



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

RESPUESTA INMUNE HUMORAL CONTRA
PÉPTIDOS DE LA PROTEÍNA L1 DE LOS VPH-16
EUROPEO Y ASIÁTICO-AMERICANO EN
PACIENTES CON CÁNCER DE CUELLO UTERINO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

BERISTAIN AGUILAR ALAN ULISES

DIRECTOR DE TESIS: Dr. JAIME BERUMEN CAMPOS

MÉXICO, D. F.

FEBRERO, 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al...

Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme realizar los estudios de maestría en tan noble institución, y por el apoyo en los diferentes trámites que he debido realizar durante toda la maestría, así como por el apoyo económico, recibido para presentar parte de mi trabajo de investigación en el V Congreso Nacional de Virología el cual se llevo acabo en el mes de Octubre del año 2007 en la Ciudad de Querétaro.

CONACYT por la beca económica con número de registro 189699 la cual fue una ayuda importante para la realización de esta maestría, cuyos resultados contribuyen a que los mexicanos tengamos una mejor calidad de vida.

A los miembros del Comité Tutorial: La Dra. Lourdes Mora, al Dr. Diego Arenas, al Dr. Alberto Monroy, a la Dra. Leticia Rocha y al Dr. Jaime Berumen, por su asesoría y consejos, para la realización y presentación de este trabajo de investigación, en especial al Dr. Berumen por aceptar ser mi tutor principal y darme la oportunidad de colaborar en la investigación para prevenir y luchar contra el CaCu .

Agradezco también a mis padres: El Sr. Jorge Beristain Carrera y la Sra. Ma. Dolores Aguilar Cruz y a mis hermanas Joyse y Aline, por su apoyo tanto material, económico y espiritual, sin el cual no hubiera podido realizar ésta tesis.

A todo los integrantes de la Unidad de Medicina Genómica del Hospital General de México, cuyo compañerismo y apoyo también fueron parte importante para esta tesis, gracias.

A quienes en algún momento contribuyeron en la elaboración de esta tesis
GRACIAS.

ÍNDICE.

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
VIRUS DE PAPILOMA HUMANO.....	2
GENOMA DEL VPH.....	3
CLASIFICACIÓN DE LOS VPH´s.....	4
VARIANTES ONCOGENICAS DEL VPH TIPO 16 DE ALTA PREVALENCIA EN MÉXICO	5
RESPUESTA INMUNE CONTRA EL VPH.....	7
VARIACIONES GENICAS DE LA PROTEÍNA L1 Y VACUNAS BASADAS EN VLP´s DEL VPH.....	9
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	12
HIPOTESIS.....	13
OBJETIVO.....	14
OBJETIVOS PARTICULARES.....	14
MÉTODO.....	15
OBTENCION DE MUESTRAS.....	15
DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA SECUENCIAR EL GEN L1 DEL VPH16 AA-C.....	16
AMPLIFICACIÓN DEL GEN L1 DEL VPH16 AA-C.....	16
SECUENCIACIÓN DEL GEN L1 DEL VPH16 AA-C.....	17
EFFECTO DE LAS MUTACIONES EN LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LA PROTEÍNA L1.....	18
SÍNTESIS DE PÉPTIDOS DERIVADOS DE LA PROTEÍNA L1 DEL VPH16 E, AA-a Y AA-c.....	18

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS CONTRA PÉPTIDOS DE LA PROTEÍNA L1 DEL VPH-16 E, AA-a Y AA-c A TRAVÉS DE LA TÉCNICA DE ENSAYO INMUNO ABSORBENTE LIGADO A ENZIMAS (ELISA).....	20
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	21
RESULTADOS.....	22
OBTENCIÓN DE LA SECUENCIA COMPLETA DEL GEN L1 DEL VPH16 AA-c..	23
MUTACIONES EN LA PROTEINA L1 DEL VPH 16 AA-c.....	24
ESTRUCTURA TERCIARIA DE LA PROTEÍNA L1 DEL VPH16 AA-c.....	25
UBICACIÓN DE LAS MUTACIONES DE LA PROTEINA L1 DEL VPH16 AA DENTRO DE EPITOPES HUMORALES DEL VPH16 E	32
DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA LAS VARIANTES EUROPEA Y ASIÁTICO AMERICANA DEL VPH 16.....	37
SEROPOSITIVIDAD A PÉPTIDOS HOMÓLOGOS EN PACIENTES CON CÁNCER POSITIVAS AL VPH16.....	42
PRESENCIA DE ANTICUERPOS EN PACIENTES POSITIVAS AL VPH16 E.....	45
PRESENCIA DE ANTICUERPOS EN PACIENTES POSITIVAS AL VPH16 AA.....	48
COMPARACIÓN DE LA SEROPOSITIVIDAD DE PACIENTES POSITIVAS AL VPH16 E CON LA SEROPOSITIVIDAD DE PACIENTES POSITIVAS AL VPH16 AA.....	49
COMPARACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL ENTRE LOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDIO.....	51
ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	54
CONCLUSIONES.....	62
BIBLIOGRAFIA.....	63

RESUMEN.

La mitad de los casos de cáncer cérvico-uterino (CaCu) en el mundo están asociados al virus de papiloma humano tipo 16 (VPH16), el cual tiene 5 variantes distribuidas de diferente manera en todo el mundo. En México el 25 % de las mujeres con CaCu presentan la variante Asiático-Americana (AA), la cual es 9 veces más agresiva que la variante Europea (E). La variante AA tiene tres subclases: AA-a, AA-b y AA-c, esta última es muy frecuente en México y muy rara o inexistente en otras partes del mundo, y no se conoce la secuencia completa de su genoma.

El sistema inmune es capaz de reconocer epítopes de las proteínas L1 y L2, las cuales forman la cápside del VPH, e inducir una fuerte respuesta contra el VPH. No obstante, la variación genética de epítopes inmunológicos pudiera afectar la respuesta inmune humoral contra la cápside del virus, por lo que la respuesta humoral inducida contra el virus de papiloma humano tipo 16 de la variante E (VPH16 E), con las vacunas que actualmente se encuentran en el mercado, podría no proteger contra la variante AA del virus de papiloma humano tipo 16 (VPH16 AA). Por lo cual, a partir de 4 tumores invasivos del cérvix, positivos para el VPH16AA-c, se amplificó y secuenció el gene L1 en ambas direcciones con oligonucleótidos específicos, encontrándose 19 mutaciones respecto del VPH16 E de referencia, y 3 mutaciones respecto a VPH16 AA-a. La mayoría de estas mutaciones caen dentro de epítopes identificados en la proteína L1 del VPH16 E, sin embargo, a través de ensayos de ELISA y utilizando péptidos derivados del VPH16 E y sus homólogos de los VPH16 AA-a y AA-c, no se encontró diferencia estadísticamente significativa en el reconocimiento humoral, en las pacientes con cáncer del cérvix (n=37) positivas para el VPH16 E y el VPH16 AA. Esto sugiere que las mutaciones encontradas en la proteína L1 del VPH16 AA-a y AA-c, no afectan el reconocimiento por parte de los anticuerpos generados contra la proteína L1 del VPH16 E, y pudiera implicar que las vacunas que se encuentran actualmente en el mercado, protegerán contra la infección por las subclases AA-a y AA-c del VPH16.

INTRODUCCIÓN.

VIRUS DE PAPILOMA HUMANO.

El Virus de Papiloma humano (VPH) es la principal enfermedad de transmisión sexual en el mundo, se estima que el 40% de la población mundial está infectada con este virus (Bosch y cols. 1995). La infección por VPH favorece el desarrollo de lesiones benignas hiperproliferativas (verrugas o condilomas), entre otras graves enfermedades como cáncer oro-faríngeo, pene, vulva, vagina, ano y esófago (Van Beurden y cols. 1998; Pinto y cols. 1999; Frish y cols. 1999; Daling y cols. 2005; Far y cols. 2007; Smith y cols. 2007; Tachezy y cols. 2007). Pero la más estudiada a nivel mundial por la alta mortandad, el fuerte impacto en la sociedad y en la economía, es el Cáncer Cérvico-uterino (CaCu), el cual es una de las principales causas de muerte a nivel mundial (Bosch y cols. 2002). Más del 75% de los casos de CaCu son del tipo celular escamoso, sin embargo en las últimas décadas los casos de adenocarcinomas han aumentado sobretudo en mujeres jóvenes (Sasieni y cols. 2001), no obstante que por más de 20 años, muchos grupos de investigación de diferentes países, han concentrado sus esfuerzos para combatir este terrible padecimiento (Orozco y Gariglio, 2000). En la década de los 80's se descubrió que el VPH se encuentra en 99.7 % de los tumores cervicales (Ver figura 1) y es un factor etiológico para el desarrollo del CaCu (Walboomers y cols. 1999; Bosch y cols. 2002).

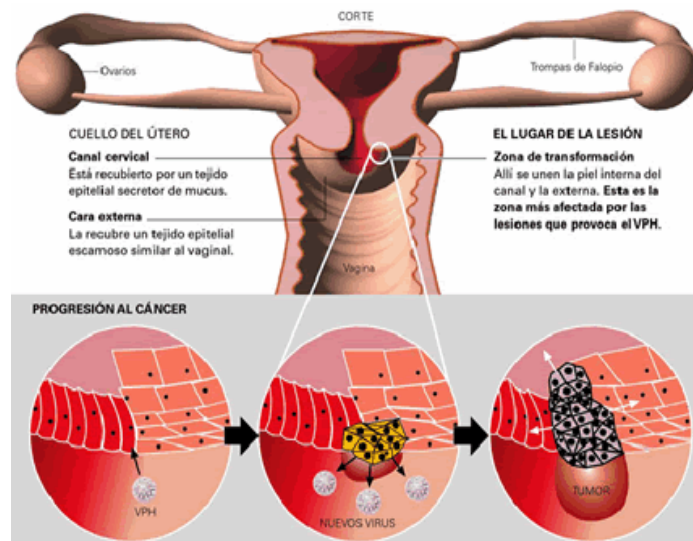


Figura 1.- Infección por VPH en el Cuello del Útero. La figura muestra el sitio donde se produce la infección por VPH y posteriormente el CaCu, tomada de MSD (www.msd.com.ar/.../press/hpv/noticia1.html).

GENOMA DEL VPH.

El VPH es un virus de doble cadena de DNA circular, con cápside icosaohédrica de aproximadamente 55 nm de diámetro, que infecta las capas basales del epitelio y mucosas (Ver figuras 1 y 4), su genoma está formado por aproximadamente 7900 pares de bases y codifica dos grupos de genes: Los genes de transcripción temprana (E) los cuales, son expresados durante todo el ciclo viral: E1 y E2 que controlan la replicación del DNA y la expresión de los genes virales; E5, E6 y E7 que controlan el crecimiento y transformación celular (Baker y cols. 1991; Howley y Knipe 1996; Garnett y cols. 2006; Kim y cols. 2006). El genoma del VPH consta de una región que precede a los genes tempranos llamada región larga de control ó RLC, y contiene secuencias promotoras y potenciadoras de la transcripción, así como secuencias que controlan el inicio de la replicación. El otro grupo de genes son los de transcripción tardía (L) L1 y L2, que codifican a la proteína mayor L1 y la proteína menor L2 respectivamente. Ambas proteínas forman la cápside del VPH (Ver figura 2), y son expresadas en la fase productiva (Doorbar y cols. 1987; Roden y cols. 1997; Zur Hausen 1999; Kammer y cols. 2000; Longworth y cols. 2004, Doorbar y cols. 2005). El virión del VPH está formado por 72 pentámeros de la proteína L1 (Ver figura 2), la cual se encuentra en mayor proporción (30:1), que la proteína interna L2 (Kirnbauer y cols. 1993).

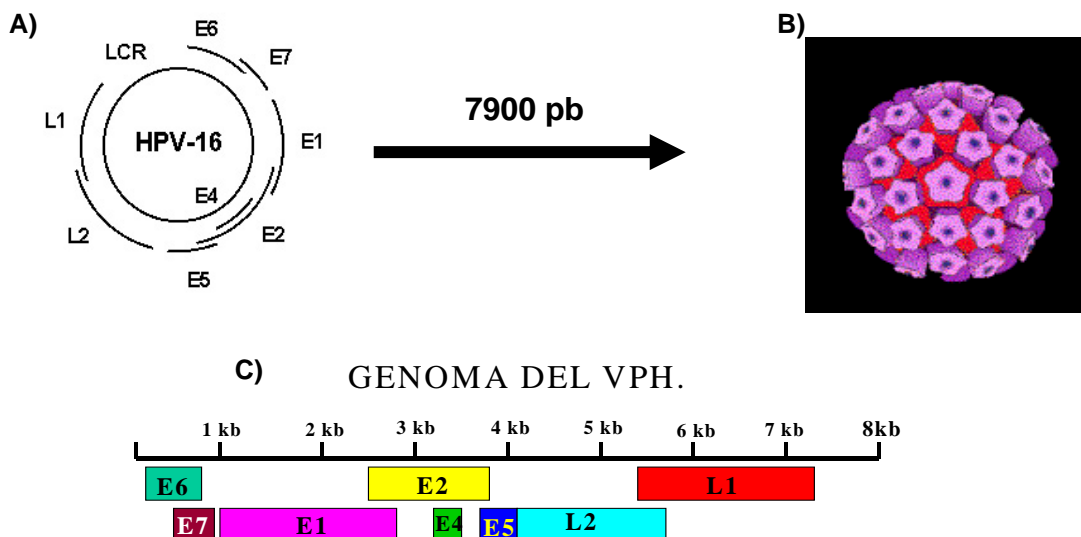


Figura 2.- Cápside y Genoma del VPH. La figura muestra el genoma del VPH (A), la cápside del VPH (B) y el genoma del VPH de manera lineal (C). Imágenes tomadas y modificadas de: www.microbiologybytes.com/virology/Papillomav., journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/E., www.medscape.com/viewarticle/408860 1995, Linda M. Stannard.

CLASIFICACIÓN DE LOS VPH's.

Debido a la gran diversidad de tipos de VPH que existen se clasifican en: Tipos, sub-tipos, variantes y subclases.

Tipo: Se define como aquel cuya secuencia nucleotídica varía más del 10 % respecto del tipo de referencia.

Subtipo: Cuando su secuencia nucleotídica difieren del 2 al 10 % respecto del tipo de referencia.

Variante: Cuando difiere del 2 al 0.5% en su secuencia nucleotídica.

Subclases: Cuando difieren en menos del 0.5 % de su genoma.

Generalmente para establecer estas diferencias se analizan las regiones de los genes E6 y L1 por ser regiones altamente conservadas (Yamada y cols. 1995; 1997; De Villers 2004). La proteína L1 tiene más del 65% de homología entre varios tipos virales de alta frecuencia, como el 6, 16, 31, 35, entre otros (Di bonito y cols. 2006).

Actualmente se sabe que existen más de 100 tipos de Virus de Papiloma, más un número mayor de variantes y subclases, todos ellos se agrupan en la familia Papillomaviridae, pero solo alrededor de 40 tipos de VPH se han detectado en el tracto genital humano (Terai y cols. 2001; Castellsague y cols. 2006). El tipo de VPH mas frecuente en pacientes con CaCu es el tipo 16 (VPH16), se encuentra aproximadamente en la mitad de los casos de CaCu en el mundo (Bosch y cols. 1995).

Por su asociación con el cáncer, los tipos de VPH se pueden clasificar en dos grandes grupos:

A).- Los de bajo riesgo oncogénico: Aquellos tipos virales que son poco frecuentes en tumores y que es poco probable favorezcan el desarrollo de cáncer, como son los tipos: 6, 11,34, 42, 43, y 44.

B).- Los de alto riesgo oncogénico: Aquellos tipos virales que frecuentemente se encuentran en tumores, y que es mas probable favorezcan el desarrollo de cáncer, como lo son los tipos: 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 58, y 59 entre otros (Zur Hausen 2000; Bosch y cols. 2002).

VARIANTES ONCOGENICAS DEL VPH TIPO 16 DE ALTA PREVALENCIA EN MEXICO.

El VPH16 tiene 5 grandes variantes distribuidas de diferente manera en todo el mundo (Yamada y cols. 1997) y se ha descrito en la bibliografía que algunas variantes son más oncogénicas que otras (Bergeron y cols. 1992; Bosch y cols. 1995; Lizano y cols. 1997; Casa y cols. 1999; Kamer y cols. 2000; Berumen y cols. 2001; Hildesheim y cols. 2001). En México (Ver figura 3), aproximadamente el 25 % de las mujeres con CaCu presentan la variante Asiático Americana (AA) del VPH16 (VPH16AA) (Berumen y cols. 2001), cifra mucho mayor que la reportada en otras regiones del mundo, como Centro y Sudamérica (20%), Europa (14%) y Asia (5.7%) (Yamada y cols. 1997). Se ha encontrado que las mujeres infectadas con la variante AA tienen un riesgo 9 veces mayor de desarrollar CaCu que las mujeres infectadas con la variante europea del VPH16 (VPH16E), y se ha detectado que la variante VPH16AA es mas frecuente en adenocarcinomas, que en cáncer cervical escamoso (Lizano y cols. 1997; Villa y cols. 2000; Berumen y cols. 2001; Lizano y cols. 2006; Rabelo-Santos y cols. 2006). Además la variante AA es muy poco frecuente en comparación con la variante E en mujeres sanas (Berumen y cols. 2001; Lizano y cols. 2006).

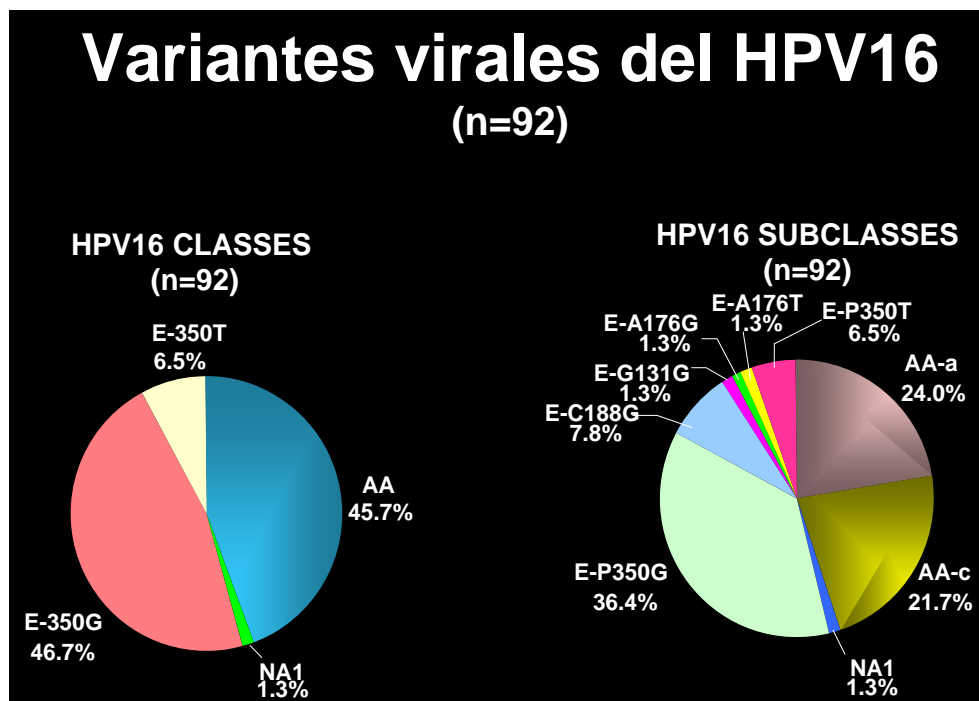


Figura 3.- Proporción de Variantes del VPH 16 en México. La figura muestra el porcentaje en el que se encuentran las diferentes subclases del VPH 16 en la población mexicana (Berumen 2003).

También se ha descrito que la actividad del promotor p97, el cual regula la transcripción de los oncogénos E6 y E7, es 1.7 veces mayor en la subclase AA-a y 3.3 veces mayor en la subclase AA-c en comparación con el virus E de referencia, sugiriendo una mayor expresión de oncogenes virales (Veress y cols. 1999; Kammer y cols. 2000). Otros artículos mencionan que el número de copias de DNA de la variante AA es mayor que el de la variante E en carcinoma cervical, sugiriendo que la variante AA tiene una mayor replicación (Casas y cols. 1999) y que la expresión de los oncogenes en la variante AA inicia en una etapa mas temprana que en la variante E, debido a fallas en la represión de la transcripción de los oncogenes E6 y E7, por parte del gen E2 de la variante AA, ya que durante la integración del ADN viral, el gen E2 es destruido (Ordóñez y cols. 2004). No obstante que la variante E se encuentra en el 48% de los casos de CaCu positivos para el VPH16, el 47% corresponde a la variante AA (Ver figura 3) y dos sub-clases de esta variante son muy frecuentes en México:

1).- La sub-clase asiático americana (AA-a), la cual se encuentra en el 25% de las mujeres mexicanas con VPH16 (Berumen y cols. 2001), y de la cual se conoce el genoma completo (Terai y Buró, 2003).

2).- La sub-clase asiático americana c (AA-c), la cual se encuentra en el 22% de las mujeres mexicanas con VPH16 (Berumen y cols. 2001) y que es poco frecuente en Centro y Sudamérica (4.4%), Europa (2%) y no se ha detectado en el Sudeste de Asia (Yamada y cols. 1997, Tonon y cols. 2007), tal vez por ello, solo se conoce la secuencia completa del gen E2 (Casas y cols. 1999), y no se conoce la secuencia del resto de su genoma.

Algunos autores sugieren que el grado en que una variante o tipo del VPH-16 se asocia con una enfermedad puede deberse a diferencias en el genoma viral (Tu y cols. 2006; Ndisang y cols. 2006; Sichero y cols. 2007, Yang y cols. 2007). En diversos protocolos de investigación se ha encontrado que menos del 5% de las infecciones por VPH de alto riesgo se desarrollan a neoplasia intraepitelial cervical (NIC) y solo entre el 10-20 % de los NIC progresan a carcinoma invasivo, indicando que factores virales y no virales, están involucrados en la infección, desarrollo de la lesión por VPH y su progresión a cáncer (Zur Hausen, 1996; Burd EM, 2003). Estos datos sugieren que la alta incidencia de CaCu en México pudiera estar asociada a la alta frecuencia de variantes virales consideradas

altamente oncogénicas, por lo que resulta muy importante el estudio de estas variantes para el desarrollo de tratamientos adecuados y efectivos para la población mexicana.

Otros autores han sugerido que las características genéticas de la población mexicana pueden estar relacionadas con la alta frecuencia de la variante AA-c en México (Ho y cols. 1993; Casas y cols. 1999) y que el componente genético influye en la habilidad del hospedero para responder inmunológicamente a un epítoto viral específico codificado por una variante, por ejemplo: Algunos alelos del HLA son más eficientes que otros para presentar el virus y ser reconocidos por el sistema inmunológico (Wank y Thomssen, 1991; Wank y cols. 1991; Hildesheim y cols. 2001; Beskow y cols. 2005; Zoodsma y cols. 2005; Chan y cols. 2007). También se sabe que el polimorfismo de P53 varía en diferentes poblaciones, y está relacionado a la progresión de la infección por VPH (Baseman y Koutsky, 2005; Bhattacharya y cols. 2005). Por lo anterior, el conocimiento del genoma humano, permitirá conocer mejor la influencia del componente genético en la progresión de la infección por VPH a cáncer.

RESPUESTA INMUNE CONTRA EL VPH.

El sistema inmune es capaz de reconocer epítotos de la proteína L1 del VPH presentes en la superficie de la cápside viral (Kirnbauer y cols. 1992; Heino y cols. 1995; Leiserowitz y cols. 1997; Kawana y cols. 1999; Roden y cols. 2000; Combata y cols. 2002; Monroy y cols. 2002; Carter y cols. 2003), montando una fuerte respuesta inmune serológica, tipo específica, contra epítotos de la cápside del VPH (Roden y cols. 1996; Touzé y cols. 1998). Los anticuerpos específicos para la proteína L1 del VPH16 se desarrollan 4 meses después de la primera infección, y persisten por muchos años (Carter y cols. 1996, 2000; Wang y cols. 1997; Schiller y cols. 1999). En diferentes estudios donde se investigó la presencia de anticuerpos contra la proteína L1 del VPH16 en pacientes con infección por VPH16 y diferentes grados de NIC y CaCu, se observó que la cantidad de anticuerpos aumenta con la gravedad de la enfermedad, pero decae en pacientes con CaCu (Ver figura 4), no obstante estos últimos presentaron anticuerpos contra la proteína L1 del VPH16 (Le Cann y cols. 1995; Wideroff y cols. 1995; Sasagawa y cols. 1996; De Grujil y cols. 1997; Luxton y cols. 1997; Kim y cols. 1999; Marais y cols. 2000; Combata y cols. 2002; Rocha y cols. 2004).

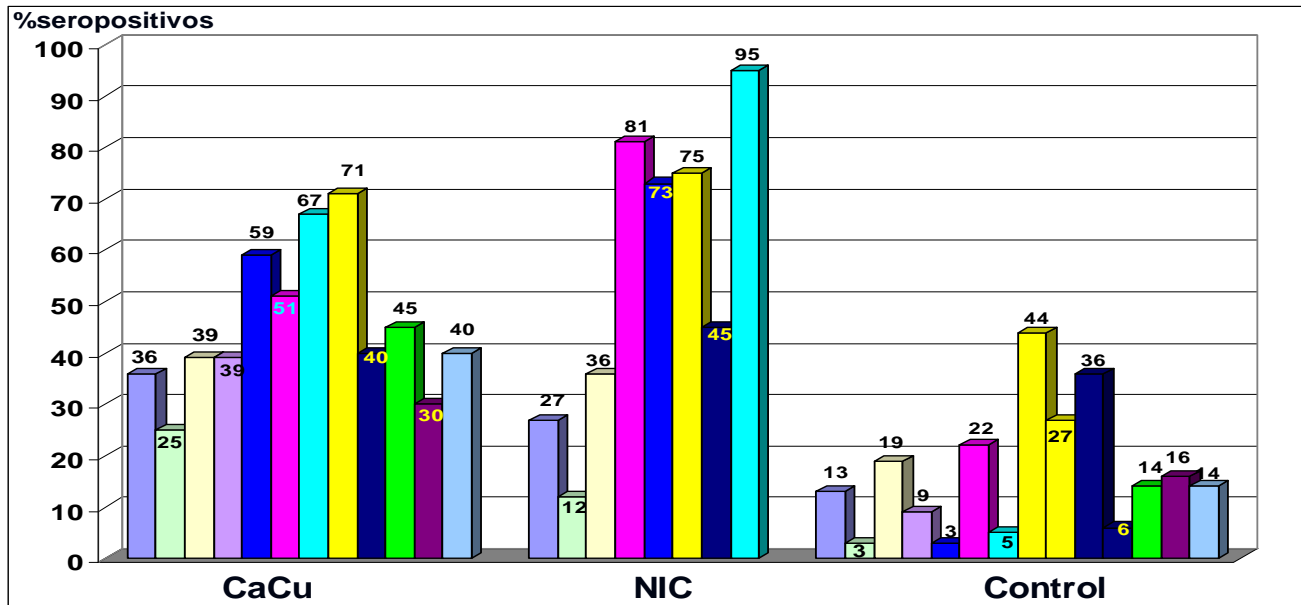


Figura 4.- Seropositividad y desarrollo de CaCu. La figura muestra el porcentaje de seropositividad encontrada en el suero de grupos de mujeres con CaCu (CaCu), mujeres con lesiones causadas por infección de VPH16 (NIC) y mujeres control (Control), descrita en los diferentes artículos arriba mencionados.

