



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA**

**USO DEL PÉPTIDO ANTIGÉNICO IHSMNSTIL DE LA  
PROTEÍNA L1 DE HPV-16 PARA LA DETECCIÓN DE  
ANTICUERPOS ESPECÍFICOS EN SECRECIONES DE  
MUCOSA BUCAL, CERVICAL Y SUERO DE PACIENTES CON  
INFECCIÓN POR VIRUS DE PAPILOMA HUMANO.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**B I Ó L O G A**

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

**KARYNA PÉREZ SALDAÑA**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. ALBERTO MONROY GARCÍA**



**MEXICO, D.F.**

**NOVIEMBRE, 2008.**



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.

## DEDICATORIA

### A mi mamá: Alejandra Saldaña Terán

La vida nos ha mostrado sus múltiples facetas y hoy nos deja disfrutar una de ellas. Gracias por ser mi ejemplo de fortaleza, amor y de sacrificio incondicional, es el ser mas maravillosos que poseo y este es solo el inicio de muchos triunfos que nos esperan. La amo.

### A mi papá: Máximo Velasco Beltran

Gracias por su incondicional apoyo, compañía y consejos que le ha sabido brindar a mi familia y sobre todo por ser un excelente hombre.

### A mis hermanos: Gris, Luis, Carlos, Sergio

Juntos hemos luchado y madurado, y por ningún motivo abandonaremos nuestros sueños; este les pertenece por igual gracias por su amor, por su apoyo y por soportarme.

### A mis abuelitos: Magdalena Terán Aguilar y Pascual Saldaña Hernández

Por que cuando mas los necesitamos nos abrieron las puertas de su corazón y nos recibieron con todo su amor, y siempre educándonos de la mejor manera.

### A mis tíos: Hortensia, Humberto, Jesús y Alejandro

Agradezco sus consejos y su apoyo en todo momento en que lo requerí pues siempre se mostraron disponibles a ayudarme.

### A mi prima: Naty

A pesar de ser la integrante mas pequeña de la familia se que algún día entenderás esto, eres muy inteligente y sabes, llegaste en el momento mas preciso a mi vida para darle luz.

## AGRADECIMIENTOS

Este proyecto se realizó en la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza en Diferenciación Celular y Cáncer, en el Laboratorio de Inmunobiología, en la FES-Zaragoza bajo la dirección del **Dr. Alberto Monroy García** al cual le agradezco el haberme permitido desenvolverme en su grupo de trabajo como de mostrarse siempre accesible y respetuoso ante todo. Gracias por sus conocimientos es una persona digna de admirarse y que siempre va por más sin importar los obstáculos.

A la **Dra. María de Lourdes Mora García** a la cual apreció mucho por sus enseñanzas pero sobre todo por sus consejos, no solo como una asesora sino como una amiga, su apoyo moral en todo momento y por la confianza que deposito en mí.

Al **Maestro Jorge Hernández Montes** por siempre mostrarse disponible ante cualquier duda además de ser crear ese ambiente de confianza para transmitirnos sus conocimientos.

A los **miembros del Jurado**: **Dra. María de Lourdes Mora García**, **Dr. Alberto Monroy García**, **Maestro Jorge Hernández Montes**, **Dr. Juan José Rodríguez Mercado** y **Dr. Edelmiro Santiago Osorio** les agradezco las sugerencias realizadas para que este trabajo diera lo mejor de sí, además de su rápida colaboración.

### **A mis amigas y hermanitas incondicionales: Lili y Paty**

Nos conocimos siendo aun unas niñas, vivimos y compartimos las mejores aventuras de adolescentes y ahora cada una esta consolidando su vida, ya con un papel de mujeres profesionistas con distintas prioridades pero igual de importantes, disfrutándolas al máximo pero siempre juntas y felices. Gracias amigas por nunca dejarnos caer.

### **A mis amigas del laboratorio:**

Rosario de verdad muchas gracias por tu apoyo incondicional deseo que tengas mucho éxito en tus próximos proyectos no te rindas te quiero mucho.

Gina mil gracias por tus consejos estas de mas decirte lo que siento por ti has sabido alentarme en todo momento sabes que te admiro mucho como amiga, como profesionista y en verdad fue una gran fortuna el haberte conocido, te quiero mucho.

Yessi, Mariel, Carmen, Vainey, Azucena y a mi amigo Jesús por la enorme confianza que tienen en mí, desde que llegaron al laboratorio espero haberles siempre sido útil, al igual les agradezco las atenciones y su apoyo que me han brindado, espero nunca pierdan ese espíritu de alegría, de lucha y de superación que los caracteriza, los quiero mucho.

### **A mis amigas y compañeras de la Carrera:**

José, Mari, Angi, Ara, Giovanna, Eleane, Eli, Leti, Bere, Arely, Moni, les agradezco todos esos momentos vívidos durante nuestras salidas a campo o en aquellas reuniones, siempre aprendí algo nuevo de cada una pues siempre tuve la oportunidad de estar un tiempo cada una de ustedes y aunque somos tan distintas hay algo que tenemos en común y es que somos muy inteligentes, que no nos rendimos fácilmente y que saldremos adelante.

A tí Bety sabes que te estimo mucho y que esta relación de amistad que tenemos ahora espero conservarla; a veces uno descubre lo mejor de las personas en los peores momentos y eso sucedió contigo te quiero mucho y ánimo que aun nos faltan muchas cosas por hacer tienes el potencial así que hazlo.

### **A mí amigo Félix:**

Te agradezco infinitamente el que siempre me hayas brindado un lugar y un espacio entre tus múltiples ocupaciones, te admiro demasiado por el gran ser humano que eres, pues como tu ya hay muy pocos siempre fuiste como un hermano en los peores momentos y nunca te importo dejar tus interés por ayudarme gracias por ser mí amigo y mí confidente espero nunca defraudarte, mí súper Médico.

### **A la familia García Rojas:**

Antes de comenzar este proyecto ya eran parte de mí vida ahora han transcurrido 6 años en los cuales hemos construido una amistad y un amor inmenso, es como contar con una segunda familia; no solo confiaron en mí sino que me han apoyado en todos los sentidos hasta el final por eso les agradezco el haberme permitido haber vivido experiencias hermosas a su lado.



El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Inmunobiología de la UMIEZ de la FES-Zaragoza, UNAM., con el apoyo económico de DGAPA-PAPIIT IN212506 y financiado por los proyectos:

DGAPA-PAPIIT IN212506

CONACYT 47615-Q

SILANES-FUNSAUD  
No. 536

---

---

**INDICE**

<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
<b>MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>4</b>
<b>Inmunidad Innata.....</b>	<b>5</b>
<b>Inmunidad Adaptativa.....</b>	<b>5</b>
<b>Ontogenia de linfocitos.....</b>	<b>6</b>
<b>Inmunidad Humoral.....</b>	<b>9</b>
<b>Inmunidad Celular.....</b>	<b>14</b>
<b>Virus de Papiloma Humano.....</b>	<b>16</b>
<b>Ciclo biológico del HPV.....</b>	<b>18</b>
<b>Etapas del Cáncer.....</b>	<b>21</b>
<b>Respuesta inmune contra el cáncer.....</b>	<b>23</b>
<b>Detección de la infección por HPV.....</b>	<b>24</b>
<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>26</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>27</b>
<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>28</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>28</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
<b>Antígenos.....</b>	<b>29</b>
<b>Material biológico.....</b>	<b>29</b>
<b>Ensayos de ELISA.....</b>	<b>29</b>
<b>Obtención de sueros de sangre periférica.....</b>	<b>30</b>



<b>Obtención de biopsias y secreción cervical.....</b>	<b>31</b>
<b>Obtención de secreción bucal.....</b>	<b>31</b>
<b>Obtención de ADN.....</b>	<b>31</b>
<b>Tipificación de HPV.....</b>	<b>32</b>
<b>Electroforesis.....</b>	<b>34</b>
<b>Análisis estadístico.....</b>	<b>35</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
<b>ANÁLISIS DE RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>52</b>
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>53</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>54</b>
<b>APÉNDICE.....</b>	<b>63</b>

## RESUMEN

La infección por virus de papiloma humano (I-HPV) es el principal factor etiológico para el desarrollo de cáncer cérvico-uterino (CaCu), su asociación en los tumores malignos es cercana al 100%. En nuestro País, el CaCu constituye un problema importante de salud pública, debido a que más de 4000 mujeres mueren cada año a causa de esta neoplasia. La I-HPV es una enfermedad de transmisión sexual que se mantiene latente por períodos largos de tiempo, se estima que cerca del 60% de la población sexualmente activa presenta I-HPV, por lo que su propagación se incrementa día a día, razón por la cual es imprescindible el desarrollo de métodos eficaces para la detección oportuna de este virus. La detección de anticuerpos específicos a antígenos del virus de papiloma humano (HPV) por el método de ELISA, se ha utilizado como un marcador de exposición acumulada de la infección, en particular por la presencia de anticuerpos contra las proteínas estructurales L1 y L2 que sugieren infecciones previas. Nuestro grupo de trabajo ha identificado previamente que la secuencia 417-425 (péptido IHSMNSTIL) o péptido P16, derivado de la proteína L1 del HPV-16, (la cual es altamente conservada entre secuencias de L1 de varios HPV de alto riesgo asociados al CaCu), es fuertemente reconocida por anticuerpos presentes en sueros y secreciones cervicales de más del 90% de mujeres que cursan la infección por HPV de alto grado. Por lo antes ya mencionado esto se realizó con la finalidad utilizar el péptido P16 para analizar la presencia de anticuerpos IgA en secreciones de mucosa bucal y cervical y de IgG en sueros de pacientes con infección por HPV de alto riesgo.

En este trabajo se estudiaron muestras de secreciones bucales, cervicales y suero de 29 pacientes con displasias de bajo grado, todas ellas positivas a la infección por HPV de alto riesgo, de las cuales 16 sólo presentaban I-HPV, sin lesión histopatológica y 13 cursaban con neoplasia intraepitelial grado 1 (NIC 1); asimismo se tomaron muestras de un grupo control de 29 donadoras normales (negativas a la I-HPV). A través de ensayos de ELISA se evaluó la reactividad de anticuerpos IgA en las secreciones, e IgG en sueros hacia el péptido P16 y hacia partículas tipo virales (VLPs) de la vacuna de Gardasil (constituidas de las proteínas L1 de HPV-16, -18, -6 y -11).

Se encontró que el promedio de anticuerpos IgA específicos hacia el péptido P16 detectado en secreciones bucales fue de 0.79 DO en pacientes con I-HPV de 0.95 DO en pacientes con NIC 1 y de 0.23 DO en el grupo control de donadoras normales. En secreciones cervicales los valores promedio encontrados fueron: 0.81 DO en pacientes con I-HPV, 1.12 DO en pacientes con NIC 1 y 0.35 DO en donadoras normales. Finalmente, los promedios de anticuerpos IgG séricos específicos al péptido P16 fueron de 1.15 DO en pacientes con I-HPV, 1.23 DO en pacientes con NIC 1 y de 0.40 DO en donadoras normales. En todos los casos, los anticuerpos IgA e IgG encontrados en las pacientes con I-HPV y con NIC 1 fueron significativamente mayores a los encontrados en las donadoras normales, ANOVA  $P < 0.0001$  y 95% de confianza. El 100% de los pacientes estudiados dieron positividad de anticuerpos hacia el péptido P16, mientras que el 85% dio positividad hacia las VLPs de la vacuna Gardasil, al utilizar las tres muestras biológicas (secreción bucal, secreción cervical y suero); de manera interesante más del 80% de los pacientes dio positividad hacia el péptido P16 en las muestras de secreción bucal.

Estos resultados nos permiten sugerir que el péptido P16 puede ser de gran utilidad para la detección de anticuerpos IgA en secreciones bucales y cervicales y de IgG en suero de pacientes con displasias de bajo grado con infecciones por HPV de alto riesgo, los cuales han generado una respuesta inmune de forma natural hacia la proteína estructural L1 de estos tipos virales.

## INTRODUCCIÓN

### CÁNCER CÉRVICO-UTERINO

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) es la segunda causa de muerte por tumores malignos entre las mujeres de todo el mundo y actualmente, es el primer cáncer reconocido por la Organización Mundial de la Salud que es 100% atribuible a la infección por el virus de papiloma humano (HPV) (Bosch *et al* 2002, Muñoz *et al* 2002).

Este virus es transmitido vía sexual y es una de las más comunes en el mundo al menos el 60% de las mujeres con vida sexual activa menores de 35 años han tenido infección genital por HPV (Hernán 2003). Así mismo, en México y en la mayoría de los países en vías de desarrollo, la infección por HPV y la incidencia de cáncer cérvico-uterino se incrementan día a día, debido a que es asintomática y se mantiene latente por largos periodos de tiempo (Hernán 2003). La mayoría de estas infecciones son transitorias y clínicamente no son evidentes debido a que el 70-90% de mujeres infectadas resuelven la infección en 12 a 30 meses (Evander *et al* 1995 y Ho GY *et al* 1998) y se estima que sólo un 5 a 8% de mujeres que la padecen desarrolla el CaCu (Torroella *et al* 1998).

Esta enfermedad tiene un período largo de transformación que inicia con los cambios en el epitelio cervical, y gradualmente van acentuándose en un término de 1-10 años después de la infección persistente por el HPV se transforman en carcinoma invasor (Castellanos 2003). La edad promedio para el desarrollo del cáncer cérvico-uterino es aproximadamente 50 años, sin embargo puede afectar a mujeres de 20 años e incluso de edades menores. El cáncer cérvico-uterino está directamente relacionado con el número de compañeros sexuales a lo largo de la vida (Nubel 2005).

## MARCO TEÓRICO

La Inmunología se inició como una rama de la microbiología con el fin de estudiar enfermedades infecciosas y la respuesta inmune del organismo hacia ellas. La inmunidad significa protección frente a la enfermedad infecciosa (Abbas *et al* 2004). Los seres superiores estamos constantemente defendiendo nuestra integridad biológica de las agresiones, procedentes del exterior así como del propio organismo. De no ser así, moriríamos a consecuencia de tumores e infecciones de bacterias, virus, hongos, entre otros. Para que estos fenómenos de defensa se lleven a cabo, los organismos disponen de un conjunto de elementos especiales, conocido como *sistema inmune* (Roitt *et al* 2004).

El sistema inmune tiene cuando menos tres propiedades funcionales principales que permiten la defensa del cuerpo. La primera es su extrema especificidad, con la propiedad de reconocer y distinguir una diversidad de moléculas blanco distintas para responder o no ante el agente agresor. La segunda, efectúa una discriminación entre lo propio y lo extraño, y la tercera es que el sistema inmune posee una memoria con la propiedad de adaptarse a partir de experiencias previas con un agente patógeno (Kindt *et al* 2007).

La capacidad de defensa se adquiere antes de nacer y consolida en los primeros años de la vida fuera del seno materno. La primera línea de defensa son las barreras mecánicas como la piel, que cubren superficies corporales y evitan físicamente que microorganismos y otros agentes potenciales nocivos penetren a los tejidos internos. Otra son células especializadas con la capacidad de reconocer, secuestrar y eliminar varios tipos de microorganismos o sustancias perjudiciales. Contamos con dos sistemas funcionales más o menos distintos, con base en el tipo de resistencia (inmunidad) que confieren contra patógenos particulares que es la **inmunidad innata** y la **inmunidad adaptativa** (Abbas *et al* 2004).

## LA INMUNIDAD INNATA

Llamada también inmunidad natural se refiere a la resistencia existente al nacimiento en que se presenta por primera vez frente a un patógeno los cuales son los sistemas de defensa con reconocimiento no clonal son llamados así, debido a que todas las células que se diferencian de la célula progenitora tiene la misma capacidad de respuesta, la cual no se adapta o cambia a una particular infección (Austyn *et al* 1993). El sistema inmune innato incluye un grupo de leucocitos llamados fagocitos, el cual comprende al linaje monocito-macrófago y a los polimorfonucleares o granulocitos (neutrófilos, basófilos y eosinófilos). Así mismo, también incluye a otro grupo de células llamadas asesinas naturales (células NK) que son capaces de destruir a células infectadas con virus, a células embrionarias o a las células tumorales. Aunado a ello, el sistema innato también incluye megacariocitos que producen plaquetas, que están involucradas en la coagulación sanguínea y en la respuesta inflamatoria, la cual frecuentemente ocurre cuando hay alguna infección, conduciendo a los síntomas clásicos del dolor, calor, enrojecimiento e hinchazón. Los principales tipos celulares vistos en la respuesta inflamatoria en su fase inicial son los neutrófilos, seguidos por los macrófagos (Margni 2000).

## INMUNIDAD ADAPTATIVA

También llamada inmunidad específica se refiere a la resistencia débil o ausente en el momento de la primera exposición, pero que aumenta de manera significativa con exposiciones subsecuentes al mismo patógeno específico. (Margni 2000). El sistema inmune innato provee la primera línea de defensa contra muchos de los microorganismos más comunes, sin embargo está no siempre elimina la infección y no puede reconocer a muchos patógenos. Cuando la primera línea de defensa fracasa, entran en acción los linfocitos del sistema inmune adaptativo, compuestos por linfocitos T y B, éste se caracteriza por la especificidad celular y la generación de memoria para contrarrestar el efecto del patógeno en un segundo ataque, desarrollando varias formas de defensa y que también provee un incremento en el nivel de protección de una subsiguiente reinfección con el mismo patógeno (Janeway *et al* 1997, Roitt 2000). La activación de los linfocitos depende críticamente de su interacción con células fagocíticas quienes además de procesar, muestran fragmentos de antígenos a los linfocitos (Abbas *et al* 2004). Por tanto, los millones de linfocitos en el organismo

pueden dar lugar a millones de especificidades y solo aquel linfocito que encuentra un antígeno para el cual su receptor se une, será activado a proliferar y diferenciarse a células efectoras. Por lo tanto la especificidad dada en la respuesta inmune adaptativa se basa en la teoría de la selección clonal. La respuesta inmune adaptativa está dada por dos vías de reconocimiento antigénico llevadas a cabo por los linfocitos B y T, los cuales confieren la inmunidad humoral y celular respectivamente (Roitt 2000).

