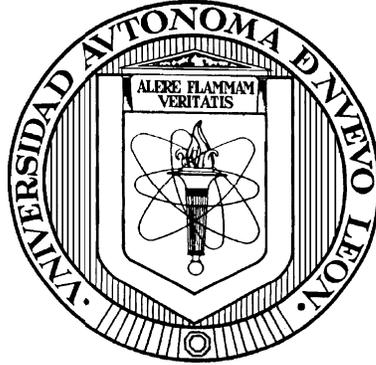


**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-VPH Y SU ASOCIACIÓN CON  
EL PRONÓSTICO DE LA INFECCIÓN VIRAL.**

**Por**

**MARTHA ELIA LUÉVANO SALINAS**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRIA EN CIENCIAS con Orientación en Biología Molecular e  
Ingeniería Genética.**

**Octubre, 2008**

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Genómica y Bioinformática del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Hugo A. Barrera Saldaña y la Co-dirección del Dr. Isaías Balderas y la Dra. Ana María Rivas Estilla.

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized letters, positioned above a solid horizontal line.

**Dr. Hugo A. Barrera Saldaña**

**Director de Tesis**

# DEDICATORIA

---

*A Dios*

*Por ser el motivo de mi existencia y darme la oportunidad de terminar una etapa más en mi vida profesional.*

*A mis padres*

*Por apoyarme incondicionalmente en todo momento, por brindarme su comprensión, su paciencia, su confianza y finalmente por creer en mí. Los amo.*

*A mi hermana*

*Gracias por ser la chispita de alegría en mi vida. Gracias por compartir conmigo tus experiencias y por el apoyo incondicional que me has brindado siempre.*

*A tí: Hugo*

*Por darme las fuerzas y los ánimos y acompañarme en las buenas y las malas. Gracias por brindarme tu amor, cariño y comprensión, por las veces en que me ofreciste tus hombros para llorar, y las veces que celebraste conmigo. Te Amo.*

---

## Agradecimientos

---

A **CONACyT** por el apoyo económico brindado durante el tiempo en que se desarrollo el presente trabajo.

Al **Dr. Barrera** por la oportunidad de integrarme en la línea de investigación. Gracias por todas sus enseñanzas, sus consejos y su disposición siempre de escuchar. Le agradezco infinitamente por llevarme siempre al límite, gracias a eso me he dado cuenta de mis capacidades y de que puedo ofrecer más de lo que yo pensé.

Gracias al **Dr. Isaías** por la asesoría brindado durante la realización del proyecto. Gracias por todos sus útiles consejos y sobre todo gracias por su amistad.

A la **Dra. Ana María** por sus valiosas observaciones en el presente trabajo y sus consejos en el ámbito profesional.

A la **Dra. Herminia**, gracias por su atención y por estar siempre al corriente de mi situación académica.

Al grupo de trabajo en la Universidad de California, Irvine, **Mina Kalantari**, **Ulrich Bernard** e **Itzel Callejas**, por aceptarme en su laboratorio y hacerme sentir un miembro más del equipo, por todas sus atenciones y sobre todo por las útiles enseñanzas en el área de Biología Molecular.

A **Sofía Bernal**, gracias por transmitirme esa pasión por la investigación acerca del CaCU, gracias por todos los conocimientos y experiencia transmitida y sobre todo gracias por la amistad que me has ofrecido y la confianza en la que ésta se basa.

Gracias a todos mis compañeros que han hecho que estos dos años sean un tiempo placentero y agradable, por todas sus locuras y ocurrencias; gracias Diana, Idalia, Alí, Richart, Iram, Margarita, Luz, Morlett, Normita, Raquel.

Gracias a mis compañeros de generación en otras áreas y a todo el personal del departamento.

---

## TABLA DE CONTENIDO

SECCIÓN	PÁGINA
TABLA DE CONTENIDO	i
LISTA DE CUADROS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	x

## CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1. El enorme reto de la lucha contra el cáncer cervicouterino	1
1.2. Antecedentes	4
1.2.1. Impacto del CaCU y su evolución	4
1.2.2. Incidencia	5
1.2.3. Tipos y clasificación de los tumores	6
1.2.4. Clasificación de las lesiones	7
1.2.5. Historia natural y agente causal	9
1.2.6. Manejo y tratamiento del VPH, lesiones y cáncer cervicouterino	13
1.2.7. Virus del Papiloma Humano	16
1.2.7.1. Genoma del VPH	16
1.2.7.2. Clasificación	17
1.2.7.2.1. Variantes	19
1.2.7.3. Ciclo Viral	20
1.2.7.3.1. Proteínas virales y su función	22
1.2.7.4. Detección	23
1.2.7.5. Utilidad clínica de detección del VPH	26
1.2.8. Sistema Inmune	28
1.2.8.1. Respuesta inmune ante la infección	28
1.2.8.2. Inmunidad innata	29
1.2.8.3. Inmunidad adaptativa	29
1.2.8.3.1. Respuesta inmune celular	30
1.2.8.3.2. Respuesta inmune humoral	32
1.2.8.4. Evasión del sistema inmune por el VPH	34
1.2.8.5. Estudios de seroprevalencia con VLPs	34
1.2.8.6. Ensayos con otras proteínas virales como antígenos	37
1.2.8.7. Reacción cruzada en los ensayos	39
1.2.9. Vacuna	40
1.3. Justificación	44

## CAPÍTULO II. OBJETIVOS

2.1	Objetivo general	45
2.2	Objetivos específicos	45

## CAPITULO III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1	Material	46
3.1.1	Origen de las muestras biológicas	46
3.1.2	Grupos de estudio y sus características	46
3.1.3	Materiales de laboratorio	49
3.1.4	Reactivos de laboratorio	49
3.1.5	Equipo de laboratorio	50
3.2	Métodos	
3.2.1	Estrategia general	51
3.2.2	Procedimientos para estudio epidemiológico	52
3.2.3	Procedimientos para estudio clínico gine-histopatológico	53
3.2.4	Obtención de suero	53
3.2.5	Detección y tipificación del VPH	53
3.2.6	PCR anidadas para muestreos de los resultados negativos para VPH	56
3.2.7	Determinación de anticuerpos	58
3.2.8	Construcción de mapas de intensidad de la señal	60
3.2.9	Análisis estadístico	60

## CAPITULO IV. RESULTADOS

4.1	Hallazgos de laboratorio	62
4.2	Grupo de estudio “seguimiento”	64
4.2.1	Características	64
4.2.2	Frecuencia del VPH y sus tipos	64
4.2.2.1	Detección viral	64
4.2.2.2	Frecuencia de los tipos virales	66
4.2.2.3	Persistencia viral	67
4.2.2.4	Manifestaciones clínicas	68
4.2.3	Análisis de los cofactores de riesgo	69
4.3	Grupo de estudio “lesiones”	69
4.3.1	Características	69
4.3.2	Frecuencia del VPH y sus tipos	69
4.3.2.1	Detección viral	69

	4.3.2.2	Frecuencia de los tipos virales	71
	4.3.2.3	Manifestaciones clínicas	72
4.4		Papel de los anticuerpos en la persistencia viral	74
	4.4.1	Descripción de la tecnología	74
	4.4.2	Prevalencia de anticuerpos	75
	4.4.3	Patrón de anticuerpos	77
	4.4.4	Perfil de anticuerpos	78
	4.4.5	Asociación de los anticuerpos anti-VPH y los alelos del HLA	80

## **CAPITULO V. DISCUSIÓN**

5.1		Valor de las investigaciones en el grupo “seguimiento”	82
	5.1.1	Detección y frecuencia viral	82
	5.1.2	Persistencia viral	82
	5.1.3	Manifestaciones clínicas	83
5.2		Contribuciones del grupo de “lesiones” a nuestro estudio	83
	5.2.1	Detección y frecuencia viral	83
	5.2.2	Manifestaciones clínicas	84
5.3		Comparaciones entre los hallazgos de ambos grupos	84
	5.3.1	Detección viral	84
	5.3.2	Frecuencia viral	86
	5.3.3	Hallazgos preliminares en tumores	87
5.4		Anticuerpos	88
	5.4.1	Seroprevalencia	89
		5.4.1.1 Hallazgos de anticuerpos en el grupo de “seguimiento”	89
		5.4.1.2 Hallazgos de anticuerpos en el grupo de “lesiones”	90
	5.4.2	Factores asociados a la respuesta inmune humoral	91
	5.4.3	Patrón de anticuerpos	93
	5.4.4	Perfil de anticuerpos	93
	5.4.5	Biomarcadores candidatos de eliminación de infecciones por VPH	94
	5.4.6	Alelos HLA y su asociación con la presencia de anticuerpos	95

		<b>CAPITULO V. CONCLUSIONES</b>	<b>97</b>
--	--	---------------------------------	-----------

<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>99</b>
-----------------------------------	-----------

## **ANEXOS**

ANEXO I	113
ANEXO II	114
ANEXO III	115
ANEXO IV	116
ANEXO V	117
ANEXO VI	129
ANEXO VII	132
ANEXO VIII	135
ANEXO IX	138
ANEXO X	141
ANEXO XI	143
ANEXO XII	149
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	152
RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO	154

## **LISTA DE CUADROS**

Cuadro 1	Tipos de cáncer clasificados de acuerdo a su histología.	6
Cuadro 2	La clasificación de Bethesda según la versión 2001.	8
Cuadro 3	Cuadro comparativo de clasificaciones.	9
Cuadro 4	Lineamientos para el manejo de anomalías citológicas.	15
Cuadro 5	Tipos virales de papiloma más estudiados y sus propiedades clínicas.	18
Cuadro 6	Proteínas virales y su función.	22
Cuadro 7	Criterios para el diseño experimental de los grupos a estudiar.	48
Cuadro 8	Variables epidemiológicas incluidas en la encuesta.	53
Cuadro 9	Condiciones de reacción utilizadas en la PCR para integridad del DNA.	55
Cuadro 10	Programa de amplificación para el gen de la hormona del crecimiento.	55

Cuadro 11	Condiciones de reacción utilizadas en la PCR para detección del VPH.	56
Cuadro 12	Programa de amplificación utilizado para la detección del VPH.	56
Cuadro 13	Condiciones de reacción utilizadas en la PCR anidada para detección del VPH.	57
Cuadro 14	Programa de amplificación utilizado para la detección del VPH.	57
Cuadro 15	Coinfecciones presentadas en el grupo de “seguimiento”.	65
Cuadro 16	Factores de riesgo relacionados con el estilo de vida potencialmente asociados a persistencia viral.	69
Cuadro 17	Coinfecciones virales en el grupo de “lesiones”.	70
Cuadro 18	Análisis de factores de riesgo relacionados con el estilo de vida que predisponen a infección viral.	73
Cuadro 19	Seroprevalencia en los grupos de estudio “seguimiento” y “lesiones”.	76
Cuadro 20	Seroprevalencia en los grupos de estudio “seguimiento” y “lesiones” de acuerdo a variables epidemiológicas.	76

### ***Lista de cuadros en anexos***

Cuadro I.	Clasificación del cáncer de cérvix.	114
Cuadro II.	Efecto de E6 sobre otras proteínas.	120
Cuadro III.	Proteínas celulares que se unen a E7.	121
Cuadro IV.	Interacciones de proteínas celulares con E1.	124

### **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1	Causas de muerte por cánceres.	4
Figura 2	Unión escamocolumnar.	10
Figura 3	Rutas de transmisión de VPH.	11
Figura 4	Historia natural del VPH.	12
Figura 5	Estructura de la partícula viral del VPH.	16
Figura 6	Organización del genoma del VPH.	17
Figura 7	Arquitectura de células cervicales epiteliales escamosas estratificadas y expresión de las proteínas del VPH tras la infección.	21