No obstante que solo alrededor de la mitad de las mujeres con infección por VPH desarrolla niveles detectables de anticuerpos VPH específicos (Carter y cols. 2000; Di Bonito y cols. 2006), en la lucha contra la infección del VPH resalta el papel de las IgA que se producen en la superficie de mucosas y previene la ocurrencia de la infección, y de las IgG las cuales son la clase de anticuerpo más importante para la neutralización directa de las partículas virales en suero y otros líquidos corporales.

En un estudio realizado en mujeres cuyo resultado de la prueba Papanicolau fue anormal y que presentaban VPH16, el 50% de ellas, fueron seropositivas para la proteína L1 desnaturalizada, lo cual sugiere que esta proteína tiene epítopes lineares reconocidos por anticuerpos neutralizantes, los cuales podrían ser usados para detectar anticuerpos contra el VPH (Di Bonito y cols. 2006). También se ha descrito que si bien algunos epítopes inmunogénicos son dependientes de la conformación de la proteína, algunos de los anticuerpos generados contra la proteína en su forma nativa, son capaces de reconocer la secuencia lineal específica, lo cual hace posible la detección serológica de la infección por VPH (Dillner y cols. 1990). Por otra parte se ha descrito la existencia de epítopes lineales de la proteína L1 del VPH16 (Christensen y cols. 1996; Wang y cols. 1997; White y cols 1999), tipo específicos (Roden y cols. 1996), algunos de los cuales inducen la generación de anticuerpos neutralizantes (Combita y cols. 2002).

VARIACIONES GENICAS DE LA PROTEÍNA L1 Y VACUNAS BASADAS EN PARTÍCULAS SEMEJANTES AL VIRUS DEL VPH.

Aprovechando la capacidad de la proteína L1 del VPH, de auto ensamblarse en partículas morfológicamente semejantes al virus o VLP's (Virus Like Particles), como las que se pueden observar en la figura 5, las cuales tienen el tamaño y los epítopes de la cápside de un virión (Kirnbauer y cols. 1992, 1993; Sasagawa y cols. 1995; Chen y cols. 2000; Combita y cols. 2002), pero ausencia de DNA viral por lo que no infectan ni producen transformación celular (Zhou y cols. 1991). En los últimos años se han empleado estas VLP's, para inmunizar animales y generar protección contra el VPH, produciendo gran cantidad de anticuerpos neutralizantes tipo específicos (Kirn Bauer y cols. 1992; Christensen y cols. 1994; Breitburd y cols. 1995; Suzich y cols. 1995; Roden y cols. 1996; Unckell y cols. 1997).

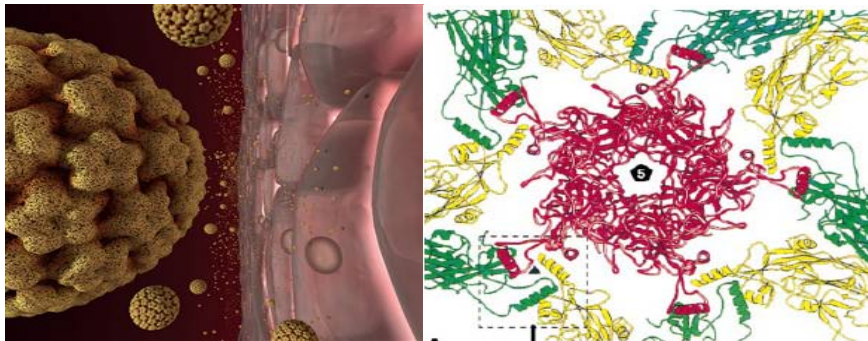


Figura 5.- Cápside de VPH y uniones inter-pentámeros. En la figura de la izquierda, se pueden observar viriones del VPH a punto de infectar una célula. (Tomada de <http://www.youngwomenshealth.org/hpv.html>). La figura de la derecha muestra las uniones inter-pentámeros de la cápside del VPH (Tomada de Chen y cols. 2000).

Se ha demostrado que la vacunación de humanos con VLP's de VPH, genera altos niveles de anticuerpos IgG e IgA neutralizantes contra la proteína L1 del VPH capaces de proteger contra este virus (Schiller y cols. 1999; White y cols. 1999; Brown y cols. 2001; Harro y cols. 2001; Poland y cols. 2005; Koutsky y cols. 2002). Por lo cual en los últimos meses, en algunos países se han puesto a la venta dos vacunas contra el VPH, ambas están hechas con VLP's formadas por la proteína L1, una vacuna bivalente que contiene VLP's del VPH-16 y 18 (Glaxo Smith Kline 2007), y la otra es una vacuna cuadrivalente formada por VLP's de los VPH 6, 11, 16, y 18 (Merck 2007), todas derivadas de variantes europeas.

Teniendo en cuenta que el principal objetivo de las vacunas contra el VPH, basadas en VLP's, es inducir una respuesta inmune que proteja contra este virus, a través de la

presentación de epítopes que induzcan la generación de anticuerpos neutralizantes. Es importante considerar que debido a la especificidad de la protección (Christensen 1994, Roden y cols. 1996; White y cols 1999; Koutsky y cols. 2002), es necesario conocer y tener en cuenta las variantes virales presentes en cada región geográfica y en diferentes poblaciones, ya que varios trabajos de investigación sugieren que las mutaciones puntuales en la proteína L1 del VPH (Ver Figura 6), pueden afectar la función de una proteína (Lichtig y cols. 2006; Yang y cols. 2005) y el reconocimiento por parte de los anticuerpos neutralizantes (Ludmerer y cols. 1996; Chen y cols 2000).

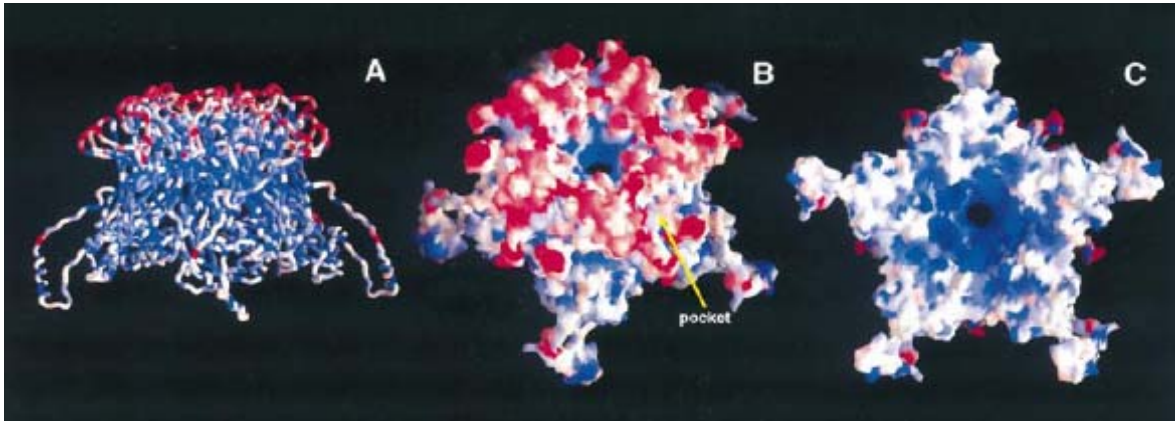


Figura 6.- Distribución de las Variaciones en la secuencia de la proteína L1 de 49 tipos de VPH. En la figura se muestra un pentámero visto lateralmente (A), desde arriba (B), y desde abajo (C), en color rojo las posiciones altamente variables, las posiciones altamente conservadas en azul, y en blanco posiciones de variación intermedia (Chen y cols. 2000).

White y cols. han descrito que el reconocimiento y neutralización del VPH16 por parte del anticuerpo monoclonal neutralizante tipo específico H16:V5 (Christensen y cols. 1996; Roden y cols. 1997; Wang y cols, 1997; Chen y cols. 2000), se ve afectado por el cambio de un aminoácido en la secuencia de la proteína L1 que reconoce (White y cols. 1999), Caso similar ocurre con el anticuerpo monoclonal neutralizante tipo específico H16:E70 (Roden y cols. 1997; Combata y cols. 2002), respecto del cual se ha descrito que el cambio A266T en la secuencia que reconoce, reduce casi a la mitad, el reconocimiento y la neutralización por parte de este anticuerpo (Varsani y cols. 2006). Por su parte Roden y cols. han descrito que el anticuerpo H16:E70, es capaz de neutralizar la cápside del VPH16 E (114K), pero no la del VPH16 Africano 2 (Z-1194) (Roden y cols. 1997). Se sabe que la mutación del aminoácido F en la posición 50, afecta la unión tanto del anticuerpo H16:V5, como del anticuerpo H16:E70 (White y cols. 1999). En un estudio en la población mexicana se describe, que el cambio de un solo aminoácido en la secuencia de un péptido altera considerablemente el reconocimiento de este péptido por parte del sistema inmune (Monroy

y cols. 2002). Por su parte la mutación L152F ocasiona la pérdida del reconocimiento y la actividad neutralizante del anticuerpo monoclonal HPV-16.123 (Combita y cols. 2002). También se a descrito que la mutación C428G ocasiona cambio en la estructura de la VLP que se forma, sin afectar la antigenicidad (Varsani y cols. 2006). Uno de los mas importantes cambios que se han descrito, es el de la mutación H228D, en la proteína L1 del VPH16 E de referencia, el cual aumenta 1000 veces la capacidad de la proteína para formar VLP`s (Kirnbauer y cols. 1993).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Se ha descrito en la bibliografía que la protección inmune humoral contra un tipo de VPH no protege de la infección por otro tipo de VPH (Matsumoto y cols. 2003; Clifford y cols. 2005; Varsani y cols. 2006), y que esta protección puede fallar debido a variaciones en la secuencia de la proteína L1 (Kirnbauer y cols. 1993; Ludemeree y cols. 1996; Monroy y cols. 2002; Lichtig y cols. 2006). Considerando que se han descrito al menos 25 mutaciones en el gen L1 del VPH16 AA-a, 9 de las cuales ocasionan cambio en el aminoácido (Yamada y cols, 1997), y que la mayoría de estas caen dentro de epítopes humorales identificados en la proteína L1 del virus Europeo (Ver tabla 5). Es posible que las mutaciones en la proteína L1 del VPH16 AA-a y AA-c, afecten el reconocimiento por parte de los anticuerpos generados contra la proteína L1 del VPH16 E, lo cual implicaría que la respuesta inmunológica inducida por los VLP's del VPH16 E no necesariamente, conferirá protección contra el VPH16 AA.

Por otro lado, no existen reportes de estudios acerca de la presencia de anticuerpos contra la proteína L1 del VPH16 AA-a o VPH16 AA-c, de esta última, ni siquiera se conoce la secuencia completa de su proteína L1. Son muy pocos los estudios entorno a las subclases de VPH16 AA de alta frecuencia en México (Berumen y cols. 2001). Por lo que no es claro si una vacuna basada en VLP's del VPH16 Europeo protegerá contra la infección del VPH16 Asiático-Americano, el cual es muy frecuente (25%) en la población mexicana.

HIPÓTESIS.

Las variaciones en la secuencia del gen L1 del VPH16 AA-a y del VPH16 AA-c, respecto del gen L1 del VPH16 Europeo, afectan el reconocimiento por parte de los anticuerpos generados contra la proteína L1 del VPH 16 Europeo.

OBJETIVO.

Determinar si las variaciones en la secuencia del gene L1 del VPH 16 AA, afecta el reconocimiento por parte de los anticuerpos generados contra la proteína L1 del VPH 16 E, en pacientes con CaCu.

OBJETIVOS SECUNDARIOS.

- 1.- Aislar y obtener la secuencia completa del gene L1 del VPH16 AA-c.
- 2.- Determinar si existe diferencia entre la secuencia del gene L1 de la subclase AA-a del VPH16 y la secuencia del gen L1 de la subclase AA-c del VPH16.
- 3.- Determinar el efecto estructural de las mutaciones en las secuencias del gen L1 del VPH16 AA-a y AA-c respecto de la secuencia del gen L1 del VPH16 E.
- 4.- Determinar si existe diferencia en el reconocimiento de péptidos derivados de la proteína L1 del VPH16 E y de péptidos derivados de la proteína L1 del VPH16 AA-a y AA-c, por parte de los anticuerpos inducidos contra el VPH16 E.
- 5.- Determinar si existe diferencia en el reconocimiento de péptidos derivados de la proteína L1 del VPH16 E y de péptidos derivados de la proteína L1 del VPH16 AA-a y AA-c por parte de los anticuerpos inducidos contra el VPH16 AA.

MÉTODO.

OBTENCIÓN DE MUESTRAS.

En este estudio se incluyeron 37 casos de mujeres con CaCu, 4 NIC y 20 mujeres sanas (Control). El grupo de mujeres con CaCu, NIC y mujeres control forman parte de una muestra mayor de un estudio en el que se analizaron los tipos y variantes de los VPH's en muestras de exudado cervical de 503 mujeres con CaCu, 30 mujeres con NIC y 357 mujeres colposcópicamente sanas. Estas muestras fueron colectadas durante el periodo 2004-2005, las mujeres con CaCu de la consulta de ginecología oncológica y las mujeres con NIC y controles de la clínica de colposcopia del servicio de oncología del Hospital General de México (H. G. M.). La detección y tipificación de los tipos y variantes virales, se realizó como se ha descrito previamente en la literatura (Berumen y cols. 2001). Las muestras de mujeres con CaCu, NIC y la mitad de las muestras control, seleccionadas para este estudio incluyeron solo casos positivos para el VPH16 (18 para la variante AA y 19 para la variante E). La otra mitad de las muestras control, fueron positivas para cualquier VPH. A todas las mujeres incluidas en este estudio se les tomaron 8 ml de sangre periférica utilizando un tubo vacutainer con anticoagulante (ACD) (Becton Dickinson, USA).

También se incluyeron 20 sueros de niños menores de 8 años que acudieron a consulta externa de pediatría por padecimientos no relacionados con el VPH, y que fueron analizados en el laboratorio de análisis clínicos como parte de los estudios de rutina para diagnóstico. De cada una de estas pacientes, se obtuvo el consentimiento por escrito para su inclusión en el estudio. A cada muestra, se le asignó una clave y un número ascendente (#): R# = Paciente con Cáncer, N# = Paciente con NIC, C# = Mujer sin lesión Genital (Control).

DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA SECUENCIAR EL GEN L1 DEL VPH16 AA-c.

A la par de la colecta de muestras para su análisis, se diseñaron oligonucleótidos que permitieran amplificar y secuenciar específicamente, el gen completo L1 del VPH16 AA-c; para ello se utilizó el programa de computadora "Primer Express" (Applied Biosystems Corporation 2001), y la información presente hasta ese momento en las bases de datos especializadas referente al VPH. Se diseñaron 12 oligonucleótidos los cuales se unen específicamente a la secuencia del gen L1 del VPH16 AA, aproximadamente cada 300 pb. Uno de estos primer (F5439) se une al gen L1, 120 pb río abajo y otro primer (R7290) se une 130 pb río arriba del gen L1, permitiendo amplificar el gen completo (Ver tabla 1).

INICIO	SECUENCIA	TÉRMINO	LARGO	T _m
F5439	CTTTTGGTGGTGCATACAATATTC	5462	26	57
F5559E	ATGCAGGTGACTTTTATTTACATCCT	5584	19	54
F5561	ATGGAGGTGACTTTTATTTACATCCT	5586	19	54
F5913	ATCCAGATACACAGCGGCT	5931	22	55
F6280	GGCTAACAAAAGTGAAGTTCCA	6301	19	54
F6583	AGCACAGGGCCACAATAAT	6601	22	54
F6829	TATTTTGGAGGACTGGAATTTT	6850	18	55
R5949	CCTACACAGGCCCAAACC	5932	22	55
R6301	TGGAACCTTCACTTTTGTAGCC	6280	19	54
R6601	ATTATTGTGGCCCTGTGCT	6583	20	54
R6947	TTCTTTAGGTGCTGGAGGTG	6928	26	57
R7156	TTACAGCTTACGTTTTTTGCGTTTAG	7131	24	56
R7290	GCATTTAAAAACACATACACACGTG	7266	24	57

Tabla 1.- Oligonucleótidos diseñados y utilizados para secuenciar el gene L1 del VPH16 AA.

AMPLIFICACIÓN DEL GEN L1 DEL VPH16 AA-c.

Una vez tipificado el tipo viral y la subclase presente en las biopsias de pacientes con cáncer, se seleccionaron 4 muestras que presentaban la subclase viral VPH16 AA-c, para cada una se realizó por separado el siguiente procedimiento: Primero se extrajo y cuantificó el ADN de células tumorales, y se preparó una alícuota de 20 µl de ADN a una concentración de 50 ng/µl, se tomaron 10 µl de esta alícuota y se realizó una PCR utilizando los oligonucleótidos: F5439 y R7290 (ver figura 7), diseñados específicamente para unirse río arriba y río abajo del gen L1 del VPH16 AA (Ver figura 8).

Del producto de la PCR se tomaron 2 µl y por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% a 100 volts, se visualizó la banda del gen L1 amplificada. El resto del producto de PCR se limpió con el “kit EXOSAP-IT”: En 1 vial de 0.2 ml para PCR debidamente etiquetado, se agregaron 2 µl de la enzima exosap-it y 5 µl del producto de la PCR (ADN amplificado con oligonucleótido). Se incubó en el termociclador 37°C por 15 min y a 80°C por 15 min, obteniendo el ADN libre de impurezas.

Mezcla de reacción utilizada en la PCR:			
Reactivo	Concentración en Mezcla		Volumen Final
Buffer para PCR	10x	1x	2.5 µl.
dNTPs	200 mM	200 µM	2.5 µl.
Oligo F5439AA	10 µM	1 µM	2.5 µl.
Oligo R7290	10 µM	1 µM	2.5 µl.
H2O			2.5 µl.
MgCl2	25 mM	2 mM	2 µl.
DNA	50 ng		10 µl.
Enzima			<u>0.5 µl.</u>
		Total	25 µl.

Condiciones de la PCR:			
	94 °C	120 Seg	
	94 °C	15 Seg	
	60 °C	30 Seg	30 ciclos
	72 °C	90 Seg	
	72 °C	420 Seg	

Figura 7.- Condiciones utilizadas en la PCR para amplificar el gen L1 del VPH16.

SECUENCIACIÓN DEL GEN L1 DEL VPH16 AA-c.

El ADN purificado fue sometido a una segunda PCR (Reacción de secuencia), con las condiciones mostradas en el figura 9, para esta PCR se utilizaron los 12 oligonucleótidos (un oligonucleótido por vial), especialmente diseñados para unirse al gen L1 del VPH16 AA (Ver figura 8). A los 5 µl del producto de la segunda PCR (reacción de secuencia) se agregaron 15 µl de agua inyectable, los 20 µl de la mezcla se agregaron en el centro de una

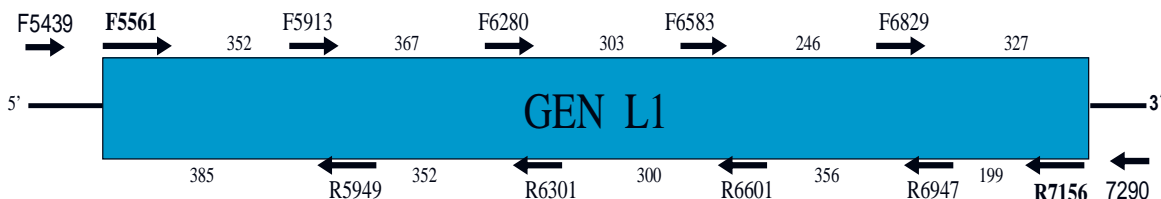


Figura 8. Ubicación de los sitios donde se unen los oligonucleótidos utilizados para secuenciar el gen L1 del VPH16 AA-c.

columna de resina sefadex de doble camisa debidamente hidratada (una columna por oligonucleótido), las columnas se centrifugaron 2 min a 2800 rpm, la camisa donde se encontraba la resina se desecho, el producto en el tubo inferior de la columna se centrifugó al vacío por 20 min, para eliminar toda el agua.

El ADN que se encontraba en la parte inferior del tubo, se resuspendió con 15 µl de formamida, y utilizando el Kit Big Day terminador V3.1 Cycle Sequencing Applied Biosystems (que incluye nucleótidos fluorescentes) y un secuenciador “ABI PRISM 310 genetic analyzer system” (Perkin-Elmer) se secuenció totalmente y en ambas direcciones el gen L1 del VPH16 AA-c, para cada una de las 4 muestras VPH16 AA-c. Los datos fueron analizados con el Software DNASIS (Hitachi Software Engineering Co., Japan).

Mezcla de Reacción de Secuencia:			
Reactivo			
1 µl del	Oligonucleótido	10 µM	
2 µl del	Reactivo para secuenciar	RR Big dye	
2 µl del	Producto de PCR	purificado por exosap-it	
Condiciones de la PCR:			
	96 °C	1 min	
	96 °C	30 min	
	50 °C	15 min	25 ciclos
	60 °C	3 min	

Figura 9.- Condiciones de la reacción de secuencia.

Como controles y de la misma forma se secuenció y analizaron los datos del gen L1 de una muestra que presentaba el VPH16 E y otra que presentaba el VPH16 AA-a, utilizando en cada caso oligonucleótidos específicos para cada Sub-clase del VPH16 (Ver tabla 1).

Una vez obtenida la secuencia completa del gen L1 del VPH16 AA-c, se comparó con las secuencias conocidas del VPH para determinar los sitios donde existe diferencia respecto a las secuencias nucleotídicas de las Subclases E y AA-a del VPH16, se extrapolaron a la proteína las mutaciones encontradas en el gen, para determinar los sitios donde existen mutaciones entre las proteínas L1 de las Subclases E, AA-a y AA-c del VPH16.

EFFECTO DE LAS MUTACIONES EN LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LA PROTEÍNA L1.

Para investigar si las mutaciones encontradas en la secuencia de la proteína L1 del VPH16 AA-a y AA-c, causan cambios en la estructura terciaria de la proteína L1, se utilizó el programa de modelaje por computadora swiss model disponible en Internet, y se sustituyeron los aminoácidos mutados en cada una de las subclases.

SÍNTESIS DE PÉPTIDOS DERIVADOS DE LA PROTEÍNA L1 DEL VPH16 E, AA-a y AA-c.

Una vez que se conocieron las mutaciones en la proteína L1 de las subclases E, AA-a y AA-c del VPH16, y después de una exhaustiva búsqueda bibliográfica, se seleccionaron y se mandaron a sintetizar a la compañía Washington Biotechnology, 4 péptidos de entre 14 y 20 a.a, derivados de la proteína L1 del VPH16 E que ya habían sido descritos por ser reconocidos por anticuerpos, y se les considera como epítopes fuertemente inmunológicos, tanto en su forma lineal (péptido) como en su forma conformacional (VLP's), y además incluyen en su secuencia al menos uno de los sitios donde se presenta mutación respecto de la secuencia L1 de la proteína del VPH16 AA (ver tabla 2).

Con la secuencia del VPH16 E ya probada como epítoto inmunológico, se sintetizaron los péptidos homólogos para el VPH16 AA, y solo en uno de los casos fue necesario sintetizar un péptido para la subclase AA-a y otro para la subclase AA-c. Además se seleccionaron dos péptidos con las mismas características que los anteriores pero que no incluyeran en su secuencia sitios de mutación respecto a las subclases AA-a o AA-c (Ver tabla 2), los péptidos liofilizados fueron reconstituidos con PBS a una concentración de 1 mg/ml.

Clave	VPH-16 Subclase	Secuencia (NH ₂ -COOH)	Posición	Referencia
1E	E	NKFGFPDTSFYNPDTQRLVW	107-126	<i>Dillner y cols, 1990.</i>
2E	E	QPLGVGISGHPLLNKLDDE	137-156	<i>Christensen y cols, 1996.</i>
3E	E	KGSPCTNVAVNP GDCPPLEL	197-216	<i>Heino y cols, 1995.</i>
4AAc	AAc	KGSPC N NVAVNP GDCPPLEL	197-216	
5AAa	AAa	KGSPC N NVAVTP GDCPPLEL	197-216	
6E	E	VHTGFGAMDFTTLQ	227-240	<i>Heino y cols, 1995.</i>
7AA	AA	V D TGFGAMDFTTLQ	227-240	
8E	E	FN RAGTVGENVPDDLYIKGS	287-306	<i>Bousarghin y cols, 2003.</i>
9AA	AA	FN RAG A VGENVPDDLYIKGS	287-306	
10E	E	GLKAKPKFTLGKRKATPTTS	499-518	<i>Cason y cols, 1992.</i>
11AA	AA	G F KAKPKFTLGKRKATPTTS	499-518	

Tabla 2.- Péptidos derivados de la proteína del VPH16 utilizados en los ELISAS. En la columna de la izquierda se especifica el nombre designado a cada péptido (Clave). La subclase del VPH16 a la cual pertenece cada péptido: Subclase Europea (E), Subclase Asiático-Americana-a (AA-a), Asiático-Americana-c (AA-c) y AA cuando la secuencia peptídica es la misma en las subclases AA-a y AA-c. Las mutaciones se encuentran resaltadas en la secuencia de cada péptido (columna central). También se muestra la posición en la proteína y la referencia bibliográfica.

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS CONTRA PÉPTIDOS DE LA PROTEÍNA L1 DEL VPH-16 E, AA-A Y AA-C A TRAVÉS DE LA TÉCNICA DE ENSAYO INMUNO ABSORBENTE LIGADO A ENZIMAS (ELISA).

Los péptidos derivados del VPH se fijaron por triplicado en una placa para ELISA de 96 pozos a una concentración de 1 µg en 100 µl por pozo, de solución de carbonato-bicarbonato la cual se uso como amortiguadora. Como controles de especificidad, se colocaron tres pozos solo con solución de bloqueo (Leche sin grasa al 1% en TBS-Tween 20) y como control positivo, se colocaron tres pozos con un péptido de Nucleoproteína de influenza (ASNENMETM) a la misma concentración que los péptidos de VPH. Se incubó la placa durante 2 horas a 37 °C, y luego durante toda la noche a una temperatura de 4 °C.

Pasado este tiempo se realizaron 4 lavados a la placa, con 200 µl de TBS-Tween 20. Después se agregaron 200 µl por pozo de solución de bloqueo y se incubó la placa por 2 horas a 37°C, cubriéndola de la luz. Terminado el período de incubación se realizaron 4 lavados con TBS Tween 20, se colocaron los sueros de las pacientes diluidos 1:100 en solución de bloqueo. La placa se incubó por 2 horas a 37°C, y se realizaron 4 lavados con TBS-Tween 20, se adicionaron 100 µl del anticuerpo secundario anti IgG humano acoplado

a fosfatasa alcalina, diluido 1:500 en solución de bloqueo, se incubó por 2 horas a 37°C. Se lavaron los pozos 6 veces con TBS-Tween 20 y a cada pozo se adicionaron 100 µl de solución de sustrato específico para la fosfatasa alcalina (Dietalonamina-Avidina fosfatasa). Se incubó la placa a 37°C por 30 min protegiéndola de la luz. Posteriormente se leyó la placa en un lector de ELISA (Molecular Devices) a una longitud de onda de 405 nm, la placa se incubó nuevamente, el proceso se repitió a intervalos de 30 min, hasta completar 1.5 horas. Para cada péptido se determinó el punto de corte de seropositividad, en base al promedio más tres desviaciones estándar de la absorbancia obtenida con el grupo control (Niños), no se consideraron para determinar el punto de corte aquellos valores fuera del rango (out-liers).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los datos obtenidos fueron analizados utilizando los programas estadísticos Sigma stat 3.0 y Excel, se compararon: Los valores promedio, la desviación estándar, y la t de student, entre los diferentes grupos.