### ONTOGENIA DE LINFOCITOS B

El desarrollo de los linfocitos B tiene lugar en el saco vitelino, médula ósea e hígado durante la 8ª y 9ª semana del desarrollo fetal. Los linfocitos no diferenciados son liberados a la sangre y son llamados pre-linfocitos. Donde llegan al timo para diferenciarse en linfocitos T los cuales van a conformar el 70-80% de los linfocitos circulantes en la sangre. Una cierta parte de los pre-linfocitos se queda en la médula ósea y maduran en linfocitos B, parte de estos salen a la sangre, donde pasan a formar el 20-30% de los linfocitos circulantes y el resto se aloja en los tejidos linfáticos (Abbas *et al* 2004).

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

El ciclo vital de las células B pueden ser divididos en 4 fases:

FASE 1 Generación de células B en la médula ósea.

FASE 2 Eliminación de células B autorreactivas en la médula ósea.

FASE 3 Activación de células B por el antígeno extraño en los tejidos linfoides primarios.

FASE 4 Diferenciación en células plasmáticas secretoras de anticuerpos y células B de memoria en los tejidos linfoides secundarios.

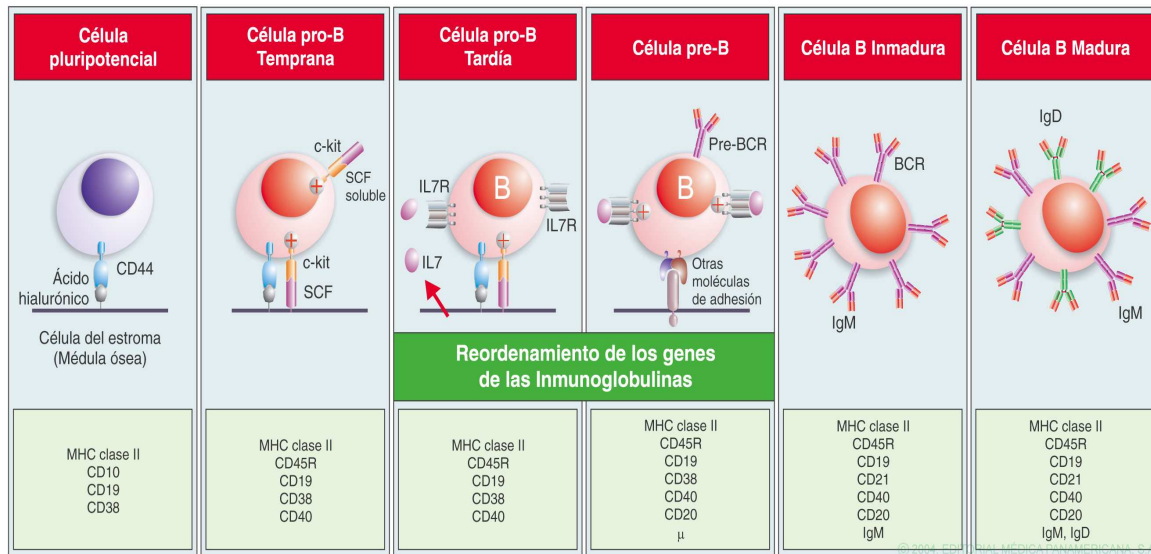
Los estadios del desarrollo de la célula B en la médula ósea están marcados por pasos sucesivos de reordenamiento y expresión de los genes de las inmunoglobulinas. Las células B derivan de células troncales hematopoyéticas pluriotenciales presentes en la médula ósea; las primeras células del linaje son llamadas **células pro-B** que conservan una capacidad limitada de autorrenovación y se dividen para producir más células pro-B. Se sabe que durante este estadio se llevan a cabo las combinaciones genéticas para poder producir las distintas inmunoglobulinas (Ig).

El reordenamiento de los genes de cadenas pesada sucede en primer lugar y esto ocurre en las células pro-B la unión de  $D_H$  con  $J_H$  se produce en estadio de **célula pro-B temprana** seguida por la unión de  $V_H$  a  $DJ_H$  en el estadio de **célula pro-B tardía**. La cadena pesada  $\mu$  es el primer tipo de cadena pesada que se produce ya expresada esta cadena se le denomina **célula pre-B**, estas presentan dos estadios en el desarrollo de la célula B, las **células pre-B grandes** menos maduras y las **células pre-B pequeñas** más maduras. Las células pre-B grandes se caracterizan por tener un complejo proteico llamado **receptor de las células pre-B** que consiste en cadenas pesadas  $\mu$  cadenas livianas sustitutas, que se sintetizan sólo en las células pre-B, y los polipéptidos inmunoglobulina (Ig)  $\alpha$  y  $\beta$  (Stanley 2005)

La presencia de moléculas del receptor celular B produce señales intracelulares que retienen el reordenamiento del locus de la cadena pesada de las Ig's y la síntesis de cadenas livianas sustitutas. La célula pre-B grande prolifera para producir muchas células pre-B pequeñas en las que el receptor celular pre-B ya no está presente, las cadenas  $\mu$  están confinadas en el citoplasma y comienza el reordenamiento del locus de las cadenas livianas de las inmunoglobulinas. Una vez sintetizadas estas cadenas livianas se unen a las cadenas  $\mu$  para formar moléculas de IgM que son transportadas a la superficie celular en la forma de un complejo de receptor de células B funcionales y se define como una **célula B inmadura** Figura 1 (Abbas *et al* 2004, Janeway *et al* 2001, Moreno 1996, Roitt 2000).



Figura 1. Diferenciación y cambios fenotípicos de los linfocitos B en la médula.



Tomada de Parham 2006.

En este momento el desarrollo de las células B tienen lugar en la médula ósea y no requiere de la interacción con el antígeno específico, la aleatoriedad del proceso de reordenamiento génico determina que una parte de los receptores de las células B reaccionen contra los constituyentes del cuerpo a menos que sean eliminados del repertorio, las células B que tienen estos receptores tienen el potencial de producir una respuesta autoinmunitaria y provocan una enfermedad autoinmunitaria. Las células B inmaduras empiezan a ser seleccionadas en este momento para que sean tolerantes a los constituyentes normales del cuerpo y también empiecen a entrar a la circulación periférica. Por lo que a esta altura el corte y empalme alternativos del mRNA de los transcritos del gen de la cadena pesada producen IgD y también IgM como inmunoglobulinas unidas a la membrana. Entonces se considera que es una célula B madura llamadas también células B vírgenes (**naive**) porque aún no se han expuesto aun antígeno específico (Abbas *et al* 2004).

El desarrollo de la célula B en la médula ósea depende de una red de células del estroma no linfoides que les proporciona microclimas especializados en sus diversos estadios de maduración; éstas tienen dos funciones diferentes:

\*Establecen contactos específicos con la superficie de las células B a través de la interacción de moléculas de adherencia y sus ligando.

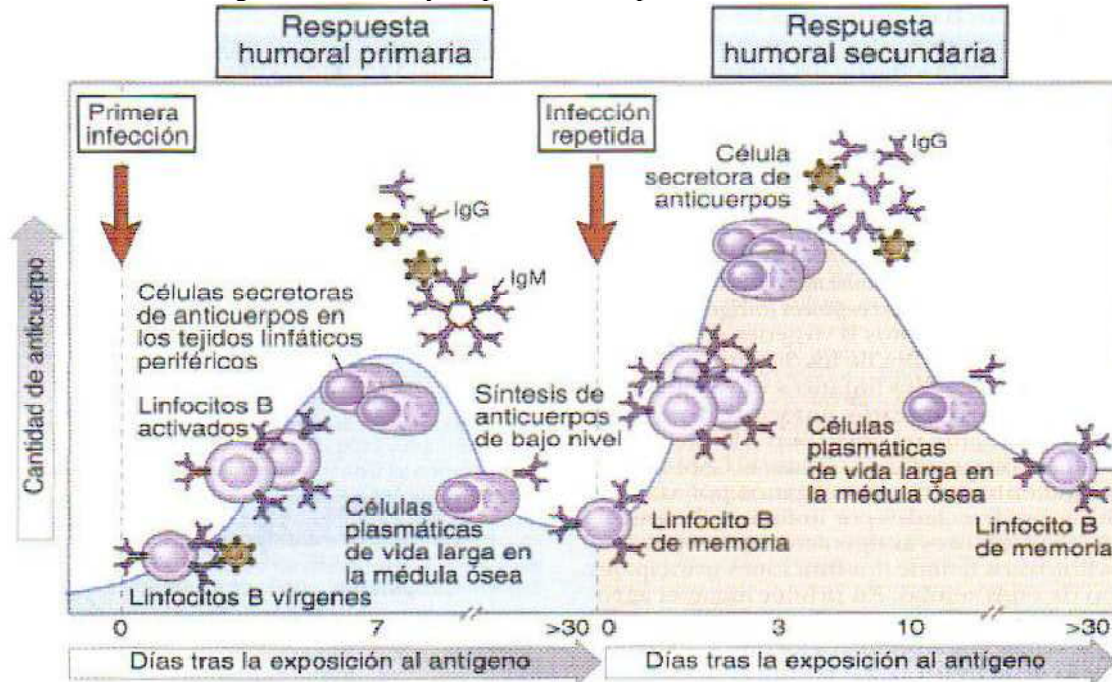
\*Producen factores de crecimiento que actúan sobre las células B unidas a ellas como factor de células troncales (stem-cell factor SCF) unido a la membrana que es reconocido por un receptor llamado Kit que se encuentra en las células B inmaduras. Otro factor importante para el crecimiento es la interleucina 7 (IL-7) una citocina secretada por las células de la estroma que actúa sobre las células pro-B tardías y las células pre-B (Janeway 1997).

Las células troncales más inmaduras se localizan en la región del subendostio de la médula ósea que está adyacente a la superficie interna del hueso, cuando las células B se desplazan, sin perder contacto con las células del estroma hacia el eje central de la cavidad medular. Los estadios más tardíos de la maduración son menos dependientes del contacto con las células del estroma lo que permite que las células B abandonen la médula ósea. El estadio final en que las células B inmaduras se transforman en células B maduras, puede ocurrir en la médula ósea, o en órganos linfoides secundarios como el bazo (Stites *et al* 2000)

### INMUNIDAD HUMORAL

La respuesta inmune humoral se lleva a cabo por la generación de Ig, las cuales son producidas por las células B y son específicos de la respuesta inmune, son encontradas en los fluidos de los componentes sanguíneos, plasma o en fluidos extracelulares. Cuando el linfocito inactivo se encuentra con su antígeno (Ag) complementario, la célula es activada e inicia su multiplicación. Produce muchos clones capaces de producir anticuerpos (Ac) contra el antígeno (Ag) que la activó. Algunas de estas células pasan al tejido linfático como **linfocito B de memoria**, listos a reaccionar multiplicándose y diferenciándose cuando el Ag vuelva a presentarse en el cuerpo Figura 2 (Abbas *et al* 2004, Janeway *et al* 1997, Moreno 1996, Roitt 2000).

Figura 2. Sucesos y etapas de la Respuesta Inmune Humoral



Tomado de Abbas *et al* 2004.

La **inmunidad humoral** es el principal mecanismo de defensa frente a los microorganismos extracelulares y sus toxinas, debido a que las Ig's secretadas pueden unirse a éstos para facilitar su eliminación. Cuadro 1 (Roitt *et al* 2004).

Cuadro 1. Elementos del sistema inmune humoral y su función.

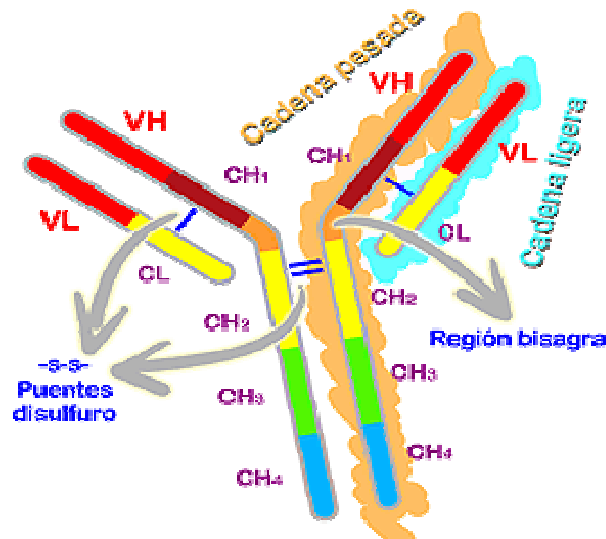
Elementos del Sistema Inmune Humoral	
CÉLULAS	ACCIÓN
Linfocitos B	Transportan receptores de un antígeno particular entonces se dividen en células plasmáticas y de memoria. Pueden ser medidas por la proliferación general de las células B a antígenos específicos.
Células de Memoria	Recuerdan encuentros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

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

Las Inmunoglobulinas, son proteínas anticuerpo altamente específicas que son producidas en respuesta a antígenos específicos. Están en forma de Y con sitios que son altamente variables de una molécula a otra; esta interacción constituye la fase de reconocimiento de la inmunidad. Poseen una alta especificidad para una estructura antigénica particular; son diversas como grupo y con actividades biológicas secundarias (Abbas *et al* 2000).

Una inmunoglobulina típica consta de una estructura cuaternaria formada por cuatro cadenas polipeptídicas; dos cadenas largas idénticas llamadas cadenas pesadas (de 55 a 70 kDa cada una) y dos cortas llamadas cadenas ligeras de 24 kDa. Ambos tipos de cadenas contienen una serie de unidades homólogas repetidas, de unos 110 aminoácidos de longitud, plegadas independientemente para formar un motivo globular común conocido como dominio de las inmunoglobulinas (dominio Ig). Estos dominios Ig contienen dos capas de hoja plegada  $\beta$  con 3-4 porciones de cadena polipeptídica antiparalela. La superfamilia de las inmunoglobulinas engloba a una serie de proteínas de relevancia inmunitaria que contienen regiones con el mismo motivo, y que están relacionadas estructuralmente. Se cree que todos los segmentos génicos que codifican los dominios Ig han evolucionado de un mismo gen ancestral Figura 3 (Weissman *et al* 1993, Moreno 1996 y Janeway *et al* 2005).

Figura 3. Esquema de la estructura de las inmunoglobulinas.



Tomada de [www.sanidadanimal.info/.../images/4inmunog.gif](http://www.sanidadanimal.info/.../images/4inmunog.gif)

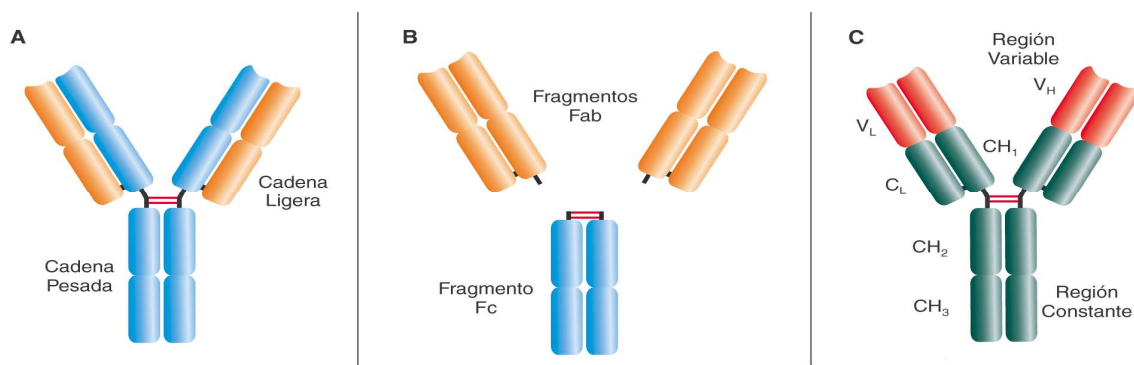
Las regiones constantes de la cadena pesada (tronco de la Y), son codificadas por segmentos genéticos contiguos, los cuales definen las clases de los anticuerpos que determina las propiedades funcionales, la unión de estas cadenas con una ligera ( $\kappa\lambda$ ) constituye un isotipo, que son los diferentes clases de anticuerpos en el humano.

Existen cinco (IgM, IgG, IgA, IgE e IgD) los cuales tienen propiedades distintas, como en el caso de IgM, IgG3, e IgG1 que activan el complemento, y de IgM e IgG que

aglutinan bacterias y precipitan antígenos solubles haciéndolos más accesibles a las células fagocíticas (Weissman *et al* 1993, Nossal 1993, Barrera *et al* 1998, Moreno 1996 y Janeway *et al* 1997). Las inmunoglobulinas tienen la propiedad de unirse específicamente al antígeno que indujo su formación; los extremos de la "Y", por ejemplo, contienen el lugar que se une al antígeno y por tanto, reconoce elementos extraños específicos. Esta región del anticuerpo se llama **Fragmento de unión al antígeno** o región **Fab**. Está compuesta de un dominio constante y otro variable de cada una de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo (Putnam 1979). El paratopo está conformado por los dominios variables de la cadena pesada y ligera en el extremo amino terminal del monómero de anticuerpo. El papel que desempeña la base de la "Y" consiste en modular la actividad de la célula inmunitaria. Esta región se llama **Fragmento cristalizable** o **Fc** y está compuesta por dos o tres dominios constantes de ambas cadenas pesadas, dependiendo de la clase del anticuerpo (Janeway *et al* 2001).

