta inmune celular para eliminar una infección establecida.

La mayoría de los trabajos serológicos del VPH se han enfocado al estudio de los anticuerpos sistémicos dejando de lado a los anticuerpos locales del cérvix. Sin embargo en los últimos años se ha reconsiderado la función que pueden tener los anticuerpos locales frente a la infección por VPH, ya que el sistema inmunológico de las mucosas es la primer línea de defensa contra patógenos que infectan los epitelios. En este trabajo hemos mostrado que los anticuerpos presentes en las secreciones cervicales de mujeres infectadas por VPH pueden inhibir la unión de VLP's de VPH16 a heparina, sentando el primer indicio del papel que pueden jugar los anticuerpos locales frente a la infección por VPH, el cual servirá de base para futuros estudios ya que la línea de investigación queda abierta.

8. CONCLUSIONES.

- Las mujeres infectadas por el virus del papiloma humano presentan anticuerpos locales capaces de inhibir la unión de VLP's de VPH16 a heparina.
- Mujeres negativas a la presencia de virus del papiloma humano presentan anticuerpos inhibitorios.
- Las mujeres infectadas por virus del papiloma humano diferente al tipo 16 presentan anticuerpos en secreciones cervicales capaces de inhibir la unión de VLP's de VPH16 a heparina.
- La existencia de anticuerpos inhibitorios previos a la infección reduce la probabilidad de adquirir una nueva infección. Por el contrario, la ausencia de anticuerpos inhibitorios incrementa el riesgo de adquirir una infección.

9. PERSPECTIVAS.

Los resultados obtenidos en este trabajo son prometedores, pues lo observado en nuestro sistema *in vitro*, podría estar reflejando lo que sucede *in vivo*. La línea de investigación continuará con la realización de los ensayos de infección, para determinar si los anticuerpos presentes en secreciones cervicales son capaces de inhibir la transferencia de genes por pseudoviriones. Más aún, dado que la respuesta inmunológica humoral actúa conjuntamente con la respuesta inmunológica celular para eliminar la infección, es necesario continuar con estudios de seguimiento analizando ambas respuestas inmunológicas para comprender los procesos involucrados en la respuesta fisiológica frente a la infección. Los resultados obtenidos podrán en un futuro, ser aplicados en el desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento y prevención de la infección por virus de papiloma humano.

10. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA.

- 📖 **Abbas, K., Lichtman, A. y Pober, J. 2000.** *Cellular and molecular immunology*. Saunders Company. Pp. 577.
- 📖 **Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. 2000.** *Molecular biology of the cell*. Garland Pubs. Pp. 1387.
- 📖 **Andersson-Ellström, A., Dillner, J., Hagmar, B., Schiller, J., Sapp, M., Forssman, L. y Milsom, I. 1996.** Comparison of development of serum antibodies to HPV16 and HPV33 and acquisition of cervical HPV DNA among sexually experienced and virginal young girls. A longitudinal cohort study. *Sex Transm Dis.* 23:234-238.
- 📖 **Barragan, A., Spillman, D., Carlson, J. y Walhlgren, M. 1999.** Role of glycans in *Plasmodium falciparum* infection. *Biochem Soc Trans.* 27:487-494.
- 📖 **Belting, M. 2003.** Heparan sulfate proteoglycan as a plasma membrane carrier. *TRENDS in Biochem Sci.* 28:145-151.
- 📖 **Bontkes, H., de Gruijl, T., Walboomers, J., Schiller, J., Dillner, J., Helmerhorst, T., Verheijen, R., Scheper, R. y Meijer, C. 1999.** Immune responses against human papillomavirus (HPV) type 16 virus like particles in a cohort study of women with cervical intraepithelial neoplasia. *J Gen Virol.* 80:409-417.
- 📖 **Bousarghin, L., Touzé, A., Combata-Rojas, A.-L. y Coursaget, P. 2003.** Positively charged sequences of human papillomavirus type 16 capsid proteins are sufficient to mediate gene transfer into target cells via the heparan sulfate receptor. *J. Gen. Virol.* 84: 157-164.
- 📖 **Breitbart, F., Kirnbauer, R., Hubbert, N., Nonnenmacher, B., Trin-Dinh-Desmaret, C., Orth, G., Schiller, J. y Lowy, D. 1995.** Immunization with virus like particles from cotton tail rabbit papillomavirus (CRPV) can protect against experimental CRPV infection. *J Virol.* 69: 3959-3963.
- 📖 **Brown, D., Bryan, J., Schroeder, J., Robinson, t., Fife, K., Wheeler, C., Barr, E., Smith, P., Chiacchierini, L., DiCello, A. y Jansen K. 2001.** Neutralization of human papillomavirus type 11 (HPV11) by serum from women vaccinated with yeast-derived HPV11 L1 virus like particles: correlation with competitive radioimmunoassay titer. *J Infect Dis.* 184:1183-1186.

