



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA

**Detección de anticuerpos contra péptidos de la
proteína L1 de HPV-16 y HPV-18 en pacientes
con Infección del Virus del Papiloma Humano.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
GONZALEZ CASTELLANOS MARTHA NANCY

DIRECTOR DE TESIS: Dr. ALBERTO MONROY GARCIA

LABORATORIO DE INMUNOBIOLOGIA

MEXICO, D. F. 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

- Con todo cariño y amor le agradezco y dedico esta tesis a mi madre pues sin su apoyo incondicional, consejos y sobre todo que estuvo siempre a mi lado en una etapa muy difícil en mi vida, le doy las gracias por todo el tiempo que me dedico en escucharme y en darme ánimos para seguir adelante, gracias por todos los sacrificios que hiciste para que yo pudiera realizar todos mis sueños y ver la culminación de mis estudios profesionales, así también, por impulsarme a ser una persona triunfadora en todos los aspectos de la vida.
- A mi hermana: Gracias por brindarme todo tu cariño y confianza, gracias por interesarte por lo que pienso y soy, además, por apoyarme y saber que cuento contigo en todo momento.
- A Manuel: Le agradezco por los consejos que me dio, por involucrarse en mis triunfos y fracasos y por hacerme reflexionar en algunos aspectos de mi vida.
- A Arturo: Gracias por brindarme, tu confianza, tu tiempo, por escucharme, por todo y por estar conmigo en este tiempo y espacio.
- A todos los integrantes del Laboratorio de Inmunobiología: En especial, al Dr. Alberto Monroy García, Dra. Maria de Lourdes Mora García, al M en C. Jorge Hernández Montes les agradezco por brindarme toda la confianza, tolerancia, apoyo, amistad, así como por compartir conmigo sus experiencias como profesionales al igual de todos sus conocimientos para la elaboración de esta tesis, ¡muchas gracias!.
- A la Dra. Leticia Rocha Zavaleta del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, le agradezco por apoyarme en el trabajo experimental de la tesis, por darme algunos tips para el desarrollo de la misma, por su confianza, amabilidad, así como, por otorgarme las facilidades para que realizara algunos experimentos en el instituto. Gracias por todo.
- Al M en C. Carlos Bautista Reyes y Biólogo Carlos Martínez Montoya les agradezco por su participación como mis sinodales, por la aportación de sus conocimientos al trabajo de esta tesis y por el apoyo que me brindaron durante la carrera.
- A mis amigos (ustedes saben quienes son), muchas gracias por estar a mi lado a lo largo de mi carrera por sus consejos por brindarme su amistad y por los detalles que siempre tuvieron conmigo O.K.

Este trabajo fue financiada por los proyectos:

CONACYT con clave 47615-Q, DGGAPA-PAPIIT con clave IN212506-3 y DGGPA-PAPIIT con clave IN215703.

La inteligencia no se mide por cuantas operaciones o calculos puedo hacer, la inteligencia se mide por la creatividad y la imaginación de cada persona lo demás solo es memoria....

INDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Marco Teórico	5
3.1. Sistema Inmune	5
3.1.1. Principios de Inmunidad	5
3.1.2. Inmunidad Innata	5
3.1.3. Inmunidad Adaptativa	6
3.1.4. Ontogenia de Linfocitos B	6
3.1.5. Linfocitos B	7
3.1.6. Inmunidad Humoral	8
3.1.7. Inmunidad mediada por células	9
3.2. Procesamiento y presentación de antígenos por moléculas MHC	10
3.3. Cáncer cérvico uterino y su etiología con el Virus del Papiloma Humano	11
3.3.1. Etiología del CaCu	11
3.4. Estructura y nomenclatura del virus del HPV	12
3.5. Infección por HPV y expresión de sus genes	13
3.6. Ciclo de replicación de HPV	16
3.7. Estructura y función de la proteína L1 de HPV	18
3.8. Respuesta Inmune Humoral hacia la proteína de la cápside	20
3.9. Inmunización con VLP's	20
3.10. Detección de anticuerpos dirigidos hacia la proteína L1 su utilidad en el diagnostico de la enfermedad	21
4. Planteamiento del Problema	22
5. Hipótesis	23
6. Objetivos	24
6.1. Objetivo General	24
6.2. Objetivos Particulares	24
7. Materiales y Métodos	25
7.1. Péptidos de la proteína L1	25
7.2. Obtención de anticuerpos específicos a los péptidos	28
7.3. Obtención de muestras biológicas	28
7.4. Tipificación de HPV en las muestras	29
7.5. Digestión del producto de PCR	30
7.6. Ensayo de ELISA	31
8. Análisis de los datos	32
8.1. Análisis estadístico	32
9. Resultados	33

9.1. Títulos de anticuerpos específicos a los péptidos obtenidos de los ratones

inmunizados	33
9.2. Tipificación de HPV	34
9.3. Detección de anticuerpos contra los péptidos de la proteína L1 en el suero de pacientes con infección por HPV (IHPV) y con cáncer cérvico-uterino CaCu	37
9.3.1. Péptidos derivados de la proteína L1 de HPV- 16	38
9.3.2. Péptidos derivados de la proteína L1 de HPV- 18	42
10. Discusión	46
11. Conclusiones y perspectivas	49
12. Apéndice	50
13. Bibliografía	51

1. RESUMEN

El Cáncer Cérvico Uterino es uno de los cánceres más comunes en la mujer, cerca de 250 000 mujeres mueren cada año. Estudios epidemiológicos han demostrado que los virus de papiloma humano de alto riesgo, como el HPV-16 y 18 están asociados con el desarrollo del cáncer cervical. La infección persistente por HPV frecuentemente induce una respuesta inmune mediada por anticuerpos hacia la proteína L1, principal constituyente de la cápside viral. Estos anticuerpos pueden reconocer sitios conformacionales o secuencias cortas lineales (péptidos) expuestas en la superficie del virión. En este estudio se analizó la presencia de anticuerpos IgG específicos contra péptidos altamente conservados entre las secuencias de la proteína L1 de HPV-16 y 18 en sueros de mujeres positivas a infecciones por HPV de alto riesgo y de pacientes con cáncer cérvico-uterino.

A través de ensayos de ELISA, se evaluó la reactividad de anticuerpos presentes en sueros de pacientes con infección por virus de papiloma humano (IVPH) y pacientes con cáncer cérvico-uterino (CaCu), hacia 4 péptidos de la proteína L1 de HPV-16: P1 (FLLQAGLKA), P2 (GLQYRVFRI), P6 (KYTFWEVNL) y P10 (IHSMNSTIL) y 4 péptidos de la proteína L1 de HPV-18, P13 (QLFNKPYWL), P14(SLVDTYRFV), P21(APAENKDPY) y P23(IHSMNSSIL).

En el grupo de mujeres con IVPH, la mayor respuesta encontrada fue dirigida hacia los péptidos P6, P10, P13 y P23 con frecuencias de 28/29, 28/29, 23/29 y 25/29 pacientes y absorbancias medias de 1.5, 2.3, 1.7 y 1.6 respectivamente, los cuales fueron significativamente diferentes a los valores dados por mujeres sanas normales ($p < 0.05\%$). En el grupo de pacientes con CaCu la mayor respuesta fue hacia los péptidos P2, P6 y P10 con frecuencias de 14/25, 21/25 y 23/25 pacientes positivas; las absorbancias medias de anticuerpos hacia el péptido P10 fue de 1.5, mientras que para los péptidos P2 y P6 fue menor a 0.7. Tomando en consideración estos datos, el péptido P10 (IHSMNSTIL) al igual que los péptidos P6, P13 y P23, pertenecientes a las regiones $\alpha 2$ - $\alpha 3$ (P10, P23) y $\alpha 5$ (P6 y P13) que conforman rizos expuestos en la estructura de la proteína L1 de HPV-16 y 18, representan determinantes antigénicos de reconocimiento por anticuerpos en mujeres con infección por HPV de alto riesgo. El uso de estos péptidos en la detección de anticuerpos específicos a infecciones producidas por HPV's de alto riesgo, sería de gran relevancia en el diagnóstico temprano de la enfermedad, por lo que es necesario ampliar el estudio a un mayor número de muestras para la validación del método.

2. INTRODUCCION

El cáncer del cervix o cáncer cérvico-uterino (CaCu) es uno de los principales problemas de salud pública a nivel global, en el año 2000 ocurrieron aproximadamente 4700,000 casos en el mundo, de los cuales cerca de 380,000 ocurrieron en países poco desarrollados (Wang, 2002). Se calculan cerca de 200,000 muertes anuales debidas a esta enfermedad, de las cuales, aproximadamente el 78% ocurren en los países pobres, la cual va en aumento (Parkin *et al*, 1999). El CaCu es el más común entre las mujeres de los países del tercer mundo, incluido México (SSA, 2004).

Múltiples estudios epidemiológicos han demostrado que el virus del papiloma humano (HPV) es la causa necesaria para el desarrollo del CaCu, en donde se ha logrado demostrar la presencia del virus en el 99.8% de los casos de CaCu (Parkin *et al*, 1999). El grupo de los virus de papiloma humano (HPV) esta constituido por aproximadamente 100 variantes que difieren significativamente respecto de su importancia para el desarrollo del cáncer cérvico uterino (Zur Hausen, 2002). La neoplasia del cervix así como la del cuello del útero en sus diferentes estadios se han asociado a los tipos de HPV16, 18, 31, 33, 35,39 45, 51, 52 y 56 la presencia de estos virus en Neoplasias Intraepiteliales del Cervix (NIC) favorecen su progresión a cáncer invasor (Zur Hausen, 2002). Otros tipos de HPV pueden inducir lesiones cutáneas que van desde verrugas hasta cáncer en la piel. En los países en vías de desarrollo, en forma semejante a la tendencia mundial el tipo 16 se encuentra en aproximadamente el 50% de los casos de CaCu, y el tipo18 en aproximadamente el 12% (Muñoz y Bosch 1997).

La familia *Papovaviridae* está constituida por un grupo heterogéneo de virus. Hasta el presente han sido identificados 77 genotipos diferentes de *Papillomavirus* en humanos. En la actualidad se ha podido determinar de forma parcial la secuencia de aproximadamente 30 tipos adicionales de *Papillomavirus* humanos (HPV), lo cual sugiere la existencia de un número total de 100 genotipos de HPV. De los 77 tipos cuyas secuencias han sido estudiadas por completo, más de 40 infectan la mucosa cervical y representan un grupo importante de patógenos que producen enfermedades de origen epitelial (Zur Hausen, 2002).

Una de las más fuertes evidencias de la función que desempeña este virus en la carcinogénesis lo constituye la presencia del ADN viral en más del 90 % de los carcinomas celulares escamosos del tracto genital (Walboomers *et al*, 1999). Se reconoce la vía sexual como la más común de diseminación del virus (Bosch *et al*, 1995).

El genoma viral está dividido en tres partes: 1) una región no-codificante, la región larga de control (LCR), la cual abarca del 7 al 11 % del genoma; 2) la región temprana (E, early), que es aproximadamente el 50% del genoma y la cual codifica para proteínas capaces de interactuar con proteínas celulares regulando positivamente la división celular (E6, E7, E5). Esta región también codifica a proteínas involucradas en la regulación de la replicación y transcripción del genoma viral (E1, E2), así como proteínas que regulan la replicación viral (E4); 3) la región tardía (L late) codifica para las proteínas de la cápside, la proteína mayor L1 que constituye a los capsómeros y comprende más de 90% de las proteínas del virión y la proteína menor L2 (Granoff y Webster, 1999).

La penetración del genoma viral en la célula del epitelio inducen mutaciones que se replican en generaciones celulares sucesivas, favorecidas por una serie de cofactores (factores de huésped como los tipos de antígenos de histocompatibilidad y de respuesta inmunológica), y que pueden desencadenar el fenómeno neoplásico con capacidad invasora (Alonso *et al*, 2000).

La infección del cuello uterino por HPV puede ser asintomática o provocar una serie de manifestaciones que varían desde la presencia de condilomas benignos hasta la ocurrencia de alteraciones displásicas de diferentes grados y cáncer. La distinción de los diferentes estadios patológicos tiene un alto valor pronóstico ya que mientras los condilomas casi siempre permanecen como lesiones benignas, las neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) tienen una alta potencialidad de progresar al cáncer invasivo (Karlsen *et al*, 1995).

Debido a la falta de un sistema celular susceptible para el aislamiento e identificación del virus y a la ausencia de pruebas serológicas adecuadas, el diagnóstico de la infección por HPV ha estado basado fundamentalmente en la detección del ácido nucleico viral (Venuti *et al*, 1995). Desde la introducción de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como nueva técnica para el diagnóstico, el estudio y análisis del ADN sufrió un vuelco tanto a nivel clínico como de investigación (Jacobs *et al*, 1995).

La proteína principal de la cápside L1 de los HPV, se autoensambla y conforma partículas semejantes a virus (VLP) compuestas por 72 pentámeros de L1 y organizadas en una estructura icosaédrica (Chen *et al*, 2000). En humanos, se ha demostrado la presencia de anticuerpos específicos o de reacción cruzada contra los VLP's (virus like particles) estos parecen ser excelentes candidatos para vacunas del papilomavirus (Combata *et al*, 2003).

De 50 a 60% de las mujeres infectadas con HPV tienen anticuerpos contra HPV-16 (VLP). A diferencia de otros tipos, los HPV-16 tienen algunas variantes y serológicamente presentan reacción cruzada (Yamada, 1995).

Estudios de seroreactividad contra las VLP de los HPV sugieren que anticuerpos contra la capsida; son inducidos durante infecciones severas o persistentes de HPV, y se pierden levemente después de que pasa la infección productiva (Carter *et al*, 2000).

La infección genital por HPV frecuentemente induce anticuerpos mediante una respuesta inmune (Wang *et al*, 1996; Carter *et al*, 2000; Rocha *et al*, 2003). La L1 es un blanco importante para el sistema inmune en ensayos inmunológicos basados sobre la cápsida de HPV, se han detectado anticuerpos restringidos, principalmente a epítopes conformacionales. Interesantemente la cápsida de HPV-16 revela que no solo tipo-restringido sino que también tipo-común de epítopes antigénicos (Heino *et al*, 1995). De esta manera, también se ha encontrado una extensa reacción cruzada de anticuerpos específicos que reaccionan contra péptidos de la secuencia de la proteína L1 en los tipos de HPV de alto y bajo riesgo (LeCann *et al*, 1995).

Por lo tanto la naturaleza de este proyecto es aplicada, ya que se evalúa la detección de anticuerpos contra péptidos que se encuentran en la región semiconservada de la proteína L1 de HPV16 y 18 y la cual es la superficie de contacto con otros monómeros de la L1, en consecuencia este sitio es importante para el ensamble de la capsida viral y es un sitio conservado relativamente entre los diferentes tipos de HPV de alto riesgo (Rocha *et al*, 2004).

Recientemente nuestro grupo de investigación ha identificado un péptido encontrado en una región semiconservada, $\alpha 2$ - $\alpha 3$, de la proteína L1 de HPV-16 y 18; y de otros HPV de alto riesgo el cual permite detectar anticuerpos específicos en mujeres con infección por HPV de alto grado (Rocha Zavaleta *et al*, 2004).

Considerando que la proteína L1 de HPV constituye la vía de entrada del virus a la célula huésped, debido a que forma parte de la cápsida viral y que tiene un papel importante en el inicio de la infección en el epitelio cervical y en la propagación de la enfermedad, en el presente trabajo, pretendemos identificar si dentro de estas regiones semiconservadas ($\alpha 1$ - $\alpha 5$) de la proteína L1 de HPV-16 y 18 hay péptidos antigénicos que permitan la detección de anticuerpos específicos en sueros de pacientes con Infección del Virus del Papiloma Humano (IVPH) de alto riesgo.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. SISTEMA INMUNE

3.1.1. Principios de inmunidad

La inmunidad (de la palabra latina *inmunitas*) significa protección frente a la enfermedad infecciosa (Abbas *et al*, 2004). Los seres superiores defienden constantemente su integridad biológica frente a agresiones, procedentes del exterior así como del propio organismo. De no ser así, morirían como consecuencia de tumores e infecciones de bacterias, virus, hongos, etc. Para que estos fenómenos de defensa se lleven a cabo, los organismos disponen de un conjunto de elementos especiales, conocido como *sistema inmune*. La capacidad de defensa se adquiere antes de nacer y se madura y consolida en los primeros años de la vida fuera del seno materno. Los sistemas inmunitarios más complejos estructural y funcionalmente son los de los mamíferos (Roitt *et al*, 2003). La inmunidad es mediada por una variedad de diferentes células y moléculas que son responsables de dos diferentes, pero interrelacionadas, formas de inmunidad: la inmunidad innata y adaptativa.

