

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**ANÁLISIS INMUNOGÉNICO DEL PÉPTIDO IHSMNSTIL DERIVADO DE LA PROTEÍNA L1 DE HPV-16 Y DE SUS HOMÓLOGOS DERIVADOS DEL HPV-18, -31, -33, -52, -58, -6 Y -11 EN RATONES BALB/c**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**ORTIZ SALAZAR ROGELIO ARNOLDO**

**DIRECTORA DE TESIS: Dra. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA**

**JURADO DE EXAMEN: Dr. ALBERTO MONROY GARCÍA**

**Dr. RUBÉN MARROQUÍN SEGURA**

**Q.F.B. FRANCISCO JAVIER PARADA GARCÍA**

**M en C. RAQUEL RETANA UGALDE**

**Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer; Laboratorio de Inmunobiología (L-326), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México**

**MÉXICO, 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

A DIOS TODO PODEROSO POR SU INFINITO AMOR, POR SU CREACIÓN Y POR LA OPORTUNIDAD DE SER DE VIVIR DE EXISTIR A EL SEA EL HONOR Y LA GLORIA POR LOS SIGLOS DE LOS SIGLOS AMEN

A MIS PAPAS. POR SU AMOR, POR SU PACIENCIA, TOLERANCIA Y RESPETO A LO QUE SOY A LO QUE ME ENSEÑARON, POR LO QUE A VECES HACEN POR NUESTRO BIEN Y NO ENTENDEMOS. POR ENSEÑARME QUE LAS COSAS NO SON FÁCILES PERO QUE CON DIOS Y CON EL ESFUERZO SE PUEDEN LOGRAR MARAVILLAS ESTE TITULO NO ES MÍO DE L TODO ES EN GRAN PARTE ESFUERZO DE USTEDES MIL GRACIAS ROSALIA, MIL GRACIAS ARNOLDO

A MI HERMANO. AUN QUE SOMOS DIFERENTES EN MUCHAS COSAS EN VERDAD TE AMO Y SIEMPRE ESTARÉ AHÍ TU LO SABES, POR TU APOYO ARTURO

A MI CORAZÓN DE POLLO. POR SER DIVERTIDO Y POR SER ESA LUCECITA QUE DIOS NOS MANDO. NUNCA DEJES DE SORPRENDERTE Y DE REÍR TE AMO MAXIMILIANO

A LA TRIX. POR OCUPAR UN LUGAR DENTRO DE MI FAMILIA Y POR SER LA MAMÁ DE MAXIMILIANO, GRACIAS CECILIA

AL DR ALBERTO. DRA LOURDES, M en C JORGE. QUE ME AYUDARON Y BRINDARON TODO SU APOYO EN LA REALIZACIÓN DE ESTA TESIS ,GRACIAS POR DARME LA OPORTUNIDAD DE SER PARTE DE ESTE GRAN GRUPO DE INVESTIGACIÓN Y POR SU TOLERANCIA, RESPETO Y AMISTAD SINCERA

AL FOCOLAR DE LA CIUDAD DE MÉXICO, POR DEMOSTRARME EL AMOR DE DIOS EN MUCHAS FORMAS CON SUS ACTOS, CON LAS LECTURAS Y SOBRE TODO SU PROVIDENCIA Y AMOR RECIPROCO (JUAN BADIA, PAULO FALCAO, ANDREA DI BAROLO, ANTONIO FERREIRA, VÍCTOR, EMILIO, LUIS ALONSO, MARIO, IVÁN Y PERDÓN SI OMITO A ALGUIEN)

AL Sr. BRUNO POR SU DESPRENDIDA FORMA DE SER Y POR SU APOYO QUE DIOS LO BENDIGA GRACIAS CON TUTO IL CUORE (perdón por mi incorrecto Italiano)

A LOS GEN POR LOS MOMENTOS QUE VIVIMOS JUNTOS POR SU AMISTAD (DAVID REY, VÍCTOR REY, MARCELINO, SONY, ABRAHAM, LOS HERMANOS SÁNCHEZ, ETC)

A MI COMUNIDAD PADRE DAMIÁN POR SU AMOR Y ORACIONES

A TODOS LOS ADMINISTRATIVOS DE LA FACULTAD EN ESPECIAL A QUIEN LLEVA LOS TRAMITES DE TITILACIÓN POR LA PACIENCIA Y LA AYUDA

A LOS HERMANOS PLATA POR SU AMISTAD Y A TODOS LOS DE LA PLANTA Y CERFYS

AL MAESTRO JOSÉ NUÑEZ POR SU AMISTAD Y ESTAR PENDIENTE DE MI

A MIS SINODALES QUE SE TOMARON LA MOLESTIA DE LEER ESTA TESIS Y POR SUS COMENTARIOS OBJETIVOS, GRACIAS POR ENRIQUECERLA

A ULISES, NUBEL, MARISOL, MICHEL-EK, PATY, SAÚL, NANCY, ÁNGEL, NOÉ, PAU, DAN, DULCE, PRISCILA, PAMELA, ANDREA, ARTURO, OCTAVIO, ALFREDO, EVELIN, ITZEL, OSVALDO, Dr. EDELMIRO, POR SU AMISTAD Y APOYO.

RAÚL OCOTILLA, ANDRÉS, NATALIA, TADEO, JAZMÍN, DENIS, RODRIGO, MARIA INÉS, CAROLINA, SERGIO, CARMELO SAN, LETICIA, MARQUITOS, PERLA, ELIZABETH

## ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo = Inmunoglobulina
ADN	Ácido desoxiribonucleico
Ag	Antígeno
CaCu	Cáncer cérvico-Uterino
CPA	Célula presentadora de antígenos
CP	Célula (plasmática) secretora de anticuerpos
HPV	Virus del Papiloma Humano
LB	Linfocito B
LT	Linfocito T
NIC	Neoplasia intracervical
VLP's	Partículas similares a virus

## ABREVIATURAS DE LOS AMINOACIDOS

A	Alanina	T	Treonina
V	Valina	C	Cisteína
L	Leucina	Y	Tirosina
I	Isoleucina	N	Asparagina
P	Prolina	Q	Glutamina
F	Fenilalanina	D	Ácido aspártico
W	Triptófano	E	Ácido glutámico
M	Metionina	K	Lisina
G	Glicina	R	Arginina
S	Serina	H	Histidina

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunobiología (L-326) de la Unidad de Investigación en Diferenciación celular y Cáncer; Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México

**ESTE TRABAJO FUE FINANCIADO POR LOS PROYECTOS:**

DGAPA-PAPIIT:

IN215703  
IN212506-3

CONACYT:

47615-Q

SILANES-FUNSAUD:

No.536

Para la realización de ésta investigación

## ÍNDICE

	paginas
Resumen	6
Introducción	7-8
Marco teórico	9
Etiología del cáncer cérvico-uterino	9-10
Características de los virus del papiloma humano	10-13
Ciclo de vida de los papiloma humano	13-15
Respuesta inmune y cáncer cérvico-uterino	16
Infección por HPV y su control por el sistema inmune	16-19
Vacunas contra la infección por HPV	20-23
Planteamiento del problema	24
Objetivos	25
Hipótesis	26
Material y métodos	27-29
Diagrama de flujo	30
Resultados	31-42
Análisis de resultados	43-45
Conclusiones	46
Perspectivas	47
Anexo	48
Referencias	49-55

## RESUMEN

El péptido IHSMNSTIL derivado de la secuencia 417-425 de la proteína L1 de HPV-16, ha sido identificado por nuestro grupo de trabajo, como un epítoto que induce activación de linfocitos T en pacientes con el alelo HLA-B\*039 y con infección de HPV-16 y 18. En este sentido se ha observado que en mujeres infectadas con HPV's de alto riesgo, independientemente del haplotipo HLA de histocompatibilidad, muestran anticuerpos IgA e IgG presentes en secreciones cervicales y sueros de sangre periférica, lo que sugiere que este péptido corresponde a un determinante antigénico para la activación de linfocitos T y linfocitos B durante la infección por HPV. La alta homología (>80%) del péptido IHSMNSTIL con secuencias encontradas en la proteína L1 de varios HPV's de alto riesgo, hace suponer que este péptido es un epítoto común entre los diferentes tipos de HPV de alto riesgo. En el presente estudio, en un modelo *in vivo*, utilizando ratones de la cepa Balb/c, se analizó la capacidad inmunogénica, a través de la inducción de anticuerpos específicos, mediante la inmunización con el péptido IHSMNSTIL (P16) y sus homólogos pertenecientes a la proteína L1 de virus de alto riesgo como HPV-18 (IHSMNSSIL) (P18); HPV-31 (IHSMNPAIL) (P31); HPV-33 (IHAMNPDIL) (P33); HPV-52 (IHKMDATIL) (P52); HPV-58 (IHTMDSNIL) (P58); o de bajo riesgo como HPV-6 (IHTMNPSVL) (P6) y HPV-11 (IHTMNPSVL) (P11) que se asocian con lesiones malignas y benignas del epitelio cervical respectivamente.

Después de aplicar 4 dosis de 100 µg de péptido durante aproximadamente 40 días, se lograron obtener altos títulos de anticuerpos específicos hacia cada péptido antigénico. A través de análisis de ELISA, se observó que los anticuerpos específicos al péptido P16 mostraron alta reactividad cruzada de reconocimiento hacia los péptidos homólogos derivados de los HPV's de alto riesgo (P18, P31, P33, P52, P58) y en menor grado hacia los péptidos P6 y P11 de bajo riesgo. Por otro lado, anticuerpos específicos al péptido P16 y a los homólogos derivados de la proteína L1 de HPV's de alto riesgo: P18, P31, P33, P52 y P58 reconocieron fuertemente a VLP's de la proteína L1 de HPV-16, mientras que anticuerpos obtenidos de ratones inmunizados con VLP's tuvieron baja reactividad hacia el péptido P16 y sus homólogos. Estos resultados permiten sugerir que el péptido P16 y sus homólogos son sitios importantes de reconocimiento por anticuerpos en la estructura de la proteína L1 de estos tipos de HPV, además de que este sitio antigénico es potencialmente expuesto en la estructura conformacional de las VLP's de la proteína L1 de HPV-16, por lo que resulta trascendental saber el papel neutralizante de estos anticuerpos hacia partículas virales infecciosas, lo cual será de gran importancia para conocer su uso potencial en la constitución de vacunas de tipo profiláctico contra esta enfermedad.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer cèrvico-uterino (CaCu) representa la neoplasia de mayor incidencia en la población femenina, constituye una de las principales causas de muerte de cáncer en el país y se ha calculado que 16 mujeres mueren diariamente por este tipo de cáncer <sup>(1)</sup>. Una gran cantidad de estudios llevados a cabo a nivel mundial, indican que uno de los factores etiológicos más importantes asociados al desarrollo del CaCu es la infección por el virus del papiloma humano (HPV) de alto riesgo, el cual de acuerdo con algunos estudios, se ha encontrado presente en casi todos los tumores de cáncer cervical (99.7%) <sup>(2-5)</sup>, siendo los principales tipos: HPV-16, -18, -31, -33, -39, -45, -52, -58 y -69 <sup>(6-8)</sup>. En nuestro país se ha estimado que el HPV-16 se encuentra en el 50% de los casos; el HPV-18 en el 15%; los HPV-31, 33 y 35, en conjunto, el 12%; y otros tipos virales, en el porcentaje restante <sup>(1, 7-9)</sup>. Asimismo, en México y en la mayoría de los países en vías de desarrollo, la infección por virus papiloma humano y la incidencia de cáncer cèrvico-uterino se incrementan día a día, debido a que la infección por HPV es asintomática y se mantiene latente por períodos largos de tiempo. Además se ha estimado que cerca del 60% de la población sexualmente activa está infectada por algún tipo de HPV, por lo que el contagio se propaga constantemente <sup>(7-8)</sup>. Esta situación, ha llevado a proponer en los últimos años, la generación de vacunas profilácticas y de métodos que permitan detectar y prevenir de manera oportuna la infección producida por HPV de alto riesgo.

Los HPVs están constituidos por una doble cadena de DNA que codifica para 8 proteínas (6 de transcripción temprana (E) y 2 de transcripción tardía (L). Este DNA esta envuelto por una cubierta o cápside constituida en aproximadamente 90% por la proteína estructural L1 y en el porcentaje restante por la proteína L2. <sup>(10)</sup>. De aquí que, las proteínas L1 y L2 están siendo utilizadas actualmente como antígenos para la generación de vacunas preventivas <sup>(11-12)</sup>. De hecho, la propiedad que tienen estas proteínas de auto ensamblarse cuando son expresadas en diferentes vectores (bacterias, células de insecto, células de mamífero, etc.), ha hecho posible la generación y purificación de partículas similares a virus (del inglés Virus Like Particles, VLP's) propias para inducir inmunidad en animales e individuos vacunados <sup>(11)</sup>. Varios estudios que han utilizado VLP's para vacunación, han mostrado la generación de anticuerpos capaces de neutralizar o inhibir la entrada de estos virus a células blanco <sup>(11-13)</sup>, no obstante estas respuestas han sido altamente específicas hacia el tipo particular de HPV del cual derivan las secuencias de las proteínas L1 y L2 <sup>(13)</sup>, lo cual hace necesario el uso de vacunas multivalentes para dar una mayor protección.

Por otro lado, nuestro grupo de investigación ha identificado que la secuencia 417-425 (IHSMNSTIL) de la proteína L1 de HPV-16, la cual es altamente conservada entre secuencias L1 de varios HPV de alto riesgo asociados a CaCu (HPV-16, -18, -31, -33, -52, -58 entre otros), es fuertemente reconocida por anticuerpos presentes en sueros de más del 90% de mujeres que cursan con infección por virus de papiloma humano de alto grado <sup>(14-15)</sup>, lo cual nos lleva a proponer que este péptido y sus homólogos puedan ser antígenos útiles para detectar infecciones producidas por HPVs de alto riesgo, así como considerar su uso potencial en la composición de vacunas de tipo profiláctico. En consecuencia, con la finalidad de analizar la capacidad inmunogénica del péptido IHSMNSTIL y de sus homólogos de las proteínas L1 de HPV-18, -31, -33, -52, -58 y -6/11, utilizamos el



modelo in vivo de ratones de la cepa Balb/c para analizar la generación de anticuerpos específicos y la capacidad de éstos para reconocer estructuras similares a virus compuestas por la proteína L1 de HPV-16 (VLP's de HPV-16).

## MARCO TEORICO

### 1.- CÁNCER CÉRVICO-UTERINO Y HPV.

#### Etiología del cáncer cérvico-uterino.

El cáncer cervical es uno de los más frecuentes en las mujeres, cada año son detectados 500 mil nuevos casos y alrededor de 250 mil mujeres mueren cada año en el mundo<sup>(16)</sup>. Actualmente la OMS reconoce al virus de papiloma humano (HPV) como el principal agente etiológico. La observación inicial dada por Zur Hausen al final de los años 70, de que la infección con el virus de papiloma humano era la responsable de cáncer cervical en humanos, fue subsecuentemente confirmada a través del tiempo al cruzar secciones y casos control en estudios epidemiológicos<sup>(12, 21)</sup>. Estas conclusiones junto con estudios llevados a cabo *in Vitro*, han permitido establecer los mecanismos moleculares que determinan que la infección con HPV promueve la inmortalización de células epiteliales e inicia el desarrollo de cáncer cervical<sup>(12,22-23)</sup>

Los estudios iniciales para determinar la etiología del cáncer cervical, se enfocaron en su asociación con muchas infecciones de transmisión sexual, incluyendo *Herpes simplex virus tipo 2*, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Cytomegalovirus*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Treponema pallidum*.<sup>(16)</sup> No obstante en estudios posteriores, con ayuda de técnicas de biología molecular, se han podido analizar y cotejar las secuencias de DNA de los diferentes tipos de HPV. En un estudio previo donde se analizaron cientos de muestras tumorales de 22 países, se observó que el HPV estuvo presente en el 93% (rango del 75% al 100%) de especímenes con cáncer cervical<sup>(8,16)</sup>. No obstante, en otro estudio hecho por Walboomers, mediante PCR para detectar 15 de los principales genotipos de alto riesgo (16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,68,73 y 82), se encontró que más del 99% de los casos de cáncer cervical fueron positivos para al menos uno de estos tipos de HPV<sup>(13,21)</sup>. Además se detectó infección en el 94 % de mujeres con lesiones cervicales preinvasivas; y en un 46% de las mujeres que habían mostrado una citología normal.<sup>(8,16)</sup> En adición al cáncer de cérvix, una buena proporción de cánceres anal, perianal, vulvar y de pene se encuentran fuertemente asociados con infecciones por HPV.<sup>(23)</sup> Varias evidencias epidemiológicas sugieren que estos tipos de cáncer son enfermedades transmitidas sexualmente, puesto que mujeres con múltiples parejas sexuales e inicio de vida sexual activa a edades tempranas y sin protección predisponen a la obtención de infecciones por HPV<sup>(16-17)</sup>. Otros factores adicionales como son el bajo estatus económico, la historia de reproducción, hábito de fumar, el uso de anticonceptivos orales, factores de dieta, la inmunosupresión y poca frecuencia para realizarse el Papanicolau pueden ser factores implicados en el riesgo de desarrollar neoplasia cervical<sup>(16-24)</sup>

