



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza
(UMIEZ)

Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer

Laboratorio de Inmunología

**Detección de anticuerpos específicos hacia epítopes
seroreactivos de las proteínas E6 y E7 de VPH - 16 en
sueros de pacientes con neoplasias cervicales**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO**

P R E S E N T A

CARLOS CORTÉS MARTÍNEZ

DIRECTOR DE TESIS: Dr. ALBERTO MONROY GARCÍA

ASESORA INTERNA: Dra: MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA



México D. F. 2013



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

"ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR P R E S E N T E.

Comunico a usted que el alumno **CORTÉS MARTÍNEZ CARLOS**, con número de cuenta **301096850**, de la carrera de Biología se le ha fijado el día **28** del mes de **mayo** de 2013 a las **10:00 hrs.** para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE M. en C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ

VOCAL DR. ALBERTO MONROY GARCÍA *

SECRETARIO DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA

SUPLENTE BIÓL. REYNALDA ROLDÁN PÉREZ

SUPLENTE M. en C. EDGAR LEDESMA MARTÍNEZ

El título de la tesis que presenta es: **Detección de anticuerpos específicos hacia epítopes seroreactivos de las proteínas E6 y E7 de VPH-16 en sueros de pacientes con neoplasias cervicales.**

Opción de titulación: tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D. F., a 30 de abril de 2013.

Dr. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ

DIRECTOR
ZARAGOZA

DIRECCION

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
M en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Inmunobiología de la UMIEZ de la FES-Zaragoza, UNAM y en el Laboratorio de Inmunología y Cáncer de la UIMEO, H Oncología CMN SXXI IMSS y fue realizado gracias al apoyo financiero de los proyectos CONACYT No. 82827 y FIS/IMSS/PROT/876.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de todo corazón a mi familia por todo el apoyo recibido durante todo este tiempo. Sin ustedes no hubiera sido posible la culminación de esta etapa de mi vida.

A mi mamá: Eres la persona más importante en mi vida, quiero decirte que te amo y adoro con toda el alma. Tu amor incondicional me han dado las fuerzas para seguir luchando por los dos; este logro es nuestro, y juntos vamos a lograr muchas cosas más. Todas tus enseñanzas son el tesoro máspreciado que tengo y mientras te tenga, soy la persona más feliz del mundo. Gracias por creer siempre en mí.

A mi papá: Te agradezco por todo el apoyo y te quiero mucho. Soy muy afortunado y estoy muy orgulloso de tenerte como papá; quiero que sepas que eres el otro pilar que sostiene mi vida y que todo el amor, enseñanzas y educación que me brindaste, los llevo siempre conmigo, en mi corazón. Te quiero mucho.

A mi hermana: Te quiero mucho y estoy muy orgulloso de ti; de tu dedicación y tu esfuerzo. Siempre podrás contar con mi apoyo incondicional.

A Brenda: Gracias por estar a mi lado y gracias por trabajar codo a codo conmigo, parte de este trabajo es tuyo. Estoy muy orgulloso de ti y de que seas mi novia. Agradezco al destino por haberte conocido y sé que vas a lograr todas tus metas porque eres la mejor (y la más hermosa). Te amo.

A mis amigos: Mis muy buenos amigos que conocí en esta facultad y en el laboratorio. Les agradezco por todas esas experiencias y consejos que siempre tuvieron para mí, por hacer la convivencia diaria en el laboratorio muy gratificante y divertida, Les aprecio mucho. A Gilberto, Yuyu y Luis que conozco desde mi primer día en la facultad, les quiero dar las gracias por ser mis amigos.

A mis Doctores: Le doy las gracias al Dr. Alberto y a la Dra. Lourdes por darme la oportunidad de pertenecer al laboratorio y siempre ayudarme y apoyarme cuando lo necesitaba. Al Doctor Jorge le estoy profundamente agradecido por todo el tiempo, paciencia, consejos y ayuda que me otorgó (siempre estaré en deuda). Al Dr. Arturo le agradezco mucho su amistad y conocimientos.

Carlos Cortés Martínez

ÍNDICE

PÁGINAS

1. ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	1
2. RESUMEN.....	2
3. MARCO TEORICO.....	3
3.1 Cáncer.....	3
3.2 Epidemiología del cáncer cervicouterino.....	3
3.3 Virus de Papiloma Humano (VPH) y su relación con el cáncer cervicouterino....	4
3.4 Genoma del VPH.....	6
3.5 Ciclo replicativo del VPH.....	7
3.6 Alteración del ciclo celular provocado por el VPH.....	9
3.7 VPH y sistema inmune.....	10
3.8 Inmunidad humoral.....	11
3.9 Marcadores Tumorales.....	13
3.10 Marcadores tumorales y CaCu.....	15
3.11 Proteínas E6 y E7 como marcadores tumorales.....	16
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	18
5. HIPÓTESIS.....	19
6. OBJETIVOS.....	20
7. MATERIAL Y MÉTODOS.....	21

7.1 Pacientes.....	21
7.2 Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).....	21
8. RESULTADOS.....	23
8.1 Determinación de la presencia de anticuerpos reactivos a péptidos TPTLHEYMLDLQPETT (E7 VPH-16), YSKISEYRHYC (E6 VPH-16) y DPQERPRKLPQLCTELQTT (E6 VPH-16) en pacientes con lesión cervical infectadas por VPH-16.....	23
8.2 Determinación de la presencia de anticuerpos reactivos a péptidos TPTLHEYMLDLQPETT (E7 VPH-16), YSKISEYRHYC (E6 VPH-16) y DPQERPRKLPQLCTELQTT (E6 VPH-16) en pacientes con lesión cervical infectadas por VPH diferente al 16.....	27
9. DISCUSIÓN.....	32
10. CONCLUSIONES.....	36
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

1. INDICE DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxiribonucleico

APC: Antigen presenting cell (Célula presentadora de antígeno)

ARN: Ácido ribonucleico

CaCu: Cáncer cervicouterino

CD4⁺: Linfocito T “cooperador”

CD8⁺: Linfocito T “Citotóxico”

CEA: Carcinoembryonic antigen (Antígeno Carcinoembriónico)

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay (Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima)

FIGO: International Federation of Gynecology and Obstetrics (Federación Internacional de Ginecología y obstetricia)

LIE: Lesión intraepithelial escamosa

MHC: major histocompatibility complex (Complejo mayor de histocompatibilidad)

NIC: Neoplasia intraepitelial cervical

NK: Natural killer (Célula asesina natural)

ORF: Open reading frame (Marco de lectura abierta)

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)

SCCA: Squamous cell carcinoma antigen (Antígeno de carcinoma de células escamosas)

TH2: Linfocito cooperador tipo 2

VLP: Virus-like particle (Partícula tipo viral)

VPH: Virus de papiloma humano

2. Resumen

El Cáncer Cervicouterino (CaCu), es el segundo cáncer más común entre las mujeres en el Mundo. Anualmente, cerca de 470,000 nuevos casos son diagnosticados y provocan alrededor de 250,000 muertes, lo que representa un importante problema de salud pública, mayormente en los países en vías de desarrollo. La infección por virus de papiloma humano (VPH) constituye el principal factor etiológico del CaCu, siendo el tipo 16 el más prevalente en este tipo de lesiones. La presencia de anticuerpos específicos a los antígenos tumorales E6 y E7, se considera como un buen marcador para la progresión de cáncer cervical, ya que estas proteínas se expresan en niveles más altos en displasia cervical de alto grado y en CaCu. Al respecto, nuestro grupo de investigación ha identificado que péptidos de la proteína E6 (PRKLPQLCTELQTTI) y de la proteína E7 (EIDGPAGQAEPDRAHYNI, RAHYNIVTF, TLGIVCPI) de VPH-16, contienen secuencias inmunogénicas que son reconocidas por anticuerpos específicos presentes en muestras séricas de pacientes con NIC-I.

En este trabajo se evaluó por la técnica de ELISA la capacidad de reconocimiento de anticuerpos séricos hacia los péptidos TPTLHEYMLDLQPETT de la proteína E7 de VPH-16 así como YSKISEYRHYC y DPQERPRKLPQLCTELQTT de la proteína E6 de VPH-16 en pacientes con neoplasias cervicales precursoras y cáncer invasor, tanto en muestras de pacientes positivas a la infección por VPH-16 así como positivas a infecciones diferentes a VPH-16. El reconocimiento de anticuerpos séricos hacia el péptido TPTLHEYMLDLQPETT (E7 VPH-16) mostró tener un comportamiento eficiente al discriminar entre diferentes estadios de la enfermedad (CaCu I-IV y NIC-I) en pacientes infectadas por VPH-16, mientras que el péptido YSKISEYRHYC (E6 VPH-16) es más reconocido en pacientes con un grado avanzado de la enfermedad en pacientes infectadas por VPH-16. El péptido DPQERPRKLPQLCTELQTT (E6 VPH-16) no parece tener facultades como marcador en la progresión de la enfermedad.

Con estos resultados se sustenta la hipótesis de que en las etapas más avanzadas de la enfermedad existe un mayor reconocimiento de epítopes tumorales por parte de anticuerpos séricos, especialmente contra el péptido TPTLHEYMLDLQPETT (E7 VPH-16), el cual podría ser un buen candidato para ser usado en análisis serológicos como marcador de progresión tumoral.

3. Marco Teórico

Cáncer

Una de las enfermedades que en las últimas décadas ha causado un número abrumador de decesos humanos es el cáncer, el cual es desencadenado por diversos factores genéticos, así como la exposición a factores químicos, físicos y biológicos (agentes carcinogénicos). Esta enfermedad es un tipo de crecimiento tisular anormal, donde las células que componen a un tejido ganan la facultad de dividirse de manera relativamente autónoma (neoplasia), junto con otras características indeseables para el organismo. Un organismo con células cancerosas, presentará diferentes anomalías sistémicas provocadas por la masa de células acumuladas también llamadas tumor o neoplasma. Estas células además de mantener un ciclo de replicación alterado, también pueden tener la facultad de migrar hacia otras partes del cuerpo, lo que se le conoce también por metástasis (Wayne *et al.*, 2009).

Epidemiología del cáncer cervicouterino

El Cáncer Cervicouterino (CaCu), es el segundo cáncer más común entre las mujeres en el Mundo. Se reconocen dos tipos histológicos principales: el epidermoide, espinocelular o de células escamosas, y el adenocarcinoma. El cáncer de tipo epidermoide es al que se le adjudican entre el 85% y 90% de los casos de CaCu; este tipo de cáncer se origina en el epitelio plano estratificado que recubre el ectocérvix; el adenocarcinoma, por su parte, se desarrolla en el epitelio cilíndrico que tapiza el canal endocervical (Alonso *et al.*, 2001). La historia natural del CaCu está bien identificada; se inicia con cambios intraepiteliales clasificados descriptivamente como displasias, las cuales son lesiones precursoras que pueden conducir al cáncer invasor. Anualmente cerca de 470,000 nuevos casos son diagnosticados y provoca alrededor de 250,000 muertes. En el año 2000, al menos 76,000 casos incidentes de cáncer cervical y 30,000 muertes se estimaron para la región de América latina [Figura1] (Arrossi *et al.*, 2003). En un estudio realizado en 2001 por Parkin, en Estados Unidos se diagnosticaron aproximadamente 12,000 casos nuevos de CaCu, de las que perecieron cerca de 4,000 mujeres (Schmitt *et al.*, 2009). En el caso particular de México, en el año 2001 la Secretaría de Salud notificó 22,774 nuevos casos de lesiones intraepiteliales escamosas y tumores malignos de cuello uterino (Ilic, 2010), lo que significa que en nuestro País, el CaCu representa un importante problema de salud pública.

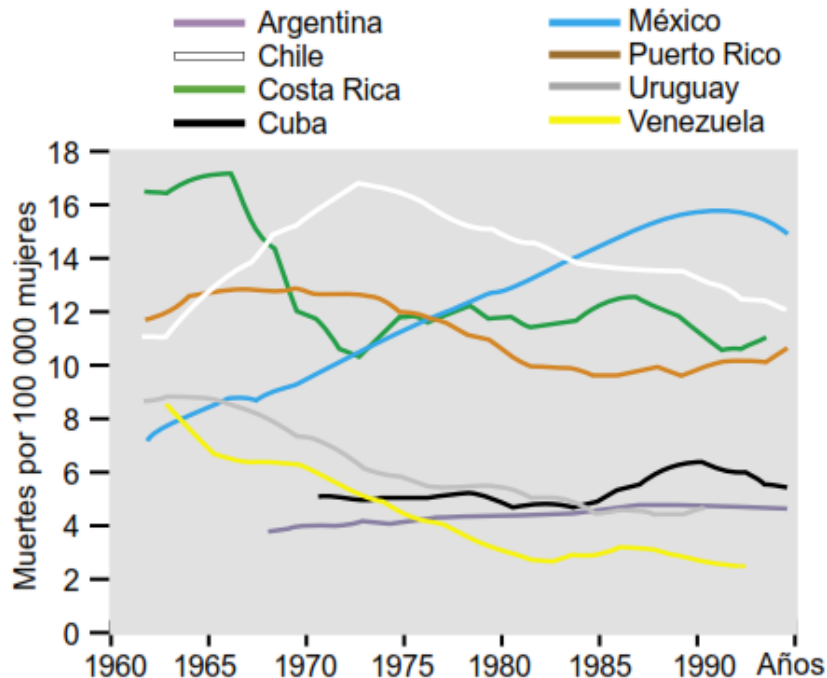


Figura 1. Tendencias en la mortalidad por cáncer de cuello uterino en América latina 1968-1995. Tomado y modificado de (Arrossi *et al.*, 2003).