3.1.2. Inmunidad Innata

Los sistemas de defensa con reconocimiento no clonal son llamados inmunidad innata, debido a que todas las células que se diferencian de la célula progenitora tienen la misma capacidad de respuesta, la cual no se adapta o cambia a una particular infección (Austyn *et al*, 1993). El sistema inmune innato incluye un grupo de leucocitos llamados fagocitos, el cual comprende al linaje monocito-macrófago y a los polimorfonucleares o granulocitos (neutrófilos, basófilos y eosinófilos). Asimismo, también incluye a otro grupo de células llamadas asesinas naturales que son capaces de destruir a células infectadas con virus, a células embrionarias o células tumorales. Aunado a ello, el sistema innato también incluye megacariocitos que producen plaquetas, las cuales están involucradas en la coagulación sanguínea y en la respuesta inflamatoria, la cual frecuentemente ocurre cuando hay alguna infección, conduciendo a los síntomas clásicos del dolor, calor, enrojecimiento e hinchazón. Los principales tipos celulares vistos en la respuesta inflamatoria en su fase inicial son los neutrófilos, seguidos por los macrófagos (Ratcliffe *et al*, 1998; Van Furth, 1993).

El sistema inmune innato por medio de los fagocitos es la primera línea de defensa contra muchos de los microorganismos más comunes y son tan esenciales para el control de las infecciones más comunes ocasionadas por bacterias (Janeway, 1997).

3.1.3. Inmunidad adaptativa

El sistema inmune innato provee la primera línea de defensa contra muchos de los microorganismos más comunes, sin embargo esta no siempre elimina la infección y no puede reconocer a muchos patógenos. Cuando la primera línea de defensa fracasa, entran en acción los linfocitos del sistema inmune adaptativo, compuestos por linfocitos T y B, éste se caracteriza por la especificidad celular y la generación de memoria para contrarrestar el efecto del patógeno en un segundo ataque, desarrollando varias formas de defensa y que también provee un incremento en el nivel de protección de una subsiguiente reinfección con el mismo patógeno (Janeway *et al*, 1997; Roitt *et al*, 2003). La activación de los linfocitos depende, críticamente de su interacción con células fagocíticas quienes además de procesar, muestran fragmentos de antígenos a los linfocitos (Abbas *et al*, 2004). Por tanto, los millones de linfocitos en el organismo pueden dar lugar a millones de especificidades y solo aquel linfocito que encuentra un antígeno para el cual su receptor se une, será activado a proliferar y diferenciarse a células efectoras. Por lo tanto la especificidad dada en la respuesta inmune adaptativa se basa en la teoría de la selección clonal propuesta por McFarlane Burnet. La respuesta inmune adaptativa esta dada por dos vías de reconocimiento antigénico llevadas a cabo por los linfocitos B y T, los cuales confieren la inmunidad humoral y celular respectivamente (Roit *et al*, 2003).

3.1.4. Ontogenia de linfocitos B

La médula ósea, durante el desarrollo fetal, libera a la sangre linfocitos no diferenciados (pre linfocitos). La mitad llega al timo donde se diferencian en linfocitos T. Algunos de estos salen a la circulación donde van a conformar el 70-80% de los linfocitos circulantes. La otra mitad de los prelinfocitos se queda en la médula ósea y maduran en linfocitos B, parte de estos salen a la sangre, donde pasan a formar el 20-30% de los linfocitos circulantes y el resto se aloja en los tejidos linfáticos (Abbas *et al*, 2004).

Cada persona tiene millones de variedades de linfocitos B y T, cada uno con el potencial de reaccionar a un antígeno diferente. Se estima que inicialmente tenemos una o dos copias de cada variedad, y que según vamos siendo expuestos a los antígenos, las células que reaccionan a esos antígenos particulares se van estimulando y clonando para tener luego múltiples copias o clones de las variedades de linfocitos estimuladas (Janeway, 1997).

3.1.5. Linfocitos B

Las células precursoras de linfocitos B se forman en el saco vitelino, la médula y el hígado fetal. A los meses de nacido el humano presenta precursores de linfocitos inactivos. Estos producen anticuerpos (Ac) al azar, especializándose cada célula (una célula produce un solo tipo de anticuerpo). Pero pocos Ac son secretados. La mayoría pasa a formar parte de la membrana celular y sirven para unirse al Ag correspondiente, cuando se lo encuentre. Cuando el linfocito inactivo se encuentra con su Ag complementario, la célula es activada e inicia su multiplicación. Produce muchos clones capaces de producir Ac contra el Ag que la activó. Algunas de estas células pasan al tejido linfático como células de memoria pero las demás liberan grandes cantidades de Ac (2000/segundo). Este proceso es conocido como inmunidad humoral. Los pre-linfocitos B presentan anticuerpos receptores sobre sus membranas. Un pre-linfocito B, con receptores para un Ag específico en su membrana, se encuentra con el Ag que es complementario a sus receptores. A la misma vez un pre-linfocito T con proteínas receptoras para el mismo Ag se encuentra a dicho Ag, se activa y libera sustancias llamadas citocinas. Estas citocinas estimulan la proliferación de otros tipos de linfocitos. El pre-linfocito B unido al Ag recibe citocinas y es estimulado a multiplicarse produciendo clones con los mismos genes que los lleva a producir el mismo tipo de anticuerpo que su célula madre. Así, empezamos con un linfocito capaz de reaccionar y producir Ac contra un Ag particular y terminamos con miles de copias. Muchas de estas copias pasan a formar células plasmáticas, capaces de producir cada una cientos de miles de moléculas de Ac, que se unirán al Ag particular que los activó. Algunos de los clones permanecen como **linfocito B de memoria** (Fig. 1), listos a reaccionar multiplicándose y diferenciándose cuando el Ag vuelva a presentarse en el cuerpo (Abbas *et al*, 2004; Janeway *et al*, 1997; Moreno, 1996; Roit *et al*, 2003)

Elementos del Sistema Inmune Humoral	
CÉLULAS	ACCIÓN
Linfocitos B	Transportan receptores de un antígeno particular entonces se dividen en células plasmáticas y de memoria. Pueden ser medidas por la proliferación general de las células B a antígenos específicos.
Células de Memoria	Recuerdan encuentros previos y responden más rápidamente a infecciones subsecuentes.
Anticuerpos	Proteínas especializadas que se fijan a un solo antígeno en particular resultando en su destrucción, eliminación, o neutralización.

Figura 1. Elementos del sistema inmune humoral y su función. Tomado de www.fbr.org/swksweb/immunolymeoutline.html.

3.1.6. Inmunidad humoral

La respuesta inmune humoral se lleva a cabo por la generación de anticuerpos (inmunoglobulinas), las cuales son producidas por las células B y son específicas de la respuesta inmune, son encontradas en los fluidos de los componentes sanguíneos, o plasma o en fluidos extracelulares. Las inmunoglobulinas son moléculas que presentan forma de Y, presentan sitios que son altamente variables de una molécula a otra. Están constituidas por cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas (H) con un peso de 50 a 70 KDa y dos ligeras (L) con un peso de 23 KDa, que en conjunto constituyen un monómero de inmunoglobulina (Fig. 2), proporcionando una variedad requerida para el proceso de antígenos específicos.

Las regiones constantes de la cadena pesada (tronco de la Y), son codificadas por segmentos genéticos contiguos, los cuales definen las clases de los anticuerpos que determina las propiedades funcionales, la unión de estas cadenas con una ligera ($\kappa\lambda$) constituye un isótipo, en el humano existen cinco tipos de isótopos de anticuerpos (IgM, IgG, IgA, IgE e IgD) los cuales tienen propiedades distintas, como en el caso de IgM, IgG3, e IgG1 que activan el complemento, y de IgM e IgG que aglutinan bacterias y precipitan antígenos solubles haciéndolos más accesibles a las células fagocíticas (Weistman *et al*, 1993; Nossal, 1993; Abbas *et al*, 2004; Moreno, 1996 y Janeway *et al*, 1997).

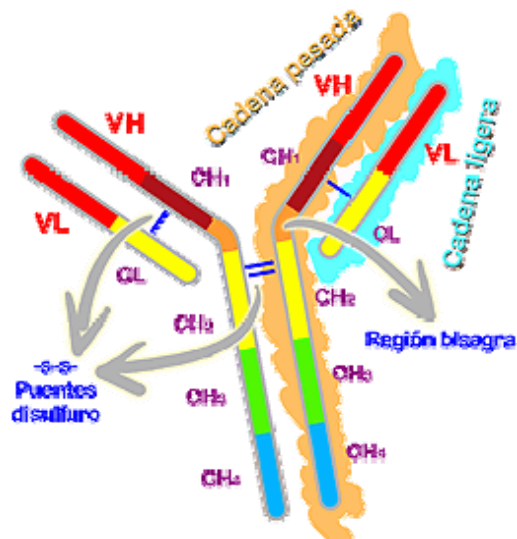


Figura 2. Esquema de la estructura de las inmunoglobulinas. Tomado de www.fbr.org/swksweb/immunolymeoutline.html

Los anticuerpos detectan, neutralizan y eliminan a los invasores extraños, bacterias o virus por medio de las proteínas del complemento; también recubren a los patógenos (opsonización) de tal forma que puedan ser fagocitados por los macrófagos o células presentadoras de Antígeno (CPA) que procesan y presentan antígenos a linfocitos T (Paul, 1993; Moreno, 1996).

Las inmunoglobulinas tienen la propiedad de unirse específicamente al antígeno que indujo su formación. Tras la unión antígeno-anticuerpo (Ag-Ac), las sustancias extrañas o (antígenos) son destruidas por las inmunoglobulinas a través de mecanismos, que pueden ser diferentes según el tipo de inmunoglobulina que participa. Esto se debe a que aunque las distintas clases de inmunoglobulinas tienen una estructura igual en ciertas partes de la molécula, en otras partes presentan una estructura distinta. Podemos decir que las inmunoglobulinas, al detectar al antígeno y unirse a él, actúan como transductores de la información de la presencia de los mismos, que serán posteriormente destruidos por el mecanismo más idóneo, en el que colaborarán además del propio anticuerpo el sistema del complemento, macrófagos, los polimorfonucleares o células NK (Abbas *et al*, 2004).

3.1.7. Inmunidad mediada por células

Las células T pueden reconocer y responder a un antígeno proteico extraño solamente cuando un fragmento peptídico de la proteína extraña es presentado por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en la superficie de una célula blanco apropiada. Por lo tanto, la inmunidad mediada por células se dirige a las células (o a su cercanía) que llevan los antígenos extraños en su superficie, y las reacciones inmunitarias mediadas por células son de gran importancia fisiológica para erradicar a los microorganismos o a los virus que viven en el interior de las células, es decir, dentro de las células presentadoras de antígeno (Abbas *et al*, 2004). Las mismas bacterias patógenas y parásitos y otros virus se replican dentro de la célula, por lo tanto estos patógenos pueden ser detectados por los anticuerpos. La destrucción de estos invasores es función de los linfocitos T, los cuales son responsables de la respuesta inmune mediada por células.

Las reacciones mediadas por células dependen de las interacciones directas entre los linfocitos T y las células presentadoras de antígeno. La acción de los linfocitos T citotóxicos es más directa. Estas células reconocen a las células infectadas con virus, los cuales se replican en el interior de las células para usar la maquinaria de síntesis de la célula. La replicación del virus eventualmente mata a la célula, liberando nuevas partículas de virus. Los antígenos derivados de la replicación del virus, no obstante, son entre tanto, mostrados en la superficie de la célula infectada y estos son reconocidos por las células T citotóxicas. Estas células pueden tener un

control sobre la infección y matar a la célula infectada antes de que la replicación viral se complete (Janeway *et al*, 1997).

3.2. Procesamiento y presentación de antígenos por moléculas MHC

Los efectos de los linfocitos T citotóxicos dependen de las interacciones con las células blanco que contienen proteínas extrañas encontradas en células infectadas con virus o células tumorales que contienen proteínas mutadas. Las células T citotóxicas reconocen células blanco por detección de fragmentos de péptidos derivados de estas proteínas extrañas unidas a moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase I (MHC-I). Las células T auxiliares, en contraste, reconocen e interactúan con células B o células presentadoras de antígeno que internalizan antígenos extraños vía inmunoglobulinas de superficie o endocitosis respectivamente. En este caso, los linfocitos T auxiliares reconocen péptidos unidos a moléculas MHC clase II. En ambos casos, la activación de las células T depende de la interacción de su receptor con los complejos péptido-MHC que solo están presentes en la superficie de las llamadas células accesorias (macrófagos, células B y células dendríticas). Las células accesorias realizan funciones importantes en la activación de células T CD4⁺. Las células accesorias son células presentadoras de antígeno (APC), es decir transforman antígenos proteicos en péptidos generados en los organelos del citoplasma mediante proteólisis (la cual se lleva a cabo en los endosomas) antes de entrar a la vía exocítica que transporta el complejo péptido-MHC a la superficie celular, en una forma capaz de ser reconocida por las células T CD4⁺. La transformación por las CPA de proteínas nativas en fragmentos péptidicos asociados al MHC, se le denomina procesamiento de antígeno (Abbas *et al*, 2004).

3.3. Cáncer cérvico uterino y su etiología con el Virus del Papiloma Humano (HPV).

3.3.1. Etiología del CaCu.

Desde el punto de vista epidemiológico se ha establecido que el carcinoma cervical es una enfermedad de transmisión sexual. La edad de inicio de la actividad sexual y el número de compañeros sexuales durante la vida, son los factores de riesgo más importantes para este padecimiento. Recientemente se han descrito otros factores como son la inmunosupresión, influencias hormonales (esteroides) que favorecen la integración de HPV's de alto riesgo y la disminución en la expresión de las moléculas HLA clase I en epitelios cervicales (Bartholomew *et al*, 1997).

En la década de los 80's se dio un gran avance en la comprensión etiológica de esta enfermedad al detectar la presencia de varios agentes virales asociados con el CaCu, entre estos encontraron el virus del Papiloma Humano (HPV), el virus del Herpes Simple (HSV); y en menor grado al citomegalovirus (HCMV). La mayoría de los estudios actuales consideran que el HPV es el principal agente etiológico del CaCu. Mediante el uso de la técnica de "reacción en cadena de la polimerasa" (PCR) que utiliza oligonucleotidos universales para la proteína L1 de todos los papilomas se ha encontrado que más del 90% de los tumores cervicales están fuertemente asociados con la presencia de HPV (Bosch *et al*, 1997). Algunos autores han detectado la presencia de HPV de casi un 100% de los tumores cervicales; esto ha sido posible mediante el uso de oligonucleotidos específicos para las proteínas E6 y E7 los cuales mantienen una expresión persistente en el tejido tumoral, ya que durante la integración del genoma viral al genoma celular, en algunos casos se pierde un segmento de la proteína L1, el cual no es amplificada por los oligonucleótidos universales de L1 (Walboomers *et al*, 1999).

De la familia de los HPV's se han clasificado más de 80 tipos virales genotípicamente diferentes, de los cuales los HPV's tipo 11, 16, 18, 31, 33, 35 y 45 están asociados con la transformación de las células epiteliales del cérvix, así como las del cuello del útero, produciendo lesiones denominadas neoplasias intraepiteliales o NIC's (Tabla1). En la mayoría de las lesiones se ha confirmado la etiología viral mediante estudios citológicos e histológicos (Seedorf *et al*, 1989; Kurgan *et al*, 1998; Storey, 1990). En los países con mayor frecuencia de CaCu (principalmente países subdesarrollados) se ha observado que el HPV 16 es el de mayor proporción (50%) seguido, por el HPV 18 con el 12 %, el HPV 45 con 8% y el HPV 31 con 5% (Muñoz y Boch, 1997). En México las proporciones son similares: el HPV 16 se encuentra en un 50% de los casos; HPV 18 en el 15% de los casos; los HPV 31,33 y 35, en conjunto, el 2%; y otros tipos virales en porcentaje restante (Berumen, 1997).

TIPO DE LESION	TIPO DE HPV
Piel	
Verrugas	1-4, 7, 10 , 26-29, 38, 41, 48, 49, 57, 63, 65.
Quiste epidermoide	60.
Verruga de carnicero	2,7 .
Epidermodisplasia verruciforme	2, 3, 5, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 17, 19-25, 35, 47, 50 .
Cambios bowenoides	16, 34, 35 .
Carcinoma de células epidermoides	5, 8, 14, 17, 20, 41, 47 .
Genital	
Condiloma acuminado	6, 11 , 42-44, 51-55, 58, 67, 74.
Neoplasia intraepitelial (NIC) bajo grado	6, 11, 16, 18, 30, 31, 33-35, 39, 40, 42-45 ,
NIC alto grado	51-52, 56-59, 68.
Carcinoma cérvico-uterino	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68.
	16, 18, 31, 33, 35 , 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68.
Tumores de cabeza y cuello	
Papilomatosis	2,6,7, 11 ,32,57.
Hiperplasia epitelial focal	13,32 .
Carcinoma de amígdala	16,33 .