En adición a los datos epidemiológicos, varias evidencias celulares y moleculares fundamentan la asociación de HPV con el desarrollo de cáncer cérvico-uterino tales como: 1) la presencia regular del DNA del HPV en tumores de biopsias en respectivos especímenes; 2) la demostración de la expresión de oncogenes virales (E6 y E7) en las células tumorales; 3) la identificación de las propiedades de transformación de estos genes; 4) el requerimiento de la expresión de E6 y E7 para el mantenimiento del fenotipo

maligno en las células de cáncer cervical; 5) la interacción de las oncoproteínas virales con las proteínas de regulación de la proliferación de la célula huésped.<sup>(24)</sup>

### **Características de los virus de papiloma humano.**

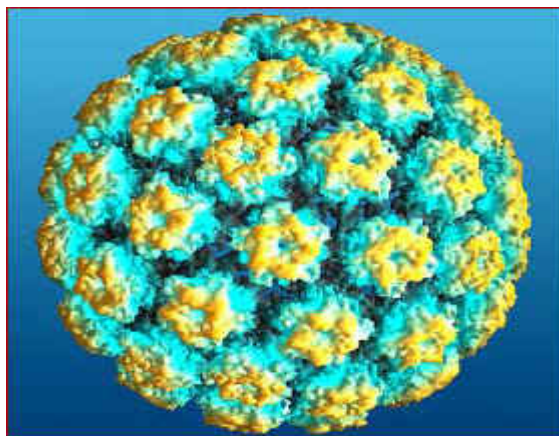
Se han identificado más de 100 tipos de HPV<sup>(8,25)</sup>, los cuales pueden infectar epitelios como el de la piel, en donde se ha identificado al HPV-1 y las mucosas como la de la región anogenital y el cérvix en donde se han identificado los tipos 11 y el 16. Los HPVs se clasifican en bajo y alto riesgo de acuerdo con el tipo de lesión que producen. Los virus de bajo riesgo, como el HPV-6,-11,-40,-42,-44,-54,-61,-70,-72,-81 y -CP6108, se asocian a lesiones benignas, que además de causar la verruga genital externa infectan el tejido cervical produciendo una lesión intraepitelial benigna o condiloma<sup>(8,25)</sup>. En el caso de los HPV de alto riesgo, existen 30 tipos de HPV identificados, siendo los más frecuentes el HPV-16 y el HPV-18 los cuales pueden infectar el epitelio cervical y progresar a neoplasia intraepitelial cervical de alto grado (HSIL o NICIII) o a cáncer.<sup>(8,25)</sup> Otros tipos de HPV entre ellos (HPV-26, 53 y 66) son considerados de riesgo intermedio y 12 más han sido clasificados de bajo riesgo. De los tipos de HPV de alto riesgo, aproximadamente el 50-60 % de los tumores de cáncer cérvico-uterino contienen HPV-16 y entre 10-20 % contienen HPV-18.<sup>(2)</sup>

Los virus de papiloma humano pertenecen a la familia *Papovaviridae* a la cual también pertenecen el virus del polioma de ratón (Po) y algunos virus vacuolizantes (Va), como el SV40 de monos. La familia Papovaviridae contiene 2 géneros: *Papillomavirus* y *Miopapovavirus*<sup>(27)</sup>.

Los virus del género *Miopapovavirus* son más pequeños que los anteriores, ya que su diámetro es alrededor de 40 nanómetros, pero el resto de características son las mismas, del otro género comprende los virus del polioma tipos virus BK, virus JC, y los virus vacuolizantes como el virus SV40<sup>(10,27)</sup>

Los virus del género *Papillomavirus* son pequeños, miden alrededor de 55 nanómetros de diámetro, ADN bicatenario, cápside de 72 capsómeros y simetría icosaédrica y no tienen envoltura.<sup>(27)</sup> (Figura 1). Tienen un peso molecular aproximado de  $5.3 * 10$  daltones<sup>(20)</sup>

La estructura icosaédrica de los HPV's está compuesta de 72 capsómeros, los cuales contienen 2 proteínas estructurales L1 y L2<sup>(28-29)</sup>. Cada capsómero está constituido por un pentámero de la proteína L1, proteína que conforma hasta un 90% de la cápside o cubierta del virus<sup>(30)</sup>. Mientras que la proteína L2 que se encuentra insertada internamente en la cápside y constituye el 10% de su composición.<sup>(22,31-32)</sup> Las proteínas de transcripción tardía L1 y L2, se asocian para constituir a las partículas virales infecciosas de la cápside, la cual envuelve al ADN circular de doble cadena<sup>(11)</sup>



**Figura 1: Estructura icosaédrica del HPV tipo 16. Tomada de [http://www.bch.bristol.ac.uk/staff/gaston/hpv/hpv\\_information.htm](http://www.bch.bristol.ac.uk/staff/gaston/hpv/hpv_information.htm)**

Los virus que pertenecen a la familia del papiloma tienen una estructura compuesta por una doble cadena de ADN circular que contiene aproximadamente 8,000 pares de bases<sup>(33)</sup>. El genoma viral contiene marcos de lectura abierta (open reading frames [ORF]), una región regulatoria 5' no codificante (upstream regulatory región [URR]), también llamada la región larga de control (long control región [LCR]). Esta región contiene sitios de unión para los factores de transcripción del ADN<sup>(34-35)</sup>. Los ORF pueden dar lugar a ocho diferentes proteínas (Figura 2): 6 proteínas de transcripción temprana (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) y 2 de transcripción tardía (L1 y L2). De las proteínas de transcripción temprana, las E1 y E2 se encargan de regular la replicación del ADN y ARN viral; mientras que las proteínas que intervienen en control del ciclo celular así como de la transformación celular son E4, E5, E6 y E7<sup>(34)</sup> (Tabla 1).

Los genes tempranos están expresados todo el tiempo dentro del ciclo viral, mientras que los genes tardíos solo son expresados durante la fase productiva en queratinocitos diferenciados.<sup>(35)</sup> En estadios tempranos de la infección por HPV existen interacciones proteína-proteína que alteran el ambiente celular, lo que permite la retención del genoma viral y crean un estado de inestabilidad genómica, la cual ayuda a la transformación celular<sup>(35-35)</sup>.

Asimismo la integración del genoma viral al hospedero es esencial para la progresión maligna y puede contribuir a la desregulación de la expresión de oncoproteínas virales requeridas para la tumorigénesis.<sup>(35)</sup>

La inmortalización celular debida a los HPV está restringida a los tipos de alto riesgo, y es inducida por la asociación de las proteínas E6 y E7 con proteínas celulares, que regulan el crecimiento celular<sup>(34)</sup>. La integración de E7 con la proteína supresora de tumores Retinoblastoma (p105Rb) y la E6 con el supresor de tumor p53, juegan un papel principal en estos procesos<sup>(36)</sup>

La proteína E6 de los HPV de alto riesgo se une a la proteína p53 y promueve su degradación por la ruta de ubiquitina. Recientes estudios han identificado una interacción

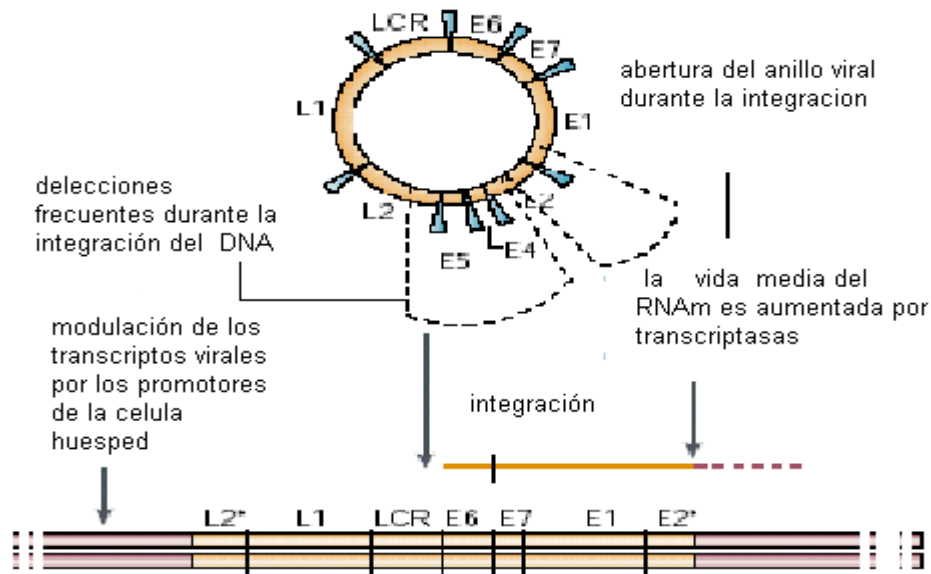
Entre la E6 de HPV16 y presuntas proteínas de unión a calcio que pueden ser importantes para la actividad transformante sobre p53<sup>(37)</sup>

Las proteínas E2, E4 y E5 de los papilomavirus, son importantes en varias funciones virales, incluyendo la transcripción y replicación, interacciones con el citoesqueleto, e inmortalización: la función de E4 es destruir la matriz del citoesqueleto; la función de E5 se localiza en los compartimentos de la membrana celular donde posiblemente interacciona con la señalización de factores de crecimiento<sup>(38-44)</sup>

**Tabla 1.** Funciones de los productos génicos del HPV

<b>Proteínas virales</b>	<b>Funciones</b>
<b>Tempranas</b>	
E1	Replicación del DNA viral y mantenimiento episomal
E2	Transcripción viral y replicación, transformación
E4	Modifica el citoesqueleto para permitir la liberación del virus
E5	Proteína transformante, inhibición de la degradación de EGFR
E6	Proteína transformante inactiva la proteína P53 e inhibe la apoptosis
E7	Proteína transformante interfiere con Rb y reactiva la síntesis de DNA del huésped.
<b>Tardías</b>	
L1 y L2	Principales proteínas de la cápside, L1 constituye el 90% y L2 el 10%.

EGFR: receptor del factor de crecimiento epidermal. Tomado de (Zur Hausen 2000, Huibregtse 1991, Munger K 1992, Di Maio D 1994, Chen J. J 1995, Syrjanen S M 1999 (33, 45-49).



**Figura 2.** La organización circular del DNA del HPV y la integración en el DNA de la célula huésped DNA. El genoma del papilomavirus (HPV) contiene entre 6800 y 8000 pares de bases y es dividido en ocho marcos de lectura abierta E6, E7, E1, E4, E5, L1, L2 y LCR, región larga de control del genoma viral. Tomado de Zur Hausen 2002 <sup>(50)</sup>, modificado por ORTIZ ROGELIO)

### Ciclo de vida de los virus de papiloma humano.

En los HPV existen por lo menos dos ciclos virales demostrados: 1.- La infección lítica y 2.- la infección lisogénica. En la infección lítica los HPV llegan a las células con capacidad para replicarse, penetran al citoplasma y posteriormente al núcleo; ya estando en el núcleo se replican en zonas episomales sin integrarse en el genoma celular y se producen gran número de copias virales, las copias virales completan su estructura con el ensamblaje de la cápside; el gran número de partículas virales completas causan la muerte de la célula y quedan libres, habitualmente estas partículas virales completas ya están en las células diferenciadas muy cercanas a la superficie de los epitelios. La infección lisogénica se caracteriza por afección directa del genoma celular; en este caso los HPV se consideran de alto riesgo (HPV 16, 18) después de alcanzar al núcleo celular, algunos genes virales son integrados dentro del genoma de la célula huésped, principalmente los segmentos E6-E7. La replicación de los virus en este caso entra en un lapso de espera hasta que la célula huésped replica su propio DNA junto con el del DNA viral<sup>(20)</sup>

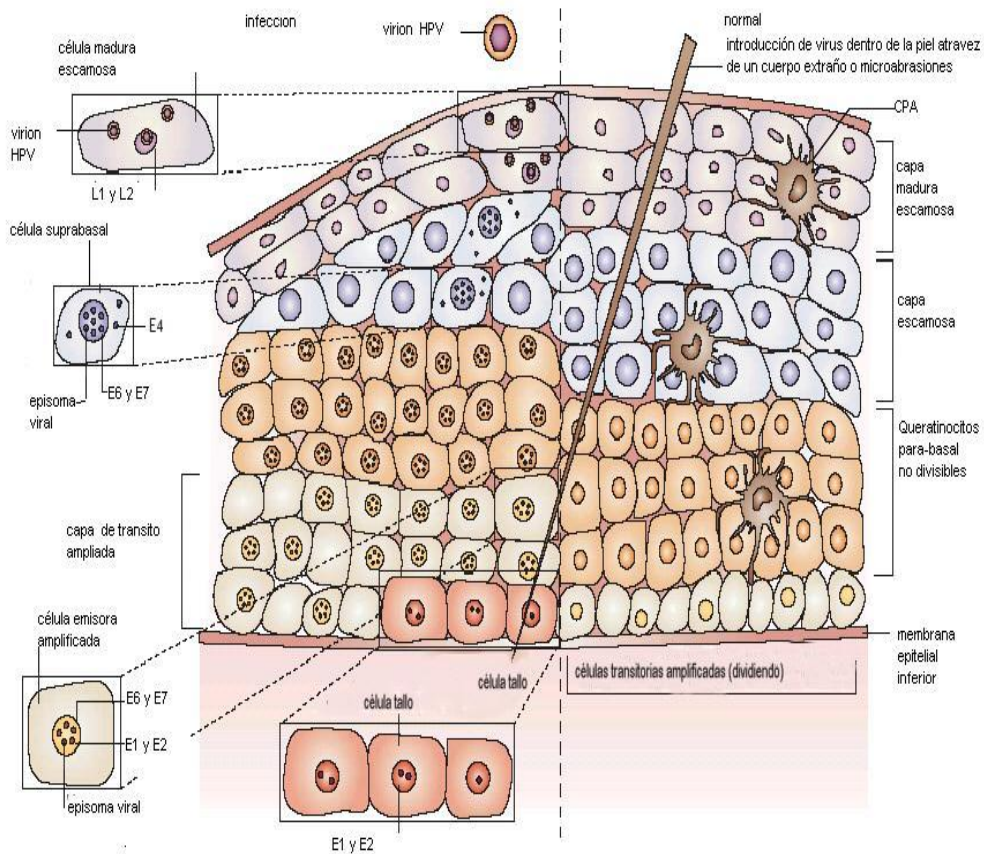
Como el virus del papiloma tiene tropismo por los epitelios, infecta las células basales de piel y mucosas a través de microlesiones <sup>(51)</sup>. En las células infectadas se replica y produce

50 a 100 copias del genoma viral, que reparte en sus dos células hijas durante la división celular, para mantener su población. Después de la amplificación del genoma se empaqueta en viriones infecciosos, los cuales se liberan en la superficie epitelial durante la descamación <sup>(52)</sup>

El genoma viral se mantiene con pocas copias episomales en las células de la capa basal y parabasal y se amplifica en las células infectadas que migran cruzando al epitelio hacia la superficie. El orden tiene que ser preservado para que se produzcan los viriones infecciosos, aunque el tiempo de los eventos del ciclo de vida pueden variar <sup>(53)</sup>

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 vagina, de modo que alcanza a células no diferenciadas en el nivel suprabasal. En este estadio, el genoma viral permanece en una conformación episomal y se transcriben principalmente los genes E1, E2, E4 y E5, y sólo muy discretamente E6 y E7 <sup>(54)</sup>. 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, este estado puede permanecer casi inalterado durante varios años, produciendo algunas alteraciones celulares en forma de displasia <sup>(55-58)</sup>. Un promotor de la región tardía activa la expresión de L1 y L2 para dar lugar a viriones que son liberados a la capa externa del epitelio escamoso por muerte celular.