Virus de Papiloma Humano (VPH) y su relación con el cáncer cervicouterino

La relación entre el Cáncer cervicouterino y el contacto sexual, ya se sospechaba desde el siglo XVIII. Una de las personas responsables de estos interesantes hallazgos fue un físico italiano llamado Rigoni Stern, quien analizó cuerpos de mujeres muertas en el periodo de 1760-1839 y notó que una alta frecuencia de mujeres que presentaban CaCu eran casadas, viudas y prostitutas; pero tenía una muy rara frecuencia en mujeres vírgenes y monjas (Zur Hausen, 2009). En el año de 1949 Ayre describió los cambios presentes en una infección productiva por los coilocitos. Posteriormente, en 1956, Koss acuñó el término coilocitosis para denominar a estas células presentes en las lesiones displásicas (Alonso *et al.*, 2001). Estos hallazgos permitieron que la comunidad científica postulara y analizara la posibilidad de la relación del VPH como candidato etiológico en el cáncer cervical, sin embargo, no fue hasta el año de 1976 cuando finalmente Meisels y Fortin publicaron dos reportes donde se establece la existencia de infección por VPH debido a la presencia de coilocitos en frotis cervicales, los cuales son queratinocitos dilatados con halos transparentes que rodean los núcleos arrugados, las cuales en general son células vacuolizadas productoras de viriones en el estrato espinoso (Zur Hausen, 2002; Alonso *et al.*, 2001). Años después el científico alemán Harald zur Hausen concretó estas investigaciones

relacionadas con el VPH y el CaCu, lo que le valió el premio Nobel de medicina en 2008.

La infección por VPH constituye el principal factor etiológico del cáncer cervicouterino (Bosch *et al.*, 2002; Walboomers *et al.*, 1999). Algunos de los virus de alto riesgo más frecuentes son: 16, 18, 45, 31, 33, 58, 52, 35, 59, 56, 6, 51, 68, 39, 82, 73, 66 y 70 (Clifford *et al.*, 2003); mismos que además de desarrollar neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) y CaCu, están relacionados con cáncer de pene, ano, así como de cáncer vulvar y otras lesiones malignas (Griffiths *et al.*, 1999). En un estudio de prevalencia de VPH en pacientes con CaCu, coordinado por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (AIIC), reportaron la presencia de ADN de VPH en más de 93% de los tumores a través de la prueba de reacción en cadena de polimerasa (PCR) (Sánchez *et al.*, 2005).

El cáncer cervical puede ser distinguido desde sus fases iniciales mediante estudios citopatológicos e histopatológicos. La clasificación morfológica de la carcinogénesis del cuello uterino consta de varias etapas que van desde: Epitelio Normal; Neoplasia Intraepitelial Cervical en sus tres grados NIC-I, NIC-II y NIC-III (Nomenclatura Richart); y por último el cáncer cervicouterino, desde grado I hasta el grado IV (FIGO: International Federation of Gynecology and Obstetrics) [Figura 2]. En los estudios citopatológicos las lesiones preneoplásicas se clasifican como Lesiones Intraepiteliales Escamosas (LIE; Nomenclatura Bethesda) y tiene dos grados, alto y bajo (Carrasco, 2010). Además de estas clasificaciones la Organización Mundial de la Salud (OMS) utiliza tres grados de displasias que en equivalencia con el sistema Richart van desde displasia leve a moderada y grave, respectivamente (Cosme, 2007).

La correspondencia entre las dos clasificaciones es:

- LIE de Bajo Grado en citopatología = NIC-I en histopatología
- LIE de Alto Grado en citopatología = NIC-II y III en histopatología

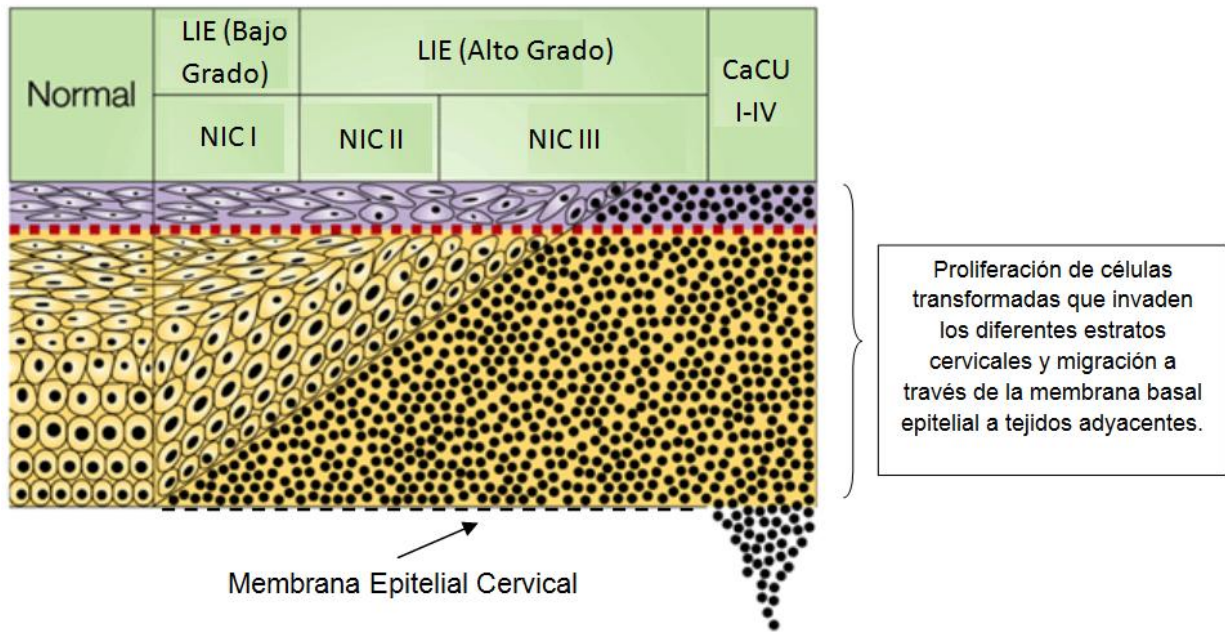


Figura 2. Esquema de la expresión morfológica de NIC (Neoplasia Intraepitelial Cervical) y LIE (Lesiones Intraepiteliales Escamosas). En la parte izquierda de la figura se puede apreciar el esquema de un cérvix normal; a medida que la lesión avanza, la población de células transformadas crece, finalizado en cáncer cervicouterino. Tomado y modificado de (Carrasco, 2010).

Genoma del VPH

Los virus de papiloma humano comprenden a un grupo heterogéneo de virus de tamaño pequeño (de 55 a 60 nm) no envueltos. Tienen una cadena doble de ADN de aproximadamente 8000 pb, empaquetados en una cápside icosaédrica compuesta por dos proteínas, la L1 (mayor tamaño) y la L2 (menor tamaño) (Ochi *et al.*, 2008; Griffiths *et al.*, 1999; López *et al.*, 2006; Carrasco, 2010). En el ADN del virus se han encontrado marcos de lectura abierta (ORF por sus siglas en inglés), que se clasifican por el momento en el que se expresan. Los ORF tempranos (E) dan lugar a 6 proteínas de transcripción temprana (E1, E2, E4, E5, E6, E7), de las cuales la célula infectada obtiene la facultad de transformarse, especialmente por la actividad de las proteínas oncogénicas E6 y E7. Los marcos de lectura abierta de expresión tardía L1 y L2, codifican proteínas de la cápside y se expresan únicamente en los queratinocitos diferenciados de la capa superficial de la lesión, donde se producen las partículas víricas maduras [Tabla 1] (Ilic, 2010).

Proteína (ORF)	Funciones
E1	Replicación viral de ADN
E2	Regulación de transcripción viral
E4	Colapso de las redes de citoqueratina
E5	Interacción MHC II
E6	Transformación (p53)
E7	Transformación (pRb)
L1	Proteína mayor de la cápside
L2	Proteína menor de la cápside

Tabla 1. Proteínas de transcripción y sus funciones. Tomado y modificado de (Stanley *et al.*, 2007).

Ciclo replicativo del VPH

Las partículas infecciosas virales entran a las células basales o germinales, a través de una pequeña abertura en el epitelio estratificado; esta abertura puede suceder en condiciones donde la piel tenga una pequeña lesión o un microtrauma, por donde podrán tener acceso tales partículas [Figura 3]. No se ha identificado concluyentemente un receptor de membrana bien definido para la entrada del virus, aunque se ha propuesto como candidato el complejo integrina $\alpha 6 - \beta 4$ (López *et al.*, 2006). La internalización del virus ocurre por endocitosis de vesículas cubiertas de clatrina (Day *et al.*, 2003). Después de haber infectado y desensamblado el virión en las células basales, se comienzan a expresar las proteínas E1 y E2. Estas proteínas se encargarán de mantener el genoma viral en forma episomal (fuera de los cromosomas del hospedero) con bajo número de copias; entre 10 a 200 por célula. Durante la fase proliferativa un ARN mensajero bicistrónico bajo el control del promotor temprano LCR promueve la expresión de E6 y E7. Estas proteínas retardan la diferenciación celular, además de promover la proliferación de las mismas. Para que se produzcan viriones infecciosos se debe amplificar el genoma y empaquetarlo en una partícula proteica. Esto ocurre en las capas superiores del epitelio (estrato espinoso), donde aumenta la actividad transcripcional del promotor tardío dependiente de diferenciación. Este promotor se halla en el marco de lectura del gen E7 y promueve la transcripción de proteínas involucradas en la replicación del ADN viral, tales como E1, E2, E4 y E5

además de L1 y L2. El ensamble de las partículas virales ocurre en el estrato granuloso del epitelio y eventualmente las células infectadas se descaman de la capa superior de éste y liberan a los viriones para continuar con el ciclo infeccioso (López *et al.*, 2006).

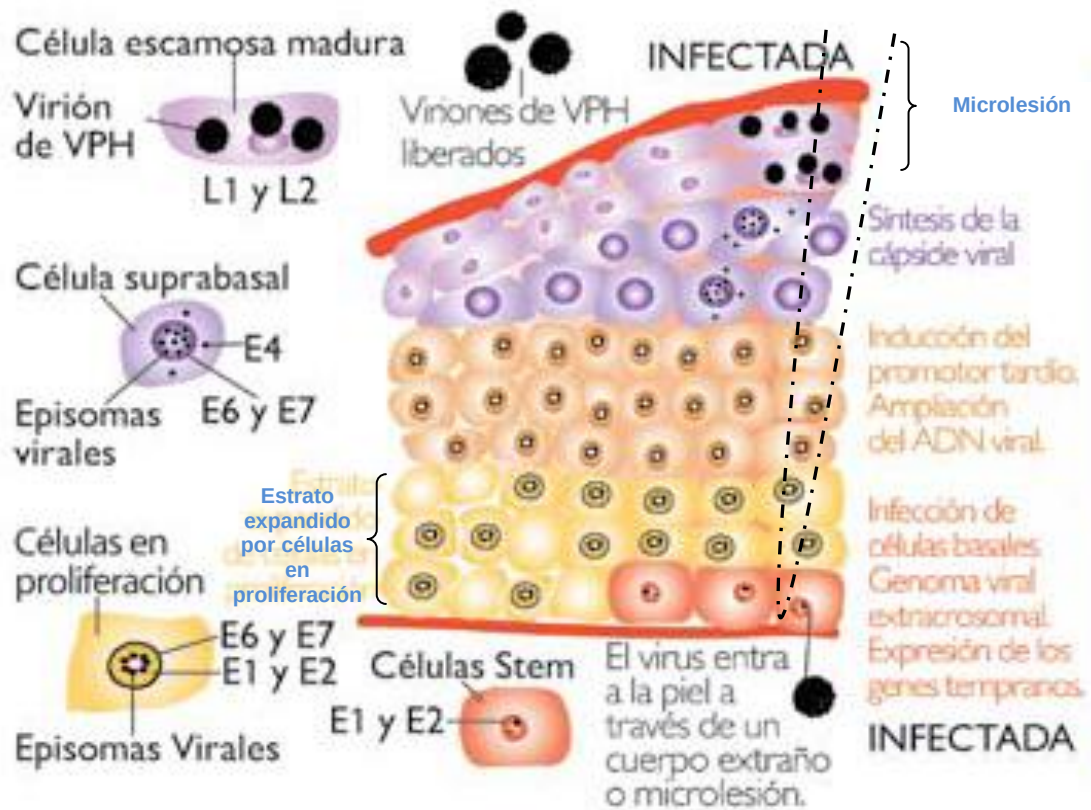


Figura 3. Después de la infección las células en la membrana basal expresan las proteínas tempranas; estas células, que están en división se comienzan a expandir verticalmente y la diferenciación es retrasada. Las proteínas virales comienzan a expresarse secuencialmente con la diferenciación y los viriones se producen al ensamblarse en las capas superiores del epitelio. Tomado y modificado de (López *et al.*, 2006).

Por el contrario, en un cérvix no infectado las células se mantienen en estratos perfectamente delineados, donde las células presentadoras de antígenos, pueden actuar y proteger el cérvix [Figura 4].

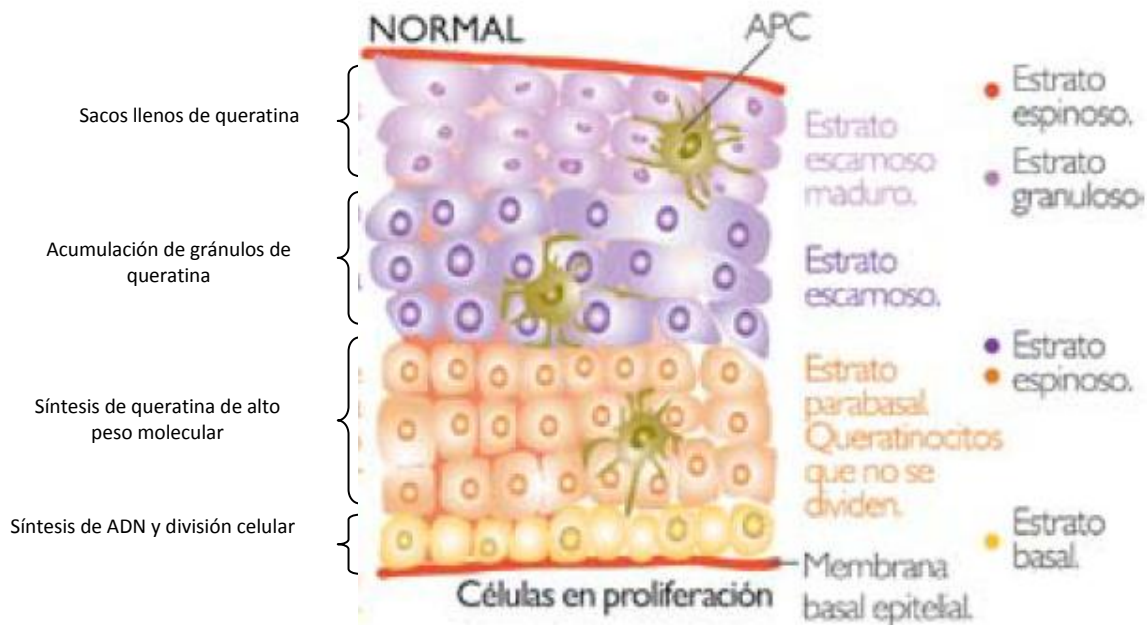


Figura 4. En la figura se muestra cómo están organizadas las células en el epitelio estratificado de un cérvix normal. Las células presentadoras de antígeno (APC) están presentes y funcionales. Se puede observar cómo las células germinales normales, se dividen a lo largo de la membrana basal y maduran verticalmente sin división posterior (estratos perfectamente alineados horizontalmente en función a su maduración). Tomado y modificado de (López *et al.*, 2006).