Los valores de seropositividad se compararon, en tablas de contingencia (r x c) y se analizaron por la prueba de Chi cuadrada con corrección de Yates. Se consideró significativo un valor de $p \leq 0.05$, e intervalos de confianza (I.C.) del 95% en todas las pruebas.

RESULTADOS.

OBTENCIÓN DE LA SECUENCIA COMPLETA DEL GEN L1 DEL VPH16 AA-c.

De las muestras de pacientes con CaCu positivas para el VPH16 AA, se seleccionaron al azar, seis biopsias de diferentes pacientes, cuatro positivas para el VPH16 AA-c (R52, R64, R59, R101) para secuenciar el gen L1 completo, una positiva para el VPH16 AA-a (R221) y una positiva para el VPH16 E (R47), las dos últimas se usaron como controles para comparar las secuencias. De estas biopsias se amplificó el gen L1 con oligonucleótidos externos y se secuenciaron ambas hebras del gen completo (1593 pb) utilizando los oligonucleótidos externos y 5 oligonucleótidos internos por cada hebra, como se describe en materiales y métodos (Ver tabla 1).

Cada oligonucleótido permitió secuenciar un fragmento aproximado de 350 pares de bases del gen L1 (Ver figura 8), cada fragmento se analizó y comparó con la secuencia del gen L1 E de referencia y la secuencia del gen L1 AA-a, disponibles en el Gene Bank con los números de acceso K02718 y AF402678, respectivamente. De cada una de las muestras analizadas, se acoplaron las secuencias obtenidas con cada oligonucleótido, para formar la secuencia completa de ambas cadenas de ADN del gen L1 del VPH16 AA-c, cuya secuencia completa se envió y se encuentra disponible en el Gene Bank (DQ680078).

Se identificaron las mutaciones de la secuencia génica para cada una de las muestras analizadas y se encontró que la secuencia del gen L1 del VPH16 AA-c presenta 19 mutaciones (1.19%) idénticas en las 4 muestras analizadas respecto del gen L1 del VPH16 E (Ver Tabla 3). Seis de ellas (31.6%) son mutaciones por transversión (Purina x Pirimidina), y el resto (68.4%) son mutaciones por transición (Purina x Purina).

La secuencia del gen L1 de la muestra R221 positiva para el VPH16 AA-a presentó 18 mutaciones (1.12%) respecto del VPH16 E, las cuales coinciden con las mutaciones reportadas para el VPH16 AA-a en el Gene Bank (AF02678), esta última presenta además una mutación más, no encontrada en nuestro estudio (6372, TxC) (Ver tabla 3). Esta

mutación ha sido descrita como poco frecuente entre las variantes, pero se encuentra en la secuencia del VPH16 AA-a de referencia (Yamada y cols. 1997).

Quince de las mutaciones en el gen AA-a (63.15%) son mutaciones por transición, es decir una purina cambia por una purina (A-G) o una pirimidina cambia por una pirimidina (C-T). El resto son mutaciones por transversión (36.8%), es decir una purina cambia por una pirimidina o viceversa. La secuencia en el gen L1 de las 2 variantes AA, varía en 6 posiciones (0.37% del gen), 3 de las cuales son mutaciones por transversión, estas últimas son más comunes en la naturaleza.

A)	5	5	5	5	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	7			
	5	6	8	9	0	1	1	2	2	3	3	4	5	6	7	8	8	8	8	9	9	0	
	6	9	6	0	2	6	7	4	4	1	7	3	5	9	1	0	5	6	6	6	9	5	
NUCLEOTIDO	2	6	2	9	3	3	8	0	5	4	2	2	7	3	9	1	2	0	3	8	2	8	
EUROPEO	C	G	C	T	A	C	A	C	T	A	T	A	C	A	G	A	C	T	C	C	G	G	
AA-a	G	A	T	C	-	A	C	G	C	-	C	G	T	C	A	T	T	-	T	T	A	T	
AA-c	G	A	T	C	C	A	-	G	C	G	-	G	T	C	A	-	T	C	T	T	A	T	
B)																							
				1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	4	4	4	4	4	4	5
			4	0	1	5	0	0	2	2	5	7	9	3	7	8	1	3	3	3	6	7	0
AMINOACIDO	2	6	2	7	5	2	7	8	9	2	2	2	3	9	7	5	2	4	5	9	7	0	
EUROPEO	Q	K	H	Y	T	T	N	H	T	T	L	T	F	T	K	T	L	P	P	Y	K	L	
AA-a	E	-	Y	-	-	N	T	D	-	-	-	A	-	P	-	S	-	-	-	-	-	F	
AA-c	E	-	Y	-	-	N	-	D	-	-	-	A	-	P	-	-	-	-	-	-	-	F	

Tabla 3.- Comparación de las secuencias del gen (A) y la proteína (B) L1 de los virus VPH16 E, AA-a y AA-c. En el lado izquierdo se muestra la sub-clase a la que corresponden y la muestra de la que provienen, y en la parte superior la posición dentro del gen. En negro se muestran las secuencias disponibles en el Gen Bank, las otras secuencias corresponden a cada una de las muestras secuenciadas provenientes de pacientes con VPH16. Las secuencias del gen L1 del VPH16 AA-c, de las cuatro muestras positivas a este virus, fueron 100% iguales por lo que en la tabla, solo se muestra una secuencia.

Por otro lado, la secuencia del gen L1 obtenida de la muestra positiva para el VPH16 E (R47) secuenciada como control, presentó dos mutaciones, respecto de la secuencia E de referencia presente en el Gene Bank (K02718). En el nucleótido 6240, el cambio CxG, causa la mutación del aminoácido histidina en la posición 228, por un ácido aspártico (H228D); La otra mutación ocurre en el nucleótido 6432, AxG la cual no causa cambio en la proteína (Ver tabla 3).

MUTACIONES EN LA PROTEINA L1 DEL VPH 16 AA-c.

De las 19 mutaciones encontradas en el gen L1 del VPH16 AA-c, siete causan cambio en la secuencia de la proteína, es decir la proteína L1 del VPH16 AA-c difiere en siete aminoácidos respecto de la proteína VPH16 de referencia de 531 aminoácidos (K02718). La secuencia de la proteína L1 del VPH16 AA-a (AF02678) difiere en 9 aminoácidos de la proteína L1 del VPH16 de referencia, dos aminoácidos más respecto de la proteína L1 del VPH16 AA-c (DQ680078) (Ver tabla 3 y figura 10).

El cambio mas drástico es el de un aminoácido básico (H) que cambia por un aminoácido ácido (D), en la posición 228, lo cual genera un cambio radical en la carga neta de esta posición de la proteína. Además un aminoácido polar sin carga (Q), cambia por un aminoácido de carácter ácido (E), en la posición 2, generando también un cambio de carga neta (Ver figura 10).

Un aminoácido básico (H) cambia por uno polar sin carga neta (Y), en la posición 102, cambiando aunque no tan drásticamente la carga neta en esta posición. Dos aminoácidos polares sin carga neta (T), en las posiciones 292 y 379, cambian por dos aminoácidos no polares (A y P) y de tamaños muy diferentes (Ver figura 10).

En tres de las mutaciones, aminoácidos polares sin carga neta cambian por aminoácido también polares sin carga (T202N, N207T, T415S), siendo mutaciones equivalentes en cuanto a la carga neta, dos de las cuales corresponden a los dos aminoácidos mutados en el virus AA-a pero no en el AA-c (Ver tabla 3), y en la mutación L500F, ambos aminoácidos son no polares (Ver figura 10).

Estas mutaciones se distribuyen en diferentes regiones de la proteína L1, desde el extremo amino, hasta el extremo carboxilo, y se localizan tanto en regiones que forman hojas beta, como en regiones que forman alfa hélices e interesantemente, 5 de la 9 mutaciones, se localizan en asas conectoras, 4 de ellas se localizan en la región del aminoácido 202 al 292 (Ver figura 10).

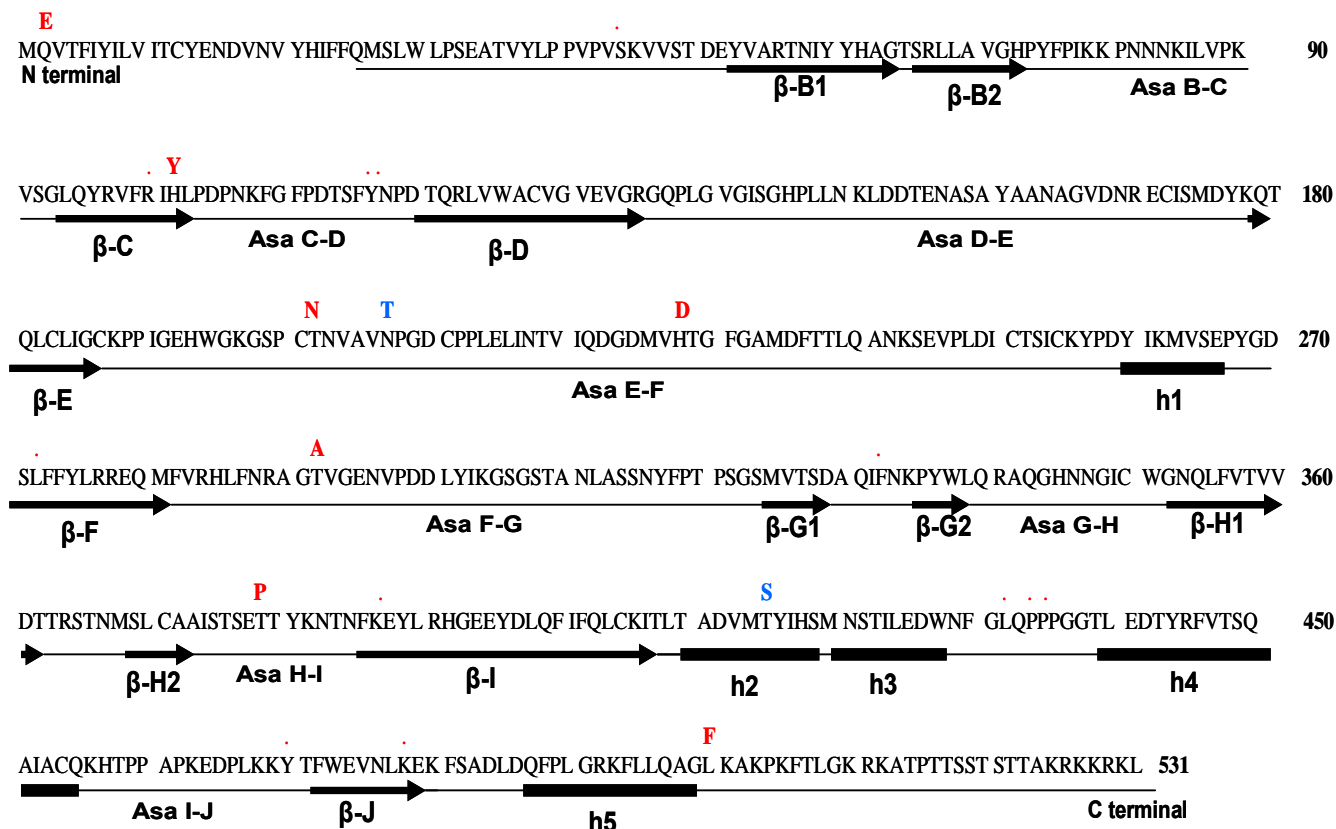


Figura 10.- Estructura secundaria de la proteína L1. Se indican las regiones donde se localizan hojas beta →, asas conectoras — y alfa hélices ■. La secuencia completa de la proteína L1 del VPH16 de referencia, así como los cambios en las secuencias de las proteínas de los VPH16 AA-a ■ y VPH16 AA-c ■, tomado y modificado de Chen y cols. 2000.

ESTRUCTURA TERCIARIA DE LA PROTEÍNA L1 DEL VPH16 AA-C.

Utilizando el programa de modelaje por computadora swiss model disponible en Internet (<http://swissmodel.expasy.org.html>), se investigó si las mutaciones encontradas en la secuencia de la proteína L1 del VPH16 AA-c podrían causar cambios en la estructura terciaria de la proteína L1.

La primera mutación se localiza en el segundo aminoácido de la proteína (Ver figura 10), una glutamina (Q), aminoácido polar sin carga, cambia en el virus AA por un ácido glutámico (E), aminoácido de carácter ácido, aunque con peso molecular (128 y 129) e hidrofobicidad

(0.43 y 0.45) similares. Al comparar esta posición entre los tipos virales más comunes, se encontró que la mayoría presentan aminoácidos más hidrofóbicos, que los presentes en el VPH16 (Ver tabla 4).

Tipo de VPH	Subclase	Posición dentro de la proteína								
		2	1	2	2	2	3	4	5	
16	EUROPEO	Q	H	T	N	H	T	T	T	L
16	AA-a	E	Y	N	T	D	A	P	S	F
16	AA-c	E	Y	N	-	D	A	P	-	F
18		V	A	K	S	D	-	G	S	-
31		V	R	S	T	D	-	-	-	Y
35		V	K	A	K	D	-	S	-	-
45		A	Q	K	Q	D	V	S	S	-
6		V	V	-	Q	D	E	S	A	Y
11		V	V	S	Q	D	-	-	A	Y

Tabla 4.- Comparación de las posiciones mutadas en la proteína L1 del VPH16 AA, con las posiciones homólogas de los tipos de VPH mas frecuentes.

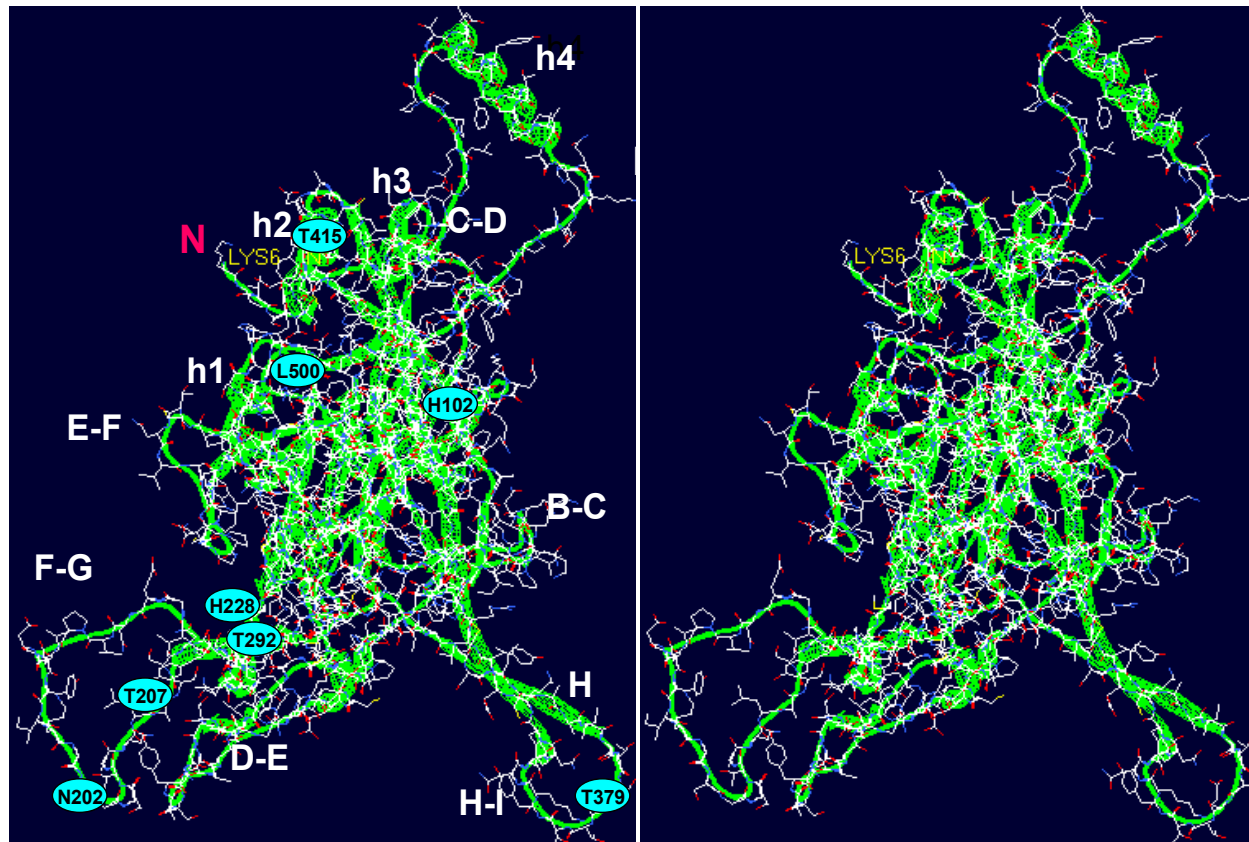


Figura 11.- Estructura tridimensional de la proteína L1 del VPH16 E (Izquierda) y de la proteína L1 del VPH16 AA (Derecha). En la figura de la izquierda se indican las regiones mas importantes de la estructura, así como los sitios donde se ubican las mutaciones, las estructuras fueron obtenidas con el programa swiss model, por lo cual, la numeración en las imágenes 5, 6, 7, 8, 9, y 10, aparece desfasada 40 aminoácidos debido a que la estructura cristalizada comienza a partir del aminoácido 40 (SWISS-MODEL 2005).

No fue posible visualizar esta mutación con el programa de modelaje, debido a que la estructura cristalizada disponible hasta ese momento, no muestra esta posición (Ver figura 11). Sin embargo, esta mutación pudiera alterar la formación de las VLP's, ya que se ha descrito que la región amino determina el tamaño de la VLP que se forma, esta región se localiza en la parte interna de la VLP (Chen y cols. 2000).

Otro cambio importante ocurre en la posición 102, donde el aminoácido básico histidina (H), cambia por el aminoácido tirosina (Y), un aminoácido polar sin carga neta y de mucho menor tamaño. Esta diferencia de cargas y de tamaño, altera las interacciones de este aminoácido con otros aminoácidos, como lo muestra la imagen generada en el programa swiss model, donde se observa que el cambio de este aminoácido localizado en la hoja β -c (Ver figura 10), altera algunas de las interacciones con una asparagina del mismo monómero (Ver figura 12), por lo que es posible que la interacción con otros monómeros de L1 también se vea afectada por este cambio. Sin embargo el programa swiss model solo muestra la estructura de un solo monómero de L1 y no permite ver la interacción de la proteína de L1 con otros monómeros, esta posición es muy variable en otros tipos virales (Ver tabla 4).

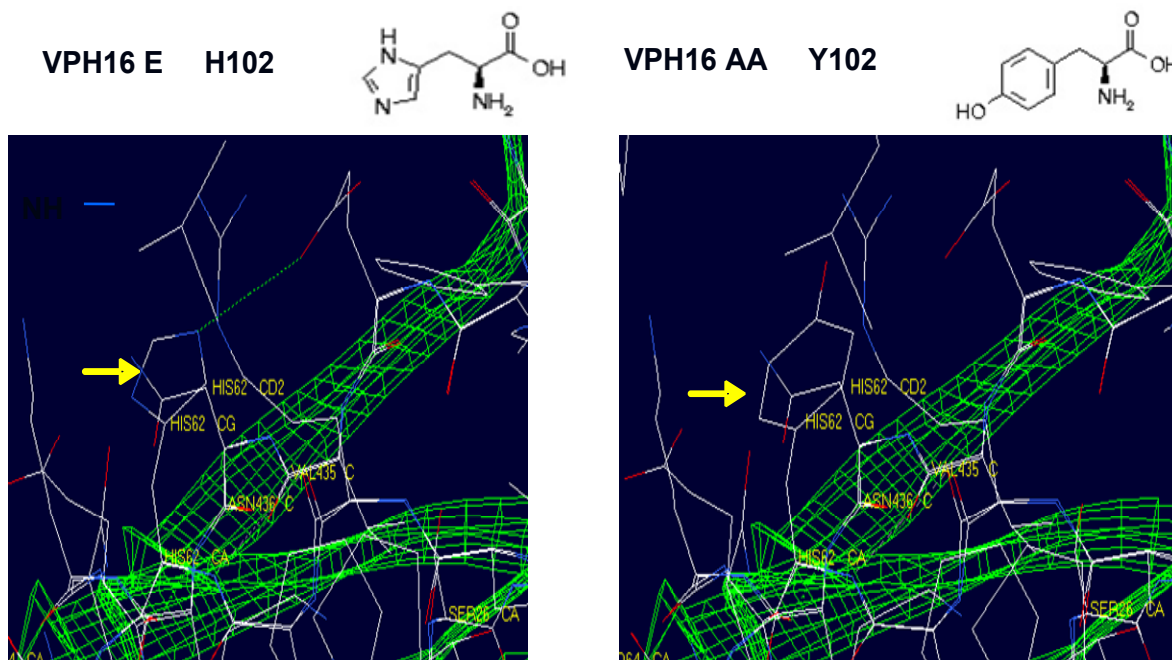


Figura 12.- Figura de la mutación H102Y obtenida con el programa swiss model. Las flechas amarillas indican el sitio de la mutación. La línea punteada de color Verde, en la figura de la izquierda (VPH16 E) representa una interacción electrostática, la cual se pierde con la mutación en la figura de la derecha (VPH16 AA).

Un cambio más se presenta en el asa E-F, en la posición 202 en la secuencia de la proteína L1 del VPH16 AA (Ver figura 10), un aminoácido polar sin carga neta, una treonina (T) cambia por una asparagina (N), un aminoácido también polar sin carga neta, pero mas grande (P.M. de N=114, P.M. de T=1001), por lo que el efecto estérico pudiera alterar las interacciones de este aminoácido, con aminoácidos de otros monómeros.

En la posición 207 de la proteína L1 del VPH16 AA-a pero no en la proteína L1 del VPH16 AA-c, se presenta un cambio “inverso” al anterior, una asparagina cambia por una treonina (Ver figura 13). Estudios cristalográficos han mostrado que la región del asa E-F, donde se localizan las mutaciones 202 y 207, podría quedar expuesta a la cara exterior de la cápside, ya que se asocia directamente con el asa H-I del monómero vecino para formar los pentámeros, además el asa H-I queda expuesta en la superficie de la cápside (Chen y cols. 2000). Sin embargo, la imagen de está región obtenida con el programa swiss model, no muestra alteración en las interacciones del aminoácido T202N con otros del mismo monómero.

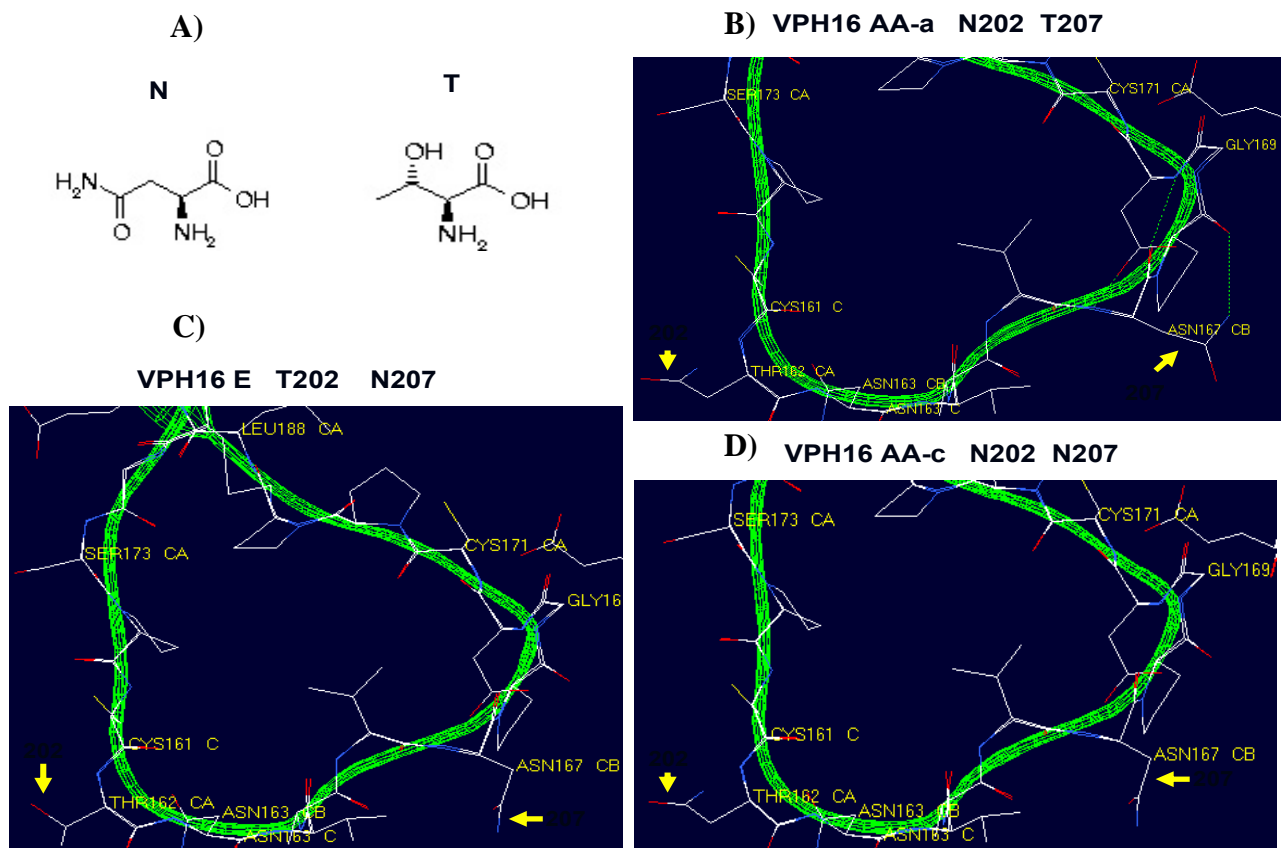


Figura 13.- Figuras de las mutaciones T202N Y N207T obtenidas con el programa swiss model. En la figura **A)** Se muestra la estructura del aminoácido asparagina (N) y treonina (T), los cuales corresponden a las mutaciones en las posiciones 202 (Flecha izquierda) y 207 (Flecha derecha) de la proteína L1. La figura **B)** corresponde al VPH16 AAa, **C)** corresponde al VPH16 E, y **D)** corresponde al VPH16 AAc.

Respecto a las interacciones con otros monómeros, no fue posible visualizar si se producen cambios en las interacciones, ya que el programa swiss model, solo permite visualizar un monómero, y no su interacción con otros (Ver figura 13). Tanto la posición 202 como la posición 207 son muy variables entre tipos virales de alto riesgo, pero solo la posición 207 se conserva entre tipos virales de bajo riesgo, los cuales en esta posición presentan un aminoácido también polar sin carga neta, pero de mucho mayor tamaño, Q de P.M.= 128 (Ver tabla 4), sugiriendo que el efecto estérico en esta posición, en tipos virales de bajo riesgo, pudiera afectar la unión del asa E-F, con el asa H-I del monómero vecino, afectando a su vez la formación de los pentámeros (Ver tabla 4).