Tabla 1. Tipos de HPV en varias lesiones. Tomado de Howley et al, 1991; Breitburd et al, 1996 y Zur Hausen 2002. Los tipos más frecuentes se indican en negritas.

3.4. Estructura y nomenclatura del virus del HPV

El virus del papiloma humano pertenece al genero *papillomavirus* de la familia *papoviridae*. Los papilomavirus tienen un diámetro de 55nm y están compuestos de 72 capsómeros, los cuales están formados por las proteínas L1 y L2; el virus presenta una estructura icosaédrica (Fig. 3) no envuelta y contiene moléculas de doble cadena de ADN circular de aproximadamente 7,200 a 8,000 pares de bases que se encuentran en el interior de la cápside, asociadas a proteínas tipo histona. El genoma contiene 8 marcos de lectura abierta (ORF), es decir, una serie de bases nitrogenadas que se pueden leer en diferente secuencia, lo que conduce a la traducción de diferentes proteínas, según el marco de lectura en función.

Se sabe que durante la transcripción solo una de las hebras del ADN se encuentra en forma activa en este proceso y una región no codificada que contiene las secuencias de regulación de la transcripción y el origen de la replicación y es estrictamente epiteliotrópico. El genoma de HPV-16 se compone de aproximadamente 7,904 pares de bases (Margaret *et al*, 1998; Stubenrauch y Laimins, 1999; Panduro, 2000).

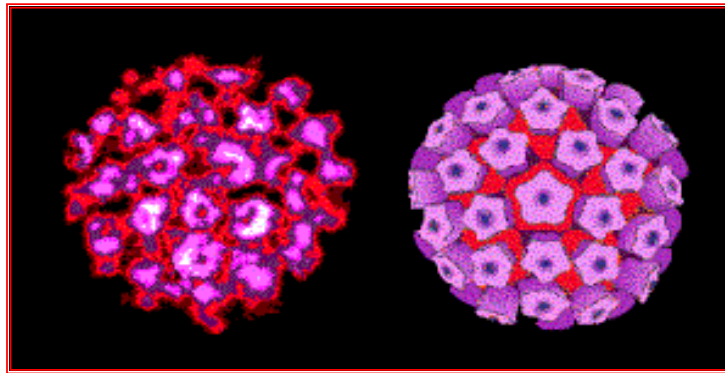


Figura 3. Diagrama de virus del papilloma humano en su forma icosaédrica desnuda. Tomado de <http://www.hon.ch/HON/P.html>

3.5. Infección por HPV y expresión de sus genes

La organización del genoma viral consiste de aproximadamente 8000 pares de bases, y dos tipos de genes son expresados: genes de transcripción temprana (E) y tardía (L). Los genes E se encargan de codificar proteínas tempranas que son necesarias para la replicación viral y la transformación de la célula infectada. A estas proteínas E se las designa como E1, E2, E4, E5, E6 y E7 y se pueden detectar en las áreas proliferativas del epitelio infectado. Por otro lado, los genes L, de los cuales existen dos: L1 y L2, se encargan de codificar en forma tardía, conforman las proteínas estructurales del virus y se expresan solamente en los sectores diferenciados del epitelio (capas más superficiales). De esta manera el ciclo viral se halla estrechamente vinculado con el grado de diferenciación de la célula epitelial (queratinocito), de tal forma que a nivel de las células basales (las únicas con capacidad proliferativa) se expresan los genes tempranos y a medida que la célula madura, se diferencia y asciende hacia las capas más superficiales se intensifica la replicación viral. A este nivel se expresan los genes que codifican las proteínas estructurales de la cápside, permitiendo la encapsidación del genoma y la producción de viriones (Panduro, 2000; Zur Hausen, 2002).

Los HPV's a lo largo del proceso evolutivo han desarrollado un sofisticado sistema de control, mediado por interacciones proteína-proteína o proteína-DNA, que involucran tanto a las proteínas celulares como virales. En la actualidad existe suficiente evidencia que relaciona a algunas de las proteínas codificadas por los genes virales tempranos con la capacidad transformante de los HPV' s de alto riesgo. Estas proteínas pueden anular los puntos de vigilancia del ciclo celular y permitir su desregulación. La anulación de estos puntos de vigilancia se logra de manera más efectiva con los HPVs de alto riesgo que con los de bajo riesgo, esta diferencia está determinada por el mayor grado de afinidad que poseen las proteínas virales de los HPVs de alto riesgo por sus respectivos blancos (Kisseliov, 2000). Como se mencionó anteriormente la integración del DNA viral en el genoma de la célula huésped ocurre principalmente en los casos de carcinoma invasor mientras que éste es un hecho raro de observar en las lesiones de bajo grado o displasias leves. La integración del DNA viral en el DNA de la célula huésped ocurre al azar, no existiendo un lugar predeterminado para su integración. El sitio en el genoma al cual el DNA viral se integra no es esencial para el proceso de carcinogénesis, mientras que el sitio en el cuál se interrumpe el DNA viral sí lo es (región E1/E2). Durante este proceso el DNA viral que es circular, se abre y adopta un patrón lineal causando una ruptura que afecta la mayoría de las veces a la región de los genes E1-E2, en algunos casos esto puede ir acompañado además de lesiones, mutaciones o rearrreglos en el genoma viral (Mougin *et al*, 1999; Massimi *et al*, 1999; Kisseliov, 2000).

Para comprender el efecto de la ruptura en la región E1-E2 es preciso analizar detenidamente la función que cumplen las distintas proteínas virales codificadas por los genes E y L. De todas las proteínas virales que se codifican, solamente algunas de las expresadas en forma temprana poseen capacidad transformante. El principal mecanismo de acción es el de unirse y modificar la actividad y función de un grupo de proteínas involucradas en el control de la progresión del ciclo celular tales como p53, pRb, p21 y complejos Ciclinas/CDK (Granoff y Webster, 1999).

Función de las diferentes proteínas virales:

Proteínas de expresión temprana (E)

E1: Está implicada en el proceso de replicación viral. Se activa una vez que se une a la proteína E2 para formar un heterodímero E1-E2 el cuál se une a su vez a una región no codificante del HPV.

E2: Se encarga de la replicación y modulación de la transcripción viral. Puede estimular o reprimir la trascricpción de genes virales (E6 y E7).

E4: Esta proteína se encarga de facilitar la encapsidación del genoma para formar las partículas virales. Favorece además la difusión y liberación de los viriones mediante la destrucción de los filamentos de citoqueratina de las células infectadas.

E5: Posee la capacidad de anclarse a nivel de las membranas celulares y activar a dos receptores de membrana: el EGFr (receptor para el factor de crecimiento epidérmico) y al PDGFr (receptor para el factor de crecimiento derivado de plaquetas), retardando su endocitosis y aumentando su vida media. De esta forma E5 modifica la transducción de señales extracelulares y desregula la proliferación celular.

E6: Es la proteína transformante mayor y tiene la capacidad de unirse a las proteínas celulares p53 y E6BP (E6 Binding Protein). Posee una gran afinidad por la proteína p53 a la cuál se une y favorece su degradación proteolítica a través de la vía de la ubiquitina-proteosoma 26S. Este es un mecanismo no lisosomal encargado de degradar proteínas blanco que previamente han incorporado moléculas de ubiquitina; una vez modificada la proteína, ésta es reconocida por un complejo multiprotéico denominado proteosoma 26S que cataliza la degradación de la proteína poliubiquitinilada. En el caso de la proteína p53 la proteólisis solo se produce si se une previamente a una proteína celular denominada E6BP, que se encarga de transferir directamente la actividad ubiquitina sobre el sustrato (p53). Esta propiedad de la E6 no la poseen los HPVs de bajo riesgo. La degradación de la proteína p53 no permite que la célula detenga el ciclo celular en G1 ante la presencia de un daño reparable al DNA o activar el proceso de apoptosis ante un daño irreparable al genoma. Esta forma de inactivación de la proteína p53 se denomina inactivación funcional y sería el equivalente a una mutación que afecte al gen P53, tal como se encuentra en la mayoría de las neoplasia malignas (Kisseliov, 2000; Zur Hausen 2002).

E7: Tiene al igual que E6 una actividad transformante. La proteína E7 de los HPVs de alto riesgo posee la capacidad de unirse con un alto grado de afinidad a la proteína pRb, producto del gen supresor de tumor Rb. La unión de E7 con pRb permite que esta última libere prematuramente a los factores de transcripción nuclear E2F/DP1 que se encontraban en la hendidura o bolsillo de la misma. De esta forma los factores de transcripción nuclear transactivan a los genes que codifican a las proteínas implicadas en la síntesis del DNA y de la progresión del ciclo celular. Además las E7 activa a los complejos cdk2/ciclina E en G1 y G1/S y a los complejos cdk2/ciclina A en la fase S. Mediante estos mecanismos la proteína E7 de los HPVs de alto riesgo evita que las células epiteliales suprabasales abandonen el ciclo celular incrementando de esta manera el pool de células en proliferación (Webster, 2000; Kisseliov, 2000; Stephen, 1998).

Proteínas de expresión tardía (L)

L1: Es la proteína mayor de la cápside, posee los antígenos específicos de género y algunos específicos de tipo. Esta proteína es la fuente de antígenos para los ensayos serológicos y para el desarrollo de vacunas profilácticas.

L2: Es la proteína menor de la cápside, es capaz de seleccionar al DNA viral y ubicarlo correctamente en el interior de la cápside.

3.6. Ciclo de replicación de HPV

El ciclo de replicación del HPV dentro del epitelio cervical tiene características singulares. La infección ocurre en el estrato celular escamoso columnar de la transición entre el útero y la vagina, de tal modo que alcanza a células no diferenciadas en el nivel suprabasal (Fig. 4). En este estadio el genoma viral permanece en una conformación episomal, y se transcriben principalmente los genes E1, E2, E4; y E5, y solo muy discretamente E6 y E7.

Conforme las células epiteliales basales cambian del estado proliferativo al de diferenciación y se mueven hacia la luz cervical, se da la formación de viriones; sin embargo la producción de viriones es tan sutil que no alcanza a haber una lisis importante de las células y por consiguiente, se presentan pocos viriones libres. Este estado puede permanecer casi inalterado durante varios años, produciendo a veces solo algunas alteraciones celulares en forma de displasia (Tindle, 2002). Sin embargo en algún momento puede ocurrir de manera aleatoria la integración del genoma viral al genoma del hospedero, lo que provoca una más profunda alteración celular (Zur Hausen, 2002).

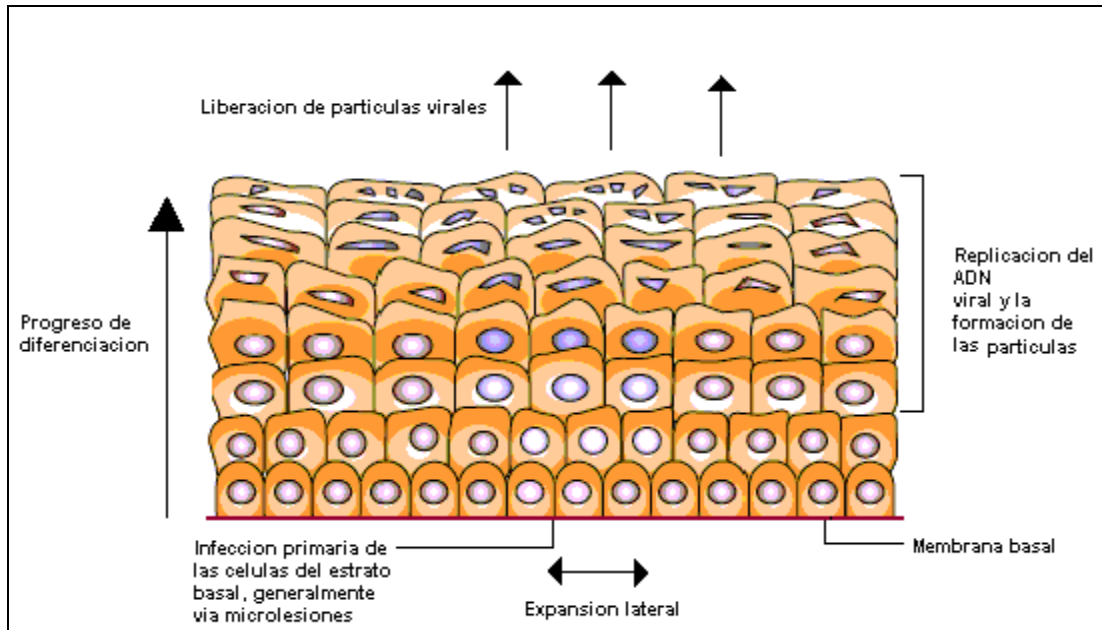


Figura 4. El ciclo de vida del *papillomavirus* humano. La infección requiere la disponibilidad de una célula del estrato basal. Esto ocurre generalmente en microlesiones de la piel o de la mucosa. La célula infectada se divide y la población se separa lateralmente. Algunas de la progenie emigran al estrato suprabasal de la célula que se diferencia, donde se activan los genes virales, el DNA viral es replicado y se forman las proteínas de la cápside. Resulta la formación de la partícula viral. Las partículas son liberadas a la superficie y pueden entonces infectar tejidos cercanos. Tomado de Zur Hausen, 2002.

3.7. Estructura y función de la proteína L1 de HPV.

El tamaño de la estructura icosaédrica de la cápside de los HPV, conformada principalmente por la proteína de L1, es aproximadamente de 600 Å de diámetro. Esta estructura contiene 72 capsómeros, cada uno constituido por 5 unidades de proteína L1 la cual a su vez está constituida por cerca de 500 residuos de aminoácidos (Fig. 5) (Chen *et al*, 2000; 1995; Sasagawa *et al*, 1995).

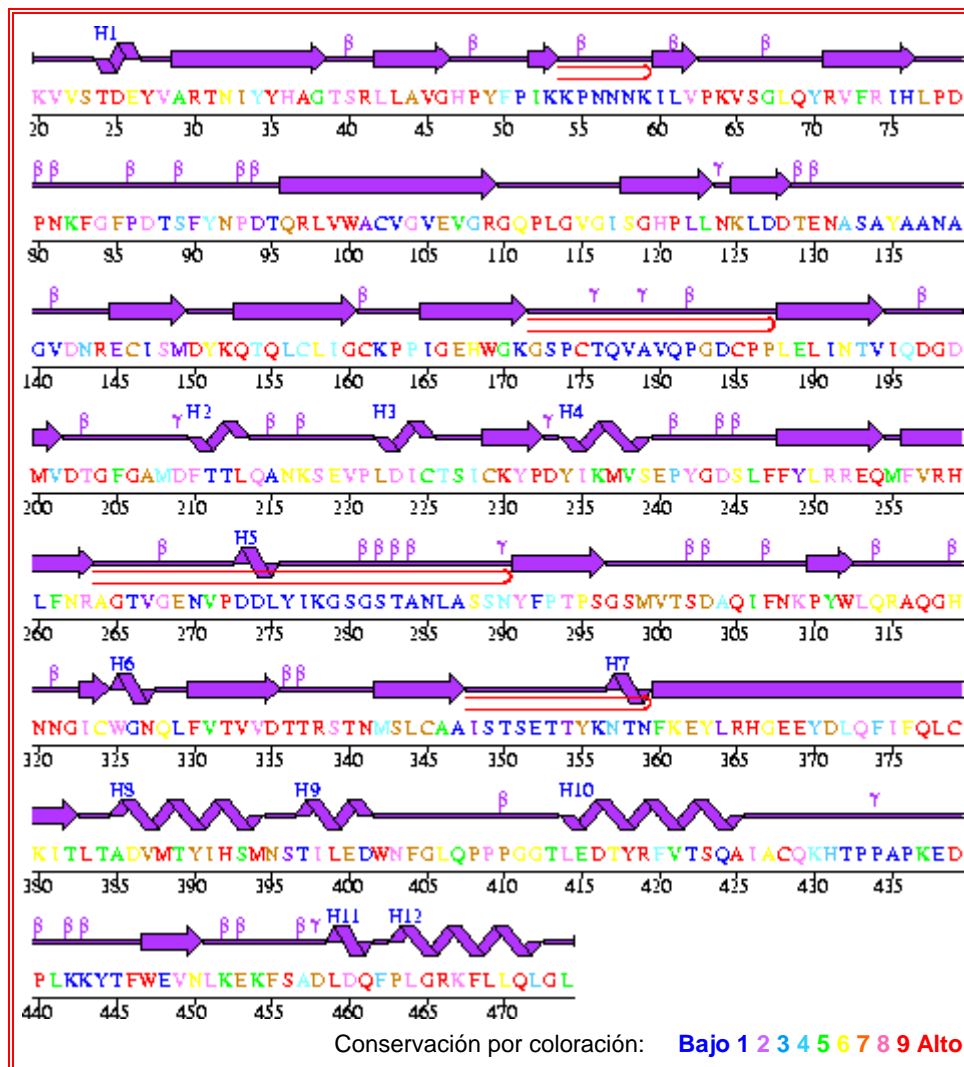


Figura 5. Secuencia y estructura secundaria de la proteína L1 por residuos de conservación. Tomado de <http://www.ebi.ac.uk/thornton/srv/databases/cgi-bin/pdbsum/GetPage.pl?pdbcode=1dzl&template=protein.html&o=RESCONS&l=1&c=999>

Las uniones entre los capsómeros están formadas de la siguiente manera: la extensión menor de los contactos interpentaméricos están formados por pequeñas proyecciones laterales, llamados dominios los cuales se agrupan alrededor de tres pliegues simétricos como ejes, la orientación del eje del dominio es aproximadamente radial; el carbono terminal en proyección lateral es significativamente una α -hélice; las tres hélices ($\alpha 2$ - $\alpha 4$) forman la superficie de contacto con otros monómeros (Fig. 6) (Chen *et al*, 2000). Los contactos entre los pentámeros van de las pequeñas proyecciones laterales dominios; las primeras dos hélices ($\alpha 2$ - $\alpha 3$) en la proyección de dominios forman una figura de V, dentro de la cual entra la parte del aminoácido terminal, la tercera hélice ($\alpha 4$) va de la subunidad relacionada al tercer pliegue; el contacto es fuertemente hidrófobico la h4 conecta y va del resto del dominio por medio de la extendida cadena del polipéptido creando una ajustable interacción orientada (Chen *et al*, 2000).