Los viriones penetran el epitelio a través de micro abrasiones e infectan a las células tallo que están localizadas en la capa basal del epitelio. En estas células el DNA viral se encuentra en forma episomal, y las proteínas E1 y E2 inducen la replicación del virus aprovechando la maquinaria celular. La expresión de las proteínas virales no estructurales (E6) y (E7) retrasan el ciclo celular deteniéndolo y diferenciando, que es normalmente observado en las células epiteliales moviéndose arriba de la membrana basal hasta llegar a producir queratinocitos maduros. Esto retrasa el ciclo celular deteniendo y permitiendo una replicación episomal más lejana, utilizando al huésped y su maquinaria de replicación del DNA en las células suprabasales epiteliales, y produciendo grosor en la piel o (verrugas) características de algunas infecciones con papilomavirus. Cuando la diferenciación y la replicación de células epiteliales hacia la no-replicación de queratinocitos maduros eventualmente ocurren, las proteínas estructurales del virus L1 y L2 son ensambladas en el núcleo celular. La maduración de los viriones entonces son ensamblados y liberados hacia el epitelio con las células epiteliales superficiales. <sup>(12)</sup> (ver figura 3)



**Figura 3. Etapas del ciclo de vida del virus de papiloma humano y su localización en el epitelio escamoso.**

El epitelio cervical escamoso y estratificado, la arquitectura celular y la expresión de proteínas del virus del papiloma humano (HPV) después de la infección, las células hijas de la célula tallo del epitelio se dividen a lo largo de la membrana basal y maduran verticalmente a través del epitelio sin más división (lado derecho). Después de la introducción del HPV dentro de las células tallo, en la capa basal del epitelio, la expresión de proteínas virales no estructurales ocurre. Bajo la regulación de estas proteínas, la división celular de la población se expande verticalmente y la diferenciación de las células epiteliales es tardía y menos completa. Los viriones maduros son producidos solo en las capas más superficiales del epitelio, las células presentadoras de antígeno (APCs) intraepiteliales son eliminadas en el epitelio infectado por HPV. Tomado de Frazer Ian 2004 (12, y modificado por ORTIZ ROGELIO)



## 2.- RESPUESTA INMUNE Y CANCER CERVICO-UTERINO.

### **Infección por HPV y su control por el sistema inmune.**

En los pacientes con diversas enfermedades que cursan con inmunodepresión se sabe que se incrementan las lesiones causadas por HPV. Por ejemplo, ciertos tipos virales causan enfermedad en pacientes tal como la epidermodisplasia verruciformis y las verrugas comunes que son enfermedades primarias en niños con inmunosupresión<sup>(59)</sup>. Los pacientes afectados con el síndrome de la inmunodeficiencia humana adquirida (SIDA) son deficientes en la respuesta inmune celular ya que la población de linfocitos CD4+ se encuentra deprimida. Esta depresión celular se acompaña de un incremento en el número de lesiones cutáneas como las verrugas, condilomas acuminados y cáncer cérvico-uterino. Asimismo, pacientes con terapia inmunosupresora también muestran un incremento de lesiones causadas por HPV, ya que este grupo de pacientes se administran drogas que deprimen específicamente la respuesta inmune celular para evitar el rechazo del órgano transplantado, lo cual afecta la respuesta inmune a infecciones de tipo viral. En las pacientes embarazadas también se observa una disminución fisiológica de la respuesta inmune celular; lo que se asocia con el incremento de condilomas genitales durante la gestación. Muchas de estas pacientes presentan desaparición de los condilomas al terminar los cambios fisiológicos del embarazo, todas estas evidencias sugieren fuertemente que la respuesta inmune celular es importante para el control de lesiones producidas por HPV.<sup>(20, 60)</sup>

La mayoría de los pacientes con alguna lesión neoplásica asociada al HPV no presentan inmunodepresión a nivel sistémico, más bien, se encuentran alteraciones a nivel local, inducidas por el HPV y otros eventos en el tumor. En las etapas previas al cáncer invasor, como son el condiloma acuminado y las neoplasias preinvasoras (neoplasia intraepitelial cervical-NIC), el sistema inmunológico aún es capaz de combatir y promover la regresión o mantener al tumor localizado. Por ejemplo, durante la regresión de las verrugas genitales se presentan infiltrados locales muy importantes de células mononucleares, incluyendo linfocitos T citotóxicos (CTL), células asesinas naturales (NK) y macrófagos que invaden la epidermis y destruyen las células neoplásicas.<sup>(61-62)</sup> Durante la evolución del tumor, las células tumorales adquieren nuevas lesiones genéticas que les confieren ventajas selectivas, para evadir cada vez un mayor número de mecanismos de control del sistema inmune, hasta que éste se hace ineficiente para combatir el tumor.<sup>(63)</sup>

En lesiones de bajo grado, por lo general se encuentran infiltrados de linfocitos T, tanto linfocitos cooperadores CD4+ como linfocitos citotóxicos CD8+, estos datos sugieren que la respuesta inmune celular esta muy ligada a los eventos de regresión o progresión de las lesiones causadas por HPV<sup>(20)</sup>

A pesar de la habilidad de los HPVs para impedir la defensa del huésped, la respuesta inmune mantiene un control de las infecciones en la mayoría de los casos y solo una pequeña cantidad de ellos puede progresar a cáncer. Esto parece que es caracterizado por una fuerte inmunidad mediada por células de manera local y la generación de anticuerpos

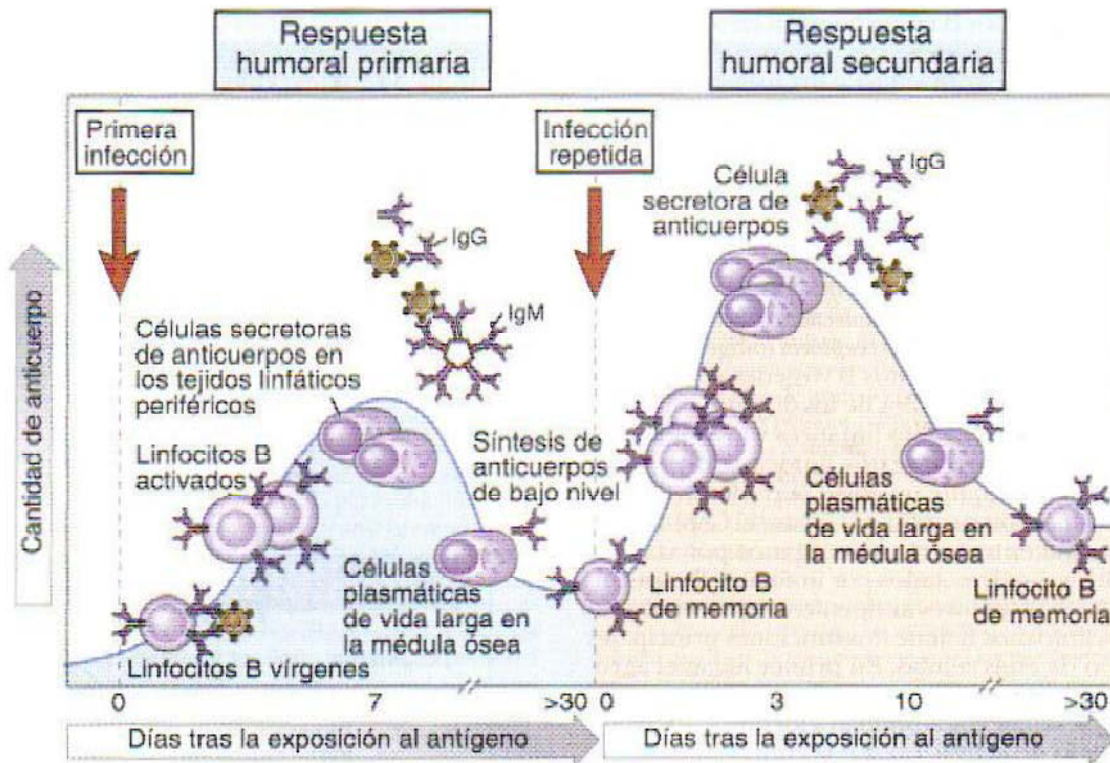
neutralizantes que se asocian con la regresión de la lesión <sup>(63-64)</sup>. Una gran cantidad de anticuerpos son generados en muchos de los individuos infectados y son altamente específicos hacia epítopes conformacionales de la proteína estructural L1 al HPV infectante. <sup>(64)</sup>

La defensa del huésped es una asociación entre la inmunidad innata (fagocitos, proteínas solubles (ejem citocinas, complemento y barreras epiteliales) e inmunidad adaptativa (anticuerpos y células citotóxicas efectoras). El sistema inmune innato detecta patógenos y actúa en la primera línea de defensa, eliminando la mayoría de los asaltos microbianos. La inmunidad innata no tiene una memoria específica, pero es responsable para activar la respuesta inmune adaptativa. La respuesta inmune adaptativa genera respuesta exquisitamente específica letal hacia los antígenos extraños, así como también células de larga vida con memoria hacia la infección. La inmunidad humoral mediada por anticuerpos elimina partículas virales libres de los fluidos y puede prevenir la reinfección viral, mientras que la respuesta inmune mediada por células es esencial para eliminar las células infectadas por virus y la generación de una memoria inmunológica. <sup>(64,66)</sup>

Los linfocitos T son los principales componentes en el sistema inmune adaptativo, tienen un papel central en ambas respuestas inmunes la mediada por células y la humoral. Las células T reconocen antígenos que han sido procesados en péptidos cortos <sup>(64)</sup>

Las células presentadoras de antígenos (CPA) expresan receptores y secretan citocinas locales que dictan si o no las células T las cuales se dirigen hacia la vía Th1 o Th2 y/o el camino regulatorio. Estas funciones de las CPA son activadas por la interacción entre receptor-ligando de las CPA y el patógeno, y también por citocinas liberadas por las CPA y otras en los alrededores inmediatos. Las CPAs liberadas y las citocinas son el puente entre la inmunidad innata y adaptativa. <sup>(64)</sup>

Los linfocitos B se desarrollan en la médula ósea y emergen como células maduras vírgenes y se diferencian a células plasmáticas en los órganos linfáticos secundarios donde son activados por CPA y citocinas producidas por los linfocitos T auxiliares. Una vez que las células B vírgenes encuentran un antígeno es activada, esto emprende una fuerte regulación de proliferación y un programa de diferenciación, en que las células B de memoria y efectoras plasmáticas producen anticuerpos antígeno-específicos. Los anticuerpos en el plasma celular son secretados por largo tiempo. Éstos son solubles e idénticos a las versiones que se unen a la membrana de las células B. En este primer encuentro con el antígeno, la respuesta primaria de los anticuerpos es generada, mas tarde al reencontrarse con el antígeno, se induce una respuesta secundaria mas rápida, produciendo altos títulos de anticuerpos con una alta afinidad para el blanco antigénico <sup>(64)</sup> ( ver figura 4)



**Figura 4 Cinética de las respuestas inmunitarias humorales primaria y secundaria.**

En la respuesta inmunitaria primaria, los linfocitos B vírgenes son estimulados por el antígeno, se activan y se diferencian en células secretoras de anticuerpos que sintetizan anticuerpos específicos frente a dicho antígeno. Algunas de las células plasmáticas secretoras de anticuerpos sobreviven en la médula ósea y continúan produciendo anticuerpos durante largos periodos de tiempo. Durante la respuesta primaria también se generan linfocitos B de memoria de vida larga. Una respuesta inmunitaria secundaria se desencadena cuando estas células se exponen nuevamente al mismo antígeno, lo que origina una proliferación y diferenciación más rápida y la síntesis de mayores cantidades de anticuerpos específicos en comparación con la respuesta primaria. Tomada de Abbas 2004 (65)

Las infecciones virales son primariamente intracelulares, y los antígenos virales escapan al alcance de los anticuerpos. La respuesta humoral es importante sólo para infecciones virales productivas, en las que las partículas virales salen al espacio extracelular por exocitosis o durante la lisis celular por efecto del propio virus o las células citotóxicas del paciente. En el espacio extracelular las partículas virales son atrapadas por linfocitos B con receptores (anticuerpos de membrana), específicos para algunos epítomos de las proteínas virales. Una vez unido al receptor, el antígeno es internalizado por endocitosis y digerido hacia el lisosoma para producir pequeños péptidos que se unen a moléculas de clase II, del complejo principal de histocompatibilidad (HLA-II). Posteriormente, los péptidos son presentados en la superficie celular para ser reconocidos por linfocitos T auxiliares CD 4+ (Th2). Una vez activados, los linfocitos Th2 estimulan a los linfocitos B para producir

anticuerpos neutralizantes contra las partículas virales, los cuales juegan un papel muy importante para evitar la diseminación de la infección. Las moléculas HLA-II están presentes en células del sistema inmune: linfocitos B, linfocitos T activados y células profesionales presentadoras de antígenos (CPA) y algunas células epiteliales especializadas; se componen de dos cadenas,  $\alpha$  y  $\beta$ , ambas codificadas en los *loci* HLA-DR, -DQ o -DP. El amplio polimorfismo que presentan está concentrado en la región de unión de los péptidos, lo cual permite que los diversos alelos reconozcan péptidos diferentes y, con ello, estén asociados a respuestas inmunes diferentes.<sup>(66-68)</sup>

En las infecciones no productivas, como serían los casos de las neoplasias intraepiteliales (NIC) de alto grado y el cáncer invasor, solamente se producen proteínas tempranas del virus y no proteínas tardías, por lo que las partículas virales no se presentan en el espacio extracelular, y por tanto no se esperaría una respuesta humoral contra los antígenos virales. Sin embargo, en el suero de las pacientes con cáncer cervical frecuentemente se encuentran anticuerpos contra la proteína E7 del HPV 16 o el HPV 18. Igualmente, se han detectado anticuerpos contra las proteínas E2 del HPV 16 y del HPV 18, E4 y E6 del HPV 16. Además, se ha encontrado que los títulos de anticuerpos contra las proteínas E2, E6 y E7 aumentan con el estadio clínico y varían de acuerdo con la manera en que es tratada la enfermedad. No se sabe cómo se genera esta respuesta humoral, pero quizá durante la lisis de células cancerosas por linfocitos T citotóxicos, salgan antígenos virales al espacio extracelular. Por otra parte, no se conoce cuál es el papel de la respuesta inmune humoral en los tumores invasores, es decir si juega un papel en contra del tumor, quizá en colaboración con las células NK y los macrófagos, o si solamente se presenta como un efecto secundario asociado al desarrollo de la enfermedad. De cualquier manera, estos datos sugieren que estas proteínas virales derivadas de genes de transcripción temprana son inmunogénicas y pueden representar blancos para el sistema inmunológico<sup>(63, 66)</sup>

Como se mencionó anteriormente, el sistema inmune es importante en el control de la infección por HPV, no obstante la prolongada persistencia de la infección viral y la concurrente aparición de lesiones intraepiteliales escamosas (SIL), sugiere la presencia de mecanismos de escape al control inmunológico durante la evolución de SIL a carcinoma in situ y cáncer invasor. En este caso, diferentes modificaciones en el mecanismo del procesamiento y presentación de antígenos por moléculas del complejo principal de histocompatibilidad pueden ocurrir<sup>(50, 67)</sup>.

La inmunodeficiencia humoral caracterizada por la falla al producir anticuerpos no incrementa la susceptibilidad a desarrollar lesiones por HPV. Una alta prevalencia de anticuerpos hacia HPV -16 E6 y E7 puede ser observada en pacientes con cáncer cervical con respecto a individuos sanos (33 vs 23 %) respectivamente, suministrando evidencia de HPV depende de la progresión.<sup>(67)</sup>

La respuesta inmune hacia las proteínas E6 y E7 expresadas en las células tumorales de cáncer cervical, es la respuesta con los linfocitos T citotóxicos (CTL). La generación de CTLs específicos para HPV requiere del exitoso procesamiento endógeno de estas proteínas oncogénicas y la subsecuente presentación a linfocitos T CD8 + en el contexto de los HLA-I.<sup>(64, 67-69)</sup>

## **Vacunas contra la infección por HPV.**

Dos tipos de vacunas han sido generadas para contrarrestar la infección producida por HPV y el desarrollo de cáncer cérvico-uterino: Las vacunas de tipo profiláctico y las vacunas terapéuticas<sup>(70)</sup>. El propósito de las vacunas profilácticas es reducir la incidencia del cáncer cervical por la prevención de la infección por el virus a través de la inducción de anticuerpos neutralizantes contra las proteínas de la cápside; mientras que las vacunas terapéuticas son diseñadas para inducir la respuesta inmune celular capaz de limpiar la infección persistente con HPV o para erradicar células transformadas por oncoproteínas del HPV.<sup>(32, 71)</sup> Las vacunas profilácticas diseñadas para la prevención de la infección por HPV tienen como objetivo inducir inmunidad contra las proteínas estructurales tardías L1 y L2 tipo específicas además pueden suprimir la replicación del virus en individuos quienes fueron ya infectados, previniendo de esta forma la transformación de células blanco. En estos casos se han ideado vacunas quiméricas de HPV compuestas por partículas virales que incorporan a las proteínas L1/L2 estructurales y a las proteínas oncogénicas E6/E7.<sup>(72)</sup>

La proteína L1 de la cápside ha sido blanco para la inducción de anticuerpos neutralizantes utilizando DNA que codifica para esta proteína, proteína sintética en forma desnaturalizada o ensamblada en capsómeros o partículas semejantes a virus (VLP's) que simulan a viriones, pero sin contener el DNA codificante para los virus<sup>(11)</sup>. Los VLPs purificados de diferentes sistemas de expresión han sido usadas para la inmunización por vía intramuscular o por una ruta oral. Los VLPs han sido expresados en bacterias, baculovirus, levaduras, también como células de plantas incluyendo papas y tabaco.<sup>(32)</sup> Estas partículas representan el candidato a vacuna líder para el tratamiento y prevención de cáncer cervical humano. La vacunación con VLPs constituidas de la proteína L1 de HPV-16, 18, 6 y 11 han inducido anticuerpos neutralizantes en varios modelos animales a los que protegen contra el desarrollo de lesiones.<sup>(70)</sup>