Mediante la unión a proteínas específicas la región Fc se asegura que cada anticuerpo genera una respuesta inmune apropiada para un anticuerpo dado (Hubert 2001). La región Fc también se une a varios receptores celulares como el receptor del Fc y otras moléculas del sistema inmunitario como las proteínas del complemento. Al efectuar esto, media en diferentes efectos fisiológicos incluyendo la opsonización, lisis celular y desgranulación de las células Figura 4.

Figura 4. A Conformación de las cadenas pesadas, ligeras de la inmunoglobulina;  
B Localización de los fragmentos Fab y Fc, C Regiones variables y constantes.



Tomada de Parham 2006.

Tras la unión antígeno-anticuerpo (Ag-Ac), las sustancias extrañas son destruidas por las inmunoglobulinas a través de mecanismos que pueden ser diferentes según el tipo de

inmunoglobulina que participa. Esto se debe a que aunque las distintas clases de inmunoglobulinas tienen una estructura igual en ciertas partes de la molécula, en otras partes presentan una estructura distinta. Podemos decir que las inmunoglobulinas, al detectar al antígeno y unirse a él, actúan como transductores de la información de la presencia de los mismos, que serán posteriormente destruidos por el mecanismo más idóneo, en el que colaborarán además del propio anticuerpo el sistema del complemento, macrófagos, los polimorfonucleares o células asesinas naturales (Moreno 2001).

Figura 5. Superficie molecular de IgA



La inmunoglobulina A (IgA) es la clase predominante de anticuerpo en las secreciones seromucosas del organismo como saliva, lágrimas, calostro, secreciones respiratorias, gastrointestinales y genitourinarias. En sangre se encuentra como una molécula monomérica, pero en mucosas esta en forma dimerica (IgA secretora). Su función es identificar a los antígenos e impedir que se localicen en las mucosas Figura 5 (Paslow et al 2002).

Tomada de [www.alerchek.com/IgA.htm](http://www.alerchek.com/IgA.htm)

Figura 6. Superficie molecular de la IgG



La inmunoglobulina G (IgG) es una de las cinco clases de anticuerpos humorales producidos por el organismo. Se trata de la inmunoglobulina predominante en los fluidos internos del cuerpo, como: sangre, líquido cefalorraquídeo y líquido peritoneal (líquido presente en la cavidad abdominal). Esta proteína especializada es sintetizada por el organismo en respuesta a la invasión de bacterias, hongos y virus con la función de opsonización, activación del complemento, y la inmunidad neonatal Figura 6 (Parslow et al 2002)

Tomada de <http://es.wikipedia.org/wiki/IgG>

La IgG es la única clase de inmunoglobulinas que atraviesa la [placenta](#), transmitiendo la inmunidad de la madre al [feto](#). La IgG constituye el 80% de las inmunoglobulinas totales. Es la inmunoglobulina más pequeña, con un [peso molecular](#) de 150.000 [Daltons](#), así puede pasar fácilmente del sistema circulatorio del cuerpo a los tejidos. La síntesis de IgG se controla principalmente por el estímulo de los [antígenos](#). En el caso de animales axénicos (sin microbios), con niveles de IgG muy bajos, el nivel de IgG se eleva en cuanto se les traslada a un ambiente normal (Kindt *et al* 2007).

### INMUNIDAD CELULAR

También llamada inmunidad mediada por células, donde las células T pueden reconocer y responder a un antígeno proteico extraño, cuando un fragmento peptídico de la proteína extraña es presentado por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en la superficie de una célula blanco. Por lo tanto, la este tipo de inmunidad se dirige a las células (o a su cercanía) que llevan los antígenos extraños en su superficie, y las reacciones inmunitarias son de gran importancia fisiológica para erradicar a los microorganismos o a los virus que viven en el interior de las células, es decir, dentro de las células presentadoras de antígeno (Abbas *et al* 2000).

Los microorganismos intracelulares, como los virus y algunas bacterias sobreviven y proliferan en el interior de los fagocitos y otras células del huésped, lugar al que no tienen acceso los anticuerpos circulantes. La defensa frente a este tipo de infecciones depende de la inmunidad celular que induce la destrucción de los microorganismos residentes en los fagocitos o de las células infectadas (Gostout *et al* 2003).

Los linfocitos T son los principales componentes en el sistema inmune adaptativo celular, y tienen un papel central en las respuestas inmunes, celular y la humoral. Los linfocitos T reconocen antígenos que han sido procesados en péptidos cortos (Stanley 2005). Y se subdividen en poblaciones funcionalmente diferentes, definidas como células T colaboradoras y las células T citolíticas o citotóxicas (Abbas *et al* 2004). Las células presentadoras de antígenos (CPA) expresan receptores y secretan citocinas locales que determinaran si estas células T, toman Th1, Th2 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. (Stanley 2005).

Las células T no producen anticuerpos, sus receptores de antígenos son moléculas de la membrana distintas de los anticuerpos, pero estructuralmente relacionadas con ellos. (Janeway *et al* 2005). Tanto los linfocitos T cooperadores, como los citotóxicos (CTL) tienen una especificidad limitada para los antígenos; ya que sólo reconocen antígenos peptídicos unidos a proteínas del huésped codificadas por genes del MHC y que se expresan en la superficie de células blanco (Stites *et al* 2000). En el caso de estas infecciones no estimulan una respuesta inflamatoria usa estrategias deliberadas para evitar ser detectado (Frazer 2004).

En los cánceres cérvico-uterinos asociados con el HPV frecuentemente se encuentra una pérdida o disminución de la expresión alélica de las moléculas clase I del MHC, que están íntimamente involucradas en el reconocimiento y presentación de antígenos de superficie. Esto podría explicar por qué algunos cánceres escapan a la vigilancia inmunológica mediada por células (Serman 2002).

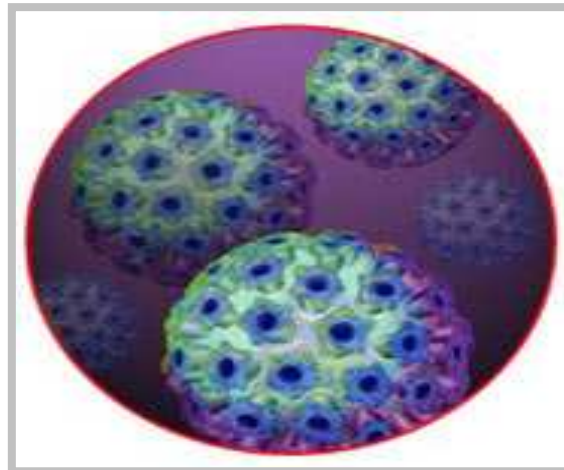
De hecho el estudio de la inmunidad celular dirigida hacia proteínas del HPV ha sido enfocado principalmente hacia estas proteínas de transcripción temprana, las cuales al ser sintetizadas endógenamente quedan disponibles en el citosol para ser degradadas a péptidos y posteriormente presentados por moléculas MHC clase I en la membrana celular (Feltkamp *et al* 1993).



## VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

El Virus del Papiloma Humano (HPV) pertenece a la familia *Papovaviridae*, de estructura icosaédrica de 72 capsómeros (60 hexámeros y 12 pentámeros) sin cápsula con un diámetro aproximado de 55nm que contiene el genoma viral que posee un DNA circular de doble cadena de aproximadamente 8kb y 8, 000 pares de bases de longitud Figura 7 (Hebner *et al* 2006).

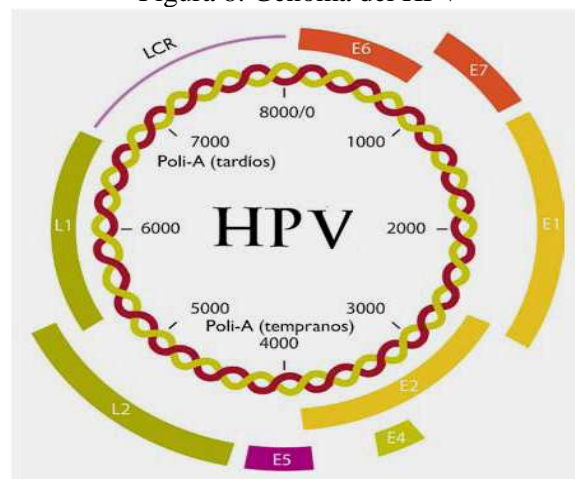
Figura 7. Virus de Papiloma Humano.



Tomado de: ([http://www. Roche.de/.../hpv\\_verlauf.htm](http://www. Roche.de/.../hpv_verlauf.htm)).

El genoma del HPV se divide en tres regiones. La región larga de control (LCR) que no contiene marco de lectura alguno, la región que corresponde a las proteínas temprana de la E1 a E8, y la región que corresponde a las proteínas tardías L1 y L2 Figura 8 (McMurray *et al* 2001).

Figura 8. Genoma del HPV



Tomada de López *et al* 2006.

El HPV, codifica para 8 proteínas, 6 de transcripción temprana (E) y 2 de transcripción tardía (L) Cuadro 2. 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 (Granoff *et al* 1999). De aquí que, las proteínas L1 y L2 están siendo utilizadas actualmente como antígenos para la generación de vacunas preventivas (Chen *et al* 1995). De hecho, la propiedad que tienen estas proteínas de auto ensamblarse cuando son expresadas en diferentes vectores (bacterias, células de insecto, células de mamífero), ha hecho posible la generación y purificación de partículas similares a virus VLPs (del inglés Virus Like Particles) propias para inducir inmunidad en animales e individuos vacunados. Varios estudios que han utilizado VLPs para vacunación, han mostrado la generación de anticuerpos capaces de neutralizar o inhibir la entrada de estos virus a células blanco, no obstante estas respuestas han sido altamente específicas hacia el tipo particular de HPV el cual derivan las secuencias de las proteínas L1 y L2, Cuadro 2 (Schiller *et al* 2004, Frazer *et al* 2004).

Cuadro 2. Proteínas del HPV.

Proteínas virales		Funciones
Tempranas	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.
Tardías	L1 y L2	Principales proteínas de la cápside, L1 constituye el 80% y L2 el 20%.

Tomado de Chen *et al* 1995, DiMaio *et al* 1994, Huibregtse *et al* 1991, Münger *et al* 1992, Syrjänen 1999, Zur Hausen 2000.

El HPV es epiteliotrópico y por tanto puede infectar la piel, el tracto ano genital, boca, laringe y esófago (Tewari *et al* 2000), se han identificado 200 tipos (Zur Hausen 1999) y los tipos de HPV's genitales son clasificados según su potencial para inducir malignidad: de alto riesgo: 16, 18, 31, 36, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 73 y 82, probable alto riesgo: 26, 53 y 66 y de bajo riesgo: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 y CP6108 (Muñoz *et al* 2003).

Se ha estimado que en nuestro país 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 (Muñoz *et al* 1997, Berumen *et al* 1995). Como todas las neoplasias malignas, el carcinoma de cérvix es consecuencia de una serie de alteraciones en genes que regulan la proliferación celular y apoptosis, en donde el HPV es el factor más importante en su etiopatogenia debido a que el DNA del virus se encuentra integrado en las lesiones invasoras en más del 90% de los casos (Howley 1991). Aunque esto no es suficiente ya que solo una pequeña proporción de las mujeres infectadas por el virus desarrollan cáncer (Hernán 2003) indicando que otros factores están implicados en la progresión de la infección (Berek *et al* 2000) como lo son la multiparidad (cuando la mujer a tenido 7 ó más embarazos a término), el consumo de cigarro, la inmunosupresión, (Muñoz *et al* 2002) y el uso prolongado de anticonceptivos orales (Moreno *et al* 2002).

#### CICLO BIOLÓGICO DEL HPV

El ciclo biológico del HPV esta regulado por dos etapas particulares **la infección lítica y la infección lisogénica**. 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 (Zur Hausen *et al* 2000).

La infección liso génica 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 (Zur Hausen *et al* 2000).

Como el virus del papiloma tiene tropismo por los epitelios, infecta las células basales de piel y mucosas a través de microlesiones (Lehn *et al* 1988). 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. Por lo tanto el virus debe alterar la progresión de la fase G1 a la S para realizar su replicación en la capa granular y la síntesis de la cápside y amplificación de su DNA (McMurray *et al* 2001).

Después de la amplificación del genoma se empaqueta en viriones infecciosos, los cuales se liberan en la superficie epitelial durante la descamación (Warness *et al* 1990). 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 (Galloway *et al* 2003).

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 (McIntre *et al* 1996). 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 (Tay *et al* 1987). 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.

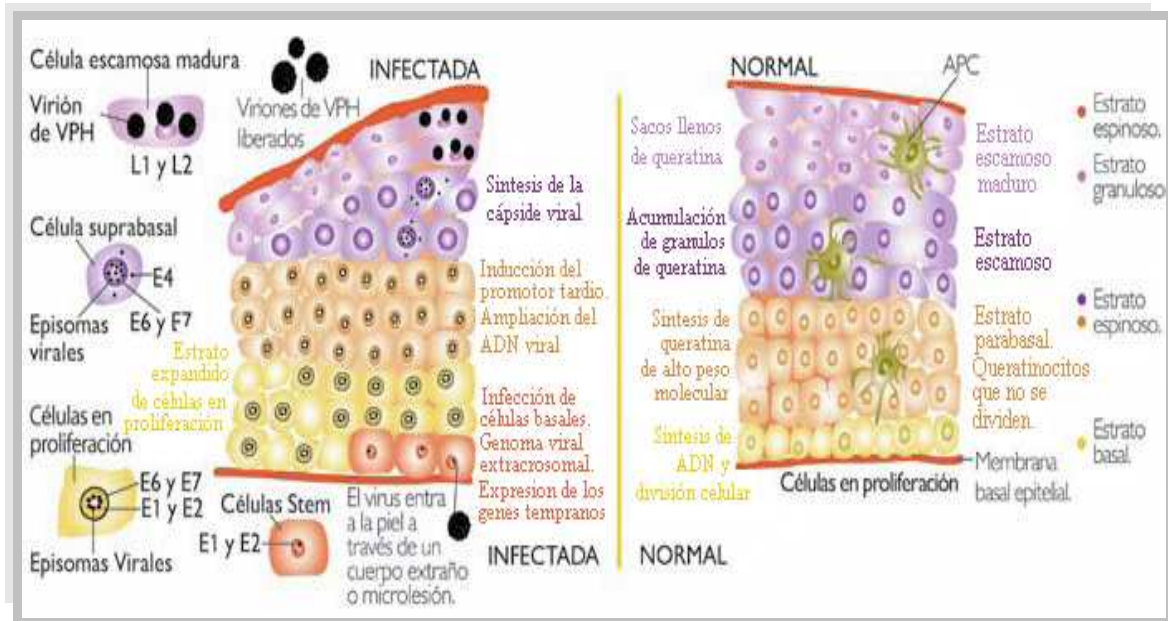
Los viriones penetran el epitelio a través de micro abrasiones e infectan a las células tallo que están localizadas en la capa basal del epitelio. En estas células el DNA viral se encuentra en forma episomal, y las proteínas E1 y E2 inducen la replicación del virus aprovechando la maquinaria celular.

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. Después de la maduración de los viriones son ensamblados y liberados hacia el epitelio con las células epiteliales superficiales (Frazer *et al* 2004).

La función de los productos de las proteínas E6 y E7, durante la infección productiva, es modificar los caminos de regulación del crecimiento celular para facilitar la replicación viral en la célula que aún no está diferenciada y mantener activo el proceso de división celular. La proteína E6 de HPV se une a p53 y lo hace blanco de degradación por ubiquitinación, esta degradación tiene la misma función de una mutación inactivante (Warness *et al* 1990). Los productos del gen E7 se unen a la forma hipofosforilada de las proteínas de la familia pRb, esta unión interrumpe el complejo entre pRb y el factor de transcripción celular E2F, liberando así la transcripción de genes cuyos productos son requeridos para que la célula entre en fase de síntesis del ciclo celular. Los productos del gen E7 también se pueden asociar con otras proteínas del ciclo celular como la ciclina E, dando como resultado la estimulación de la síntesis de DNA y la proliferación celular Figura 9 (Thomas *et al* 1999).

Figura 9. Etapas del ciclo de vida del HPV.



Etapas del ciclo de vida del virus de papiloma humano y su localización en el epitelio escamoso. En el epitelio normal cervical escamoso y estratificado, 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).

Mientras que cuando ocurre la infección por HPV dentro de las células tallo, en la capa basal del epitelio, la expresión de proteínas virales de transcripción temprana ocurre. Bajo la regulación de las proteínas, la división celular de la población se expande verticalmente y la diferenciación de las células epiteliales es tardía y menos completa, con cambios en la arquitectura del epitelio (lado izquierdo). Los viriones maduros son producidos en las capas más superficiales del epitelio y las células presentadoras de antígeno (CPA) intraepiteliales son eliminadas en el epitelio infectado por HPV. Tomado de Frazer 2004.

## ETAPAS DEL CÁNCER CÉRVICO-UTERINO

En los años ochenta fueron reconociéndose cada vez más alteraciones anatomopatológicas como la atipia coilocítica o condilomatosa asociada con la infección por virus del papiloma humano (HPV). Los coilocitos son células atípicas con una cavitación o halo perinuclear en el citoplasma, que indica cambios citopáticos debidos a la infección por el HPV. Esto condujo al desarrollo de un sistema histológico. Por lo que se propuso una terminología histopatológica basada en los grados de la enfermedad se caracteriza microscópicamente por una serie de manifestaciones que van de la atipia celular a diversos grados de displasia o NIC (Neoplasia Intraepitelial Cervical) antes de progresar a carcinoma invasor Cuadro 3 y 4 (Richard 1968).