Alteración del ciclo celular provocado por el VPH

La progresión del ciclo celular está regulado de forma armónica por diferentes proteínas; entre ellas las ciclinas y las cinasas dependientes de ciclinas, entre otras (Alberts *et al.*, 2008). Esta regulación puede verse afectada por diferentes factores, siendo la transición G1-S la más susceptible y peligrosa. En esta transición de fases del ciclo algunas de las proteínas afectadas por la infección de VPH son pRb, p53 y p21. Cuando la proteína pRb se encuentra subfosforilada, secuestra a los factores de transcripción E2F y DPl, los cuales son necesarios para la progresión del ciclo celular; así de este modo, pRb funciona como freno del ciclo celular, en caso de existir alguna anomalía en la célula como daño al ADN. Por otro lado, la proteína p53 también llamado “el guardián del genoma” se encarga de controlar la progresión del ciclo celular monitoreando la integridad del genoma. Una vez detectado el daño, p53 incrementa su concentración en la célula y este actúa como un factor de transcripción que se encarga de activar genes necesarios para solucionar el daño o iniciar el proceso apoptótico (Sánchez *et al.*, 2005).

Estudios experimentales recientes, han indicado que las proteínas E6 y E7 desempeñan un papel crítico en la carcinogénesis cervical. La proteína E6 de los VPH de alto riesgo, se acopla formando un complejo muy estable con P53 para inducir su proteólisis [Figura 5], además de desregular la transcripción de P53 a través del coactivador CBP/p300 (Furumoto *et al.*, 2002).

La proteína E7 provoca que el factor de transcripción E2F se libere de pRb acelerando el ciclo celular. E7 forma complejos con pRb degradando a Rb, por lo tanto, E7 provoca indirectamente la activación E2F, lo que consecuentemente provoca que la célula entre en el ciclo celular [Figura 5] (Carrasco, 2010).

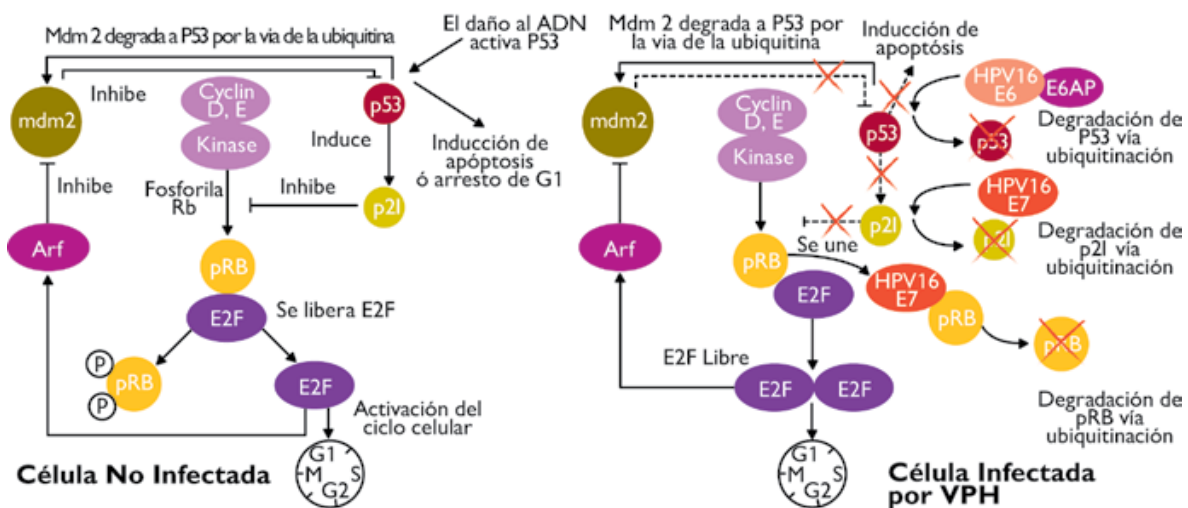


Figura 5. Efecto de las proteínas E6 y E7 en el ciclo celular. Tomado de (López *et al.*, 2006).

VPH y sistema inmune

El sistema inmune tiene la función de defender al organismo de diferentes patógenos como microorganismos y toxinas. Este posee las importantes características de ejercer una respuesta dirigida altamente específica distinguiendo lo propio de lo extraño, así como generar memoria y ejercer una acción más eficiente y rápida a futuras exposiciones con el mismo patógeno (Janeway *et al.*, 2012). Por consiguiente, el sistema inmunológico se divide en dos tipos: el innato y el adaptativo. El sistema inmune innato, ha evolucionado de tal forma que reconoce carbohidratos y lípidos (marcadores estructurales de muchos patógenos). Mientras que el sistema inmune adaptativo reconoce principalmente antígenos peptídicos derivados de proteínas extrañas. Estos péptidos pueden ser internos a la célula del hospedero (por ejemplo un virus), o ser parte de una

estructura proteínica de un microorganismo externo a la célula (Abbas *et al.*, 2010). Existen diferentes células que pueden combatir una infección por VPH como las células asesinas naturales (NK) y los linfocitos T, donde las células T $CD4^+$ y $CD8^+$ pueden combatir la infección dirigiendo el ataque principalmente a la proteína L1 (Malik *et al.*, 2009). Sin embargo, el VPH ha evolucionado de tal forma que expresa múltiples proteínas para evadir el sistema inmune, una de esas proteínas es E5 la cual puede inhibir o desregular la expresión de MHC I, evitando una correcta erradicación de la infección por parte de células T y células NK (Hosseini *et al.*, 2005).

Inmunidad humoral

La inmunidad humoral esta mediada por anticuerpos, producidos por linfocitos de la línea B y por diferentes moléculas como el sistema del complemento que se encuentran en el plasma sanguíneo, así como en diferentes fluidos corporales como la saliva, mucosas, etcétera. Los anticuerpos son glicoproteínas en forma de “Y”, las cuales son altamente específicas a un antígeno gracias a que poseen sitios sumamente variables. Están constituidos por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) con un peso aproximado de 50 a 70kDa y dos ligeras (L) con un peso de aproximado de 23kDa, que en conjunto, constituyen un monómero de inmunoglobulina [Figura 6]; los anticuerpos se pueden encontrar en forma de monómeros, dímeros y pentámeros, dependiendo su función. Cuando las inmunoglobulinas están unidas a la membrana de las células B, desempeñan el papel de receptores para el antígeno de dicha célula. La interacción del antígeno con los anticuerpos de membrana, constituye la fase de reconocimiento de la inmunidad humoral. Los anticuerpos que se producen de forma soluble, se unen al antígeno y desencadenan varias funciones importantes efectoras del sistema inmune como la opsonización, la neutralización de toxinas y virus, entre otras (Abbas *et al.*, 2010).

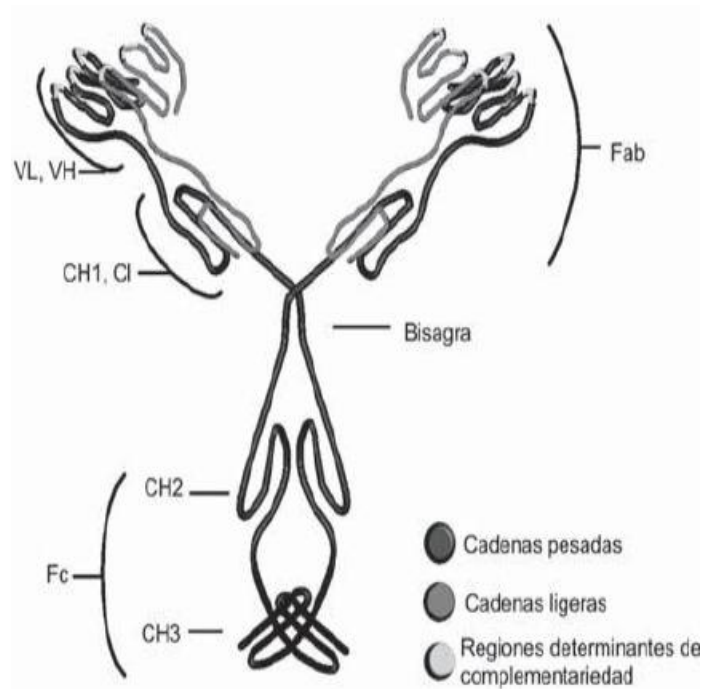


Figura 6. Estructura de las inmunoglobulinas (monómero).

VL: Fracción variable de la cadena ligera, **VH:** Fracción variable de la cadena pesada, **Fab:** Fracción de unión antigénica, **Fc:** Fracción cristalizante, **Bisagra:** Le confiere movilidad a la inmunoglobulina. Tomado de (Nina *et al.*, 2006).

Cuando un antígeno ingresa al organismo y es reconocido por la inmunoglobulina de la célula B unida a membrana, esta célula interpreta esta unión como una señal desencadenante para diferenciarse como célula plasmática formadora de anticuerpos, que junto con citocinas liberadas por células Th2 se induce la diferenciación a una célula plasmática madura [Figura 7]. Los anticuerpos producidos, serán reactivos al mismo antígeno que se unió a la inmunoglobulina de membrana (Roitt *et al.*, 2008).

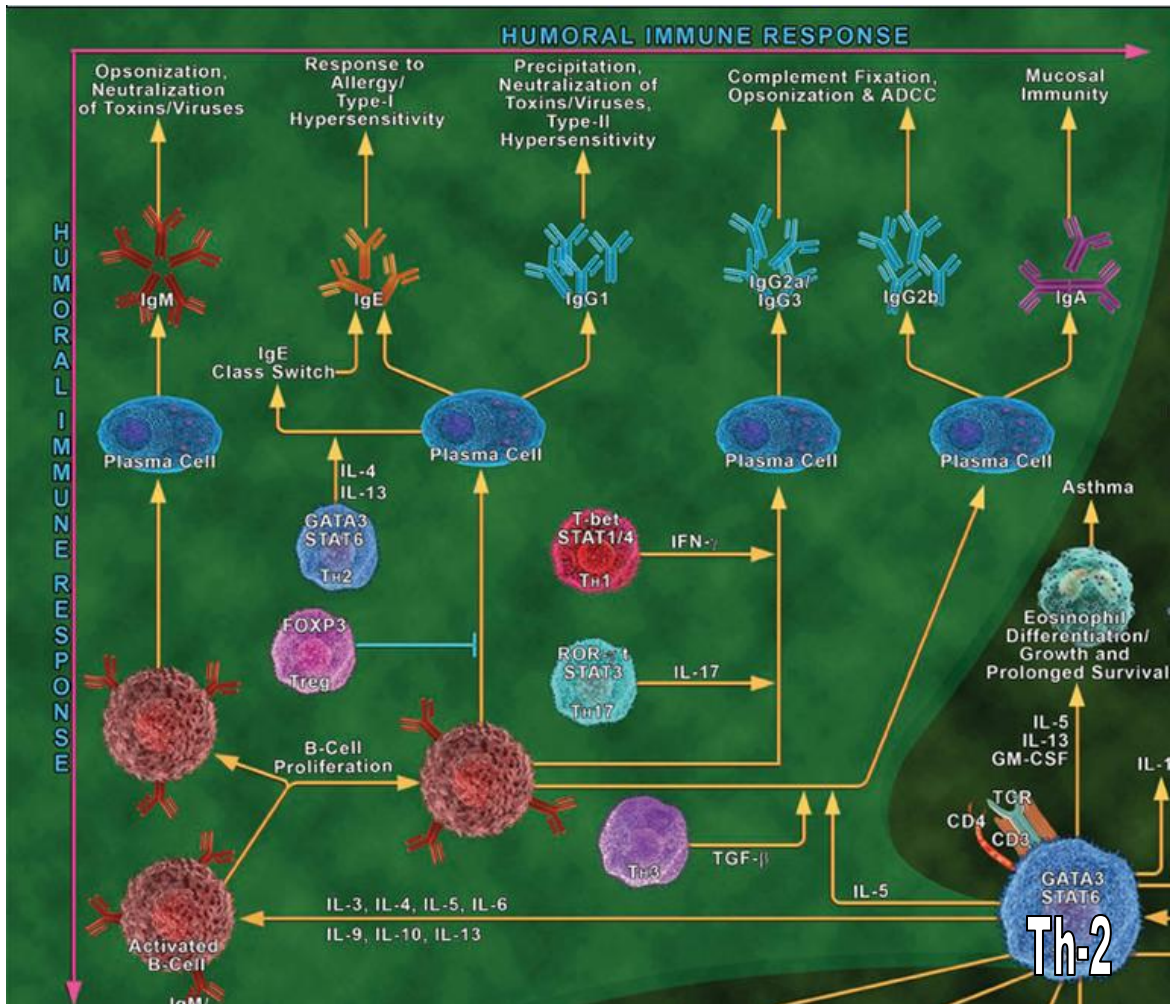


Figura 7. Cascada de señalización de la célula B activada. El linfocito Th2 libera diferentes citocinas que estimulan a la célula B activada a proliferar y cada una de esos clones se van a diferenciar a células plasmáticas productoras de anticuerpos. Tomado y modificado de Biolegend: Immunologic Networks 2011.