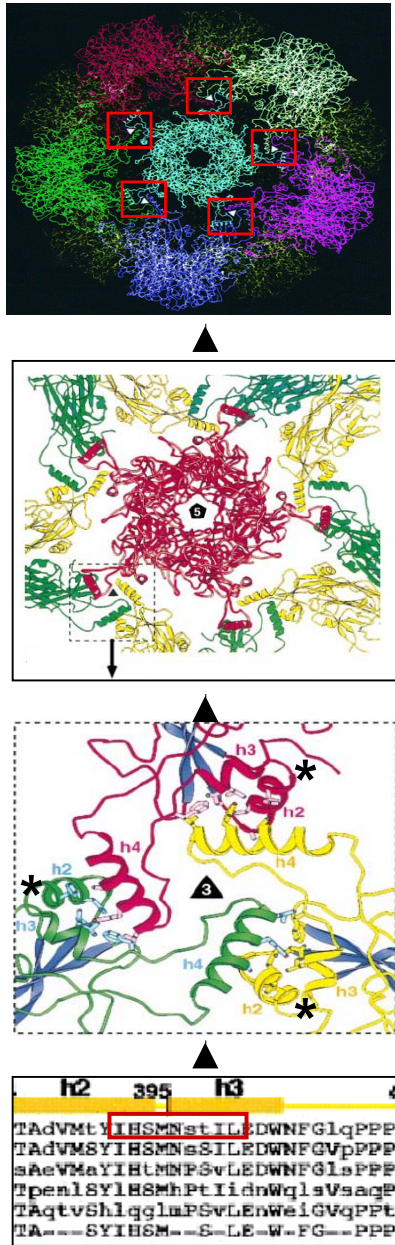
Varios modelos de estudio han utilizado VLPs constituidas por la proteína L1 y las VLPs quiméricas con la finalidad de activar linfocitos T y B mediante células presentadoras de antígeno alimentadas con estas partículas, como es el caso de células dendríticas que expresan una alta cantidad de moléculas MHC clase I y clase II y moléculas coestimuladoras CD 80 y CD 86<sup>(70)</sup>

En el caso particular de las vacunas profilácticas basadas en VLP's compuestas por la proteína L1 de HPV tipo 16 (HPV16 L1), su aplicación ha sido bien tolerada en humanos y capaz de generar altos niveles de anticuerpos neutralizantes. Se han realizado estudios en las cuales fueron incluidas 2392 mujeres jóvenes entre 16 y 23 años las cuales recibieron 40 µg por dosis de VLPs con intervalos de 0, 2 y 6 meses, y se encontró una respuesta en la cual las mujeres fueron seguidas en una media de 17.4 meses después de la vacunación y la incidencia de persistencia a infección por HPV-16 fue de 3.8 %, estos autores concluyen que la administración de la vacuna HPV-16 reduce la incidencia tanto la infección por HPV-16 como la neoplasia intraepitelial cervical relacionada y

que la inmunización a mujeres con HPV 16 negativas puede eventualmente reducir la incidencia de cáncer cervical<sup>(73)</sup>

En otro estudio realizado con VLPs del HPV tipo 11 se llamaron a voluntarios adultos sanos, en fase I se encontró la dosis para el tratamiento en humanos. Esta vacuna fue tolerada e induce altos niveles de anticuerpos de unión y neutralizantes. Un marcado incremento en la linfoproliferación hacia antígenos del HPV-11 fueron notados después de la segunda vacunación<sup>(74)</sup>. Estos estudios, han mostrado que la generación de anticuerpos neutralizantes han sido altamente específicos hacia estructuras conformacionales de las partículas virales utilizadas para la inmunización, de tal suerte que las vacunas profilácticas que actualmente se están evaluando son: una vacuna tetravalente (gardasil) producida por los laboratorios Merck e incluyen VLP's de HPV-16, 18, 6 y 11, los principales tipos de HPV asociados a lesiones cervicales. Otra vacuna producida por laboratorios Glaxo (cervarix) sólo incluye VLP's de HPV-16 y 18. Estas vacunas cotizadas en alrededor de 100 dólares por dosis, pueden conferir protección a la población femenina en aproximadamente un 70% ante el riesgo de contraer infección por estos tipos de HPV y eventualmente cáncer cérvico-uterino. Ya que estos dos tipos virales son frecuentemente expresados en el 70% de los tumores cervicales<sup>(75-76)</sup>.

Ante esta perspectiva, sería de gran importancia establecer tipos de vacunación más accesibles a la población de países subdesarrollados y propios a las variantes virales predominantes en las diversas regiones del mundo. En este sentido, el grupo de trabajo ha venido estudiando secuencias homólogas antigénicas encontradas en las proteínas L1 de los principales tipos de HPV asociados a cáncer cérvico uterino, con la finalidad de utilizarlas como inmunógenos en la generación de respuesta mediada por linfocitos T y B en pacientes con infecciones producidas por HPV. Recientemente se identificaron dos péptidos antigénicos homólogos derivados de la proteína L1 del HPV 16 y 18, con una alta especificidad para el alelo de histocompatibilidad HLA-B \*3901. Estos péptidos inducen una estimulación de células T en pacientes con cáncer cervical avanzado, positivo para las infecciones HPV-16 o 18 y para esta molécula de histocompatibilidad, además los linfocitos estimulados fueron capaces de matar a células tumorales derivadas de un paciente con cáncer cérvico-uterino positivo para infección por HPV-18 y para el alelo HLA-B \*3901.<sup>(14)</sup> El nonapéptido IHSMNSTIL descrito en este estudio, comparte homología >70% con secuencias encontradas en las proteínas L1 de varios HPV's altamente asociados a cáncer cérvico-uterino y además estructuralmente se localiza en los dominios alfa-hélices h2 y h3 de la estructura de la proteína L1, los cuales son importantes en la unión de los pentámeros de la proteína L1 para constituir a la cápside viral.



**Figura 5.** Vista del pentámero de la proteína L1, y las interacciones de las alfa hélices y la localización del péptido IHSMNSTIL entre las alfa hélices 2 y 3 y el número de aminoácidos que lo conforman. Tomada de Chen Xiaojiang 2000 <sup>(11)</sup>

De acuerdo con la localización de esta secuencia antigénica IHSMNSTIL en la estructura de la cápside viral, se procedió a analizar previamente si pacientes con infecciones por virus de HPV de alto riesgo presentaban anticuerpos específicos IgA e IgG hacia este péptido. <sup>(15)</sup>

Al analizar sueros y secreciones cervicales de mujeres con lesiones cervicales intraepiteliales escamosas asociadas a HPV de alto riesgo (LSIL) y pacientes con cáncer cervical, comparadas con mujeres con infecciones por HPV de bajo riesgo y mujeres sanas (controles), se encontró que la respuesta de IgG e IgA fue similar en mujeres con HPV de bajo riesgo asociadas a LSIL y controles ( $P=0.1$ ). En contraste, más del 90 % de pacientes con HPV de alto riesgo asociado a LSIL y pacientes con cáncer cervical fueron seropositivos al péptido IHSMNSTIL. Este resultado permitió discriminar de manera significativa mayor seropositividad hacia este antígeno en mujeres con infección por HPV de alto riesgo en comparación con aquellas de bajo riesgo o donadoras sanas<sup>(15)</sup>, lo cual sugiere que este péptido antigénico es determinante en la generación de respuesta inmune específica. Por lo que en el presente estudio, se analiza a través de un modelo murino de ratones Balb/c, la generación de anticuerpos específicos a este antígeno a través de la inmunización y la reactividad cruzada de anticuerpos generados al inmunizar ratones con secuencias homólogas al péptido IHSMNSTIL, así como el reconocimiento de estos anticuerpos hacia partículas similares a virus de la proteína L1 de HPV-16.



## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México la infección por virus del papiloma humano y la incidencia de cáncer cervical intraepitelial de alto grado (CaCu) se incrementa día a día. Se ha estimado que más del 60 % de la población sexualmente activa está infectada por algún tipo de HPV, ello se debe a que la infección por HPV es asintomática y se mantiene latente por largos periodos, por lo que el contagio se propaga continuamente. En consecuencia, resulta indispensable establecer metodologías que permitan la detección oportuna de infecciones producidas por los tipos de HPV de alto riesgo (HPV-16, -18, -31, -33, -52, -58 etc) que se asocian más frecuentemente con lesiones malignas del epitelio cervical. Actualmente el Papanicolaou es el método de detección más utilizado debido a su bajo costo y relativa accesibilidad a la población; no obstante éste método no da información sobre los tipos de HPV infectantes. Asimismo, los métodos que permiten identificar y tipificar la infección por HPV a través del análisis del DNA viral mediante técnicas de PCR, hibridación in situ, captura de híbridos, etc., no son accesibles para la mayoría de la población debido a su alto costo. Por otro lado, gracias a la tecnología recombinante, se han podido sintetizar partículas similares a virus de HPV (VLPs), constituidas principalmente por las proteínas L1 y L2 de HPV-16 y 18. El uso de estas partículas se encuentra en evaluación clínica Fase III para prevenir infecciones por HPV, no obstante su alto costo en la síntesis y alta especificidad en los análisis previamente reportados, limitaría su uso en poblaciones en vías de desarrollo. Por tanto, es necesario desarrollar métodos y técnicas de mayor accesibilidad a la mayoría de la población tanto para la detección como para la prevención de estas infecciones. En este contexto, nuestro grupo de investigación ha identificado que la secuencia 417-425 (péptido IHSMNSTIL) de la proteína L1 de HPV-16, la cual es altamente conservada entre secuencias L1 de varios HPV de alto riesgo asociados a CaCu, es fuertemente reconocida por anticuerpos presentes en sueros de más del 90% de mujeres que presentan infección por virus de papiloma humano de alto grado, lo cual nos lleva a proponer que este péptido pueda ser útil para detectar infecciones producidas por HPVs de alto riesgo, así como considerar su uso potencial en la composición de vacunas de tipo profiláctico. Por tanto, el objetivo del presente trabajo es el de evaluar la capacidad inmunogénica del péptido IHSMNSTIL y de sus homólogos de las proteínas L1 de HPV-18, -31, -33, -52, -58 y -6/11 en un modelo de ratón (Balb/c), para generar anticuerpos específicos hacia estos péptidos y con capacidad de reconocer VLPs de HPV-16.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Evaluar la capacidad inmunogénica del péptido IHSMNSTIL derivado de la proteína L1 del HPV-16 y de sus homólogos derivados de los diferentes tipos de HPV ( HPV-18, -31, -33, -52, -58 y -6/11) en ratones de la cepa Balb/c

### **Objetivos particulares**

- 1.- Analizar la presencia de anticuerpos específicos al péptido antigénico IHSMNSTIL y a sus homólogos en suero de ratones Balb/c inmunizados.
- 2.- Analizar la reactividad cruzada de anticuerpos específicos al péptido IHSMNSTIL, contra los péptidos homólogos a éste péptido.
- 3.- Evaluar el reconocimiento de partículas similares a virus (VLP) de HPV-16 por los anticuerpos específicos al péptido IHSMNSTIL y a sus homólogos.

## **Hipótesis**

En estudios previos se ha identificado que el péptido IHSMNSTIL, correspondiente a la secuencia 417-425 de la proteína L1 del HPV-16, conserva alta homología con péptidos derivados de la proteína L1 de varios tipos de HPV de alto riesgo asociados al desarrollo de cáncer cèrvico-uterino. Además recientemente detectamos que mujeres que cursan con infecciones producidas por HPV-16 y otros tipos de alto riesgo, presentan altos títulos de anticuerpos séricos que reconocen a este péptido, sugiriendo una alta inmunogenicidad del mismo. Por tanto, si aplicamos al péptido IHSMNSTIL y a varios de sus homólogos derivados de la proteína L1 de HPV-18, -31, -33, -52, -58 (principales tipos oncogénicos asociados con el desarrollo de neoplasias cervicales) así como el de HPV-6/11 (asociados a lesiones benignas del epitelio cervical) en un sistema de la inmunización in vivo (ratones de la cepa Balb/c), esperamos encontrar anticuerpos péptido específicos, los cuales serán capaces de reconocer partículas similares a virus (VLPs) derivadas de la proteína L1 de HPV-16.

## MATERIALES Y METODOS

### Materiales

Péptidos sintetizados derivados de los HPV (tabla 2). (Invitrogene, USA).

Albúmina bovina serica fracción 5, pH 7, (Resarch organic, Cleveland OH )

Anticuerpo (IgG) anti ratón acoplado a fosfatasa alcalina (ZYMED, USA).

Adyuvante completo e incompleto de Freund (Sigma, USA).

Solución amortiguadora de fosfatos, PBS pH 7.2 (Apéndice) .

Solución amortiguadora de carbonatos-bicarbonatos pH 9.6 (Apéndice).

TBS-Tween 0.1 % pH 7.6 (Apéndice).

Dietanolamina al 10% (Sigma, USA) (Apéndice).

Substrato de fosfatasa alcalina (Sigma, USA) (Apéndice).

Jeringas 3 mL (TERUMO, USA)

Tubos siliconizados Eppendorff 1.5 mL (CLP, USA )

Tubos capilares sin anticoagulante, 100 mm (KIMAX, USA).

Placas para ELISA de 96 pozos (Corning, USA).

Lector de placas de ELISA (Filtro de 405 nm), (Molecular Devices E MAX, USA).

Micro centrifuga (Eppendorff, USA).

## MÉTODOS

### A. PETIDOS SINTÉTICOS.

Los péptidos sintéticos utilizados en este estudio se enlistan en la siguiente tabla:

Proteína de donde deriva el péptido	Secuencia del péptido	Posición en la proteína L1	% Identidad
L1 de HPV's de alto riesgo			
16	IHSMNSTIL	417-425	Referencia
18	IHSMNSSIL	453-461	88.9
31	IHSMNPAIL	392-400	77.8
33	IHAMNPDIL	390-398	66.7
52	IHKMDATIL	421-429	66.7
58	IHTMDSNIL	416-424	66.7
L1 de HPV's de bajo riesgo			
6	IHTMNPSVL	386-394	55.6
11	IHTMNPSVL	387-395	55.6

**Tabla 2. Secuencias de los péptidos antigénicos homólogos al péptido IHSMNSTIL. Para el análisis de alineación de secuencias se utilizó el programa de Lipman y Pearson. [www.ebi.ac.uk/emboss/align/](http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/)**

### B. RATONES E INMUNIZACIÓN.

Ratones hembra de la cepa Balb/c de 6-8 semanas de edad, fueron inmunizados con cada uno de los péptidos de acuerdo con el siguiente esquema: Se aplicaron 4 inmunizaciones, vía cavidad peritoneal, de 100 µg de cada uno de los péptidos a grupos de 3 ratones. En la primera inmunización los péptidos aplicados fueron disueltos en PBS y emulsionados con Adyuvante Completo de Freund en proporción 1:1; y en las tres posteriores inmunizaciones se utilizaron 100 µg de péptido emulsionado con Adyuvante Incompleto de Freund en proporción 1:1, el espacio entre cada inmunización fue de 8-10 días. Los anticuerpos anti-VLP's se obtuvieron de tres ratones inmunizados con 5 µg c/u de VLPs (donados por la Dra. Leticia Rocha Zavaleta, IIB-UNAM).

Una semana después de la última inmunización, los ratones fueron sangrados vía ocular usando tubos capilares sin anticoagulante. Después de centrifugar la sangre, se colectaron los sueros correspondientes, se fraccionaron en alícuotas y se almacenaron en ultra congelación (-70°C) hasta su posterior uso.