En la imagen por computadora, se puede observar que la mutación N207T en la proteína L1 del VPH16 AA-a causa cambios en las interacciones de este aminoácido con otros del mismo monómero (Ver figura 13B), lo cual podría afectar a su vez la interacción con otros monómeros y la formación de la cápside o el reconocimiento de los anticuerpos ya que en esta región se han descrito varios epítopes humorales (Ver tabla 5 y figura 17).

Otra mutación muy importante ocurre en la posición 228, el aminoácido básico histidina (H) cambia por el aminoácido ácido aspártico (D) (Ver tabla 3), esta mutación resulta muy drástica ya que, no solo cambia radicalmente la carga del aminoácido en esta posición, sino también la diferencia de tamaño entre estos aminoácidos es sustancial. Este cambio radical ocurre en una región de interacción con otros monómeros, no obstante que el programa swiss model no muestra alteración en la estructura tridimensional de la proteína (Ver figura 14), se ha descrito en la literatura que el cambio H228D aumenta más de 100 veces el ensamble de los VLP's (Kirnbauer y cols. 1993), este cambio corresponde a la mutación 6240 en el gen, discutida anteriormente y en la cual los tipos virales mas importantes de alto y bajo riesgo, presentan una D en esta posición (Ver tabla 4).

En la posición 292, nuevamente un aminoácido polar sin carga neta, una treonina (T), cambia por el aminoácido no polar y mucho más pequeño, alanina (A), y de acuerdo con el programa swiss model, no se generan cambios en la estructura tridimensional de la proteína L1 (Ver figura 14). Esta posición es muy conservada entre los tipos virales más importantes (Ver tabla 4), y se encuentra en una región que queda expuesta en la superficie de la cápside viral (Chen y cols. 2000), por lo cual pudiera afectar el reconocimiento por parte de los anticuerpos de esa región alfa hélice (Ver figura 10).

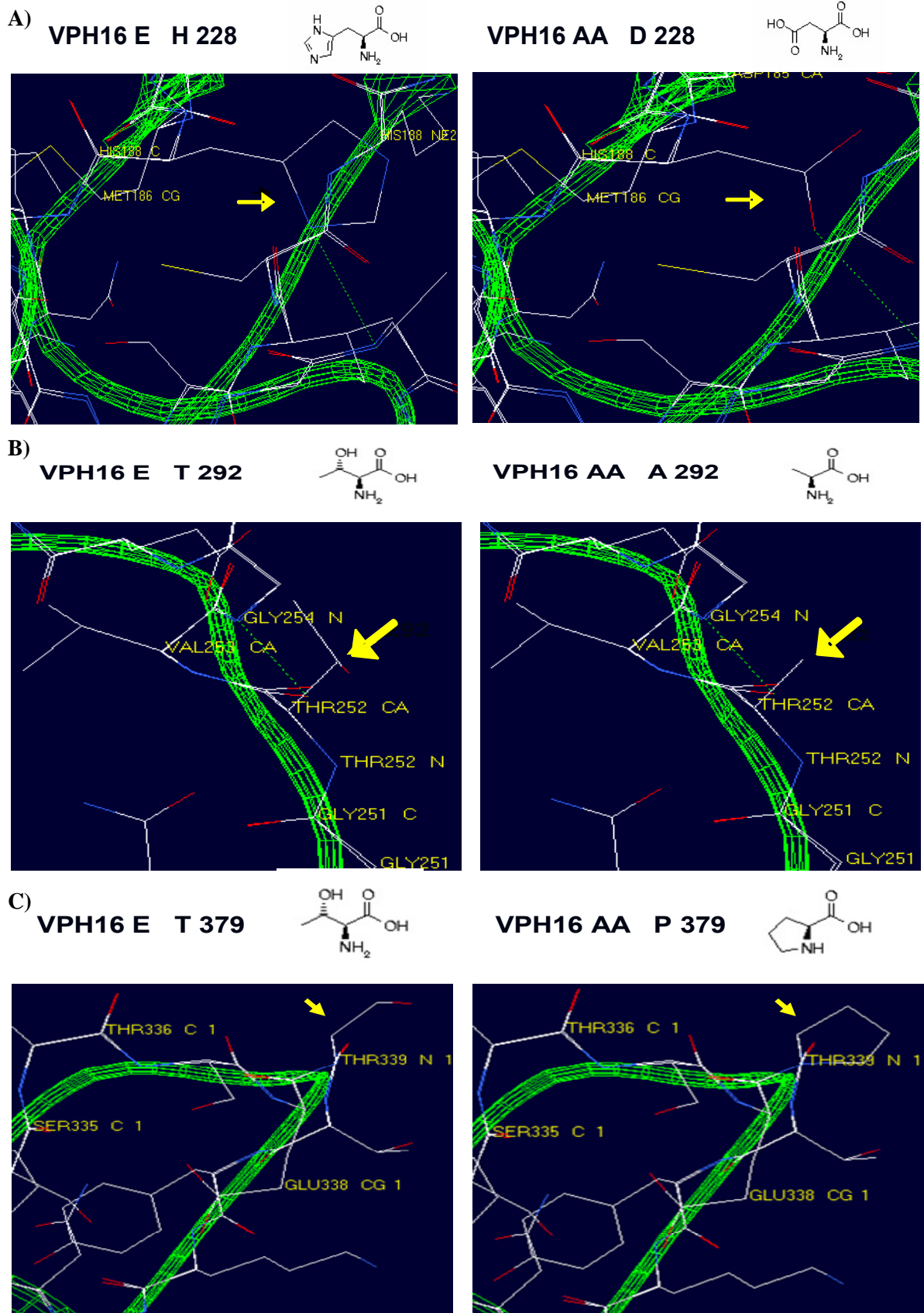


Figura 14.- Figuras de las mutaciones H228D (A), T292A (B) y T379P (C), obtenidas con el programa swiss model. Las flechas indican el sitio de la mutación, la figura de la izquierda corresponde al VPH16 E y la figura de la derecha al VPH16 AA.

En la posición 379, posición variable entre diferentes tipos virales (Ver tabla 4), en la alfa hélice H-I (Ver figura 10), se localiza otro importante cambio de aminoácido, el aminoácido polar sin carga treonina (T), cambia por el aminoácido no polar prolina (P) el cual se localiza en un sitio donde se dobla la proteína (Ver figura 14). Además, esta región interactúa con otros pentámeros y queda en la cara exterior de la cápside (Chen y cols. 2000), no se han descrito epítopes en esta posición, pero se pudiera alterar la formación de la partícula viral.

Otra mutación que ocurre en la proteína L1 del virus AA-a, pero no en la proteína del virus AA-c (Ver tabla 3), en una región que interactúa con otros monómeros (Chen y cols. 2000), la mutación se localiza en la posición 415, altamente conservada entre VPH de alto riesgo, una serina (S) cambia por una treonina (T), ambos son aminoácidos polares sin carga neta y muy parecidos, sin embargo esta mutación causa cambios en los enlaces entre aminoácidos del mismo monómero, como lo muestra el modelo generado con el programa swiss model (Ver figura 15), por lo que podría afectar la formación de la cápside.

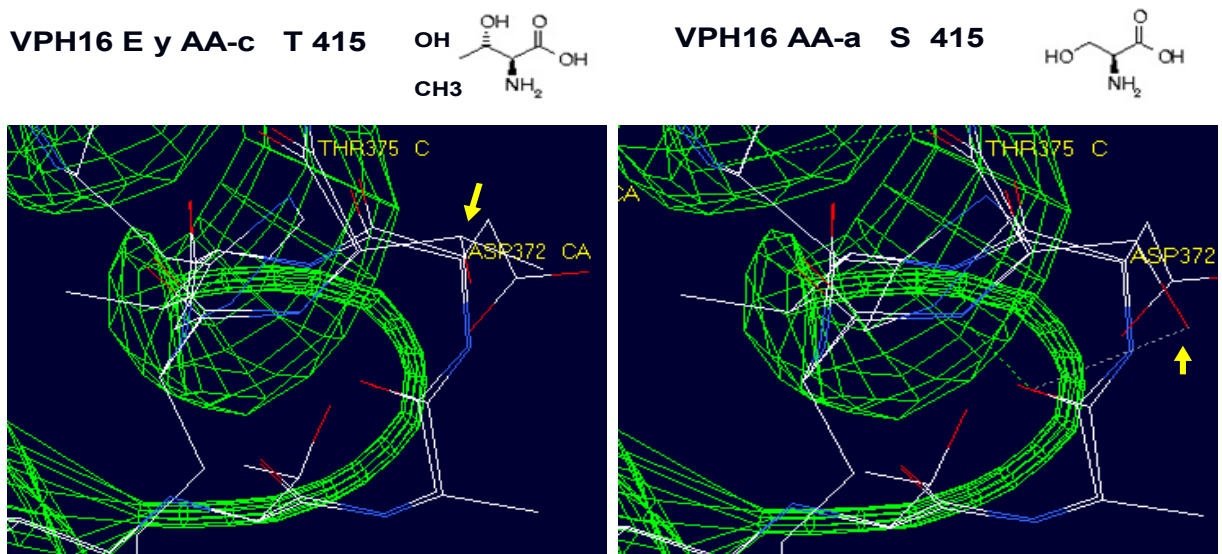


Figura 15.- Figuras de las mutaciones T415S (A) obtenidas con el programa swiss model. Las flechas indican el sitio de la mutación, la figura de la izquierda corresponde al VPH16 E y la figura de la derecha al VPH16 AA.

La última mutación dentro de la proteína se localiza en la posición 500, la cual es una posición muy conservada entre tipos virales de alto riesgo (Ver tabla 4), se localiza cerca del extremo COOH terminal, una leucina (L) cambia por una fenilalanina (F) (Ver figura 10). Ambos aminoácidos son polares, pero la fenilalanina es mucho más grande que la leucina (Ver figura 16), por lo que el efecto estérico pudiera alterar la formación de la partícula viral. También se ha mencionado en la literatura, que los últimos 31 aminoácidos en el extremo

carboxilo (499-531), donde se localiza esta mutación, es importante para la estabilidad de la VLP (Chen y cols. 2000), además posiblemente es un dominio de unión inespecífico al DNA, participa en el empaquetamiento del genoma viral e incluye una señal de localización nuclear de la proteína L1 del VPH16 (Zhou y cols. 1991).

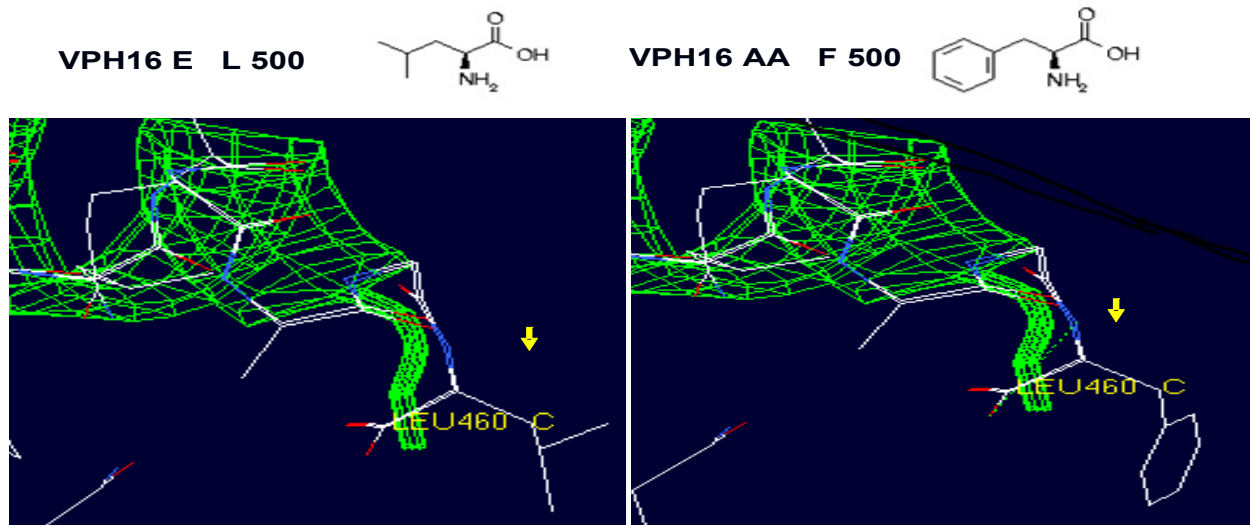


Figura 16.- Figuras de las mutaciones E500F (B) obtenidas con el programa swiss model. Las flechas indican el sitio de la mutación, la figura de la izquierda corresponde al VPH16 E y la figura de la derecha al VPH16 AA.

UBICACIÓN DE LAS MUTACIONES DE LA PROTEINA L1 DEL VPH16 AA DENTRO DE EPITOPES HUMORALES DEL VPH16 E.

Para conocer si alguna de las mutaciones tiene importancia inmunológica se realizó una exhaustiva búsqueda y se identificaron todos los péptidos o epítopes inmunológicos de la proteína L1 del VPH16, previamente descritos en la literatura. Se han identificado 26 péptidos de la proteína L1 del VPH16 E, los cuales son reconocidos por anticuerpos contra el VPH16 (Ver tabla 5). La información recabada se comparó con los sitios donde se localizan las mutaciones en la proteína L1 del VPH 16 AA, interesantemente la mayoría de las mutaciones caen dentro de regiones descritas como inmunogénicas en la proteína L1 del VPH16 E (Ver tabla 5 y figura 17).

Algunas regiones de la proteína han sido muy estudiadas, tal es el caso de la región comprendida entre los aminoácidos 227-366, en la cual se han descrito 15 péptidos (Ver figura 17), uno de ellos el péptido 227-240, es el péptido de la proteína L1 del VPH16 mejor reconocido por los anticuerpos de pacientes con VPH16 (Dillner y cols. 1990). Este péptido ha sido utilizado como control positivo en varios protocolos, además la mutación H228D cae

dentro de la secuencia de este péptido, y por si fuera poco, varios autores han descrito buen reconocimiento humoral hacia este péptido, aun cuando el aminoácido en la posición 228 es D en lugar de H. La posición 228 es altamente conservada entre diferentes tipos de VPH (Ver tabla 4), por lo que es de esperarse un buen reconocimiento hacia la secuencia del VPH16 AA. Interesantemente el péptido de la región 227-240 es mejor reconocido por los anticuerpos, que el péptido 227-246 (Heino y cols. 1995) razón por la cual el péptido 227-240 del VPH16 E y su homólogo AA fueron seleccionados para este estudio.

EPITOPES DESCRITOS EN LA PROTEINA L1 DEL VPH16 EUROPEO		
SECUENCIA DEL EPITOPE	POSICION	REFERENCIA
DVNVYHIFFQMSLWLPSEAT	17-36	6
PSEATVYLP PVPVSKVVST D	32-51	5
NKFG FPDTSFYNPD TQRLVW	107-126	3, 5
QPLG VGISGHPLLN KLDDTE	137-156	5, 6, 8
AGVDNR ECI	165-173	12
VDNRECISMDYKQTQLCLIG	167-186	3
LCLIGCKPPIGEHWGKSPC	182-201	3, 5
KGSPCTNVAVNPGDCPPEL	197-216	3, 5
PCTNVAVNPGDC	200-211	6
VHTGFGAMDFTTLQ	227-240	5, 2
VHTGFGAMDFTTLQANKSEV	227-246	3, 5, 2
NKSEVPLDICTSICKYPDYI	242-261	3
FNRA GTVGENVPDD LYIKGS	287-306	5, 6, 11
TVGENVPDD LYIKGSG	292-307	1, 8, 10
ENVPDD LYIKGSGS	295-308	8
ENVPDD LYIKGSGSTA	295-310	1, 4
YIKGSGSTANLASSNYFPT	302-321	3, 5
NLASSNYFPT PSGSM	311-325	7
YFPT PSGSMVTSDA QIFNKP	317-336	5
PSGSMVTSDA QIFNK	321-335	7
NGICWGNQLFVTVVDTRST	347-366	3
IHSM NSTIL	417-525	9
STILEDWNFGLQPPPGGTLE	422-441	3, 5, 6
ACQKHTPPAPKEDDPLKKYT	453-472	3, 11.
GLKAKPKFTLGKRKATPPTS	499-518	1, 8, 10
SSTSTAKRKRKL	519-531	10

1.- Cason y cols. 1989; 2.- Jenison y cols. 1989; 3.- Dillner y cols. 1990; 4.- Cason y cols. 1992; 5.- Heino y cols. 1995; 6.- Christensen y cols. 1996; 7.- Shepherd y cols. 1996; 8.- Combata y cols. 2002; 9.- Monroy y cols. 2002; 10.- Bousarghin. 2003; 11.- Carter y cols. 2003; 12.-. Ohlschalger y cols. 2003.

Tabla 5.- Epítopes descritos en la proteína L1 del VPH16 E. en la tabla se muestra la secuencia del péptido descrito (Izquierda), la posición (centro), y la clave de la referencia bibliográfica donde se describe (derecha), en la parte inferior se encuentra la clave y referencia a la cual corresponde cada clave.

La mutación T292A, también se encuentra en esta región inmunogénica (227-366), dicha posición es altamente conservada entre VPH de alto riesgo (Ver tabla 4), y queda expuesta en la superficie de la cápside viral (Dillner y cols. 1990; Heino y cols. 1995; Christensen y cols. 1996), por lo cual, el reconocimiento por parte de los anticuerpos pudiera ser afectado.

Otra región inmunogénica es la de los aminoácidos 165-216, en la cual se han descrito 5 péptidos, en esta región ocurren dos de las mutaciones encontradas en la proteína AA, dichas mutaciones ocurren a solo 5 aminoácidos de distancia una de otra, las mutaciones T202N y N207T (Ver figura 17), las cuales se localizan en posiciones altamente variables en VPH de alto riesgo (Ver tabla 4).

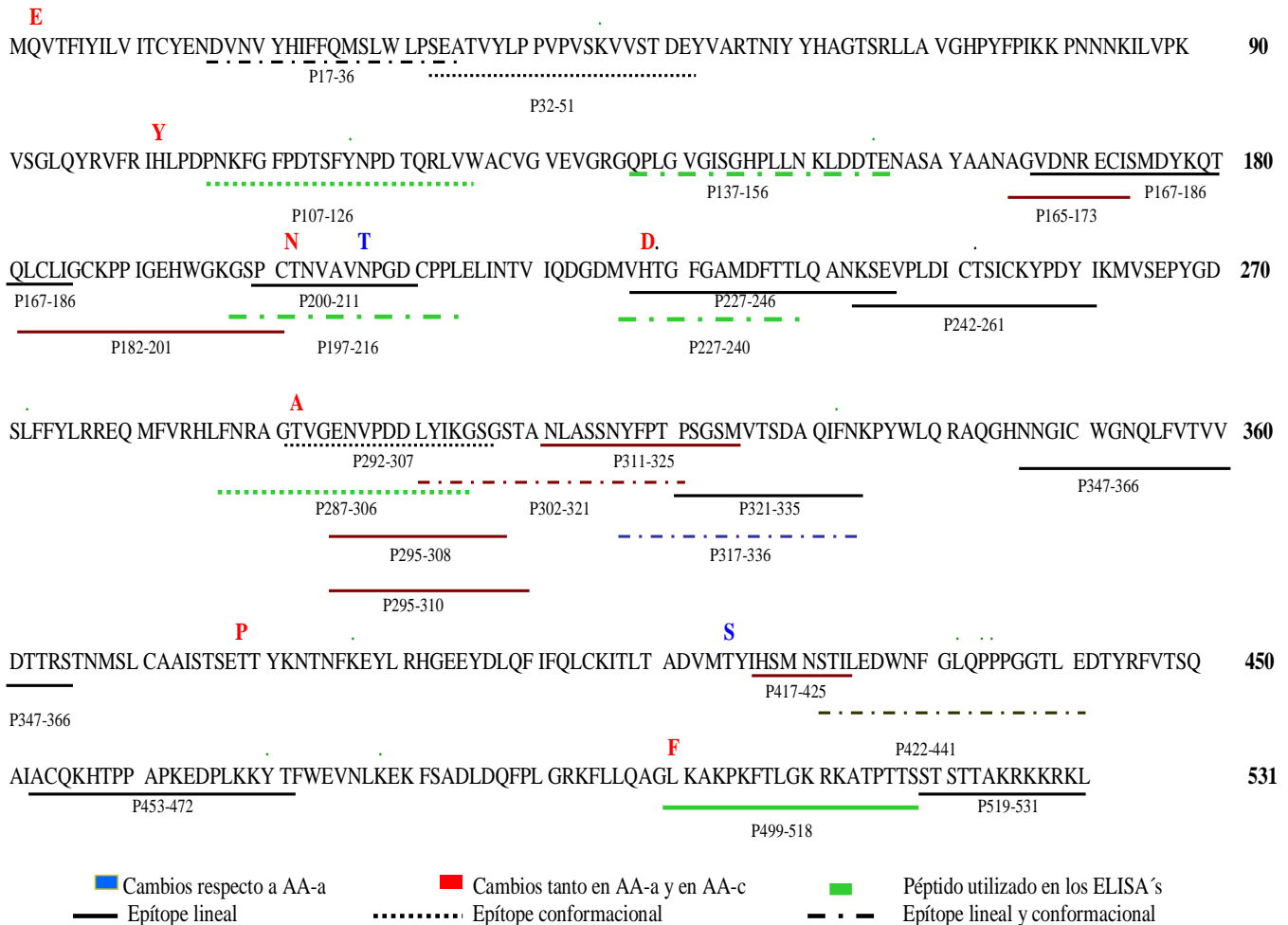


Figura 17.- Secuencia de la proteína L1 del VPH16 y la ubicación de los epítopes descritos en la literatura. En negro se muestra la secuencia completa de la proteína L1 del VPH16 E de referencia (K02718), y en distinto color los cambios en el VPH16 AA.

Se ha descrito en la literatura que la región comprendida entre los aminoácidos 197 y 216 es un epítope humoral reconocida por anticuerpos de pacientes con CaCu, tanto de forma lineal, como conformacional (Heino y cols. 1995), por lo que pudiera verse afectado el reconocimiento humoral debido a las mutaciones en las posiciones 202 y 207. Dos péptidos que incluyen en sus secuencias tanto la mutación T202N como la N207T han sido descritos (Ver figura 17), no obstante el péptido 197-216 es mejor reconocido que el péptido 200-211 (Heino y cols. 1995), razón por la cual el péptido 197-216 con la secuencia del VPH16 E y su

homólogo AA fueron utilizados en este estudio (Ver tabla 2). Aunque algunos péptidos son mejor reconocidos en su forma conformacional, como los péptidos 32-52 y 292-307, y otros como los péptidos 167-186, 200-211, 227-246, 242-261, 295-310, han sido descritos como epítopes lineales, la mayoría de los péptidos son reconocidos tanto en su forma lineal como conformacional (Cason y cols. 1989; Jenison y cols. 1989; Dillner y cols. 1990; Heino y cols. 1995; Cason y cols. 1992; Christensen 1994); Shepherd 1996; Combata y cols. 2002; Carter y cols. 2003; Ohlschalger y cols. 2003), razón por la cual en este estudio se utilizaron péptidos sintéticos como epítopes lineales.

La región donde se localiza la mutación Q2E ha sido muy poco estudiada y no se ha descrito ningún epítope. Tampoco se ha descrito ningún epítope en la posición donde se localiza la mutaciones H102Y, sin embargo cercana a esta posición, se ha descrito que el péptido 107-126 (Ver figura 17), es reconocido por anticuerpos de mujeres con CaCu, tanto en forma lineal como conformacional (Dillner y cols. 1990; Heino y cols. 1995).

En la región donde se localiza la mutación T379P, a pesar de que queda expuesta en la superficie del virión, no se han descrito epítopes inmunológicos. De manera similar ocurre con la mutación T415S, cuya posición no se ha descrito como epítope inmunológico, cercano a esta posición, en la región 422-441 (Ver tabla 5 y figura 17), se localiza un epítope humoral conformacional (Dillner y cols. 1990), y en la región 417-425 se ha descrito un epítope para linfocitos T (Monroy y cols. 2002).

Por último la mutación L500F, ocurre en un posición altamente conservada entre VPH de alto riesgo (Ver tabla 4), y se encuentra cercana al extremo carboxilo, el cual en contraste es muy variable, esta región ha sido poco estudiada, sin embargo, Cason la describe como una región bien reconocida por anticuerpos de pacientes con CaCu (Cason y cols. 1992).

Se comparó la secuencia de los péptidos derivados de la proteína L1 del VPH16 que se utilizaron en este estudio, con las secuencias homólogas de los tipos virales más importantes. Como se puede observar en la tabla 6, las regiones 107-126 y 137-156, que corresponden a los péptidos 1E y 2E respectivamente y cuyas secuencias son las mismas en las variantes E y AA del VPH16, son muy poco variables entre tipos de VPH de alto riesgo. En cambio la región 197-216, correspondiente a los péptidos 3E, 4AAa y 5AAc, específicamente la región 202-208, donde se localizan dos de las mutaciones que estamos analizando, es altamente variable entre los tipos virales de mayor importancia (Ver tabla 6), lo cual puede tener importancia inmunológica.

La región 227-240 es muy poco variable entre los diferentes tipos virales analizados. La región 287-306 es poco variable, en contraste, la región 499-518 correspondiente al péptido 10E y 11AA, altamente conservada entre las variantes E y AA del VPH16, es muy variable entre los diferentes tipos virales en los que se comparó (Ver tabla 6).

POSICIÓN	TIPO	SECUENCIA
(107-126)	HPV16 Europeo	NKFGFPDTSFYNPDTQRLVW
18		-----I-----E-----
31		-----E-----
35		-----D-AS-----
45		-----STI-----
6		---AL--S--LFD--T-----
11		---AL--S--LFD--T-----
(137-156)	HPV16 Europeo	QPLGVGISGHPLLNKLDDE
18		-----L-----FY-----
31		-----F-----
35		-----I-----
45		-----L-----FY-----
6		-----V-----F-----Y--V-
11		-----V-----Y--V-
(197-216)	HPV16 Europeo	KGSPCTNVAVNPGDCPPLEL
	AA-c	KGSPCNNVAVNPGDCPPLEL
	AA-a	KGSPCNNVAVTPGDCPPLEL
18		--TA--KSRPLSQ-----
31		---S-N-IT-----
35		--T--AANQ-KA-E-----
45		--TL--KPAQLQP-----
6		--KQ--TP--QA-----
11		--TQ--S-TS--QN-----
(227-240)	HPV16 Europeo	VHTGFGAMDFTTLQ
	AA	VDTGFGAMDFTTLQ
18		-D--Y-----S---
31		-D-------A---
35		-D--F--------
45		-D--Y-----S---
6		-D-- -- --N-AD--
11		-D-- -- --N-AD--
(287-306)	HPV16 Europeo	FNRAGTVGENVPDDLIIKGS
	AA	FNRAGAVGENVPDDLIIKGS
18		W-----M-DT--QS-----T
31		- --S- --S--T-----
35		- -- -- --T--A-----T
45		W-----VM-DT--T-----T
6		- -- --E--P--T--I----
11		- -- -- --P-- --LV--G
(499-518)	HPV 16 Europeo	GLKAKPKFTLGKRKATPTTS
	AA	GFKAKPKFTLGQRKATPTTS
18		- - - - -ITGPR--S--P-A-T
31		-YR- R--KA--S-PSAST
35		- - -R-N-R-- --A-PASTS
45		- - -R--IGP- --A--ST
6		-YRGRSS IRT- VKRPAVSKA
11		-YRGRTSART- I KRPAVSKP

Tabla 6.- Comparación de las secuencias que comprenden los péptidos utilizados en este estudio, con las secuencias homólogas de los tipos de VPH mas importantes.