Figura 6. Proteína L1 HPV-16 se muestran las alfa-hélices en rosa, y las beta hojas plegadas en Amarillo. Tomado de <http://cat.middlebury.edu/~chem/chemistry/class/bio/ch322/ribosome/images/L1>.

3.8. Respuesta inmune humoral hacia la proteína de la cápside

Los estudios generales acerca de la inmunidad humoral en contra de los papilomavirus indican tres respuestas, que incluyen anticuerpos para proteínas derivadas de los HPV, hacia las propias células infectadas y hacia antígenos que no están asociados directamente con las lesiones (Crum *et al*, 1991). Estudios serológicos secuenciales han indicado que la respuesta de anticuerpos desarrollada tras la infección es muy baja por unos meses, es mas fuerte al año (11.8 meses) y posteriormente disminuyen y el nivel se vuelve inversamente proporcional a la duración de la enfermedad. La persistencia de anticuerpos se ha observado en 20% a 35% de pacientes a los 9 años del inicio de la infección (Crum *et al*, 1991).

Los anticuerpos que se generan contra la capsida de los HPV no eliminan la infección, pero pueden proveer protección en contra de re-infecciones posteriores por el mismo tipo de HPV y pueden servir de marcadores para infecciones previas, o incluso activas si se determina el isótopo de inmunoglobulina presente, por ejemplo IgA contra VLP de HPV-16 puede indicar una infección reciente o actual (Wang *et al*, 2000). Los títulos de estos anticuerpos declinan con el tiempo en las pacientes con cáncer (Carter *et al*, 2000).

3.9. Inmunización con VLP's

Varios investigadores se han enfocado en demostrar la presencia de anticuerpos dirigidos a las proteínas virales del HPV, tanto de la capsida como de transcripción temprana. Con relación a las proteínas de la capsida se sabe que la principal proteína que la constituye es la L1, la cual comprende a más del 90 % de las proteínas del virión, y la proteína menor L2, cuya localización de la cápsida aun es incierta (Tindle, 1996). Existen estudios en los cuales se demuestra que la infección con HPV, puede ser prevenida en conejos y bovinos al ser inmunizados con la proteína L1 y la proteína L2 desnaturalizada. No obstante aun no se sabe de que manera estas inmunizaciones, mediante exposición a mucosas, neutralizan al virus que solamente infectan a células epiteliales (Suzich *et al*, 1995; Kirnbauer *et al*, 1996).

En humanos se ha mostrado la presencia de anticuerpos específicos o de reacción cruzada contra partículas parecidas a virus (virus like particles, VLP) los cuales parecen ser excelentes candidatos para vacunas del papilomavirus (Combita *et al*, 2003). Se ha encontrado que del 50 al 60% de las mujeres infectadas por HPV, tienen anticuerpos contra VLP de HPV-16. A diferencia de otros tipos de HPV, HPV-16 tiene varios subtipos y serológicamente presentan reacción cruzada (Yamada *et al*, 1995).

En varios estudios de modelos animales (conejo, perro, bovinos) se ha demostrado que la inmunización con VLP genera Anticuerpos tipo específicos y protege de la infección experimental (Breitburd *et al*, 1996; Kawana *et al*, 2002). Los epítopes conformacionales de las VLP son esenciales en la inducción de estos anticuerpos (Combata *et al*, 2002). La detección de anticuerpos es importante para el estudio de su papel en la historia natural de la infección por estos virus también en la evaluación de la inmunogenicidad de las vacunas profilácticas (Galloway, 2003).

3.10. Detección de anticuerpos dirigidos hacia la proteína L1 su utilidad en el diagnóstico de la enfermedad

En investigaciones recientes se ha mostrado que péptidos de la proteína L1 de HPV-16 que están expuestos en la superficie de dicha proteína, están fuertemente asociados con la presencia de HPV's de alto riesgo asociados a las lesiones cervicales, mostrando 92%-97% de sensibilidad y 89-95% de especificidad en reconocer a pacientes con cáncer cervical, lo cual dichos péptidos pueden ser excelentes herramientas para usar una escala amplia de pruebas serológicas en población de mujeres con un alto desarrollo de carcinoma cervical (Urquiza *et al*, 2005).

Recientemente nuestro grupo de investigación ha identificado un péptido encontrado en una región altamente conservada, $\alpha 2$ - $\alpha 3$, de la proteína L1 de HPV-16 y 18; y de otros HPV de alto riesgo el cual permite detectar anticuerpos específicos en mujeres con infección por HPV de alto grado (Rocha *et al*, 2004).

Otros investigadores han detectado anticuerpos dirigidos hacia la proteína L1, o péptidos derivados de esta misma, considerándolos como blancos potenciales para el estudio de la respuesta inmune natural así como para una fácil detección de la infección oncogénica por HPV y como vacuna profiláctica contra HPV's de alto riesgo (Dillner, 1990; Urquiza *et al*, 2005; Combata 2002; Rocha *et al*, 2004).

Considerando que la proteína L1 de HPV constituye la vía de entrada del virus a la célula huésped, debido a que forma parte de la cápside viral y que tiene un papel importante en el inicio de la infección en el epitelio cervical y en la propagación de la enfermedad, en el presente trabajo, pretendemos identificar si dentro de estas regiones altamente conservadas ($\alpha 1$ - $\alpha 5$) de la proteína L1 de HPV-16 y 18 hay péptidos antigénicos que permitan la detección de anticuerpos específicos en sueros de pacientes con infección por HPV de alto riesgo, lo cual será de relevancia en la detección de la infección por HPV's.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer cérvico uterino (CaCu) representa la neoplasia más frecuente de nuestro país (aproximadamente el 35% de las neoplasias en la mujer), a pesar de las campañas de detección oportuna como puede ser el papanicolau, no se puede evitar una alta incidencia en este problema de salud. Varios estudios epidemiológicos han demostrado que el virus del papiloma humano (HPV) es la causa necesaria para el desarrollo del CaCu, en donde se ha logrado demostrar la presencia del virus en el 99.8% de los casos de CaCu, siendo el factor etiológico más importante en el desarrollo de este cáncer. La prevalencia de HPV-16 es de aproximadamente 50% en neoplasias cervicales en México; a este le siguen el HPV 18 con el 12 % y el 38% restante lo forman los HPV 45 y 31 principalmente. Por lo tanto varios investigadores han propuesto que las proteínas derivadas del HPV puedan ser blancos importantes en la respuesta inmune contra CaCu.

En estudios recientes, nuestro grupo de investigación ha identificado un péptido encontrado en una región altamente conservada, $\alpha 2$ - $\alpha 3$, de la proteína L1 de HPV-16 y 18; y de otros HPV de alto riesgo el cual permite detectar anticuerpos específicos en mujeres con infección por HPV de alto grado, los cuales pueden ser de gran utilidad en el diagnóstico de la enfermedad.

De esta manera, considerando que la proteína L1 de HPV constituye la vía de entrada del virus a la célula huésped, debido a que forma parte de la cápside viral y que tiene un papel importante en el inicio de la infección en el epitelio cervical y en la propagación de la enfermedad, este estudio se llevo a cabo con la finalidad de identificar si dentro de regiones altamente conservadas cadenas alfa-helice ($\alpha 1$ - $\alpha 5$) de la proteína L1 de HPV-16 y 18 hay péptidos antigénicos que permitan la detección de anticuerpos específicos en sueros de pacientes con infección aguda por virus del Papiloma humano de alto riesgo.

5. HIPOTESIS

Se sabe que la proteína L1 del virus del papiloma humano es la proteína principal de la cápside y constituye un sitio inmunogénico importante en procesos infecciosos agudos por virus de HPV de alto riesgo en displasias cervicales, en donde es predominantemente encontrada. En estudios previos hemos encontrado anticuerpos dirigidos hacia un péptido de la región $\alpha 2$ - $\alpha 3$ altamente conservada entre las proteínas L1 de HPV's de alto grado. Por tanto, se espera que en sueros de pacientes con displasias cervicales y con infecciones agudas por HPV de alto riesgo, se encuentren anticuerpos dirigidos a sitios antigénicos (péptidos) de la proteína L1 encontrados en la región altamente conservada $\alpha 1$ - $\alpha 5$ de HPV 16 y 18.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo General:

Detectar la presencia de anticuerpos contra péptidos antigénicos de la proteína L1 de HPV 16 y 18 en suero de pacientes con infecciones agudas por HPV.

6.2. Objetivos Particulares:

- Obtener sueros positivos en anticuerpos contra los péptidos antigénicos de la proteína L1 de HPV 16 y 18.
- Evaluar la presencia de anticuerpos específicos hacia los péptidos antigénicos en suero de pacientes con infección de HPV (IHPV), con cáncer cérvico-uterino y en donadoras sanas.
- Correlacionar la presencia de anticuerpos específicos hacia los péptidos en los grupos de pacientes analizadas.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1. Péptidos de la proteína L1

Los péptidos antigénicos utilizados en este trabajo, se obtuvieron mediante el programa CLUSTALW para identificar las regiones más conservadas entre la proteína L1 de diferentes tipos de HPV de alto riesgo y corresponden a segmentos de las regiones α 1- α 5 de la proteína L1 de HPV-16 y 18 (Tabla 2, Figura 7).

No de péptido	Región en la proteína L1	Secuencia de aminoácidos	Posición en la secuencia de la proteína L1	Tipo de HPV
1	α 5	FLLQAGLKA	494-503	16
2	-	GLQYRUFRI	93-102	16
6	α 5	KYTFWEVNL	469-478	16
10	α 2-3	IHSMNSTIL	417-426	16
13	α 5	QLFNKPYWL	366-375	18
14	α 5	SLVDTYRFV	475-484	18
21	α 2-3	APAENKDPY	495-504	18
23	α 2-3	IHSMNSSIL	453-462	18

Tabla 2. Péptidos antigénicos correspondientes a las regiones conservadas α 1- α 5 de la proteína L1 de HPV 16 y HPV 18.

La mayoría de los péptidos antigénicos seleccionados muestran alta homología con secuencias correspondientes a la proteína L1 de HPV's de alto riesgo asociados con el desarrollo de cáncer cérvico uterino (Tabla 3).

PÉPTIDO	POSICIÓN	TIPO DE HPV	TIPO DE LESION ASOCIADA
1 (FLLQAGLKA)	494-503	16	CaCu
2 (GLQYRUFRI) (GLQYRUFRL)	93-102 75-84	16 73	CaCu
6 (KYTFWEVNL) (KYTFWEVNL) (NYTFWEVDL)	469-478 137-146 138-147	16 33 35	CaCu CaCu CaCu
10 (IHSMNSTIL) (IHSMNSSIL) 23 (IHSMNSSIL) (IHSMNPSIL) (IHSMNSTIL)	417-426 84-93 453-462 85-94 391-400	16 45 18 35 73	CaCu CaCu CaCu CaCu
13 (QLFNKPYWL) (QIFNKPYWL) (QLFNKPYWL) (QLFNKPYWL)	366-375 331-340 302-311 305-314	18 16 11 68	CaCu CaCu Condiloma acuminado CaCu
14 (SLVDTYRFV) (SLVDTYRFV) (SLVDTYRYL) (SLQDTYRFV)	475-484 97-106 414-423 96-105	18 45 68 33	CaCu CaCu CaCu CaCu
21 (APAENKDPY)	495-504	16	CaCu

Tabla 3. Péptidos antigénicos de la proteína L1 utilizados en este estudio y su homología con péptidos derivados de la proteína L1 de varios tipos de papiloma humano asociados a CaCu. Tomado de Zur Hausen 2002 y Breitburd *et al* 1996. Los números en negritas representan el tipo de HPV de alto riesgo.

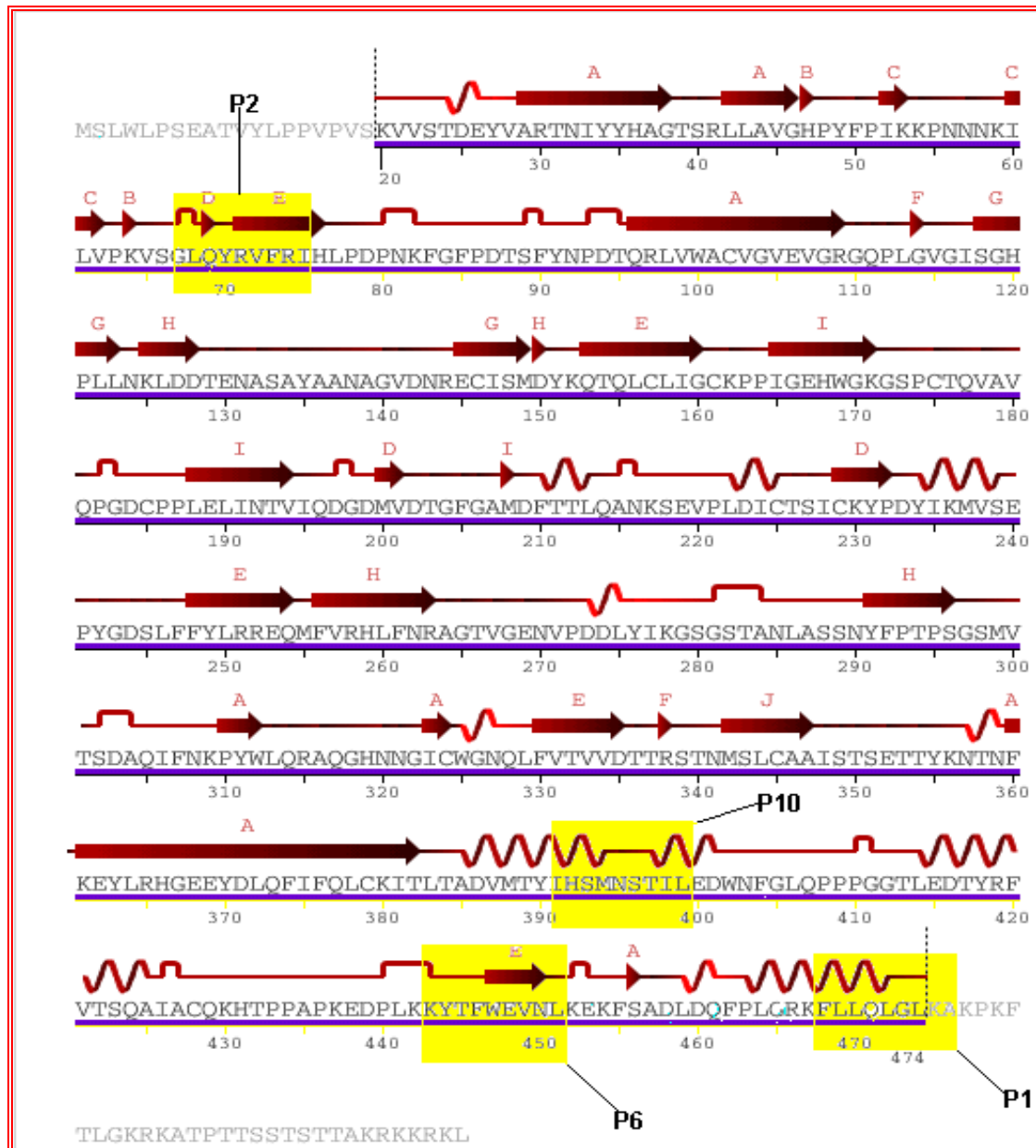


Fig 7. Secuencia y estructura secundaria de la proteína mayor de la cápside L1 de HPV 16, mostrando la ubicación en que se encuentran los péptidos antigénicos utilizados: P1 (FLLQLGLKA), P2 (GLQYRUFRI), P6 (KYTFWEVNL) Y P10 (IHSMNSTIL), así como los de L1 de HPV-18 P13, P14, P21 y P23. Numero de monómeros 505. Clave: = hebra extendida, = doblada, = alfa hélice, = beta hélice, = pi hélice, Grises monómeros que no se tiene información estructural. Tomado de: <http://pd-beta.resb.org/pdbsequencc=1dzl/>

Las secuencias de los péptidos antes denotados, fueron sintetizados por Invitrogen, USA. Los péptidos sintéticos fueron disueltos en solución amortiguadora de fosfatos PBS y almacenados en alícuotas a 70°C antes de su uso.