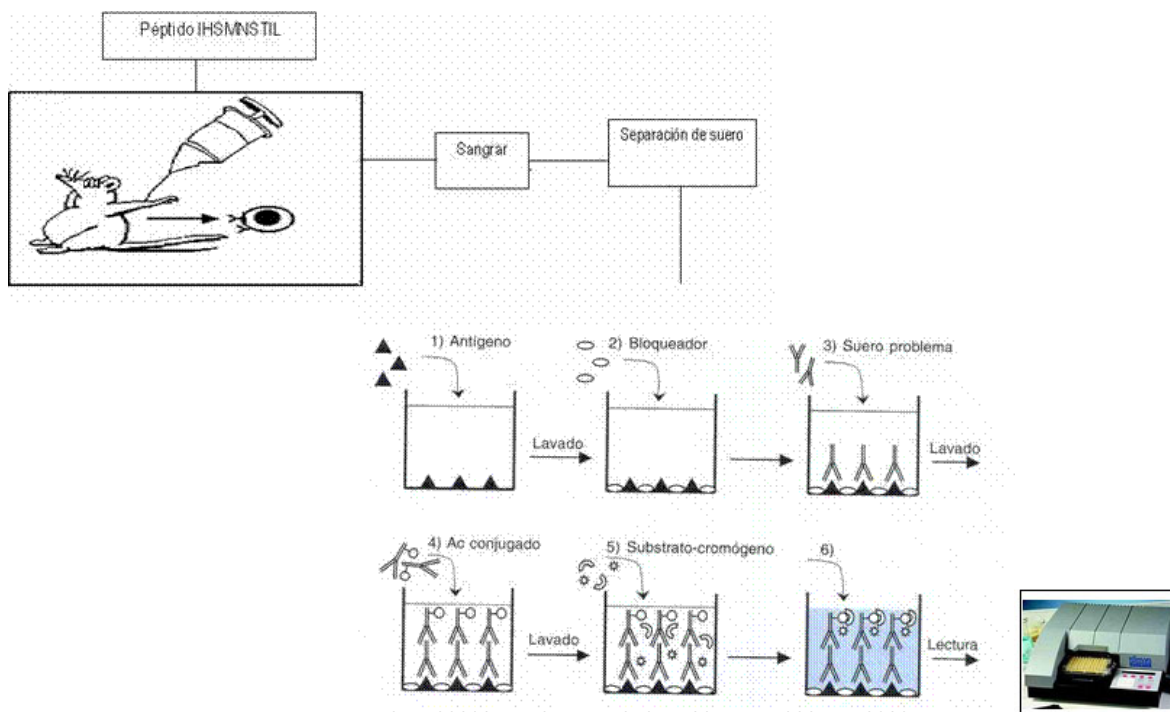
### **C. ENSAYOS DE ELISA PARA DETECTAR ANTICUERPOS ESPECÍFICOS A PÉPTIDOS Y VLPS.**

Los péptidos sintéticos fueron disueltos a una concentración de 10 µg/mL de solución amortiguadora de carbonatos-bicarbonatos pH 9.6. 100 µL de esta solución fueron colocados por triplicado en pozos de placas de ELISA e incubados durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se realizaron 2 lavados con 300 µL de TBS-Tween al 0.1 % por cada pozo. Posteriormente los pozos fueron cubiertos con 300 µL de solución bloqueadora compuesta por TBS-Tween 0.1% y albúmina sérica bovina (BSA) al 2% e incubados durante 2 horas a 37°C. Después de este tiempo, los pozos fueron lavados 4 veces con TBS-Tween 20 al 0.1 % (300 µL de solución por cada pozo). En seguida, los sueros de ratones inmunizados con cada uno de los péptido, fueron diluidos a una proporción de 1:2500 en solución de bloqueo y se colocaron 100 µL de cada dilución en los pozos correspondientes, con la finalidad de determinar el reconocimiento específico de cada antisuero a su péptido específico, así como el del antisuero anti-IHSMNSTIL contra los péptidos homólogos a éste. Después de 2 horas de incubación a 37°C, se realizaron 6 lavados con 300 µL de TBS-Tween al 0.1 % por cada pozo. Para revelar el reconocimiento de los anti-sueros hacia los péptidos, se utilizó un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón acoplado a fosfatasa alcalina, el cual se diluyó 1:5000 en solución de bloqueo y se colocaron 100 µL de esta solución en cada pozo. Después de incubar a 37°C durante 2 horas, se realizaron 8 lavados con 300 µL de TBS-Tween 20 al 0.1 % por cada pozo, y se adicionaron 100 µL de una solución de substrato de fosfatasa alcalina (Apéndice 5). Después de incubar la placa a 37°C durante 30-60 minutos, la reactividad enzimática de la fosfatasa fue determinada mediante el desarrollo de color amarillo detectado en un lector de placas de ELISA a una longitud de onda de 405 nm.

Para determinar la reactividad de los antisueros anti-péptido contra los VLPs de la proteína L1 de HPV-16, los VLPs fueron disueltas en solución de PBS y fijadas toda la noche en las placas de 96 pozos de ELISA. El reconocimiento de los antisueros hacia los VLPs, fue determinado bajo las mismas condiciones del procedimiento antes mencionado.

Los ensayos se realizaron 3 veces

## DIAGRAMA DE FLUJO.



**Figura 6. Principio básico de la técnica de ELISA indirecta. En esta técnica, usada para buscar anticuerpos contra antígenos conocidos, los pozos se recubren con el antígeno (1), después se lavan y se tratan con una proteína bloqueadora “irrelevante” (2) y luego se incuban con el suero problema (3). Los anticuerpos retenidos por el antígeno se detectan por adición de un “segundo anticuerpo” conjugado a una enzima (4) que después “se revela” adicionando el substrato y un cromógeno (5). El resultado de la reacción es la formación de un producto coloreado soluble. (6) el producto coloreado se lee a 405 nm tomado de Rojas- Espinosa 2001 <sup>(77)</sup> y modificado por ORTIZ ROGELIO)**

## Resultados:

### DetECCIÓN DE ANTICUERPOS IgG ESPECÍFICOS AL PÉPTIDO IHSMNSTIL Y A SUS HOMÓLOGOS.

En estudios previos, nuestro grupo de trabajo ha detectado que mujeres con infección por HPV-16 y otros tipos de HPV de alto riesgo, presentan anticuerpos de isotipo IgG que reconocen al péptido antigénico IHSMNSTIL proveniente de la proteína L1 de HPV-16,<sup>(15)</sup>. La alta homología de este péptido (>89%, mediante análisis de secuencias por Pearson) con secuencias encontradas en la proteína L1 de HPV de alto riesgo de los principales tipos asociados con el desarrollo de cáncer cérvico-uterino (HPV-18, -31, -33, -52, y -58 entre otros), sugería que anticuerpos específicos hacia P16 pudieran tener reactividad cruzada hacia sus homólogos presentes en las secuencias L1 de los HPV's de alto riesgo, por tal motivo en el presente trabajo evaluamos la reactividad de anticuerpos anti péptido P16 contra sus péptidos homólogos pertenecientes a la proteína L1 de HPV-18 (IHSMNSSIL) (P18); HPV-31 (IHSMNPAIL) (P31); HPV-33 (IHAMNPDIL) (P33); HPV-52 (IHKMDATIL) (P52); HPV-58 (IHTMDSNIL) (P58); HPV-6 (IHTMNPSVL) (P6) y HPV-11 (IHTMNPSVL) (P11), asimismo evaluamos la reactividad de anticuerpos específicos a cada péptido contra partículas similares a virus (VLP's) constituídas principalmente por la proteína L1 de HPV-16.

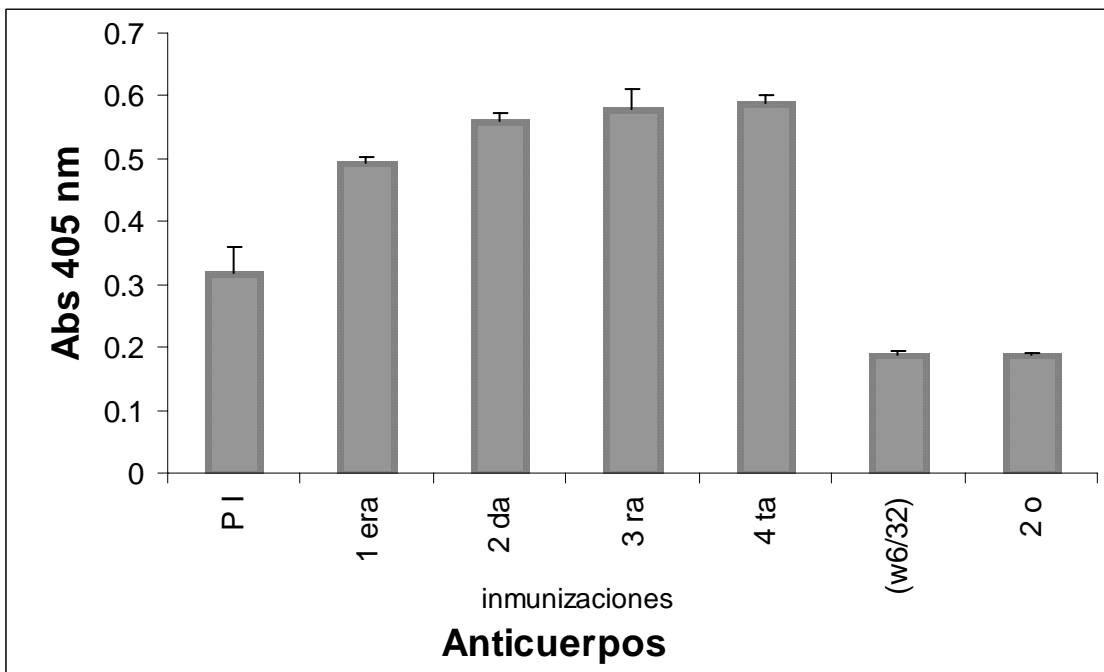
Se utilizó el modelo de inmunización de ratones de la cepa Balb/c para generar anticuerpos específicos hacia los péptidos antes mencionados y la técnica de ELISA para detectar y evaluar la presencia de anticuerpos IgG específicos en los sueros de los ratones inmunizados.

Inicialmente se evaluó la presencia de anticuerpos IgG (detectado por un anticuerpo 2° anti-IgG, conejo anti ratón, marcado con fosfatasa alcalina) específicos contra el péptido P16 en sueros obtenidos después de cada una de las inmunizaciones. Como se observa en la Tabla 3 y Figura 7, el título de anticuerpos fue incrementándose durante cada inmunización, desde 0.31 de absorbancia a (405 nm) en el suero de ratones pre-inmunes (sin inmunizar), hasta 0.589 de absorbancia en el suero de ratones después de la cuarta inmunización, utilizando una dilución de 1:1000 en los ensayos de ELISA. El anticuerpo irrelevante y del isotipo IgG, W6/32, que reconoce la región constante de las moléculas HLA clase I humanas, no reaccionó con P16 en la ELISA y su valor fue similar al del anticuerpo secundario. Además los anticuerpos obtenidos después de la cuarta inmunización no reaccionaron contra péptidos de la proteína E6 o E7 de HPV-16, dando valores similares a los obtenidos por el anticuerpo secundario (Tabla 3). De estos resultados se concluye que la inmunización con el péptido IHSMNSTIL indujo la producción de anticuerpos péptido-específicos y que el mayor título de anticuerpos se produjo después de la tercera inmunización, manteniéndose constante después de la cuarta inmunización.

**Tabla 3.** Títulos de anticuerpos anti-P16 presentes en sueros de ratones inmunizados con el péptido IHSMNSTIL durante los periodos de inmunización.



Antisuero	# Inmunizaciones	Promedio Abs contra P16
Preimmune	Sin inmunizar	0.31
Anti p16 IHSMNSTIL	Primera	0.494
	Segunda	0.558
	Tercera	0.577
	Cuarta	0.589
Anticuerpo w6/32		0.1876
Secundario		0.1873
Antisuero	Promedio de Abs contra péptidos no relacionados	
Anti p16 IHSMNSTIL	KLPQLCTEL (E6 HPV-16)	0.1920
	TLGIVCPIC (E7 HPV-16)	0.2010



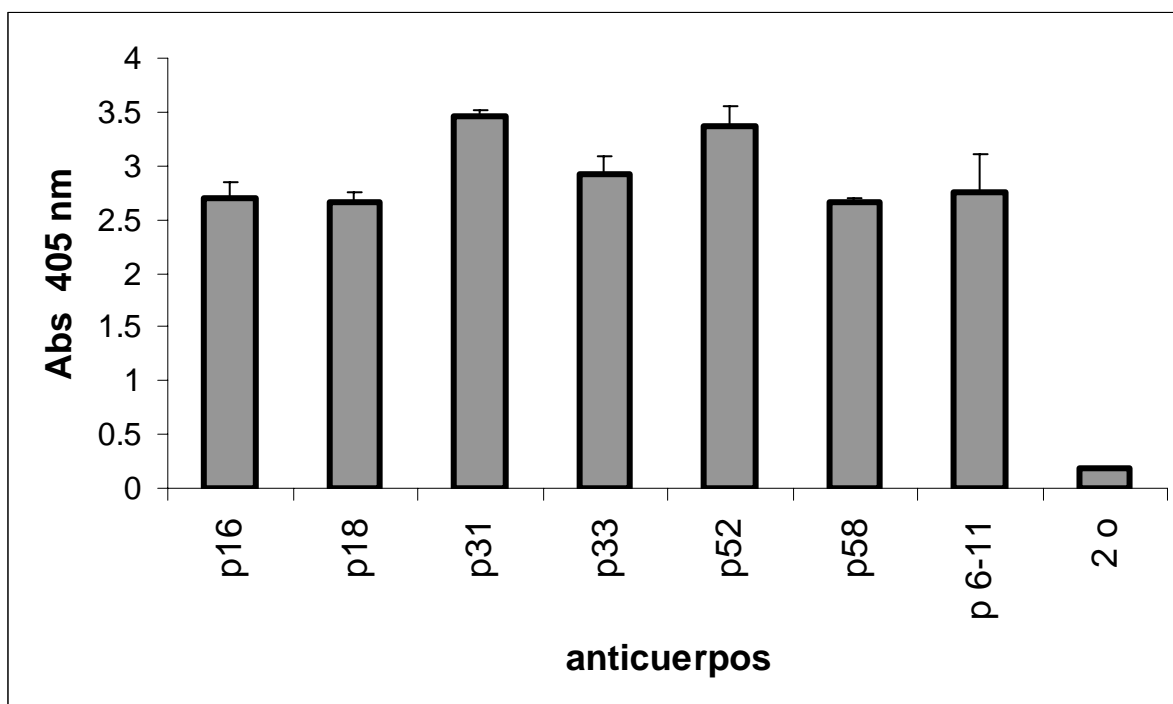
**Figura 7.** Títulos de anticuerpos específicos contra el péptido IHSMNSTIL después de inmunizar a ratones de la cepa Balb/c. PI, suero de ratones sin inmunizar. W6/32, anticuerpo irrelevante anti-HLA clase I. 2o, anticuerpo secundario. La dilución de los sueros utilizada fue de 1:1000.

Una vez que se determinó que la cuarta inmunización con péptido IHSMNSTIL derivado de la proteína L1 del HPV 16, indujo la mayor cantidad de anticuerpos específicos al péptido P16, se procedió a inmunizar a ratones Balb/c con los diferentes péptidos homólogos al péptido IHSMNSTIL (P16), péptidos derivados de la proteína L1 de HPV-18, 31, 33, 52, 58, 6 y 11.

Como se observa en la tabla 4 y figura 8, todos los péptidos homólogos fueron capaces de inducir la generación de anticuerpos IgG específicos a cada uno de los mismos en los animales inmunizados durante 4 ocasiones. Los ratones inmunizados con el péptido P31 y P52, derivados de la proteína L1 de HPV-31 y 52 (alto riesgo) fueron los que indujeron una mayor respuesta de anticuerpos.

**Tabla 4.** Títulos de anticuerpos específicos a P16 y a sus homólogos en sueros de ratones inmunizados

Anticuerpo	Péptido	Promedio Abs
Anti HPV 16	IHSMNSTIL (HPV-16)	2.7
Anti HPV 18	IHSMNSSIL (HPV-18)	2.6
Anti HPV 31	IHSMNPAIL (HPV-31)	3.4
Anti HPV 33	IHAMNPDIL (HPV-33)	2.8
Anti HPV 52	IHKMNATIL (HPV-52)	3.1
Anti HPV 58	IHTMDSNTIL (HPV-58)	2.6
Anti HPV 6	IHTMNPSVL (HPV-6)	2.7
Anti HPV 11	IHTMNPSVL (HPV-11)	2.7
Secundario		0.220



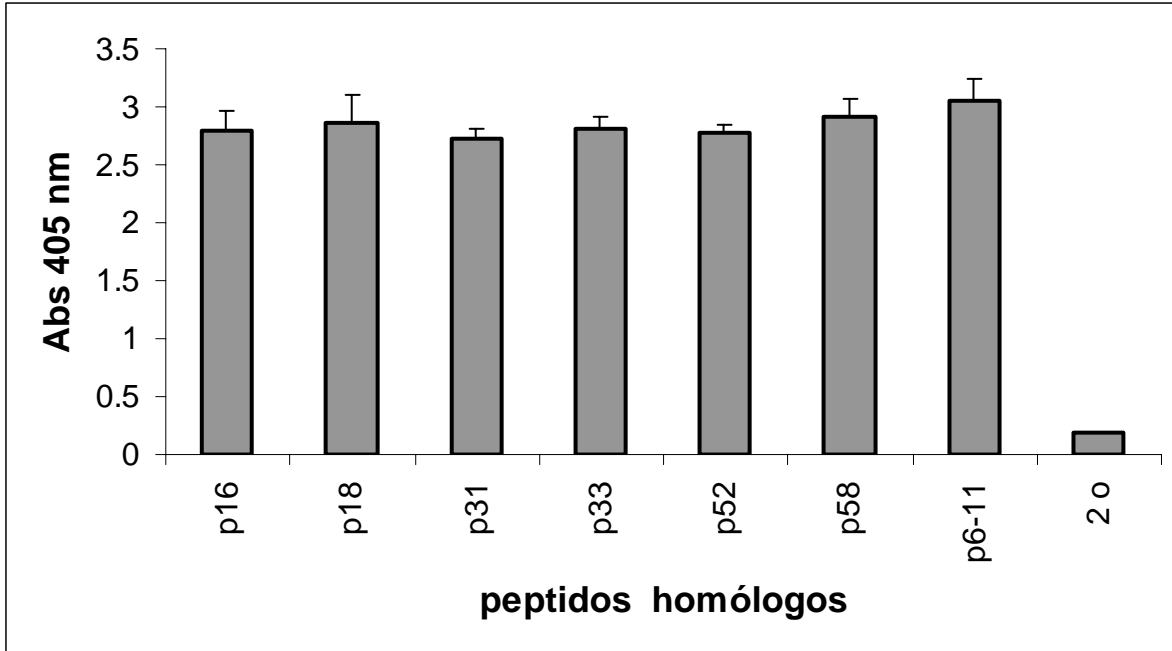
**Figura 8.** Títulos de anticuerpos específicos hacia los péptidos P16, P18, P31, P33, P52, P58 y P6/11, después de inmunizar a ratones Balb/c con cada uno de los péptidos correspondientes durante 4 ocasiones. La dilución de los sueros en la determinación fue de 1:100.