Figura 8	Amplificones producidos con el uso de diferentes iniciadores oligonucleotídicos.	25
Figura 9	Respuesta inmune adaptativa ante la infección por VPH.	30
Figura 10	Secuencia mínima retenida por el VPH en CaCU.	37
Figura 11	Historia del estudio.	47
Figura 12	Grupo de estudio “Lesiones”.	48
Figura 13	Calendario de tomas de muestras.	51
Figura 14	Estrategia general del estudio.	52
Figura 15	Esquema de rastreo, detección y tipificación del VPH.	54
Figura 16	Detección de anticuerpos anti-VPH en suero.	58
Figura 17	Comprobación de integridad y calidad del DNA extraído a partir de células de cérvix en ambos grupos de estudio.	61
Figura 18	Amplificación con los iniciadores del estuche comercial “Roche”.	62
Figura 19	Tipificación del VPH.	63
Figura 20	PCR anidada con los iniciadores GP5+/6+ a partir de la reacción previa con los iniciadores PGMY.	63
Figura 21	Frecuencia de la infección de VPH en el grupo “seguimiento”.	65
Figura 22	Frecuencia de VPH de alto y bajo riesgo oncogénico en el grupo de “seguimiento”.	65
Figura 23	Clasificación del grupo de seguimiento de acuerdo a su citología y frecuencia viral.	66
Figura 24	Análisis de las frecuencias de los tipos virales en el subgrupo positivo para VPH del grupo de estudio “seguimiento”.	67
Figura 25	Resultados del curso de las infecciones en la segunda visita.	67
Figura 26	Distribución de las infecciones de acuerdo a la citología.	68
Figura 27	Frecuencia de la infección por VPH en el grupo “lesiones”.	70
Figura 28	Frecuencia de VPHs de alto y bajo riesgo oncogénico en el grupo de “lesiones”.	70
Figura 29	Frecuencia de la infección de VPH de alto y bajo riesgo oncogénico en el espectro de resultados citológicos.	71
Figura 30	Análisis de las frecuencias de los tipos virales en el subgrupo positivo para VPH del grupo de estudio “lesiones”.	72
Figura 31	Clasificación de los casos de acuerdo a las anomalías	

	citológicas.	72
Figura 32	Microarreglo de proteínas virales para la detección de anticuerpos anti-VPH.	74
Figura 33	Punto de corte de las señales en los microarreglos.	75
Figura 34	Mapa de intensidad de las señales de fluorescencia.	77
Figura 35	Comparación de perfil de anticuerpos.	78
Figura 36	Biomarcadores candidatos de eliminación viral.	79
Figura 37	Comparación de anticuerpos presentes en infecciones transitorias versus lesiones.	80
Figura 38	Asociación entre alelos HLA y presencia de anticuerpos.	81

### ***Figuras en anexos***

Figura A	Efecto de E6 y E7 en el ciclo celular.	118
Figura B	Interacción de E6 con proteínas celulares.	120
Figura C	E1 y E2 y la replicación del genoma viral.	123
Figura D	Interacciones de la proteína E2.	124
Figura E	La región larga de control (LCR).	128
Figura F	Esquemización del proceso de presentación antigénica por las moléculas del MHC-II.	133
Figura G	Moléculas co-estimuladoras expresadas en células dendríticas y células T.	134
Figura H	Producción de proteínas de VPH y replicación de DNA viral en NIC 1, NIC 2 y NIC 3.	139
Figura I	Análisis de Componentes principales.	149

## LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Microgramos
µl	Microlitros
µM	Concentración micromolar
ACCP	Alianza para la Prevención del Cáncer Cervicouterino
ACH	Anticonceptivos Orales
APC	Célula Presentadora de Antígeno
ASCCP	Sociedad Americana de Colposcopia y Patología Cervical
ASC-US	Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado
CaCU	Cáncer Cervicouterino
CIS	Carcinoma <i>in situ</i>
CTL	Linfocitos T Citotóxicos
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
EDTA	Acido etildiaminotetra-acético
ELISA	Ensayo Inmunoenzimático
FDA	Administración de drogas y alimentos
FIGO	Federación Internacional de Ginecólogos y Obstetrias
HC2	Captura de Híbridos
HCl	Ácido clorhídrico
IC	Intervalo de Confianza
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
IVAA	Inspección visual con ácido acético
IVSA	Inicio de Vida Sexual
LEEP	Procedimiento de Escisión Electroquirúrgica
LIEAG y HSIL	Lesión Intraepitelial Escamosa de Alto Grado
LIEBG y LSIL	Lesión Intraepitelial Escamosa de Bajo Grado
M	Concentración molar
Mg	Magnesio
MHC y HLA	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
ml	Mililitro
NaCl	Cloruro de sodio

ng	Nanogramos
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
NK	Células asesinas naturales
ORF	Marco de lectura abierto
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	$-\log[H^+]$
RLU	Unidades Relativas de Luz
RNA	Ácido Ribonucleico
SDS	Dodecilsulfato de sodio
TCR	Receptores Antigénicos de las Células T
Th	Linfocitos T Cooperadores
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
U	Unidades
VLP	Partículas parecidas a virus
VP	Virus del Papiloma
VPH	Virus del Papiloma Humano
X	Veces la concentración

## Resumen

**Q.F.B. Martha Elia Luévano Salinas**

**Universidad Autónoma de Nuevo León**

**Fecha de graduación:** Octubre del 2008  
**Número de páginas:** 154

**Área de estudio:** Biología Molecular

**Título de estudio:** Determinación de anticuerpos anti-VPH y su asociación con el pronóstico de la infección viral.

**Introducción:** El cáncer cervicouterino (CaCU) y sus lesiones precursoras continúan siendo un importante problema de salud pública. Muchas mujeres no son capaces de eliminar la infección por VPH. Se postula que la respuesta inmune es clave en ello. El estudio de la inmunología humoral se ha intensificado desde la aparición de las vacunas profilácticas. No obstante, los resultados han sido confusos y su papel en las infecciones establecidas no ha sido esclarecido. El descubrimiento de biomarcadores que nos permitan distinguir a las mujeres en riesgo a desarrollar lesiones y CaCU permitirá dirigir así los limitados recursos del sector salud a las mismas.

**Objetivo:** Detectar anticuerpos anti-VPH en sueros recolectados de mujeres de la población abierta reclutadas en el 2002 por ser VPH positivas, actualmente en seguimiento y divididas en las que eliminaron con éxito la infección y las que no lo han logrado, con el objetivo de determinar si existe asociación entre la presencia de dichos anticuerpos y el desenlace de la infección.

**Material y Métodos:** Se estudiaron 157 mujeres reclutadas entre el 2005 y el 2008 partiendo de un grupo de 600 mujeres positivas para la infección por VPH en el 2002. Se reclutó un grupo al que denominamos "lesiones" el cual sirvió como control positivo (52 mujeres). Se les realizó una encuesta que incluyó la historia clínica y cofactores de riesgo, recolección de tubos de sangre, cepillados cervicales así como estudios de Pap y colposcopia. A partir del cepillado se realizó la detección del VPH. Para la determinación de anticuerpos se aisló el suero a partir de sangre anticoagulada. Debido a la información generada previamente sobre los alelos HLA en el grupo de "seguimiento", se realizó el análisis de asociación entre estos y la presencia de anticuerpos.

**Resultados:** Se determinaron las frecuencias de la infección por VPH en ambos grupos de estudio (48.1% en "lesiones" y 30.1% en "seguimiento"). Los resultados de seroprevalencias fueron del 66% en el grupo "seguimiento" y del 35% en el grupo "lesiones". Al dividir el grupo de seguimiento según la persistencia viral, no hubo diferencias estadísticamente significativas en la seroprevalencia. Finalmente, se encontró que la reactividad de los anticuerpos contra un subconjunto de proteínas virales en particular podría servir como biomarcador de eliminación viral.

**Conclusiones:** La respuesta inmune humoral pudiera ser clave en el destino de las infecciones por el VPH y nuestros hallazgos indican que esta se encuentran notablemente disminuida en mujeres con persistencia viral y presencia de anomalías citológicas. Se encontraron anticuerpos contra ciertas proteínas virales que pudieran ser usados como biomarcadores de predicción.



**Dr. Hugo A. Barrera Saldaña**  
**Director de Tesis**

## **CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. El enorme reto de la lucha contra el cáncer cervicouterino**

A pesar de su naturaleza prevenible, el cáncer cervicouterino (CaCU) sigue siendo un importante problema de salud pública, con la infección persistente por ciertos tipos de virus del papiloma humano (VPH) como el principal factor de riesgo. Estos virus representan la causa más frecuente de infecciones víricas de transmisión sexual y afecta de distinto modo a los hombres y a las mujeres.

En el 2006, se presentó comercialmente la vacuna contra el VPH como tratamiento preventivo contra CaCU, proporcionando una nueva estrategia a las mujeres para prevenir la infección por este virus. Ello proporciona al país una oportunidad para elaborar una estrategia integral de prevención y control de CaCU. Sin embargo, dado al alto costo del tratamiento y tamaño de la población que puede beneficiarse, hacer accesible la vacuna contra el VPH a la población de nuestro país constituye un enorme reto. Por otro lado, mientras que la vacuna pudiera representar una esperanza para las niñas de hoy, las mujeres que ya iniciaron su vida sexual viven hoy y cada día más con la amenaza del CaCU, ya que ésta vacuna no está dirigida a ellas y no pueden ser olvidadas.

El CaCU también puede prevenirse si se somete a las mujeres asintomáticas a tamizaje de lesiones precancerosas del cuello uterino y si éstas son tratadas antes de que progresen hacia un cáncer invasor. Los métodos actuales para detección oportuna del CaCU presentan una baja sensibilidad. La prueba de Papanicolaou, la prueba de detección utilizada con mayor frecuencia, presenta como desventaja inherente una baja sensibilidad -como promedio del 50%- que aún puede ser menor en entornos con bajos recursos [1]. Otra desventaja son las múltiples visitas que la mujer debe hacer, lo que a menudo conduce al diagnóstico y tratamiento incompletos [2]. Desde hace unos treinta años, se realiza el tamizaje mediante esta prueba. No obstante, los países de América Latina no han experimentado las mismas disminuciones de las tasas de mortalidad que se han observado en Estados Unidos de América y Canadá (véase anexo 1).

Los factores que han conducido a los fracasos de los programas de tamizaje en América Latina están relacionados con aspectos inherentes de los servicios de salud y a las situaciones precarias sociocultural, económica y educativa de las mujeres, así como factores étnicos, la escasa coordinación y el mal desempeño del sistema de salud en general [3].

Por otra parte, la detección molecular del VPH, en el caso de lesiones intraepiteliales de alto grado, presenta una sensibilidad cercana al 100% cuando se compara con el estándar de oro, la colilocitosis en la citología cervical. La implementación de este procedimiento en los programas de tamizaje, ha sido limitada debido al elevado costo del mismo. Nuevos datos obtenidos por la Alianza para la Prevención del Cáncer Cervicouterino (ACCP), indican que la estrategia más eficiente en entornos con bajos recursos es el tamizaje mediante inspección visual con ácido acético (IVAA) o la prueba de detección del VPH seguido del tratamiento posterior de las lesiones precancerosas con crioterapia [4-9]. En condiciones óptimas, todo esto se lleva a cabo en una única visita y en un entorno de atención primaria, por personal competente, incluidas enfermeras o parteras adiestradas [9].

Se conoce que la gran mayoría de las mujeres infectadas por el VPH eliminan la infección sin dificultades (del 70 al 80% de los casos), gracias a una adecuada respuesta de su sistema inmune. El sistema inmune juega un papel primordial en la reacción del huésped ante la infección por el VPH, debido a que éste despierta una respuesta adaptativa tipo celular y humoral, aunada a la respuesta innata que se basa en la producción de interferón y activación de las células asesinas naturales (NK). Aunque la eliminación del virus es propiciada principalmente por la inmunidad celular, la activación de la respuesta humoral produce anticuerpos (neutralizantes y tipo – específico) que aunada a la respuesta celular, ayudan a la eliminación del virus; además suelen ser marcadores de infecciones actuales o pasadas.

Para montar una adecuada respuesta, es necesaria la apropiada presentación de antígenos. Esta es dada por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas del inglés *Major histocompatibility complex*), cuyos genes de clase I y II presentan las partículas virales a los linfocitos T cooperadores, encargados de iniciar la respuesta inmune. En los humanos, el MHC es conocido también como HLA, por sus

siglas del inglés de “*Human Leukocyte Antigen*”. Numerosos estudios han buscado relacionar la susceptibilidad a la infección con diferentes alelos de HLA, encontrándose en algunos de ellos de protección y otros de susceptibilidad [10]. Cabe aclarar que estos estudios son específicos de poblaciones y varían entre éstas.