7.2. Obtención de anticuerpos específicos a los péptidos

La obtención de anticuerpos específicos a cada péptido se realizó mediante inmunización de ratones de la cepa Balb/c, para ello se preparó cada péptido con adyuvante completo e incompleto de Freund (Sigma, USA) de la siguiente manera:

La preparación de los péptidos se llevó a cabo en un cuarto de cultivo celular en condiciones estériles en la campana de flujo laminar. En una jeringa de 3ml se añadieron 200µl de PBS y 50µl de cada péptido (a una concentración de 10mg/ml); mientras que en otra jeringa de 3ml se añadieron 250µl de adyuvante completo o incompleto de Freund. Posteriormente ambas soluciones fueron mezcladas con ayuda de un conector hasta obtener una consistencia cremosa.

Los ratones fueron inmunizados (vía intraperitoneal) con tres dosis de los péptidos: 1 con adyuvante completo y 2 con adyuvante incompleto de Freund, por espacio de 8-10 días entre cada inmunización. Diez días después de la última inmunización, los ratones fueron sangrados por punción de la vena orbital. La sangre obtenida fue refrigerada durante 2 hrs y posteriormente centrifugada a 2000rpm durante 10min para obtener el suero.

La detección de anticuerpos péptido-específicos se llevó a cabo mediante ensayos de ELISA (ver adelante).

7.3. Obtención de muestras biológicas

Las muestras de sangre periférica de las pacientes se obtuvieron estérilmente, mediante tubos vacutainer (Beckton Dickinson) con anticoagulante ACD. Se obtuvieron 74 muestras de pacientes: 29 muestras de pacientes con displasias cervicales agudas e infección por el Virus de Papiloma Humano (IVPH); 25 con Cáncer Cérvico-uterino (CaCu) y 20 de donadoras sanas (como control negativo). Todas las muestras fueron procedentes del Hospital General de la Ciudad de México, las cuales se trasladaron al laboratorio de Inmunobiología de la F.E.S-Zaragoza en donde se centrifugaron las muestras en frío a 4°C a 2000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos para la obtención de la fase superior (plasma) y se almacenaron en alícuotas de 50µl en tubos eppendorf estériles para su análisis posterior.

7.4. Tipificación de HPV en las biopsias

Con la biopsia de tejido tumoral se procedió a la extracción del ADN geonómico y tipificación del HPV. Inicialmente se amplificó el gen que codifica para la proteína L1 de HPV mediante el uso de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando oligonucleótidos consenso; después se realizó la digestión del producto de PCR de las muestras y fueron llevados a electroforesis en un gel de agarosa al 3 % para analizar los productos y determinar el tipo de HPV de acuerdo al tamaño de los fragmentos reportados por Manos, *et al*, 1990.

Las condiciones de la técnica fueron las siguientes:

Para la amplificación del gen L1 mediante PCR se utilizaron los oligonucleótidos MY09/MY11, los cuales fueron sintetizados por Gibco, USA. Estos oligonucleótidos, reportados por Manos 1988, son degenerados y están dirigidos para amplificar un fragmento de 450 pares de bases del gen L1.

Secuencia de los oligos utilizados para amplificar L1:

MY09: 5' gcm cag ggw cat aay aat gg 3' (sentido).

MY11: 5' cgt ccm arr gga wac tga tg 3' (antisentido).

En donde:

m= a+c

r= a+g

w= a+t

y= c+t

Reactivos utilizados:

REACTIVO	μl
Amortiguador PCR (10X)	4
MgCl (30mM)	2
DNtp's (2mM)	4
MY09 (10μL)	2
MY11 (10μL)	2
Taq	0.25
H2O + ADN	25.75

- En un tubo para microcentrífuga se adicionaron los reactivos señalados anteriormente.
- De la mezcla de estos reactivos se tomaron 14.25µl por cada muestra.
- Al tubo se le adicionó DNA de la muestra y agua suficiente hasta llevarla a un volumen total de 40µl. Las muestras se incubaron en un termociclador (Mastercycler, eppendorf, USA) para obtener el producto de PCR, las condiciones de amplificación fueron:

TEMPERATURA °C	TIEMPO
94	5 minutos
95	30 segundos
45	1 minuto
72	1 minuto con 30 segundos
72	10 minutos

- Finalmente se tomaron 8µl de las muestras amplificadas y se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 3%, para verificar el producto de PCR.

7.5. Digestión del producto de PCR

En un tubo para microcentrífuga:

- Se adicionaron 12µl del producto de PCR, 1.4µL de Amortiguador de la enzima de restricción y 0.6µL de la enzima de restricción RsaI (Invitrogen USA).
- Se incubaron a 37°C durante 60 minutos.
- Se separaron las muestras mediante electroforesis en un gel de agarosa al 3%.
- Simultáneamente se separaron muestras de PCR sin digerir.

Como controles positivos para HPV-16 y HPV 18 se utilizaron muestras provenientes de células Caski y Hela respectivamente.

7.6. Ensayo de ELISA

La técnica de ELISA empleada se llevó a cabo de acuerdo con la reportada por Rocha *et al*, 2004 y Fernández, 2001. Brevemente, los péptidos (Tabla 2) fueron disueltos en una solución de carbonato-bicarbonato con un PH de 9.6 a una concentración de 500ng/100µl.

En una placa de ELISA (EIA-ria 96 pozos fondo plano de alta afinidad de poliestireno no estériles sin tapa, Costar 9018) se colocaron por triplicado 100µl de la solución de los péptidos.

La placa se incubó toda la noche a 4°C, se lavó 4 veces con 100µl de TBS-Tween20 (ver apendice). En seguida se preparó una solución de Albúmina Bovina Sérica (BSA) al 2% en TBS-Tween20 y se colocaron 200µl de esta solución bloqueadora a cada pozo. Se incubó la placa por 2hrs a 37°C. Después de lavar la placa nuevamente 4 veces con Tween 20 y TBS, se colocaron 100µl de los sueros de pacientes y BSA al 2% en TBS-Tween 20 a la placa (ver apendice). Esto se llevó por triplicado a una dilución 1:100.

La placa se incubó por 2hrs a 37°C, se lavó 6 veces con TBS-Tween20 y después se adicionaron 100µl de anticuerpo secundario (AP-Rabbit-Anti Mouse IgG + M+ A, Gibco USA) diluido 1:5000 en solución bloqueadora a los pozos que contienen el suero de los ratones inmunizados (controles (+)) y 100µl de anticuerpo secundario de (AP- Rabbit-Anti Human IgG + A) diluido 1:1000 también en solución bloqueadora, en los pozos conteniendo las muestras de pacientes (Figura 8).

Posteriormente se incubó por 2hrs a 37°C, se lavó la placa 6 veces con Tween 20 – TBS. Se adicionaron 100µl de sustrato para la fosfatasa alcalina, adicionando 0.03g de sustrato a 5ml de dietanolamina al10% (ver apendice). La placa se incubó a 37°C, observando cada 15 min. La aparición del color amarillo. Por ultimo se leyó en un lector de ELISA (Molecular Devices) a una longitud de onda de 405nm.

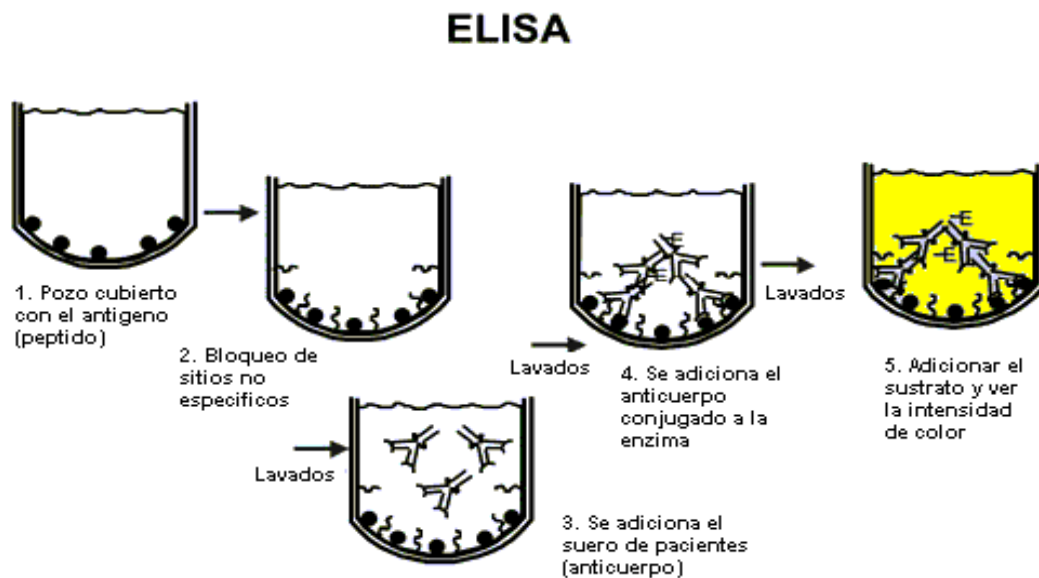


Fig 8. Técnica de ELISA. Tomado de [www.fbr.org/swksweb/ immunolymeoutline.html](http://www.fbr.org/swksweb/immunolymeoutline.html).

8. ANALISIS DE LOS DATOS

La determinación de anticuerpos de cada suero se evaluó por triplicado y se hizo el promedio de las tres lecturas, adicionalmente todas las muestras se probaron en pozos los cuales no fueron cubiertos con péptido para definir una reactividad no específica. El valor final de ELISA reportado para cada suero corresponde al valor en densidad óptica (absorbancia) de la media de los pozos problema a los cuales se les resto la media de los pozos a los cuales no se les adicionó péptido. Como controles para todos los ensayos se puso un suero irrelevante (-) y el suero de los ratones inmunizados con cada péptido (+), además el suero sin antígeno para identificar reactividad no específica.

8.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El valor de corte para la positividad fue calculado con base a la distribución de absorbancias del grupo control y fue definido como la media de la absorbancia + tres desviaciones estandar (DS). Para evaluar la diferencia de las proporciones de las

muestras positivas en los diferentes grupos, los datos fueron arreglados en las tablas de contingencia de 2 por 2 y analizados por chi cuadrada corregida por Yates para calcular la porción probable (OR) con intervalos de confianza al 95% (CI) y el valor de P. Para evaluar la diferencia de medias entre las variables continuas se empleo el estadístico t-test tomando como la diferencia estadísticamente significativa cuando $p \leq 0.05$.

9. RESULTADOS

9.1. Títulos de anticuerpos específicos a los péptidos, obtenidos de los ratones inmunizados.

Con la finalidad de obtener anticuerpos específicos a cada uno de los péptidos antigénicos de la proteína L1 de HPV-16 y 18 (Tabla 2), se inmunizaron ratones hembra de la cepa Balb/c con tres dosis de los péptidos, posteriormente se obtuvieron sueros de estos ratones y se realizaron ensayos de ELISA para evaluar la reactividad de los antisueros hacia cada uno de los péptidos. Como se muestra en la Tabla 4 y Gráfica 1, la mayoría de los antisueros mostraron alta reactividad específica hacia los péptidos correspondientes a una dilución de 1:10 y 1:100, lo cual nos sugiere una fuerte antigenicidad de los péptidos para la generación de anticuerpos en los animales inmunizados. Cabe mencionar que los antisueros mostraron muy baja reactividad hacia un péptido irrelevante (GILGFVFTL) derivado de la proteína A de matriz de influenza, además de que anticuerpos IgG específicos a moléculas clase I de histocompatibilidad, isotipo control proveniente del hibridoma W6/32, tampoco mostraron reactividad hacia los péptidos de la proteína L1 de HPV-16 y 18 utilizados en este estudio.

Dilución	PEPTIDO 1	PEPTIDO 2	PEPTIDO 6	PEPTIDO 10	PEPTIDO 13	PEPTIDO 14	PEPTIDO 21	PEPTIDO 23
1:10	1.54	1.33	0.824	1.658	1.01	1.144	1.394	1.386
1:100	0.536	0.75	0.792	1.122	0.731	0.86	0.277	0.746
1:1000	0.297	0.474	0.995	0.24	0.225	0.452	0.213	0.252

Tabla 4. Títulos de anticuerpos encontrados en sueros de ratones Balb/c inmunizados con péptidos derivados de la proteína L1 de HPV-16 y 18.

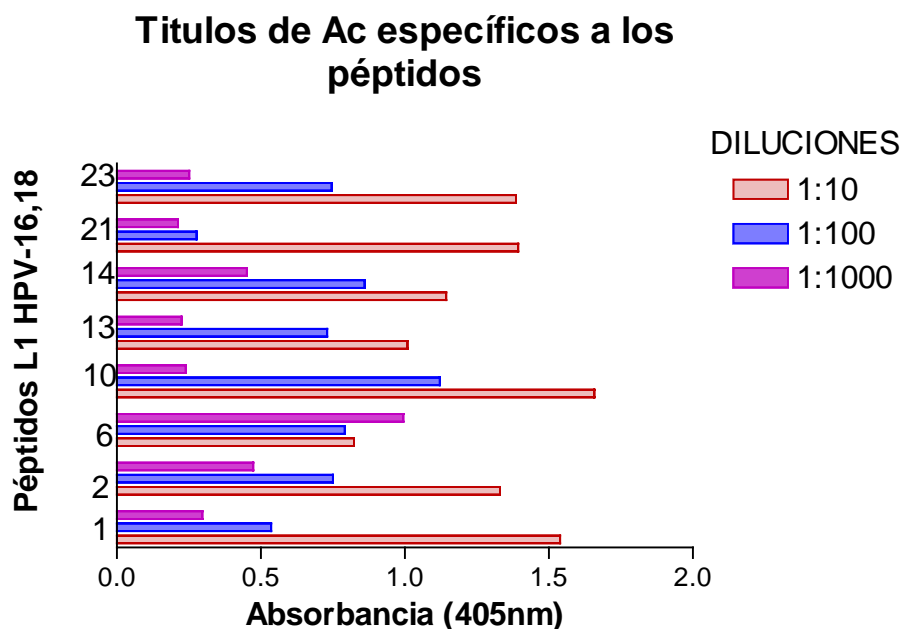


Grafico 1. Se muestran los títulos de anticuerpos específicos a los péptidos de la proteína L1 de HPV-16 y 18, obtenidos de sueros de ratones Balb/c inmunizados. Se muestra el promedio de ensayos realizados por triplicado a 3 diferentes diluciones.

9.2. Tipificación de HPV

En este estudio se trabajaron con biopsias de pacientes que presentaban Infección por Virus de Papiloma Humano (IVPH) de esta población 4 mostraron HPV-16 (14%); 11 con infección diferente a HPV 16 y 18 (38%) de las cuales 7 presentaron infección de HPV's de alto riesgo (59, 39, 68 y 31) y 4 pacientes HPV's de bajo riesgo (6 y 72), 14 fueron no tipificadas (48%), (FIG. 9).

Con Cáncer Cérvico-uterino (CaCu) y diferentes estadios clínicos (Tabla 5): 9 con estadio IIB, 1 con IB, 1 con IA, 7 con NIC1, 2 con NICII, 1 con IIB2, 1 con CaCu, 2 con IIIB, y 1 con IIA. De estas pacientes, 8 presentaron infección con HPV-16 (35%); 8 con HPV-18 (35%); 4 con infección diferente a HPV 16 y 18 (17%); y 3 negativas a la infección por HPV (13%), (Fig.10).