**Anticuerpos anti-IHSMNSTIL reconocen a sus homólogos derivados de HPV-18, -31, -33, -52, -58, -6 y -11.**

Después de analizar la inducción de anticuerpos producidos por las diferentes inmunizaciones con el péptido IHSMNSTIL y de sus homólogos de P-18, -31,-33,-52,-58, -6 y -11, se procedió a analizar si los anticuerpos anti-P16 tenían reactividad cruzada hacia cada uno de los péptidos homólogos. En la tabla 5 y figura 9 se observa que los anticuerpos IgG producidos por la inmunización de ratones Balb/c con el péptido IHSMNSTIL, muestran altos títulos de reconocimiento hacia los péptidos homólogos desde 2.5 a 3.1 de absorbancia, destacando la reactividad hacia los péptidos P6, P11 y P58 cuyos valores fueron de 3.1, 3.1 y 2.9 respectivamente.

**Tabla 5.** Inmunoreactividad del anticuerpo anti-P16 contra los péptidos homólogos P-18,-31,-33,-52,-58,-6 y -11.

Anticuerpo	Péptidos	Promedio Abs (405nm)
Anti p16	IHSMNSTIL (HPV-16)	2.7
	IHSMNSSIL (HPV-18)	2.8
	IHSMNPAIL (HPV-31)	2.6
	IHAMNPDIL (HPV-33)	2.65
	IHKMNATIL (HPV-52)	2.5
	IHTMDSNIL (HPV-58)	2.9
	IHTMNPSVL (HPV-6)	3.1
	IHTMNPSVL (HPV-11)	3.1
	Secundario	



**Figura 9.** Anticuerpos anti-P16 reconocen a los péptidos homólogos P18, P31, P33, P52, P58, P6-11. La dilución del suero anti-P16 fue de 1:100.

**Anticuerpos anti-P16, -P18, -P31, -P33, -P52, -P58 y -P6/11 reconocen a VLP's de la proteína L1 de HPV-16.**

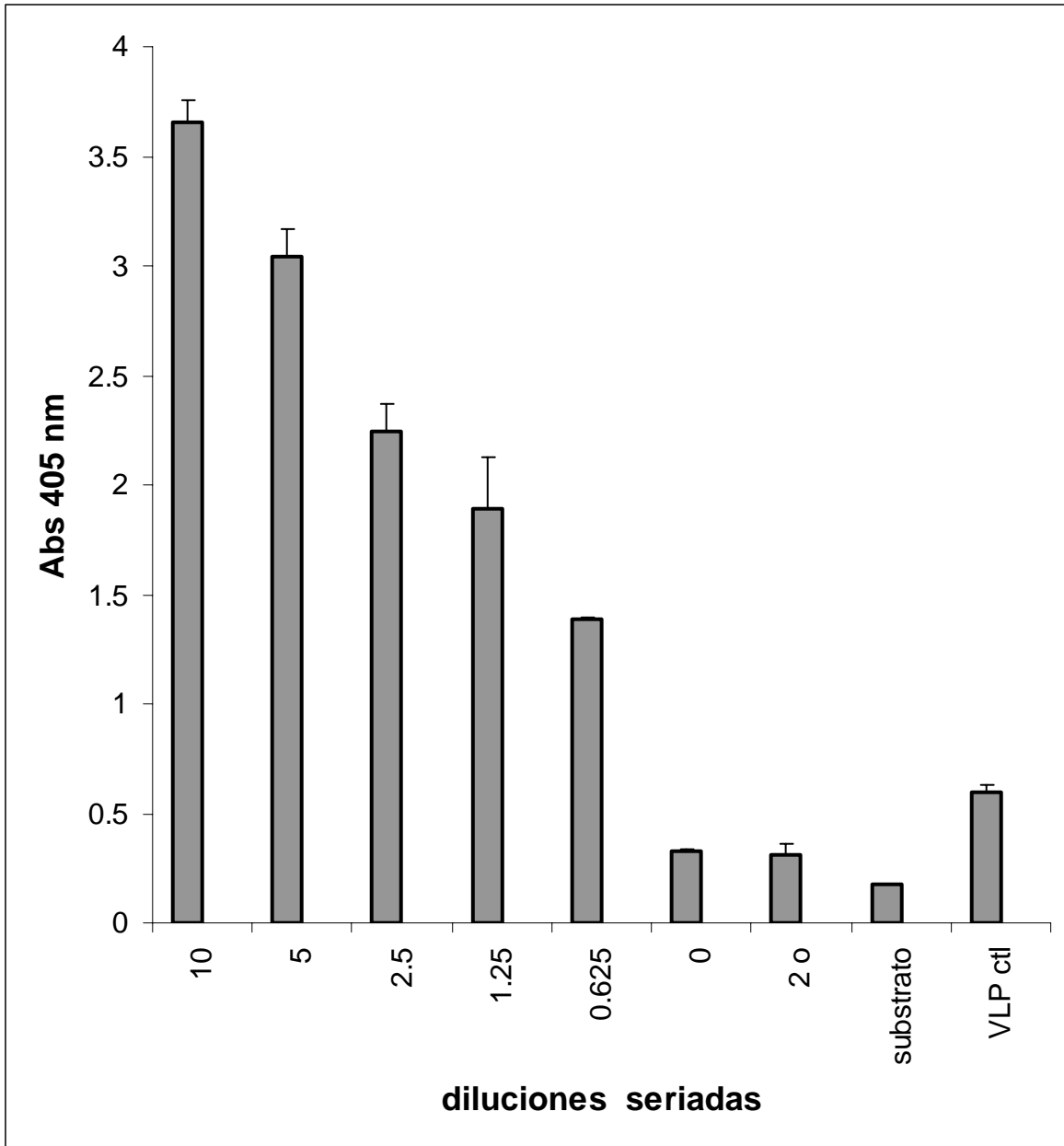
De acuerdo con los resultados anteriores, el anticuerpo anti-P16 fue capaz de reconocer a los péptidos homólogos, lo cual sugiere que este sitio conservado entre los diferentes tipos de HPV (alto y bajo riesgo) es altamente antigénico y potencialmente reconocido dentro de la estructura del virión infectante. Con la finalidad de analizar si los anticuerpos anti-P16 y los obtenidos de sus homólogos en ratones inmunizados, eran capaces de reconocer a estructuras conformacionales similares a viriones de HPV-16, en donde la región perteneciente al péptido P16 es potencialmente expuesta, se procedió a determinar si estos anticuerpos reconocen a partículas similares a virus (VLP's) constituidos por la proteína L1 de HPV-16. Para ello, se contó con VLP's de la proteína L1 de HPV-16 previamente generados en el laboratorio de Inmunobiología de FES-Zaragoza UNAM, asimismo con antisueros anti-VLP's generados a partir de ratones de la cepa Balb/c inmunizados con 3 dosis de 5 µg de VLP's.

Inicialmente se realizó una dilución seriada de un lote de VLP's en ensayos de ELISA para revelar la reactividad de los anticuerpos anti-VLP's a una dilución de 1:2500. Como se observa en la tabla 6 y figura 10, el título de absorbancia de VLP's entre 10 y 0.625 µL del lote original fue de 3.7 y 1.4 respectivamente, siendo óptimo el de 2.5 µL de VLP's con una absorbancia de 2.4, el cual fue más alto en comparación con el valor de 0.593 de Abs dado por 20 ng de VLP's de una marca comercial (Glaxo, SK, England), por

lo cual en el ensayo posterior se utilizaron 2.5  $\mu$ L de VLP's del lote original producido en el laboratorio.

**Tabla 6.** Reactividad de anticuerpos anti-VLP's contra diluciones de VLP's en ensayos de ELISA.

Dilución de VLP's	Promedio Abs
10 $\mu$ L	3.7
5 $\mu$ L	3.0
2.5 $\mu$ L	2.4
1.25 $\mu$ L	1.6
0.625 $\mu$ L	1.4
0 $\mu$ L	0.3
Secundario	0.2
Substrato	0.18
VLP GLAXO SK	0.593

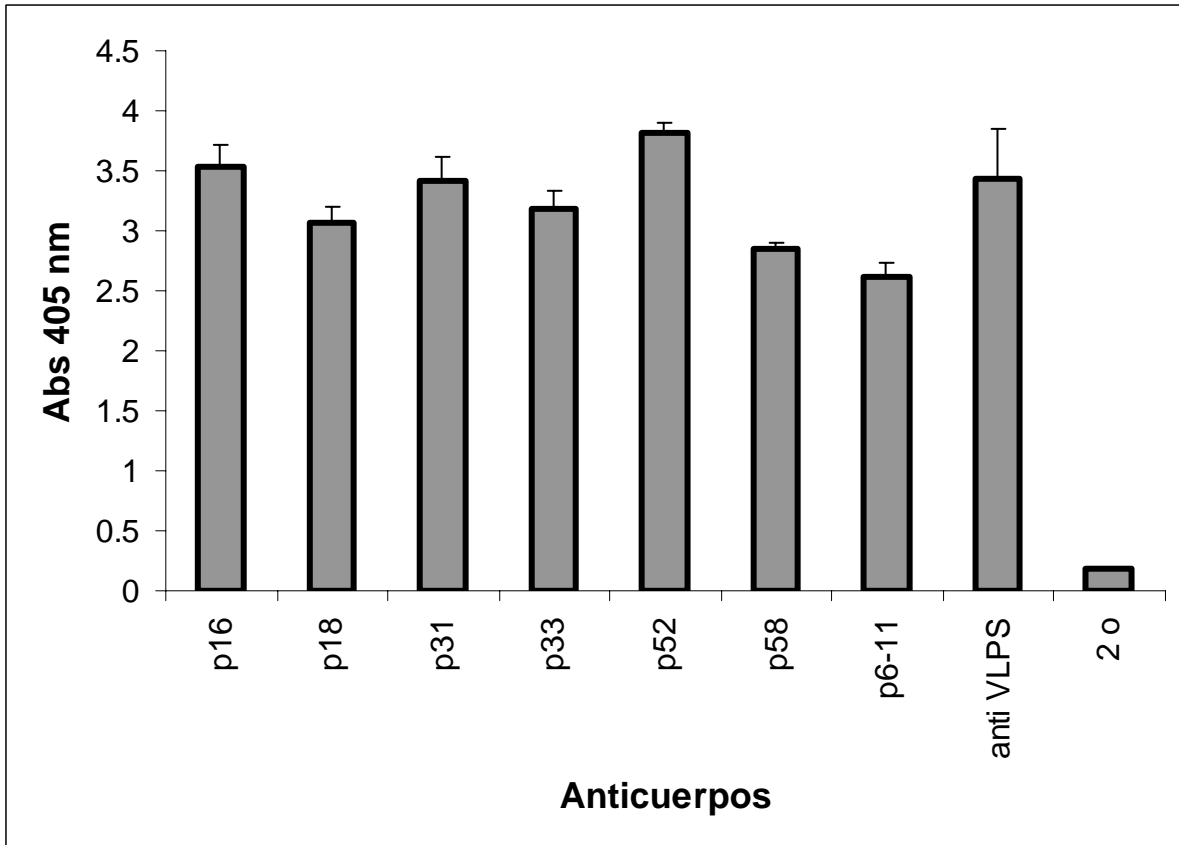


**Figura 10.** Reactividad de anticuerpos anti-VLP's contra diluciones seriadas de VLP's en ensayos de ELISA. La dilución del anticuerpo anti-VLP fue de 1:2500.

En la tabla 7 y figura 11 se muestra que los anticuerpos anti-P16 y homólogos reconocen a las VLP's compuestas por la proteína L1 de HPV-16. Los títulos más altos fueron dados por los anticuerpos dirigidos hacia los péptidos derivados de la proteína L1 de HPV's de alto riesgo, desde 3.1 hasta 3.9 de absorbancia, destacando los títulos dados por los anticuerpos anti-P16 y P52 con 3.7 y 3.9 de absorbancia respectivamente, ligeramente mayores a los obtenidos por el anticuerpo anti-VLP cuyo título promedio fue de 3.5. Mientras tanto, los títulos obtenidos por los anticuerpos anti-P6 y P11, derivados de HPV's de bajo riesgo, fueron de 2.8 de absorbancia en cada uno de ellos. Esto nos permite sugerir que los anticuerpos dirigidos hacia péptidos provenientes de HPV's de alto riesgo, tienen mayor avidez hacia los VLP's de HPV-16, muy probablemente debido a la alta homología entre el péptido P16 y aquellos derivados de los HPV's de alto riesgo.

**Tabla 7** Anticuerpos anti-P16 y sus homólogos de HPV's de alto riesgo reconocen fuertemente a VLP's de la proteína L1 de HPV-16.

Anticuerpos	VLPs	Promedio Abs
Anti IHSMNSTIL (HPV-16)	VLPs (HPV-16)	3.7
Anti IHSMNSSIL (HPV-18)		3.1
Anti IHSMNPAIL (HPV-31)		3.5
Anti IHAMNPDIL (HPV-33)		3.2
Anti IHKMNATIL (HPV-52)		3.9
Anti IHTMDSNIL (HPV-58)		3
Anti IHTMNPSVL (HPV-6)		2.8
Anti IHTMNPSVL (HPV-11)		2.8
Anti VLPs		3.5
Secundario		0.2



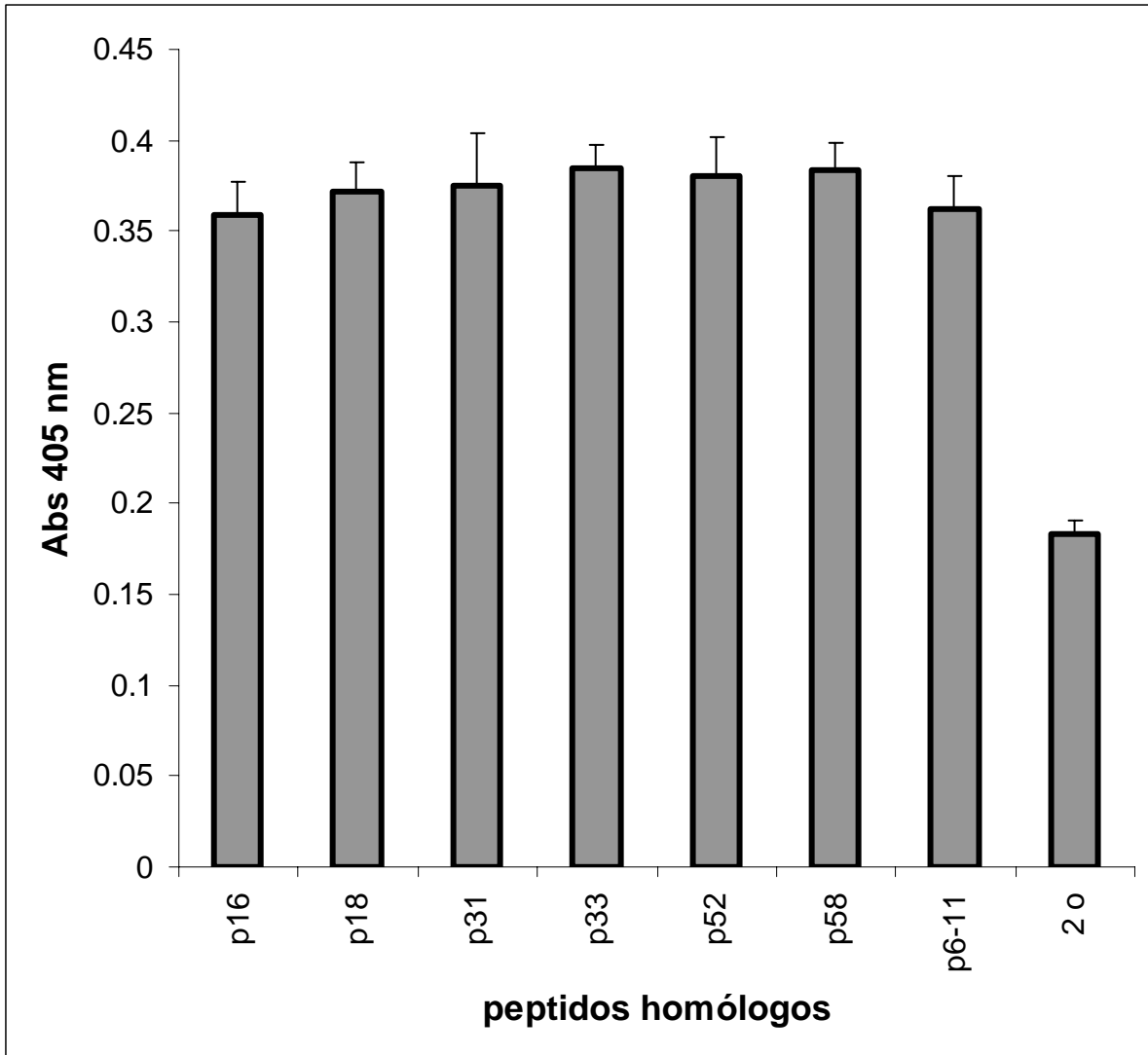
**Figura 11.** Los anticuerpos anti: P-16, P-18, P-31, P-33, P-52, P-58, p- 6/11 reconocen fuertemente a VLP's de la proteína L1 de HPV-16. La dilución utilizada de cada anticuerpo fue de 1:100; y la del anti-VLP fue de 1:2500.