Marcadores Tumorales

El término marcador tumoral se aplica para definir a toda sustancia de carácter bioquímico producida por las células tumorales; lo que permite conocer la presencia, evolución o respuesta terapéutica de un tumor. Generalmente estos marcadores tumorales pueden ser detectados de forma sistémica (a distancia), es decir, se pueden presentar en el suero u otros fluidos biológicos, lo que puede facilitar un diagnóstico oportuno de una neoplasia (González *et al.*, 2000).

En los últimos años se han tratado de diseñar métodos eficaces para poder evaluar el riesgo de desarrollar CaCu y otros muchos tipos de cáncer, así como para mantener un seguimiento en las diferentes etapas de la historia natural de la enfermedad. Muchos de los métodos de diagnóstico que actualmente se utilizan, se basan en buscar anormalidades citológicas e histopatológicas, sin embargo, para enriquecer estos análisis, sería deseable tener marcadores de tumores o de cáncer muy específicos, que ayudaran a prevenir la enfermedad o diagnosticarla en etapas muy tempranas para ofrecer un efectivo, pertinente y eficaz tratamiento específico (Park *et al.*, 1997). Por lo que respecta a la sensibilidad y especificidad de estos marcadores, no se cuenta aún con alguno que se acerque al 100% de estas características; ya que esto puede variar dependiendo no sólo en relación al estadio tumoral, sino también con diversos factores inherentes al tumor o asociados a los hábitos del propio paciente. Si se tiene en cuenta que el marcador es sintetizado y liberado por la célula neoplásica, es lógico esperar que mientras existan más células tumorales habrá más concentración del marcador tumoral; sin embargo, se tienen que tomar en cuenta otros factores que pueden tener una gran influencia a la hora de tratar de detectar concentraciones de un marcador tumoral como lo son: el lugar de síntesis, la localización intracelular, el mecanismo de secreción y muy importante resulta la vascularización donde se asienta el tumor, ya que una gran vascularización facilitaría el acceso del marcador a la circulación (González *et al.*, 2000). Actualmente existen diversos marcadores en neoplasias ginecológicas [Tabla 2] que son utilizados con diferentes fines médicos como diagnósticos, de pronóstico y de seguimiento; esta última utilidad resulta muy importante, ya que permite valorar la existencia de recidiva tumoral tras una cirugía o descartar el origen tumoral de los altos valores del marcador y atribuirlo a otro origen.

Tumor	Marcadores
Cáncer de ovario	
Epiteliales no mucinosos	CA125
Mucinosos	CA19,9, CEA, CA125
Tumores de células germinales	AFP, β -HCG
Tumores del seno endodérmico	AFP
Teratomas inmaduros	AFP, β -HCG
Tumores de la granulosa	Inhibina
Cáncer de útero	
Tumores de Endometrio	CEA, CA19,9, CA125
Cáncer de cérvix	
Escamosos	SCC
Adenocarcinomas	CEA, CA19,9, CA125
Cáncer de vulva	SCC
Cáncer de mama	CEA, CA15,3 (MCA o CA 549), c-erbB2/neu

Tabla 2. Marcadores tumorales en neoplasias ginecológicas. Tomado y modificado de (González *et al.*, 2000).

Marcadores tumorales y CaCu

Los estudios de la respuesta inmune hacia el VPH han progresado lentamente, debido en parte a la carencia de inmunoensayos disponibles. Durante las últimas dos décadas, los estudios serológicos han sido importantes para entender la historia natural de las infecciones por VPH y varios esfuerzos se han llevado a cabo para desarrollar ensayos genotipo-específicos. En este contexto, la observación de que las proteínas de la cápside viral generadas en sistemas de

expresión eucariótica son capaces de autoensamblarse en partículas tipo virales (VLP), ha permitido el uso de estas partículas para estudios de la respuesta inmune a VPH (Zhou *et al.*, 1991; Kirnbauer *et al.*, 1992; Hagensee *et al.*, 1993; Rose *et al.*, 1993). Un gran número de estudios ha demostrado que el suero humano puede reaccionar con VLP y que esta reactividad es altamente específica al tipo de VPH (Ochi *et al.*, 2008; Wideroff *et al.*, 1999; Carter *et al.*, 2000). Asimismo, se ha encontrado una fuerte asociación entre la seropositividad de anticuerpos a VLP de VPH y el desarrollo de lesiones cervicales o la progresión de estas lesiones a cáncer cervical (Sasagawa *et al.*, 1996; Heim *et al.*, 2002; Viscidi *et al.*, 1997). En estudios epidemiológicos previos, se ha demostrado que la presencia de anticuerpos específicos a VLP de VPH-16 se asocia con un incremento de 12.5 veces en el riesgo de desarrollar carcinoma *in situ* o cáncer cervical invasivo (Sasagawa *et al.*, 1998; Lehtinen *et al.*, 1996). No obstante, también se ha demostrado que la presencia de anticuerpos específicos a VLP de VPH no necesariamente son indicativos de la infección viral, ya que la detección de anticuerpos es fuertemente asincrónica con la infección y la respuesta de anticuerpos a proteínas de VPH no invariablemente ocurre durante una infección natural. De hecho, se ha reportado que la respuesta inmune humoral a VLP es inducida en casi la mitad de mujeres con citología normal quienes tienen ADN viral en su epitelio cervical (Lehtinen *et al.*, 1996).

Por otra parte, la presencia de anticuerpos específicos a los antígenos tumorales E6 y E7, son considerados como el mejor marcador para la progresión de cáncer cervical (Lehtinen *et al.*, 2003; Park *et al.*, 1997; Viscidi *et al.*, 1997), ya que estas proteínas se expresan relativamente en más altos niveles en displasia cervical de alto grado y CaCu (Greenstone *et al.*, 1998). Dado que las proteínas E6 y E7 son las principales responsables de la transformación celular, su incremento puede ser monitoreado a través de la generación de anticuerpos séricos.

Proteínas E6 y E7 como marcadores tumorales

Existen diferentes estudios donde se han propuesto proteínas asociadas al VPH como marcadores tumorales entre las cuales están las proteínas E6 y E7. Estas proteínas representarían una ventaja, por el simple hecho de que son inherentes a una infección por VPH, y no son sintetizadas en un organismo con ausencia de infección.

Uno de los marcadores tumorales que se conoció primero es el antígeno carcinoembrionario (CEA), el cual es también uno de los más utilizados en la detección de CaCu, ya sea solo o en combinación con otros, como el SCCA. CEA

no es específico de un órgano y valores anormales del mismo pueden ser encontrados en múltiples carcinomas. Tanto CEA y SCCA han sido utilizados para poder realizar comparaciones con otros prospectos de marcadores tumorales como es el caso de las proteínas E6 y E7. Jong Sup Park y colaboradores, realizaron algunos estudios con hallazgos bastante interesantes; uno de estos fue que los marcadores tumorales usados convencionalmente (SCCA y CEA) parecen presentar altos títulos de anticuerpos en etapas avanzadas y pocos en etapas tempranas. Sin embargo SCCA tiene un incremento significativo concordante respecto al progreso del CaCu en pacientes positivas a VPH-16. Por otra parte cuando utilizaron las proteínas E6 y E7 de VPH-16 transcritas *in vitro* (*E. Coli*), observaron que la proteína E7, tenía un incremento significativo gradual respecto al estado clínico de la enfermedad, desde estados tempranos (NIC), hasta CaCu III/IV. Respecto a la proteína E6 la mayoría de las pacientes con neoplasia cervical, generan una respuesta positiva contra esta proteína, lo cual se puede ocupar como un marcador específico contra estas infecciones, esto aunado a el monitoreo de anticuerpos contra la proteína E7 de VPH-16 puede ser de gran utilidad para ayudar a generar pronósticos fiables en la evolución de la enfermedad (Park *et al.*, 1997).

4. Planteamiento del problema y justificación

El cáncer cervicouterino (CaCu) es un problema importante de salud pública, ya que constituye una de las principales causas de mortalidad por cáncer entre las mujeres mexicanas (INEGI, 2010). Cada año se diagnostican alrededor de 10,000 nuevos casos de CaCu invasor y la mayoría de las pacientes ingresan con la enfermedad avanzada y con un mal pronóstico, lo que representa una gran pérdida de recursos humanos y económicos. En consecuencia, resulta importante desarrollar métodos que permitan la detección y el diagnóstico oportuno de la enfermedad. Puesto que el establecimiento del CaCu se asocia fuertemente con la infección permanente por virus de alto riesgo y la expresión de los antígenos tumorales E6 y E7 representa un buen marcador para la progresión de cáncer cervical, se ha considerado que la presencia de anticuerpos específicos a estas proteínas es el mejor marcador de progresión tumoral, debido a que la respuesta de anticuerpos es influenciada por el estado de la enfermedad y por el tamaño tumoral (Lehtinen *et al.*, 2003; Park *et al.*, 1997; Viscidi *et al.*, 1993). En consecuencia, la detección óptima de anticuerpos específicos para los antígenos E6 y E7 puede ser importante en el entendimiento de la seroconversión en pacientes con lesiones primarias, así como para evaluar la evolución de la infección o la progresión de la infección a CaCu.

Nuestro grupo de investigación ha identificado que los péptidos de E6 (PRKLPQLCTELQTTI) y E7 (EIDGPAGQAEPDRAHYNI, RAHYNIVTF, TLGIVCPI) de VPH-16, contienen secuencias inmunogénicas con capacidad de inducir linfocitos T citotóxicos en pacientes con neoplasias cervicales (Monroy *et al.*, 2007) y en modelos de ratón (Paz *et al.*, 2009), además de ser reconocidas por anticuerpos específicos presentes en muestras séricas de pacientes con NIC-I (Monroy *et al.*, 2011). Por lo tanto, resulta interesante evaluar el reconocimiento de los péptidos de este estudio por parte de anticuerpos presentes en sueros de pacientes con estadios más avanzados de la enfermedad, y así, poder llevar a cabo una comparación entre pacientes con neoplasias cervicales precursoras (NIC-I) y pacientes con cáncer invasor (CaCu I – IV), así como obtener una herramienta que pueda indicar la progresión tumoral, ya que la respuesta de anticuerpos es influenciada por el estado de la enfermedad y el tamaño tumoral (Lehtinen *et al.*, 2003; Park *et al.*, 1997; Viscidi *et al.*, 1993). La identificación de antígenos seroreactivos podrá ser de gran utilidad para emplearse como marcador serológico en CaCu y además para generar herramientas que permitan evaluar el riesgo de desarrollar CaCu. La implementación de análisis serológicos como marcadores de progresión tumoral, aunado a los estudios citológicos e histopatológicos rutinarios, podría ser una buena herramienta para combatir el cáncer cervical.

5. Hipótesis

Se sabe que la presencia de anticuerpos específicos hacia las proteínas oncogénicas E6 y E7 de VPH de alto riesgo se asocia directamente con la progresión del cáncer cervical. Nuestro grupo de investigación ha encontrado que los péptidos de E6 (PRKLPQLCTELQTTI) y E7 (EIDGPAGQAEPDRAHYNI, RAHYNIIVTF, TLGIVCPI) de VPH-16 son reconocidos por anticuerpos presentes en pacientes con NIC-I y positivas a la infección por VPH-16. En consecuencia, se espera que la reactividad de anticuerpos hacia el péptido TPTLHEYMLDLQPETT de la proteína E7 de VPH-16 y de los péptidos YSKISEYRHYC y DPQERPRKLPQLCTELQTT de la proteína E6 de VPH-16 en pacientes con estadios más avanzados de la enfermedad y positivas a la infección por VPH-16, se vea incrementada en comparación con la reactividad de anticuerpos en pacientes con neoplasias cervicales precursoras. Por otro lado, se espera una menor reactividad hacia estos péptidos en sueros de pacientes infectadas con VPH diferente al 16, en comparación con los sueros de pacientes con infección por VPH-16. Adicionalmente, se plantea la posibilidad que los sueros de pacientes con los valores más altos correspondan con los estadios más avanzados de la enfermedad.

6. Objetivos

Objetivo General

Analizar la capacidad del péptido TPTLHEYMLDLQPETT de la proteína E7 de VPH-16 y de los péptidos YSKISEYRHYC y DPQERPRKLPQLCTELQTT de la proteína E6 de VPH-16 para detectar la presencia de anticuerpos específicos en sueros de pacientes con neoplasias cervicales precursoras (NIC-I) y con cáncer invasor (CaCu I - IV).

Objetivos particulares

- 1) Determinar la seroreactividad de donadoras normales hacia el péptido TPTLHEYMLDLQPETT de la proteína E7 de VPH-16 y de los péptidos YSKISEYRHYC y DPQERPRKLPQLCTELQTT de la proteína E6 de VPH-16 con el objetivo de delimitar un valor de corte.
- 2) Determinar la seroreactividad de pacientes con NIC-I y CaCu I-IV positivas a VPH-16 hacia el péptido TPTLHEYMLDLQPETT de la proteína E7 de VPH-16 y de los péptidos YSKISEYRHYC y DPQERPRKLPQLCTELQTT de la proteína E6 de VPH-16.
- 3) Determinar la seroreactividad de pacientes con NIC-I y CaCu I-IV con infección por VPH diferente al tipo 16 hacia el péptido TPTLHEYMLDLQPETT de la proteína E7 de VPH-16 y de los péptidos YSKISEYRHYC y DPQERPRKLPQLCTELQTT de la proteína E6 de VPH-16.