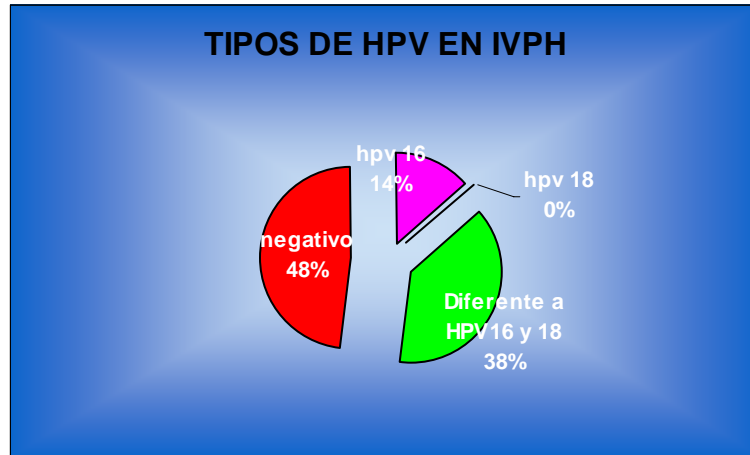


Fig 9. Porcentajes de los tipos de HPV presentes en las biopsias de las pacientes con Infección por el Virus del Papiloma Humano (IVPH).

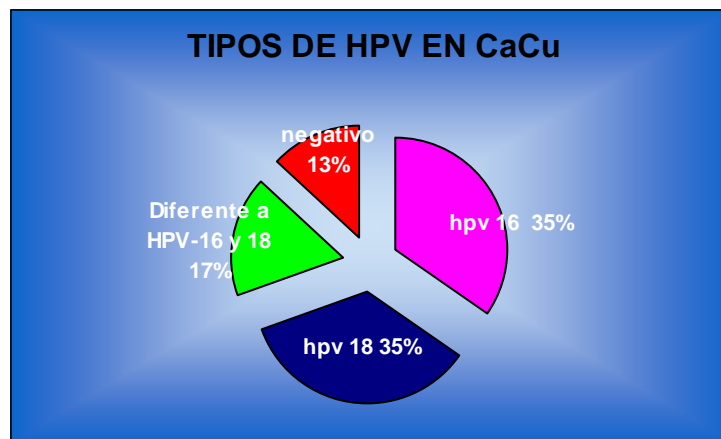


Fig 10. Porcentajes de los tipos de HPV presentes en las biopsias de las pacientes con cáncer cérvico-uterino (CaCu).

No de paciente	EDAD	TIPO DE HPV	ESTADIO CLINICO	HAPLOTIPO HLA CLASE I
1	-----	16	IIB	NT
2	60	18	IIIB	A1, B8, C7 A2, B62(15)
3	-----	Positivo no 16 ni 18	IIB	A28, B35, Cw4 A3, B65(14), Cw8
4		16	IIB	NT
5	35	18	IIB	A19
6	73	16	IIB	A2,B52(5),B35,CW4
7		18	IB1	A2, B35, Cw4 A28(68), B48
8	44	16	IIB	NT
9		Positivo no 16 ni 18	AI	A2B15BW4,BW6
10		negativo	NICI	A24(9),A28(68),B35,B 48,CW6
11		16	NICII	NT
12	26	16	NICII	A2,A24(9),B75(15),B W6,CW1
13		16	IIB	A2,B52(5)BW6,CW3, CW9
14	37	negativo	NICI	A2,B7,B41
15	40	18	NICI	A2,B60(40),CW3,BW 6
16		18	IIB	B16
17	30	16	NICI	A28(68),A29(19)B44(13),B38(16)(39)
18	27	18	NIC-1	A2,A28,B35,B40,CW 3,CW4
19	42	Negativo	NIC-1	A24(9),A28,B35,CW3
20	32	Positivo no 16 ni 18	NIC-1	A24(9),A28(68),B35B 48,CW4
21		NT	IIB2	A2,B5
22		NT	CaCu	A9(23),A10(26)
23	52	18	CaCu IIIB	B7,BW6,A24(9)
24	32	18	II A	A2,B16(39),B35,CW1 ,CW4
25		Positivo no 16 ni 18	IIB	A24(9),A28(68),B35

Tabla 5. Datos clínicos y haplotipos de histocompatibilidad HLA clase 1 de las pacientes con cáncer cervicouterino atendidas en el hospital general. NT; no tipificadas.

9.3. Detección de anticuerpos contra los péptidos de la proteína L1 en el suero de pacientes con infección por HPV (IVPH) y con cáncer cérvico-uterino CaCu.

Para la determinación de anticuerpos específicos a los péptidos de la proteína L1, las muestras séricas humanas fueron organizadas en tres grupos: 1) pacientes con IVPH (n = 29); pacientes con CaCu (n = 25); y un control negativo con pacientes sin evidencia clínica de infección por HPV (n = 20). El grupo de CaCu y el de IVPH se probó positivamente con HPV-16 y HPV-18 mediante la prueba de Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) como se mencionó anteriormente.

Los sueros de las pacientes con IHPV mostraron fuerte respuesta hacia los péptidos 1, 6, 10 de HPV-16 y 13 y 23 de HPV-18 (Gráficos 2, 3, 4, 6, y 9; y Tablas 6, 7, 8, 10 y 13), esta respuesta fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$) contra los datos encontrados en el grupo control (sin evidencia de infección por HPV). Lo cual sugiere que en la población que presenta IVPH hay presencia de anticuerpos de memoria dirigidos hacia estos péptidos antigénicos, debido muy probablemente a infecciones pasadas y recientes. Cabe mencionar que la mayor respuesta encontrada fue hacia los péptidos P6 y P10 de la proteína L1 de HPV-16 en donde 28 de las 29 pacientes dieron positividad en ambos casos, con una absorbancia media de 1.5 y 2.3 respectivamente; mientras que hacia los péptidos 13 y 23 de HPV-18 la reactividad fue de 23/29 y 25/29 con una absorbancia media de 1.7 y 1.6 respectivamente.

Los sueros de las pacientes con CaCu mostraron la mayor respuesta hacia los péptidos 2, 6 y 10 en donde 14/25, 21/25 y 23/25 pacientes dieron positividad de anticuerpos hacia estos péptidos (Gráficos 3, 4, 5 y Tablas 7, 8, 9), además de mostrar una respuesta estadísticamente significativa ($p < 0.05$) contra el grupo control. No obstante la absorbancia media del grupo de pacientes con CaCu hacia el péptido P10 fue de 1.5, mientras que para los péptidos P2 y P6 fue menor a 0.7. Estos datos nos permiten sugerir que el péptido P10 (IHSMNSTIL) es un segmento fuertemente antigénico de la proteína L1 de HPV-16 el cual es altamente reconocible por anticuerpos en mujeres con IVPH y pacientes con CaCu.

Por otro lado, la población control no tuvo respuesta significativa contra ningún péptido ya que en todos los casos, la absorbancia media de este grupo siempre se encontró debajo del valor de corte (Gráficos del 2 al 9).

Para los péptidos 14 y 21 de HPV-18 las absorbancias medias de anticuerpos en las mujeres con IVPH y CaCu fueron menores a los valores de corte a pesar de que algunas pacientes con CaCu mostraron cierta positividad de anticuerpos hacia estos péptidos (Gráficos 7-8 y Tablas 11 y 12).

9.3.1. PÉPTIDOS DERIVADOS DE LA PROTEÍNA L1 DE HPV-16

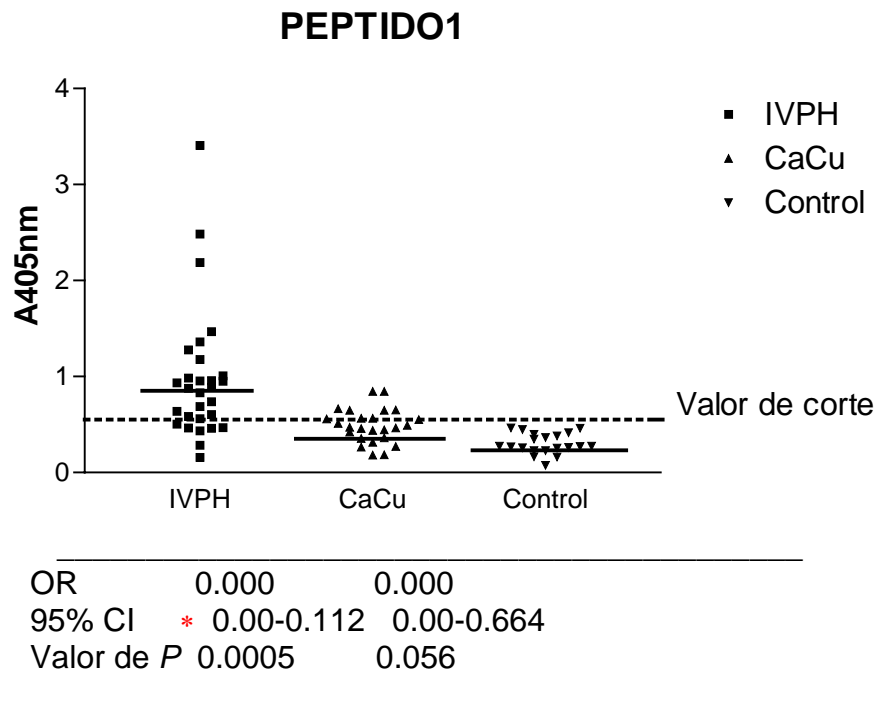
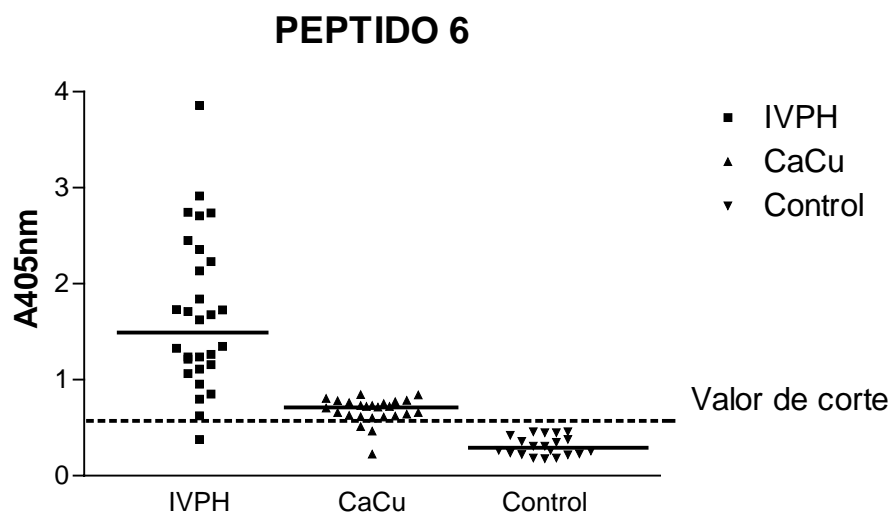


Grafico 2. Respuesta de anticuerpos contra el péptido 1 de la proteína L1 de HPV-16 en el suero de mujeres sin evidencia de infección por HPV (control), pacientes con CaCu y pacientes con IVPH. La media de cada grupo esta representada por la línea negra continua. El valor de corte es de 0.620 indicado por la línea negra punteada. Se muestran las diferencias estadísticas entre los grupos. El valor de P fue calculado utilizando el estadístico t-test. * Diferencia significativa vs población control.

	IVPH	CaCu	SANAS
POSITIVAS	19	6	0
NEGATIVAS	10	19	20
TOTAL	29	25	20

Tabla 6. Datos de la población de CaCu, IVPH y control para el péptido 1 de la proteína L1 de HPV-16 mostrando el número de pacientes positivas y negativas tomando de referencia el valor de corte para la positividad.

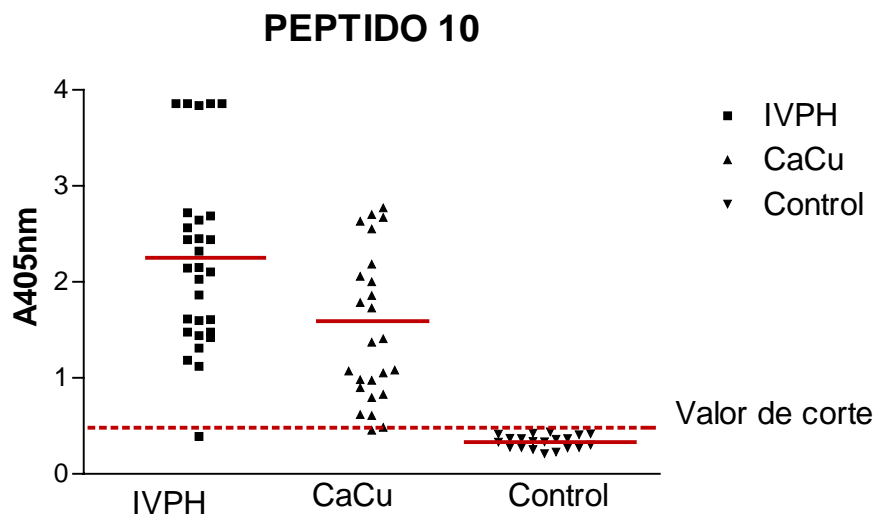


OR	0.000	0.000
95% CI	* 0.000-0.014	* 0.000-0.046
Valor de P	0.0005	0.0005

Grafico 3. Respuesta de anticuerpos contra el péptido 6 de la proteína L1 de HPV-16 en el suero de mujeres sin evidencia de infección por HPV (control), pacientes con CaCu y pacientes con IVPH. La media de cada grupo esta representada por la línea negra continua. El valor de corte es de 0.606 indicado por la línea negra punteada. Se muestran las diferencias estadísticas entre los grupos. El valor de P fue calculado utilizando el estadístico t-test. * Diferencia significativa vs población control.

	IVPH	CaCu	SANAS
POSITIVAS	28	21	0
NEGATIVAS	1	4	20
TOTAL	29	25	20

Tabla 7. Datos de la población de IVPH, CaCu y control para el péptido 6 de la proteína L1 de HPV-16 mostrando el número de pacientes positivas y negativas tomando de referencia el valor de corte para la positividad.



OR	0.000	0.000
95% CI	* 0.000-0.014	* 0.000-0.025
Valor de P	0.0005	0.0005

Grafico 4. Respuesta de anticuerpos contra el péptido 10 de la proteína L1 de HPV-16 en el suero de mujeres sin evidencia de infección por HPV (control), pacientes con CaCu y pacientes con IVPH. La media de cada grupo esta representada por la línea negra continua. El valor de corte es de 0.540 indicado por la línea negra punteada. Se muestran las diferencias estadísticas entre los grupos. El valor de P fue calculado utilizando el estadístico t-test. * Diferencia significativa vs población control.

	IVPH	CaCu	SANAS
POSITIVAS	28	23	0
NEGATIVAS	1	2	20
TOTAL	29	25	20

Tabla 8. Datos de la población de IVPH, CaCu y control para el péptido 10 de la proteína L1 de HPV-16 mostrando el número de pacientes positivas y negativas tomando de referencia el valor de corte para la positividad.