Los estudios de anticuerpos contra VPH en los últimos años se han basado principalmente en pruebas ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) y el uso de partículas que asemejan viriones o VLPs (por sus siglas del inglés *virus like particles*) como antígenos. Los resultados no han sido muy alentadores, pues no se ha logrado obtener patrones consistentes hasta la fecha, ya que la respuesta inmune en contra del VPH de cada mujer varía de acuerdo a un gran número de factores (edad, tipo de virus, persistencia y carga viral, estado inmunológico de la paciente, etc.).

La implementación de métodos de detección y diagnóstico oportuno con el fin de identificar a las pacientes que se encuentran en mayor riesgo a desarrollar CaCU debe ser una prioridad en nuestro país. La investigación de marcadores de susceptibilidad aunados a un abordaje integral que incluya intervenciones a lo largo de todo el proceso asistencial, desde la prevención primaria al tamizaje, la detección temprana, el tratamiento y los cuidados paliativos, traerán consigo la reducción de la incidencia del CaCU.

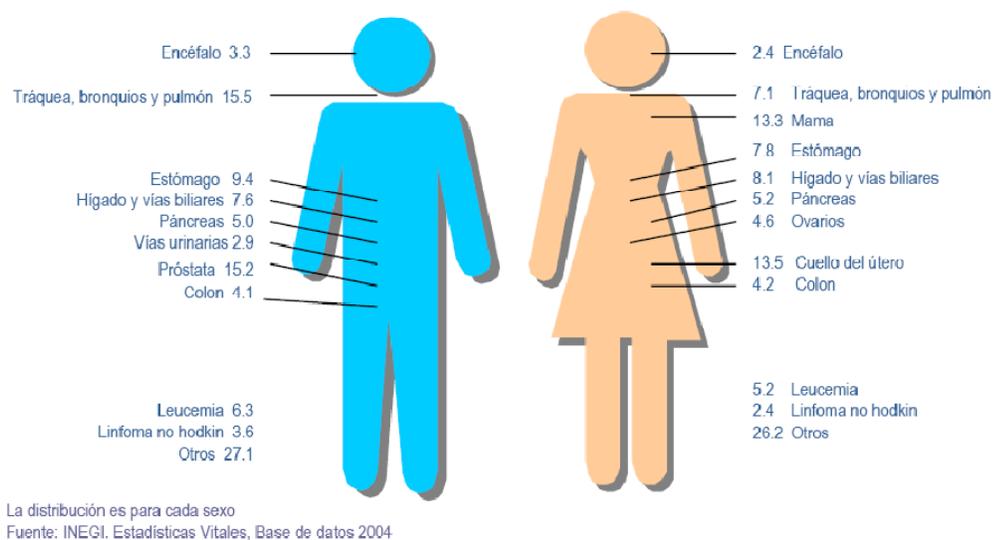
Debido a la importancia de la respuesta inmune humoral y la falta de conocimiento sólido en ésta área, el presente trabajo se desarrolló con el objetivo de encontrar la asociación entre la producción de anticuerpos y la persistencia viral. Recientemente, nuestro grupo de trabajo ha investigado el papel del HLA en la susceptibilidad a persistencia viral, debido a la importancia del mismo en el arranque de la respuesta inmune, también se pretende estudiar la relación entre los alelos HLA y la producción de anticuerpos. La meta es encontrar marcadores serológicos que nos permitan reconocer a las mujeres más susceptibles a desarrollar CaCU y así canalizar los escasos recursos del sector salud hacia estas mujeres.

El CaCU tiene su pico máximo de incidencia sobre la cuarta y quinta década de la vida, por lo que tiene un enorme impacto sobre la estructura familiar y la sociedad, ya que estas mujeres mueren en una etapa todavía productiva de su vida [11]. El reto actual consiste en saber ¿cómo identificar muy tempranamente a este grupo de pacientes?

## 1.2 Antecedentes

### 1.2.1 Impacto del CaCU y su evolución

El cáncer, según la definición del Instituto Nacional de Cancerología en México, se define como un término para un conjunto de enfermedades en el que las células se dividen de manera anormal y sin control. Las células cancerosas pueden invadir tejidos vecinos y propagarse a través del flujo sanguíneo y linfático a otras partes del cuerpo [12]. El cáncer hoy en día es reconocido como una serie de enfermedades altamente heterogénea: más de 100 tipos de cáncer humano se han descrito, y existen varios subtipos de acuerdo al órgano o tejido en específico que afecta [13]. Uno de los cánceres que ha alcanzado dimensiones de salud pública mundial es el CaCU [14], el cual permanece siendo el segundo más común entre las mujeres (véase figura 1).



**Figura 1. Causas de muerte por cánceres.** Se muestra la distribución porcentual de las principales causas de defunción por tumores malignos para ambos sexos en México para el 2004.

El CaCU, antes de manifestarse como tal o presentar síntomas, pasa por varias etapas que empiezan con la lesión precancerosa llamada displasia, que, según su avance, puede ser leve, moderada o severa, y de ahí evolucionar a carcinoma *in situ* y cáncer invasor, el cual tiene alta mortalidad [15]. Para que una lesión pre-cancerosa progrese a CaCU son necesarios de 5 a 10 años [16], aunque cabe mencionar que una

proporción sustancial de lesiones pre-cancerosas regresan espontáneamente sin intervención [17].

### **1.2.2 Incidencia**

Según la OMS, el CaCU es la segunda causa de mortalidad femenina por cáncer en todo el mundo, con cerca de 500,000 casos nuevos presentándose cada año y unos 300,000 de estos resultando lamentablemente en decesos, 80% de los cuales corresponden a los países en desarrollo [18]. Tan solo en el año 2002 se presentaron casi medio millón de casos(493,243) y de estos, poco más de la mitad (273,505) fueron decesos [19].

El CaCU se ha mantenido como la segunda neoplasia más importante en nuestro país y como la primera causa en la población femenina. La edad promedio al momento del diagnóstico es de 45 años, pero la enfermedad puede ocurrir inclusive en la segunda década de la vida y, ocasionalmente, durante el embarazo [20] .

Durante el periodo 1990-2000 se reportaron un total de 48,761 defunciones de mujeres mexicanas por CaCU, lo cual representó un promedio de 12 mujeres fallecidas cada 24 horas, con un crecimiento anual de 0.76%. En las mujeres, 13.5% de las defunciones por cáncer maligno corresponden al CaCU según datos proporcionados por el INEGI (figura 1) [21]. Datos recientes de la Secretaría de Salud reportan que en el 2005 ocurrieron 4,257 muertes en el país a causa de esta enfermedad.

Mientras en la mayoría de los países desarrollados se logró disminuir la mortalidad por CaCU a partir de la sexta década del siglo pasado, en los países en desarrollo y particularmente en América Latina, las tasas fueron en aumento, o en el mejor de los casos permanecieron estables [22]. En el 2002, en Estados Unidos de Norteamérica se registraron las tasas de mortalidad más bajas en el continente (2.3 por 100 mil mujeres) y en Bolivia las más altas (30.4 por 100 mil mujeres), México registró una tasa intermedia (14.1 por 100 mil mujeres) [23] (véase anexo 1).

Lo analizado hasta ahora nos indica que aun cuando la mortalidad tiene una tendencia ligeramente al descenso [24], es lamentable que continúe siendo un grave problema de

salud pública, a pesar de tener una serie de recursos científicos y tecnológicos de indiscutible valor, lo que reclama su conjunción y la intensificación de sus acciones en diferentes frentes para alcanzar un mayor impacto epidemiológico y sanitario, tal y como ha ocurrido en los países desarrollados.

### 1.2.3 Tipos y clasificación de los tumores

El carcinoma escamocelular (epidermoide) comprende aproximadamente el 90% de los cánceres cervicales, mientras que el adenocarcinoma comprende aproximadamente el restante 10%. Los carcinomas adenoescamosos y carcinomas de células pequeñas son relativamente poco frecuentes. Se han descrito ocasionalmente sarcomas primarios cervicales y también se ha informado sobre la existencia de linfomas malignos cervicales primarios y secundarios. Los tipos de CaCU se clasifican de acuerdo a su histología tal y como se describe a continuación (cuadro 1) [25]:

Cuadro 1. Tipos de cáncer clasificados de acuerdo a su histología.

Carcinoma de células escamosas	<ul style="list-style-type: none"> <li>a. Células largas no queratinizantes</li> <li>b. Células largas queratinizantes</li> <li>c. Células escamosas Basaloide</li> <li>d. Células escamosas verrucoso</li> <li>e. Células escamosas papilar</li> <li>f. Células escamosas parecido al linfoepitelioma</li> <li>g. Células escamosas escamo-transicional</li> <li>h. Células escamosas microinvasivo</li> </ul>
Adenocarcinoma	<ul style="list-style-type: none"> <li>a. Adenocarcinoma mucinoso</li> <li>b. Adenocarcinoma mucinoso endocervical</li> <li>c. Adenocarcinomamucinoso intestinal</li> <li>d. Adenocarcinoma mucinoso de células en forma de sello</li> <li>e. Adenocarcinoma mucinoso de mínima desviación</li> <li>f. Adenocarcinoma mucinoso villoglandular</li> <li>g. Adenocarcinoma endometroide</li> <li>h. Adenocarcinoma de células claras</li> <li>i. Adenocarcinoma seroso</li> <li>j. Adenocarcinoma mesonéfrico</li> </ul>
Otros	<ul style="list-style-type: none"> <li>a. Carcinoma adenoescamoso; adenocarcinoma variante de células vítreas</li> <li>b. Carcinoma adenoide quístico</li> <li>c. Carcinoma adenoide basal</li> </ul>

Para el caso de cáncer invasor, la Federación Internacional de Ginecólogos y Obstetrias (FIGO) provee en la actualidad un sistema que clasifica el cáncer de cérvix en etapas 0 al IV. Este sistema se basa en las examinaciones clínicas de médicos así como en otros procedimientos (véase anexo 2) [26].

#### **1.2.4 Clasificación de las lesiones**

En relación a la historia del estudio de las lesiones, desde 1910 Isidore C. Rubin acuña el término cáncer incipiente para nominar el concepto de transformación neoplásica confinada al espesor del epitelio [27]. Veinte años más tarde, Broders, basándose en su experiencia dermatopatológica, emplea el de carcinoma *in situ* (CIS) al describir este cuadro histológico [28].

Con la progresiva introducción de la citología y biopsia sistemáticas se vio con claridad que el espectro de anomalías del epitelio cervical era mucho más amplio, siendo frecuentes otros cambios epiteliales menos severos que el CIS. En 1949, Papanicolaou introduce los términos de “displasia” en histopatología y “discariosis” en citología para designar dichos cambios. Posteriormente, en 1953, Reagan consagra el término en histopatología cervical al denominar a estas lesiones, menos severas que el CIS, como hiperplasias atípicas o displasias, señalando que la mayoría de ellas, dejadas a su evolución, regresan o permanecen inalteradas por mucho tiempo [29].

En 1961, en el Primer Congreso Internacional de Citología celebrado en Viena, se acuerda que los términos para designar citológicamente las tres lesiones cervicales mayores sean: carcinoma invasor, carcinoma *in situ* y displasia. Esta última fue graduada como leve, moderada, y severa o grave, a las que habría que añadir el CIS ya definido. Richart, en 1967, propuso el término de neoplasia intraepitelial cervical (NIC-CIN) con tres grados progresivos (1,2 y 3), incluyéndose en el grado 3 la displasia grave y el CIS de la clasificación anterior [30, 31].