Cuadro 3. Grado de Neoplasia Intraepitelial Cervical (Richard 1968)

Grado de la Lesión	Características
NIC 1	Displasia leve
NIC 2	Displasia moderada
NIC 3	Displasia grave

Cuadro 4. Etapas del Cáncer cérvico-uterino. Tomado de ([www.NCI/POQ/pacientes](http://www.NCI/POQ/pacientes))

Etapa	Características	Subetapas
0	Se encuentra en la primera capa de células que recubren el cuello del útero; y no ha invadido tejidos profundos denomina Carcinoma in situ.	
I	Se encuentra en el cuello uterino	I A: Se detecta una cantidad muy pequeña de cáncer; no teniendo mas de 5mm de profundidad y 7 mm de ancho.  IB: El cáncer se encuentra dentro del cuello uterino aproximadamente mas de 4 cm.
II	El cáncer se ha diseminado mas allá del cuello uterino sin alcanzar la pared pélvica	IIA: Cáncer se ha diseminado a dos tercios superiores de la vagina.  IIB: El cáncer se ha diseminado ha dos tercios superiores de la vagina y a los tejidos en torno al útero.
III	Cáncer diseminado al tercio inferior de la vagina y talvez haya alcanzado la pared pélvica y los ganglios linfáticos circundantes.	IIIA: Se ha diseminado al tercio inferior de la vagina.  IIIB: Se ha diseminado a la pared pélvica y es lo suficientemente grande para bloquear los uréteres. Y puede haber alcanzado a los ganglios linfáticos.
IV	El cáncer se ha diseminado a la vejiga , recto y otras partes del cuerpo	IVA: Cáncer diseminado en a la vejiga o a la pared del recto y puede que también el los ganglios linfáticos en la pelvis.  IVB: El cáncer se ha diseminado más allá de la pelvis y ganglios linfáticos y otros lugares en el cuerpo como abdomen, hígado, tubo intestinal o pulmones.

## RESPUESTA INMUNE CONTRA EL CÁNCER

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

Los anticuerpos que se generan contra la cápside de los HPV no eliminan la infección, pero pueden proveer protección en contra de re-infecciones posteriores por el mismo tipo de HPV y pueden servir de marcadores para infecciones previas, e incluso activas si se determina el isótipo de inmunoglobulina presente, por ejemplo IgA contra VLP de HPV-16 puede indicar una infección reciente o actual (Wang *et al* 1996). Los títulos de estos anticuerpos declinan con el tiempo en las pacientes con cáncer (Carter *et al* 2001).

Con la presencia de anticuerpos contra proteínas de transcripción temprana del HPV se ha reportado una sero-prevalencia contra péptidos de E2, E4 y E7 siendo las más elevadas para E4 (35%) y E2 (30%) (Hamiskova *et al* 1998). Los anticuerpos contra la proteína E7 se han asociado fuertemente a la presencia del cáncer cervical, mientras que la presencia de anticuerpos contra E4 se ha asociado a la presencia de condilomas y neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC I-III) precursoras de cáncer. Para la proteína E5 es muy baja la detección de anticuerpos IgA e IgG en los pacientes con NIC (Hassen *et al* 2001).

La respuesta inmune está considerada como un mecanismo efector en la resistencia a los tumores y está relacionada desde la fase de iniciación hasta el crecimiento y progresión de éstos (Janeway *et al* 2001).

Se ha encontrado una asociación positiva entre la presencia de IgG anti-VLP-16 con la presencia de Neoplasia Intraepitelial Cervical grados II y III (Brontkes *et al* 1999, Wang *et al* 1996).



## DETECCIÓN DE LA INFECCIÓN POR HPV.

Existen pruebas moleculares para identificar secuencias de DNA de HPV que han sido usadas para estimar la prevalencia de infecciones por este virus (Galloway y Jenison 1990). Así como Southern blot, dot blot, ensayos de hibridación *in situ*, PCR y captura de híbridos (DeVita *et al* 1997), ya que son sistemas más sensibles a la detección de HPV. Sin embargo, no determinan si la infección por HPV en los individuos presenta una infección activa, o sólo en estado latente (Galloway y Jenison 1990), además de su alto costo en el mercado, hace limitado su uso en poblaciones en vías de desarrollo. En este sentido, las pruebas serológicas son una alternativa ideal para detectar la infección por el HPV, pues son fáciles de realizar y no requieren equipo especial. Pueden predecir infecciones presentes y pasadas al detectar respuesta inmune sistemática contra la infección. Sin embargo, la confiabilidad depende de la pureza de los antígenos virales obtenidos por los sistemas tradicionales de purificación.

La detección de anticuerpos dirigidos contra antígenos del HPV por ELISA (del inglés *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) en la población general, se ha tratado de utilizar como un marcador de exposición acumulada de la infección (Kaelin *et al* 1992). Por analogía con otros virus, la presencia de anticuerpos contra proteínas tardías como L1 y L2, sugieren una infección previa, mientras que la presencia de anticuerpos contra proteínas tempranas pueden reflejar una infección reciente.

Potencialmente todas las proteínas del HPV pueden ser blancos antigénicos para generar una respuesta inmune, no obstante, de acuerdo con el ciclo biológico del virus, algunas de sus proteínas pueden quedar más accesibles al reconocimiento inmune. En las etapas tempranas de infección viral o en las etapas iniciales del desarrollo del cáncer cervical, cuando existe una amplia formación de viriones, las proteínas de la cápside (primordialmente L1) son los principales antígenos blanco accesibles para la respuesta inmune humoral y celular contra la infección por HPV (Zur Hausen 2002)

Mientras que las oncoproteínas E6 y E7, que se expresan abundantemente en estadios tardíos, constituyen los principales blancos de la respuesta inmune en el cáncer cervical en etapas avanzadas (Frazer 2002). A pesar de la capacidad de los HPV's para impedir la defensa del huésped, la respuesta inmune mantiene un control de las infecciones en la

mayoría de los casos y sólo 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. Una gran cantidad de anticuerpos son generados en muchos de los individuos infectados y son altamente específicos hacia epitopes conformacionales de la proteína estructural L1 al HPV infectante (Stanley 2005).

En este contexto, nuestro grupo de investigación ha identificado la secuencia 417-425 (péptido IHSMNSTIL), o P16 de la proteína L1 de VPH-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.(Monroy *et al* 2002) Este péptido antigénico, debido a su alta homología (60-90%) con secuencias de la proteína L1 de HPV de alto riesgo, puede ser de gran utilidad en la detección de infección por HPV. Por este motivo la finalidad del presente trabajo es analizar la presencia de anticuerpos IgA específicos al péptido P16 en muestras de secreciones de mucosa cervical y bucal en pacientes con infección por HPV del hospital de Troncoso.

## JUSTIFICACIÓN

En México, la infección por virus del papiloma humano y la incidencia de CaCu se ha incrementado y se ha estimado que más del 60 % de la población sexualmente activa está infectada por algún tipo de HPV (Hernán 2003), debido a que este tipo de infección 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 HPV de alto riesgo como son HPV-16,-18, -31, -33, -52 y -58 entre otros, que se asocian muy frecuentemente con lesiones malignas del epitelio cervical; y por los tipos de bajo riesgo como son el HPV-6 y -11 que se asocian con lesiones benignas como son las verrugas genitales (Kaelin *et al* 1992, Piña *et al* 2006)

Actualmente el Papanicolao sigue siendo el método de referencia más utilizado para la detección de anomalías celulares en el cuello uterino, 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; no son accesibles a la mayoría de la población debido a su alto costo. Por tanto, es necesario desarrollar métodos y técnicas de mayor accesibilidad a la mayoría de la población y que permitan un alto grado de confiabilidad en la detección de estas infecciones. En este contexto, nuestro grupo de investigación ha identificado varios péptidos antigénicos de la proteína L1 de HPV-16; uno de ellos, correspondiente a la secuencia 417-425 (péptido IHSMNSTIL), denominada P16, es altamente conservada entre secuencias L1 de varios HPV de alto riesgo asociados a CaCu, y además 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 (Rocha-Zavaleta *et al* 2004).

Por tanto, en este trabajo de investigación se analizó la presencia de anticuerpos específicos al péptido P16 en secreciones de mucosa bucal y cervical así como de suero de pacientes que cursan con infección producida por virus de papiloma humano de alto riesgo. Su utilidad será de gran relevancia para conocer si a través de este tipo de muestras (secreciones de mucosas) es posible detectar infecciones por HPV.

## HIPÓTESIS

En estudios previos se ha encontrado que un alto porcentaje de mujeres infectadas por HPV-16 y otros tipos de alto riesgo, presentan altos títulos de anticuerpos séricos que reconocen específicamente al péptido IHSMNSTIL (P16) de la proteína estructural L1 del HPV-16, el cual conserva alta homología con péptidos derivados de la proteína L1 de varios tipos de HPV de alto riesgo asociados al desarrollo de cáncer cérvico-uterino, sugiriendo además que este péptido es altamente antigénico. Asimismo, se ha reportado la presencia de anticuerpos específicos hacia la proteína L1 en las mucosas (cervical y bucal) de mujeres que cursan con infecciones por HPV. En consecuencia, se espera que en mucosas (cervical y bucal) de mujeres que presentan infecciones por HPV de alto riesgo, también existan anticuerpos específicos contra el péptido P16.

### OBJETIVO GENERAL

Analizar la presencia de anticuerpos IgA de secreciones de mucosa bucal y cervical e IgG de suero, específicos contra el péptido IHSMNSTIL (P16) de la proteína L1 de HPV 16 en de pacientes infectadas por HPV.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Obtener plasma sanguíneo y secreciones bucales cervicales de pacientes infectadas por HPV.
- 2.- Tipificar el tipo de HPV infectante en muestras de tejido del cérvix.
- 3.- Determinar la presencia de anticuerpos IgG específicos hacia el péptido P16 en suero e IgA en secreciones bucales y cervicales de pacientes infectadas por HPV.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Antígenos.*

En este estudio, se utilizó el péptido sintético IHSMNSTIL (Invitrogen, USA), derivado de la proteína L1 de HPV-16 con una pureza mayor al 90%. Además se utilizaron partículas similares a virus (VLPs) constituidas por la proteína L1 de HPV-16, -18, -6 y -11 obtenidas de la vacuna tetravalente GARDASIL (Merck Sharp Dohme, México).

### *Material biológico.*

Se obtuvieron las muestras de pacientes infectadas por HPV en estadio de Infección y NIC 1; tanto de secreción cervical, bucal, de sangre periférica y biopsias de cérvix; del Hospital General de Zona 2-a Francisco del Paso y Troncoso.

### *Ensayos de ELISA para la detección de anticuerpos específicos hacia el péptido IHSMNSTIL ó péptido P16.*

La determinación de anticuerpos específicos hacia el péptido IHSMNSTIL se realizó mediante la técnica de ELISA. El péptido sintético IHSMNSTIL o péptido P16 disuelto previamente en solución salina de PBS a una concentración de 5 mg/mL, fue diluido en solución amortiguadora de carbonatos-bicarbonatos pH 9.6 a una concentración de 10 µg/mL. Además de analizar la reactividad de anticuerpos hacia el péptido P16, también se analizó la reactividad hacia partículas similares a virus o VLP's contenidos en la vacuna GARDASIL. Para ello, los VLP's de la vacuna fueron disueltos en solución de PBS a una concentración de 1µg /mL.

Se colocaron 100 µl de las soluciones de péptido y VLP's por triplicado para cada muestra en los pozos de placas de ELISA (EIA-ria) de 96 pozos fondo plano de alta afinidad de poliestireno no estériles sin tapa (Costar, USA) y se incubó durante toda la noche a 4°C.

Al día siguiente se realizaron 2 lavados con 300 µL de TBS-Tween 20 al 0.1 % por cada pozo. Posteriormente los pozos fueron cubiertos con 200 µl de solución bloqueadora compuesta por TBS-Tween 20 al 0.1% y albúmina sérica bovina (BSA) (Research Organics, USA) al 0.5% para las placas donde se realizó la detección de anticuerpos

IgA de las secreciones bucales y cervicales y para los sueros la solución bloqueadora se uso al 1%; se incubaron durante 2 horas a 37°C. Después de este tiempo, los pozos se lavaron 4 veces con TBS-Tween 20 al 0.1 % (300 µL de solución por cada pozo). En seguida, se adicionaron las muestras de secreción bucal y cervical que fueron el anticuerpo primario que a una dilución de 1:100, esto diluido en solución de BSA al 0.5%. Las muestras del suero se diluyeron a 1:1000 de solución BSA al 1%, esto por triplicado de cada muestra correspondiente. Se incubó por 2 horas a 37°C, después se lavó 6 veces con 300 µl de TBS-Tween al 0.1 % por cada pozo. Para revelar el reconocimiento de las inmunoglobulinas IgA de los exudados cervicales y bucales hacia el péptidos o hacia los VLPs, se utilizó un anticuerpo secundario dirigido hacia IgA para los raspados bucales y cervicales de cabra anti-humano acoplado a fosfatasa alcalina (Sigma, USA) diluido 1:2000, y un anticuerpo secundario IgG de cabra anti-humano acoplado a fosfatasa alcalina para los sueros de las pacientes el cual se diluyó 1:5000 en solución de bloqueo BSA al 0.5% para el IgA y al 1% para las IgG; y se colocó 100 µL de estas soluciones en cada pozo. Después se incubó a 37°C durante 2 horas, y después se realizaron 8 lavados con 300 µL de TBS-Tween 20 al 0.1 % por cada pozo, y se adicionó 100µL de una solución de substrato de fosfatasa alcalina (Sigma USA). Disuelta en solución de Dietanolamina (Sigma, USA). Después se incubó la placa a 37°C durante 1 hora, la reactividad enzimática de la fosfatasa se determinó mediante el desarrollo de color amarillo detectado en un lector de placas de ELISA (Molecular Devices) a una longitud de onda de 405 nm. Los ensayos se realizaron por triplicado.

#### *Obtención de sueros de sangre periférica.*

Mediante punción en la vena del brazo, se tomó muestra de sangre periférica (15-20 mL) usando tubos vacutainer (Beckton Dickinson) con anticoagulante ACD (ácido cítrico citrato de sodio y dextrosa) de un volumen aproximado de 6 ml. Después la sangre se centrifugó a 2000 rpm durante 8 minutos. Al término de este periodo, se colectó el suero correspondiente, se fraccionó en alícuotas y se almacenó en ultra congelación (-70° C) hasta su posterior uso.

### *Obtención de biopsias y secreción cervical.*

A mujeres con diagnóstico previo de infección por HPV y que asisten a consulta de ginecología en el Hospital de Zona de Troncoso, en la sala de exploración y con ayuda de un espejo vaginal, se procedió a tomar una muestra de raspado cervical, previo a la toma de biopsia, por medio de un hisopo estéril, se colocó la muestra en un tubo falcon de 50 ml que contenía un volumen aproximado de 2 ml de medio RPMI +SFB al 10% con antibiótico. En el laboratorio L3 PB UMIEZ, se adicionó 20  $\mu$ l de DTT (ditiotreitól) 50 mM para disminuir la consistencia del moco y poder separar la fase líquida del botón celular mediante centrifugación. La fase líquida se colocó en un tubo eppendorf de 2 ml y ambos tubos se almacenaron en ultra congelación (Ultracongelador, Forma Scientifica USA) a 70° C para su posterior uso. La biopsia o fragmento de tejido se tomó con ayuda de una pinza para biopsia y se colocó en un tubo falcon de 50 ml con un volumen de 5-8 ml de medio RPMI +SFB al 10% con antibióticos penicilina (100 U/mL) y estreptomycin (100  $\mu$ g/mL) para evitar algún tipo de contaminación durante el traslado al laboratorio.

### *Obtención de secreción bucal*

Por medio de un hisopo estéril se procedió a raspar la cavidad bucal (en los carrillos) de las pacientes con infección por HPV; y se colocó en un tubo de 5ml aproximadamente que contenía 1.5 ml a 2 ml de PBS tratando de dejar todos los residuos contenidos en el hisopo. Se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos para separar la fase líquida del botón celular. Ambas fases fueron almacenadas en ultracongelación a -70°C.

### *Obtención de ADN.*

El tejido cervical se enjuagó con PBS hasta eliminar residuos de sangre y se procedió a cortarlo en muy pequeñas porciones, las cuales se vaciaron a tubos eppendorf de 2ml, dependiendo de la cantidad de tejido se distribuyó y se le agregó 400  $\mu$ l de buffer de lisis (Ver Apéndice 1). Para la obtención de ADN, al cual se le adicionó 5  $\mu$ L de proteinasa K (16 mg/ ml) e incubó toda la noche de 37°C a 56°C hasta que se disolvió el tejido. Al termino de la incubación se homogenizó completamente mediante pipeteo. Luego se adicionó 40  $\mu$ L de Tris 1M pH 9.4 y se homogenizó; se agregó 400  $\mu$ L de fenol saturado en agua y se agitó vigorosamente con la mano. Se centrifugó 10 minutos



a 8000 rpm. Se recupero la fase superior (acuosa) y se transfirió a un tubo nuevo. Cuando se formo una gran cantidad de interfase se repitió este paso.

Se mezcló la muestra recuperada con un volumen igual de cloroformo-alcohol isoamílico (25:1) agitándolo vigorosamente con la mano, se centrifugo 10 minutos a 8000 rpm. Se recupero la fase superior y se transfirió a un nuevo tubo (se centrifugo dos veces). Se adicionó a la muestra recuperada medio volumen de acetato de amonio 7.5 M y se homogenizó. Se agrego 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío y se mezcló por inversión. En este paso fue evidente la precipitación de DNA en forma de finos hilillos. Se centrifugó 10 minutos a 5000 rpm a 4°C.

Desechando el sobrenadante, se enjuago el botón formado con etanol al 75% frío; se centrifugó 10 minutos a 5000rpm a 4°C y se descarto el sobrenadante. Cuando el botón fue visible se repitió este paso.