- ☞ **Carter, J., Koutsky, A., Wipf, G., Christensen, D., Lee, S., Kuypers, J., Kiviat, N. y Galloway, D. 1996.** The natural history of human papillomavirus type 16 capsid antibodies among a cohort of university women. *J Infect Dis.* 174:927-936.
- ☞ **Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R., Fromm, J., Esjo, J., Linhardt, R. y Marks R. 1997.** Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med.* 3:866-871.
- ☞ **Christensen N., Kirnbauer, R., Schiller, J., Ghim, S., Shlegel, R., Jenson, A. y Kreider J. 1994.** Human papillomavirus types 6 and 11 have antigenically distinct strongly immunogenic conformationally dependent neutralizing epitopes. *Virology.* 205:329-335.
- ☞ **Christensen N., Reed, A., Cladel, N., Hall, K. y Leiserowitz, S. 1996.** Monoclonal antibodies to HPV6 L1 virus like particles identify conformational and linear neutralizing epitopes on HPV11 in addition to type specific epitopes on HPV6. *Virology.* 224:477-486.
- ☞ **Christensen N., Cladel, N., Reed, C., Budgeon, L., Embers, M., Skulsky, D., McClements, W., Ludmerer, S. y Jansen, K. 2001.** Hybrid papillomavirus L1 molecules assemble into virus like particles that reconstitute conformational epitopes and induce neutralizing antibodies to distinct HPV types. *Virology.* 291:324-334.
- ☞ **Combata, A., Touzé, A., Bousarghin, L., Sisarte, P., Muñoz, N. y Coursaget, P. 2001.** Gene transfer using human papillomavirus pseudovirions varies according to virus genotype and requires cell surface heparan sulfate. *FEMS Microbiology Letters* 204:183-188.
- ☞ **Combata, A., Bravo, M., Touze, A., Orozco, O., y Coursaget, P. 2002.** Serologic response to human oncogenic papillomavirus types 16, 18, 31, 33,39,58 and 59 virus like particles in colombian women with invasive cervical cancer. *Int J Cancer.* 97:796-803.
- ☞ **Compton, T., Nowlin, D. y Cooper N. 1993.** Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology.* 193:834-841.
- ☞ **Cooper, G. 2000.** *The cell a molecular approach.* ASM Press y Sinauer Associates Inc, Washington, 687pp.

- 📖 **Cubie, H., Plumstead, M., Zhang, W., de Jesus, O., Duncan, L. y Stanley, M. 1998.** Presence of antibodies to human papillomavirus-like particles (VLPs) in 11-13-year-old schoolgirls. *J. Med Virol* 56:210-216.
- 📖 **Dehecchi, M., Tamanini, A., Bonizzato, A. y Cabrini G. 2000.** Heparan sulfate glycosaminoglycans are involved in adenovirus type 5 and 2 host cell interactions. *Virology*. 268:382-390.
- 📖 **Dowe, G., Smikle, M., King, S., Wynter, H., Frederick, J. y Hylton, T. 1999.** High prevalence of genital Chlamydia trachomatis infection in women presenting in different clinical settings in Jamaica: implications for control strategies. *Sex Transm Infect.* 75:412-416.
- 📖 **Duggan, M., McGregor, G. y Stuart, L. 1998.** The natural history of CIN I lesions. *Eur J Gynaecol Oncol.* 19:338-344.
- 📖 **Dyson, N., Howell, P., Munger, K. y Harlow, E. 1989.** The human papillomavirus 16 E7 oncoprotein is able to bind the retinoblastoma gene product. *Science.* 243:934-937.
- 📖 **Einstein, M. y Goldberg, G. 2002.** Human papillomavirus and cervical neoplasia. *Cancer Investigation.* 20: 1080-1085.
- 📖 **Evander, M., Edlund, K., Gustafsson, A., Jonsson, M., Karlsson, R., Rylander, E. y Wadell, G. 1995.** Human papillomavirus infection is transient in young women: a population based cohort study. *J Infect Dis.* 171:1026-1030.
- 📖 **Evander, M., Frazer, I., Payne, E., Mei, Y., Hengst, K. y McMillan, N., 1997.** Identification of α_6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J. Virol* 71:2449-2456.
- 📖 **Flint, S., Enquist, L., Krug, R., Racaniello, V. y Skalka, A. 2000.** *Principles of virology.* ASM Press y Sinauer Associates Inc. Washington. Pp. 804.
- 📖 **Germi, R., Crance, J., Garin, D., Guimet, J., Lortat-Jacob, H., Ruigrok, R., Zarski, J. y Drouet, E. 2002.** Heparan sulfate mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. *Virology.* 292:162-168.
- 📖 **Giroglou, T., Florin, L., Schäfer, F., Streeck, R. y Sapp, M., 2001.** Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J. Virol* 75:1565-1570.
- 📖 **Hagensee, M., Koutsky, L., Lee, SK., Grubert, T., Kuypers, J., Kiviat, N. y Galloway, D. 2000.** Detection of cervical antibodies to human papillomavirus type 16 (HPV16) capsid