La ventaja principal de esta propuesta, es el reconocimiento de la unidad del proceso patológico, lo cual conlleva una relación con las técnicas terapéuticas. No obstante, un número creciente de publicaciones señalaron el hecho de la sorprendentemente baja seguridad diagnóstica, tanto en material cito como histológico, en la parte menos

severa del espectro. Por esta razón se convocó a una reunión de representantes de organismos internacionales, científicos y profesionales, en el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos en Bethesda (Maryland). Fruto de dicha reunión fue un nuevo sistema de nomenclatura para informes citológicos ginecológicos (Sistema o Clasificación de Bethesda), en el que se unificaron criterios y se adoptaron recomendaciones que la experiencia general acumulada aconsejaba. La parte fundamental de esta nueva clasificación fue la elaboración de un sistema binario para catalogar las anomalías celulares preneoplásicas en el extendido citológico, denominándolas lesiones intraepiteliales escamosas de alto o bajo grado (L.I.P.-S.I.L.). El término “alto grado” incluye el CIN 2 y CIN 3 de la clasificación de Richart, y el de “bajo grado” el CIN 1 así como las alteraciones celulares producidas por VPV. Esta clasificación fue difundida en 1988 [32], mínimamente modificada en 1991 [33, 34], y actualizada recientemente en el 2001 [35]. En el cuadro 2 se resume la clasificación de Bethesda en su versión 2001 [35, 36].

Cuadro 2. La clasificación de Bethesda según la versión 2001<sup>1</sup>.

<b>SIN ANOMALÍAS CELULARES EPITELIALES</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Negativo para lesión intraepitelial</i> (Se utiliza esta categoría cuando no hay evidencia de neoplasia, independientemente de si se observan, o no, microorganismos u otros hallazgos no neoplásicos).</li> </ul>	
<b>CON ANOMALÍAS CELULARES EPITELIALES</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>En células escamosas</i></li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Células escamosas atípicas (ASC)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Significado indeterminado (ASC-US)</li> <li>- No puede excluirse H-SIL (ASC-H)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (L-SIL)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Displasia leve/CIN 1</li> <li>- VPV</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Lesión intraepitelial escamosa de alto grado (H-SIL)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Displasia moderada, severa y CIS/CIN 2 y 3</li> <li>- Con características sugestivas de invasión</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>En células glandulares</i></li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Células glandulares atípicas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Endocervicales</li> <li>- Endometriales</li> <li>- Glandulares</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Células glandulares atípicas (favor a neoplasia)</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Adenocarcinoma endocervical <i>in situ</i></li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Adenocarcinoma</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Endometrial</li> <li>- Endocervical</li> <li>- Extrauterino</li> </ul>

<sup>1</sup> Modificado de Bergeron y cols. [36].

En esta evolución histórica de la clasificación se puede comprobar la tendencia marcadamente reduccionista y simplificadora de las mismas, ya que de los cuatro grados de la primera se ha llegado a las dos categorías del Sistema Bethesda pasando por los tres grados de Richardt, con una duración media de unos 20 años para cada una de ellas (ver cuadro 3). También se puede intuir que la tercera modificación de dicho Sistema Bethesda no va a ser probablemente la última, abriéndose el camino a la especulación sobre su evolución en el futuro.

Cuadro 3. Cuadro comparativo de clasificaciones<sup>1</sup>.

Displasia/ CIS Años 49-69	HPV?	Displasia Leve	Displasia Moderada	Displasia Grave	CIS
CIN-NIC (Richardt) Años 69-89	HPV (1976)	CIN-NIC 1	CIN-NIC 2	CIN- NIC 3	
SIL-LIP (Bethesda) Desde 1989	SIL-LIP Bajo Grado (L-SIL)		SIL-LIP Alto Grado (H-SIL)		

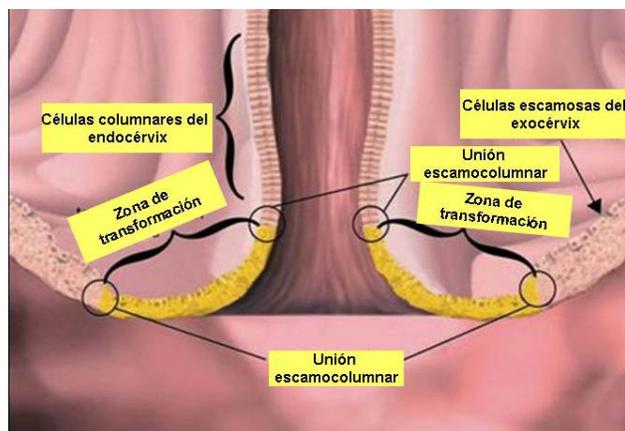
<sup>1</sup> Modificado de Pelea y cols. [37].

### 1.2.5 Historia natural y agente causal

El agente etiológico del CaCU es la infección por VPH, su presencia es necesaria mas no suficiente para ocasionar CaCU [38-40]. El Dr. Harald zur Hausen fue el primero en demostrar, por medio de experimentos de hibridación, que las verrugas genitales y los tejidos de CaCU, contienen genomas de VPH [41-43]. Este es considerado como un factor independiente y necesario para el desarrollo de cáncer y sus lesiones precursoras, encontrándose hasta en el 99% de los casos [44-47]. La mayoría de las lesiones leves o moderadas causadas por este virus revierten espontáneamente en individuos inmunocompetentes [48]. Se sabe que más del 70% de las adolescentes sexualmente activas y mujeres jóvenes adquieren la infección por VPH, siendo ésta en la mayoría transitoria [49-51], aún así, en cerca del 25% la infección persiste y se desarrolla una lesión intraepitelial de bajo grado (LSIL por las siglas en inglés). Después, sólo del 20 al 40% de estas LSIL progresa hacia lesiones intraepiteliales de alto grado (HSIL). Esto significa que aquellas mujeres que en alguna ocasión adquieren un VPH, solo el 5 o 10% de ellas desarrollarán una HSIL, mientras que

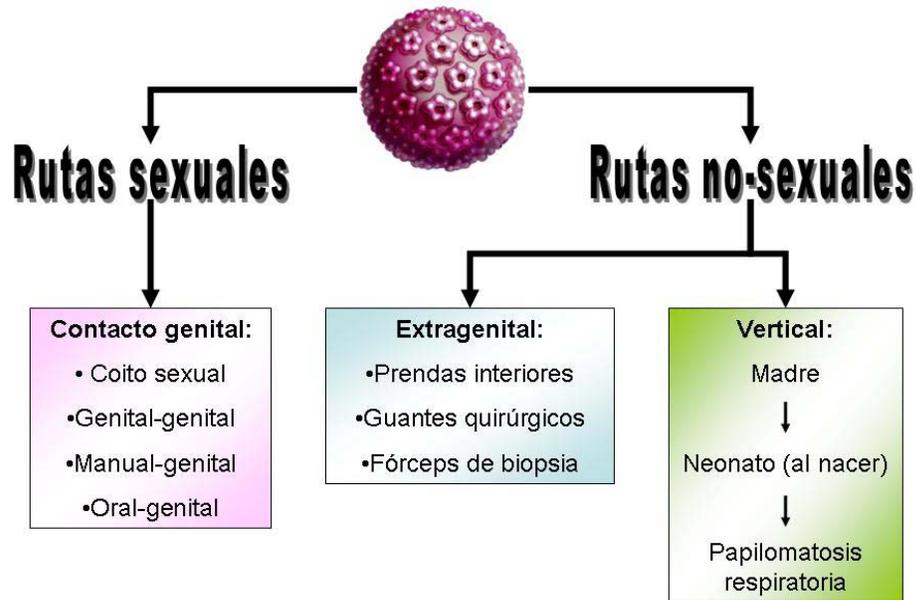
cerca del 90% de las mujeres infectadas no mostrarán evidencia alguna del tipo viral adquirido después de 12 a 36 meses [50, 52].

Las lesiones premalignas y malignas del cérvix se originan en la zona de transformación [53] (véase figura 2). Esta es una área de intercambio celular el cual cambia en respuesta a cambios hormonales y etapas reproductivas, como la pubertad, el embarazo y la menopausia [54]. El virus infecta este epitelio presuntamente vía abrasión mecánica, resultando en abrasiones microscópicas en la mucosa o la piel que permiten la entrada al VPH y su establecimiento [54].



**Figura 2. Unión escamocolumnar.** Consiste en un área de metaplasia inmadura entre el epitelio escamoso estratificado maduro del exocérvix y el epitelio columnar del endocérvix [55].

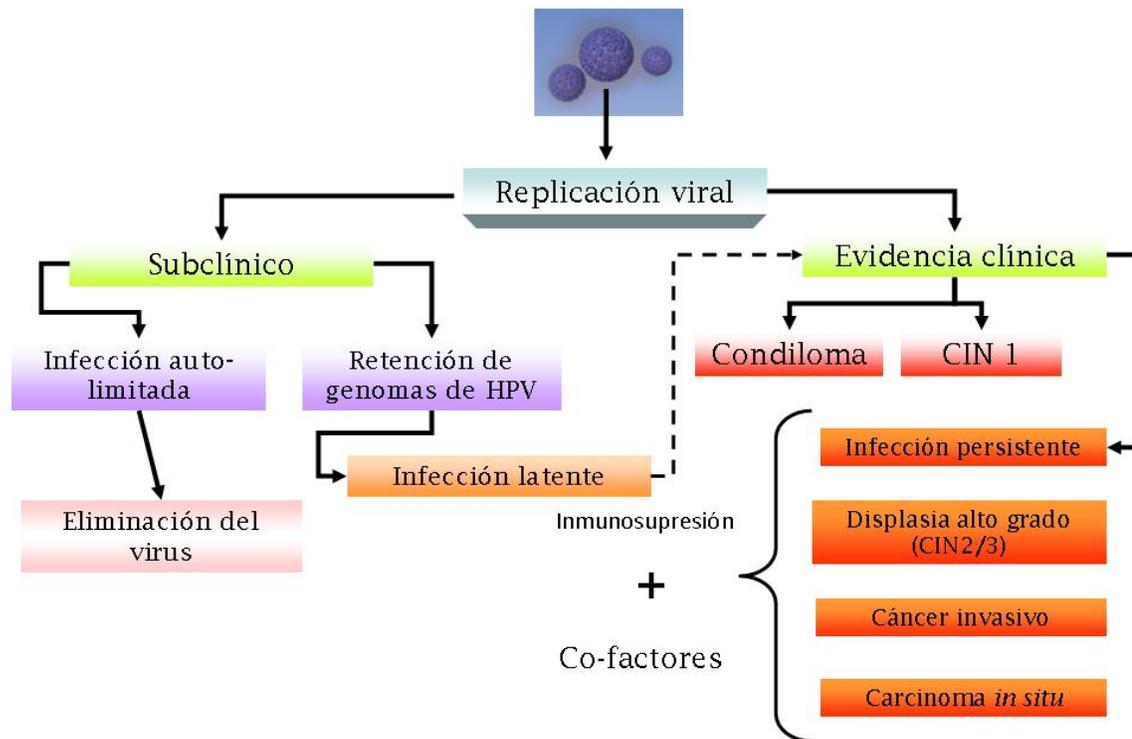
El contacto genital, usualmente mediante el coito sexual, con una pareja infectada es al parecer necesario para la transmisión de VPH. Otros tipos de contacto genitales, en la ausencia de penetración (contacto oral-genital, manual-genital, y genital-genital) pueden llevar a infección por VPH, pero estas rutas de transmisión son menos comunes. Se ha propuesto la hipótesis, aunque no bien documentada, que la transmisión de VPH puede ocurrir vía objetos inanimados (fomites) como superficies del ambiente o ropa [56]. Ocasionalmente, la transmisión madre a recién nacido o vertical ocurre, en el que la infección por VPH es adquirida por el recién nacido después de pasar por el tracto genital de la madre infectada. La transmisión vertical por VPH puede conducir a Papilomatosis recurrente respiratoria (véase figura 3 ) [57].



**Figura 3. Rutas de transmisión de VPH.** El VPH se transmite por contacto cutáneo directo con una persona infectada. La transmisión, por lo general, se debe al contacto vaginal, oral o anal, aunque existe evidencia acerca de su transmisión extragenital por objetos inanimados y vertical de madre a hijo/a durante el parto [56].