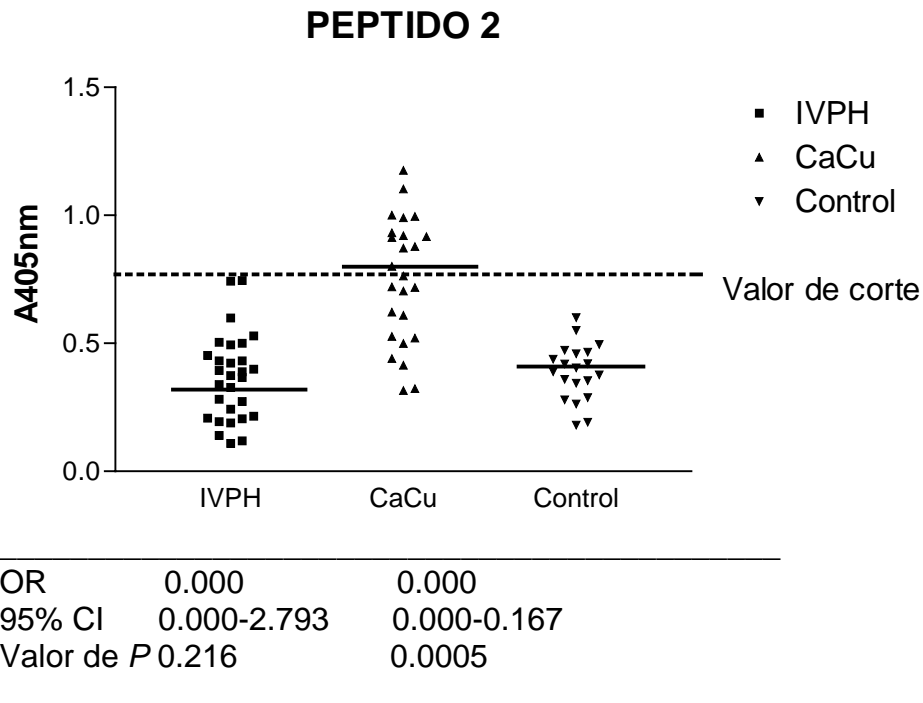
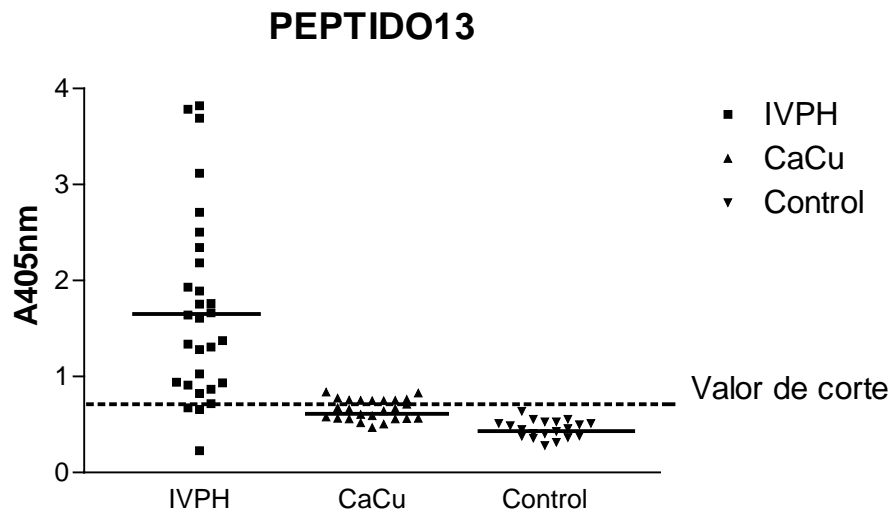


Grafico 5. Respuesta de anticuerpos contra el péptido 2 de la proteína L1 de HPV-16 en suero de mujeres sin evidencia de infección por HPV (control), pacientes con CaCu y pacientes con IVPH. La media de cada grupo esta representada por la línea negra continua. El valor de corte es de 0.717 indicado por la línea negra punteada. Se muestran las diferencias estadísticas entre los grupos. El valor de P fue calculado utilizando el estadístico t-test.

	IVPH	CaCu	SANAS
POSITIVAS	2	14	0
NEGATIVAS	27	11	20
TOTAL	29	25	20

Tabla 9. Datos de la población de IVPH, CaCu y control para el péptido 2 de la proteína L1 de HPV-16 mostrando el número de pacientes positivas y negativas tomando de referencia el valor de corte para la positividad.

9.3.2. PÉPTIDOS DERIVADOS DE LA PROTEÍNA L1 DE HPV 18

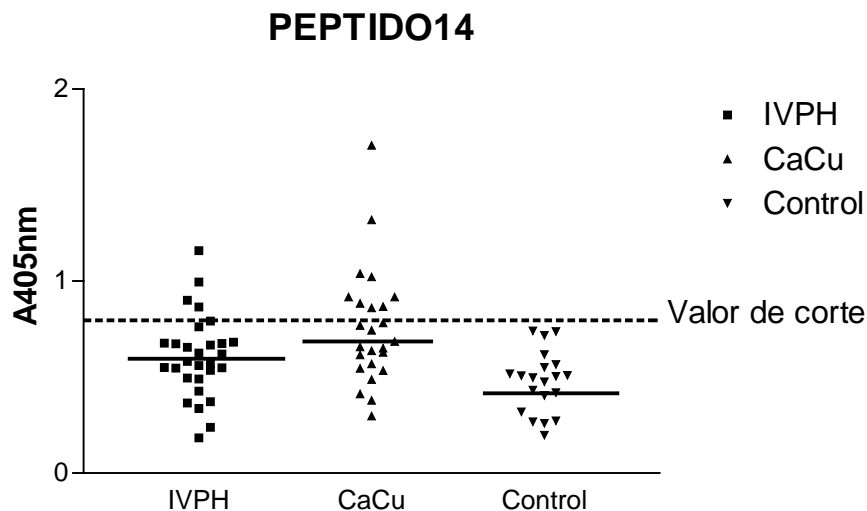


OR	0.000	0.000
95% CI	*0.000-0.058	0.000-0.372
Valor de P	0.0005	0.009

Grafico 6. Respuesta de anticuerpos contra el péptido 13 de la proteína L1 de HPV-18 en el suero de mujeres sin evidencia de infección por HPV (control), pacientes con Cacú y pacientes con IVPH. La media de cada grupo esta representada por la línea negra continua. El valor de corte es de 0.724 indicado por la línea negra punteada. Se muestran las diferencias estadísticas entre los grupos. El valor de P fue calculado utilizando el estadístico t-test. * Diferencia significativa vs población control.

	IVPH	CaCu	SANAS
POSITIVAS	23	9	0
NEGATIVAS	16	16	20
TOTAL	29	25	20

Tabla 10. Datos de la población de IVPH, CaCu y control para el péptido 13 de la proteína L1 de HPV-18, mostrando el número de pacientes positivas y negativas tomando de referencia el valor de corte para la positividad.

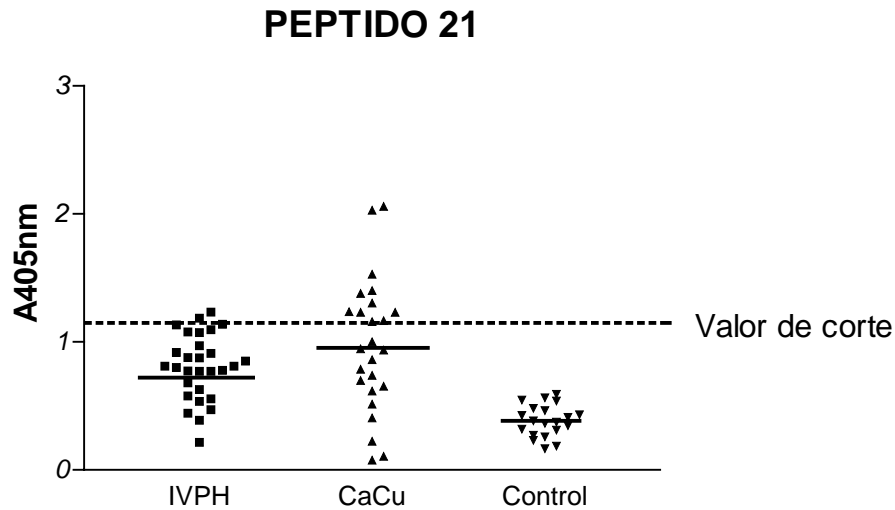


OR	0.000	0.000
95% CI	0.000-5.676	0.000-1.112
Valor de P	1.000	0.178

Grafico 7. Respuesta de anticuerpos contra el péptido 14 de la proteína L1 de HPV-18 en el suero de mujeres sin evidencia de infección por HPV (control), pacientes con CaCu y pacientes con IVPH. La media de cada grupo esta representada por la línea negra continúa. El valor de corte es de 0.952 indicado por la línea negra punteada. Se muestran las diferencias estadísticas entre los grupos. El valor de P fue calculado utilizando el estadístico t-test.

	IVPH	CaCu	SANAS
POSITIVAS	1	4	0
NEGATIVAS	28	21	20
TOTAL	29	25	20

Tabla 11. Datos de la población de IVPH, CaCu y control para el péptido 14 de la proteína L1 de HPV-18, mostrando el número de pacientes positivas y negativas tomando de referencia el valor de corte para la positividad.

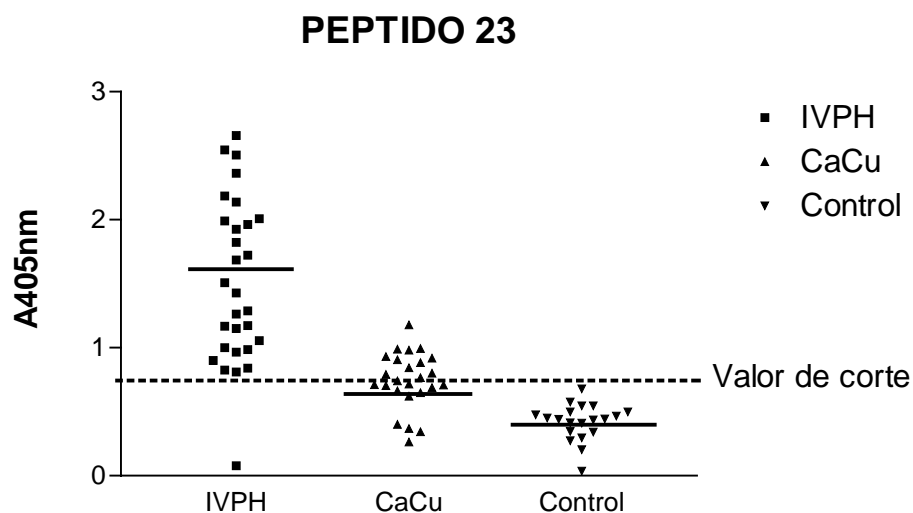


OR	0.000	0.000
95% CI	0.000-2.793	0.000-0.372
Valor de P	0.642	0.009

Grafico 8. Respuesta de anticuerpos contra el péptido 21 de la proteína L1 de HPV-18 en el suero de mujeres sin evidencia de infección por HPV (control), pacientes con CaCu y pacientes con IVPH. La media de cada grupo esta representada por la línea negra continua. El valor de corte es de 1.175 indicado por la línea negra punteada. Se muestran las diferencias estadísticas entre los grupos. El valor de P fue calculado utilizando el estadístico t-test.

	IVPH	CaCu	SANAS
POSITIVAS	2	9	0
NEGATIVAS	27	16	20
TOTAL	29	25	20

Tabla 12. Datos de la población de IVPH, CaCu y control para el péptido 21 de la proteína L1 de HPV-18, mostrando el número de pacientes positivas y negativas tomando de referencia el valor de corte para la positividad.



OR	0.000	0.000
95% CI	*0.000-0.038	*0.000-0.445
Valor de P	0.0005	0.017

Grafico 9. Respuesta de anticuerpos contra el péptido 23 de la proteína L1 de HPV-18 en el suero de mujeres sin evidencia de infección por HPV (control), pacientes con Cacú y pacientes con IVPH. La media de cada grupo esta representada por la línea negra continua. El valor de corte es de 0.846 indicado por la línea negra punteada. Se muestran las diferencias estadísticas entre los grupos. El valor de P fue calculado utilizando el estadístico t-test. * Diferencia significativa vs población control.

	IVPH	CaCu	SANAS
POSITIVAS	25	8	0
NEGATIVAS	4	17	20
TOTAL	29	25	20

Tabla 13. Datos de la población de IVPH, CaCu y control para el péptido 23 de la proteína L1 de HPV-18, mostrando el número de pacientes positivas y negativas tomando de referencia el valor de corte para la positividad.

10. DISCUSION

Diversos estudios epidemiológicos concuerdan que el cáncer cérvico-uterino tiene una fuerte asociación con la infección por HPV, principalmente por los tipos HPV-16 y 18, que en conjunto se encuentran en alrededor del 75% de los tumores (Muñoz N *et al*, 2004), lo cual hace factible que proteínas derivadas de estos virus, ya sea de transcripción temprana E1, E2, E3, E4, E5, E6, y E7, o de transcripción tardía L1 y L2, puedan ser blancos potenciales para la detección de anticuerpos contra estas proteínas en pacientes con infecciones cervicales (Rocha *et al*, 2004; Vazquez-Corsa *et al*, 2003).

Las proteínas virales de transcripción tardía L1 y L2 constituyen la cápside de los HPV en una proporción de 9 a 1 aproximadamente, y juegan un papel importante en el proceso de infección de las células del epitelio cervical (Stubenrauch y Laimins, 1999; Shepherd *et al*, 1996). La proteína L1 constituye la mayor parte de superficie de contacto del virión, por lo que este sitio es importante para su reconocimiento por el sistema inmune durante la persistencia de infección genital por HPV (Karem *et al*, 2002).

Se ha estipulado que después de seis meses de la persistencia de la infección por HPV, es posible detectar anticuerpos específicos hacia componentes de la cápside o cubierta viral, principalmente hacia la proteína L1 (Gallowey *et al* 2003), por tanto, la presencia de anticuerpos específicos hacia proteínas de la cápside pueden dar un fuerte indicio de infecciones por HPV pasadas y persistentes. En este contexto, varios ensayos inmunológicos han sido desarrollados para la detección de anticuerpos específicos hacia la proteína L1. La mayoría se han basado en el uso cápsides intactas de los viriones de HPV-16, a través de partículas sintéticas similares a virus o VLPs. En varios estudios serológicos, usando principalmente VLP de HPV-16 (Carter *et al*, 1996; Kirnbauer *et al*, 1996), se ha demostrado que la infección con *papillomavirus* genitales es seguida por una respuesta inmune humoral a las proteínas de la cápside viral y que los anticuerpos anti-VLP pueden ser indicadores de infecciones pasadas y presentes. Los anticuerpos anti-VLP se asocian con detección persistente del ADN y permanecen detectables en el suero por varios años (Wideroff *et al*, 1995; De Gruijl *et al*, 1997; Combata *et al*, 2003). Además el resultado de estos ensayos ha mostrado la detección de anticuerpos dirigidos hacia sitios conformacionales altamente específicos de las VLPs utilizadas para su detección (Zur Hausen 2002; Calvo *et al*, 2003 y Combata *et al*, 2002). Por otro lado, muy pocos estudios se han enfocado hacia la identificación de epítopes lineales de la proteína L1 de HPVs, cuya reactividad de anticuerpos ha sido limitada principalmente hacia HPV-16 (Heino *et al*, 1995 y Urquiza *et al* 2005).

En un estudio hecho recientemente, nuestro grupo de investigación identificó una secuencia lineal (IHSMNSTIL) de la proteína L1 de HPV-16, el cual fue altamente reconocido por anticuerpos presentes en sueros de mujeres que cursan con infecciones por HPV de alto riesgo (Rocha *et al*, 2004). La alta homología del péptido IHSMNSTIL, denominado también P10, con secuencias presentes en la proteína L1 de diferentes tipos de HPV de alto riesgo, explica la reactividad encontrada en los sueros de mujeres infectadas con diferentes tipos de HPV de alto riesgo. Un aspecto importante de este péptido es que forma parte de una región alfa hélice ($\alpha 2$ - $\alpha 3$) de la proteína L1 de HPV-16, la cual interacciona con las alfa hélices $\alpha 4$ - $\alpha 5$ de otra proteína L1 para formar los amarres de 5 unidades de L1 que constituyen cada uno de los capsómeros de la estructura icosaédrica del virión, por lo que varias de estas regiones quedan expuestas al reconocimiento por anticuerpos. En consecuencia, en el presente estudio se hizo un análisis de la reactividad de anticuerpos presentes en el suero de mujeres con infecciones por HPV hacia varios péptidos distribuidos en la región comprendida entre las alfa hélices $\alpha 1$ - $\alpha 5$ de la proteína L1 de HPV-16 y 18, tomando en consideración su homología con secuencias presentes en diferentes tipos de HPV (Tabla 3).

De acuerdo con los resultados obtenidos, los péptidos P6 y P10 presentes en las regiones $\alpha 5$ y $\alpha 2$ -3 de HPV-16, así como los péptidos 13 y 23 de las mismas regiones en HPV-18, fueron los de mayor reconocimiento por anticuerpos presentes en sueros de mujeres con IVPH y con CaCu, lo cual nos sugiere que estas regiones además de estar expuestas en la estructura del virión, constituyen epítopes fuertemente reconocidos durante el proceso infeccioso, generando anticuerpos de memoria, como los IgGs detectados en este estudio. En nuestro estudio, también destaca la alta reactividad de anticuerpos IgG de las pacientes con IVPH y CaCu hacia el péptido P10, con promedios de absorbancia de 2.3 y 1.5 respectivamente, sugiriendo que este péptido corresponde a un determinante antigénico muy importante en la proteína L1 de HPV-16. Cabe mencionar que en un estudio previo el péptido p10 (IHSMNSTIL) y su homólogo p23 (IHSMNSSIL) fueron péptidos altamente antigénicos para estimular linfocitos T citotóxicos de pacientes positivos a la infección con HPV-16 y 18 y para el alelo de histocompatibilidad HLA-B39 (Monroy *et al*, 2002). La antigenicidad de la región situada entre $\alpha 2$ - $\alpha 3$ de la proteína L1 de HPV-16 y 18 parece radicar específicamente en la secuencia IHSMNSTIL o IHSMNSSIL, ya que en un estudio realizado en 1990 por J Dillner (Dillner *et al*, 1990), quien encontró una predominante respuesta de IgAs, más que de IgM e IgG, hacia epítopes lineales de E2 y de L1 de HPV-16 en pacientes con neoplasias cervicales intraepiteliales (NIC's), mostró que en el péptido de 20 aminoácidos que incluye a la secuencia del péptido 10 (IHSMNSTIL), no mostró reactividad, muy probablemente atribuible a la longitud y conformación del péptido utilizado, influenciando así su reconocimiento.