antigens in relation to detection of HPV16 DNA and cervical lesions. *J Infect Diseases*. 181:1234-1239.

- 📖 **Halpert, R., Fruchter, R., Sedlis, A., Butt, K., Boyce, J. y Sillman, F. 1986.** Human papillomavirus and lower genital neoplasia in renal transplant patients. *Obstetrics and Gynecology*. 68:251-258.
- 📖 **Ho, G., Bierman, R., Beardsley, L., Chang, C. y Burk, R. 1998.** Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med*. 338:423-428.
- 📖 **Ho, G., Studentsov, Y., Hall, C., Bierman, R., Beardsley, L., Lempa, M. y Burk, R. 2002.** Risk factors for subsequent cervicovaginal human papillomavirus infection and the protective role of antibodies to HPV16 virus like particles. *J Infect Dis*. 186:737-742.
- 📖 **Hofmann, K., Cook, J., Joyce, J., Brown, D., Schulz, L., George, H., Rosolowsky, M., Fife, K. y Jansen, K. 1995.** Sequence determination of human papillomavirus 6 and assembly of virus like particles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Virology*. 209: 506-518.
- 📖 **Horowitz, A. y Simons, M. 1998.** Phosphorylation of the cytoplasmic tail of syndecan-4 regulates activation of protein kinase $C\alpha$. *J Biological Chem*. 273:25548-25551.
- 📖 **Jacobson, D., Peralta, L., Farmer, M., Graham, N., Gaydos, C. y Zenilman, J. 2000.** Relationship of hormonal contraception and cervical ectopy as measured by computerized planimetry to chlamydial infection in adolescents. *Sex Transm Dis*. 27:313-319.
- 📖 **Joyce, J., Tung, J., Przysiecki, C., Cook, J., Lehman, E., Sands, J., Jansen, K. y Keller, P. 1999.** The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus like particles interacts with heparin and cell surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J. Biol. Chem*. 274: 5810-5822.
- 📖 **Karlsen, F., Kalantari, M., Jenkins, A., Pettersen, E., Kristensen, G. y Holm, R. 1996.** Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of human papillomavirus. *J Clin Microbiol*. 34:2095-2100.
- 📖 **Kawana, K., Yoshikawa, H., Taketani, Y., Yoshiike, K. y Kanda, T. 1998.** In vitro construction of pseudovirions of human papillomavirus type 16: incorporation of plasmid DNA into reassembled L1/L2 capsids. *J Virol*. 72:10298-10300.
- 📖 **Kawana, K., Yasugi, T., Kanda, T., Kawana, Y., Hirai, Y., Yoshikawa, H. y Taketani, Y. 2002.** Neutralizing antibodies against oncogenic human papillomavirus as a possible