7. Material y métodos

Pacientes. Para este estudio se incluyeron sueros de 10 mujeres normales negativas a la infección por VPH, además de sueros de 20 mujeres con Neoplasias Intraepiteliales Cervicales (NIC-I) y sueros de 19 mujeres con CaCu en estadios I-IV, ambos grupos positivos a la infección por VPH-16. Adicionalmente, se utilizaron sueros de 20 pacientes con diferentes grados de CaCu con un tipo de VPH diferente al 16; además se utilizaron también 20 sueros de pacientes con NIC-I con un tipo de VPH diferente al 16. Las pacientes con CaCu positivas a la infección por VPH-16 presentan una edad promedio de 49 años en un intervalo de 29 a 81 años; mientras que las que presentan CaCu con una infección por VPH diferente al 16 presentan un promedio de 50.22 años en un intervalo de 28 a 79 años. Por otro lado, las pacientes que presentan NIC-I positivas a la infección por VPH-16 tienen un promedio de 29.55 años en un intervalo de 17 a 47 años; mientras que las que presentan NIC-I con una infección por VPH diferente al 16 presentan un promedio de 31.26 años en un intervalo de 19 a 49 años. Cabe mencionar que los sueros forman parte de un banco de sueros de pacientes atendidas en la Clínica de Displasias del Hospital General de la Ciudad de México (pacientes con NIC-I) y de pacientes con CaCu atendidas en el Hospital de Cancerología de la Ciudad de México. La tipificación del VPH se realizó con anterioridad por la técnica de PCR en muestras epiteliales cervicales.

Los sueros de donadoras normales fueron obtenidos de mujeres que acuden a control ginecológico en el Hospital General de Zona de Troncoso, las cuales resultaron con un análisis de Papanicolaou normal.

ELISA. Los péptidos TPTLHEYMLDLQPETT (E7 VPH-16) y YSKISEYRHYC (E6 VPH-16), DPQERPRKLPQLCTELQTT (péptido E6 VPH-16) fueron sintetizados (Invitrogen, USA), y la presencia de anticuerpos con reactividad hacia ellos fue determinada por medio del Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas, también conocido como ELISA. Se utilizaron placas de 96 pozos de fondo plano (Corning), donde se incubaron por triplicado 100µL. de cada uno de los péptidos disueltos en una solución de carbonatos-bicarbonatos (carbonato de Sodio 0.1M y bicarbonato de Sodio 0.1M pH 9.6) a una concentración de 10µg/mL. durante 2hrs a 37°C, y después se refrigeró a 4°C por toda una noche. Posteriormente, se realizaron 2 lavados con TBS/Tween 20 al 2% seguido de un bloqueo con TBS/Tween y Albúmina bovina sérica (BSA) al 2% (200 µL/pozo) por 2 horas a 37°C en oscuridad. Después del bloqueo, se realizaron 4 lavados a la placa con TBS/Tween 20 al 2% y se añadió el anticuerpo primario (suero de las pacientes) a una proporción de 1:100 (se realizó una estandarización previa) en solución de

bloqueo y se incubó a 37°C en oscuridad durante 2 horas. Terminado el tiempo de incubación, se realizaron 6 lavados con TBS/Tween 20 al 2% y después se agregó el anticuerpo secundario (cabra antihumano) acoplado a fosfatasa (Sigma, EUA) en una dilución 1:5000 en solución de bloqueo y se incubó durante 2 horas a 37°C en oscuridad. Terminada la incubación se procedió a lavar 8 veces la placa con TBS/Tween 20 al 2%, para después agregar a los pozos un agente generador de color (100µL por pozo), que consiste en 0.03g. de sustrato de fosfatasa alcalina por cada 5 mL. de dietanolamina (el agente cromógeno generará un color amarillo). Posteriormente se incubó a 37°C en oscuridad durante una hora, para finalmente detectar la reacción enzimática en un lector de placas (Molecular Devices, Emax) a 405 nm.

Para cada ensayo se incluyó un grupo de pozos para determinar el valor inespecífico de la reacción enzimática. Este valor fue obtenido al incluir en dichos pozos, los péptidos correspondientes, los anticuerpos secundarios y el sustrato de la fosfatasa alcalina, y son incluidos en cada gráfica. El valor de corte para determinar la seroreactividad de los sueros se obtuvo mediante la media +3 desviaciones estándar de las absorbancias de un grupo de 10 muestras de mujeres normales negativas al virus y por ende a los péptidos (Monroy *et al.*, 2011). Este método de obtención de valor de corte se aplicó para todas las gráficas. Para comparar si existe alguna diferencia estadística significativa entre los diferentes grupos de pacientes y donadoras normales, se empleó la prueba *T* de Student de dos colas. Todos los análisis estadísticos y gráficas se realizaron con el software GraphPad PRISM 5.0 para Windows (GraphPad Software, Inc.).

8. Resultados

Se determinó la presencia de anticuerpos reactivos a los 3 péptidos en pacientes con CaCu y NIC-I positivas a VPH-16 y también se determinaron los anticuerpos reactivos en pacientes con CaCu y NIC-I con VPH diferente al 16. Esto con la finalidad de detectar si las pacientes infectadas por VPH diferente al tipo 16 son susceptibles a generar títulos de anticuerpos dirigidos hacia epítopes de los péptidos antes mencionados.

Determinación de la presencia de anticuerpos reactivos a péptidos TPTLHEYMLDLQPETT (E7 VPH-16), YSKISEYRHYC (E6 VPH-16) y DPQERPRKLPQLCTELQTT (E6 VPH-16) en pacientes con lesión cervical infectadas por VPH-16

Se determinó la presencia de anticuerpos reactivos a los 3 péptidos en pacientes con CaCu y NIC-I positivas a VPH-16, para los que se realizaron varios ensayos ELISA. El primer péptido utilizado fue el TPTLHEYMLDLQPETT (E7 VPH-16) [Figura 8], donde el grupo de pacientes diagnosticadas con CaCu tuvo los más altos títulos de anticuerpos y una diferencia estadísticamente significativa con el grupo NIC-I y el grupo de donadoras normales al ser sometidos a una prueba estadística *T* no pareada, de dos colas. Adicionalmente, se realizó una prueba de comparación múltiple de Dunnett, donde igualmente se obtuvieron diferencias significativas entre el grupo de CaCu y NIC-I contra el grupo de donadoras normales.

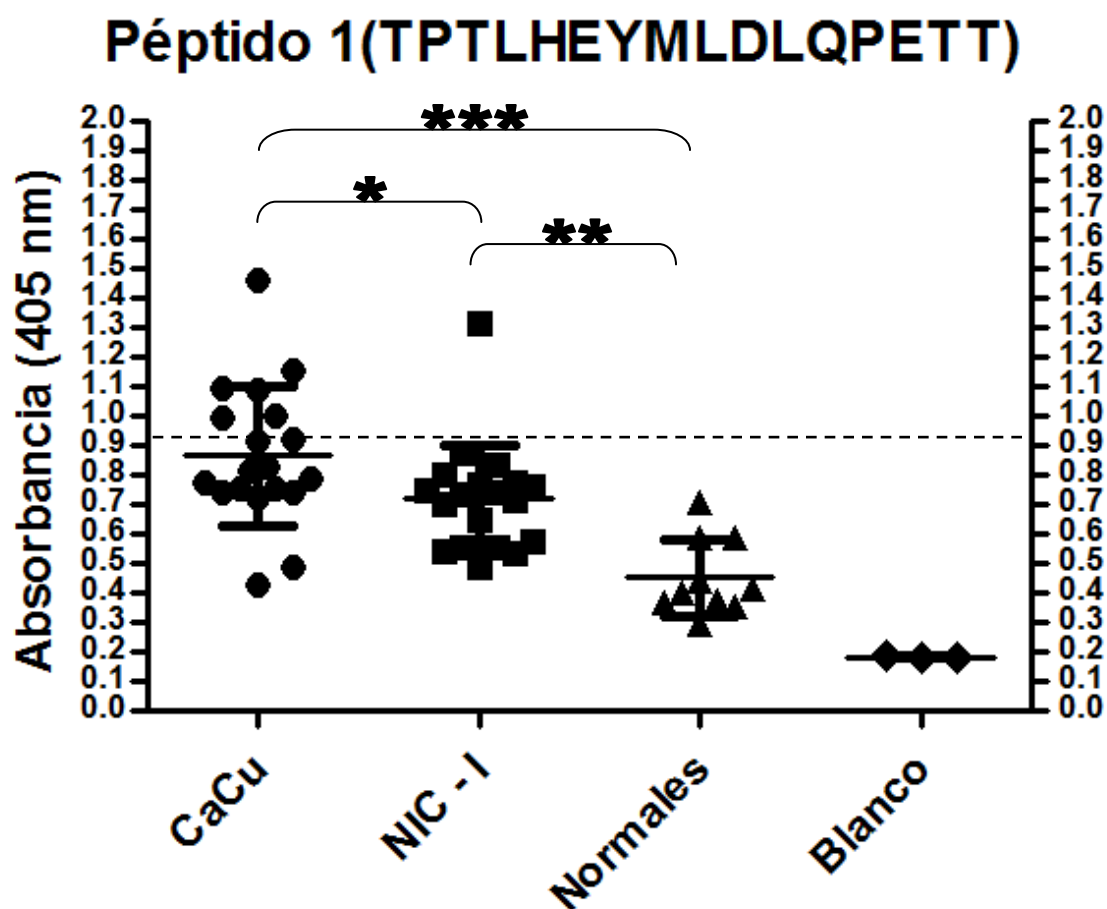


Figura 8. Valores en las absorbancias obtenidas con ensayos ELISA en el péptido TPTLHEYMLDLQPETT (E7 VPH-16). Los valores de columna de pacientes con CaCu (n=19) son significativamente mayores que los valores obtenidos de pacientes con NIC-I (n=19) ($P=0.0382$). Los valores de la columna de pacientes con NIC-I (n=19) son significativamente mayores que los valores de las donadoras normales (n=10) ($P=0.0004$). Los valores de columna de pacientes con CaCu (n=19) son significativamente mayores que los valores obtenidos en donadoras normales (n=10) ($P<0.0001$). El valor de corte se determinó mediante el valor promedio de donadoras normales (n=10) +3 desviaciones estándar (Monroy *et al.*, 2011), cuyo valor fue 0.9209.

Por otro lado, cuando se utilizó el péptido YSKISEYRHYC (E6 VPH-16) se observó también que la tendencia del grupo de pacientes diagnosticadas con CaCu es mayor que las pacientes diagnosticadas con NIC-I y donadoras normales [Figura 9]; lo que se corrobora con una prueba *T* no pareada de dos colas y una prueba de comparación múltiple de Dunnett.

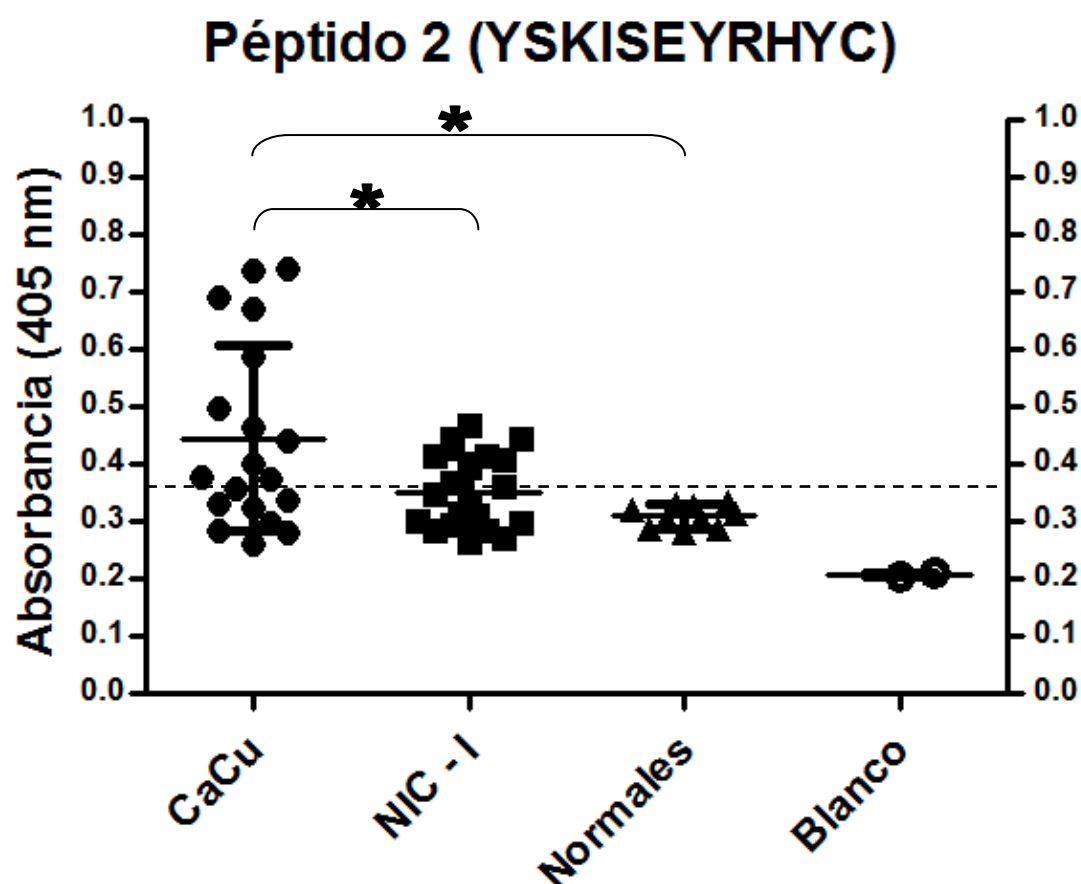


Figura 9. Valores en las absorbancias obtenidas con ensayos ELISA en el péptido YSKISEYRHYC (E6 VPH-16). Los valores de columna de pacientes con CaCu (n=19) son significativamente mayores que los valores obtenidos de pacientes con NIC-I (n=20), ($P = 0.0207$). Los valores de columna de pacientes con CaCu (n=19) son significativamente mayores que los valores obtenidos en donadoras normales (n=10), ($P = 0.0145$). El valor de corte fue 0.373189 con 10 muestras normales.

El tercer péptido probado fue DPQERPRKLPQLCTELQTT (E6 VPH-16), el cual generó valores de titulación muy similares a los del primer péptido; sin embargo, las pacientes diagnosticadas con NIC-I también generaron títulos similares [Figura 10]. Al someter los grupos a una prueba *T* no pareada y a la prueba de comparación múltiple de Dunnett, no existe diferencia significativa entre los tres grupos. El valor de corte fue de 0.92572.