Finalmente se dio una rápida centrifugación para concentrar los residuos de etanol con la finalidad de retirar la mayor cantidad posible de este reactivo. Se dejó secar el botón de DNA durante 10 minutos; transcurrido el tiempo se disolvió con agua ultra pura libre de DNAsas y RNAsas en cantidad dependiente al botón obtenido (aproximadamente de 50 µL a 200 µL). Se incubo por lo menos 30 minutos a 56°C para descartar productos insolubles. Se centrifugó por última vez 10 minutos a 14000 rpm a una temperatura de 4°C y finalmente se recupero el DNA disuelto en agua a un tubo nuevo. Se cuantificó por espectrofotometría.

### *Tipificación de HPV.*

Ya obtenido el ADN, se utilizo una pequeña cantidad para amplificar un segmento que codifica para la proteína L1 de HPV mediante el uso de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se utilizo los oligonucleótidos MY09/MY11, sintetizados por Gibco, USA. Estos oligonucleótidos, son degenerados y están dirigidos para amplificar un fragmento de 450 pares de bases del gen L1.

Secuencia de los oligonucleótidos que se utilizaron para amplificar L1:

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

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

En donde:

m= a+c

r= a+g

w= a+t

y= c+t

Reactivos que se emplearon para un volumen total de 25  $\mu$ L.

REACTIVO	$\mu$ l
Amortiguador PCR (10X)	2.5
MgCl (30mM)	0.875
dNTP's (2mM)	2.5
MY09 (10 $\mu$ L)	1.25
MY11 (10 $\mu$ L)	1.25
Taq enzima (5U/ $\mu$ l)	0.156

En un tubo para microcentrífuga se adicionó los reactivos señalados anteriormente que se multiplicó por el número de muestras que se realizaron; sin la enzima Taq polimerasa, ya que está se colocó al final cuando estuvieron listos los tubos con las muestras de ADN. Finalmente la mezcla de reacción se repartió en partes iguales en cada tubo y se adicionó el ADN (1.25  $\mu$ g/ml), con agua suficiente que se llevó a un volumen final de 25  $\mu$ L. Las muestras se incubaron en un termociclador (Mastercycler, eppendorf, USA), las condiciones de amplificación fueron:

TEMPERATURA °C	TIEMPO
94 Inicialización	5 minutos
95 Desnaturalización	30 segundos
45 Alineamiento	1 minuto
72 Elongación de la cadena	1 minuto con 30 segundos
72 Elongación final	10 minutos
22 Hold	

30 ciclos {

Para amplificar el segmento de la proteína E7 se prepararon como anteriormente se menciona para L1 pero ahora con otros oligonucleótidos (sentido y antisentido) de los principales tipos de HPV de alto riesgo asociados a CaCu; HPV-16, -18-, -31, -33, -39, -45, -52, -58 y para los de bajo riesgo como HPV-6 y 11 Cuadro 5.

Cuadro 5. Secuencias de DNA de los oligonucleótidos de E7 para tipificar HPV.

<b>Tipo de HPV</b>	<b>Secuencia DNA (5' hasta 3')</b>
6 sentido	TAG TGG GCC TAT GGC TCG TC
6 antisentido	TCC ATT ACG CTC CAC GGG TG
11 sentido	GGA ATA CAT GCG CCA TGT GG
11 antisentido	CGA GCA GAC GTC CGT CCT CG
16 sentido	GAT GAA ATA GAT GGT CCA GC
16 antisentido	GCT TTG TAC GCA CAA CCG AAG C
18 sentido	AAG AAA ACG ATG AAA TAG ATG GA
18 antisentido	GGC TTC ACA CTT ACA ACA CA
31 sentido	GGG CTC ATT TGG AAT CGT GTG
31 antisentido	AAC CAT TGC ATC CCG TCC CC
33 sentido	TGA GGA TGA AGG CTT GGA CC
33 antisentido	TGA CAC ATA AAC GAA CTG TG
39 sentido	CCA AAG CCC ACC TTG CAG GA
39 antisentido	ATG GTC GGG TTC ATC TAT TTC
45 sentido	CCC ACG AGC CGA ACC ACA G
45 antisentido	TCT AAG GTC CTC TGC CGA GC
52 sentido	GCA GAA CAA GCC ACA AGC AA
52 antisentido	TAG AGT ACG AAG GTC CGT CG
58 sentido	CGA GGA TGA AAT AGG CTT GG
58 antisentido	ACA CAA ACG AAC CGT GGT GC

Tomado de Invitrogen Custom Primers 2005.

Bajo las siguientes condiciones descritas por Van den Brule et al 1990.

<b>TEMPERATURA °C</b>	<b>TIEMPO</b>
95 Inicialización	5 minutos
95 Desnaturalización	1 minuto
55 Alineación	2 minutos
72 Elongación de la cadena	1 minuto con 30 segundos
72 Elongación final	10 minutos
22 Hold	

40 ciclos.

### Electroforesis

Finalmente para poder separar las muestras amplificadas se utilizó la técnica de electroforesis; donde primero se niveló la cámara horizontal de 8 pozos, después se

preparó el gel de agarosa (Invitrogen, USA) al 3% disuelta en 50 ml de TBE (Tris borato) al 0.5x a una temperatura aproximada de 56°C , se le agregó 5 µl de Bromuro de Etidio, se agitó y se vertió a la cámara horizontal para que cuajara, al cabo de esto se retiraron los peines de separación y se agregó el buffer de corrida TBE 0.5x hasta que cubriera el gel, el buffer de corrida permite conducir la corriente.

Por otro lado se colocaron en papel parafilm aproximadamente 2 µl de buffer de carga por cada muestra; éste contiene 0.25% de bromo fenol azul, 0.25% de xileno cianol y 30% de glicerol en agua; al cual se le fueron añadiendo 8 µl del producto del PCR, se resuspendieron y se colocaron en los pozos de la cámara; este buffer por su densidad permite que la muestra entre al pozo y por medio de la corriente eléctrica corra la muestra, en el primer pozo se agregó 7 µl de marcador de ADN de bajo rango (Biogénica, México) el cual se usa para comparar los fragmentos separados por pares de bases y así saber la positividad para la proteína L1 o para E7 y así conocer el tipo de HPV infectante del tejido cervical. Y por último se corrió a un voltaje de 75 a 80 volts.

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

Para los demás tipos de HPV's no se cuentan con controles positivos y nos basamos para dar el diagnóstico del tipo de virus por los pares de bases que deben de aparecer a la misma distancia de los controles de Hela y Caski de acuerdo a los marcadores de ADN de bajo rango (corresponde a 100 pb).

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la detección de anticuerpos los experimentos se realizaron por triplicado, se les determinó un promedio; y por medio de un análisis estadístico ANOVA  $P < 0.0001$  y 95% de confianza pudimos comparar la positividad de pacientes a la detección de anticuerpos específicos a péptido P16 ( IHSMNSTIL) de la proteína L1 del HPV-16 a partir de un valor de corte obtenido del promedio del grupo control (Mujeres sin evidencia a la I-HPV) sumándole a ese valor dos desviaciones estándar tanto para anticuerpos IgA de secreciones de mucosa bucal y cervical así como de IgG de suero.

---

---

## RESULTADOS

### *Muestras biológicas y características de las pacientes.*

En el presente estudio se tomaron muestras séricas y de secreciones tanto bucales como cervicales de 29 pacientes con displasias de bajo grado, las cuales, de acuerdo con la valoración clínica y el estudio histopatológico, 16 presentaron infección por HPV (I-HPV) y 13 con neoplasia intraepitelial cervical de bajo grado (NIC 1). También se tomaron muestras séricas, bucales y cervicales de un grupo de 29 donadoras normales negativas a la infección por virus de papiloma humano. Para determinar el tipo de HPV infectante en la biopsia de tejido cervical, en este estudio se utilizaron 8 pares de oligonucleótidos de los principales tipos de HPV asociados con el desarrollo de cáncer cérvico-uterino (HPV: 16, 18, 31, 33, 39, 45, 52 y 58) (Walboomers *et al* 1999). Después de realizar la amplificación mediante PCR, se encontró que de las mujeres que presentaban displasias, 7 fueron positivas a la infección por HPV-18; 3 a HPV-16; 2 positivas tanto a HPV-16 como a HPV-18; 4 a HPV-33; 7 más a un grupo de HPV de alto riesgo que contenían una mezcla de oligos de HPV-31, -39, -45, -52 y -58; y finalmente 6 que presentaron positividad a los oligonucleótidos L1 consenso, no fueron positivas a ninguno de los 8 pares de oligonucleótidos utilizados Cuadro 6.

Cuadro 6. Tipificación de HPV de biopsias de las pacientes infectadas por el HPV

<b>PACIENTE</b>	<b>ESTADIO</b>	<b>TIPO DE HPV</b>
1	I-HPV	A.R.
2	I-HPV	33
3	I-HPV	16,18
4	I-HPV	16
5	I-HPV	33
6	I-HPV	A.R.
7	I-HPV	A.R.
8	I-HPV	18
9	I-HPV	18
10	I-HPV	18
11	I-HPV	A.R.
12	I-HPV	N.D.
13	I-HPV	18
14	I-HPV	16,18
15	I-HPV	A.R.
16	I-HPV	N.D.
17	NIC 1	33
18	NIC 1	16
19	NIC 1	33
20	NIC 1	16
21	NIC 1	18
22	NIC 1	18
23	NIC 1	N.D.
24	NIC 1	A.R.
25	NIC 1	A.R.
26	NIC 1	18
27	NIC 1	N.D.
28	NIC 1	N.D.
29	NIC 1	N.D.

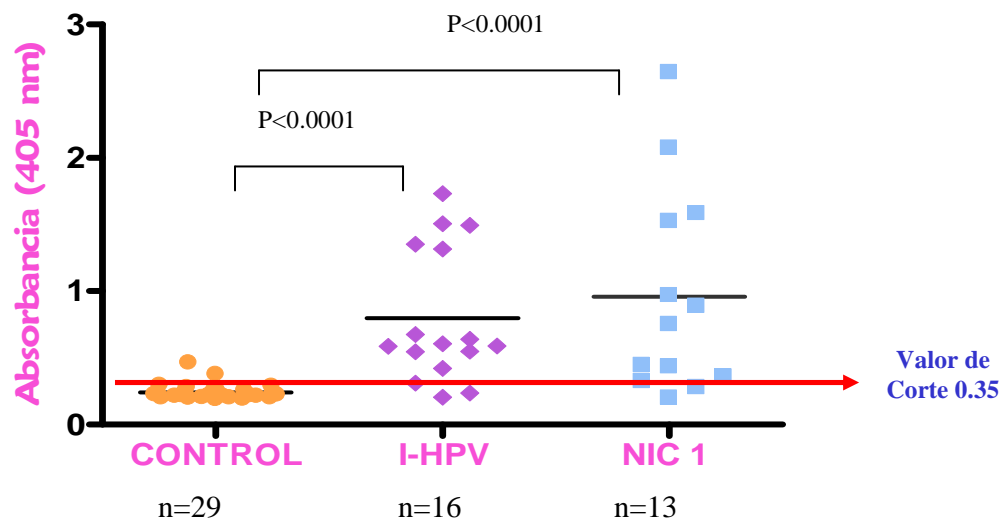
A.R. HPV DE ALTO RIESGO QUE PUEDE SER (31,39, 45, 52, 58)

N.D. NO TIENEN HPV 16, 18, 31, 33, 39, 45, 52, 58, 6, 11.

Detección de anticuerpos IgA específicos al péptido P16 en secreciones bucales y cervicales de pacientes con I-HPV y NIC 1.

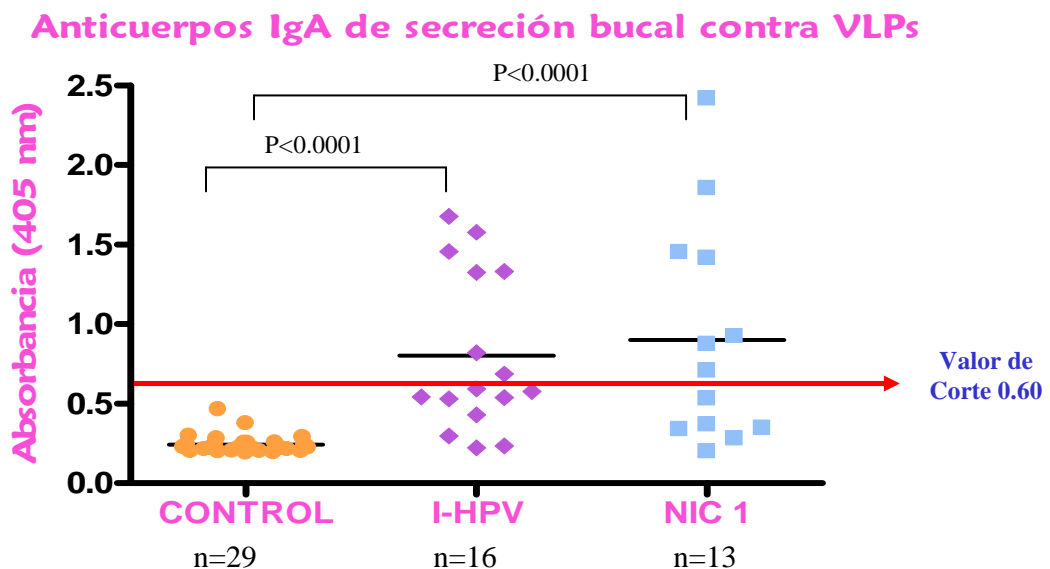
En estudios previos, nuestro grupo de investigación ha encontrado que el péptido IHSMNSTIL de la proteína L1 de HPV-16 (P16), permite detectar mediante ensayos de ELISA, anticuerpos IgG e IgA en muestras séricas y cervicales de más del 90% de mujeres con displasias de bajo grado y con infección por virus de papiloma humano de alto riesgo (Rocha-Zavaleta et al 2004). En el presente trabajo, se procedió a detectar la presencia de anticuerpos IgA específicos hacia el péptido IHSMNSTIL tanto en secreciones bucales como cervicales de mujeres con displasias cervicales de bajo grado.(I-HPV y NIC-1). Al evaluar anticuerpos IgA en las secreciones bucales encontramos que las mujeres con I-HPV presentaron alta positividad hacia el péptido P16,obteniéndose un promedio de 0.79 de densidad óptica DO; mientras que las pacientes con NIC 1, el promedio de anticuerpos detectado fue de 0.95 de DO, en ambos casos los valores de anticuerpos fueron significativamente mayores ( $P<0.0001$ ) a los encontrados en el grupo de mujeres normales, en las cuales el promedio de anticuerpos fue de 0.23 de DO Gráfica 1.

**Anticuerpos IgA de secreción bucal contra el péptido P16**



Grafica 1. Detección de anticuerpos IgA específicos al péptido P16 (IHSMNSTIL) encontrados en secreción bucal en pacientes con I-HPV con un promedio de 0.79 DO en NIC 1 fue de 0.95 DO comparado con el grupo control 0.23 DO (Mujeres sin evidencias de I-HPV).

Por otro lado considerando que la proteína L1 es el componente principal de las cápsides del HPV, representando cerca del 80% de la composición total, y que en la mayoría de ensayos inmunológicos se emplean cápsides para detectar anticuerpos específicos, se procedió a determinar la presencia de anticuerpos IgA de las secreciones bucales hacia partículas tipo virales (VLPs), constituidas de las proteínas L1 de HPV-16, HPV-18, HPV-6 y HPV-11, componentes de la vacuna Gardasil de MERK SD, USA. El promedio de anticuerpos IgA contra VLPs, detectados en las mujeres con I-HPV fue de 0.80 DO mientras que el grupo de NIC 1 presentó un promedio de 0.90 DO valores significativamente mayores ( $P < 0.0001$ ) al encontrado en el grupo de mujeres donadoras normales con un promedio de 0.36 de DO Gráfica 2.

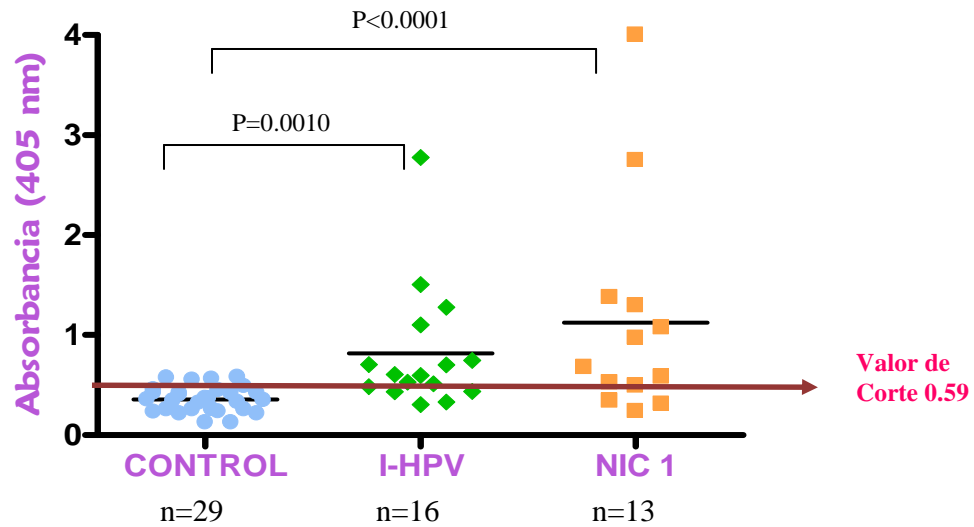


Grafica 2. Detección de anticuerpos IgA específicos al VLP's encontrados en secreción bucal en pacientes con I-HPV 0.80 DO, NIC 1 0.90 DO comparado con el grupo control 0.36 DO (Mujeres sin evidencias de I-HPV).