Por otra parte, para averiguar si anticuerpos obtenidos en ratones inmunizados con VLP's, generan anticuerpos específicos a péptidos, en este caso hacia el péptido P16 y a sus homólogos, se procedió a evaluar la reactividad de anticuerpos anti-VLP's contra estos péptidos. Como se muestra en la tabla 8 y figura 12, la presencia de anticuerpos anti-P16 y sus homólogos P18, P31, P33, P52, P58 y P6/11, en el suero de ratones inmunizados con VLP's de la proteína L1 de HPV-16, fueron muy bajos comparados con el valor dado por anticuerpos anti-VLP's contra los propios VLP's en los ensayos de Elisa. Lo cual nos permite concluir que en los ratones inmunizados con VLP's, la principal respuesta es dirigida hacia epítopes conformacionales de la estructura de los VLP's y muy pocos hacia péptidos lineales.

**Tabla 8** Títulos de anticuerpos anti-P16 y sus homólogos en sueros de ratones inmunizados con VLP's de la proteína L1 de HPV-16.

Anticuerpo	Péptidos	Promedio Abs
Anti VLP's	IHSMNSTIL (HPV-16)	0.36
	IHSMNSSIL (HPV-18)	0.375
	IHSMNPAIL (HPV-31)	0.375
	IHAMNPDIL (HPV-33)	0.39
	IHKMNATIL (HPV-52)	0.38
	IHTMDSNIL (HPV-58)	0.38
	IHTMNPSVL (HPV-6)	0.36
	IHTMNPSVL (HPV-11)	0.36
Secundario		0.2



**Figura 12.** Anticuerpos específicos a VLP's de la proteína L1 de HPV-16 reconocen débilmente al péptido P16 y a sus homólogos P18, P31, P33, P52, P58 y P6/11. La dilución del anticuerpo VLP usada fue de 1:2500. El valor dado por anti-VLP hacia los VLP's fue de 3.5.

## Análisis de resultados

El péptido IHSMNSTIL derivado de la secuencia 417-425 de la proteína L1 de HPV-16 fue identificado inicialmente el grupo de investigación como un epítotope de linfocitos T en pacientes con infección por HPV-16 y 18 en el contexto del alelo de histocompatibilidad HLA-B\*039<sup>(14)</sup>. Posteriormente fue identificado como un péptido antigénico reconocido fuertemente por anticuerpos IgA e IgG presentes en secreciones cervicales y sueros de sangre periférica respectivamente, de pacientes con infecciones por HPV de alto riesgo<sup>(15)</sup>, lo que hace suponer que esta secuencia corresponde a un determinante antigénico para la activación de linfocitos T y linfocitos B durante la infección por HPV. Otro aspecto importante del péptido IHSMNSTIL es la alta homología (mayor del 80%) que comparte con secuencias encontradas en la proteína L1 de varios HPV's de alto riesgo, lo cual nos permite argumentar que este péptido antigénico es un epítotope común entre los diferentes tipos de HPV de alto riesgo, siendo entonces relevante para estudiar su capacidad para generar respuesta inmunológica hacia infecciones producidas por HPV de alto riesgo. En este sentido, el presente trabajo se llevó a cabo con la finalidad de analizar la inducción de anticuerpos específicos al péptido IHSMNSTIL y a sus homólogos en un modelo *in vivo*, usando para ello, ratones de la cepa Balb/c. De acuerdo con lo observado en los experimentos, después de un esquema de inmunización estandarizado para el péptido IHSMNSTIL (P16), en donde se aplicaron 4 dosis de 100 µg de péptido durante aproximadamente 40 días, se lograron obtener altos títulos de anticuerpos específicos hacia este péptido antigénico. Siguiendo este mismo esquema, también se lograron obtener anticuerpos específicos a cada uno de los péptidos homólogos pertenecientes a la proteína L1 de HPV-18 (IHSMNSSIL) (P18); HPV-31 (IHSMNPAIL) (P31); HPV-33 (IHAMNPDIL) (P33); HPV-52 (IHKMDATIL) (P52); HPV-58 (IHTMDSNIL) (P58); HPV-6 (IHTMNPSVL) (P6) y HPV-11 (IHTMNPSVL) (P11). De manera interesante se encontró que los anticuerpos específicos al péptido P16 mostraron alta reactividad cruzada de reconocimiento hacia los péptidos homólogos derivados de los HPV's de alto riesgo (P18, P31, P33, P52, P58) y en menor grado hacia los péptidos P6 y P11 de bajo riesgo, sugiriendo entonces que las diferencias entre las secuencias de los aminoácidos de los péptidos homólogos a P16 son importantes en la reactividad cruzada de estos anticuerpos, puesto que los péptidos P6 y P11 de bajo riesgo difieren en 4 aminoácidos respecto a P16 y los homólogos de alto riesgo (P31, P33, P52 y P58) difieren entre 1 y 3 aminoácidos en relación a éste, lo cual puede influir en la carga y estructura del péptido para ser reconocido por los anticuerpos.

Otro aspecto importante observado en este trabajo, fue el hecho de que anticuerpos derivados de animales inmunizados con los péptidos de la proteína L1 de HPV's de alto riesgo, reconocieron más eficientemente a partículas sintéticas semejantes a virus (VLP's) compuestas por la proteína L1 y L2 de HPV-16, en comparación con los anticuerpos obtenidos de animales inmunizados con los péptidos de la proteína L1 de HPV's de bajo riesgo. Sería entonces conveniente analizar, en estudios posteriores, si estos anticuerpos son capaces de neutralizar a partículas virales infecciosas. Por otra parte, si anticuerpos generados a través de la inmunización con péptidos derivados de HPV's de alto riesgo, reconocen al péptido P16 de manera lineal y conformacional en la estructura de las VLP's, entonces se podría pensar que durante las infecciones producidas por HPV's de alto riesgo, se puedan generar anticuerpos que reconozcan al péptido P16, lo cual sería de

gran relevancia para considerar el uso del péptido P16 para detectar infecciones virales producidas por HPV's de alto riesgo.. En estudios previos, hemos encontrado que en sueros de mujeres con infecciones producidas por HPV's de alto riesgo y no en sueros de mujeres con infecciones producidas por HPV's de bajo riesgo existen anticuerpos con alta reactividad hacia el péptido P16 <sup>(79)</sup>, lo cual apoya fuertemente esta idea.

La posición de P16 dentro de la estructura de la proteína L1 parece ser determinante en el reconocimiento de las estructuras conformacionales, debido a que este péptido forma parte de una asa situada entre las estructuras alfa-hélices h2-h3 cercanas al extremo carboxilo terminal de la proteína L1, las cuales junto con la alfa-hélice h4 forma la superficie de contacto con otros monómeros de L1 <sup>(11)</sup>. El reconocimiento de VLP's de HPV-16, por anticuerpos específicos a P16 y sus homólogos derivados de HPV's de alto riesgo, nos permite sugerir que particularmente esta secuencia altamente conservada entre estos HPV's se encuentra expuesta en la estructura conformacional. En apoyo a esta aseveración, se ha observado que secuencias más largas que incluyan aminoácidos contiguos al péptido P16 tanto en la posición carboxilo como amino terminal, no son reconocidas por anticuerpos IgG presentes en mujeres positivas a infecciones por HPV-16. En un estudio realizado por Dillner J 1990 <sup>(80)</sup>, en donde usó un péptido que incluía 9 aminoácidos en el extremo amino terminal y uno en la porción carboxilo terminal de P16, no encontró reactividad de anticuerpos hacia este péptido largo. De manera similar en un estudio reciente, en donde se utilizó un péptido de 20 aminoácidos que incluían de manera parcial a los aminoácidos IHSM de P16 en la parte carboxilo terminal, tampoco encontraron reactividad de anticuerpos en mujeres con infección por HPV-16 <sup>(81)</sup>.

Por otro lado, la reactividad natural hacia el péptido P16 en mujeres infectadas con HPV de alto riesgo puede ser un indicador de infecciones persistentes a través del tiempo, puesto que se ha demostrado que la respuesta contra diferentes péptidos derivados de la proteína L1 son significativamente prevalentes en pacientes con lesiones premalignas, en donde por lo menos ha existido una permanencia de la infección viral de 1 año <sup>(79, 82)</sup>. Sin embargo, la reactividad de anticuerpos hacia péptidos no es característica en pacientes con cáncer cèrvico uterino <sup>(83)</sup>, debido a que la reducción de anticuerpos anti-péptidos en estas pacientes puede ser debida a la disminución natural que ocurre en los individuos infectados o puede ser asociado con la carencia de la expresión del antígeno <sup>(79, 84)</sup>. Se sabe que la transcripción del antígeno L1 es restringida a los queratinocitos terminalmente diferenciados y que el nivel de diferenciación celular disminuye a medida de que el grado de neoplasia avanza <sup>(85)</sup>. En consecuencia, la expresión de la proteína L1 es significativamente reducida en lesiones avanzadas asociadas con genotipos de HPV de alto riesgo <sup>(86)</sup>, además de que en estadios avanzados de la enfermedad, eventualmente se da el rompimiento del gene L1 en células donde el genoma viral de HPV se integra para producir la transformación celular <sup>(79, 87)</sup>.

Otro dato importante encontrado en nuestro estudio fue la alta reactividad de los anticuerpos obtenidos de animales inmunizados con VLP's de HPV-16 hacia las propias VLP's, la cual no fue consistente al analizarla sobre el péptido P16 y los péptidos homólogos a éste. Al respecto, se ha observado que una buena proporción de los anticuerpos generados a través de la inmunización con VLP's, es dirigida hacia epítopes conformacionales de la estructura de las VLP's lo cual probablemente se vea reflejado en

la reactividad hacia los péptidos antigénicos ensayados. Tomando en consideración de que a los animales se les inmunizó con dos dosis de 5 µg de VLP's durante un periodo de 1 mes, y a que como se mencionó anteriormente, la persistencia del antígeno es favorable para la generación de anticuerpos péptido-específicos, podemos considerar que el tiempo y las dosis de antígeno utilizados durante la inmunización no fueron suficientes para que se generaran anticuerpos específicos hacia el péptido P16 o hacia sus homólogos, lo cual sería de gran relevancia para corroborarlo en estudios posteriores.

## **Conclusiones.**

- 1.- La mayor cantidad de anticuerpos específicos hacia el péptido IHSMNSTIL derivado de la proteína L1 del HPV 16 (P16), así como de sus homólogos derivados de HPV-18 (IHSMNSSIL) (P18), HPV-31 (IHSMNPAIL) (P31), HPV-33 (IHAMNPDIL) (P33), HPV-52 (IHKMDATIL) (P52), HPV-58 (IHTMDSNIL) (P58), HPV-6 (IHTMNPSVL) (P6) y HPV-11 (IHTMNPSVL) (P11), se obtuvo mediante cuatro inmunizaciones con 100 µg de péptido cada una, durante 40 días.
- 2.- El anticuerpo anti-péptido P16 tuvo fuerte reactividad cruzada contra los péptidos homólogos, particularmente hacia P6, P11, P18 y P58.
- 3.- Los anticuerpos específicos al péptido P16 y a los homólogos derivados de la proteína L1 de HPV's de alto riesgo: P18, P31, P33, P52 y P58 reconocieron fuertemente a VLP's de la proteína L1 de HPV-16, sugiriendo que el péptido IHSMNSTIL se encuentra conformacionalmente expuesto en la estructura de los VLP's.
- 4.- Los anticuerpos obtenidos de ratones inmunizados con VLP's tuvieron baja reactividad hacia el péptido P16 y sus homólogos, sugiriendo que su principal reconocimiento es sobre la estructura conformacional de las VLP's.

## Perspectivas

De acuerdo con los estudios previamente realizados con el péptido P16 y a los resultados obtenidos en el presente estudio, nos permiten sugerir que este determinante antigénico encontrado en la región  $\alpha 2$ - $\alpha 3$  de la proteína L1 de HPV-16, es capaz de inducir la producción de anticuerpos específicos. Estos anticuerpos pueden ser inducidos mediante inmunización, como lo mostrado en este estudio; o bien, de manera natural en mujeres infectadas por HPV's de alto riesgo como lo sugieren estudios previos realizados en nuestro laboratorio. En consecuencia, este péptido tiene un potencial de relevante importancia para detectar infecciones producidas por estos tipos de HPV, también será interesante conocer si la inducción de anticuerpos específicos se correlaciona con la persistencia de la infección, lo cual será conveniente explorar en estudios posteriores.

De acuerdo con lo observado en este estudio, la inmunización con el péptido P16 induce anticuerpos capaces de reconocer partículas similares a virus o VLP's de la proteína L1 de HPV-16, por lo que sería de interesante saber si estos anticuerpos tienen la capacidad de neutralizar a partículas virales y prevenir la infección de células blanco por tipos virales de alto riesgo, lo cual debe ser analizado en los siguientes estudios.

La vacunación con péptidos que generen anticuerpos de memoria, como lo es P16, puede ser de gran utilidad en la prevención de este tipo de enfermedades, que en nuestro país representan es un importante problema de salud con alto índice de mortalidad. En la actualidad la introducción de vacunas recombinantes como lo son las VLP's sintéticas son muy caras en su obtención y deben seguir una rigurosa conservación en cadena fría, por lo que gastos de manutención y distribución también son caros. En consecuencia es de vital importancia generar vacunas polivalentes más accesibles a la población de países en vías de desarrollo, por lo que las vacunas a base de péptidos pueden ser una opción.

## Apéndice

### Preparación de soluciones

Buffer de carbonato y bicarbonatos

Solución A:

Carbonato de Sodio 0.1M (5.29 g/500 mL de agua)

Solución B.

Bicarbonato de Sodio 0.1M (4.2 g/500 mL de agua)

Adicionar solución A a la solución B hasta que el pH sea de 9.6. Guardar todas las soluciones en refrigeración.

TBS-Tween 0.1%

6.5 gr de Tris Base, 8.7 gr de Cloruro de Sodio, para 1 Lt de Agua destilada. Ajustar el pH a 7.6. Adicionar Tween 20 al 0.1%. Guardar en refrigeración.

Solución bloqueadora

6.5 gr de Tris Base, 8.7 gr de Cloruro de Sodio, para 1 Lt de Agua destilada. Ajustar el pH a 7.6 Adicionar Tween 20 al 0.1%. De esta solución se toman 100 mL se le adicionan 2 gramos de Albúmina bovina sérica. Guardar en refrigeración.

Dietanolamina al 10 %

Disolver 10 mL de Dietanolamina en 100 mL de Agua destilada. Ajustar el pH a 9.8. Guardar en refrigeración y proteger de la luz.