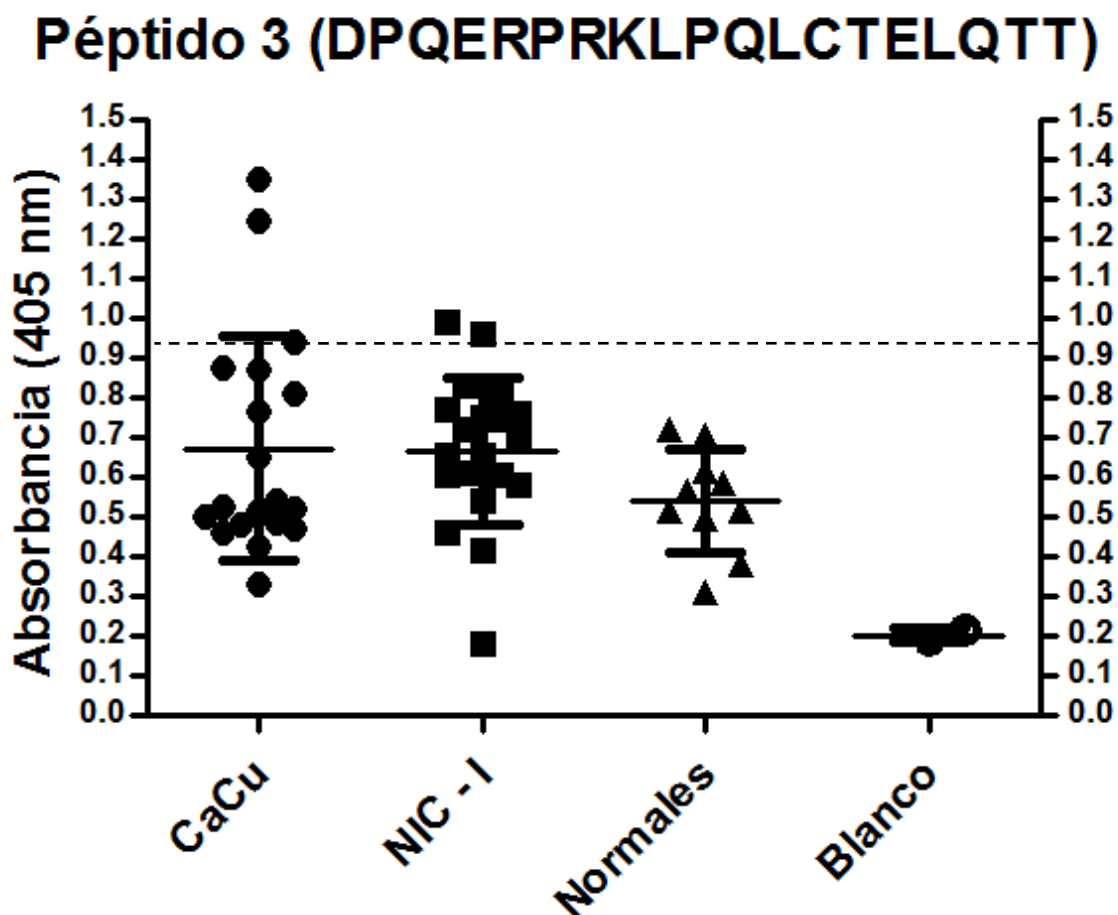


Figura 10. Valores en las absorbancias obtenidas con ensayos ELISA en el péptido DPQERPRKLPQLCTELQTT (E6 VPH-16). Los valores de columna de pacientes con CaCu (n=19) y de NIC-I (n=20) son muy similares y no arrojan una diferencia estadística significativa. El valor de corte fue de 0.9257 con 10 muestras normales.

Posteriormente se categorizaron los resultados para evaluar si los valores obtenidos en los ensayos ELISA tienen una correlación con el estadio tumoral [Tabla 3]. Sin embargo no parece existir una correlación entre el estado de la enfermedad y los títulos de anticuerpos obtenidos por ELISA, ya que la gran mayoría de las pacientes con títulos altos tienen un avance moderado en la enfermedad.

	Péptido TPTLHEYMLDLQPETT (E7 VPH-16)			Péptido YSKISEYRHYC (E6 VPH-16)			Péptido DPQERPRKLPQLCTELQTT (E6 VPH-16)		
	Número de muestras	# de pacientes con Ab> del valor de corte	Estadio Clínico	Número de muestras	# de pacientes con Ab> del valor de corte	Estadio Clínico	Número de muestras	# de pacientes con Ab> del valor de corte	Estadio Clínico
CaCu	19	6 (31.57%)	2 (IIA)	19	10 (52.63%)	1 (IIA)	19	2 (10.52%)	1 (IB)
			2 (IB)			3 (IB)			1 (IIB)
			2 (IIB)			4 (IIB)			
						1 (IIIB)			
						1 (IVB)			
NIC-I	19	1 (5.26%)		20	7 (35%)		20	2 (10%)	

Tabla 3. Tabla que muestra el porcentaje de pacientes cuyos valores de absorbancia fueron mayores al límite de corte obtenido, con sus respectivos estadios clínicos de progresión.

Determinación de la presencia de anticuerpos reactivos a péptidos TPTLHEYMLDLQPETT (E7 VPH-16), YSKISEYRHYC (E6 VPH-16) y DPQERPRKLPQLCTELQTT (E6 VPH-16) en pacientes con lesión cervical infectadas por VPH diferente al 16

Se determinó la presencia de anticuerpos reactivos a los 3 péptidos en pacientes con CaCu y NIC-I con infección por VPH diferente al tipo 16. El primer péptido utilizado fue el TPTLHEYMLDLQPETT (E7 VPH-16) [Figura 11]. Esta gráfica

muestra una gran homogeneidad en los promedios tanto de la columna de NIC-I como de la columna de CaCu y no presentan diferencia significativa; por otra parte, la columna de pacientes con NIC-I presentó diferencia estadística significativa comparada con la columna de donadoras normales en una prueba *T* no pareada de dos colas, la cual, sin embargo, no se presentó al realizar una prueba de comparación múltiple de Dunnett. El valor de corte fue de 0.6991.

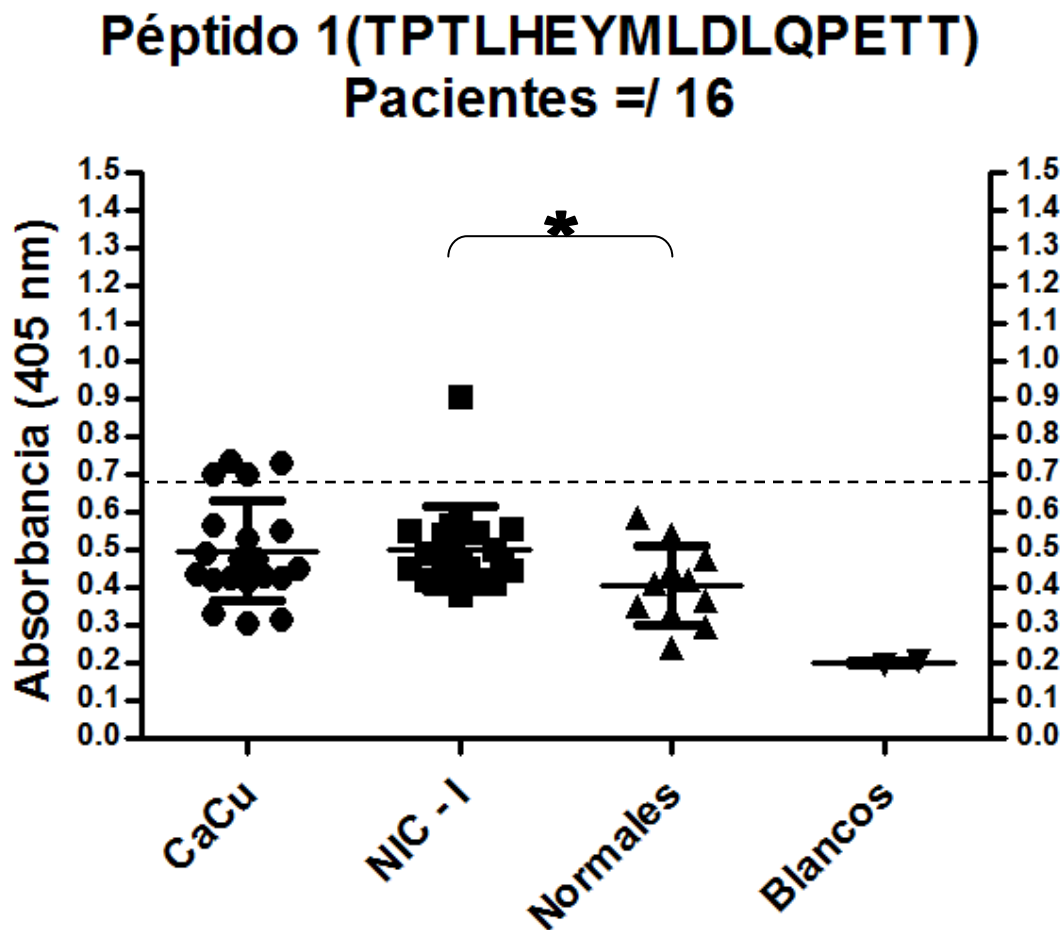


Figura 11. Valores en las absorbancias obtenidas con ensayos ELISA en el péptido TPTLHEYMLDLQPETT (E6 VPH-16). Los valores de columna de pacientes con CaCu (n=20) y de NIC-I (n=20) no arrojan una diferencia estadística significativa. La columna de pacientes con NIC-I y la columna de donadoras normales (n=10) presenta una diferencia significativa (P=0.0243). El valor de corte fue de 0. 6921.

El segundo péptido que se utilizó fue el YSKISEYRHYC (E6 VPH-16), donde las pacientes con NIC-I y CaCu tienen un comportamiento similar [Figura 12]. 2 pacientes con CaCu rebasaron la línea de corte, mientras que sólo 1 paciente con NIC-I rebasó dicha línea. No existió una diferencia estadística significativa.

Péptido 2 (YSKISEYRHYC) Pacientes =/ 16

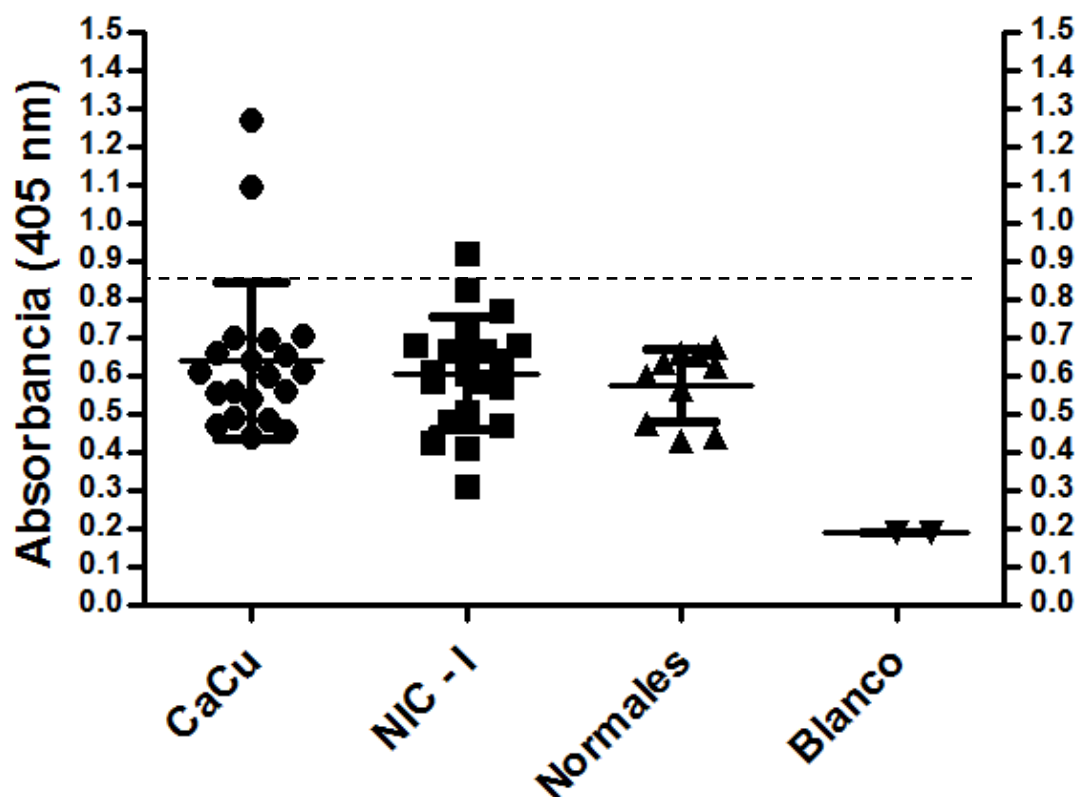


Figura 12. Valores en las absorbancias obtenidas con ensayos ELISA en el péptido YSKISEYRHYC (E6 VPH-16). La columna de pacientes con CaCu (n=20), NIC-I (n=20) y donadoras normales (n=10), no tienen diferencia estadística. El valor de corte fue de 0.8585.

Para el tercer péptido DPQERPRKLPQLCTELQTT (E6 VPH-16) se utilizaron 20 muestras de pacientes con CaCu, 20 muestras de pacientes con NIC-I y 10 muestras de donadoras normales [Figura 13]. Ningún valor en las titulaciones de anticuerpos rebasó la línea de corte. El valor de corte fue 0.9991. En esta gráfica no existe diferencia significativa.