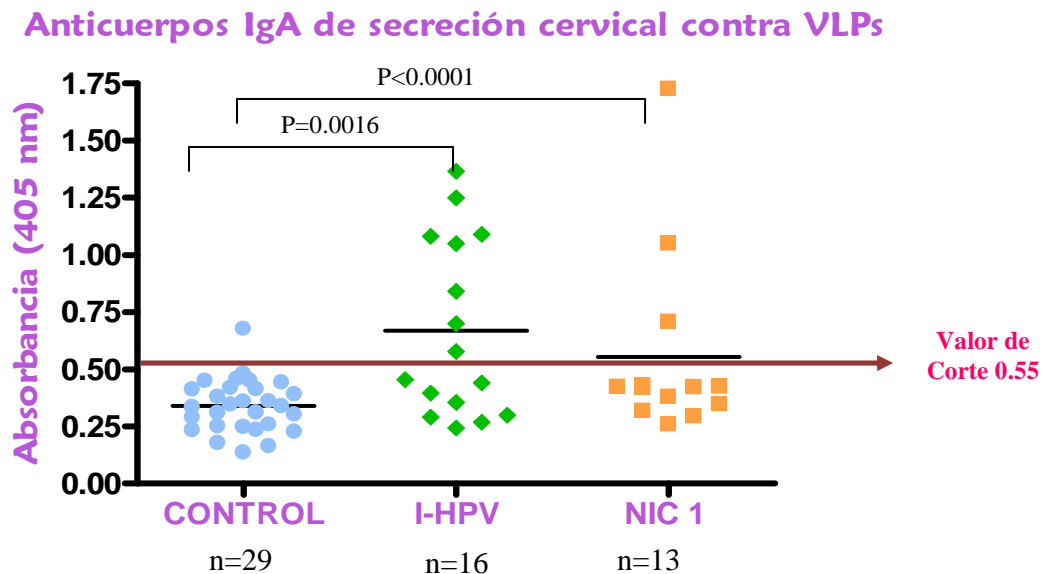
En cuanto a las secreciones cervicales los anticuerpos específicos hacia péptido P16, encontrado en las pacientes con I-HPV fue de 0.81 DO el de las pacientes con NIC 1 fue de 1.12 de DO, ambos casos, fueron significativamente mayores ( $P < 0.0001$ ) a los encontrados en el grupo de donadoras normales, quienes presentaron un promedio de 0.35 de DO Gráfica 3.

### Anticuerpos IgA de secreción cervical contra el péptido P16



Grafica 3. Detección de anticuerpos IgA específicos al P16 (IHSMNSTIL) encontrados en secreción cervical en pacientes con I-HPV fue de 0.81 DO y NIC 1 1.12 DO, comparado con el grupo control fue de 0.35 DO (Mujeres sin evidencias de I-HPV).

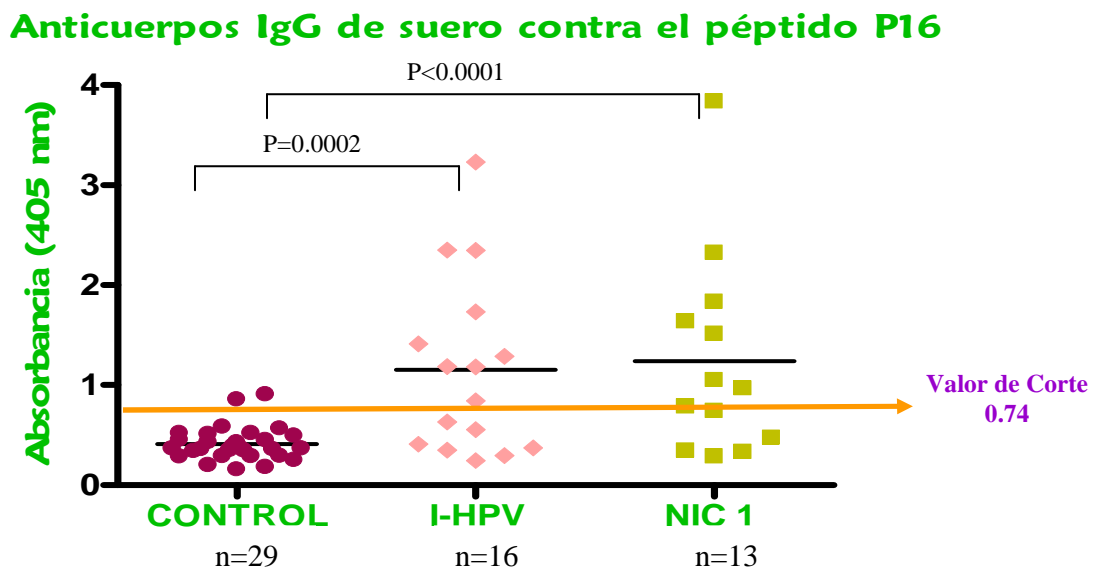
Por otro lado, al determinar la presencia de anticuerpos IgA de secreción cervical contra VLPs contenidos en la vacuna Gardasil, se encontró que el valor promedio de anticuerpos de las pacientes con I-HPV fue de 0.66 DO, mientras que las pacientes con NIC 1 presentaron un promedio de 0.55 DO, en ambos casos se encontró diferencia significativa ( $P < 0.0001$ ) respecto al grupo de donadoras normales quienes presentaron un promedio de anticuerpos de 0.33 de DO Gráfica 4.



Grafica 4. Detección de anticuerpos IgA específicos a VLP's encontrados en secreción cervical en pacientes con I-HPV 0.66 DO y NIC1 0.55 DO, comparado con el grupo control fue de 0.33 DO. (Mujeres sin evidencias de I-HPV).

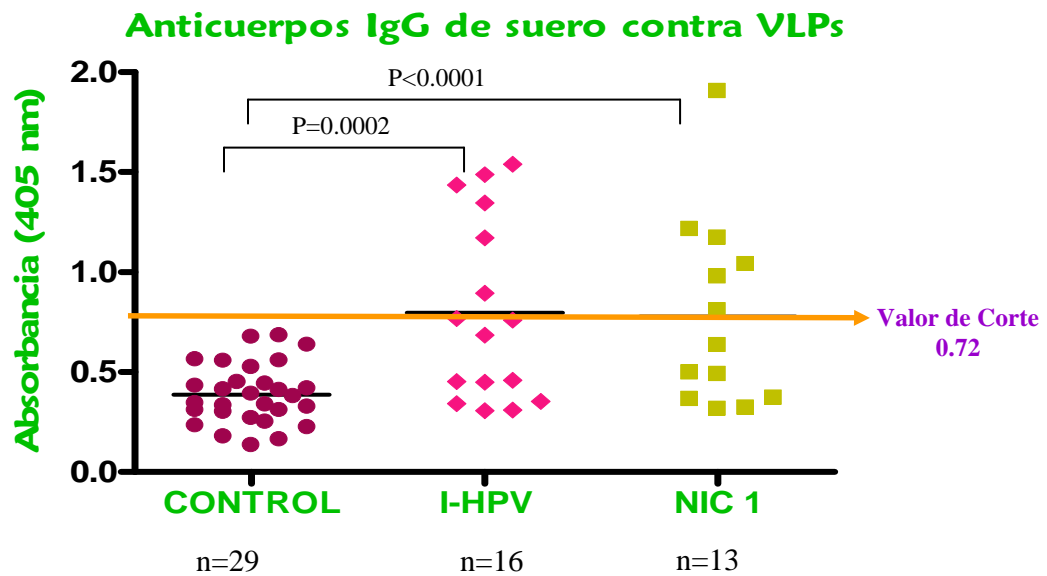
## Detección de anticuerpos IgG específicos a péptido P16 en sueros de pacientes con I-HPV y NIC 1.

Al determinar la presencia de anticuerpos IgG específicos hacia el péptido P16 en sueros de pacientes con I-HPV se encontró un promedio de 1.15 DO, mientras que en pacientes con NIC 1 fue de 1.23 DO, y en el grupo control presentó un promedio de 0.40 DO. Ambos grupos mostraron valores significativamente mayores ( $P < 0.0001$ ) a los encontrados en el grupo de donadoras normales Grafica 5.



Grafica 5. Detección de anticuerpos IgG específicos al P16 (IHSMNSTIL) encontrados en suero en pacientes con I-HPV fue de 1.15 DO, para NIC 1 1.23 DO, comparado con el grupo control 0.40 DO. (Mujeres sin evidencia de I-HPV).

Finalmente, al detectar los anticuerpos IgG séricos específicos a VLPs de la vacuna Gardasil, las pacientes; con I-HPV mostraron un promedio de anticuerpos de 0.79 DO, mientras que las pacientes con NIC 1 0.77 DO, ambos casos fueron significativamente mayores ( $P < 0.0001$ ) a los encontrados en el grupo de donadoras normales, cuyo promedio fue de 0.46 DO Gráfica 6.



Grafica 6. Detección de anticuerpos IgG específicos a VLPs encontrados en suero en pacientes con I-HPV fu de 0.79 DO, para NIC 1 0.77 DO, comparado con el grupo control 0.46 DO (Mujeres sin evidencia de I-HPV).

*Positividad de anticuerpos IgA e IgG específicos hacia el P16 versus VLPs en pacientes con I-HPV y NIC 1.*

Para comparar la positividad de anticuerpos IgA e IgG hacia los antígenos P16 y VLPs, en los ensayos de ELISA, en las diferentes muestras biológicas (secreción bucal, cervical y suero), se establecieron valores de corte en cada uno de los ensayos Cuadro 7 y 8, Graficas 1-6) para que a partir de este se considerara la positividad de la detección de anticuerpos específicos. Este valor se obtuvo a partir del promedio de anticuerpos específicos a péptido P16 o a VLPs encontrados en el grupo control más dos desviaciones estándar. Con base a los valores de corte, se observó que los porcentajes de las pacientes que dieron positividad de detección de anticuerpos en las diferentes muestras biológicas fueron mayores hacia el péptido P16 que hacia las VLPs. De hecho el 100 % de las pacientes con I-HPV y NIC 1 mostraron anticuerpos específicos hacia el P16 utilizando las tres muestras biológicas; mientras que el 85% de las pacientes tanto con I-HPV y NIC 1 mostraron anticuerpos específicos hacia las VLPs de la vacuna Gardasil.

Cabe destacar que de los tres tipos de muestras biológicas, se concentra un 80% de detección de anticuerpos específicos a péptido P16 en secreción bucal en estadio de I-HPV siendo así menores los porcentajes en secreción cervical (56%) y de suero (56%) comparado con NIC 1 donde se obtuvieron el 61%, 54% y 61% respectivamente Cuadro 9.

Mientras que para VLPs la positividad de pacientes con I-HPV fue de 43% en secreción bucal, 50% en secreción cervical y 50% en suero; y para pacientes con NIC 1 los valores fueron de 53%, 23% y 46% respectivamente Cuadro 10.

Cuadro 7. Anticuerpos IgA de secreción bucal, cervical e IgG en sueros, específicos para el péptido P16; en 16 muestras de pacientes en estadio de I-HPV y 13 con NIC 1.

Pacientes con I-HPV	IgA Bucal	IgA Cervical	IgG Suero	Pacientes con NIC 1	IgA Bucal	IgA Cervical	IgG Suero
Paciente 1	<b>1.493667</b>	0.306	0.245	Paciente 1	<b>0.9676667</b>	0.2366667	<b>1.636</b>
Paciente 2	<b>1.731333</b>	0.3296667	0.408	Paciente 2	<b>1.582667</b>	0.31	<b>2.321667</b>
Paciente 3	<b>1.350333</b>	0.5293334	<b>2.349667</b>	Paciente 3	<b>2.640667</b>	0.5266666	<b>3.834667</b>
Paciente 4	<b>0.547</b>	0.4303333	<b>0.8416666</b>	Paciente 4	<b>2.073667</b>	0.3416667	<b>1.831333</b>
Paciente 5	0.203	0.4843333	<b>3.233</b>	Paciente 5	<b>0.4336667</b>	0.493	<b>1.511</b>
Paciente 6	<b>1.317</b>	<b>1.503667</b>	<b>1.186333</b>	Paciente 6	0.3583333	0.5823333	<b>0.9666666</b>
Paciente 7	0.2356667	<b>0.7036667</b>	0.5546666	Paciente 7	<b>0.445</b>	<b>2.748667</b>	0.738
Paciente 8	<b>0.6396667</b>	<b>1.276667</b>	<b>1.289667</b>	Paciente 8	<b>1.524333</b>	<b>1.296333</b>	<b>0.786</b>
Paciente 9	<b>1.506667</b>	<b>0.746</b>	<b>1.413</b>	Paciente 9	0.324	<b>4</b>	<b>1.048</b>
Paciente 10	<b>0.588</b>	0.4353333	<b>2.351333</b>	Paciente 10	0.75	<b>1.377667</b>	0.3283333
Paciente 11	<b>0.587</b>	<b>0.6063333</b>	0.632	Paciente 11	0.2776667	<b>1.076</b>	0.285
Paciente 12	0.3076667	<b>0.5953333</b>	<b>1.733</b>	Paciente 12	<b>0.8896667</b>	<b>0.97</b>	0.3423333
Paciente 13	<b>0.6736667</b>	<b>0.701</b>	<b>1.180333</b>	Paciente 13	0.199	<b>0.6796666</b>	0.473
Paciente 14	<b>0.607</b>	<b>2.774667</b>	0.3706667	<b>Valor de Corte</b>	<b>0.35</b>	<b>0.59</b>	<b>0.74</b>
Paciente 15	<b>0.4203333</b>	<b>1.103</b>	0.349				
Paciente 16	<b>0.5476667</b>	0.512	0.2946667				
<b>Valor de Corte</b>	<b>0.35</b>	<b>0.59</b>	<b>0.74</b>				

\*\*\*Los valores en negritas son aquellos que dieron positividad en las pacientes de acuerdo al valor de corte obtenido en cada una de las diferentes muestras biológicas.

Cuadro 8. Anticuerpos IgA de secreción bucal, cervical e IgG en sueros, específicos a VLPs; de 16 muestras de pacientes en estadio de I-HPV y 13 con NIC 1.

Pacientes con I-HPV	IgA Bucal	IgA Cervical	IgG Suero	Pacientes con NIC 1	IgA Bucal	IgA Cervical	IgG Suero
Paciente 1	<b>1.677667</b>	0.439	0.6836666	Paciente 1	<b>0.874</b>	0.3176667	0.3213333
Paciente 2	<b>1.578333</b>	<b>1.089667</b>	<b>0.7683333</b>	Paciente 2	<b>1.415333</b>	0.4206667	0.6343333
Paciente 3	<b>1.327</b>	<b>1.365667</b>	0.3066667	Paciente 3	<b>2.418667</b>	0.3456667	0.37
Paciente 4	0.5423333	<b>1.249333</b>	<b>0.894</b>	Paciente 4	<b>1.854667</b>	0.2926667	<b>1.904</b>
Paciente 5	0.235	<b>1.081</b>	0.3103333	Paciente 5	0.368	0.4223333	0.4966667
Paciente 6	<b>1.331333</b>	<b>0.6986667</b>	0.355	Paciente 6	0.338	0.258	<b>1.171333</b>
Paciente 7	0.2213333	0.4546667	<b>1.487333</b>	Paciente 7	0.5313333	<b>1.048667</b>	<b>1.214</b>
Paciente 8	<b>0.6856667</b>	<b>0.841</b>	<b>1.436333</b>	Paciente 8	<b>1.453333</b>	0.423	<b>0.8073334</b>
Paciente 9	<b>1.458</b>	<b>0.577</b>	0.4586667	Paciente 9	0.3463333	<b>1.726</b>	<b>1.038667</b>
Paciente 10	0.538	0.3546667	0.453	Paciente 10	<b>0.7076667</b>	0.3786667	0.3643333
Paciente 11	0.5756667	0.268	<b>0.7616667</b>	Paciente 11	0.281	0.43	0.3153333
Paciente 12	0.2963333	0.2976667	<b>1.539</b>	Paciente 12	<b>0.923</b>	0.4176667	0.4893333
Paciente 13	<b>0.819</b>	0.2903333	<b>1.345</b>	Paciente 13	0.1996667	<b>0.7066666</b>	<b>0.9773333</b>
Paciente 14	0.5926667	<b>1.048667</b>	<b>1.171333</b>	<b>Valor de Corte</b>	<b>0.60</b>	<b>0.55</b>	<b>0.72</b>
Paciente 15	0.43	0.396	0.4493333				
Paciente 16	0.5303333	0.243	0.3426667				
<b>Valor de Corte</b>	<b>0.60</b>	<b>0.55</b>	<b>0.72</b>				

\*\*\*Los valores en negritas son aquellos que dieron positividad en las pacientes de acuerdo al valor de corte obtenido en cada una de las diferentes muestras biológicas.