Como se mencionó con anterioridad, la infección con el VPH es necesaria, más no suficiente para el desarrollo de CaCU. Existen cofactores ambientales y del huésped que condicionan el establecimiento de la infección. En la mayoría de los individuos inmunocompetentes la infección con VPH es asintomática y transitoria [49]; aún y cuando la infección se asocia con neoplasia, la lesión regresa. En contraste, la infección viral persistente por virus de alto riesgo se asocia con la progresión de lesiones, y puede finalmente llegar a desarrollar cáncer invasivo (véase figura 4).

Se ha documentado que la persistencia es común entre los tipos virales de alto riesgo, definiéndose como la detección del mismo tipo viral en muestras obtenidas consecutivamente en intervalos de 3 a 6 meses. Ésta puede inducir cambios genéticos secundarios dado que las proteínas virales interfieren con los puntos de control del ciclo celular e inducen inmortalización de los queratinocitos [49, 52]. La carga viral correlaciona directamente con la severidad de la enfermedad. Y se ha documentado que el VPH 16 puede alcanzar una carga viral más alta que otros tipos virales [58].



**Figura 4. Historia natural del VPH.** La infección por VPH puede ser clínica (sintomática) o subclínica (asintomática). La mayoría de los individuos tienen la capacidad de eliminar la infección, aún y en presencia de lesiones leves o moderadas éstas reversion espontáneamente en individuos inmunocompetentes. Sin embargo, en aquellos con una deficiencia inmune, heredada o inducida farmacológicamente, hay una fuerte tendencia para que la infección persista. La persistencia con virus de alto riesgo favorece la progresión de las lesiones hacia cáncer [42, 59].

A continuación se mencionan algunos cofactores de riesgo para la infección por VPH.

La *conducta sexual*, se ha encontrado un fuerte vínculo entre el número de parejas que han tenido tanto la mujer como su compañero a lo largo de su vida al igual que la edad de inicio de actividad sexual y la adquisición del VPH [60-62].

La *edad*, siendo la infección más común en mujeres jóvenes sexualmente activas, de 18 a 30 años de edad. El CaCu es más común después de los 35 años, lo que sugiere infección a temprana edad y progresión lenta a cáncer [63, 64].

La *paridad elevada*, se ha demostrado que mujeres con siete partos o más, presentaron un riesgo 3.8 veces mayor [65]. Otros estudios corroboran esta relación positiva encontrada entre la paridad elevada y el CaCU [66, 67].

El uso de *anticonceptivos orales* también se considera un cofactor de riesgo, un análisis de los datos compartidos de diez estudios de casos y testigos, de pacientes con CaCU, sugiere que el uso a largo plazo de los anticonceptivos orales podría aumentar hasta cuatro veces el riesgo de CaCU en las mujeres infectadas con el VPH [68].

El *tabaquismo* parece estar firmemente asociado con la aparición de lesiones cervicales precancerosas y cáncer [69, 70], aún en fumadoras pasivas [71]. El tabaquismo se encuentra entre los cofactores ambientales más uniformemente identificados con la probabilidad de influir en el riesgo de padecer CaCU; los estudios revelan que el riesgo para las fumadoras actuales al menos duplica el de las no fumadoras [69, 70, 72].

Los *folatos* han sido implicados en el desarrollo de CaCU por varios autores, incluyendo los polimorfismos en MTHFR (el gen de metilentetrahidrofolato reductasa por sus siglas en inglés) y los niveles de folatos en la dieta [73].

Aunado a estos cofactores, se considera que una baja *condición socioeconómica* es un factor de riesgo de numerosos problemas de salud, incluido el CaCU; en particular, en entornos de bajos recursos. Las mujeres con una baja condición socioeconómica a menudo tienen bajos ingresos, limitaciones para acceder a los servicios de atención de salud, nutrición deficiente y escasa concientización acerca de los temas de salud y de una conducta preventiva [74].

### **1.2.6 Manejo y tratamiento del VPH, lesiones y cáncer cervicouterino**

#### *VPH*

El tratamiento de VPH no está bien establecido, existen múltiples ensayos clínicos que aprueban el uso de la radiocirugía, la electrocauterización, el láser, la crioterapia y el empleo de biomoléculas. Dentro de éstas últimas figura el interferón alfa (IFN) agente biológico de gran actividad antiviral, antiproliferativa e inmunomodulador, que afecta la división de las células cancerosas y hace que el crecimiento del tumor sea más lento, considerándosele un arma valiosa en el tratamiento de muchas enfermedades y que,

en el caso de las verrugas genitales, debe ser inyectado directamente en ellas. Actualmente no existe un tratamiento que elimine el virus y su desaparición depende del sistema inmunológico de cada paciente. Otros tratamientos menos comunes para las verrugas incluyen medicamentos como el ácido tricloroacético, podophyllin o podofilox, y el 5 – FU (5-fluorouracilo), el cual está disponible en crema. Nuevos medicamentos como el imiquimod (Aldara ®), HspE7 y cidofovir (Vistide ®), originalmente desarrollados para combatir el citomegalovirus (CMV), han demostrado ser útiles en el tratamiento para el VPH en estudios preliminares [75].

### *Lesiones*

Desde la publicación de la guía consenso en el 2001 por la Sociedad Americana de Colposcopia y Patología Cervical (ASCCP, por sus siglas en inglés), se ha generado nueva información acerca del manejo de las lesiones, dentro de ésta se incluyen los resultados del estudio ALTS (ASCUS/LSIL/Triage Study) patrocinado por el Instituto Nacional de Cancerología (NCI por sus siglas en inglés). Además, la detección molecular del VPH ha sido usada junto con la citología cervical para el monitoreo de mujeres mayores de 30 años.

En el 2005, la ASCCP, junto con sociedades profesionales y organizaciones federales e internacionales, comenzó el proceso de revisión de los lineamientos generales. Los resultados de estos lineamientos para el manejo de anomalías citológicas e histológicas, se presentaron en la conferencia que tuvo lugar en septiembre 18-19 del 2006 en el campus de Bethesda (Maryland), en donde se discutieron, modificaron y se hizo voto para llegar a un acuerdo sobre el manejo de las mismas (cuadro 4).

Para la clasificación citológica se usa el sistema Bethesda 2001 descrito con anterioridad. La clasificación histológica usada es el sistema de 2-niveles que aplica los términos CIN 1 para lesiones de bajo grado y CIN 2,3 para precursores de lesiones de alto grado.

Cuadro 4. Lineamientos para el manejo de anomalías citológicas.

<i>Recomendaciones para manejo de ASC-US</i>	Los estudios clínicos [76-78] han demostrado que dos exámenes citológicos repetidos en intervalos de 6 meses, prueba del VPH, y una sola examinación colposcópica son un manejo seguro y efectivo para mujeres con ASC-US. Las mujeres con ASC-US y VPH DNA negativas pueden ser seguidas con una citología en 12 meses. Las mujeres con VPH DNA positivas deben de ser manejadas como mujeres con LSIL y ser referidas a evaluación colposcópica. Después de dos resultados “negativos para lesión intraepitelial”, la mujer puede regresar a su monitoreo de rutina citológico (véase anexo 3).
<i>Recomendaciones para el manejo de LSIL</i>	Datos del estudio ALTS indican que el riesgo de CIN 2,3 es el mismo en mujeres con LSIL y aquellas con ASC-US que son VPH (alto riesgo oncogénico) DNA positivas. Se recomienda la colposcopia. El manejo aceptable post-colposcópico para las mujeres con citología LSIL en el que CIN2,3 no se ha identificado son la prueba de detección de VPH (virus de alto riesgo oncogénico) o repetición de la citología en 6 o 12 meses. Si el resultado de VPH es negativo o dos citologías consecutivas son negativas para lesión intraepitelial, se regresa al monitoreo rutinario citológico. Si ya sea la prueba de VPH DNA o la citología es reportada como ASC-US o mayor, se recomienda la colposcopia (véase anexo 4).
<i>Recomendaciones para el manejo de HSIL</i>	El descubrimiento de HSIL en una citología conlleva un alto riesgo para CaCU. Cuando no se identifica histológicamente CIN 2,3, ya sea por el procedimiento del asa o con observación colposcópica, se acepta la revisión citológica en intervalos de 6 meses. Después de un año de observación las mujeres con dos resultados “negativos para lesión intraepitelial” pueden regresar a su monitoreo normal. Las mujeres con CIN 2,3 deben de ser tratadas de acuerdo a los lineamientos publicados (véase anexo 4).

### CaCU

Los tratamientos para el CaCU dependen de la etapa en que se encuentra la enfermedad, del tamaño del tumor, de la edad de la paciente, su estado de salud general y su deseo de tener hijos. En los primeros estadios (etapa 0 y I) se puede tratar ya sea con conización, cirugía con rayo láser, procedimiento de escisión electroquirúrgica (LEEP), criocirugía o histerectomía total abdominal. Para la etapa II se realiza histerectomía radical junto con los ganglios linfáticos en la región pélvica y radioterapia interna/externa y en caso de las últimas etapas (III y IX) se utiliza quimioterapia aunada a radioterapia. El tratamiento del CaCU puede ser postergado

durante el embarazo dependiendo de la etapa en que se encuentre el cáncer y el progreso del embarazo[79].

### 1.2.7 Virus del Papiloma Humano

Los virus del papiloma (VP) pertenecen a la familia Papillomaviridae, una familia recientemente reconocida como distinta de los polyomavirus por el Consejo Internacional para la Taxonomía de los Virus, (ICTV) [80]. Estos virus están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Infechan específicamente el epitelio escamoso de más de 20 especies diferentes de mamíferos, así como aves y reptiles [81]. La partícula viral del VPH tiene una cápside de 72 capsómeros (60 hexámeros y 12 pentámeros), con un diámetro aproximado de 55 nm y que contiene al genoma viral (véase figura 5). Los capsómeros están hechos de dos proteínas estructurales: L1 en mayor proporción y L2. El VPH es relativamente estable y debido a que no tiene una envoltura, permanece infeccioso en un ambiente húmedo por meses [56].



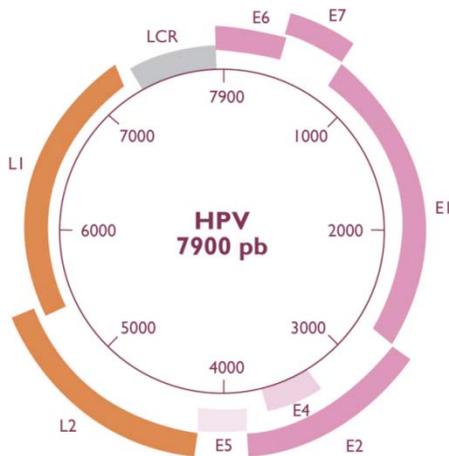
**Figura 5. Estructura de la partícula viral del VPH.** La partícula viral del VPH tiene una cápside de 72 capsómeros formados por las proteínas estructurales L1 y L2.

Tomada de [http://www.hopkinsmedicine.org/cervicaldysplasia/definitions\\_1.htm](http://www.hopkinsmedicine.org/cervicaldysplasia/definitions_1.htm)

#### 1.2.7.1 Genoma del VPH

El genoma del VPH consiste de una molécula de DNA circular de doble cadena de aproximadamente 8 Kb. Se divide en tres regiones: la región larga de control, LCR, que no contiene marco de lectura alguno; la región que corresponde a las proteínas tempranas (E1 a E8) y la región que corresponde a las proteínas tardías (L1 y L2) (véase figura 6). El genoma codifica aproximadamente ocho ORFs (por sus siglas en inglés Open Reading Frames) que son transcritos como mRNAs policistrónicas a partir de una sola cadena de DNA. Los transcritos virales son procesados diferencialmente por mecanismos de *splicing* alternativo y traducidos usando escaneo ribosomal. El genoma contiene dos promotores principales, el temprano inicia la transcripción río arriba de el ORF de E6, mientras que el promotor tardío está localizado en el ORF de

E7 dependiente de diferenciación y es activado durante la fase vegetativa del ciclo viral [82, 83].



**Figura 6. Organización del genoma del VPH.** El genoma se divide en tres regiones; la región larga de control, la región que codifica las proteínas tempranas y la región que codifica las proteínas tardías. Tomada de Prendiville y Davies [81].