- determinant of the fate of low grade cervical intraepithelial neoplasia. *Biochem Biophys Res Commun.* 296:102-105.
- ☞ **Kaye, J., Cason, J., Pakarian, F., Jewers, R., Kell, B. y Bible, J. 1994.** Viral load as a determinant for transmission of human papillomavirus type 16 from mother to child. *J Med Virol.* 44:415-421.
- ☞ **Kirnbauer, R., Boy, F., Cheng, N., Lowly DR. y Schiller, J. 1992.** Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus like particles that are highly immunogenic. *Proct Natl Acad Sci.* 89:12180-12184.
- ☞ **Kirnbauer, R., Hubbert, N., Wheeler, C., Lowy, D. y Schiller, J. 1994.** A virus like particle ELISA detects serum antibodies in a majority of womwn infected with human papillomavirus type 16. *J Natl Cancer Inst.* 86:498-598.
- ☞ **Kjaer, S., Chackerian, B., van der Brule, A., Svare, E., Paull, G. y Walbomers, J. 2001.** High risk human papillomavirus is sexually transmitted: evidence from a follow-up study of virgins starting sexual activity (intercourse). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 10:101-106.
- ☞ **Laga, M., Icenogle, J., Marsella, R., Manoka, A., Nzila, N., Ryder, R., Vermund, S., Heyward, W., Nelson, A. y Revé, W. 1992.** Genital papillomavirus infection and cervical dysplasia: opportunistic complications of HIV infection. *Inter J Cancer.* 48:682-688.
- ☞ **Laimins, L. 1993.** The biology of human papillomaviruses: from warts to cancer. *Infectious Agents and Disease.* 2: 74 – 86.
- ☞ **Le-Cann, P., Touze, A., Enogat, N., Leboulleux, D., Mougín, C., Legrand, MC., Calvet, C., Afoutou, JM. y Coursaget, P. 1995.** Detection of antibodies against human papillomavirus (HPV) type 16 virions by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant HPV16L1 capsids produced by recombinant baculovirus. *J Clin Microbiol.* 33:1380-1382.
- ☞ **Li, M., Cripe, T., Estes, P., Lyon, M., Rose, R. y Garcea, R. 1997.** Expresión of the human papillomavirus type 11 L1 capsid protein in Escherichia coli: characterization of protein domains involved in DNA binding and capsid assembly. *J Virol.* 71:2988-2995.
- ☞ **Manos, M., Ting, Y., Wright, D., Lewis, A., Broker, T. y Wolinski, S. 1989.** The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus. *Cancer Cell.* 7:209-214.

- 📖 **Müller, M., Gissmann, L., Cristiano, R., Sun, X., Frazer, I., Jenson, A., Alonso, A., Zentgraf, H. y Zhou, J. 1995.** Papillomavirus capsid binding and uptake by cells from different tissues and species. *J Virol.* 69:948-954.
- 📖 **Munger, K y Phelps, W. 1993.** The human papillomavirus E7 protein as a transforming and transactivating factor. *Biochem Biophys Acta.* 1155:111-123.
- 📖 **Moscicki, A., Ma, Y., Holland, C. y Vermund, S. 2001.** Cervical ectopy in adolescent girls with and without human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis.* 267:2493-2496.
- 📖 **Nakagawa, M., Viscidi, R., Deshmukh, I., Costa, M., Palefsky, J., Farhat, S. y Moscicky, A. 2002.** Time course of humoral and cell mediated immune responses to human papillomavirus type 16 in infected women. *Clin Diagn Lab Immunol.* 9:877-882.
- 📖 **Rapraeger, A. 1995.** In the clutches of proteoglycans:how does heparan sulfate regulate FGF binding?. *Chem Biol.* 10:620-628.
- 📖 **Rapraeger, A. 2000.** Syndecan regulated receptor signaling. *J Cell Biol.* 149:995-997.
- 📖 **^aRocha-Zavaleta, L., Yescas, G., Cruz, R. y Cruz, F. 2003.** Human papillomavirus infection and cervical ectopy. *Int J Gynecol Obstetrics.*
- 📖 **^bRocha-Zavaleta, L., Pereira, A., Yescas, G., Cruz, R., García, A. y Cruz F. 2003.** Mucosal IgG and IgA responses to human papillomavirus type 16 capsid proteins in HPV16 infected womwn without visible pathology. *Viral Immunology.* 16:159-168.
- 📖 **Roden, R., Yutzy, W., Fallon, R., Inglis, S., Lowy, D. y Schiller, J. 2000.** Minor capsid protein of human genital papillomavirus contains subdominant cross-neutralizin epitopes. *Virol.* 270: 254-257.
- 📖 **Rose, R., Bonnez, W., Reichman, R. y Garcea, L. 1993.** Expresión of human papillomavirus type 11 L1 protein in insect cells: in vivo and in vitro assembly of virus like particles. *J Virol.* 67:1936-1944.
- 📖 **Rose, R., White, W., Li, M., Suzich, J., Lane, C. y Garcea, R. 1998.** Human papillomavirus type 11 recombinant L1 capsomeres induce virus-neutralizing antibodies. *J Virol.* 72:6151-6154.
- 📖 **Sancllemente, G. y Gill, DK. 2002.** Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. *JEADV.* 16: 231-240.