Cuadro 9. Porcentajes de las pacientes que dieron positividad a la detección de anticuerpos IgA e IgG específicos a péptido P16

		Pacientes con I-HPV			
IgA Bucal		IgA Cervical		IgG Suero	
13/16	81%	9/16	56%	9/16	56%
		Pacientes con NIC 1			
8/13	61%	7/13	54%	8/13	61%

Cuadro 10. Porcentajes de las pacientes que dieron positividad a la detección de anticuerpos IgA e IgG específicos a VLPs

		Pacientes con I-HPV			
IgA Bucal		IgA Cervical		IgG Suero	
7/16	43%	8/16	50%	8/16	50%
		Pacientes con NIC 1			
7/13	53%	3/13	23%	6/13	46%

---

---

## ANÁLISIS DE RESULTADOS

Varios estudios epidemiológicos han demostrado que durante la infección persistente por virus de papiloma humano, se genera una respuesta inmune humoral hacia proteínas de la cápside viral, y por tanto, la presencia de anticuerpos específicos hacia epítopes conformacionales o lineales de la proteína L1 de los HPV's infectantes, puede ser indicador de infecciones pasadas y/o de infecciones agudas recientes ( Stanley *et al* 2006, Hamiskova *et al* 1994, Marais *et al* 2000, Sun *et al* 1999, Stone *et al* 2002). En estudios previos, nuestro grupo de investigación reportó que más del 90% de pacientes que cursan con infecciones por HPV's de alto riesgo, presentan anticuerpos específicos hacia el péptido P16 (IHSMNSTIL, derivado de la proteína L1 de HPV-16) en muestras de secreción cervical y suero (Rocha-Zavaleta *et al* 2004). En el presente trabajo, además de confirmar este hallazgo, encontramos que en muestras de secreción bucal también se detectaron anticuerpos IgA específicos hacia este péptido en más del 80% de las pacientes, aún cuando éstas presentaron infección por diferentes tipos de HPV de alto riesgo (HPV-16, -18, -31, -33, -39, -45, -52, -58) asociados con el desarrollo de CaCu (Muñoz *et al* 2003), lo que sugiere que la vía oral puede ser también una fuente importante de ingreso de las partículas virales infecciosas; ya que en estudios se ha demostrado la frecuencia de DNA en queratinocitos de HPV en células escamosas identificadas como lesiones premalignas o lesiones cancerosas en la mucosa bucal; con un alto porcentaje de HPV de alto riesgo específicamente el HPV-16 (González *et al* 2007). Incluso la expresión de la proteína E7 en ADN de estas células escamosas orales, identificando queratinocitos premalignos, esta proteína juega un papel importante en el desarrollo de la neoplasia oral y su asociación con la inmunosupresión (Young SK y Min KW 1991).

En este estudio se encontró que el 100% de las pacientes con I-HPV y con NIC 1 dieron positividad de anticuerpos específicos hacia el péptido P16 en los ensayos de ELISA, al analizar los niveles detectados entre las diferentes muestras biológicas (secreción bucal, cervical o suero); mientras que al utilizar como antígeno a partículas tipo virales (VLPs) de la vacuna Gardasil MSD, constituidas de las proteínas L1 de HPV-16, -18, -11 y -6, el 85% de las pacientes presentaron positividad de anticuerpos hacia estas partículas.



La mayoría de los ensayos inmunológicos para detectar anticuerpos específicos a la proteína L1 del HPV están basados en el uso de cápsides intactas de los viriones o VLP's, particularmente de los genotipos HPV-16, HPV-18, HPV-6 y HPV-11 (Carter *et al* 1996, Kimbauer *et al* 1994); y a partir de estos ensayos, se ha encontrado que 50-60% de las mujeres infectadas, presentan anticuerpos contra estos VLPs. Además de que en las etapas iniciales de la infección por HPV a nivel cervical, vulvar o anogenital, la producción de anticuerpos específicos hacia la proteína L1 es lenta y los anticuerpos suelen ser muy bajos en la mayoría de los individuos infectados, por lo que el tiempo de conversión de los anticuerpos producidos inicialmente con isotipo IgM al isotipo de memoria IgG, puede durar alrededor de 6-12 meses durante la infección persistente (Carter *et al* 1996, Kimbauer *et al* 1994, Wikström *et al* 1995 y Villa *et al* 2005). Asimismo se ha observado que pacientes que muestran infección con variantes de HPV-16 (Asiático-americana, africana) serológicamente presentan reacción cruzada con el prototipo europeo de HPV-16, pero no así contra diferentes tipos de HPV, lo cual indica que el reconocimiento de anticuerpos hacia epítomos conformacionales de la cápside son específicos al tipo de papiloma infectante (Yamada *et al* 1995, Cheng *et al* 2000). Sin embargo la detección de anticuerpos fue más eficiente usando al péptido P16 ya que reconoce también otros tipos virales por los cuales las pacientes estaban infectadas.

Por otra parte, se ha reportado que secuencias lineales de la proteína L1 de HPV-16, expuestas en la superficie de los viriones, pueden ser herramientas de gran utilidad para la detección serológica de anticuerpos con alta sensibilidad y especificidad en personas expuestas a la infección por HPV. Han mostrado que el uso de péptidos de 20 o más aminoácidos de la proteína L1 de HPV-16, permiten detectar anticuerpos específicos en pacientes infectadas por HPV-16, lo cual es muy valioso para la detección de infección por este tipo viral (Heino *et al* 1995 y Urquiza *et al* 2005). En el caso particular del péptido IHSMNSTIL, en estudios previos se reportó que a través de ensayos de ELISA es posible detectar anticuerpos en personas expuestas a la infección por HPV de alto riesgo y no así aquellas con infección por HPV de bajo riesgo (Rocha-Zavaleta *et al* 2004). En el presente estudio también logramos detectar anticuerpos en una gran proporción de mujeres con infecciones por diferentes tipos de HPV de alto riesgo. Este hecho se debe muy probablemente a que la secuencia de 9 aminoácidos (IHSMNSTIL), corresponde a una región altamente conservada entre las secuencias de la proteína L1 de HPV's de alto riesgo asociados al desarrollo de cáncer cérvico-uterino.

Por lo cual es muy probable que mujeres que cursan con infecciones producidas por diferentes tipos de HPV de alto riesgo generen anticuerpos que tengan reactividad cruzada hacia el péptido IHSMNSTIL. Lo cual nos permite explicar el hecho de que el 100% de las pacientes con I-HPV y con NIC 1 que presentaban infección por diferentes tipos de HPV de alto riesgo, presentaran positividad a la detección de anticuerpos específicos hacia este péptido.

También es relevante considerar la posición del péptido IHSMNSTIL en la estructura de la proteína L1 y en la cápside del virus, ya que esta secuencia forma parte de la unión entre las cadenas alfa hélice 2 y 3 de la proteína L1 de HPV-16, las cuales interaccionan con las cadenas alfa hélices 4 y 5 de otra proteína L1 para formar los amarres de 5 unidades de proteína L1 que constituyen a cada uno de los capsómeros de la estructura icosaédrica del virión (Chen *et al* 1995). Lo que representa que este péptido se encuentre expresado de manera repetitiva en la estructura del virión y por tanto altamente disponible al reconocimiento por anticuerpos. En consecuencia, es posible que de manera natural durante la infección por virus de papiloma humano de alto riesgo, además de generarse anticuerpos dirigidos hacia epítopes conformacionales de la estructura del virión, también se generen anticuerpos hacia la región que constituye el péptido IHSMNSTIL. Esta aseveración también se basa en el hecho de que nuestro grupo de trabajo, al utilizar un modelo de inmunización de ratones de la cepa C 57 BL/6 con VLPs de la vacuna Gardasil (VLP de HPV-16, -18, -11 y -6) se detectaron anticuerpos específicos al péptido IHSMNSTIL y a sus homólogos derivados de la proteína L1 de HPV-18, HPV-11 y HPV-6 (Muñoz-Gómez DE 2008).

Así mismo al inmunizar ratones con péptidos homólogos al péptido IHSMNSTIL, derivados de los HPV's de alto riesgo HPV-31, -33, -52 y -58, sus sueros contenían anticuerpos que reconocieron fuertemente de manera cruzada a VLP's de la vacuna Gardasil y a VLPs de HPV-16 (Ortiz-Salazar RA 2006). Tomando estos estudios de manera global, podemos considerar que la secuencia conformada por el péptido IHSMNSTIL puede ser de gran relevancia para la detección de anticuerpos específicos generados de manera natural (ante la transmisión de la infección) o de manera inducida (mediante la aplicación de la vacuna que contiene VLPs). Aunado a estos hallazgos, en un estudio previo logramos identificar que el péptido IHSMNSTIL y su homólogo IHSMNSSIL de la proteína L1 de HPV-18 son capaces de estimular linfocitos T de

pacientes con cáncer cérvico-uterino positivas a HPV-18 y al alelo HLA-B39 de las moléculas clase I del complejo principal de histocompatibilidad (Monroy-García *et al* 2002). Por lo tanto esto nos permite sugerir que la secuencia constituida por los 9 aminoácidos del péptido IHSMNSTIL o de sus homólogos, representa un determinante antigénico importante para el reconocimiento inmune en pacientes o mujeres expuestas a infecciones causadas por HPV's de alto riesgo, no solo en la generación de anticuerpos, sino en la respuesta inmune mediada por linfocitos T. La conformación de esta secuencia parece ser de gran relevancia, puesto que en otros estudios se ha encontrado que el uso de péptidos con 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 (Andersson-Ellstrom A *et al* 1996).

En un estudio realizado por Dillner J 1990, en donde usó un péptido que incluía 9 aminoácidos en el extremo amino terminal y uno en la porción carboxilo terminal de péptido 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 péptido P16 en la parte carboxilo terminal, tampoco encontraron reactividad de anticuerpos en mujeres con infección por HPV-16 (Andersson-Ellstrom A *et al* 1996)

Por otro lado, los estudios realizados hasta ahora para la detección de respuesta inmune celular y humoral en pacientes con I-HPV y cáncer cervical, utilizando el péptido P16, han sido de corte transversal, en la cual solo se ha tomado una muestra, por lo que resultaría importante realizar estudios longitudinales para analizar la presencia de respuesta inmune en mujeres infectadas por HPV's de alto riesgo a través de un tiempo determinado, lo cual sería una herramienta de gran utilidad para monitorear la evolución de la enfermedad bajo diferentes condiciones de tratamiento en las pacientes.

Finalmente, tomando en consideración que cerca del 60% de la población sexualmente activa está infectada por algún tipo de HPV; en donde la prevalencia de infección para la mujer y el hombre es de 14.5% y 42.7% respectivamente (Galloway y Jenison 1990, Lina *et al* 2003), resulta conveniente establecer métodos que permitan monitorear la presencia del agente infeccioso, para lo cual este método en el cual se pueden emplear

muestras biológicas provenientes de secreciones cervicales, bucales o sueros, podría resultar conveniente e importante en la detección de anticuerpos específicos a HPV's de alto riesgo, no solo en la mujer, sino en la(s) pareja(s) sexuales, en donde el hombre es un portador y transmisor importante de la infección.

## CONCLUSIONES

En el presente trabajo, la aplicación de la técnica de ELISA permitió la detección de anticuerpos IgA e IgG específicos al péptido P16 (IHSMNSTIL) en un 100% considerando que en alguna de las tres muestras biológicas de secreciones bucales, cervicales, y de sueros se detectaron en las pacientes con displasias de bajo grado con infección por HPV de alto riesgo.

Más del 80% de los pacientes estudiados presentaron positividad de anticuerpos IgA en muestras de secreciones bucales.

El péptido P16 derivado de la proteína L1 de HPV-16 es un determinante antigénico que puede ser útil en la detección de anticuerpos específicos IgA de secreción de mucosa bucal, cervical y de IgG en suero de pacientes con displasias de bajo grado infectadas por HPV de alto riesgo.

## PERSPECTIVAS

Considerando que en este estudio las muestras analizadas son de corte transversal (en donde se cuenta con una sola muestra tomada en un determinado momento), sería conveniente llevar a cabo estudios de carácter longitudinal, en donde se de seguimiento a estas pacientes para detectar los niveles de anticuerpos, tomando en consideración los procedimientos prescritos por el médico tratante, lo cual daría información muy relevante durante la evolución de la enfermedad.

Es conveniente probar la detección de anticuerpos IgA e Ig G específicos a los péptidos homólogos al péptido P16 en las muestras de secreciones bucales, cervicales y en suero; incluso en otros estadios de la infección por virus de papiloma humano.

En este estudio se demostró que mediante el método de ELISA, se pueden detectar anticuerpos específicos al péptido P16 en muestras de secreción bucal, cervical y de suero en un número importante de mujeres con infección por HPV de alto riesgo, por lo que sería muy conveniente implementar la detección de anticuerpos en pruebas rápidas como la de flujo lateral o tira reactiva, las cuales podrían ser auxiliares en la detección y diagnóstico de esta enfermedad.

## BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Abbas A, Lichtman A, Pober J. 2000. Inmunología celular y molecular. Madrid. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana. pp. 189-193.
- ❖ Abbas A, Lichtman A. 2004. Inmunología Celular y Molecular. Madrid. 5ª ed. Ed. Saunders-Elsevier. pp. 189-193.
- ❖ Andersson-Ellstrom A, Dillner J, Hagmar B, Schiller J, Sapp M, Forssman L, Milsom I. 1996. 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. 23: 234-238.
- ❖ Austyn MJ y Kathryn J. 1993. Principales of cellular and Molecular Immunology. Ed. Oxford University Press. pp. 50-57.
- ❖ Barrera RR, Peralta ZP. 1998. Bases Moleculares de la Inmunología del Cáncer. Madrid MV. Slud Pública de México. 37: 45-50.
- ❖ Berek JS, Hcker NF. 2000. Practical Gynecology Oncology. 3ª edición. Lippincott Williams & Wilkins: 180-203.
- ❖ Berumen J, Unger ER, Casas L, Figueroa P. 1995. Amplification of human papillomavirus types 16 and 18 in invasive cervical cancer. Hum Pathol. 26: 676-681.
- ❖ Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ & Shah KV .2002. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. J Clin Pathol. 55: 244-265.
- ❖ Bontkes H, Gruil T, Walboomers J, Schiller, Dillner J, Helmerhost T, Verheijen R, Scheper R & Meijer C. 1999. Immune responses against human papillomavirus (HPV) type 16 virus-like particles in a cohort study of women with cervical intraepithelial Neoplasia II. Systemic but no local IgA responses correlates with clearance of HPV-16. J Gen Virol. 80: 409-417.
- ❖ Carter JJ, Koutsky L, Wipf G, Chistensen N, Lee SK, Kuypers J, Kiviat N y Galloway D. 1996. The nature history of humanpapillomavirus type 16 capsid antibodies among a cohort of university women. J Inf Dis. 174: 927-936.
- ❖ Carter JJ, Madeleine MM, Shera K, Schwartz SM, Cushing-Haugen KL, Wipf GC, Porter P, McDougall JK, Galloway DA. 2001. Human Papillomavirus 16 and 18 L1 serology compared across anogenital cancer sites. Cáncer Res. 61: 1934-40.

- ❖ Castellanos MMR. 2003. Cáncer cervico-uterino y el HPV .Opciones de detección. Revista de la Facultad de Medicina UNAM. 2: 63-66.
- ❖ Chen JJ, Reid CE, Band V, Androphy EJ. 1995. Interaction of Papillomavirus E6 oncoproteins with a putative calcium-binding protein. Science. 269: 529-531.
- ❖ Cheng XS, Garcea RL, Goldberg Ilya, Casini Gregory y Harrison Stephen C. 2000. Structure of small Virus-Like Particles Assembled from the L1 Protein of Human Papillomavirus 16. Molecular cell. 5: 557-567.
- ❖ Crum CP, Snyder KA, Barber SR, Symbula M, Taylor PT, Roche JK. 1991. Binding by immunoglobulin to the HPV-16-derived proteins L1 and E4 in cervical secretions of women with HPV-related cervical disease. Cancer Res. 16: 4423-4429.
- ❖ DeVita V, Hellman S. y Rosemberg S. 1997. Philadelphia, USA. Cancer: Principles and Practice of Oncology. Lippincott-Raven Publishers.
- ❖ Dillner J, Dillner L, Utter G, Eklund C, Carter JJ, Rotola A, Costa S & DiLuca D. 1990. Mapping of linear epitopes of human papillomavirus type 16: the L1 and L2 open reading frames. J Inf Cáncer. 45: 529-535.
- ❖ DiMaio D, Petti L, Hwang ES. 1994. The E5 transforming proteins of the Papillomaviruses. Sem Virol. 5: 369-379.
- ❖ Evander M, Edlund K, Gustafsson A, Jonsson M, Karlsson R, Rylander E, Wadell G. 1995. Human papillomavirus infection is transient in young women: a population-based cohort study. J Inf Dis. 171: 1026-1030.
- ❖ Feltkamp MC, Smits HL, Vierboom MP, Minnaar RP, de Johgh BM, Brijfhout JW, Ter Schegget J, Melief CJ, Kast WM. 1993. Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope containing peptide protects against a tumor induced by human Papillomavirus type 16-transformed cells. J Eur Immonul. 23: 2242-2249.
- ❖ Frazer IH, Gao FG, Khammanivong V, Liu WJ, Leggatt GR. 2002. Antigen-specific CD4+ T-cell help is required to activate a memory CD8+ T cell to a fully functional tumor killer cell. Cancer Res. 62(22): 6438-6441.
- ❖ Frazer IH. 2004. Prevention of Cervical Cancer through Papillomavirus Vaccination. Nature Immune. 4: 46-54.
- ❖ Galloway AD y Jenison AS. 1990. Characterization of the Humoral Immune Response to Genital Papillomaviruses. Mol Biol Med. 7, 59-72.