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA LAS VARIANTES EUROPEA Y ASIÁTICO AMERICANA DEL VPH 16.

Una vez determinadas las diferencias en las secuencias de las proteínas L1 del VPH16 AA-a (9 a.a) y del VPH16 AA-c (7 a.a) respecto del VPH16 E, el siguiente paso fue investigar si los anticuerpos de pacientes con CaCu positivas para el VPH16 E reconocen a los péptidos específicos del VPH16 AA, y viceversa, para lo cual se utilizaron 11 péptidos sintéticos derivados de la proteína L1 del VPH16 (Ver tabla 2) y la técnica de ELISA. En total se analizaron los sueros de 37 mujeres con CaCu positivas para el VPH16 (Cáncer VPH16+), 19 de ellas positivas para el VPH16 E (Cáncer E) y 18 para el VPH16 AA (Cáncer AA), cuyos datos se pueden ver en la tabla 7.

CLAVE	GRUPO	EDAD	ETAPA CLINICA	CLAVE	GRUPO	EDAD
R081	E	41	IB1	C103	CP	68
R072	E	61	IB1	C133	CP	61
R234	E	36	IIIB	C141	CP	53
R240	E	31	IB2	C192	CP	58
R247	E	54	IB2	C293	CP	42
R248	E	36	IB1	C294	CP	36
R244	E	52	IIB	C297	CP	49
R246	E	63	IB	C298	CP	50
R229	E	67	IIB	C309	CP	46
R250	E	50	IIIB	C310	CP	38
R124	E	42	IB1	C347	CP	41
R133	E	36	IB1			
R230	E	62	IB1	C337	CN	32
R092	E	48	IB2	C338	CN	45
R102	E	66	IB1	C341	CN	40
R130	E	38	IB1	C350	CN	45
R070	E	74	IB1	C351	CN	48
R076	E	31	IIB	C353	CN	45
R089	E	74	IIA	C354	CN	47
				C348	CN	41
R035	AA	48	IB2	C349	CN	42
R115	AA	62	IB1	C343	CN	47
R135	AA	38	IB2			
R156	AA	70	IIIB	HVE	Niño	8
R158	AA	37	IVB	UMJ	Niño	6
R232	AA	45	IB2	GA	Niño	3
R040	AA	65	IIIB	RC	Niño	5
R216	AA	32	IIB	ATA	Niño	8
R183	AA	64	IB1	EE	Niño	8
R215	AA	58	IIIB	GZA	Niño	7
R219	AA	30	IIB	MM	Niño	7
R015	AA	42	IIB	MV	Niño	6
R093	AA	57	IB1	VMS	Niño	8
R094	AA	45	IB1	FCE	Niño	3
R170	AA	67	IIB	DMX	Niño	4
R189	AA	47	IB1	ELE	Niño	7
R217	AA	64	IIB	TMJ	Niño	7
R221	AA	41	IB2	SGA	Niño	8
				CZ	Niño	5
N015	NIC	33	II	CRM	Niño	8
N006	NIC	48	II	OFL	Niño	4
N042	NIC	50	I	BPF	Niño	7
N121	NIC	35	I	DH	Niño	5

Tabla 7.- Listado de todas las muestras analizadas por ELISA's, así como el grupo de estudio al cual pertenecen, la edad, y la etapa clínica de acuerdo a la clasificación FIGO. CP (Control Positivo)= Sanas VPH16+; CN (Control Negativo)= Sanas VPH16-.

Adicionalmente se analizaron 4 casos de NIC de alto grado, positivos para el VPH16 (NIC), 11 sueros de mujeres sanas positivas para el VPH16 que no presentaban lesiones cervicales (Sanas VPH16+), 10 sueros de mujeres sanas negativas para el VPH16 y sin lesiones cervicales (Sanas VPH16-), y 20 sueros de niños menores de 8 años (Niños) cuyos datos se pueden ver en la tabla 7.

Los valores de absorbancia obtenidos con los ELISA's, por péptido y por paciente en cada uno de los grupos de estudio, se muestran en la figura 18(A-G). Cada barra corresponde a un suero diferente, la línea horizontal en cada figura representa el punto de corte para la seropositividad y se determinó como se explica en el apartado correspondiente (Ver método). La seropositividad en cada caso se muestra en la figura 18, de manera más resumida, como se puede ver en la tabla.

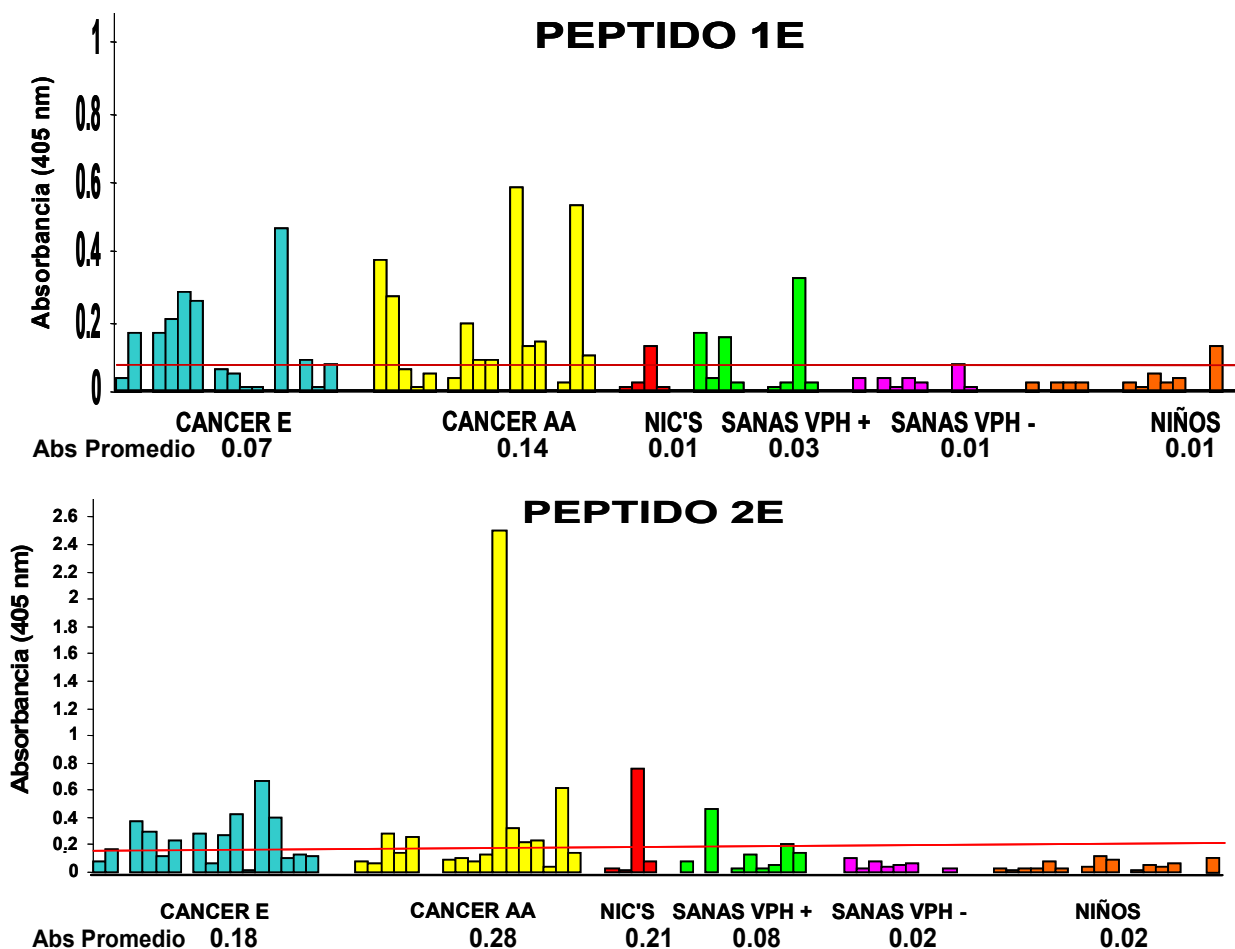
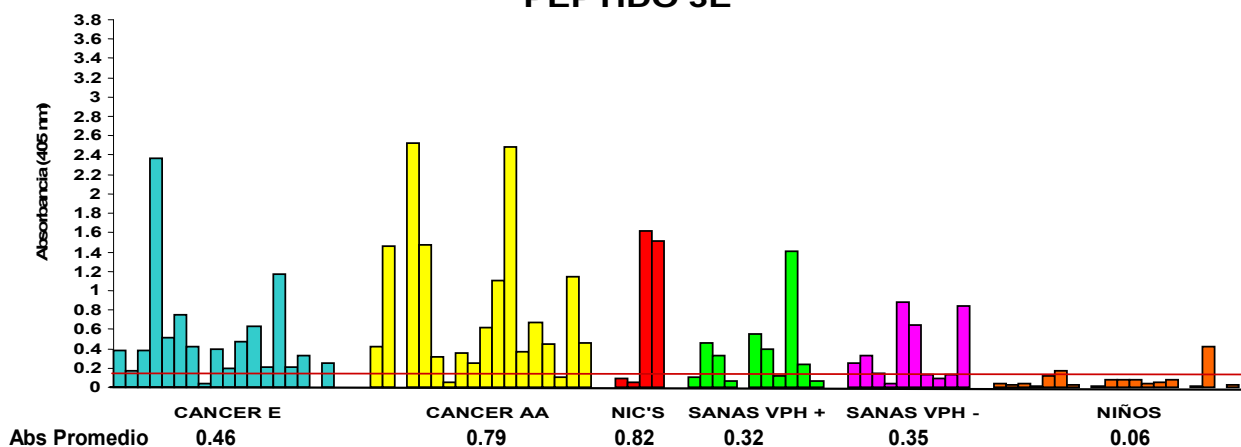
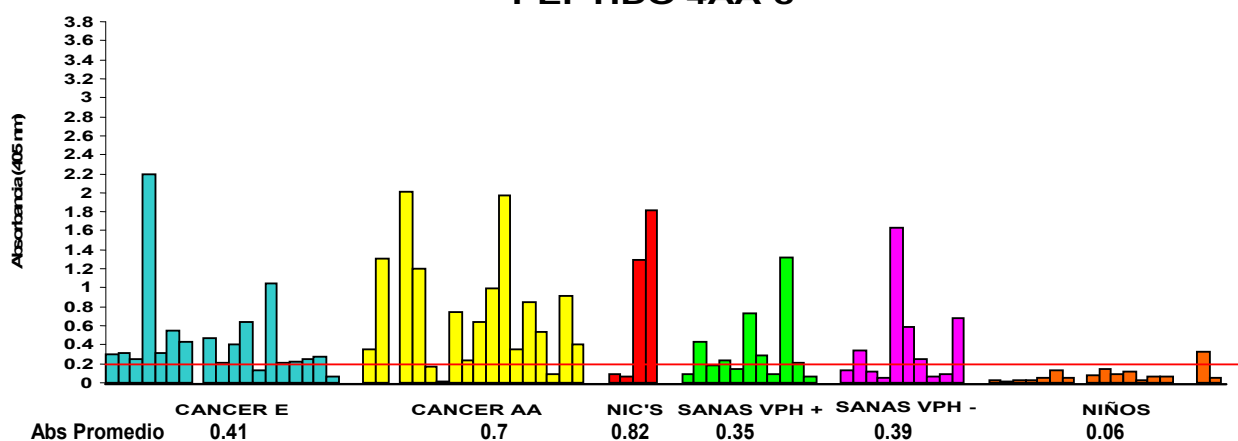


Figura 18A.- Absorbancia obtenida con cada uno de los sueros analizados, para los péptidos 1E y 2E respectivamente, las barras de un mismo color pertenecen a un mismo grupo de estudio, el cual aparece en el eje x, con su respectiva absorbancia promedio (Abs promedio). La línea roja indica el punto de corte. La Absorbancia promedio para el grupo de pacientes con cáncer (CANCER E y CANCER AA) para el péptido 1E = 0.10, y para el péptido 2E = 0.23.

PEPTIDO 3E



PEPTIDO 4AA-c



PEPTIDO 5AA-a

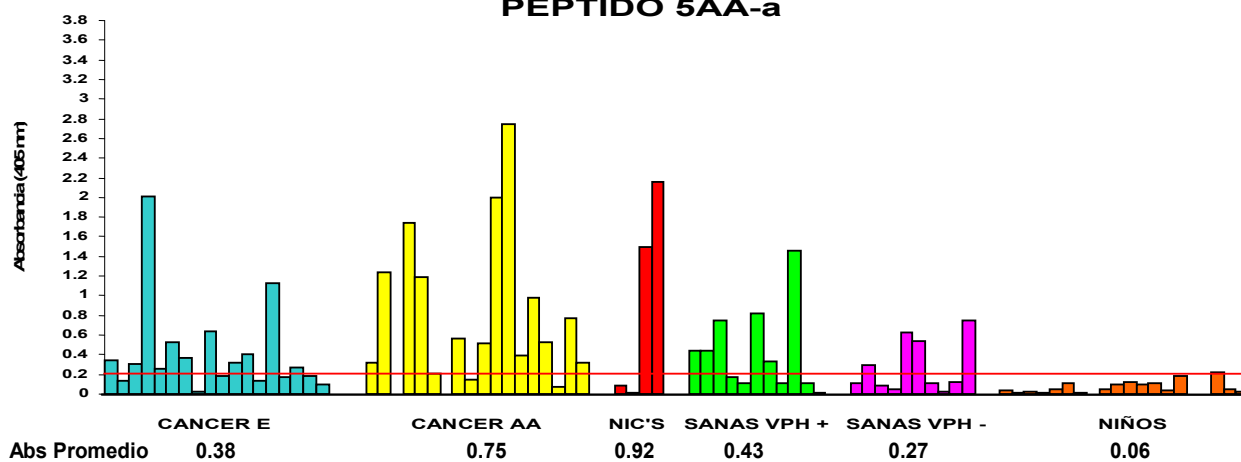


Figura 18B.- Absorbancia obtenida con cada uno de los sueros analizados, para los péptidos 3E, 4AA-c y 5AA-a respectivamente, las barras de un mismo color pertenecen a un mismo grupo de estudio, el cual aparece en el eje x, con su respectiva absorbancia promedio (Abs promedio). La línea roja indica el punto de corte. La Absorbancia promedio para el grupo de pacientes con cáncer (CANCER E y CANCER AA) para el péptido 3E =0.62, para el péptido 4AA-c= 0.55, para el péptido 5AA-a =0.57.

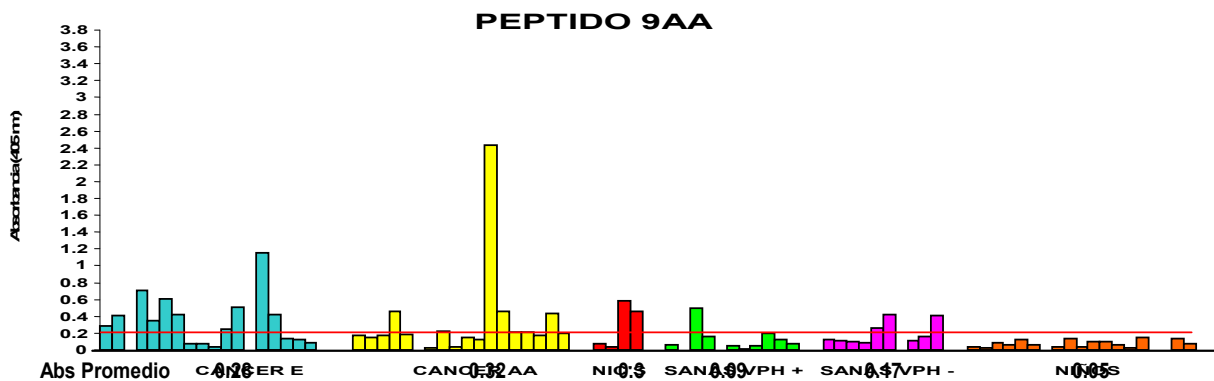
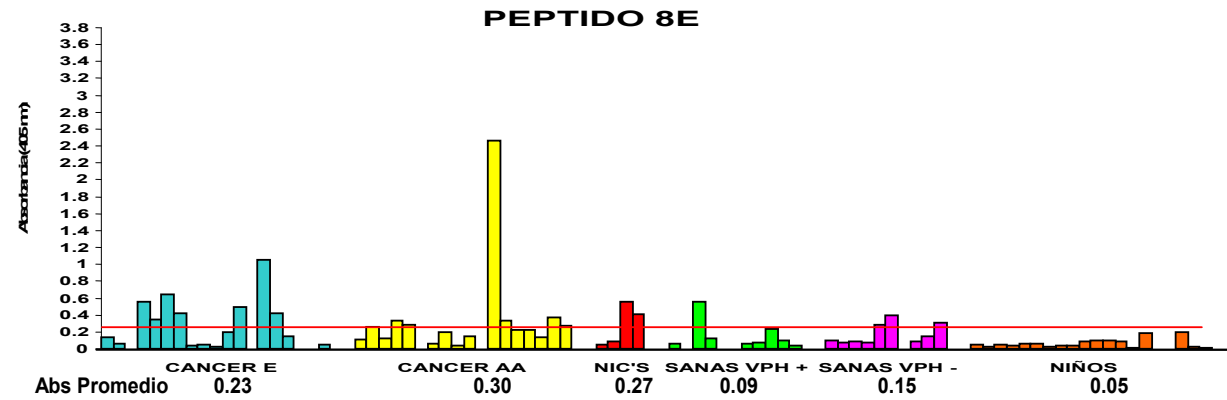
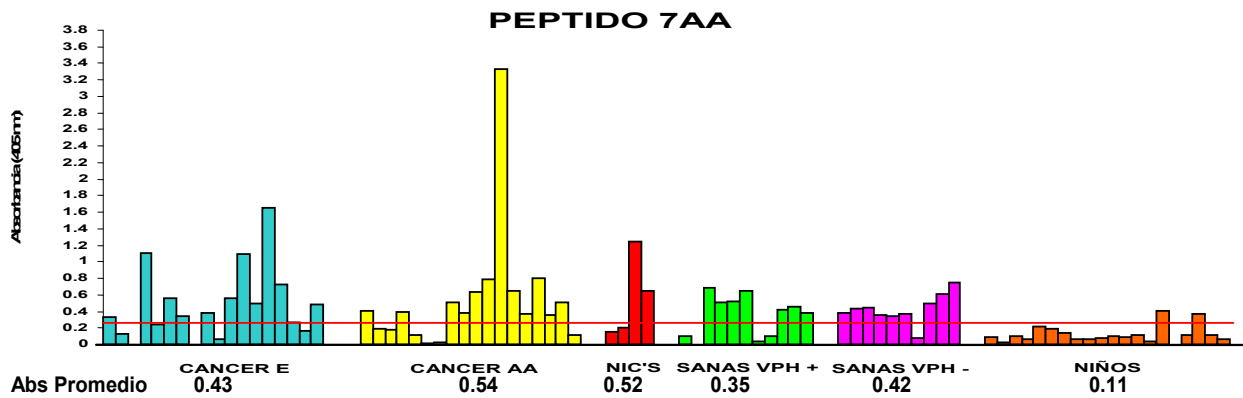
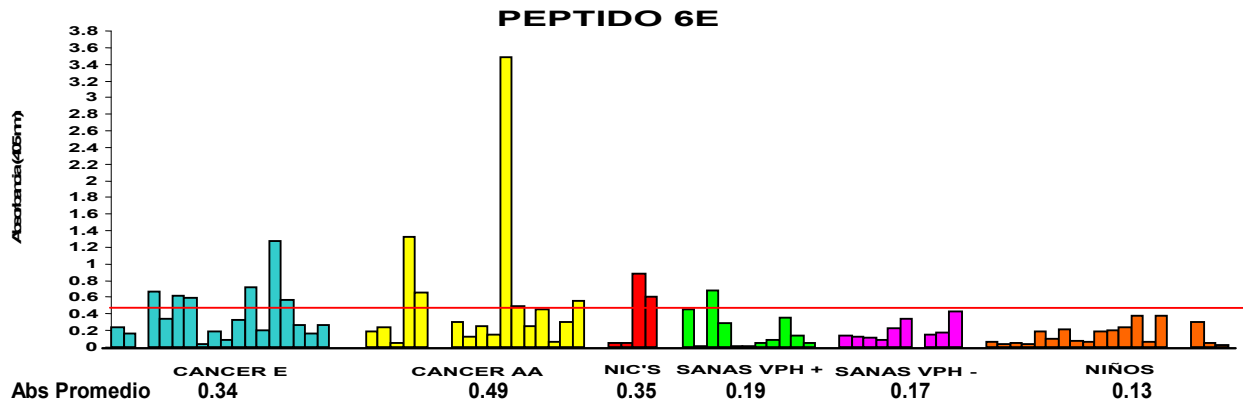


Figura 18C.- Absorbancia obtenida con cada uno de los sueros analizados, en (A) para los péptidos 6E y 7AA, y en (B) para los péptidos 8E y 9AA respectivamente, las barras de un mismo color pertenecen a un mismo grupo de estudio, el cual aparece en el eje x, con su respectiva absorbancia promedio (Abs promedio). La línea roja indica el punto de corte. La Absorbancia promedio para el grupo de pacientes con cáncer (CANCER E y CANCER AA) para el péptido 6E =0.41, para el péptido 7AA= 0.48, para el péptido 8E =0.26, y para el péptido 9AA= 0.30.

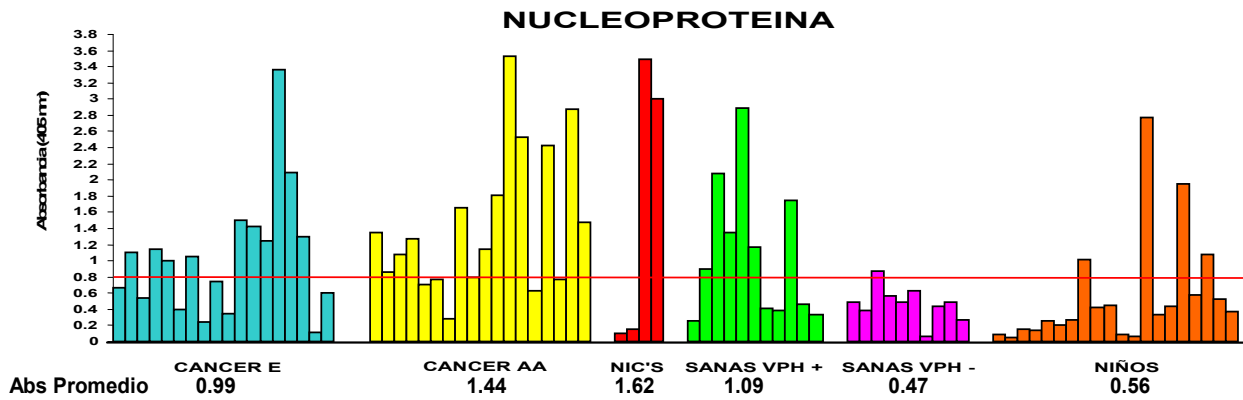
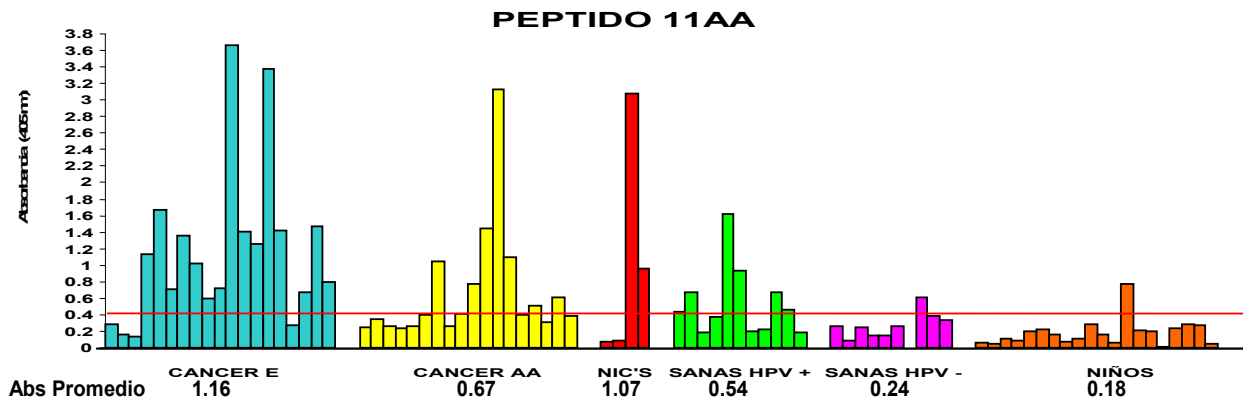
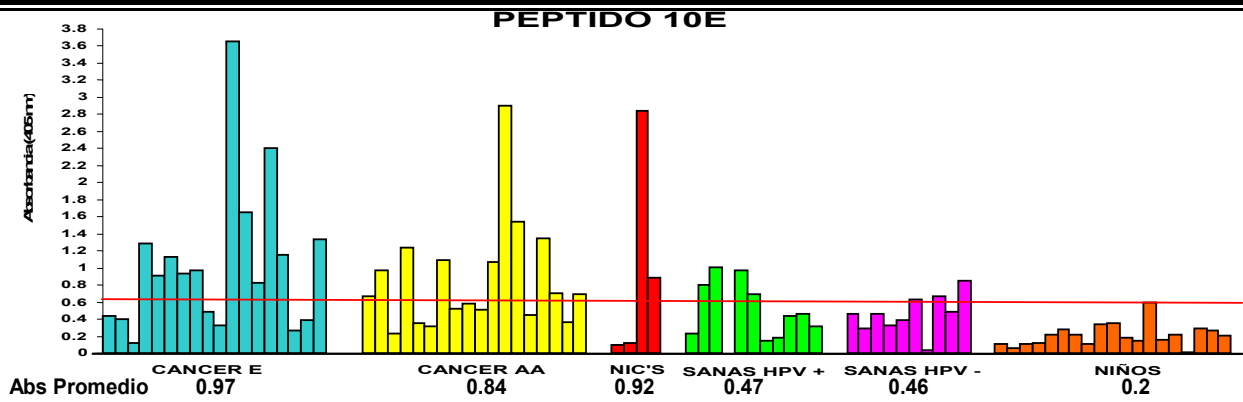


Figura 18D.- Absorbancia obtenida con cada uno de los sueros analizados, para los péptidos 10E y 11AA, y para el péptido derivado de la nucleoproteína de influenza, las barras de un mismo color pertenecen a un mismo grupo de estudio, el cual aparece en el eje x, con su respectiva absorbancia promedio (Abs promedio). La línea roja indica el punto de corte. La Absorbancia promedio del grupo de pacientes con cáncer (CANCER E y CANCER AA), para el péptido 10E = 0.9, para el péptido 11AA= 0.92, y para el péptido derivado de la Nucleoproteína de influenza (NUP) = 1.21.

Debido a que solo se pudieron analizar 4 sueros de pacientes con NIC de alto grado positivas para el VPH16, no es posible hacer un análisis representativo, sin embargo, puesto que si se realizaron los experimentos, los resultados obtenidos en los ELISA's con dichas muestras, se incluyen en la figura 18 para fines informativos.

SEROPOSITIVIDAD A PÉPTIDOS HOMÓLOGOS EN PACIENTES CON CÁNCER POSITIVAS AL VPH16.