### 1.2.7.2 Clasificación

El gen L1 es el más conservado del genoma viral y por tanto ha sido usado para identificar nuevos tipos virales. Un nuevo tipo viral es reconocido como tal solo si la secuencia nucleotídica del gen L1 difiere por poco más del 10% de aquella del tipo viral conocido más cercano. Diferencias de 2 al 10% definen a un subtipo viral, mientras que la diferencia menor a 2% define a una variante viral. Hasta la fecha se han descrito y secuenciado completamente 118 tipos virales y se ha identificado un número mayor de posibles nuevos tipos mediante la amplificación de regiones subgenómicas.

Los VP se clasifican en 3 niveles taxonómicos: género, especie y tipo [84]. Los diferentes géneros comparten menos del 60% de identidad en la secuencia de L1; las especies de un género comparten una identidad de secuencia de 60 a 70% y los tipos virales dentro de una especie comparten de 71 a 89% de identidad de secuencia. Los VP conocidos que infectan tanto a humanos como a animales forman 16 géneros que se identifican por letras griegas. Cinco de estos géneros se componen exclusivamente de VPHs y VPs identificados en algunos primates, todos los otros géneros contienen tipos encontrados en varios mamíferos y aves.

El género clínicamente más importante es el referido como los virus del papiloma-Alfa o VP-Alfa (en inglés Alpha-papillomavirus). Contiene a todos los tipos de VPH asociados a lesiones en mucosas o genitales. Los VP-Beta incluyen todos los tipos de

VPH asociados con epidermodisplasia verruciformis (EV), una enfermedad neoplásica cutánea con componente genético. En aquellos portadores que no son genéticamente predispuestos a la enfermedad, los VP-Beta y los VP-Gama establecen infecciones asintomáticas, o en el peor de los casos producen pequeñas lesiones cutáneas neoplásicas benignas. Algunos de los virus de estos dos géneros también se han hallado asociados a cáncer de piel en individuos inmuno-suprimidos. El cuadro 5 resume la relación entre la taxonomía y patología de algunos VPs.

Cuadro 5. Tipos virales de papiloma más estudiados y sus propiedades clínicas<sup>1</sup>.

Familia: <i>Papillomaviridae</i>			
GÉNERO	ESPE-CIE	TIPO(S)	PROPIEDADES
Virus del papiloma-Alfa	4	VPH-2, -27, -57	Verrugas comunes de la piel, frecuentemente verrugas genitales en niños.
	5	VPH-26, -51, -69, -82	Lesiones benignas en mucosas así como malignas de alto riesgo.
	6	VPH-53, -30, -56, -66	Lesiones benignas en mucosas así como malignas de alto riesgo.
	7	VPH-18, -39, -45, -59, -68, -70	Lesiones malignas de alto riesgo en mucosas. VPH-18 más frecuente en adenocarcinomas que en carcinomas escamosos de cérvix.
	8	VPH-7, -40, -43	Lesiones cutáneas y mucosas de bajo riesgo
	9	VPH-16, -31, -33, -35, -52, -58, -67	Lesiones malignas de alto riesgo en mucosas. VPH-16 más frecuentemente en carcinoma de cérvix que en adenocarcinoma.
	10	VPH-6, -11, -13, -44, -74	Lesiones benignas en mucosa. VPH-6 y -11 en verrugas genitales de hombres y mujeres.
Virus del papiloma -Beta	1	VPH-5, -8 (por citar solo dos tipos)	Lesiones cutáneas benignas y malignas en pacientes inmunosuprimidos.
Virus del papiloma -Gama	1	VPH-4, -65 (por citar solo dos)	Lesiones cutáneas benignas.
Virus del papiloma -Delta	4	Virus del papiloma bovino-1 (por citar solo uno)	Papilomas fibrosos en el ganado vacuno.
Virus del papiloma -Kappa	1	Virus del papiloma del conejo de cola de algodón	Lesiones cutáneas
	2	Virus del papiloma oral en conejo	Lesiones de la cavidad bucal.
Virus del papiloma -Mu	1,2	VPH-1, -63	Lesiones cutáneas como verrugas de los pies.
Virus del papiloma -Un	1	VPH-41	Lesiones cutáneas
Virus del papiloma -Xi	1	VPB-3, -4	Papilomas en el canal alimentario en ganado vacuno.

<sup>1</sup> Modificada de Saavedra y cols. [85]

### **1.2.7.2.1 Variantes**

Se especula que hace varios miles de años, cuando las especies humanas evolucionaron, los tipos de VPH ya existían con genomas muy parecidos a los de hoy en día. Las distancias genéticas entre los aislados virales evolucionaron en paralelo con los grupos étnicos humanos y con la dispersión de estos alrededor del mundo. Como consecuencia, ciertas variantes virales predominaron en grupos étnicos humanos definidos y aislados, como aquellos que colonizaron primero el continente americano hace unos 12,000 años. En México, hace 500 años los inmigrantes europeos se mezclaron con los nativos y actualmente la población contiene las variantes virales específicas de ambos grupos étnicos. Todos los tipos virales hoy en día, tienen variantes genómicas y estas difieren entre sí por 1 – 5% en su secuencias genómicas [86-89].

Además de los factores de riesgo para la progresión a CaCu ya mencionados, las variantes virales intratipo podrían ser otro factor de riesgo importante, pues diversos estudios sugieren que estas difieren biológicamente en su potencial oncogénico [90-92]. Los países en vías de desarrollo tienen incidencias más altas de cáncer cérvicouterino que los países desarrollados.

Las variantes intratipo de VPH 16 son las más estudiadas. Forman 5 ramas filogenéticas y por su distribución geográfica se clasifican como Europeas (E), Asiáticas (As), Asiático – americanas (AA), Africana – 1 (Af1) y Africana – 2 (Af2) [89, 93]. Por medio del análisis de secuencia de la LCR en VPH – 18, se han identificado tres ramas filogenéticas principales: Europea (E), Africana (Af) y Asiático – Amerindia (AAI), siendo esta última la clona de referencia o prototipo de VPH 18, la cual es un aislado de origen brasileño y que probablemente representa a las variantes de VPH 18 de los indígenas americanos [88]. Se ha sugerido que las variantes no europeas de VPH 16 y 18 se hallan involucradas con un riesgo mayor de progresión [94]. Por ejemplo, las variantes AA de VPH 16 tienen una actividad transcripcional mas elevada que aquellas de otras ramas filogenéticas [95], mientras que las variantes no Europeas de VPH 18 tienen una actividad transcripcional más alta que aquella de las Europeas [96].

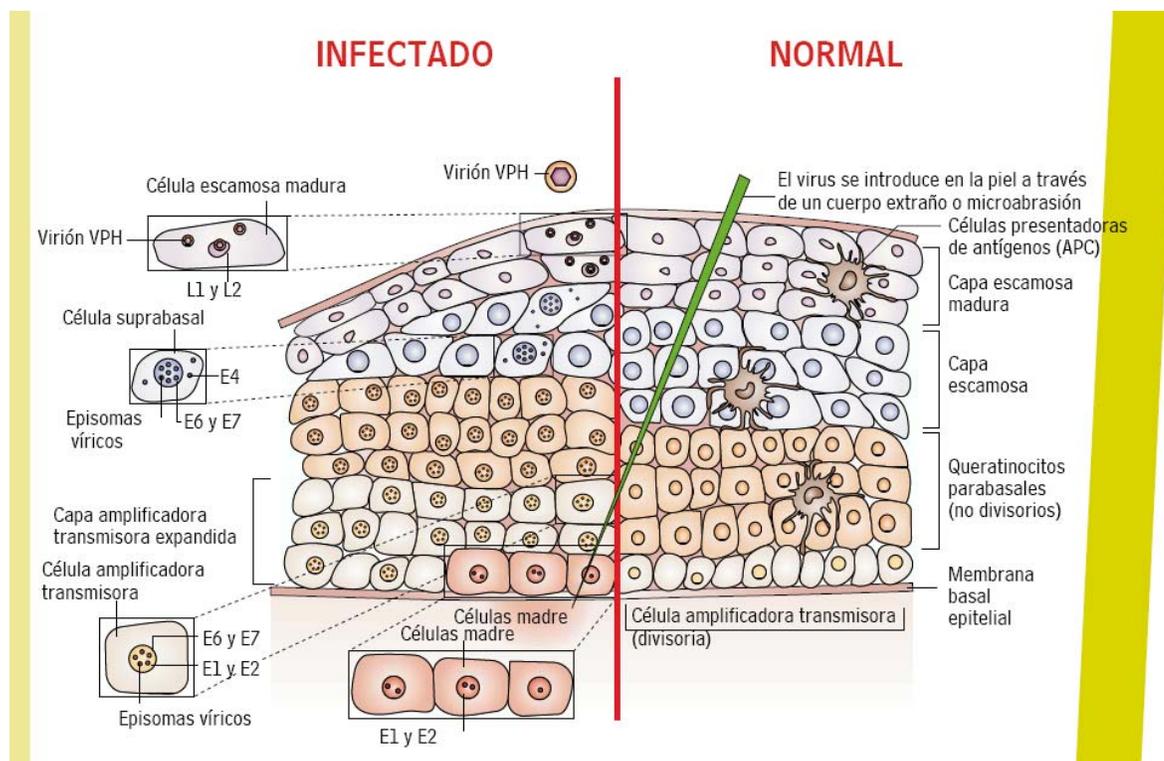
### 1.2.7.3 Ciclo viral

Las partículas infecciosas entran a las células basales o germinales a través de una abertura en el epitelio estratificado. Tal abertura puede ocurrir en condiciones donde la piel tenga alguna lesión o microtrauma. Para los VPH – AR como VPH 16, la formación de lesiones cervicales se facilita por la infección de células columnares que después formarán la capa basal del epitelio estratificado de la zona de transformación. No se ha identificado un receptor de membrana definido para la entrada del virus, aunque el complejo integrina  $\alpha 6 - \beta 4$  se ha propuesto como candidato. Además se ha visto que la entrada depende de la presencia de los proteoglicanos de sulfato de heparan presentes en la membrana plasmática, que podrían ser el lugar de unión inicial previo a la unión con el receptor [97-99]. La internalización del virus ocurre por endocitosis de vesículas cubiertas de clatrina [100]. El desensamble del virión puede ser a través del rompimiento de enlaces disulfuro internos de la cápside, dado el ambiente reductor de la célula, lo que permitiría el transporte del DNA viral al núcleo de esta [101].

Después de la infección y desensamble en las células basales y para mantener su genoma episomal en bajo número de copias, de 10 a 200 por célula, se expresan las proteínas E1 y E2 [102], que además facilitan la segregación correcta de los genomas durante la división celular. La infección inicial es seguida por una fase proliferativa que conduce al incremento del número de células basales que contienen el genoma viral, lo que puede requerir la expresión de las proteínas E6 y E7, mismas que estimulan el progreso de la fase de ciclo celular G1 a S. La expresión de E6 y E7, de un mRNA bicistrónico bajo el control del promotor temprano en la LCR, evita que la célula basal interrumpa el ciclo celular una vez que esta migra al estrato suprabasal del epitelio (veáse figura 7). Estas proteínas retardan la diferenciación celular [103] y promueven la proliferación mediante interacciones con proteínas celulares responsables del control del ciclo celular. Para que se produzcan viriones infecciosos, los VPHs deben multiplicar su genoma y empaquetarlo en la partícula proteica. Esto ocurre en las capas superiores del epitelio, en el estrato espinoso, donde aumenta la actividad transcripcional del promotor tardío dependiente de la diferenciación. Este promotor se halla en el marco de lectura del gen E7 y promueve la transcripción de proteínas involucradas en la replicación del DNA viral, tales como E1, E2, E4 y E5, así como las constituyentes de la cápside, L1 y L2. Para la replicación viral se necesita que E2 se

una a la LCR y que promueva la unión de E1 en el sitio de origen de la replicación viral. 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 este.