PBS

8.0 gr de Cloruro de Sodio, 2.88 gr de Fosfato de Sodio monobásico, 0.4 gr Fosfato de Potasio, 0.20 gr de Cloruro de Potasio en 800 mL de H<sub>2</sub>O disolver las sales, ajustar el pH a 7.2 con ácido Clorhídrico 10 N, se lleva a un volumen final de 1 litro y se esteriliza



## Referencias

- 1.- Torroella-Kouri, M., Morsberger, S., Carrillo, A., Mohar, A., Meneses, A., Ibarra, M., Ghaffari, A.M., Solorza, G., and Shah, K.V. HPV prevalence among Mexican women with neoplastic and normal cervixes. *Gynecologic Oncol.*, (1998) 70: 115-120.
- 2.- Walboomers, J.M.M., Jacobs, M.V., Manos, M.M., Bosch, F.X., Kummer, J.A., Shah, K.V., Snidgers, P.F., Peto, J., Meijer, C.J.L.M., Muñoz, N.. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* (1999) 189: 12-19.
- 3.- Duggan\_Keen, M.F., Brown, M.D., Stacey, S.N., Stern, P.L.. Papillomavirus vaccines. *Frontiers in Bioscience* (1998) 3: 1192-1208.
- 4.- Wright, T.C., Richart, R.M. Review role of human Papillomavirus in the pathogenesis of genital tract warts and cancer. *Gynecologic. Onc.* (1989) 37: 151-164.
- 5.- Zur Hausen, H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J. Nat. Can. Inst.* (2000) 92: 690-698.
- 6.- Bosch, F.X., Manos, M., Muñoz, N., Sherman, M., Jansen, A.M., Peto, J., Schiffman, M.H., Moreno, V., Kurman, R., Shah, K. EBSCC Study Group: Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J. Natl. Cancer Inst.*, (1995) 87: 796-802.
- 7.- Muñoz, N., Bosch, F.X. Cervical cancer and human papillomavirus: epidemiological evidence and perspectives for prevention. *Salud pública de México.* (1997) 39: 274-282.
- 8.- Muñoz, N., Bosch, F.X., de Sanjosé, S., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, K.V., Snijders, P.J., and Meijer, Ch, J.L.M.. Epidemiology classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *The New England J of Med.* (2003) 348: 518-527.
- 9.- Berumen, J., Unger, E. R., Casas, L. Figueroa, P. Amplification of human papillomavirus types 16 and 18 in invasive cervical cancer. *Hum. Pathol.* (1995) 26: 676-681.
- 10.- A Granoff. Editor *Encyclopedia of virology*, second edition, USA California Academic press, (1999) Volume 2 p.p 1105-1120
- 11.- Chen Xiaojiang S, Garcea Robert L, Goldberg Ilya, Casini Gregory, and Harrison Stephen C. Structure of Small Virus-Like Particles Assembled From the L1 Protein of Human Papillomavirus 16. *Molecular cell* (2000) 5: 557-567

- 12.- Frazer Ian H. Prevention of Cervical Cancer Through Papillomavirus Vaccination . *Nature Immunol.* (2004) 4: 46-54
- 13.- Schiller John T, Davies Philip. Delivering on the promise: HPV vaccines and cervical cancer. *Nature Microbiology* (2004) 4: 343-347
- 14.- Monroy-García A, Weiss-Steider B, Hernández-Montes J, Ortiz-Navarrete V.F, Bañuelos-Pánuco A, Acosta-Araujo A, Díaz-Quíñonez A, López-Graniel C.M, Herbert G, Granados J, De Leo C, Silva-López R.M, and Mora-García M.L. 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: 1933-1942
- 15.- Rocha-Zavaleta L, Ambrosio J.P, Mora-García M.L, Cruz-Talonia F. Hernandez-Montes J, Weiss-Steider B, Ortíz-Navarrete V and Monroy-García 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
- 16.- Raphael E Pollock .Editor. International union against cancer. *Manual of clinical oncology seventh edition.* A John Wiley and sons, inc publication. printed in the United States of America (1999) p.p 515-524
- 17.- De Vita Vincent, Hellman Samuel, Rosenberg Steven. Edited. Cancer principles and practice of oncology . JB Lippincott company. Printed in United States of America (1982) p.p 823-860, 1168-1177
- 18.- González –Merto J, Gonzalez-Bosquet y cols. Ginecología oncológica. 2a edición edit Masson SA Barcelona (2000) p.p 234-289
- 19.- Alonso, Lazcano, Hernandez. Cancer cervico uterino diagnostico, prevención y control. 1a reimpresión edit Médica Panamericana México D.F (2001) p.p 59-77
- 20.- .- Conzuelo Q Alvaro. Nuevas alternativas en el tratamiento del Papillomavirus. edit Prado. México D.F (2002) p.p 1-7
- 21.- Bosch, F.X, Lorincz A, Muñoz N, Meijer C J & Shah K V . The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer, *J. Clin. Pathol* (2002) 55: 244-265
- 22.- Zur Hausen, H, de Villers, E.M, & Gissmann, L. Papillomavirus infections and human genital cancer. *Gynecol Oncol* (1981) 12: S124-S128
- 23.- Zur Haunsen , H. Inmortalization of human cells and their malignant conversion by high risk human papilloomavirus genotypes. *Semin Cancer Biol.* (1999) 9: 405-409

- 24.- Zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *Journal of the National Cancer Institute* (2000) Vol 92 No 690-695
- 25.- de Villiers Ethel-Michele, Fauquet Claude, Broker Thomas R, Bernard Hans-Ulrich and zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. (2004) 324:17-27
- 26.- Plett Torres Tanya . Tesis de Maestría Seroprevalencia de IgG , IgA. e IgM contra las proteínas E4 y E7 del virus del papiloma humano tipo 16, en hombres mexicanos (2003) Instituto de Salud Pública p.p 6-10
- 27.- Koneman M.D. Diagnostico microbiologico. Texto y atlas color 5 ed Buenos Aires Argentina. edit Panamericana, S.A (1999) p.p 1186-1188
- 28.- Favre M. Structural polipeptides of rabbit, bovine and human papillomavirus. *J. Virol* (1975) 15: 1239-1247
- 29.- De Villiers E-M. Heterogeneity of the human papillomavirus group. *J. Virol* (1989) 63: 4898-4903
- 30.- Baker T,S. Newcomb W,W. Olson N,H. Cowser L,M. Olson C. Brown J, C. Structure of bovine and human papillomavirus. Análisis by electrón microscopy and three dimensional image reconstruction . *Biophys J*. (1991) 60: 1445-1456
- 31.- Sapp M. Volppers C. Muller M. Steck R,E. Organization of the major and minor capsid proteins in human papillomavirus type 33 virus-like particles. *J Gen Vrol* (1995) 76: 2407-2412
- 32.- Marcio O Lasaro and Hildegund C.J. Ertl. Human papillomavirus-associated cervical cancer: Prophylactic and therapeutic vaccines. *Gene Ther Mol Biol*. (2004) Vol 8 :291-306
- 33.- Zur Hausen H. Papillomaviruses in human cancers. In: Infectious causes of cancer Target for intervention. Ed. Goedert JJ. *Human press. USA* (2000). 245-261
- 34.- Hubert, W.G., Laimins, L.A.. The action of E6 and E7 of human papillomaviruses in cellular immortalization and transformation. In: Rosental, L.J. (Ed). Mechanisms of DNA tumor virus transformation. *Monogr Virol. Basel, Karger*. ( 2001) 23: 44-63.
- 35.- Laimins LA. Regulation of transcription and replication by human papillomavirus. Washington: *American Society for Microbiology* (1998) p.p 201-233
- 36.- Howley P.M. Papillomavirinae: The viruses and their replication. Fields Virology 3 ed. Philadelphia: *Lippincott-Raven* (1996) p.p 2045-2067

- 37.- Yamada T, Wheeler C.M, Halpern A.L. Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States population characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2 and L1 coding segments. *J Virol* (1995) 69: 7743-53
- 38.- Roberts S, Ashmole I, Johnson G.D. Cutaneous and mucosal human papillomavirus E4 proteins form filament-like structure in epithelial cell. *Virology* (1993) 197:176-187
- 39.- Myers G, Lu H, Calif C. Heterogeneity of papillomaviruses. *Cancer Biol* (1996) 7: 349-358
- 40.- Doorbar J, Ely S, Sterling J. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins result in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* (1991) 352: 824-827
- 41.- Ham J, Dostanti N, Gauthier JM. The papillomavirus E2 protein: a factor with many talents. *Trends Biochem Science* (1991) 16: 440-444
- 42.- McBride A.A, Romanczuk H, Howley P.M, The papillomavirus E2 regulatory proteins. *J. Biol Chem* (1991) 266: 1811-1814
- 43.- Pim D, Collins M, Banks L. Human papillomavirus type 16 E5 gene stimulates the transforming activity of the epidermal growth factor receptor. *Oncogene* (1992) 7: 27-32
- 44.- McBride A, Myers G. The E2 proteins. In human papillomavirus. A compilation and analysis of nucleic and amino acid sequence. *Los Alamos National Laboratory* (1996) p III 15- II 31.
- 45.- Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM. A cellular protein mediates association of P53 with the E6 oncoprotein of Human Papillomavirus type 16 or 18. *EMBO J* (1991). 10(13) 4129-4135.
- 46.- Münger K, Scheffner M, Huibregtse JM, Howley PM. Interactions of HPV E6 and E7 oncoproteins with tumor suppressor gene product. *Cancer Surv* (1992) 12: 197-217
- 47.- DiMaio D, Petti L, Hwang ES. The E5 transforming proteins of the Papillomaviruses. *Sem Virol* (1994) 5: 369-379
- 48.- Chen J.J, Reid CE, Band V, Androphy E.J. Interaction of Papillomavirus E6 oncoproteins with a putative calcium-binding protein. *Science* (1995) 269: 529-531
- 49.- Syrjänen SM, Syrjänen JK. New concepts on the role of Human Papillomavirus in cell cycle regulation. *Ann Med* (1999) 31: 175-187.
- 50.- Zur Hausen. Papillomaviruses and Cancer: From basic studies to clinical application. *Nature.com/reviews/cancer* (2002) volume 2: 342-350.

- 51.- McMurray HR : Nguyen D. Westbrook TF. McAnce DJ. Biology of human papillomavirus. *Int J Exp Path.* (2001) 82: 15-33
- 52.- Howley P,M Lowry D,R . Papillomavirus and their replication In DM Knipe PM Howley. DE Griffin . RA Lamb. MA Martin. B Rizman; SE Straus (ed), *Virology 4<sup>th</sup> ed Lippincott/ the Williams & Wilkins co. Philadelphia Pa* (2001) 2 p.p 2197-2229
- 53.- Middleton K. Peh V. Southern S , Griffin H. Stolar K. Nakahara T. El-Sherif A. Morris L. Soth R. Hibma M. Jenkins D. Lambert P. Coleman M. Doorbar J. Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *J Virol* (2003) 77 : 10186-10201
- 54.- Lehn H, Villa L.L, Marziona F, Hilgarth M, Hillemans H.G, Saber G. Physical state and biological activity of human papillomavirus genomes in precancerous lesions of the female genital trac. *J.Gen. Virol* (1988) 69:187-196
- 55.- Wamess B, Levin A.J, Howley P.M. Association of human papillomavirus-types 16 and 18 E6 protein with p53. *Science* (1990) 248: 76-79
- 56.- Galloway D.A, Mc Dugall. J.K . The disruption of cell cycle checkpoints by papillomavirus oncoproteins contributes to anogenital neoplasia. *Sem Cancer Biol.*(1996) 7: 309-315
- 57.- McIntyre. M.C, Ruesh M.N, Laimins L.A, Human papillomavirus E7 oncoprotein binds a single form of cyclin E in a complex with cdk2 and p107. *Virology* (1996) 215: 73-82
- 58.- Dyson N, Howley P.M, Munger K. Harlow E. The human papillomavirus-16 E-7 oncoproteins is able to bind to retinoblastoma gene product. *Science* (1989) 243: 934-937.
- 59.- Encyclopedia of immunology. Edited by Ivan M Roit and Peter J Delves. San Diego California USA. Academic Prees (1992) Volume three: 1201-1202
- 60- Benton C, Shahidullah H, Hunter J. Human papillomaviruses. *Papillomavirus Rep* (1992) 3: 23-26
- 61.- Tay SK. Jenkins D. Singer A. Natural killer cells in cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus infection. *Br Obstet Gynaecol* (1987) 94: 901-906
- 62.- Fierlbeck G. Schiebel U. Muller C. Immunohistology of genital warts in different stages of regresion alter therapy with interferon . *Dermatologica* (1989) 179: 191-195
- 63.- Berumen J, Villegas N. Vacunas terapéuticas recombinantes contra el cáncer del cuello uterino. *Salud Publica Méx;* (1997) 39: 288-297.
- 64.- Margaret Stanley. Immune response to human papillomavirus. *Vaccine.* (2005)1-7

- 65.- Abbas .A, Lichtman A. Inmunología celular y molecular.5 edición Edit Elseiver Madrid (2004) p.p 189-193
- 66.- Berumen J .Ordoñez R M. Lazcano E. Salmeron J. Galvan S C. Estrada R A. Yunes E. García-Carranca A. González-Lira G. Madrigal-de la Campa A . Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *Journal of the nacional cancer institute* (2001) vol 93 No 17 September 5: 1325-1330
- 67.- Adams A, Borysiewicz L, Fiander A, Man S, Jasani B, Navabi H, Lipetz C, Evans A.S, Mason M. Clinical studies of human papilloma vaccines in pre-invasive and invasive cancer : *Vaccine* (2001) 19: 2549-2556
- 68.- Bontkes H.J, De Gruijl T.D, Van Den Muysenberg A J.C, Verheijen R H.M, Stukart M J, Meijer C J L M, Scheper R J, Stacey S N, Duggan-Keen M F, Stern P L, Man S, Borysiewicz L K and Walboomers J M M. Human papillomavirus type 16 E6/E7- specific cytotoxic T lymphocytes in women with carvical neoplasia . *Int J Cancer* (2000) 88: 92-98
- 69.- Bauer M, Wagner H, Lipford G B. HPV type 16 E7 HLA-A2 binding peptides are immunogenic but not processed and presented. *Immunology Letters* (2000) 71 55-59
- 70.- Mandic A, Vujkov T . Human papillomavirus vaccine as a new way of preventing cervical cancer: a dream or the future?. *Annals of Oncology* (2004) 15 :197-200
- 71.- Galloway D A. Papillomavirus vaccines in clinical trials. *The Lancet infectious Diseases* (2003) 3 469-475
- 72.- Bubenik J : Animal models for development of therapeutic HPV 16 vaccines (review) *International Journal of Oncology* (2002) 20 :207-212
- 73.- Koutsky LA. Ault KA. Wheeler CM. Brown DR. Barr E. Alvarez FB. Chiacchierini LM. Jansen K . Acontrolled trial of human papillomavirus type 16 vaccine. *The New England Journal of Medicine* (2002) 347 No 21: 1645-1651
- 74.- Evans TG. Bonnez W. Rose RC. Koenig S. Demeter L. Suzich J. O'Brien D. Campbell M. White WI. Baisley J. Reichman RC. A phase I study a recombinant virus like particles vaccine against human papillomavirus type 11 in healthy adults volunteers *The J of Inf Dis* (2001) 183: 1485-1493
- 75.- McNeil C. Coming soon: Cervical Cancer Vaccines , and an Array of Public Health Issues. *J N C I.* (2006 ) 98 : 432-435
- 76.- Lowy D R. Schiller J T. Prophylactic human papillomavirus vaccines. Review series *.The Journal of Clinical Investigation.* (2006) 116: 1167-1173.

- 77.- Rojas-Espinosa O. Inmunología ( de memoria) 2a ed. edit Médica Panamericana México DF (2001) p.p 164-165
- 78.- <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/>
- 79.- Rocha-Zavaleta L. Pereira-Suárez A L. Yescas G. Cruz-Mimiaga R M. García-Carranca A . Cruz Talonia F. Mucosal IgG and IgA responses to human papillomavirus type 16 capsid proteins in HPV16-infected women without visible pathology. *Viral Immunol* (2003) 16(2) :159-168
- 80.- Dillner J. Dillner L. Utter G. Eklund C. Carter J.J. Rotola A. Costa S & DiLuca D. Mapping of linear epitopes of human papillomavirus type 16: the L1 and L2 open reading frames. *Int J Cancer* (1990).45: 529-535
- 81.- Urquiza M. Guevara T. Espejo F. Bravo M M. Rivera Z. Patarroyo M E. Two L1-peptides are excellent tools for serological detection of HPV- associated cervical carcinoma lesions. *Biochemical and Biophysical research communications*. (2005) 332: 224-232
- 82.- Sharma B K. Ray A & Murthy N S. Prevalence of serum antibodies to synthetic peptides to HPV 16 epitopes among indian women with cervical neoplasia *Eur J Cancer* (1996) 32A: 872-876
- 83.- Dillner J. Wiklund F. Lenner P. Eklund C. Fredriksson- Shanazarian V. Schiller J T. Hibma M. Hallmans G & Stendahl U. Antibodies against linear ad conformational epitopes of human papillomavirus type 16 that independently associated with cervical cancer. *Int J Cancer* (1995) 60: 377-382
- 84.- Andersson-Ellstrom A. Dillner J. Hagmar B. Schiller J . Sapp M. Forssman L. Milsom I. Comparison of development of serum antibodies to HPV 16 and HPV 33 and acquisition of cervical HPV DNA among sexually experienced and virginal young girls. A longitudinal cohort study. *Sex Transm Dis* (1996) 23: 234-238
- 85.- Stoler M H. Rhodes C R. Whitbeck A. Wolinsky S M. Chow L T & Broker T R. Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasia. *Hum Pathol* (1992) 23: 117-128
- 86.- Melsheimer P. Kaul S. Doeck S. & Bastert G . Immunocytochemical detction of HPV high-risk type L1 capsid proteins in LSIL and HSIL as compared with detection of HPV L1 DNA. *Acta Cytol* (2003) 47: 124-128
- 87.- Walboomers J M. M & Meijer C J L M . Do HPV-negative cervical carcinoma exist? *J Pathol* (1997) 181: 253-254