Las mujeres con CaCu positivas al VPH16, reconocieron en promedio 6 péptidos, no obstante, la respuesta humoral hacia los once péptidos explorados fue muy variable en este grupo (figura 18A). La absorbancia promedio obtenida con los péptidos derivados del VPH16, fue de 0.49, y el promedio de seropositividad por péptido fue de 56.49%, la menor seropositividad se registro hacia el péptido 6E y la mayor absorbancia se registro hacia el péptido 3E (Ver tabla 8).

PEPTIDOS	CANCER VPH16+ Frecuencia (%) (n= 37)
1E	20 (54)
2E	15 (40.54)
3E	31 (83.78)
4AAc	30 (81)
5AAa	24 (64.86)
6E	11 (29.72)
7AA *	24 (64.86)
8E	14 (37.83)
9AA	17 (45.95)
10E	21 (56.75)
11AA	23 (62.16)
NUP	23 (62.16)

Tabla 8.-Comparación de la seropositividad a péptidos homólogos en el grupo de pacientes con Cáncer positivas al VPH16. * El péptido 7AA, realmente también corresponde al VPH16 E, y el péptido 6E, prácticamente no esta representado en los VPH16 (Ver sub-capítulo de resultados "Obtención de la secuencia completa del gen L1 del VPH16 AA-c").

Solamente 10 pacientes con CaCu fueron seropositivas tanto para el péptido 1E como para el péptido 2E, mientras que 15 pacientes fueron positivas solo para uno de estos dos péptidos (Ver figura 18A), cuyas secuencias son las mismas tanto en el virus E como en el virus AA (tabla 2).

La diferencia en la seropositividad de las pacientes con CaCu hacia los péptidos 3E y 4AAc ($p= 0.9$), 3E y 5AAa ($p= 0.1$), y 4AAc y 5AAa ($p= 0.1$), no fue estadísticamente significativa. La región 197-216 de la proteína L1, de la cual derivan estos tres péptidos, fue la más antigénica, 22 de las 37 pacientes, fueron seropositivas para estos tres péptidos, en promedio estos péptidos tuvieron 76.54% de seropositividad (Ver tabla 8). También con estos péptidos se obtuvieron algunas de las mayores absorbancias promedio (Ver figura 18B), sin que se encontrara diferencia estadísticamente significativa entre los péptidos 3E y 4AAc ($p=0.77$), ni entre los péptidos 3E y 5AAa ($p=0.50$). La gran mayoría de las pacientes (89%), a excepción de cuatro (R040, R089, R246, y R189), fueron seropositivas al menos a uno de estos tres péptidos (Ver figura 18A), aunque no se encontró relación entre el estadio de estas cuatro pacientes, resulta interesante que tres de estas cuatro, tenían más de 62 años de edad (Ver tablas 6 y 7).

Por su parte la secuencia específica del péptido 7AA, fue la segunda región más antigénica, sin embargo la secuencia específica del péptido 6E, el cual difiere en un aminoácido, fue la región menos reconocida de los 11 péptidos. La diferencia de seropositividad entre los péptidos 6E y 7AA, fue estadísticamente significativa en pacientes con CaCu ($p= 0.005$), las cuales, presentaron 2.2 veces mayor porcentaje de seropositividad contra el péptido 7AA, en comparación con la presencia de anticuerpos contra el péptido 6E (Ver tabla 8). No obstante la absorbancia promedio fue similar para estos dos péptidos (Ver figura 18C), lo cual sugiere que el cambio H228D, favorece fuertemente el reconocimiento de los anticuerpos (Ver tabla 8).

En cuanto a los péptidos 8E y 9AA, no se encontró diferencia estadísticamente significativa en la seropositividad de las pacientes con CaCu ($p=0.63$), ni en la absorbancia (Ver tabla 8 y figura 18C). Con estos péptidos se obtuvieron los valores más similares de todos los péptidos, al comparar la absorbancia, entre péptidos homólogos, y las seropositividad también fue muy similar entre estos dos péptidos.

La región 499-518 a la cual corresponden los péptidos 10E y 11AA, presentó los valores promedio de absorbancia más altos (Ver figura 18D), entre los péptidos 10E y 11AA, estos valores fueron estadísticamente similares ($p=0.6$). También estos péptidos tuvieron algunos de los porcentajes de seropositividad más altos, no obstante que el péptido 11AA tuvo un

mayor porcentaje de seropositividad, en comparación con el péptido 10E (Ver tabla 8), esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p= 0.8$).

Al comparar la seropositividad entre péptidos derivados de la proteína L1 del VPH16 E y sus homólogos del VPH16 AA, no se encontró diferencia estadísticamente significativa. En comparación, al comparar la seropositividad entre péptidos de diferentes regiones de la proteína L1, en el grupo de mujeres con CaCu (Ver tabla 8), encontramos que existe diferencia estadísticamente significativa entre algunos de ellos (Ver figura 19).

Péptidos	Valor de P	Péptidos	Valor de P	Péptidos	Valor de P
1E/2E	0.430	3E/4AAc	0.9	5AAa/10E	0.630
1E/3E	0.001	3E/5AAa	0.191	5AAa/11AA	0.9
1E/4AAc	0.025	3E/6E	≤0.001	6E/7AA	0.005
1E/5AAa	0.478	3E/7AA	0.191	6E/8E	0.630
1E/6E	0.063	3E/8E	≤0.001	6E/9AA	0.190
1E/7AA	0.478	3E/9AA	0.002	6E/10E	0.036
1E/8E	0.190	3E/10E	0.002	6E/11AA	0.055
1E/9AA	0.630	3E/11AA	0.067	7AA/8E	0.036
1E/10E	0.9	4AAc/5AAa	0.190	7AA/9AA	0.191
1E/11AA	0.630	4AAc/6E	≤0.001	7AA/10E	0.630
2E/3E	≤0.001	4AAc/7AA	0.190	7AA/11AA	0.9
2E/4AAc	≤0.001	4AAc/8E	≤0.001	8E/9AA	0.630
2E/5AAa	0.063	4AAc/9AA	0.004	8E/10E	0.191
2E/6E	0.478	4AAc/10E	0.044	8E/11AA	0.063
2E/7AA	0.063	4AAc/11AA	0.122	9AA/10E	0.478
2E/8E	0.9	5AAa/6E	0.005	9AA/11AA	0.190
2E/9AA	0.800	5AAa/7AA	1.00	10E/11AA	0.800
2E/10E	0.190	5AAa/8E	0.036		
2E/11AA	0.090	5AAa/9AA	0.191		

Figura 19.- Péptidos entre los cuales existe diferencia estadísticamente significativa respecto a la seropositividad en el grupo de mujeres con Cáncer.

Lo cual sugiere que algunas regiones, son más antigénicas que otras, como por ejemplo: La región 197-216 (Péptidos 3E, 4AA-c y 5AA-a), la cual tuvo mayor porcentaje de seropositividad que las regiones de las que derivan los péptidos 1E, 2E, 8E y 9 AA (Ver figura 19).

Interesantemente, todos los casos donde hubo seropositividad al péptido 5AAa, también la hubo para el péptido 4AAc, y casi todos los casos donde hubo seropositividad al péptido 4AAc, también la hubo para el péptido 3E, a excepción del caso R070E el cual solo fue seropositivo al péptido 3E (Ver figura 18A).

Las pacientes: R072E, R250E, R102E, R076E, y R183AA, reconocen al péptido 3E y al péptido 4AAc, pero no reconocen al péptido 5AAa, cuya secuencia varía solo en un aminoácido respecto al péptido 4AAc, sugiriendo que la mutación de la posición 207, pudiera afectar el reconocimiento por parte de los anticuerpos, y que esta posición es un epítope

importante en el reconocimiento humoral (Ver figura 18). Es de destacar que la paciente R232 fue seropositiva únicamente al péptido 1E y la paciente R183 que fue seropositiva solo para los péptidos 3E y 4AAc, ambas pacientes son positivas al VPH16 AA, sugiriendo que algunas pacientes reconocen solo cierta región del virus (Ver figura 18).

Estos datos sugieren que el empleo de algunos péptidos correspondientes a las regiones con los porcentajes de seropositividad más altos, como los péptidos 3E y 4AAc, pudieran ser utilizados para detectar infección por VPH. Por otro lado de acuerdo con los datos obtenidos, sería interesante evaluar si los péptidos que tuvieron los porcentajes de seropositividad más altos en este estudio, son capaces de inducir una respuesta inmune protectora.

PRESENCIA DE ANTICUERPOS EN PACIENTES POSITIVAS AL VPH16 E.

Al comparar la presencia de anticuerpos contra péptidos derivados de la proteína L1 del VPH16 E y la presencia de anticuerpos contra péptidos derivados de la proteína L1 del VPH16 AA, en el suero de las pacientes con CaCu positivas para el VPH16 E, encontramos que estas pacientes, reconocen en igual proporción al péptido 3E y 4AAc, pero en menor proporción al péptido 5AAa (Ver tabla 9). Sin embargo, esta diferencia no es estadísticamente significativa ($p= 0.09$), y la absorbancia promedio fue similar para los tres péptidos en este grupo de pacientes (Ver figura 20A). Se puede pensar que el efecto estérico del aminoácido asparagina, el cual es más grande que el aminoácido treonina, o la diferencia en hidrofobicidad ($T=0.63$, vs $N= 0.44$), podrían afectar el reconocimiento por parte de los anticuerpos, sin embargo entre los péptidos 3E y 4AAc cuyas secuencias, solo tienen un aminoácido diferente, el reconocimiento fue el mismo. No obstante, entre el péptido 4AAc y el péptido 5AAa, cuyas secuencias también tienen un solo aminoácido diferente, se presenta una variación en el reconocimiento, aunque estadísticamente no significativa. Lo anterior sugiere que la mutación del aminoácido asparagina, en la posición 207 de la proteína L1 del VPH16 AAa, pudiera afectar el reconocimiento de los anticuerpos generados contra el VPH16 E (Ver tabla 4).

Por su parte, el porcentaje de mujeres con CaCu positivas para el VPH16 E que presenta anticuerpos contra el péptido 7AA fue el doble en comparación con las que presentan anticuerpos contra el péptido 6E (Ver tabla 9), sin embargo, esta diferencia no es estadísticamente significativa ($p= 0.1$). Esta diferencia en el porcentaje de seropositividad,

puede deberse a la enorme diferencia de tamaño y carga de los aminoácidos (Ver figura 14), o bien puede deberse a que estas mujeres estuvieron expuestas al virus AA, por lo cual presentan anticuerpos contra esta variante.

PEPTIDOS	Frecuencia n (%)	
	CANCER VPH16 E+ (n= 19)	CANCER VPH16 AA+ (n= 18)
1E	9 (47.36)	11 (60.5)
2E	8 (42.10)	7 (38.88)
3E	16 (84.16)	15 (82.5)
4AAc	16 (84.16)	14 (77)
5AAa	11 (57.89)	13 (72.22)
6E	6 (31.57)	5 (27.7)
7AA *	12 (63.15)	12 (66)
8E	7 (36.83)	7 (38.88)
9AA	10 (52.63)	7 (38.88)
10E	11 (57.89)	10 (55.55)
11AA	15 (78.9)	8 (44.4)
NUP	10 (52.63)	13 (72.22)

Tabla 9.- Comparación de la seropositividad entre el grupo de pacientes con Cáncer VPH16E+ y el grupo de pacientes con CaCu VPH16AA+. (*)El péptido 7AA, realmente también corresponde al VPH16 E, y el péptido 6E, prácticamente no está representado en los VPH16 (Ver sub-capítulo de resultados “Obtención de la secuencia completa del gen L1 del VPH16 AA-c”).

Por otro lado, el péptido 8E fue reconocido de manera similar ($p= 0.5$), en comparación con el péptido 9AA (Ver tabla 9), y a pesar de la enorme diferencia en peso molecular ($A= 71$, y $T= 101$), no se afecta el reconocimiento por parte de los anticuerpos. Sin embargo los resultados obtenidos con los ELISA's, muestran que las pacientes R081, R072 y R124 positivas al VPH16 E, son seropositivas para el péptido 9AA pero no para el péptido 8E, lo cual sugiere que estas pacientes estuvieron expuestas al virus AA, por lo que presentan anticuerpos contra esta variante.

a)

GRUPO	PEPTIDO											
	1E	2E	3E	4AA-c	5AA-a	6E	7AA	8E	9AA	10E	11AA	NUP
Cáncer VPH 16 E+	0.07	0.18	0.46	0.41	0.38	0.34	0.43	0.23	0.28	0.97	1.16	0.99
Cáncer VPH 16 AA+	0.14	0.28	0.79	0.7	0.75	0.49	0.54	0.30	0.32	0.84	0.67	1.44

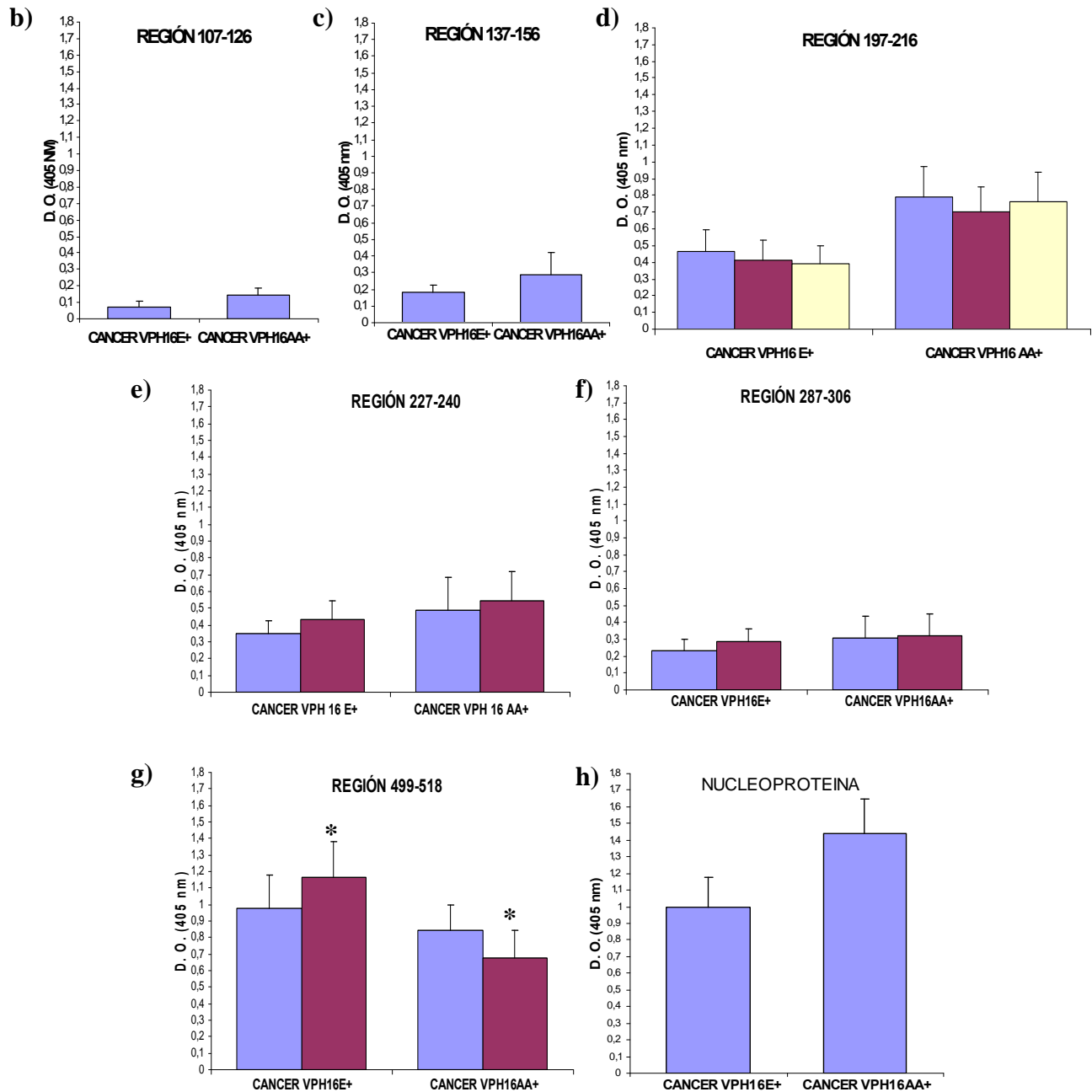


Figura 20 .- Comparación de los valores de absorbancia promedio, obtenidos con los ELISA's entre las pacientes con cáncer VPH16 E+ y pacientes con cáncer VPH16 AA+, para los péptidos homólogos del VPH16: **a)** Absorbancia promedio obtenida con cada péptido para los grupos positivos a la variante E y AA respectivamente; **b)** Péptido 1E, **c)** Péptido 2E, y **d)** Péptidos 3E, 4AA-c, y 5AA-a, **e)** Péptidos 6E y 7AA, **f)** Péptidos 8E y 9AA, **g)** Péptidos 10E y 11AA, * existe diferencia estadísticamente significativa entre estos valores ($P = 0.040$). **h)** Péptido derivado de Nucleoproteína. Los péptidos correspondientes a la secuencia de referencia (VPH16-E) aparecen en morado, los péptidos correspondientes a la secuencia del VPH16 AA-a aparece en color rojo, y los péptidos correspondientes a la secuencia del VPH16 AA-c aparece en amarillo.

Interesantemente, aparentemente existe un mayor porcentaje de seropositividad, hacia el péptido 11AA que al péptido 10E (Ver tabla 8), sin embargo esta diferencia no es estadísticamente significativa ($p= 0.3$), las pacientes positivas al virus E, reconocen mejor al péptido derivado del virus AA, ya que de acuerdo a los resultados de los ELISA's, las pacientes R229, R250, R070 y R089, positivas para el virus E, son seropositivas al péptido 11AA pero no al péptido 10E (Ver figura 18). Lo cual, al igual que los casos mencionados en el párrafo anterior, sugiere que estas pacientes ya habían estado expuestas al VPH16 AA ó algún tipo de VPH cuya secuencia es similar a la del péptido 11AA.

En todos los casos los valores de absorbancia promedio fueron similares entre péptidos homólogos (Ver figura 20(a-g). Por su parte, los péptidos 1E y 2E fueron reconocidos en similar proporción por este grupo de pacientes, sin embargo la absorbancia promedio observada para el péptido 2E fue más del doble de la absorbancia promedio para el péptido 1E (Ver figura 20A).

PRESENCIA DE ANTICUERPOS EN PACIENTES POSITIVAS AL VPH16 AA.

Al comparar la presencia de anticuerpos contra péptidos derivados del VPH16 E y la presencia de anticuerpos contra péptidos derivados del VPH16 AA, en el suero de las paciente con CaCu positivas para el VPH16 AA, encontramos que estas pacientes presentan anticuerpos que reconocen en similar proporción a los péptidos 3E, 4AAc y 5AAa (Ver tabla 9), y no existe diferencia estadísticamente significativa ($p= 0.2$).

Por su parte, solo el 27% de las mujeres con CaCu positivas al VPH16 AA reconocen al péptido 6E, en comparación mas del 60% de estas mujeres reconocen al péptido 7AA (Ver tabla 9), la diferencia es estadísticamente significativa ($p= 0.04$), lo cual indica que la mutación H228D si afecta el reconocimiento de los anticuerpos generados contra la secuencia del virus E de referencia, no obstante y como ya se mencionó anteriormente, la secuencia L1 del VPH16 E de referencia no es representativa.

Las pacientes con cáncer positivas al VPH16 AA, presentan anticuerpos en la mismas proporción contra los péptidos 8E y 9AA (Ver tabla 9). Al realizar un análisis más detallado

de los resultados obtenidos con los ELISAS's, se encontró que, las pacientes R216, R094 y R170 son seropositivas al péptido 9AA pero no al péptido 8E, en contraste las pacientes R115, R158 y R221 son seropositivas al péptido 8E pero no al 9AA (Ver figura 18). Lo anterior refuerza la teoría de que existen factores no virales, posiblemente las características genéticas de cada individuo, los cuales favorecen o afectan el reconocimiento del VPH por parte de los anticuerpos.

Por otro lado, las mujeres positivas para el virus AA reconocen mejor al péptido 10E, que a su homólogo el péptido 11AA (Ver tabla 9), aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa ($p= 0.7$), solo 5 de los 13 casos en que hubo seropositividad a alguno de estos dos péptidos, fueron seropositivos para ambos, lo cual sugiere que una parte de estas pacientes reconocen de manera diferencial a estos péptidos.

Cabe mencionar que un mayor número de pacientes fueron seropositivas al péptido 1E, en comparación con el número de pacientes seropositivas al péptido 2E, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa, contrasta con el hecho de que, la absorbancia registrada para el péptido 2E fue el doble de la registrada para el péptido 1E (Ver tabla 9 y figura 20A).

COMPARACIÓN DE LA SEROPOSITIVIDAD DE PACIENTES POSITIVAS AL VPH16 E CON LA SEROPOSITIVIDAD DE PACIENTES POSITIVAS AL VPH16 AA.

Al comparar la seropositividad encontrada en el suero de pacientes con CaCu positivas al virus E, contra la seropositividad encontrada en pacientes con CaCu positivas al virus AA, encontramos que para casi todos los péptidos la seropositividad es similar ($p=0.6$ a $p=1.0$), a excepción del péptido 11AA, para el cual casi todas las pacientes VPH16 E positivas, son seropositivas, en contraste, menos de la mitad de las mujeres positivas al VPH16 AA, son seropositivas a este péptido derivado del virus VPH16 AA (Ver tabla 9), en este caso la diferencia si es estadísticamente significativa ($p= 0.05$). En cambio, no existe diferencia significativa, entre la seropositividad encontrada hacia el péptido 10E por ambos grupos de pacientes (Ver tabla 9).

Es de destacar, que las mujeres con CaCu positivas para el VPH16 AA, si reconocen de manera diferente al péptido 6E, y al péptido 7AA ($P=0.04$), sin embargo, las pacientes con CaCu positivas al VPH16 E, reconocen de manera similar a los péptidos 6E y 7AA ($P= 0.1$). El hecho de que una paciente con CaCu positiva para el VPH16 AA, tenga anticuerpos que reconocen al péptido 6E derivado del VPH16 E, pero que no reconocen al péptido 7AA derivado del VPH16 AA, puede deberse a que estas mujeres pudieran haber estado expuestas al VPH16 E.

En cuanto a la absorbancia registrada con el péptido 1E en pacientes VPH16 AA fue el doble de la registrada en pacientes VPH16 E, caso contrario ocurre con la absorbancia registrada con el péptido 11AA en pacientes VPH16 E, la cual fue casi el doble de la registrada en pacientes VPH16 AA. Las pacientes con CaCu positivas para el VPH16 AA presentan mayor absorbancia promedio, para la mayoría de los péptidos, en comparación con las pacientes con CaCu positivas al VPH16 E, lo cual sugiere que las pacientes con VPH 16 AA generan más anticuerpos que las pacientes con VPH16 E. A excepción de los péptidos 10E y 11AA, para los cuales las pacientes con el virus E presentan mayor absorbancia promedio (Ver figura 21).

De manera general, las pacientes positivas al virus E reconocen mejor a los péptidos 9 y 11 derivados del virus AA, en comparación con los péptidos 8 y 10 derivados del virus E. En cambio, las pacientes positivas al virus AA reconocen en similar proporción a todos los péptidos (Ver tabla 9).

La edad de las mujeres con CaCu positivas para el VPH16 E, es de los 31 a los 74 años, con un promedio de 50.63 años, de manera similar, la edad de las mujeres con CaCu positivas para el VPH16 AA, es de los 30 a los 70 años, con un promedio de 50.60 años; Mientras que la edad de las mujeres positivas para el VPH16, pero que no presentan lesiones genitales (CP), es de los 36 a los 68 años, con un promedio de 49.27 años, por último la edad de las mujeres a las que no se les detectó el VPH16 (CN), es de los 32 a los 48 años, con un promedio de 43.2 años, este último grupo de mujeres, son en promedio 6.3 años más jóvenes que las mujeres que presentan VPH16, sin embargo en este estudio no se encontró relación entre la seropositividad al VPH y la edad, en ningún grupo.

COMPARACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL ENTRE LOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDIO.

En todos los grupos analizados existe similar reconocimiento hacia los péptidos derivados del VPH16 E y sus homólogos del VPH16 AA. Por su parte las pacientes con cáncer, presentaron los valores más altos tanto de seropositividad, como de absorbancia, y el grupo control (Niños) presentó los valores más bajos (Ver figura 18 y figura 20). De manera general se observó aumento de la presencia de anticuerpos contra L1 conforme aumenta la gravedad de la enfermedad

Entre el grupo de mujeres con cáncer y el grupo de mujeres sanas VPH16+, sólo con el péptido 9AA se registró una diferencia estadísticamente significativa, tanto en la absorbancia promedio ($p=0.02$) como en la frecuencia de seropositividad ($p<0.05$), pero no ocurrió lo mismo con el péptido 8E, tanto en la absorbancia promedio ($p=0.10$) (Ver figura 21), como en la seropositividad ($p=0.1$) (Ver tabla 10). Resulta interesante que solo una mujer sana VPH16+ fue seropositiva a estos péptidos (Ver figura 18B), lo cual puede sugerir que estas pacientes no reconocen esta región del virus, sin embargo son necesarios más estudios para poder confirmar o rechazar esta hipótesis.

Tanto en el grupo de mujeres con cáncer VPH16+, como en el grupo de mujeres sanas VPH16+, las regiones más antigénicas fueron la 197-216, 227-240 y la 499-518, sin embargo en el caso de las mujeres sanas VPH16-, la región 227-240, fue la más antigénica, seguida por la región 197-216, lo cual sugiere, que el péptido 7AA, correspondiente a esta región, junto con los péptidos 3E y 4AAc, con los cuales se tuvieron los mayores porcentajes de seropositividad, podrían utilizarse como marcadores para la detección del VPH (Ver tabla 10).

En promedio el 33.6% de las mujeres sanas VPH16+, y 30% de las mujeres sanas VPH16- presentaron anticuerpos contra péptidos derivados del VPH16 (Ver tabla 10), pero no presentan lesiones en el área genital, posiblemente debido a que estas pacientes están infectadas por VPH, pero en un sitio distinto al área genital o el virus es eficientemente controlado por el sistema inmune y no produce lesiones.

Entre el grupo de mujeres con cáncer y el grupo de mujeres sanas VPH-, se registro una diferencia estadísticamente significativa en el número de casos seropositivos con los péptidos 1E, 2E, 3E, 6E y 11AA (Ver tabla 10) y respecto a la absorbancia promedio con los péptidos 2E, 10E y 11AA (Ver figura 20). En estos grupos también se encontró que algunas mujeres solo reconocen péptidos del virus AA (C141, C294, C310), pero no del virus E (Ver figura 18).

Por su parte el 63% de las mujeres VPH16+ y el 90% de las mujeres VPH16-, reconocen al péptido 7AA, pero sólo la mujer VPH16+ CP309, reconoce al péptido 6E. Por otro lado, las mujeres VPH16+, reconocen mejor al péptido 11AA, que al péptido 10E, en contraste, el grupo de mujeres sanas VPH16- reconoce mejor al péptido 10E que al péptido 11AA, sin embargo dichas diferencias no son estadísticamente significativas (Ver tabla 10).