Más recientemente, en otro estudio realizado por Urquiza et al, 2005, utilizaron un péptido control de 23 aminoácidos "18299" el cual contiene 6 aminoácidos de la porción amino terminal del péptido P10 y tampoco encuentran reactividad de los sueros de las pacientes analizadas, confirmando entonces una reactividad conformacional más que secuencial en la medida de que los péptidos utilizados para la detección de anticuerpos son más largos.

11. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Finalmente, debido a la alta reactividad encontrada en sueros de pacientes con infección por HPV y en pacientes con CaCu hacia el péptido P10 (IHSMNSTIL) al igual que a los péptidos P6 (KYTFWEVNL), P13(QLFNKPYWL) y P23(IHSMNSSIL) nos permite concluir que dichos péptidos, en especial el P10, puede ser un determinante antigénico de gran utilidad para la detección de anticuerpos de memoria en mujeres que han sido expuestas a infecciones producidas por virus de alto riesgo, lo cual puede ayudar al diagnóstico de la infección por HPV. Para lo cual debe optimizarse un método de detección utilizando este péptido y ampliando el número de muestras a estudiar.

Por otro lado, ante la inminente llegada de la vacuna profiláctica compuesta por VLP`s de HPV-16 y 18, será de gran interés conocer si a través de este péptido es posible monitorear la respuesta inmune de personas vacunadas y correlacionarla con la protección que confiere la vacunación.

12. APÉNDICE

Preparación de las soluciones amortiguadoras:

Preparación del buffer carbonato de sodio -bicarbonato a pH de 9.6 para 1l de agua.

-solución A: pesar 5.29g de carbonato de sodio y agregarlos en 500ml de agua destilada.

-solución B: pesar 4.2g de bicarbonato de sodio y agregarlos en 500ml de agua destilada.

Adicionar la solución A a la solución B y homogenizarlos perfectamente y ajustar a un ph de 9.6. Conservar a una temperatura de 4°C

Preparación del buffer TBS

-pesar 6.5g de tris base, 8.7g de cloruro de sodio verterlos en 1l de agua destilada homogenizarlos perfectamente y ajustar a un ph de 7.6. Conservar a una temperatura ambiente o de 4°C.

Preparación de la solución bloqueadora

TBS + Tween 20 al 0.5% + BSA al 2%. Conservar a una temperatura de 4°C.

Preparación de dietanolamina al 10%

Tomar 10ml de dietanolamina y vertirlos en 90ml de agua destilada homogeneizarlos y ajustar a un ph de 9.8. Conservar a una temperatura de 4°C. (Fernandez, 2001)

ABREVIATURAS

HPV	Virus del Papiloma Humano.
CaCu	Cáncer Cérvico-Uterino.
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad.
HLA	Antígeno Leucocitario Humano.
NIC	Neoplasia Intraepitelial.
CPA	Células Presentadoras de Antígeno.
Ig	Inmunoglobulina.
L	Gen de Transcripción Tardía.
E	Gen de Transcripción Temprana.
IVPH	Infección por Virus del Papiloma Humano.
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
Ag	Antígeno.
Ac	Anticuerpo.
VLP	Partícula Propia del Virus.
ELISA	Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a una Enzima.

ABREVIATURAS DE LOS AMINOÁCIDOS

A	Alanina	M	Metionina.
B	Asparagina.	N	Asparagina.
C	Cistaína.	P	Prolina.
D	Aspartato.	Q	Glutamina.
E	Glatamato.	R	Arginina.
F	Fenilalanina.	S	Serina.
G	Glicina.	T	Treonina.
H	Histidina.	V	Valina.
I	Isoleucina.	W	Triptofano.
K	Lisina.	Y	Tirosina.
L	Leusina.	Z	Glutamato.

13. BIBLIOGRAFIA

- Abbas, Lichtman. Inmunología Celular y Molecular. 5ª Edición. Ed. Saunders-Elsevier. 2004. pp 4, 11, 126-129.
- Alonso RP, Lazcano PEC, Hernández AM. Cáncer Cérvico-Uterino. Diagnostico prevención y control. Ed. Médica Panamericana. México. 2000. pp. 57-66.
- Austyn M. J. And Kathryn J. Wood. Principles of Cellular and Molecular Immunology, Ed. Oxford University Press. 1993. pp. 50-57.
- Bartholomew JS, Glenvillie S, Sarkar S, Burth DJ, Stanley MA, Ruiz CF, Chengang J, Garrido F, Stern PL. Integration of high-risk human papillomavirus DNA is linked to the downregulation of class I human leucocyte antigen by steroid hormones in cervical tumor cells. *Cancer Res.* 1997. 57: 937-942.
- Berumen,C.J ;Villegas, N. Vacunas terapéuticas recombinantes contra el cáncer del cuello uterino *Salud Publica Mex* 1997. 39:288-297.
- Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M. Prevalence of human Papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Nat Cancer Inst* 1995.11(87):797-801.
- Breitburd F, Kirnbauer R, Hubbert NL, Nonnenmacher B, Desmaret C, Orth G, et al. Immunization with virus like particles from cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) can protect against experimental CRPV infection. *J. Virol.* 1995. 69:3959–3963.
- Calvo JC, et al. An alpha helix conformationally restricted peptide is recognized by cervical carcinoma patient´s sera. *J Med. Chem.* 2003. 46: 5389-5394.
- Carter J, Koutsky L, et al. The natural history of human papillomavirus type 16 capsid antibodies among a cohort of university women. *J Infect. Dis* 1996. 174: 927-936.
- Carter J, Koutsky L, Hughes J, Lee S, Kuypers J, Kiviat N, & Galloway D. Comparison of human papilomavirus types 16, 18 and 6 capsid antibody responses following incident infection. *J Infect Dis.* 2000. 181:1911-1919.

- Chen S, Garcea R, Golberg I, Casini G, Harrison S. Structure of small Virus-like Particles Assembled from the L1 Protein of Human Papillomavirus 16. *Molecular Cell*. 2000. 5: 557-567.
- Cómbita AL, Touze A, Bousarghin L, Christense N, Coursaget P. Identification of Two Cross-Neutralizing Linear Epitopes within the L1 Major Capsid Protein of Human Papillomaviruses. *Journal of Virology*. 2002. 76 (13): 6480-6486.
- Cómbita AL, Touzé A, Coursaget P, Bravo MM. Respuesta serológica hacia las cápsides de los papilomavirus oncogénicos tipos 16, 18, 31, 33, 39, 58 y 59 en mujeres colombianas con cáncer de cérvix invasivo. *Rev Col Cancerología*. 2003; 7:26-34.
- Crum CP, Barber S, Roche J. Pathobiology of papillomavirus-related cervical diseases: prospects for immunodiagnosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 1991. 4(3): 270-285.
- De Gruijl TD, Bontkes HJ, Walboomers JM, et al. Immunoglobulin Responses against human papillomavirus type 16 virus like particles in a prospectiv nonintervention cohort study of woman with cervical intraepiteliel neoplasia. *J Natl. Cancer Inst*. 1997. 89: 630-638.
- Dillner et al. Mapping of linear epitopes of human papillomavirus type 16: the L1 and L2 open reading frames. *Inst. J. Cancer*. 1990. 45: 529-535.
- Fernandez Botran R, Vaclau Ph. *Celullar Immunology*. 2da edición. Edit CRC Press. 2001. New York. pp 213-227.
- Galloway D. Papillomavirus vaccines in clinical trials. *The lancet infectious Diseases*. 2003. 3: 469-475.
- Granoff RG, Webster. *Encyclopedia of Virology* vol. 2, 2 Edition. Ed. Academic Press. 1999. pp. 1105-1120.
- Heino P, Skyldberg B, Rantala I, Hagmar B, Kreider R, Kirnbauer R, and Dillner J. Human papillomavirus type 16 capsids expose multiple type-restricted and type-common antigenic epitopes. *J. Gen. Virol*. 1995.76: 1141-1153.
- Howley PM. Role of the human Papillomeviruses in human. *Cancer Res*. 1991. 51:5019-5022.

- Jacobs MV, Roda Husman AM de, Brule AJ van der. Group- -specific between high and low risk human Papillomavirus genotypes by general primer mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes. *J Clin Microbiol* 1995. 3 (4):901-905.
- Janeway CA and Travers P. *Immunobiology the immune system in health and disease*. Ed. Curr. Biol. Limit. New York. USA. 1997. pp. 254.
- Karem KL, Poon AC, Bierl C, Nisenbaum R, Unger E. Optimization of a human papillomavirus- specific enzyme –linked immunosorbent assay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2002. 9: 577-582.
- Karlsen F, Kristensen G, Holm R, Chitemerese M, Berner A, Hagmar BM. High incidence of human Papillomavirus in 146 cervical carcinomas. A study using three different consensus primers, and detecting viral genomes with putative deletions. *Eur J Cancer* 1995: 9(31):1511-1516.
- Kawana K, Yasugi T, Kanda T, Kawana Y, Hirai Y, Yoshikawa H, et al. NABs against oncogenic human papillomavirus as a possible determinant of the fate of low-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002. 9; 296(1):102-105.
- Kirnbauer R, Chandrachud LM, O'Neil BW, Wagner ER, Grindlay GJ, Armstrong AA et al. Virus-like particles of bovine papillomavirus type 4 in prophylactic and therapeutic immunization. *Virology* 1996. 219: 37-44.
- Kisseljov F. L. *Virus-Associated Human Tumors: Cervical Carcinomas and Papilloma Viruses*. Biochemistry (Moscow). 2000. Vol 65 N°1; 68-77.
- LeCann P, Chabaud M, Leboulleux D, & 7 other authors. Detection of antibodies to L1, L2, and E4 proteins of human papillomavirus types 6, 11, and 16 by ELISA using synthetic peptides. *J Med virol.* 1995. 45: 410-414.
- Manos M, Ting Y, Wright D, Lewis A, Broker T, Wolinsky S. Use of polimerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer.* 1989. 7: 209-214.
- Margaret FDK, Brown DM, Stacey NS and Stem LP. Papillomavirus vaccines. *Front. Bios.* 1998. 3:1192-1208.
- Massimi P et al. Interaction between the HPV-16 E2 transcriptional activator and p53. *Oncogene* 1999. 16; 18 (54): 7748-54.

- Monroy G, Weiss SA, Hernandez MJ, & 10 other authors. Identification of Two Homologous antigenic peptides derived from L1 HPV-16 and 18 proteins specific for the HLA-B 3901 allele. Arch Virol. 2002.147: 1993-1942.
- Moreno RJ. Respuesta Inmune y Mecanismos de autoinmunidad. Ed. Limusa. México. 1996. pp 112-115.
- Mougin Ch. Et al. Papillomavirus humains, cycle cellulaire et cancer du col de l'utérus. J Gynecol Obstet Biol Reprod. 1999. 29: 13-20.
- Muñoz N. and Bosch Fx. Cervical cancer and human papilomavirus: Epidermiological evidence and perspectives for prevention. Salud pub. Mex. 1997. 39:274-282.
- Muñoz, N et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. 2003. N.Engl. J Med. 348, 518-527.
- Nossal G. Sistema inmunitario entre la vida y la muerte. Invest. Cien. Nov: 1993. pp. 9-12.
- Panduro A. Biología Molecular en la clinica. Ed. McGraw-Hill Interamericana. México. 2000. pp 131-134.
- Parkin DM, Pisan P, Muñoz N, Ferlay J. Tha global burden of infection associated cancers. Cancer surveys. 1999. 33: 5-33.
- Paul WE. Fundamental Immunology. 3a Edición. Ed. Raven Press. N.Y. USA. 1993. pp 1122-1128.
- Ratcliffe DR, Nolin SL, Cramer EB. Neutrophil interacción with influenza-infected epithelial cell. Blood. 1998.72:142-149.
- Rocha Z, Ambrosio P, Mora G, Cruz F, Hernandez M, Weiss B, Ortiz V, Monroy A. Detection of antibodies against a human papillomavirus (HPV) type 16 peptide that differentiate high-risk from low-risk HPV-associated low-grade squamous intraepithelial lesions. Journal of General Virology. 2004.85: 1-8.

- Rocha Zavaleta L, Pereira suarez A, Garcia Carranca A, Cruz Talonia F. Mucosal IgG and IgA responses to human papillomavirus type 16 capsid proteins in HPV 16- infected women without visible pathology. *Viral immunol.* 2003.16, 159-168.
- Roitt IM. *Inmunología Fundamentos.* 10ª edición. Editorial Médica panamericana. 2003. pp 177-178, 204.
- Sasagawa T, Pushko P, Steers G, Grschmeissner SE, Hajibagheri MA, Finch J, et al. Synthesis and assembly of virus-like particles of human papillomaviruses type 6 and type 16 in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Virology* 1995. 206:126-135.
- Secretaria de salud 2004. Principales causas de mortalidad general y en edad productiva, Estados Unidos Mexicanos 1999. Pagina en internet de la secretaria de salud (<http://www.ssa.gob.mx>).
- Shepherd PS, Rowe JA, CJ, Coletrart T, Wilson P and Lux CJ. Proliferative T cell responses to human papillomavirus type 16 L1 peptides in patients with cervical dysplasia. *J. Gen. Virol.* 1996. 77: 593-602.
- Stephen Man. Human cellular immune responses against human papillomaviruses in cervical neoplasia. *Exp Rev in Mol Med.* 1998. 1-19.
- Storey A, Osborn K, Crawford L. Co-transformation by human papillomavirus type 6 and 11. *J. Gen Virol.* 1990. 71:165-171.
- Stubenrauch F and Laimins LA. Human Papillomavirus Life Cycle: Active and Latent Phases. *Cancer Biol.* 1999. 9:379-386.
- Suzich JA, Ghim SJ, Palmer-Hill FJ, White WI, Tamura JK, Bell JA, et al. Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. 92:11553-11557.
- Tindle, RW. Immune evasion in human Papillomavirus-associated cervical cancer. 2002. *Nature Rev. Cancer* 2: 59-65.
- Tindle RW. Human Papillomavirus vaccines for cervical cancer, current opinion in immunology. 1996; 8:643-650.

- Urquiza M, Guevara T, Espejo F, Bravo M, Rivera Z, Patorroyo M. Two L1-peptidos are excellent tools for serological detection of HPV-associated cervical carcinoma lesions. Elsevier 2005.vol 332. pp 224-232.
- Van Furth R. Cell Biology of Molecular Phagocytes. In: Hematopoietic Growth Factor and Molecular Phagocytes. R. Van Furth. Ed Basel: Karger. 1993. Pp. 1-9.
- Vazquez Corso S et al. Asociación entre la presencia de anticuerpos anti-Ras y anti- VPH 16 E4/E7 y lesiones intraepiteliales del cervix. Salud Pública de Méx. 2003. 45 (5): 335-345.
- Venuti A, Badaracco G, Marcante ML. Detection and typing of human Papillomavirus by single hybridization. J Virol Methods 1995. 51:115-24.
- Walboomers JM, Jacobs Mv, Manos MM, Bosch Fx, Kummer JA, Shah Ku, Snijders Pj, Peto J, Meijer Cj, Muñoz N. Human Papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol. 1999.189:12-19.
- Wang L. Developing countries put cervical cancer test to the test, Journal of the National Cancer Institute. 2002.94:245-247.
- Wang Z, Hanson B, Fourslund O, Dillner L, Sapp m, Schiller J, Bjerre B & Dillner j. Cervical Mucos antibodies against human papillomavirus type 16, 18 y 33 capsids in relation to presence of viral DNA. J Clin Microbiol. 1996. 34: 3056-3062.
- Wang ZH, et al. Type specificity and significance of different isotypes of serum antibodies to human papillomavirus capsids. The Journal of Infectious Diseases. 2000. 181: 456-462.
- Webster K. et al. The human papillomavirus (HPV) 16 E2 protein induces apoptosis in the absence of other HPV proteins and via a p53-dependent pathway. J Biol Chem 2000. 275 (1): 87-94.
- Weissman YL, Max DC. Formación y desarrollo del sistema inmunitario. Invest. Cien.Nov. 1993: pp. 12-25.
- Wideroff L, Schiffman MH, et al. Evaluations of seroreactivity to human papillomavirus type 6 and virus-like particles in an incident case-control study of cervical neoplasia. J. Infect. Dis. 1995. 172: 1425-1430.

- Yamada T, Wheeler CM, Halpern AL, Stewart ACM, Hildesheim A, Jenison SA. Human papillomavirus-16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments. *J Virol.* 1995. 69:7743-7753.
- Zur Hausen H: Papillomaviruses and cancer:from basic studies to clinical application. *Nature Publishing Group.* 2002. 2:342-350.