El virus es estable extracelularmente ya que es resistente a la desecación y puede ser transmitido directamente a otros individuos. Alternativamente las células infectadas permanecen en el ambiente antes de que el virus sea transmitido a una nueva superficie epitelial, como ocurre en virus que infectan superficies cutáneas. Los VPHs no son líticos y se ha sugerido que la proteína E4 contribuye al egreso del virus de las capas superiores del epitelio mediante el rompimiento de los complejos de citoqueratina [104].



**Figura 7. Arquitectura de células cervicales epiteliales escamosas estratificadas y expresión de las proteínas del VPH tras la infección.** Las células hija de las células epiteliales se dividen a lo largo de la membrana basal para, posteriormente, maduran verticalmente a través del epitelio sin volver a dividirse (lado derecho). Tras la introducción del VPH en las células madre en la capa basal de epitelio, se produce la expresión de las proteínas no estructurales. Bajo la regulación de estas proteínas, la población de células en división se expande verticalmente, la diferenciación de las células epiteliales se retrasa y es menos completa. Las proteínas virales se expresan secuencialmente con diferenciación tal y como se muestra en el lado izquierdo de la figura, y se forman viriones maduros solamente en las capas más superficiales del epitelio. Tomado de Frazer [105].

**1.2.7.3.1 Proteínas virales y su función**

A continuación se resumen las funciones y características de las proteínas del VPH (véase cuadro 6) y una explicación más detallada de las mismas se incluye en el anexo 5.

Cuadro 6. Proteínas virales y su función<sup>1</sup>

<b>Proteína</b>	<b>Función</b>	<b>Características</b>
<b>E1</b>	Inicia la replicación del genoma vírico.	Es una helicasa 3' → 5' hexamérica dependiente de ATP. Estas funciones de ATPasa y de helicasa hacen de esta proteína viral la única con actividad enzimática.
<b>E2</b>	Esencial para la modulación de la replicación del DNA vírico y el control de la transcripción de los oncogenes E6 y E7.	Es una proteína nuclear que provoca una curvatura en la molécula de DNA y otros cambios conformacionales, también es responsable de regular la transcripción y la replicación del DNA viral.
<b>E4</b>	Regula los niveles de la proteína E2. Facilita la amplificación del genoma viral y las proteínas de expresión temprana.	La secuencia codificante de E4 está contenida dentro del marco de lectura del mRNA de E2. El transcrito formado entre el procesamiento alternativo en el ORF de E1 y el de E4 (E1 <sup>Δ</sup> E4) se expresa de manera abundante durante las etapas tardías del ciclo viral y la replicación vegetativa del DNA viral.
<b>E5</b>	Permite la proliferación continua de la célula huésped y la diferenciación retardada.	Es una proteína de membrana hidrofóbica que afecta la actividad de EGFR y PDGFR, así como la interacción de los péptidos antigénicos con las moléculas del MHC-II.
<b>E6</b>	Neutraliza a p53, una proteína supresora de tumores, mediante su degradación por la vía de la ubiquitina. Cooperación con la proteína E7 para la inmortalización de las células.	E6 se expresa muy tempranamente durante la infección por VPH. Esto le confiere varias funciones que alteran el ambiente celular, como por ejemplo el bloqueo de la apoptosis mediante la degradación de p53, la alteración de la transcripción de genes celulares a través de la interacción con p300 y CBP, e incremento de la vida celular por la sobre activación de la telomerasa.
<b>E7</b>	Promueve la inmortalización celular por medio de la supresión pRB.	E7 tiene la mayor capacidad transformante y actúa mediante la unión a proteínas celulares supresoras de tumores de la familia pRB, que a su vez interactúan con factores de transcripción de la familia E2F.
<b>Fusión de E8 con E2</b>	Regula la transcripción y la replicación del genoma vírico.	Resultado de una fusión del producto del pequeño marco de lectura E8 con parte de la proteína E2. Permite la proliferación continua de la célula huésped y la diferenciación retardada.
<b>L1 y L2</b>	Son constituyentes de la cápside.	L1 es la proteína principal de la cápside y conforma cerca del 80% de la misma y se expresa después de L2. La cápside contiene 360 copias de L1 y aproximadamente 12 copias de L2, organizados en 72 capsómeros de una partícula icosaedral.

<sup>1</sup> Modificada de Saavedra y cols. [85]

#### **1.2.7.4 Detección**

En la actualidad, se sabe que las mujeres infectadas con VPHs de alto riesgo tienen un mayor riesgo de desarrollar CaCU que aquellas que no están infectadas o que están infectadas con un VPH de bajo riesgo [106-108]. La incorporación de pruebas de VPH en los programas de monitoreo podría identificar a mujeres que están en riesgo de desarrollar cáncer invasivo. En efecto, varios estudios han demostrado la relevancia de la prueba de VPH en los programas de monitoreo y manejo de pacientes con citologías anormales [109-111]. Además, la ausencia de VPH de alto riesgo en la citología cervical permitiría el manejo menos agresivo de mujeres con anomalías leves citológicas ya que son improbables que progresen [107, 112]. La importancia del VPH en la génesis de la neoplasia cervical sugiere que el diagnóstico específico de la infección por este virus puede dictar un resultado particular clínico y ser útil en el manejo de la paciente.

El VPH no se puede cultivar en el laboratorio, por lo tanto, el diagnóstico del mismo se basa en las tecnologías moleculares que detectan el DNA del virus en las muestras cervicales/vaginales.

Los métodos iniciales para la detección de VPH usaban hibridaciones directas con sondas, como en el Southern blot. Además de que requieren una labor intensiva y consumen demasiado tiempo, este ensayo tiene una baja sensibilidad y requiere grandes cantidades de DNA de las muestras clínicas, siendo actualmente superado por la tecnología de la amplificación, que ha permitido la detección de bajos niveles de copias del virus en las muestras clínicas.

Las dos tecnologías que actualmente se usan para diagnóstico, se distinguen por emplear o no la PCR.

Métodos que no emplean la PCR. Dentro de esta categoría se encuentra la captura de híbridos (HC2) (Digene Corporation, Gaithersburg, Md., USA). La compañía Digene ha lanzado al mercado el único ensayo para detección de DNA de VPH aprobado por la FDA (por sus siglas en inglés Food and Drug Administration). El HC2 es capaz de detectar DNA de 13 VPHs asociados a CaCU ( VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52,

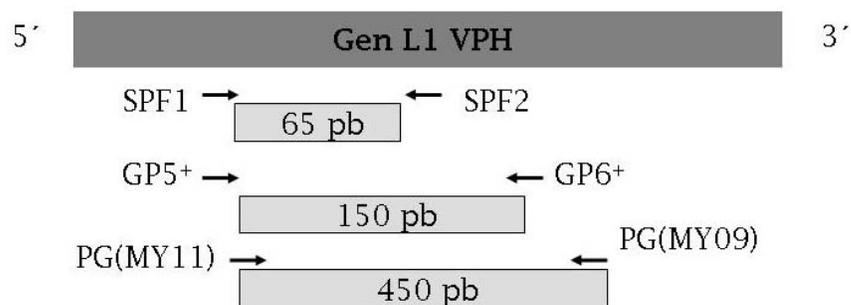
56, 58, 59 y 68) y cinco tipos de bajo riesgo asociados a verrugas genitales (VPH 6, 11, 42, 43 y 44). El ensayo ha sido validado y tiene una sensibilidad de más del 96% para la detección de lesiones de alto grado o cáncer, cuando es usado junto con la citología [113]. La tecnología HC2 es un método cualitativo que consiste en la hibridación del DNA de la muestra a estudiar con sondas de RNA específicas para 18 tipos virales de alto y bajo riesgo. Estos híbridos DNA:RNA son capturados sobre una superficie con anticuerpos conjugados con material quimoluminiscente que emite señales de luz al reconocer el DNA del VPH. Los especímenes de las muestras se combinan con una solución básica que fragmenta a los virus y libera el DNA blanco. No se requiere preparación especial del espécimen. El DNA blanco se combina con sondas de RNA específicas, creando los híbridos RNA:DNA. Los híbridos RNA:DNA formados son capturados sobre una fase sólida cubierta con anticuerpos de captura universal específicos para esos híbridos. Los híbridos RNA:DNA capturados son detectados con múltiples anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina. La señal resultante puede ser amplificada al menos 3000 veces. La unión a la fosfatasa alcalina es detectada con un sustrato quimoluminiscente de dioxetano. La digestión producida por la fosfatasa alcalina sobre el sustrato genera luz que es medida con un luminómetro en Unidades Relativas de Luz (RLU por sus siglas en inglés).

Métodos que utilizan la PCR. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas del inglés) se basa en la amplificación selectiva y exponencial de las secuencias de VPH en los especímenes biológicos. El proceso en la teoría, puede producir más de un billón de copias a partir de una sola molécula de doble hebra de DNA blanco después de 30 ciclos de amplificación.

La mayoría de los laboratorios usan ensayos con PCR, los cuales emplean iniciadores consenso, dirigidos al gen conservado L1, por esta razón son capaces de detectar la mayoría de los tipos de VPH. Dentro de los iniciadores consenso se encuentran los GP5/6 y los modificados GP5<sup>+</sup>/6<sup>+</sup>, MY09/11 y los modificados PGMY09/11, y el conjunto de iniciadores SPF. La amplificación con cada uno de estos iniciadores da amplicones de diferentes tamaños (véase figura 8), lo cual resulta en una variación en la sensibilidad para la detección de ciertos genotipos de VPH [114]. Esto representa un inconveniente cuando las muestras contienen infecciones con múltiples VPHs. En un

estudio realizado por nuestro grupo de investigación (datos no publicados) en el 2006, 13 de 118 (11.01%) de las muestras contenían infecciones múltiples.

En otro estudio reciente se observó un porcentaje parecido de infecciones múltiples (9.2%), el método usando PGMY09/11 detectó la mayoría de éstas (9/11, 81.8%), MY09/11 detectó 2/11 (18.2%), y el sistema GP5<sup>+</sup>/6<sup>+</sup> no detectó ninguna [115]. Después de la PCR, el análisis de los productos amplificados y la distinción de los tipos de VPHs se realiza por medio de secuenciación o hibridación con sondas oligonucleotídicas tipo – específicas, usando varios métodos [116]. Esto puede ser logrado con el uso de diferentes formatos de hibridación, dot blot, Southern blot, placa de ELISA, ensayos de tiras blot lineares reversos, y ensayos en formato de microarreglos.



**Figura 8. Amplicones producidos con el uso de diferentes iniciadores oligonucleotídicos.**

Los laboratorios han incorporado controles internos de amplificación, como el gen de beta-globina (presente en una copia por célula humana) en cada PCR como medida para detectar el potencial inhibitorio de alguna sustancia exógena y la integridad de la muestra. El ensayo comercial de Roche Diagnostics (Amplicor, Indianapolis, Ind., USA) ha sido lanzado recientemente. Este ensayo es similar al HC2 y es capaz de detectar 37 tipos de VPHs, 13 tipos de VPH – AR. Éste detecta los productos de la amplificación específica del DNA del VPH con oligonucleótidos inmovilizados en una membrana de nylon. Las ventajas de éste método son la rapidez (un día), además de una interpretación fácil de genotipos individuales o múltiples, aún sin requerir instrumentación especializada ni costosa.

La utilidad de la PCR de tiempo real y cuantitativa en la detección de VPH también ha sido identificada en numerosos estudios y provee herramientas para la cuantificación

de varios genotipos de VPH en las muestras [117]. Por otro lado, los ensayos de arreglos lineales y microarreglos son dos métodos que ofrecen una rápida detección y tipificación simultánea de múltiples VPHs. El microarreglo de oligonucleótidos de VPH ha sido desarrollado por la compañía Biomedlab (Seoul, Korea), y permite la detección de 22 tipos de VPHs. Los productos son generados en presencia de nucleótidos marcados con fluorescencia y son hibridados en un chip para posteriormente ser escaneados, siendo posible detectar múltiples infecciones en un solo paso. Lo ideal sería que un gran número de oligonucleótidos tipo-específicos de VPH pudieran ser impresos en el chip, aunque este método requiere de equipo costoso y no es apto para uso comercial aun.