Respecto al grupo control y como puede verse en la figura 18B, el 3% del grupo de niños menores de 8 años, fueron seropositivos, esto puede deberse a que estos niños pueden presentar infección por VPH o anticuerpos de memoria maternos contra el VPH, como ha sido descrito por algunos investigadores (Cason y cols 1992).

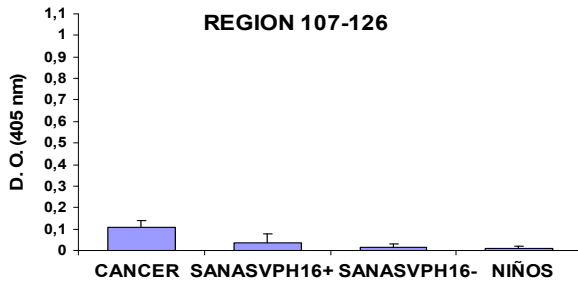
PEPTIDOS	Frecuencia n (%)		
	CANCER VPH16+ (n= 37)	SANAS VPH16+ (n= 11)	SANAS VPH16- (n= 10)
1E	20 (54)	3 (27.27)	0 (0) b
2E	15 (40.54)	2 (18.18)	0 (0) b
3E	31 (83.78)	6 (54.54)	5 (50) a
4AAc	30 (81)	7 (63.63)	5 (50)
5AAa	24 (64.86)	6 (54.54)	4 (40)
6E	11 (29.72)	1 (9.09)	0 (0) a
7AA *	24 (64.86)	7 (63.63)	9 (90)
8E	14 (37.83)	1 (9.09)	3 (30)
9AA	17 (45.95)	1 (9.09) a	3 (30)
10E	21 (56.75)	4 (36.36)	3 (30)
11AA	23 (62.16)	6 (54.54)	1 (10) b
NUP	23 (62.16)	6 (54.54)	1 (10) T

Tabla 10.- Comparación de la seropositividad entre los diferentes grupo. (*)El péptido 7AA, realmente también corresponde al VPH16 E, y el péptido 6E, prácticamente no esta representado en los VPH16 (Ver sub-capítulo de resultados "Obtención de la secuencia completa del gen L1 del VPH16 AA-c"). **a** significa una $p < 0.05$, y **b** significa $p < 0.01$, obtenida por medio de la prueba de Fisher.

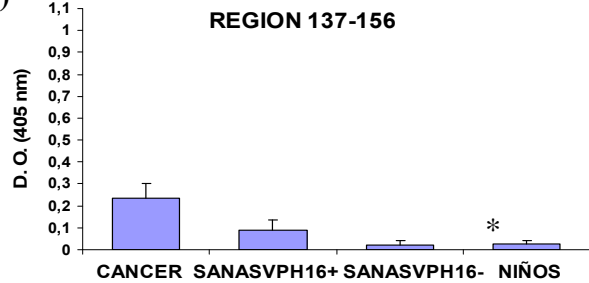
a)

GRUPO	PEPTIDO												
	1E	2E	3E	4AA-c	5AA-a	6E	7AA	8E	9AA	10E	11AA	NUP	
CANCER	0.10	0.23	0.62	0.55	0.56	0.41	0.48	0.26	0.3	0.9	1.83	1.2	
SANAS VPH16+	0,03	0,08	0,32	0,35	0,43	0,19	0,35	0,09	0,09	0,47	0,54	1,09	
SANAS VPH16-	0,01	0,02	0,35	0,39	0,27	0,17	0,42	0,15	0,17	0,46	0,24	0,47	
NIÑOS	0,01	0,02	0,06	0,06	0,06	0,13	0,11	0,05	0,05	0,2	0,18	0,56	

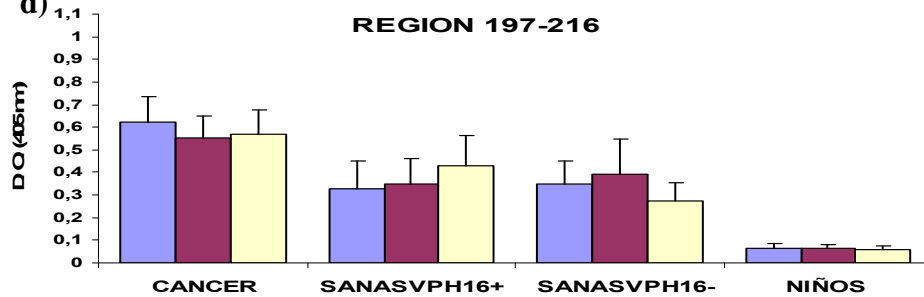
b)



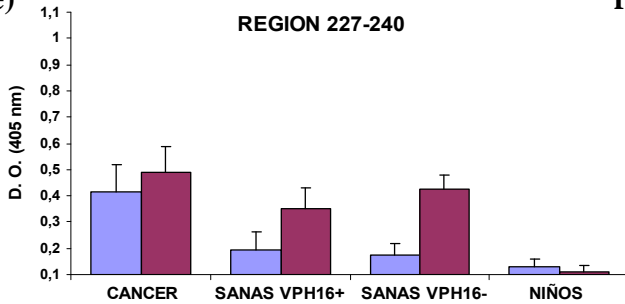
c)



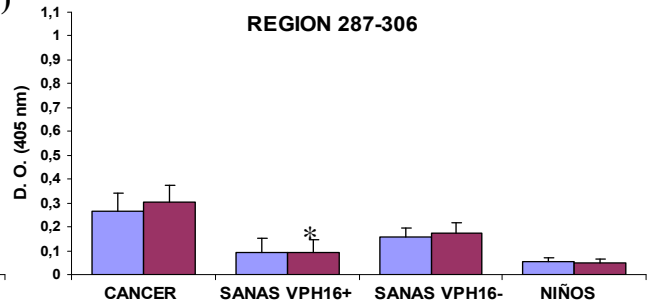
d)



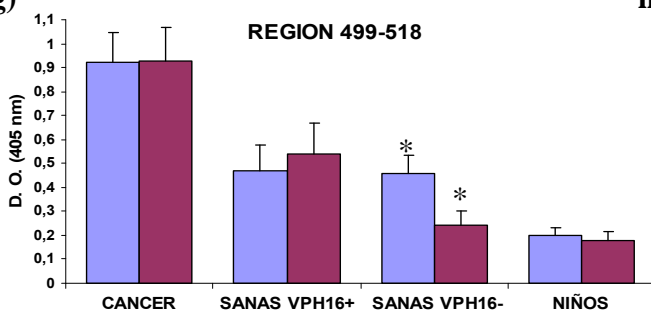
e)



f)



g)



h)

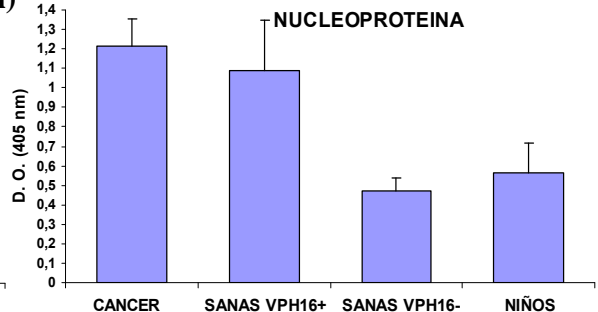


Figura 21.- Comparación de los valores de absorbancia promedio, obtenidos con los ELISA's, entre los diferentes grupos para los péptidos homólogos del VPH16-E ■, -AA-a ■, -AA-c ■. **a)** Absorbancia promedio obtenida con cada péptido en cada grupo, **b)** Péptido 1E, **c)** Péptido 2E, y **d)** Péptidos 3E, 4AA-c y 5AA-a, **e)** Péptido 6E y 7AA, **f)** Péptido 8E y 9AA, **g)** 10E y 11AA, **h)** Péptido derivado de la Nucleoproteína de Influenza. * significa una $p < 0.05$ respecto del grupo de cáncer.

ANÁLISIS DE RESULTADOS.

Al secuenciar el gen L1 del VPH16 AA-c completo, y hasta ahora desconocido, encontramos que la secuencia obtenida de cada una de las cuatro muestras positivas para el VPH16 AA-c, son iguales en un cien por ciento. En comparación la secuencia del gen L1 obtenida de la muestra positiva al VPH16 E (R47), difiere en dos posiciones de la secuencia del gen L1 del VPH16 E de referencia. Por su parte, la secuencia del gen L1 obtenida de la muestra positiva para el VPH16 AA-a (R221), difiere en una posición, respecto de la secuencia del gen L1 del VPH16 AA-a de referencia (Ver tabla 3). Sugiriendo que la secuencia del gen L1 del VPH16 AA-c, es muy conservada a diferencia de la secuencia del gen L1 del VPH16 E, o de la secuencia del gen L1 del VPH16 AA-a, de las cuales existen diversas variantes (Yamada y cols. 1997).

Solo 7 de las 19 mutaciones encontradas en el gen L1 del VPH16 AA-c, causan cambios en la secuencia de la proteína, en comparación 9 de las 19 mutaciones encontradas en el gen L1 del VPH16 AA-a, causan cambios en la secuencia de la proteína, respecto de la secuencia de la proteína L1 del VPH16 E de referencia. Sugiriendo, que el VPH16 AA-c, tiene mayor similitud al VPH16 E, en comparación con el VPH16 AA-a.

No fue posible analizar la primera de estas mutaciones (Q2E), ya que no se encuentra representada en la estructura cristalizada de la proteína. Tampoco se han descrito epítopes inmunológicos, debido posiblemente a que la región amino terminal donde se localiza dicha mutación, queda en la parte interna de la cápside. Sin embargo, esta región determina el tamaño de la VLP que se forma (Chen y cols. 2000), por lo que en estudios más específicos, sería interesante estudiar el efecto de esta mutación en la estructura de la cápside del VPH16.

La mutación H102Y, ocurre en una posición muy variable, entre diferentes tipos virales. Esta mutación, ocasiona la pérdida de algunas interacciones de este aminoácido con otros aminoácidos del mismo monómero (Ver figura 12). Debido a que el sitio donde se localiza dicha mutación, no queda expuesto en la superficie de la cápside, y no se han descrito

epítopes inmunológicos, no se utilizó ningún péptido que incluyera esta posición en su secuencia, no obstante, sería interesante analizar su efecto en la estructura de la cápside.

En el asa E-F de la proteína, se localizan 3 de las 9 mutaciones, encontradas en la proteína L1 del VPH16 AA (Ver figura 10), dos de ellas a menos de 5 aminoácidos de distancia, las mutaciones T202N y N207T, localizadas en sitios donde la proteína se pliega (Ver figura 13). Como ya se mencionó la mutación T202N, se localiza en una posición muy variable entre los tipos virales mas frecuentes (Ver tabla 4), dicha mutación no causa cambio en la estructura de la proteína L1 (Ver figura 13).

Por su parte, la mutación N207T, presente en el VPH16 AA-a, pero no en el VPH16 AA-c, afecta las interacciones, de este aminoácido con otros del mismo monómero (Ver figura 13), lo cual pudiera afectar la formación de VLP's, o el reconocimiento de los anticuerpos. Esta mutación se localiza en una posición variable entre tipos virales de alto riesgo, pero muy conservada entre tipos virales de bajo riesgo (Ver tabla 4), lo cual sugiere que la variabilidad le permite evadir la respuesta inmune, por lo que las mutaciones en esta región, pueden afectar seriamente el reconocimiento por parte de los anticuerpos.

La mutación H228D, localizada en el asa E-F (Ver figura 10), ocurre en una posición importante en la interacción con otros monómeros de la proteína L1, esta mutación aumenta 100 veces la formación de VLP's (Kirnbauer y cols. 1993). Este hecho pudiera estar relacionado a la mayor oncogenicidad de la variante AA, respecto de la variante E de referencia. La imagen obtenida con el programa swiss model muestra cambios en los enlaces de este aminoácido (Ver figura 14), lo cual pudiera afectar la formación de la cápside y el reconocimiento por parte de los anticuerpos, ya que en esta región se han descrito varios epítopes humorales (Jenison y cols. 1989; Dillner y cols. 1990; Heino y cols. 1990).

La mutación T292A es otra de las 9 mutaciones encontradas en el VPH16 AA, esta se localiza en el asa F-G, en una posición conservada entre diferentes tipos virales (Ver tabla 4), no obstante la imagen de la estructura terciaria de esta mutación (Ver imagen 9), no muestra cambios en la estructura de la proteína, o los enlaces entre aminoácidos como consecuencia de dicha mutación. Esta mutación ocurre en una región de unión entre pentámeros, la cual puede quedar relativamente expuesta en la superficie de la cápside

(Chen y cols. 2000), como lo sugiere el hecho de que en esta región se localizan varios de los péptidos descritos en la literatura (Ver tabla 5 y figura 17), por lo cual se investigó si esta mutación afecta el reconocimiento por parte de los anticuerpos.

Por su parte la mutación T379P, la cual ocurre en una posición poco variable, en el loop H-I de la proteína L1 el cual interactúa con otros pentámeros, no genera cambios en la estructura de la proteína, dicha mutación, se localiza en una posición donde la proteína se pliega (Ver figura 14), por lo cual la interacción con otros pentámeros de la proteína L1 pudiera verse afectada, y alterar la formación de la cápside. En esta región no se han descrito epítopes inmunológicos, posiblemente debido a que esta región no queda expuesta en la superficie (Chen y cols. 2000).

La mutación T415S, la cual ocurre en una posición conservada de la proteína, causa cambios en los enlaces entre el aminoácido de esta posición y otro del mismo monómero (Ver figura 15), esta mutación ocurre en una posición de unión entre pentámeros, por lo que pudiera afectar la formación de la cápside. Por otro lado, no se han descrito péptidos que incluyan esta posición de la proteína.

La mutación L500F, ocurre en una posición conservada entre diferentes tipos virales de VPH, no obstante que las características bioquímicas de los dos aminoácidos son muy similares, la fenilalanina presenta un anillo aromático, el cual puede afectar la interacción de este aminoácido con otros del mismo monómero o la estabilidad de la cápside, ya que esta región se ha descrito ser importante para dicha estabilidad (Chen y cols. 2000). Esta región se proyecta al interior de la cápside y probablemente interactúa con el DNA viral (Zhou y cols. 1991), no obstante se ha descrito un péptido lineal (499-518), el cual incluye esta posición (Cason y cols. 1992; Combata y cols. 2002; Bousarghin 2003), por lo cual éste péptido se utilizó en este estudio para analizar el efecto de esta mutación en el reconocimiento humoral.

Después de obtener la secuencia completa del gen L1 del VPH16 AA-c, haber determinado las mutaciones entre los genes L1 del VPH16 AA-a y L1 del VPH16 AA-E y sus respectivas proteínas (Ver tabla 3), así como su ubicación dentro de las mismas y el efecto que estas mutaciones causan en la estructura terciaria de la proteína (Ver figuras 6-10), se investigó,

por medio de la técnica de ELISA, si estas mutaciones afectan el reconocimiento de los anticuerpos generados contra la proteína L1 del VPH16 E. Los resultados obtenidos con los ELISAS's, al analizar el suero de mujeres con diferente grado de infección por VPH16, permitieron analizar el efecto de las mutaciones encontradas en la proteína L1 de los VPH16 AA.

Los péptidos 1E y 2E cuyas secuencias son las mismas en el VPH16 E y VPH16 AA (Ver tabla 2), corresponden a regiones de la proteína poco antigénicas (Ver figura 17), lo cual concuerda con los resultados de este estudio, ya que estos péptidos, tuvieron los valores de absorbancia más bajos (Ver figura 21). Estos péptidos sirvieron para analizar la diferencia en el reconocimiento por parte de los anticuerpos generados contra el VPH16 E o contra el VPH16 AA, hacia diferentes regiones de la proteína L1 del VPH16, sin que influyan en ello algunas mutaciones. Los resultados sugieren que existen factores virales y no virales involucrados en el reconocimiento del virus por parte de los anticuerpos. Si bien la diferencia en cuanto a seropositividad no es significativa (Ver tabla 8), la diferencia en cuanto a absorbancia, es más del doble (Ver figura 21), lo cual sugiere que existen regiones mejor reconocidas que otras.

Los resultados obtenidos con los péptidos 3E, 4AAc y 5AAa, al analizar el suero de pacientes con CaCU positivas para el VPH16 E, permiten analizar el efecto que causa el cambio de un aminoácido en una posición determinada, como se puede observar en la tabla 10, el cambio de un aminoácido (T202N), en la secuencia del péptido 4AAc, respecto de la secuencia del péptido 3E, el cual no afecta el reconocimiento de los anticuerpos (ver tabla 8), de este grupo de pacientes.

En contraste al mutar el aminoácido en la posición 207 (N207T), en el péptido 5AAa, respecto de la secuencia del péptido 3E, se genera un cambio en el número de pacientes seropositivas, lo cual puede estar relacionado al cambio de las interacciones entre el aminoácido de la posición 207 a consecuencia de la mutación de esta posición (Ver figura 13), sugiriendo que la mutación del aminoácido N en la posición 207 de la proteína L1, pudiera afectar el reconocimiento de los anticuerpos. La anterior información, y el hecho de que dicha posición es muy conservada entre virus de bajo riesgo (Ver tabla 4), pero no en tipos virales de alto riesgo, sugiere que esta posición puede ser importante para el reconocimiento por parte del sistema inmune humoral, y que los virus que evolutivamente

han sufrido mutación en esta posición, logran escapar al reconocimiento humoral aumentando el riesgo de generar CaCu.

Por otro lado, dado que esta diferencia se presenta únicamente en el grupo de mujeres con CaCu positivas para el VPH16 E, y no entre el grupo de mujeres con CaCu positivas para el VPH16 AA, ni con ningún otro de los grupos (ver tabla 9 y 11), y dado que la región donde se localiza dicha mutación, probablemente queda expuesta en la superficie de la cápside (Chen y cols. 2000), es posible que el componente genético de las mujeres con CaCu positivas para el VPH16 E, influya en el menor reconocimiento del péptido derivado de la variante AA-a. Se sugiere analizar, en futuros estudios, un mayor número de muestras para corroborar si esta diferencia se mantiene. También, sería interesante analizar el componente genético de mujeres positivas para el VPH16 E y compararlo con el de mujeres positivas para el VPH16 AA, para determinar como influye el componente genético encargado de codificar la región variable de los anticuerpos en el reconocimiento humoral.

La mutación H228D, fue explorada con los péptidos 6E y 7AA (Ver tabla 10), cabe recordar que las secuencias obtenidas en este estudio (Ver tabla 3), y los tipos mas frecuentes de VPH (Ver tabla 4), presentan un aminoácido D, en la posición 228 (Ver tabla 4), lo cual se ve reflejado en los resultados obtenidos con los ELISA's, ya que el péptido 7AA es 2.3 veces mejor reconocido, en comparación con el péptido 6E. Esta diferencia es estadísticamente significativa ($P=0.005$), llama la atención, que el péptido 6E tuvo la seropositividad mas baja de los once péptidos utilizados en este estudio, y el péptido 7AA tuvo la tercera seropositividad mas alta de los once péptidos, no obstante la absorbancia promedio fue similar para los dos péptidos, fue la segunda región mejor reconocida por los anticuerpos (Ver tabla 10).

La región de la cual deriva el péptido 7AA (227-240), ha sido descrita como la región mejor reconocida por los anticuerpos de toda la proteína L1, (Dillner y col 1990; Heino y col 1995), sin embargo en este estudio, encontramos que la región de la cual derivan los péptidos 3E, 4AAc y 5AAa (197-216), es la región mejor reconocida de toda la proteína (Ver tabla 10).

Casi todos los casos en que hubo seropositividad al péptido 6E, también la hubo al péptido 7AA (93%), en contraste, solo algunos de los casos en que hubo seropositividad al péptido 7AA también la hubo al péptido 6E (33%). Algunas mujeres con CaCu positivas al VPH16,

reconocen al péptido 6E, en contraste, en el resto de los grupos, solo una mujer que no presenta lesión pero que es positiva para el VPH16 E lo reconoce, puesto que los péptidos usados, son los mismos en todos los grupos, la diferencia en el reconocimiento puede deberse a que estas mujeres ya habían estado expuestas al virus y presentan anticuerpos de memoria.

Un análisis más detallado de los resultados, permite observar que, las únicas dos pacientes con CaCu, seropositivas al péptido 6E, pero no al 7AA (Ver figura 18A), reconocen 3 veces mejor (Absorbancia mayor), al péptido 6E, en comparación con el péptido 7AA, lo cual sugiere que estas pacientes, presentan anticuerpos específicos contra la secuencia del péptido 6E derivado de la proteína L1 del VPH16 E de referencia (Ver figura 18C). El cual es muy poco frecuente, por lo que sería conveniente, incluir en el diseño de vacunas contra VLP's del VPH, las variantes mas frecuentes en cada población, en el caso específico de la población mexicana las variantes del VPH16 que incluyan una D en la posición 228 de la proteína L1. En la figura 18C, se puede observar que existe reconocimiento del péptido 6E, pero es muy débil, posiblemente debido a que la secuencia en su mayoría si es reconocida, pero el aminoácido H en la posición 228, afecta la unión de los anticuerpos, razón por la cual el reconocimiento por parte de los anticuerpos se ve afectado.

Al analizar los datos llama la atención que el 90% de las mujeres a las cuales no se les detecto VPH16, son seropositivas al péptido 7AA (Ver tabla 10), sin embargo esto se puede explicar, si se considera que los tipos de VPH más frecuentes, presentan un ácido aspártico (D), en la posición 228 (Ver tabla 6), esta región es altamente conservada entre estos tipos virales (Ver tabla 5), y además, es una región descrita como un importante epítotope humoral (Dillner y cols 1990). Por lo que es posible que estas pacientes hayan estado expuestas al VPH16 en alguna etapa de su vida, lograron controlar la infección y ahora presentan anticuerpos de memoria, lo cual fortalece la propuesta de usar al péptido 7AA para detectar infecciones por VPH.

Respecto a la mutación T292A, la cual fue analizada con los péptidos 8E y 9AA (Ver tabla 2), no se encontró diferencia, ni en cuanto a la seropositividad (Ver tabla 10), ni en cuanto a la absorbancia (Ver figura 20), entre estos dos péptidos. El Hecho de que la enorme diferencia en el peso molecular no afecte el reconocimiento humoral, de esta secuencia, sugiere que la posición, donde se localiza una mutación puede ser igual o más importante que las propiedades del aminoácido por el que cambia. Por otro lado llama la atención, que sólo con el péptido 9AA se encontró una diferencia estadísticamente significativa, entre el

grupo de mujeres con CaCu positivas para el VPH16 y el grupo de mujeres sanas positivas para el VPH16, pero no ocurre lo mismo con el péptido 8E.

Por su parte la mutación L500F, en el extremo carboxilo de la proteína L1, cuya posición es altamente conservada entre diferentes tipos virales (Ver tabla 6), fue analizada con los péptidos 10E y 11AA (Ver tabla 2), con estos péptidos se obtuvieron los valores de absorbencia mas altos (Ver figura 18D) y no existe diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la seropositividad hacia estos dos péptidos. No obstante las pacientes con CaCu positivas para el VPH16 E, reconocen mejor al péptido 11AA, que las pacientes positivas para el VPH16 AA (Ver tabla 9), lo cual puede sugerir que estas pacientes positivas para el VPH16 E, ya habían estado en contacto con el VPH16 AA, o que la secuencia del péptido 11AA es mas susceptible de ser reconocida por anticuerpos generados contra otro tipo viral.

De manera general, las pacientes con CaCu, reconocen en promedio a 6 de los 11 péptidos, el doble del número promedio de péptidos que reconocen las mujeres negativas para el VPH16 (CN).

En promedio los péptidos derivados del VPH16 E, son reconocidos en proporción similar a los péptidos derivados del VPH16 AA, tanto por las pacientes con CaCu positivas para el VPH16E, como por las pacientes con CaCu positivas para el VPH16 AA, de manera similar ocurre en el resto de los grupos de estudio (Ver figura 18), lo cual indica que los anticuerpos generados contra el VPH16 E reconocerán, también a la variante AA y viceversa.

Por otra parte, los resultados de los ELISA´s permiten observar que, algunas regiones, son mejor reconocidas que otras (Ver figura 19), lo cual puede ser de utilidad en el diseño de nuevas vacunas contra el VPH, ya que tal vez no sea necesario incluir la cápside o la proteína L1 completa para generar anticuerpos contra la cápside del VPH, lo cual hasta la fecha, es muy difícil y costoso, por lo que no todas las personas pueden pagarlos. Sin embargo se podría utilizar una combinación de los péptidos derivados de las regiones más antigénicas y con los cuales se obtuvieron los porcentajes de seropositividad, más altos, como los péptidos 3E, 4AAc, 7AA y 11AA (Ver tabla 10), y con ellos podría ser suficiente para generar una vacuna contra el VPH, la cual sería más fácil de obtener y económicamente más accesible para un mayor número de personas.

Una combinación de péptidos que incluyeran cuando menos los péptidos 3E, 7AA, y 11AA, podrían ser suficiente para detectar infección por VPH16, ya que el 98% de las muestras de suero de mujeres con VPH16, que se analizaron en este estudio, presentan anticuerpos contra al menos uno de estos tres péptidos, y el 66% contra dos de estos tres péptidos.

La diferencia estadísticamente significativa, encontrada entre el grupo de mujeres con CaCu positivas para el VPH16 y el grupo de mujeres sanas negativas para el VPH16, con varios péptidos (Ver tabla 10), entre los que se encuentran los péptidos 3E y 11AA, sugiere que estos péptidos podrían utilizarse como marcadores para la detección específica del VPH16.

Es posible que péptidos derivados de regiones conservadas entre diferentes tipos virales, puedan utilizarse en el diseño de una vacuna capaz de generar anticuerpos contra diferentes tipos virales, ya que la proteína L1 del VPH16, contiene epítopes antigénicos comunes en varios tipos de VPH (Heino y cols. 1995; Combita y cols. 2002).

Cabe mencionar que se encontró una mayor seropositividad entre los grupos, conforme aumenta la severidad de la infección por VPH, incluso en el grupo de pacientes con CaCu, la absorbancia promedio se encuentra por arriba del punto de corte, lo cual pudiera estar relacionado al hecho de que los sueros de algunas mujeres, contienen anticuerpos que reconocen péptidos de algunas regiones pero no de otras (Ver figura 18), este hecho es menos frecuente conforme aumenta la infección por VPH16, sugiriendo que ciertas regiones son reconocidas en etapas mas tempranas de la infección.

CONCLUSIONES.

1.- Los objetivos de este estudio se cumplieron, ya que permitió conocer la secuencia completa de la proteína L1 del VPH16 AA-c, de alta frecuencia en México la cual hasta ahora era desconocida.

2.- Siete de las diecinueve mutaciones en el gen, repercuten en la proteína AA-c, la cual tiene mayor similitud con la secuencia de la proteína L1 del VPH16 E, que la secuencia de la proteína L1 del VPH16 AA-a (con 9 mutaciones).

3.- Algunas de las mutaciones, presentes en la proteína L1 de los VPH16 AA's, modifican algunos enlaces entre los aminoácidos, lo cual pudiera influir en la formación de las partículas virales, ya que se localizan en regiones de unión con otros monómeros de la proteína L1. Otras pudieran afectar la unión al ADN humano, sin embargo se requieren estudios específicos al respecto.

4.- Se encontró una elevada presencia de anticuerpos contra los péptidos derivados de la proteína L1 del VPH16 en pacientes con CaCu. La cantidad de anticuerpos contra L1 aumenta, conforme aumenta la gravedad de la infección por VPH.