- 📖 **Sasagawa, T., Steers, G., Gschmeissner, S., Hajibagheri, M., Finch, J., Crawford, L. y Tomassino, M. 1995.** Synthesis and assembly of virus like particles of human papillomavirus type 6 and type 16 in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Virology*. 209:506-518.
- 📖 **Sasagawa, T., Inoue, M., Lehtinen, M., Zang, W., Gschmeissner, S. y Hajibagheri, M. 1996.** Serological responses to human papillomavirus type 6 and 16 virus like particles in patients with cervical neoplastic lesions. *Clin Diagn Lab Immunol*. 3:403-410.
- 📖 **Sasagawa, T., Yamazaki, H., Dong, YZ., Satake, S., Tateno, M., e Inoue, M. 1998.** Immunoglobulin-A and G responses against virus like particles (VLP) of human papillomavirus type 16 in women with cervical cancer and cervical intraepithelial lesions. *Int J Cancer*. 75: 529-535
- 📖 **Sasagawa, T., Rose, R., Azar, K., Sakai, A. y Inoue, M. 2003.** Mucosal immunoglobulin A and G responses to oncogenic human papillomavirus capsids. *Int J Cancer*. 104:328-335.
- 📖 **Scheffner, M., Werbes, B., Huibregtse, J., Levine, A. y Howell, P. 1990.** The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*. 63:1129-1136.
- 📖 **Schulz, J., Annaert, W., Vandekerckhove, J., Zimmermann, P., Strooper, B. y David, G. 2003.** Syndecan 3 intramembrane proteolysis is presenilin/γsecretase dependent and modulates cytosolic signaling. *J Biological Chem*. 278:48651-48657.
- 📖 **Secchiero, P., Sun, D., de Vico, A., Growley, R., Reitz, M., Zauli, G., Lusso, P. y Gallo, R. 1997.** Role of the extracellular domain of human herpesvirus 7 glycoprotein B in virus binding to cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Virol*. 71:4571-4580.
- 📖 **Selinka, HC., Giroglou, T. y Sapp, M. 2002.** Analysis of the infectious entry pathway of human papillomavirus type 33 pseudovirions. *Virology*. 299:279-287.
- 📖 **Shafti-Keramati, S., Handisurya, A., Kriehuber, E., Meneguzzi, G., Slupetzki, K. y Kirnbauer, R. 2003.** Different heparan sulfate proteoglycans serve as a cellular receptors for human papillomaviruses. *J Virol*. 77:13125-13135.
- 📖 **Simons, M. y Horowitz A. 2001.** Syndecan 4 mediated signalling. *Cellular Signalling*. 13:855-862.
- 📖 **Spear, P. 1993.** Entry of alphaherpes viruses into cells. *Semin Virol*. 4:167-180.

- ☞ **Spillmann, D. 2001.** Heparan sulfate: Anchor for viral intruders? *Biochimie*. 83:811-817.
- ☞ **SSA.** Programa de control y detección del cáncer cervico-uterino. **2002.**
www.ssa.gob.mx
- ☞ **Syrjanen, K., Kataja, V., Yliskoski, M., Chang, F., Syrjanen, S. y Saarikoski, S. 1992.** Natural history of cervical human papillomavirus lesions does not substantiate the biologic relevance of the Bethesda system. *Obstet Gynecol*. 79:675-682.
- ☞ **Taraktchoglou, M., Pacey, A., Turnbull, J. y Eley, A. 2001.** Infectivity of *Chlamydia trachomatis* serovar LGV but not E is dependent on host cell heparan sulfate. *Infect Immunol*. 69:968-976.
- ☞ **Tindle, R. 2002.** Immune evasion in human papillomavirus associated cervical cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2: 1-7.
- ☞ **Touzé, A. y Coursaget, P. 1998.** In vitro gene transfer using human papillomavirus virus like particles. *Nucleic Acids Res*. 26:1317-1324.
- ☞ **Ugolini, S., Mondor, I. y Sattentau, Q. 1999.** HIV-1 attachment: another look. *Trends Microbiol*. 7:144-149.
- ☞ **Unckell, F., Streeck, R. y Sapp, M. 1997.** Generation of pseudovirions of human papillomavirus type 33. *J Virol*. 71:2934-2939.
- ☞ **Wang, Z., Hansson, B., Forslund, O., Dillner, L., Sapp, M., Schiller, J., Bjerre, B. y Dillner, J. 1996.** Cervical mucus antibodies against human papillomavirus type 16, 18 y 33 capsids in relation to presence of viral DNA. *J Clin Microbiol*. 34:3056-3062.
- ☞ **Wang, Z., Kjellberg, L., Abdalla, H., Wiklund, F., Eklund, C., Knekt, P., Lehtinen, M., Kallings, I., Lenner, P., Hallmans, G., Mählck, C. Wadell, G., Schiller, J. y Dillner, J. 2000.** Type specificity and significance of different isotypes of serum antibodies to human papillomavirus capsids. *J Infec Diseases*. 181:456-462.
- ☞ **Werness, B., Levine, A. y Howell, P. 1990.** Association of human papillomavirus type 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*. 248:76-79.
- ☞ **White, W., Wilson, S., Palmer-Hill, F., Woods, R., Ghim, S., Hewitt, L., Goldman, D., Burke, S., Jenson, A., Koeing, S. y Suzich, J. 1999.** Characterization of a major neutralizing epitope on human papillomavirus type 16 L1. *J Virol*. 73:4882-4889.