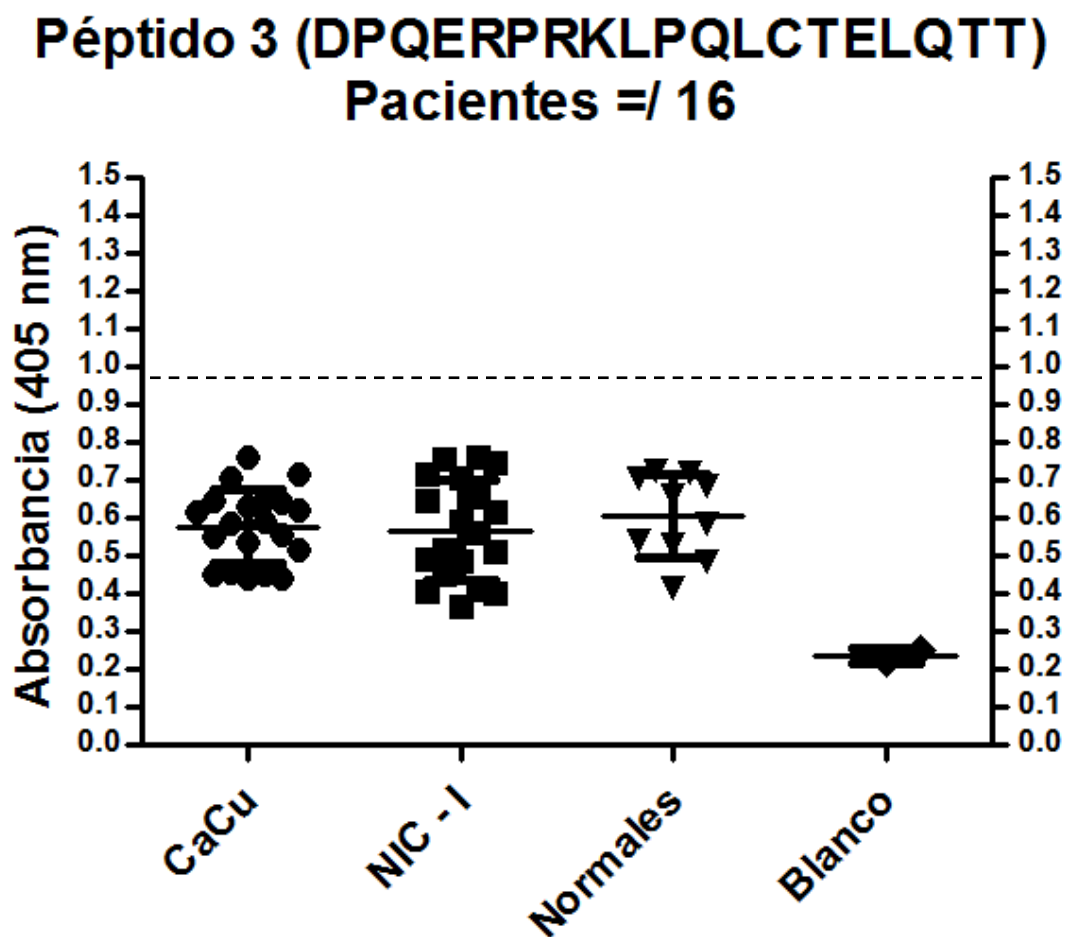


Figura 13. Valores en las absorbancias obtenidas con ensayos ELISA en el péptido DPQERPRKLPQLCTELQTT (E6 VPH-16). La columna de pacientes con CaCu (n=20) y la columna con NIC-I (n=20) no tienen diferencia estadística. El valor de corte fue de 0.9991 con 10 muestras normales.

Posteriormente en la tabla 4 se categorizaron los valores de las pacientes con absorbancias superiores al límite de corte junto con el estadio tumoral (FIGO). No parece existir una relación entre el estado avanzado de la enfermedad y los valores de absorbancia.

	Péptido TPTLHEYMLDLQPETT (E7 VPH-16)			Péptido YSKISEYRHYC (E6 VPH-16)			Péptido DPQERPRKLPQLCTELQTT (E6 VPH-16)		
	Número de muestras	# de pacientes con Ab> del valor de corte	Estadio Clínico	Número de muestras	# de pacientes con Ab> del valor de corte	Estadio Clínico	Número de muestras	# de pacientes con Ab> del valor de corte	Estadio Clínico
CaCu	20	4 (20%)	1 (IIA) 1 (IB) 2 (IIB)	20	2 (10%)	1 (IB) 1 (IIB)	20	0 (0%)	
NIC-I	20	1 (5%)		20	1 (5%)		20	0 (0%)	

Tabla 4. Tabla que muestra el porcentaje de pacientes cuyos valores de absorbancia fueron mayores al límite de corte obtenido, con sus respectivos estadios clínicos de progresión.

9. Discusión

Se ha reportado que la presencia en suero de anticuerpos que reconocen a partículas tipo-virus (VLP) conformadas por la proteína L1 de VPH, es resultado de una exposición persistente a los virus (Cason *et al.*,1992; Dillner *et al.*,1995; LeCann *et al.*,1995; Sharma *et al.*,1996), y esto a su vez se asocia con la progresión de la enfermedad; sin embargo, la presencia de estos anticuerpos no siempre es un indicador seguro de la progresión de lesiones malignas, debido a diferentes factores.

Por otra parte, también se ha demostrado la presencia de anticuerpos que reconocen a péptidos de la proteína L1 en suero de pacientes con infección por VPH-16.

En el mismo sentido, nuestro grupo de trabajo demostró que el uso de un péptido derivado de la proteína L1 de VPH-16 permitió la discriminación de muestras de sueros entre grupos de pacientes con infección por VPH de alto riesgo y de bajo riesgo (Rocha *et al.*, 1996).

Por otro lado, se ha demostrado que las lesiones malignas están asociadas con el incremento en los títulos de anticuerpos séricos de las proteínas E6 y E7 (Lehtinen *et al.*, 2003; Park *et al.*, 1997; Viscidi *et al.*, 1993).

Por lo tanto, un reciente estudio realizado por nuestro equipo de trabajo reportó una mejor detección de anticuerpos específicos por el método de ELISA utilizando una novedosa partícula tipo viral compuesta por la proteína L1 fusionada con péptidos seroreactivos de las proteínas E6 (PRKLPQLCTELQTTI) y E7 (EIDGPAGQAEPDRAHYNI, RAHYNIVTF, TLGIVCPI) comparado con una VLP que sólo contiene la proteína L1, en pacientes con NIC-I (Monroy *et al.*, 2011), sugiriendo que la actividad se debió al reconocimiento de los péptidos antigénicos de E6 y de E7 contenidos en la VLP quimérica.

Con la finalidad de complementar esas observaciones, se evaluaron los títulos de anticuerpos séricos en pacientes con neoplasias cervicales con VPH tipo 16 y en pacientes con VPH diferente al tipo 16.

Observamos que para pacientes con infección por VPH-16, el péptido 1 (TPTLHEYMLDLQPETT) tuvo un mayor reconocimiento por anticuerpos de pacientes con diferentes grados de CaCu, comparado con las pacientes con NIC-I y con las donadoras normales, con una diferencia estadística significativa. Este resultado encuentra una correspondencia con un reporte previo, en el que

utilizaron a las proteínas E7 de VPH 16 y 18 completas, y los porcentajes de anticuerpos correspondieron con el avance de la enfermedad: 53% en pacientes con CaCu, 40% en NIC y 8% en mujeres normales (Ravaggi *et al.*, 2006).

Por otro lado, se obtuvo un comportamiento similar para el péptido 2 (YSKISEYRHYC), donde existió una diferencia significativa entre los grupos de pacientes con CaCu y NIC-I; igualmente para pacientes con CaCu y donadoras normales, aunque no se encontró diferencia entre pacientes con NIC-I y donadoras normales. Estos resultados sugieren que el péptido 1 (TPTLHEYMLDLQPETT) tiene la capacidad de ser reconocido por anticuerpos específicos en diferentes grados de avance en la enfermedad (lo cual puede ser de gran valor clínico al realizar una valoración de pronóstico), y el péptido 2 (YSKISEYRHYC) sólo es reconocido en etapas avanzadas.

El péptido 3 (DPQERPRKLPQLCTELQTT) dio como resultado una alta reactividad, tanto en pacientes con lesiones como en donadoras normales, aunque sin diferencia significativa. Por tanto, no es clara la facultad de este péptido para poder discriminar entre donadoras normales y entre pacientes con lesiones de diverso grado de avance. Una posible respuesta a la alta reactividad inespecífica hacia este péptido es que en el suero de las mujeres normales existan anticuerpos hacia tipos virales de bajo riesgo u otras proteínas que puedan provocar una reacción cruzada (Di Bonito *et al.*, 2006).

Por lo tanto, la actividad con la mayor utilidad potencial para discriminar entre diferentes estadios de la enfermedad incluyendo las etapas tempranas, correspondió con el péptido 1 TPTLHEYMLDLQPETT, el cual se deriva de la proteína E7, en tanto que las secuencias de los péptidos 2 y 3 derivan de la proteína E6. Es de remarcable interés que diferentes estudios serológicos concuerdan en que la proteína E7 es mayormente reconocida que la proteína E6 en pacientes infectados por VPH-16. Sin embargo, existen péptidos de la proteína E6 que pueden ser parcialmente útiles en la discriminación de diferentes estadios de la enfermedad, como lo es el péptido 2 (YSKISEYRHYC E6 VPH-16). De acuerdo con ello, en un estudio se corroboró que en mujeres con carcinomas orofaríngeos positivas a la infección por VPH-16 se encuentran mayores títulos de anticuerpos contra la proteína E7 (51.78%) que contra la proteína E6 (36.60%) y sugieren que la proteína E7 es un buen candidato como biomarcador en pacientes asociados con el padecimiento (Anderson *et al.*, 2011).

Por otra parte, con la finalidad de evaluar la especificidad del reconocimiento por anticuerpos de los péptidos incluidos en este estudio, se realizaron los ensayos con sueros de una población de pacientes con neoplasias cervicales con tipos de virus diferentes al 16.

Al probar el péptido 1 (TPTLHEYMLDLQPETT) en un grupo de muestras de pacientes con tipos de virus diferentes al HPV16 se observó que no hay una diferencia estadística significativa entre CaCu y NIC-I. Por otra parte, sí encontramos una diferencia entre el grupo de pacientes con NIC-I y el grupo de donadoras normales, mediante una prueba T, pero no cuando se sometieron estos dos grupos a una prueba de comparación múltiple de Dunnett, resaltando una muestra de NIC-I que rebasó el valor de corte. La mínima diferencia observada entre los grupos CaCu, NIC-I y donadoras podría explicarse por la presencia de anticuerpos hacia tipos de virus emparentados filogenéticamente al 16, así como el pobre reconocimiento de los anticuerpos de sueros de pacientes con VPH diferentes al 16 hacia los péptidos que provienen de proteínas de VPH-16.

El reconocimiento del péptido 2 (YSKISEYRHYC) no presenta diferencia estadística significativa entre los grupos NIC-I, CaCu y normales, aun cuando los anticuerpos de algunas pacientes de CaCu y NIC-I rebasan la línea de corte; del mismo modo que con el péptido 1, esto se puede deber a infecciones con tipos relacionados al VPH-16 que pueden presentar esas pacientes y al estado avanzado de la enfermedad.

Como en el caso de las muestras de pacientes positivas para VPH-16, el reconocimiento hacia el péptido 3 (DPQERPRKLPQLCTELQTT) no difirió tanto entre las donadoras normales y las pacientes con lesiones, lo cual corrobora que el uso de este péptido no parece ser conveniente para la discriminación de grupos en diferentes estadios de la infección por VPH.

Por tanto, nuestros resultados indican que los péptidos 1 y 2 pueden ser reconocidos por anticuerpos de pacientes con infección por VPH-16, pero no así el péptido 3. Sería interesante evaluar la capacidad de reconocimiento de los péptidos 1 y 2 por sueros de pacientes con VPH relacionados filogenéticamente con el VPH-16.

Por otra parte, sería interesante evaluar si la reactividad de los péptidos (TPTLHEYMLDLQPETT E7) y (YSKISEYRHYC E6), pueden ser semejantes con la observada en otro reporte, donde en pacientes que presentaban CaCu infectadas por VPH-16 se encontraron anticuerpos específicos a la proteína E7 en lavados cervicovaginales y en suero, mientras que en pacientes con NIC no existía reactividad de IgG's en suero, pero si una baja reactividad de anticuerpos en lavados cervicovaginales (Tjiong *et al.*, 2000). Estos resultados sugieren que el número de anticuerpos contra la proteína E7 en suero de pacientes infectadas con VPH-16 se incrementan en función al avance de la enfermedad y que se pueden encontrar anticuerpos contra E7 en etapas muy tempranas en el tracto cervical.

Finalmente, los ensayos ELISA realizados en este trabajo pueden resultar ser una herramienta útil en la evaluación de riesgo en la progresión de cáncer en mujeres que tienen altos títulos de anticuerpos específicos contra los péptidos 1 y 2 (TPTLHEYMLDLQPETT, YSKISEYRHYC). Existen estudios longitudinales que han demostrado que mujeres con lesiones persistentes que generan anticuerpos son 5 veces más susceptibles a desarrollar lesiones cervicales intraepiteliales comparados con mujeres que no generan anticuerpos (Carter *et al.*, 1996; Nakagawa *et al.*, 2002). Mientras que la persistencia de anticuerpos en suero contra VLP de VPH-16 incrementa el riesgo de desarrollar carcinoma *in situ* o cáncer cervical (Sasagawa *et al.*, 1998; Lehtinen *et al.*, 1996), lo que sustenta la importancia de los ensayos ELISA realizados en este trabajo y su potencial uso como herramienta clínica.

10. Conclusiones

El péptido 1 TPTLHEYMLDLQPETT (E7 VPH-16) es reconocido más intensamente por los anticuerpos séricos de pacientes con CaCu I - IV, en comparación con las pacientes con lesiones de menor grado (NIC-I), y menos aún, por las donadoras normales.

Además, el péptido 1 es reconocido en menor grado por sueros de pacientes con tipos virales diferentes al 16, presentando una diferencia significativa entre los grupos de pacientes con NIC-I y las donadoras normales.

El péptido 2 YSKISEYRHYC (E6 VPH-16) es reconocido más fuertemente con sueros de pacientes positivas a infección por VPH-16 con lesiones más avanzadas y no en lesiones tempranas; tampoco por pacientes con otro tipo de infección.

El péptido 3 DPQERPRKLPQLCTELQTT (E6 VPH-16) tiene una reacción muy inespecífica en sueros de pacientes con CaCu y en pacientes con NIC-I; lo que sugiere que el péptido 3 no parece tener facultades como un candidato a marcador tumoral.