- ❖ Galloway DA. 2003. Papillomavirus vaccines in clinical trials. *The Lancet infectious Diseases*. 3: 469-475.
- ❖ González JV, Gutiérrez RA, Keszler A, Colacino Mdel C, Alonio LV, Teyssie AR, Picconi MA. 2007. Human papillomavirus in oral lesions. *Medicina Buenos Aires*. (67) 4: 363-368.
- ❖ Gostout BS, Ferber MJ, Thorland EC, Brink AA, Rapp AK, Phillips LA, McGovern R, Cheung TH, Chung TK, Fu WY, Smith DI. 2003. Preferential integration of human papillomavirus type 18 near the c-myc locus in cervical carcinoma. *Oncogene*. 46: 7233-7242.
- ❖ Granoff RG, Webster. 1999. *Encyclopedia of Virology*. 2 ed. Ed. Academic Press. pp. 2:1105-1120.
- ❖ Hamiskova E, Novak J, Hofmannova V, Muñoz N, Bosch FX, De Sanjose S, Shah K, Roth Z y Vonka V. 1994. Presence of antibodies to seven human papillomavirus type 16-derived peptides in cervical cancer patients and healthy controls. *J Inf Dis*. 170: 1424-1431.
- ❖ Hamiskova E, Ludvikova V, Smahel M, Sapp M, Vonke V. 1998. Prevalence of antibodies to human papilomavirus in the general population of the Czech Republic. *J Inf Cancer*. 77: 689-694.
- ❖ Hassen E, Chaï eb A, Bouaouina N, Khairi H, Remadi S, Chouchane L. 2001. Strategies for detection of papilloma-virus specific antibodies. *Mod Asp Immunobiol*. 2: 8-12.
- ❖ Hebner CM, Laimins LA. 2006. Human papilomavirus: Basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol*. 16: 83-97.
- ❖ Heino P, Skyldberg B, Rantala I, Hagmar B, Kreider R, Kirnbauer R y Dillner J. 1995. Human papillomavirus type 16 capsids expose multiple type-restricted and type-common antigenic epitopes. *J Gen Virol*. 76: 1141-1153.
- ❖ Hernan JG, Baylin SB. 2003. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*. 349: 2042-2054.
- ❖ Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Buró RD. 1998. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med*. 7: 423-428.
- ❖ Howley PM. 1991. Role of the human papilomavirus in human cancer. *Cancer Res*. 51: 5019-5026.

- ❖ Hubert WG, Laimins LA. 2001. 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. 23: 44-63.
- ❖ Huibregtse JM, Scheffber M, Howley PM. 1991. A cellular protein mediates association of P53 with the E6 oncoprotein of Human Papillomavirus type 16 or 18. EMBO J. 13: 4129-4135.
- ❖ Janeway CA y Travers P. 1997. Immunobiology the immune system in health and disease. Ed. Curr. Biol Limit New York. USA. pp. 254.
- ❖ Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra JD. 2001. Manipulation of the immune response. Signaling through lymphocyte receptor. En: Immunobiology. The immune system in health and disease. 5 ed. EE.UU. Garland Publishin. 550-560.
- ❖ Janeway CH, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. 2005. Immunobiology. The immune system in health and disease. 6ª ed. Ed: Current Biology Ltd. New York, U.S.A. pp. 823.
- ❖ Kaelin WG, Krek W, Sellers WE, Decaprio JA. 1992. Expression Cloning of a DNA Encoding a Retinoblastoma-Binding Protein with E2F-like Properties. Cell 70. pp. 351-364.
- ❖ Kimbauer R, Hubebert NL, Wheeler CM, Becker TM, Lowy DR y Schiller JT. 1994. A virus-like particle enzyme-linked immunoabsorbent assay detects serum antibodies in a majority of women infected with human papillomavirus type 16. J Natl Cancer Inst. 86: 494-499.
- ❖ Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. 2007. Inmunología de Kuby. 6ª ed. Editorial McGrawHill. México. pp. 1-5.
- ❖ Lehn H, Villa LL, Marziona F, Hilgarth M, Hillemans HG, Saber G. 1988. Physical state and biological activity of human papillomavirus genomes in precancerous lesions of the female genital tract. J Gen Virol. 69:187-196.
- ❖ Lina L. 2003. Vaccines against papillomavirus infections and disease. Salud Publica de México. 45 (3) 443-448.
- ❖ López SA y Lizano SM. 2006. Cáncer cervico-uterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. Cancerología. 1: 31-55.

- ❖ Marais D, Rose RC, Lane C, Espinal S, Bos P y Williamson AL. 2000. Seroresponses to virus like particles of human papillomavirus types 16, 18, 31, 33 and 45 in San People in Southern Africa. *J Med Virol.* 60: 331-336.
- ❖ Margni R. 2000. *Inmunología e Inmunoquímica Fundamentos.* 5a ed. Editorial Medica Panamericana. Buenos Aires. pp. 201-205.
- ❖ McIntyre MC, Ruesh MN, Laimins LA 1996. Human papillomavirus E7 oncoprotein binds a single form of cyclin E in a complex with cdk2 and p107. *Virology.* 215: 73-82.
- ❖ McMurray HR, Nguyen D, Westbrook TF, McAnce DJ. 2001. Biology of human papillomavirus. *Int J Exp Path.* 82: 15-33.
- ❖ Monroy-García A, Weiss-Steider B, Hernández -Montes J, Ortiz-Navarrete VF, Bañuelos-Pánuco A, Acosta-Araujo A, Díaz-Quiñonez A, López-Graniel CM, Herbert G, Granados J, De Leo C, Silva-López RM y Mora-García ML. 2002. Identification of two homologous antigenic peptides derived from L1 HPV-16 and 18 proteins specific for the HLA-B\*3901 allele. *Arch Virol.* 147: 1933-1942.
- ❖ Moreno RJ. 1996. *Respuesta inmune y mecanismo de auto inmunidad* Ed. Limusa. México. pp. 112-115.
- ❖ Moreno RJ. 2001. *Respuesta Inmune y Mecanismos de la Autoinmunidad.* Editorial Limusa. México. pp. 112-115.
- ❖ Moreno V, Bosch FX, Muñoz N, et al. 2002. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papilomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet.* 359: 1085-1092.
- ❖ Münger K, Scheffner M, Huibregste JM, Howley PM. 1992. Interactions of HPV E6 and E7 oncoproteins with tumor suppressor gene product. *Cancer Surv* 12: 197-217
- ❖ Muñoz N, Bosch FX. 1997. México. *Cervical cancer and human papillomavirus: epidemiological evidence and perspectives for prevention.* *Salud pública de México.* pp. 274-282.
- ❖ Muñoz N, Bosch FX, Lorincz A, Meijer CJ & Shah KV .2002. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol.* 55: 244-265.
- ❖ Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, y Meijer Ch, J.LM. 2003. *Epidemiology classification of human*

- papillomavirus types associated with cervical cancer. The New England J of Med pp. 518-527.
- ❖ Muñoz-Gomez DE. 2008. Detección de anticuerpos IgG específicos a péptidos homólogos de la proteína L1 de VPH de alto riesgo en suero de ratones C57 BL/6, inmunizados con la vacuna Gardasil. Tesis de Licenciatura. FES-Zaragoza. UNAM.
  - ❖ Nossal G. 1993. Sistema inmunitario entre la vida y la muerte. Investigación y Ciencia. Nov. 9-12.
  - ❖ Nubel RJR. 2005. Evaluación de las capacidades antigenicas de péptidos homologos derivados de la variante europea y de la variante asiatico-americana de la proteína E6 del HPV en el contexto de la HLA Clase 1. Tesis de Licenciatura. FES-Zaragoza. UNAM.
  - ❖ Ortiz-Salazar RA. 2006. Análisis inmunogénico del péptido IHSMNSTIL derivado de la proteína L1 de HPV-16 y de sus homólogos derivados de HPV-18, -31, -33, -52, -58, -6 y -11 en ratones Balb/c. Tesis de Licenciatura. FES-Zaragoza. UNAM.
  - ❖ Parham P. 2006. México. 2ªed. Editorial Medica Panamericana. pp. 230.
  - ❖ Parslow G, Stites P, Terr I, Imboden B. 2002. Inmunología Básica y Clínica. Manual Moderno. México, D.F. pp. 895.
  - ❖ Piña-Sánchez P, Hernández-Hernández DM, López-Romero R, Vázquez-Ortíz G, Pérez-Plasencia C, Lizano-Soberón M, González-Sanchez JL, Cruz-Talonias F, Salcedo M. 2006. Human papillomavirus-specific viral types are common in Mexican women affected by cervical lesions. Int Gyn Can. 16:1041-1046.
  - ❖ Putnam FW, Liu YS, Low TL. 1979. Primary structure of a human IgA1 immunoglobulin. IV. Streptococcal IgA1 protease, digestion, Fab and Fc fragments, and the complete amino acid sequence of the alpha 1 heavy chain. J Biol Chem. 254 (8): 2865-74.
  - ❖ Richard CY, Lalanne CM, Vandenbrouck C, Juilliard G. 1968. Summary and perspectives of the treatment of carcinoma of the piriform sinus. Apropos of 214 cases treated at the Gustave Institute. Ann Otolaryngol Chir Cervicofac. 85(8): 771-778.
  - ❖ Rocha-Zavaleta L, Ambrosio JP, Mora-García ML, Cruz-Talonia F, Hernandez-Montes J, Weiss-Steider B, Ortíz-Navarrete V y Monroy-García A. 2004. 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. *J Gen Virol.* 85: 1-8
- ❖ Roitt IM. *Inmunología Fundamentos.* 2000. 10ªed. Editorial Médica Panamericana. pp. 204.
  - ❖ Roitt IM, Brostoff y Male D. 2004. *Immunology.* pp. 87-97, 115.
  - ❖ Schiller JT, Davies P. 2004. Delivering on the promise: HPV vaccines and cervical cancer. *Nature Microbiology.* 4: 343-347.
  - ❖ Serman F. 2002. Cáncer Cerviño-uterino: epidemiología, historia natural y rol del virus de papilloma humano. *Perspectivas en prevención y tratamiento. Revchil Obstet Ginecol.* 67: 318-323.
  - ❖ Stanley M. 2005. Immune response to human papillomavirus. *Vaccine.* 1-7.
  - ❖ Stanley M. 2006. Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine* 24S1: S1/16-S1/22.
  - ❖ Stites A, Terr A, Parslow T. 2000. *Inmunología básica y clínica.* 9ª ed. México: Editorial El Manual Moderno. pp. 129-133, 200-250.
  - ❖ Stone KM, Karem KL, Sternberg MR, McQuillan GM, Poon AD, Unger ER, Reeves WC. 2002. Seroprevalence of humanpapillomavirus type 16 infection in the United States. *J Inf Dis.* 186: 1396-1402.
  - ❖ Sun YC, Eluf-Neto J, Bosch X, Muñoz N, Walboomers J, Chris J, Meijer M, Shah KV, Clayman B, Viscidi R. 1999. Serum antibodies to human papillomavirus 16 proteins in women from Brazil with invasive cervical carcinoma. *Cancer Epi Biomark Prev.* 8: 935-942.
  - ❖ Syrjänen SM, Syrjänen JK. 1999. New concepts on the role of Human Papillomavirus in cell cycle regulation. *Ann Med.* 31: 175-187.
  - ❖ Tay SK, Jenkins D, Singer A. 1987. Natural killer cells in cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus infection. *Br Obstet Gynaecol.* 94: 901-906.
  - ❖ Tewari KS, Taylor JA, Liao SY, DiSaia PJ, Burger RA, Monk BJ et al. 2000. Development and assessment of a general theory of cervical carcinogenesis utilizing a severe combined immunodeficiency murine-human xenograf model. *Gynecol Oncol.* 77: 137-148.
  - ❖ Thomas M, Pim D, Banks L. 1999. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene.* 18: 7690-7700.

- ❖ Torroella-Kouri M, Morsberger S, Carrillo A, Mohar A, Meneses A, Ibarra M, Ghaffari AM, Solorza G y Shah KV. 1998. HPV prevalence among Mexican women with neoplastic and normal cervixes. *Gynecologic Oncol.* 70: 115-120.
- ❖ Urquiza M, Guevara T, Espejo F, Bravo M, Rivera Z, Patorroyo M. 2005. Two L1-peptidos are excellent tools for serological detection of HPV-associated cervical carcinoma lesions. Elsevier. 332. pp. 224-232.
- ❖ Van den Brule, AJC, Meijer CJLM, Bakels V, Kenemans P y Walboomers JMM. 1990. Rapid detection of human papillomavirus in cervical scrapes by combined general primer-mediated and type-specific polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 26:2739-2743.
- ❖ Villa LL, Costa R, Petta C, Andrade R, Ault K, Giuliano A, Wheeler C, Koutsky L, Malm C y Lehtinen M. 2005. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16 and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomized double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *Lancet Oncol.* 6: 271-278.
- ❖ Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snidgers PF, Peto J, Meijer CJLM, Muñoz N. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer World Wide. *J Pathol.* 189: 12 -19.
- ❖ Wang Z, Hansson BG, Forslund O, Dillner L, Sapp M, Schiller JT, Bjerre B, Dillner J. 1996. Cervical mucus antibodies against human papillomavirus type 16, 18, and 33 capsids in relation to presence of viral DNA. *J Clin Microbiol.* pp. 3056-3062.
- ❖ Warness B, Levin AJ, Howley PM .1990. Association of human papillomavirus-types 16 and 18 protein with p53. *Science.* 248 : 76-79.
- ❖ Weissman L, Cooper MD.1993. How the immune system develops. *Sci Am.* 269(3):64-71. Review. No abstract available. Erratum in: *Sci Am.* 269(6):10.
- ❖ Wikström A, Van DGJJ, Quint WGV, Schiller JT y Dillner J. 1995. Identification of human papillomavirus seroconversion. *J Gen Virol.* 76: 529-539.
- ❖ Yamada T, Wheeler CM, Halpern AL, Stewart ACM, Hildesheim A, Jenison SA. 1995. Human papillomavirus-16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments. *J Virol.* 69: 7743-7753.

- ❖ Young SK, Min KW. 1991. In situ DNA hybridization analysis of oral papillomas, leukoplakias, and carcinomas for human papillomavirus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 71 (6):726-729.
- ❖ Zur Hausen H. 1999. Immortalization of human cells and their malignant conversion by high risk human papillomavirus genotypes. *Semin Cancer Biol.* 9: 405-409.
- ❖ Zur Hausen H. 2000. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Nat Can Inst.* pp. 690-698.
- ❖ Zur Hausen H. 2002. Papillomavirus and Cáncer: from basic studies to clinical application. *Nature Publishing Group.* 2: 342-350.
- ❖ <http://es.wikipedia.org/wiki/IgG>
- ❖ [http:// www.alerchek.com/IgA.htm](http://www.alerchek.com/IgA.htm)
- ❖ <http://www.fbr.org/swksweb/immunolymeoutline.html>
- ❖ [http:// www.NCI/PDQ/pacientes](http://www.NCI/PDQ/pacientes)
- ❖ [http://www.roche.de/.../hvp\\_verlauf.htm](http://www.roche.de/.../hvp_verlauf.htm)
- ❖ [http:// www.sanidadanimal.info/.../images/4inmunog.gif](http://www.sanidadanimal.info/.../images/4inmunog.gif)

## APÉNDICE

### PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

#### **Buffer de Carbonatos 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 la solución A a la solución B hasta que el pH sea de 9.6. Guardar todas las soluciones en refrigeración.

#### **TBS-Tween al 0.1%**

6.5g de Tris base, 8.7 g de Cloruro de Sodio para 1 L de agua destilada. Ajustar el pH a 7.6. Adicionar Tween 20 al 0.1%. Guardar en refrigeración.

#### **Solución bloqueadora**

De la solución anteriormente mencionada se toman 100 ml y se le adicionan 1 g de BSA (albúmina bovina sérica) que se uso para bloquear las placas de ELISA donde se colocaron las muestras séricas, mientras que para las secreciones bucales se tomó igual 100 ml de la solución de TBS-Tween pero se le agrego 0.5 g de BSA. 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.

### EXTRACCIÓN DE ADN

#### **Buffer de Lisis**

Para preparar 100 ml de esta solución se añade:

NaCl 0.5 M-----20 ml



Tris 0.1 M-----10 ml

EDTA 0.1 M-----25 ml

Y 0.5 g de SDS

Agua destilada----45 ml.

### **Fenol Saturado de Agua**

Se coloca en un tubo falcon de 50 ml aproximadamente 35 ml de cristales de fenol y se le agrega agua libre de DNAsas y RNAasa hasta cubrir los cristales esto se realiza en la campana de flujo laminar. Se disuelve por inversión y se coloca en baño maría a 56°C y cada 10 minutos aproximadamente se agita hasta que deje se vean claramente la separación de ambas fases se cubre el tubo con aluminio para evitar que se oxide y se deja a temperatura ambiente.

### **Tris 1 M pH 9.4**

Se pesa 12.11 g en 100 ml de agua destilada y se esteriliza.

### **Acetato de Amonio 7.5 M**

Se pesa 57.81 g y se disuelven en 100 ml de agua destilada de igual forma se esteriliza.

### **Cloroformo- alcohol isoamílico 25:1**

Se colocan 25 ml de cloroformo y 1 ml de alcohol isoamílico en un frasco oscuro y se guarda a temperatura ambiente.

### **Buffer de corrida para electroforesis 0.5X**

Para 1 L se agregan 10.8 g de Tris base, 5.5 g de ácido bórico y 4 ml de 0.5 M de EDTA a p H 8. Y se deja a temperatura ambiente.

### **Buffer de carga para las muestras del producto de PCR**

Contiene 0.25% de bromo fenol azul, 0.25% de xileno cianol y 30% de glicerol en agua. De este stock se hace una dilución 1:6 en agua ultrapura.

## ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo, sinónimo de Inmunoglobulina
ADN	Acido desoxirribonucleico
CaCu	Cáncer cervico uterino
CPA	Célula Presentadora de Antígeno
CTL	Linfócito T Citotóxico
DO	Densidad Óptica
ELISA	del inglés, Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay (Ensayo de Inmuabsorbancia ligado a Enzimas)
Fab	Fragmento de unión al antígeno
Fc	Fragmento cristalizante
HPV	Virus de Papiloma Humano
I-HPV	Infección por Virus de Papiloma Humano
Ig	Inmunoglobulina
Ig A	Inmunoglobulina tipo A
Ig G	Inmunoglobulina tipo G
NIC 1	Neoplasia intraepitelial cervical de bajo grado
PCR	del inglés, Polimerase Chain Reaction, Reacción en Cadena de Polimerasa.
P16	Péptido de 9 aminoácidos (IHSMNSTIL) de la proteína L1 de HPV-16.