5.- No existe diferencia estadísticamente significativa en el reconocimiento de péptidos derivados del VPH16E y Péptidos derivados del VPH16AA, por parte de los anticuerpos generados en pacientes positivas al VPH16 E o al VPH16 AA.

6.-Estos resultados sugieren que la vacunación basada en VLP's del gen L1 del VPH16E pudieran proteger a la mayoría de las mujeres mexicanas, contra eventuales infecciones por las variantes VPH16 AA-a o VPH16 AA-c, sin embargo hacen falta estudios más específicos.

7.- De acuerdo a la heterogeneidad de reconocimiento observada en las pacientes infectadas por el VPH16 AA-a o VPH16 AA-c, los péptidos 3E, 4AAc, 7AA y 11AA, pudieran utilizarse como marcadores, en pruebas de detección del VPH.

8.- Algunas pacientes reconocen mejor algunas regiones que otras, y regiones que para algunas pacientes pueden ser muy antigénicas para otras no y viceversa, lo cual destaca la importancia de las características genéticas de cada persona.

BIBLIOGRAFÍA.

- Applera Corporation 2001. http://www.bionet.nsc.ru/gep/materials/Primer_Express_V2.html.
- Bhattacharya P, Sengupta S. Lack of evidence that proline homozygosity at codon 72 of p53 and rare arginine allele at codon 31 of p21, jointly mediate cervical cancer susceptibility among Indian women. *Gynecol Oncol*. 2005. 99:176-82.
- Baker T. S, W W Newcomb, N H Olson, L M Cowser, C Olson, and J C Brown. Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys J*. 1991. 60: 1445–1456.
- Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol*. 2005. 32:S16-24.
- Berumen J, Ordóñez RM, Lazcano E, Salmeron J, Galván SC, Estrada RA, Yunes E, García-Carranca A, González-Lira G, Madrigal-de la Campa A. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J Nat Cancer Inst*. 2001. 93:1325-30.
- Berumen Campos Jaime. Nuevos Virus del Papiloma Humano descubiertos en México: su asociación a la alta incidencia del cáncer del cerviz. *Gaceta Médica Mexicana*. 2003. 139:3-9
- Bergeron C., Barrasso R., Beaudenon S., Flamant P., Croissant O. and Orth G. Human papillomaviruses associated with cervical intraepithelial neoplasia: Great diversity and distinct distribution in low-and high-grade lesions. *Am J Surg Pathol*. 1992. 16:641-649.
- Beskow AH, Engelmark MT, Magnusson JJ, Gyllensten UB. Interaction of host and viral risk factors for development of cervical carcinoma in situ. *Int J Cancer*. 2005. 117:690-2.
- Bosch F.X., Manos M. N., Sherman M., Jansen A.M., Peto J., Schiffman M.H., Moreno V., Kurman R. and SHAH K.V. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Nat Cancer Inst*. 1995. 87:796-802.
- Bosch F. X, A. Lorincsz, N Muñoz, C J L M Meijer and K V Shah. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J. Clin. Pathol*. 2002. 55:244-265.
- Bousarghin L, Touzé A, Combita-Rojas AL, Coursaget P. Positively charged sequences of human papillomavirus type 16 capsid proteins are sufficient to mediate gene transfer into target cells via the heparan sulfate receptor. *J Gen Virol*. 2003. 84:157-64.
- Breitburd F, Kirnbauer R, Hubbert NL, Nonnenmacher B, Trin-Dinh-Desmarquet C, Orth G, Schiller JT, Lowy DR. Immunization with viruslike particles from cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) can protect against experimental CRPV infection. *J Virol*. 1995. 69:3959-63.
- Brown DR, Bryan JT, Schroeder JM, Robinson TS, Fife KH, Wheeler CM, Barr E, Smith PR, Chiacchierini L, DiCello A, Jansen KU. Neutralization of human papillomavirus type 11 (HPV-11) by serum from women vaccinated with yeast-derived HPV-11 L1 virus-like particles: correlation with competitive radioimmunoassay titer. *J Infect Dis*. 2001. 184:1183-6.
- Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev*. 2003.16:1-17.

- Casas L, Galvan SC, Ordonez RM, Lopez N, Guido M, Berumen J. Asian-american variants of human papillomavirus type 16 have extensive mutations in the E2 gene and are highly amplified in cervical carcinomas. *Int J Cancer*. 1999. 83:449-55
- Cason J, Patel D, Naylor J, Lunney D, Shepherd PS, Best JM, McCance DJ. Identification of immunogenic regions of the major coat protein of human papillomavirus type 16 that contain type-restricted epitopes. *J Gen Virol*. 1989. 70:2973-87.
- Cason J, Kambo PK, Best JM, McCance DJ. Detection of antibodies to a linear epitope on the major coat protein (L1) of human papillomavirus type-16 (HPV-16) in sera from patients with cervical intraepithelial neoplasia and children. *Int J Cancer*. 1992. 50:349-55.
- Carter JJ, Koutsky LA, Wipf GC, Christensen ND, Lee SK, Kuypers J, Kiviat N, Galloway DA. The natural history of human papillomavirus type 16 capsid antibodies among a cohort of university women. *J Infect Dis*. 1996.174:927-36.
- Carter JJ, Koutsky LA, Hughes JP, Lee SK, Kuypers J, Kiviat N, Galloway DA. Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. *J Infect Dis*. 2000. 181:1911-9.
- Carter JJ, Wipf GC, Benki SF, Christensen ND, Galloway DA. Identification of a human papillomavirus type 16-specific epitope on the C-terminal arm of the major capsid protein L1. *J Virol*. 2003. 77:11625-32.
- Chan PK, Cheung JL, Cheung TH, Lin CK, Siu SS, Yu MM, Tang JW, Lo KW, Yim SF, Wong YF, To KF, Ng HK, Chung TK. HLA-DQB1 polymorphisms and risk for cervical cancer: A case-control study in a southern Chinese population. *Gynecol Oncol*. 2007. 105:736-41.
- Chen XS, Garcea RL, Goldberg I, Casini G, Harrison SC. Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol Cell*. 2000. 5:557-67.
- Cheng G, Icenogle JP, Kirnbauer R, Hubbert NL, St Louis ME, Han C, Svare EI, Kjaer SK, Lowy DR, Schiller JT. Divergent human papillomavirus type 16 variants are serologically cross-reactive. *J Infect Dis*. 1995. 172:1584-7.
- Christensen ND, Höpfel R, DiAngelo SL, Cladel NM, Patrick SD, Welsh PA, Budgeon LR, Reed CA, Kreider JW. Assembled baculovirus-expressed human papillomavirus type 11 L1 capsid protein virus-like particles are recognized by neutralizing monoclonal antibodies and induce high titres of neutralizing antibodies. *J Gen Virol*. 1994. 75:2271-6.
- Christensen ND, Dillner J, Eklund C, Carter JJ, Wipf GC, Reed CA, Cladel NM, Galloway DA. Surface conformational and linear epitopes on HPV-16 and HPV-18 L1 virus-like particles as defined by monoclonal antibodies. *Virology*. 1996. 223:174-84.
- Clifford GM, Rana RK, Franceschi S, Smith JS, Gough G, Pimenta JM. Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005. 14:1157-64.
- Combata AL, Touze A, Bousarghin L, Christensen ND, Coursaget P. Identification of two cross-neutralizing linear epitopes within the L1 major capsid protein of human papillomaviruses. *J Virol*. 2002. 76:6480-6.

- Daling JR, Madeleine MM, Johnson LG, Schwartz SM, Shera KA, Wurscher MA, Carter JJ, Porter PL, Galloway DA, McDougall JK, Krieger JN. Penile cancer: importance of circumcision, human papillomavirus and smoking in in situ and invasive disease. *Int J Cancer*. 2005. 116:606-16.
- De Villiers E.M. Human pathogenic papilloma-virus types: an update. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1994. 186:1-12.
- De Gruijl TD, Bontkes HJ, Walboomers JM, Schiller JT, Stukart MJ, Groot BS, Chabaud MM, Remmink AJ, Verheijen RH, Helmerhorst TJ, Meijer CJ, Scheper RJ. Immunoglobulin G responses against human papillomavirus type 16 virus-like particles in a prospective nonintervention cohort study of women with cervical intraepithelial neoplasia. *J Nat Cancer Inst*. 1997. 89:630-8.
- Di Bonito P, Grasso F, Mochi S, Accardi L, Donà MG, Branca M, Costa S, Mariani L, Agarossi A, Ciotti M, Syrjänen K, Giorgi C. Serum antibody response to Human papillomavirus (HPV) infections detected by a novel ELISA technique based on denatured recombinant HPV16 L1, L2, E4, E6 and E7 proteins. *Infect Agent Cancer*. 2006.1:6.
- Dillner J, Dillner L, Utter G, Eklund C, Rotola A, Costa S, DiLuca D. Mapping of linear epitopes of human papillomavirus type 16: the L1 and L2 open reading frames. *Int J Cancer*. 1990. 45:529-35.
- Doorbar J, Gallimore PH. Identification of proteins encoded by the L1 and L2 open reading frames of human papillomavirus 1a. *J Virol*. 1987. 61:2793-9.
- Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol*. 2005. 1:7-15.
- Far AE, Aghakhani A, Hamkar R, Ramezani A, Pishbigar HF, Mirmomen S, Roshan MR, Vahidi S, Shahnazi V, Deljoodokht Z. Frequency of human papillomavirus infection in oesophageal squamous cell carcinoma in Iranian patients. *Scand J Infect Dis*. 2007. 39:58-62.
- Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia. 2007. www.figo.org.
- Frish M, Biggar RJ. Etiological parallel between tonsillar and anogenital squamous-cell carcinomas. *Lancet*. 1999. 354:1442-5.
- Garnett TO, Duerksen-Hughes PJ. Modulation of apoptosis by human papillomavirus (HPV) oncoproteins. *Arch Virol*. 2006.151:2321-35.
- GlaxoSmithKline México 2007. www.gsk.com.mx.
- Harro CD, Pang YY, Roden RB, Hildesheim A, Wang Z, Reynolds MJ, Mast TC, Robinson R, Murphy BR, Karron RA, Dillner J, Schiller JT, Lowy DR. Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine. *J Nat Cancer Inst*. 2001. 93:284-92.
- Heino P, Skyldberg B, Lehtinen M, Rantala I, Hagmar B, Kreider JW, Kirnbauer R, Dillner J. Human papillomavirus type 16 capsids expose multiple type-restricted and type-common antigenic epitopes. *J Gen Virol*. 1995. 76:1141-53.
- Hildesheim A, Schiffman M, Bromley C, Wacholder S, Herrero R, Rodriguez A, Bratti MC, Sherman ME, Scarpidis U, Lin QQ, Terai M, Bromley RL, Buetow K, Apple RJ, Burk RD. Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer. *J Nat Cancer Inst*. 2001. 93:315-8.

-Ho L., Chan S.Y., Burk R. D., Das B. C., Fujinaga K., Icenogle P. J., Kahn T., Kiviat N., Lancaster W., Mavromara-Nazos P., Labropouton V., Mitrani-Rosenbaum S., Norrild M., M. Pillai R., Stoerker J., Syrjanen K., Tay S.K., Villa L.L., Wheeler C.M., Williamson A. L., and Bernard H.U. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human population. *J Virol.* 1993. 67:6413-6423.

-Howley P.M. B.N, and Knipe D.M. Papillomavirinae: The viruses and Their replication : in fields. *Fields Virology.* 1996. 2045-2076.

-Jacobs M. V., Walboomers J. M., Snijders P. J. F., Voorhorst F. J., Verheijen R. H. M., Franssen-Daalmeijer N., and Meijer C. J. L. M. Distribution of 37 mucosotropic HPV types in women with cytologically normal cervical smears: The age-related patterns for high-risk and low-risk types. *Int J Cancer.* 2000. 87:221-227.

-Jenison SA, Yu XP, Valentine JM, Galloway DA. Human antibodies react with an epitope of the human papillomavirus type 6b L1 open reading frame which is distinct from the type-common epitope. *J Virol.* 1989. 63:809-18.

-Kammer Ch., Warthors U., Torrez M.N., Wheeler C.M. and Pfister H. Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for p97 promoter activity. *J Gen Virol.* 2000. 81:1975-1986.

.-Kim CJ, Um SJ, Hwang ES, Park SN, Kim SJ, Namkoong SE, Park JS. The antibody response to HPV proteins and the genomic state of HPVs in patients with cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 1999. 9:1-11.

-Kim SW, Yang JS. Human papillomavirus type 16 E5 protein as a therapeutic target. *Yonsei Med J.* 2006. 47:1-14.

-Kirnbauer R., Booy F., Cheng N., Lowy D. R. and Schiller J. T. Papillomavirus L1 major protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1992. 89:12180-12184.

-Kirnbauer R., Tabú J., Greenstone H., Roden R., Durst M., Gissman L., Lowy D. R. and Schiller J. T. Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J Virol.* 1993. 67:6929-6936.

-Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, Brown DR, Barr E, Alvarez FB, Chiacchierini LM, Jansen KU; Proof of Principle Study Investigators. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N Engl J Med.* 2002. 347:1645-51.

-Laboratório Nacional de Los Alamos Copyright 2006-7 Los Alamos National Security, LLC. 2006. www.lanl.gov/external/news/releases.

-Leiserowitz GS, Hall KS, Foster CA, Hitchcock ME, Christensen ND, Heim K, Smith LH. Detection of serologic neutralizing antibodies against HPV-11 in patients with condyloma acuminata and cervical dysplasia using an in vitro assay. *Gynecol Oncol.* 1997. 66:295-9.

-Lichtig H, Algrisi M, Botzer LE, Abadi T, Verbitzky Y, Jackman A, Tommasino M, Zehbe I, Sherman L. HPV16 E6 natural variants exhibit different activities in functional assays relevant to the carcinogenic potential of E6. *Virology.* 2006. 350:216-27.

-Lizano M., García Carranca A. Molecular variants of human papillomaviruses type 16, 18, and 45 in tumor of the uterine cervix in Mexico. *Gac Med Mex.* 1997. 1:43-48.

-Lizano M, De la Cruz-Hernández E, Carrillo-García A, García-Carranca A, Ponce de León-Rosales S, Dueñas-González A, Hernández-Hernández DM, Mohar A. Distribution of HPV16 and 18 intratypic variants in normal cytology, intraepithelial lesions, and cervical cancer in a Mexican population. *Gynecol Oncol*. 2006. 102:230-5.

-Le Cann P, Touze A, Enogat N, Leboulleux D, Mougin C, Legrand MC, Calvet C, Afoutou JM, Coursaget P. Detection of antibodies against human papillomavirus (HPV) type 16 virions by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant HPV 16 L1 capsids produced by recombinant baculovirus. *J Clin Microbiol*. 1995. 33(5):1380-2.

-Longworth MS, Laimins LA. Related Articles, Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004. 68:362-72.

-Ludmerer SW, Benincasa D, Mark GE 3rd. Two amino acid residues confer type specificity to a neutralizing, conformationally dependent epitope on human papillomavirus type 11. *J Virol*. 1996. 70:4791-4.

-Luxton JC, Rose RC, Coletart T, Wilson P, Shepherd PS. Serological and T-helper cell responses to human papillomavirus type 16 L1 in women with cervical dysplasia or cervical carcinoma and in healthy controls. *J Gen Virol*. 1997. 78:917-23.

-Marais DJ, Rose RC, Lane C, Kay P, Nevin J, Denny L, Soeters R, Dehaeck CM, Williamson AL. Seroresponses to human papillomavirus types 16, 18, 31, 33, and 45 virus-like particles in South African women with cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia. *J Med Virol*. 2000. 60:403-10.

-Matsumoto K, Yoshikawa H, Yasugi T, Nakagawa S, Kawana K, Takeoka A, Yaegashi N, Iwasaka T, Kanazawa K, Taketani Y, Kanda T. IgG antibodies to human papillomavirus 16, 52, 58, and 6 L1 capsids: case-control study of cervical intraepithelial neoplasia in Japan. *J Med Virol*. 2003. 69(3):441-6.

- Merck, S.A. de C.V. 2008. www.merck.com.mx

-Monroy G., Weiss S., Hernández M., Ortiz Navarrete V. F., Bañuelos P., Acosta A. A., Díaz Q., López G., Herbert G., Granados J., De Leo C., Silva L. R. M., and Mora G.M.L. Identification of two homologous antigenic peptides derived from L1 HPV- 16 and 18 proteins specific for the HLA-B*3901 allele. *Archives of Virol*. 2002. 147:1933-1942.

-Moscicki Anna-Barbara, MD; Nancy Hills, MA; Steve Shiboski, PhD; Kim Powell, NP,RN; Naomi Jay, NP,RN; Evelyn Hanson, NP,RN; Susanna Miller, BA; Lisa Clayton; Sepideh Farhat, MS; Jeanette Broering, NP,RN; Teresa Darragh, MD; Joel Palefsky, MD. Risks for Incident Human Papillomavirus Infection and Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion Development in Young Females. *JAMA*. 2001. 285:2995-3002.

-National Center For Biotechnology Information-Gen bank. 2008. www.ncbi.nlm.nih.gov

-Ndisang D, Faulkes DJ, Gascoyne D, Lee SA, Ripley BJ, Sindos M, Singer A, Budhram-Mahadeo V, Cason J, Latchman DS. Differential regulation of different human papilloma virus variants by the POU family transcription factor Brn-3a. *Oncogene*. 2006. 25(1):51-60.

-Ordoñez Rosa M. Espinosa Ana María, Sánchez-González, Armendáriz-Borunda Juan y Berumen Jaime. Enhanced oncogenicity of Asian-American human papillomavirus 16 is associated with impaired E2 repression of E6/E7 oncogene transcription. *J of General Virology*. 2004. 85,1433-1444.

- Orozco E. y Gariglio P. *Genética y biomedicina molecular*. IPN-Limusa. 2000. 181-198.
- Pinto AP, Signorello LB, Crum CP, HARLOW BL, ABRAO F, VILLA L. Squamous cell carcinoma of the vulva in brazil: prognostic importance of host and viral variables. *Gynecol Oncol*. 1999. 14:61-7.
- Poland GA, Jacobson RM, Koutsky LA, Tamms GM, Railkar R, Smith JF, Bryan JT, Cavanaugh PF Jr, Jansen KU, Barr E. Immunogenicity and reactogenicity of a novel vaccine for human papillomavirus 16: a 2-year randomized controlled clinical trial. *Mayo Clin Proc*. 2005. 80:601-10.
- Rabelo-Santos SH, Villa LL, Derchain SF, Ferreira S, Sarian LO, Angelo-Andrade LA, do Amaral Westin MC, Zeferino LC. Variants of human papillomavirus types 16 and 18: histological findings in women referred for atypical glandular cells or adenocarcinoma in situ in cervical smear. *Int J Gynecol Pathol*. 2006. 25:393-7.
- Rocha-Zavaleta L, Ambrosio JP, Mora-Garcia Mde L, Cruz-Talonia F, Hernandez-Montes J, Weiss-Steider B, Ortiz-Navarrete V, Monroy-Garcia A. Detection of antibodies against a human papillomavirus (HPV) type 16 peptide that differentiate high-risk from low-risk HPV-associated low-grade squamous intraepithelial lesions. *J Gen Virol*. 2004. 85:2643-50.
- Roden RB, Greenstone HL, Kirnbauer R, Booy FP, Jessie J, Lowy DR, Schiller JT. In vitro generation and type-specific neutralization of a human papillomavirus type 16 virion pseudotype. *J Virol*. 1996. 70:5875-83.
- Roden RB, Armstrong A, Haderer P, Christensen ND, Hubbert NL, Lowy DR, Schiller JT, Kirnbauer R. Characterization of a human papillomavirus type 16 variant-dependent neutralizing epitope. *J Virol*. 1997. 71:6247-52.
- Roden RB, Yutzy WH 4th, Fallon R, Inglis S, Lowy DR, Schiller JT. Minor capsid protein of human genital papillomaviruses contains subdominant, cross-neutralizing epitopes. *Virology*. 2000. 270:254-7.
- Sasagawa T, Pushko P, Steers G, Gschmeissner SE, Hajibagheri MA, Finch J, Crawford L, Tommasino M. Synthesis and assembly of virus-like particles of human papillomaviruses type 6 and type 16 in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Virology*. 1995. 206:126-35.
- Sasagawa T, Inoue M, Lehtinen M, Zhang W, Gschmeissner SE, Hajibagheri MA, Finch J, Crawford L. Serological responses to human papillomavirus type 6 and 16 virus-like particles in patients with cervical neoplastic lesions. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1996. 3:403-10.
- Sasieni P, Adams J. Changing rates of adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma of the cervix in England. *Lancet*. 2001. 357:1490-3.
- Shepherd PS, Rowe AJ, Cridland JC, Coletart T, Wilson P, Luxton JC. Proliferative T cell responses to human papillomavirus type 16 L1 peptides in patients with cervical dysplasia. *J Gen Virol*. 1996. 77:593-602.
- Schiller JT. Related Articles, Papillomavirus-like particle vaccines for cervical cancer. *Mol Med Today*. 1999. 5:209-15.
- Sichero L, Ferreira S, Trottier H, Duarte-Franco E, Ferenczy A, Franco EL, Villa LL. High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18. *Int J Cancer*. 2007. 120:1763-8.

- Smith EM, Wang D, Kim Y, Rubenstein LM, Lee JH, Haugen TH, Turek LP. p16(INK4a) Expression, human papillomavirus, and survival in head and neck cancer. *Oral Oncol.* 2007.
- Snijders PJ, van den Brule AJ, Schrijnemakers HF, Snow G, Meijer CJ, Walboomers JM. The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *J Gen Virol.* 1990. 71:173-81.
- Suzich JA, Ghim SJ, Palmer-Hill. Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. *Proc Nat Acad Sci U S A.* 1995. 92:11553-7.
- Swiss-Model. 2005. <http://swissmodel.expasy.org.html>.
- Tachezy R, Jirasek T, Salakova M, Ludvikova V, Kubecova M, Horak L, Mandys V, Hamsikova E. Human papillomavirus infection and tumours of the anal canal: correlation of histology, PCR detection in paraffin sections and serology. *APMIS.* 2007. 115:195-203.
- Terai M, Burk RD. Characterization of a novel genital human papillomavirus by overlapping PCR: candHPV86 identified in cervicovaginal cells of a woman with cervical neoplasia. *J Gen Virol.* 2001. 82:2035-40.
- Terai,M. and Burk,R.D. Human. Papillomavirus type 16 Asian-American variant, complete genome. 2003. *ACCESSION AF402678.*
- Tonon SA, Basiletti J, Badano I, Alonio LV, Villa LL, Teyssie AR, Picconi MA. Human papillomavirus type 16 molecular variants in Guarani Indian women from Misiones, Argentina. *Int J Infect Dis.* 2007. 11:76-81.
- Touze Antoine, Slimane El Mehdaoui, Pierre-Yves Sizaret, Christine Mouglin, Nubia Muñoz, and Pierre Coursaget The L1 Major Capsid Protein of Human Papillomavirus Type 16 Variants Affects Yield of Virus-Like Particles Produced in an Insect Cell Expression System. *J Clin Microbiol.* 1998. 36: 2046–2051.
- Tu JJ, Kuhn L, Denny L, Beattie KJ, Lorincz A, Wright TC Jr. Molecular variants of human papillomavirus type 16 and risk for cervical neoplasia in South Africa. *Int J Gynecol Cancer.* 2006. 16:736-42.
- Unckell F, Streeck RE, Sapp M. Generation and neutralization of pseudovirions of human papillomavirus type 33. *J Virol.* 1997. 71:2934-9.
- Van Beurden M, Ten Kate FWJ, Tjong-A-Hunt sp, et al. Human papillomavirus DNA in multicentric vulvar intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Pathol.* 1998. 17:12-16.
- Varsani A, Williamson AL, Jaffer MA, Rybicki EP. A deletion and point mutation study of the human papilloma virus type16 major capsid gene. *Virus Res.* 2006. 122:154-63.
- Veress G., Skarka K., Dong X. P., Gergely L. and Pfiser H. Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16. *J General Virol.* 1999. 80:1035-1043.
- Villa L. L., Laura S., Rahal P., Caballero O., Ferenczy A., Rohan T. and Franco E. I. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J General Virol.* 2000. 81:2959-2968.

- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. Related Articles, Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999. 189:12-9.
- Wang Z, Konya J, Avall-Lundkvist E, Sapp M, Dillner J, Dillner L. Human papillomavirus antibody responses among patients with incident cervical carcinoma. *J Med Virol.* 1997. 52:436-40.
- Wank R, Thomssen C. High risk of squamous cell carcinoma of the cervix for women with HLA-DQw3. *Nature.* 1991. 352:723-5.
- White WI, Wilson SD, Palmer-Hill FJ, Woods RM, Ghim SJ, Hewitt LA, Goldman DM, Burke SJ, Jenson AB, Koenig S, Suzich JA. Characterization of a major neutralizing epitope on human papillomavirus type 16 L1. *J Virol.* 1999. 73:4882-9.
- Wideroff L, Schiffman MH, Nonnenmacher B, Hubbert N, Kirnbauer R, Greer CE, Lowy D, Lorincz AT, Manos MM, Glass AG, et al. Evaluation of seroreactivity to human papillomavirus type 16 virus-like particles in an incident case-control study of cervical neoplasia. *J Infect Dis.* 1995. 172:1425-30.
- Xi. F., and Wheeler C. M. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspectiva. *J Virol.* 1997. 71:2463-2472.
- Xi LF, Kiviat NB, Hildesheim A, Galloway DA, Wheeler CM, Ho J, Koutsky LA. Human papillomavirus type 16 and 18 variants: race-related distribution and persistence. *J Nat Cancer Inst.* 2006. 98:1045-52.
- Yamada T., Wheeler C. M., Halpern A. L., Stewart Ann-Charlotte M., Hildesheim A., and Jansen S. A. Human papillomavirus type 16 variant lineages in united states population characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments. *J Virol.* 1995. 69:7743-7753.
- Yamada T., Manos M. M., Peto J., Creer C. E., Muñoz N., Bosch X Xi L. F., Kutsky L. A., Galloway D. A., Kuypers J., Hughes J. P., Wheeler C. M., Holmes K. K. and Kiviat N. B. Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Nat Cancer Institute.* 1997. 89:796-802.
- Yang R, Wheeler CM, Chen X, Uematsu S, Takeda K, Akira S, Pastrana DV, Viscidi RP, Roden RB. Papillomavirus capsid mutation to escape dendritic cell-dependent innate immunity in cervical cancer. *J Virol.* 2005. 79:6741-50.
- Yang YJ, Zhao J, Liao QP. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi.* Association between human papillomavirus (HPV) type 16 infection and E6/E7 gene variant and the cervical lesions in Beijing. 2007. 21:32-4.
- Zhou J, Doorbar J, Sun XY, Crawford LV, McLean CS, Frazer IH. Identification of the nuclear localization signal of human papillomavirus type 16 L1 protein. *Virology.* 1991. 185:625-32.
- Zoodsma M, Nolte IM, Schipper M, Oosterom E, van der Steege G, de Vries EG, te Meerman GJ, van der Zee AG. Analysis of the entire HLA region in susceptibility for cervical cancer: a comprehensive study. *J Med Genet.* 2005. 42:49.
- Zur Hausen H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1996.1288:55-78.

-Zur Hausen H. Papillomaviruses in human cancers. *Poc Assoc Am Physicians*. 1999. 111:1-7.

-Zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J National Cancer Institute*. 2000. 92: 690-698.