- 📖 **Xiaojiang, S., Garcea, R., Goldberg, I., Casini, G., Harrison, S. 2000.** Structure of small virus like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol Cell.* 5:557-567.
- 📖 **Xiaojiang, S., Casini, G., Harrison, S. y Garcea, R. 2001.** Papillomavirus capsid protein expression in Escherichia coli: purification and assembly of HPV11 and HPV16 L1. *J Mol Biol.* 307:173-182.
- 📖 **Yoon, C.-S., Kim, K.-D., Park, S.-N. y Cheong, S.-W., 2001.** α_6 integrin is the main receptor of human pallomavirus type 16 VLP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283: 668-673.
- 📖 **Zhu, Z., Gershon, m., Ambron, R., Gabel, C. y Gershon, A. 1995.** Infection of cells by varicela zoster virus: inhibition of viral entry by mannose6-phosphate and heparin. *Proc Natl Acad Sci.* 92:3546-3550.
- 📖 **Zimmermann, P. y David G. 1999.** The syndecans, tuners of transmembrane signaling. *FASEB.* 13:S91-S100.

11. APÉNDICE.

A.1. PBS

8g de NaCl (Cloruro de sodio)
0.2g de KCl (Cloruro de potasio)
1.44g de Na₂HPO₄ (Fosfato dibásico de sodio)
0.24g de KH₂PO₄ (Fosfato monobásico de potasio)

Diluidos en 800ml de agua destilada. Ajustar el pH a 7.4 con HCl. Aforar a 1L y esterilizar 20 minutos a 15lb/sq en ciclo líquido. Se sella la boquilla del recipiente con parafilm y se almacena a 4°C.

A.2 Medio de congelación.

Para la línea celular Sf9:

60% de medio GRACE'S
30% de Suero fetal de bovino (SFB)
10% Dimetilsulfóxido (DMSO)

Se esteriliza por filtración y se sella la boquilla del recipiente con parafilm. Se almacena a 4°C.

A.3 Solución PBS-BSA

20gr BSA (Albumina)
Diluidos en 1L de PBS (1X). Se almacena a 4°C.

A.4 Solución Agua-Tween 20

En 900 ml de agua bidestilada se diluyen 500µl de Tween 20 y se afora a 1L. Se almacena a 4°C.

A.5 Solución TBS-T (TBS-Tween)

TBS

6.5g Tris base

8.7g NaCl

Diluidos en agua bidestilada, se ajusta el pH a 7.6 y se afora a 1 litro. Se almacena a 4°C.

En 900 ml de TBS se adicionan 100 µl de Tween 20, se afora a 1L y se almacena a 4°C.

A.6 Solución TBS-T-BSA (TBS-Tween 20-BSA).

20gr BSA

Diluidos en 1L de la solución TBS-T. Se almacena a 4°C.

A.7 Solución de dietanolamina

En 800 ml de agua bidestilada se diluyen 100 ml de dietanolamina. Se ajusta el pH a 9.8 y se afora a 1L. Se almacenan a 4°C.

A.8 Solución de hidróxido de sodio 1M.

39.99 gr de NaOH

Diluidos en 1L de agua bidestilada.