No encontramos una correlación entre los valores de titulación de anticuerpos con el grado de avance de la lesión presente en la paciente.

11. Referencias Bibliográficas

Abbas A., Lichtman A., Pillai S., 2010, Cellular and molecular immunology, Ed. Saunders/Elsevier, pp. 526.

Alberts B., Bray D., Lewis J., 2008, Biología Molecular de la Célula, 5ta edición, Ed. Omega, pp. 1728.

Alonso P., Lazcano E., Hernández M., 2001, Cáncer cervicouterino diagnóstico, prevención y control, 1ra edición, pp. 254.

Anderson K., Wong J., Souza G., Riemer A., Lorch J., Haddad R., Pai S., Longtine J., McClean M., LaBaer J., Kelsey K., Posner M., 2011, Serum antibodies to the HPV16 proteome as biomarkers for head and neck cancer, *British Journal of Cancer*, 104:1896-1905.

Arrossi S., Sankaranarayanan R., Maxwell D., 2003, Incidence and mortality of cervical cancer in Latin America, *Salud Publica Mex* 3:306-314.

Biolegend: Immunologic Networks 2011, <http://www.biolegend.com/pathways/>

Bosch F., Lorinc Z., Muñoz N., Meijer C., Shah K., 2002, The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer, *J Clin Pathol* 55:244-265.

Carrasco M., 2010, Neoplasia Intraepitelial Cervical grado II y III: Estudio morfológico de sus diferencias y relación con el Virus del Papiloma Humano, Tesis Doctoral, Universidad Internacional de Cataluña.

Carter J., Koutsky L., Hughes J., Lee S., Kuypers J., Kiviat N., Galloway D., 2000, Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection, *J Infect Dis* 181:1911-1919.

Cason J., Kambo K., Best J., McCance D., 1992, 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* 50:349-355.

Castañeda S., 2005, El cáncer cervical como problema de salud pública en mujeres mexicanas y su relación con el virus de papiloma humano, Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona Facultad de Medicina.

Clifford G., Smith J., Plummer M., Muñoz N., Franceschi S., 2003, Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis, *British Journal of Cancer* 88:63-73.

Cosme E., 2007, La nueva clasificación de la O.M.S. 2005. Lesiones precursoras y los tumores de la laringe, hipofaringe y tráquea, *Rev Esp Patol* 40:3-10.

Day M., Lowy D., Schiller., 2003, Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway, *Virology* 307:1-11.

Di Bonito P., Grasso F., Mochi S., Accardi L., Donà M., Branca M., Costa S., Mariani L., Agarossi A., Ciotti M., Syrjänen K., Giorgi C., 2006, 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, *Infectious Agents and Cancer* 1:6.

Dillner J., Wiklund F., Lenner P., Eklund C., Fredriksson V., Schiller J., Hibma M., Hallmans G., Stendahl U., 1995, Antibodies against linear and conformational epitopes of human papillomavirus type 16 that independently associate with incident cervical cancer, *Int J Cancer* 60:377-382.

Feltkamp M., Smits H., Vierboom M., Minnaar R., Johgh B., Brijfhout J., Schegget J., Melief C., Kast W., 1993, Vaccination with cytotoxic T lymphocyte Epitope containing peptide protects against a tumor induced by human Papillomavirus type 16-transformed cells, *Eur J Immunology* 23: 2242-2249.

Furumoto H., Irahara M., 2002, Human papilloma virus (HPV) and cervical cancer, *J Med Invest* 49:124-133.

González M., González B., 2000, Ginecología Oncológica, 2da Edición, Masson, pp. 634.

Greenstone H., Nieland J., De Visser K., Bruijn M., Kirnbauers R., Roden R., Lowy D., Kast W., Schiller J., 1998, Chimeric papillomavirus virus-like particles elicit antitumor immunity against the E7 oncoprotein in an HPV16 tumor model, *Proc. Natl Acad Sci* 95:1800-1805.

Griffiths T., Mellon J., 1999, Human papillomavirus and urological tumours: I. Basic science and role in penile cancer, *BJU International* 84:579-586.

Hagensee M., Yaegashi N., Galloway D., 1993, Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins, *J Virol* 67:315-322.

Heim K., Widschwendter A., Pirschner G., Wieland U., Awerkiew S., Christensen N., Bergant A., Marth C., Höpfl R., 2002, Antibodies to human papillomavirus 16 L1 virus-like particles as an independent prognostic marker in cervical cancer, *Am J Obstet Gynecol* 186:705-711.

Hosseini G., Haghshenas M., Marchetti B., O'Brien P., Campo M., 2005, The E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I, *International Journal of Cancer* 113:276-283.

Ilic I., 2010, Comparación de estrategias del cribado primario de lesiones intraepiteliales de alto grado y el cáncer de cuello del útero en la población de Córdoba: el papel de la citología cervical y la determinación del ADN del virus de papiloma humano, Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba.

INEGI (2010). Estadísticas vitales, base de datos. Consultado en: www.inegi.gob.mx

Janeway C., Walport M., Travers P., Murphy K., 2012, Immunobiology, 8va Edición, Ed. Garland Science, pp. 928.

Kirnbauer R., Booy F., Cheng N., Lowy D., Schiller J., 1992, Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic, *Proc Natl Acad Sci USA* 89:12180-12184.

Kirnbauer R., Hubbert N., Wheeler C., Becker T., Lowy D., Schiller J., 1994, A virus-like particle enzyme-linked immunosorbent assay detects serum antibodies in a majority of women infected with human papillomavirus type 16, *J Natl Cancer Inst* 86:494-499.

LeCann P., Chabaud M., Leboulleux D., Mougin C., Mayelo V., Legrand M., Calvet C., Afoutou J., Coll A., Coursaget P., 1995, Detection of antibodies to L1, L2, and E4 proteins of human papillomavirus types 6, 11, and 16 by ELISA using synthetic peptides, *J Med Virol* 45:410-414.

Lehtinen M., Dillner J., Knekt P., Luostarinen T., Aromaa A., Kirnbauer R., Koskela P., Paavonen J., Peto R., Schiller J., Hakama M., 1996, Serologically diagnosed infection with human papillomavirus type 16 and risk for subsequent development of cervical carcinoma: nested case-control study, *BMJ* 312:537-539.

Lehtinen M., Pawlita M., Zumbach K., Lie K., Hakama M., Jellum E., Koskela P., Luostarinen T., Paavonen J., Pukkala E., Sigstad E., Thoresen S., Dillner J., 2003, Evaluation of antibody response to human papillomavirus early proteins in women in whom cervical cancer developed 1 to 20 years later, *Am J Obstet Gynecol* 188:49-55.

López S, Lizano M., 2006, Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia no termina, *Cancerología* 1:31-55.

Malik Z., Hailpern S., Burk R., 2009, Persistent antibodies to HPV virus-like particles following natural infection are protective against subsequent cervicovaginal infection with related and unrelated HPV, *Viral inmun* 6:445-449.

Monroy A., Gómez M., Weiss B., Paz G., Hernández J., Pérez K., Tapia Y., Toledo M., Santiago E., Sánchez H., Mora M., 2011, A novel HPV 16 L1-based chimeric virus-like particle containing E6 and E7 seroreactive epitopes permits highly specific detection of antibodies in patients with CIN 1 and HPV-16 infection, *Virology Journal* 8:59.

Monroy A., Hernández J., Mora M., 2007, Identification of epitopes from L1, E6, and E7 proteins of the HPV-16 and 18 types and its implication for diagnosis and treatment of cervical carcinoma, *Advances in Cancer Research*, Ed. Manual Moderno, UNAM y PUIS. pp:1-32.

Muderspach L., Sharon W., Linda R., Liz B., Juan F., Small L. A., Martin K. W., Grace F., Verna M., Jeffrey W., 2000, A phase I trial of a human papillomavirus (HPV) peptide vaccine for women with high-grade cervical and vulvar Intraepithelial neoplasia who are HPV 16 positive, *Clin Can Res* 6:3406-3416.

Müller M., Viscidi R., Ulken V., Bouwes J., Hill P., Fisher S., Reid R., Munoz N., Schneider A., Shah K., Gissmann L., 1995, Antibodies to the E4, E6, and E7 proteins of human papillomavirus (HPV) type 16 in patients with HPV-associated diseases and in the normal population, *J Invest Dermatol* 104:168-141.

Ochi H., Kondo K., Matsumoto K., Oki A., Yasugi T., Furuta R., Hirai Y., Yoshikawa H., Kanda T., 2008, neutralizing antibodies against human papillomavirus types 16, 18, 31, 52 and 58 in serum samples from women in Japan with low-grade cervical intraepithelial neoplasia, *Clin Vaccine Immunol* 15:1536-1540.

Park J., Park D., Kim C., Ahn H., Um S., Park S., Kim S., Namkoong S., 1997, HPV-16-Related Proteins as the Serologic Markers in Cervical Neoplasia, *Gynecologic Oncology* 69:47-55.

Paz G., Monroy A., Mora M., Reynaga C., Hernández J., Weiss B., Gómez M., 2009, An HPV 16 L1-based chimeric human papilloma virus-like particles containing a string of epitopes produced in plants is able to elicit humoral and cytotoxic T-cell activity in mice, *Virol J* 6:2.

Ravaggi A., Romani C., Pasinetti B., Tassi R., Bignotti E., Bandiera E., Odicino F., Ragnoli M., Donzelli C., Falchetti M., Calza S., Santin A., Pecorelli S., 2006,

Correlation between serological immune response analyzed by a new ELISA for HPV-16/18 E7 oncoprotein and clinical characteristics of cervical cancer patients, *Arch Virol* 1899:9-16

Ressing M., Sette A., Brandt R., Ruppert J., Wentworth P., Hartman M., Oseroff C., Grey H., Melief C., Kast, W., 1995, Human CTL epitopes encoded by human Papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through in vivo and in vitro immunogenicity studies of HLA-A 0201-binding peptides, *J Immunology* 154:5934-5943.

Rocha L., Ambrosio J., Mora M., Cruz Talonia., Hernandez J., Benny W., Ortiz V., Monroy A., 2004, Detection of antibodies against a human papillomavirus (HPV) type 16 peptide that differentiate high-risk from low-risk HPV-associated low-grade squamous intraepithelial lesions, *Journal of General Virology* 85:2643-2650

Roitt I., Delves P., 2008, Inmunología: Fundamentos 11va Edición, Ed. Médica Panamericana, pp. 543.

Rosales R., López M., Cortes R., 2001, Antibodies against human papillomavirus (HPV) type 16 and 18 E2, E6 and E7 proteins in sera: correlation with presence of papillomavirus DNA, *J Med Virol* 4:736-744.

Rose R., Bonnez W., Reichman R., Garcea R., 1993, Expression of human papillomavirus type 11 L1 protein in insect cells in vivo and in vitro assembly of virus like particles, *J Virol* 67:1936-1944.

Sánchez J., Huerta M., Rivera J., 2005, Infección por VPH y cáncer cervicouterino, *Rev Mex Patol Clin* 4:222-233.

Sasagawa T., Inoue M., Lehtinen M., Zhang W., Gschmeissner S., Hajibagheri M., Finch J., Crawford L., 1996, Serological responses to human papillomavirus type 6 and 16 virus-like particles in patients with cervical neoplastic lesions, *Clin Diagn Lab immunol* 3:403-410.

Sasagawa T., Yamazaki H., Dong Y., Satake S., Tateno M., Inoue M., 1998, Immunoglobulin- A and -G responses against virus-like particles (VLP) of human papillomavirus type in women with cervical cancer and cervical intra-epithelial lesions, *Int J Cancer* 75:529-535.

Schmitt M., Dalstein., Waterboer T., Clavel C., Gissmann L., Pawlita M., 2009, Diagnosing Cervical Cancer and High-Grade Precursors by HPV16 Transcription Patterns, *Cancer Res* 70:249-256.

Sharma B., Ray A., Murthy N., 1996, Prevalence of serum antibodies to synthetic peptides to HPV16 epitopes among Indian women with cervical neoplasia, *Eur J Cancer* 32:872-876.

Stanley M., Pett M., Coleman N., 2007, HPV: from infection to cancer, *Biochemical Society Transactions*, 35:1456-1460.

Tjiong M., Schegget J., Tjiong-A-Hung S., Out T., Van Der Vange N., Burger M., Struyk L., 2000, IgG antibodies against human papillomavirus type 16 E7 proteins in cervicovaginal washing fluid from patients with cervical neoplasia, *Int J Gynecol Cancer*, 4:296-304

Viscidi R., Kotloff K., Clayman B., Russ K., Shapiros S., Shah K., 1997, Prevalence of Antibodies to Human Papillomavirus (HPV) Type 16 Virus-Like Particles in Relation to Cervical HPV Infection among College Women, *Clin Diagn Lab Immunol* 4:122-126.

Walboomers J., Jacobs M., Manos M., Bosch F., Kummer J., Shah K., Snijders P., Peto J., Meijer C., Munoz N., 1999, Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide, *J Pathol* 189:12-19.

Wayne M., 2009, El mundo de la célula, 6ta edición, Ed. Addison Wesley Longman/Pearson, pp.970.

Wideroff L., Schiffman M., Haderer P., Armstrong A., Greer C., Manos M., Burk R., Scott D., Sherman M., Schiller J., Hoover R., Tarone R., Kirnbauer R., 1999, Seroreactivity to human papillomavirus types 16, 18, 31, and 45 virus-like particles in a case-control study of cervical squamous intraepithelial lesions, *J Infect Dis* 180:1424-1428.

Xu Y., Zhang Y., Xu X., Song G., 2006, Papillomavirus-like particles as vehicles for the delivery of epitopes or genes, *Arch Virology* 151:2133-2148.

Zhou J., Sun X., Stenzel D., Frazer I., 1991, Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles, *Virology* 185:251-257.

Zur Hausen H., 2002, Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application, *Nature* 2:342-350.

Zur Hausen H., 2009, Papillomaviruses in the causation of human cancers — a brief historical account, *Virology* 384:260-265.