#### **1.2.7.5 Utilidad clínica de detección de VPH**

La prueba típica para la detección oportuna del CaCU es el Papanicolaou. Desde su introducción hace más de 30 años, las tasas de mortalidad en países desarrollados han disminuido de manera extraordinaria. Una de sus desventajas inherentes es la sensibilidad de la prueba, que varía entre un 30% y un 87% mientras que la especificidad varía entre un 86% y un 100% [118]. Debido a estas desventajas, se han venido desarrollando nuevas tecnologías, como son las preparaciones en base líquida, aunque no se ha logrado superar las mismas, la sensibilidad de este ensayo varía entre un 61% y un 95% y su especificidad entre un 78% y un 82% [119, 120], superando por poco la sensibilidad del Papanicolaou tradicional. Estas limitaciones han despertado el interés en el uso de una combinación entre la citología y la detección del VPH. La mayoría de las infecciones adquiridas se eliminarán espontáneamente y la positividad de DNA de VPH disminuye conforme la mujer avanza en edad. Así que, el examen de VPH debe ser usado solo para el monitoreo de rutina en mujeres mayores de 30 años de edad [121].

Numerosos estudios han evaluado la combinación de la prueba de VPH y citología cervical [122, 123]. En estudios realizados en Norte América y Europa, la sensibilidad y especificidad de la prueba de VPH para la detección de lesiones CIN2 o mayores en mujeres que sobrepasan los 35 años es de 95% y 93%, respectivamente [124]. El valor de sensibilidad y especificidad de la citología en ASC-US es de 60% y 97%, respectivamente, mientras que la sensibilidad usando una combinación de la citología y

la prueba de VPH es significativamente mayor que si se realiza una sola prueba, con valores predictivos negativos del 99-100% [124, 125]. En los Estados Unidos de América el uso de la prueba de detección de VPH ha sido aprobado por la FDA en conjunto con la citología cervical en mujeres mayores de 30 años. Como se comentó con anterioridad, la ASCCP ha dado los lineamientos para el manejo. Se ha llegado a la conclusión de que un resultado negativo en citología y VPH puede ser manejado con un monitoreo cada 3 años, ya que menos del 2% de éstos casos desarrollarán CIN3 [126] y los beneficios son equiparables al monitoreo anual.

*Genotipificación del VPH.* Como ya se comentó antes, se ha descubierto que el tipo específico de VPH-AR que una mujer adquiere puede ser un importante indicador del riesgo a desarrollar CIN2 o lesiones mayores. Entre las mujeres mayores de 30 años con una citología negativa en un estudio en Portland, se identificó CIN III después de un seguimiento de 10 años en 21% y 18% de aquellas con infección por VPH 16 y 18, respectivamente [126]. En contraste, el riesgo de desarrollar CIN III entre mujeres con otros tipos de VPH-AR fue de solo el 1.5%. Schlecht y cols. también encontraron una incidencia elevada en citologías con lesiones de alto grado durante un seguimiento en mujeres brasileñas que fueron VPH positivas para los tipos 16 y 18, comparado con mujeres infectadas por otros tipos de VPH-AR, aunque las incidencias no fueron tan marcadas como las observadas en Portland [127].

Los ensayos de genotipificación para determinar tipos específicos de VPH aún no han sido aprobados por la FDA. Si la FDA aprobara la genotipificación de VPH, sería razonable utilizarla en citologías negativas de igual manera como es utilizada en mujeres VPH-AR positivas con ASC-US. Las muestras con citologías negativas y VPH positivas podrían ser genotipificadas para saber el tipo específico, para que aquellas con VPH 16 o 18 puedan ser referidas a colposcopia [126]. A las mujeres con otro tipo de VPH-AR se les podría recomendar su monitoreo en 12 meses para pruebas de citología y VPH.

En resumen, la incorporación de la detección de VPH en la clínica cotidiana tendrá uso en: 1) para mujeres con citología ASC-US con resultados positivos a VPH-AR deben ser seguidas de forma más agresiva que aquellas con resultados negativos; 2) como medio de vigilancia para las mujeres tratadas por lesiones de alto grado o cáncer,

donde aquellas positivas para VPH-AR deben ser monitoreadas más de cerca que aquellas con resultado negativos; 3) como un monitoreo primario para las displasias de alto grado en mujeres mayores de 35 que sean positivas para VPH-AR, mismas que serían dirigidas a colposcopia. La relación costo-beneficio de esta propuesta no ha sido delineada con claridad, pero una prueba aleatoria en Canadá ha mostrado resultados prometedores [128].

La incorporación de la prueba de detección de VPH en la clínica cotidiana en México ha sido un proceso lento. Esto debido a dos principales restricciones que impiden el uso de las tecnologías de detección en los programas de monitoreo: 1) la metodología y la instrumentación requerida para el procesamiento de los especímenes cervicales y 2) los requerimientos de equipo técnico para la interpretación de los resultados. La comunidad científica se esfuerza diariamente para resolver estos inconvenientes y permitir así la incorporación de ensayos que se adopten a las deficiencias económicas y de recursos humanos que existen en el país.

### **1.2.8 Sistema Inmune**

#### **1.2.8.1 Respuesta inmune ante la infección**

La defensa del huésped ante cualquier agente exógeno resulta de una estrecha colaboración entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa (véase anexo 6).

La primera línea de defensa es la inmunidad innata, proporcionada por ejemplo, por las enzimas de las superficies mucosas y la piel así como por la acción de interferones, citocinas, neutrófilos y macrófagos. La segunda línea de defensa es la inmunidad adquirida, compuesta por la inmunidad humoral y la inmunidad celular. Esta última tiene la capacidad de eliminar la infección hasta en más del 70% de los casos, permaneciendo el resto (20 – 30%) como infecciones persistentes.

Comparado con otros patógenos, VPH es pobremente inmunogénico debido a sus características estructurales y fisiológicas: 1) es un virus de doble cadena de DNA sin intermediario RNA que active la respuesta innata; 2) durante la fase temprana de la infección, produce nucleoproteínas que no son secretadas y nos son presentadas por

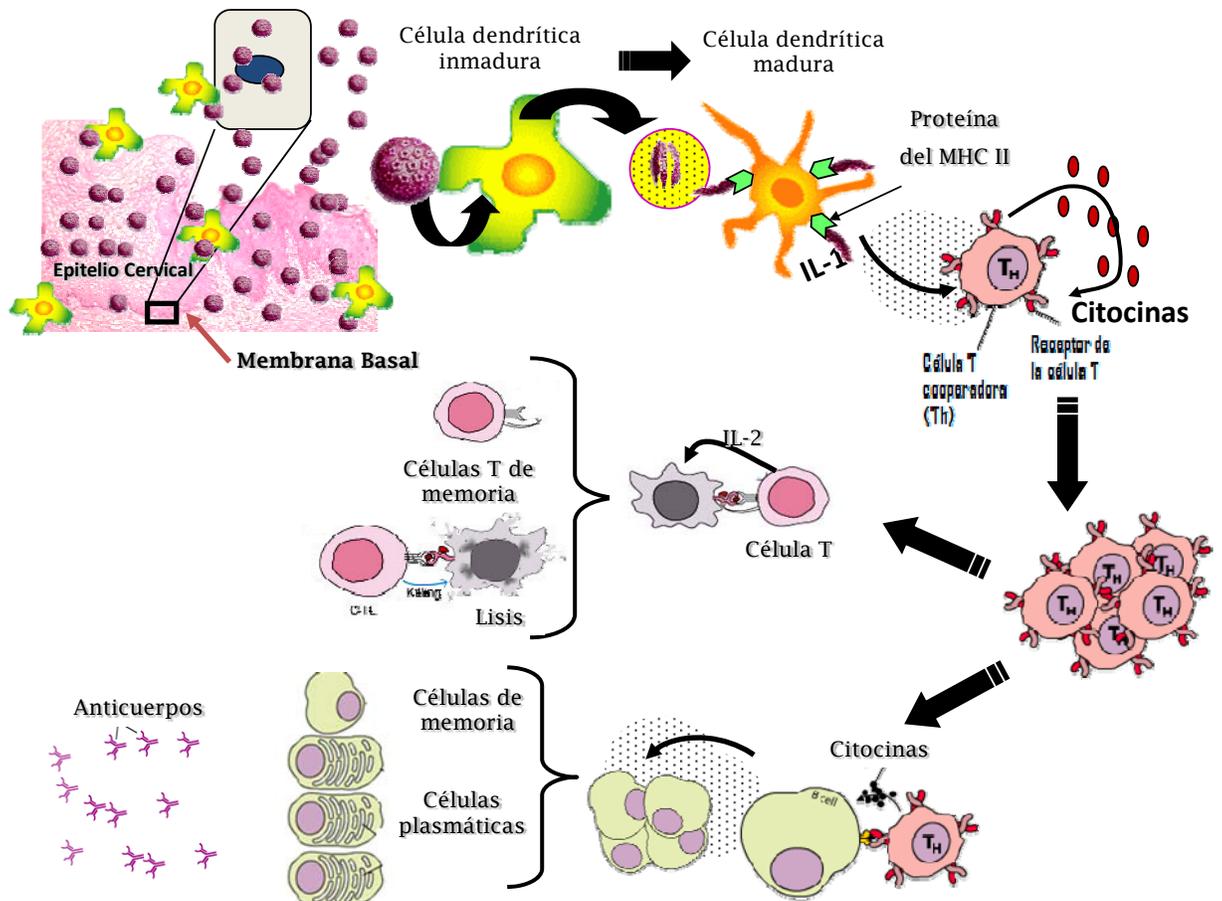
las células infectadas; 3) la mayoría de sus proteínas se expresan en niveles muy bajos en el epitelio basal, siendo insuficientes para despertar la respuesta inmune; 4) infecta sólo células de la piel y no induce muerte celular, el activador principal de la inmunidad innata y adaptativa; y 5) sus proteínas oncogénicas reprimen la presentación antigénica. Como resultado de estas características, el VPH provoca una débil respuesta inmune por parte del huésped [129].

### **1.2.8.2 Inmunidad innata**

El principal mecanismo de defensa ante una infección viral requiere la integridad de las superficies epiteliales o endoteliales. Una vez que se altera el mecanismo de barrera, se disparan una serie de mecanismos inespecíficos o innatos, tales como la producción de interferones, las células asesinas (NK) y los macrófagos. La infección viral celular induce la producción de interferones, los cuales activan mecanismos antivirales en las células vecinas capaces para resistir la infección. Una descripción detallada de los componentes de la inmunidad innata se encuentra en el anexo 6.

### **1.2.8.3 Inmunidad adaptativa**

La inmunidad adaptativa es muy flexible y se basa en los receptores para linfocitos B y T generados por el re-arreglo somático de genes durante la ontogénesis. Ni la especificidad de estos receptores ni la respuesta que los mismos pueden inducir en los linfocitos después de la ligación de un antígeno con el receptor, es predeterminada; estas respuestas son determinadas por esfuerzos coordinados entre los sistemas adaptativos e innatos. La figura 9 muestra un resumen de la respuesta inmune adaptativa ante la infección por VPH.



**Figura 9. Respuesta inmune adaptativa ante la infección por VPH.** El VPH infecta las células de la membrana basal del epitelio cervical. Una vez que la célula dendrítica reconoce el virus, ésta lo procesa en péptidos y migra hacia los nódulos linfáticos. La célula dendrítica madura presenta los péptidos por medio del MHC-II a las células T cooperadoras. La liberación de ciertas citocinas, como la IL-1, provoca la linfoproliferación de los linfocitos T y la activación de dos respuestas inmunes diferentes, la respuesta celular y la humoral. En la primera, se activan los linfocitos T citotóxicos, los cuales interactúan directamente con las células infectadas provocando su lisis. Por otra parte, la respuesta inmune humoral produce células de memoria y células plasmáticas capaces de liberar anticuerpos antígeno- específico que neutralizan los virus.

### 1.2.8.3.1 Respuesta inmune celular

La adquisición de VPH resulta en una infección con duración variable que puede o no estar asociada a lesiones clínicas. Se ha hecho un esfuerzo recientemente en entender el rol del sistema inmune del huésped en la historia natural de VPH, en particular la inmunidad celular (una descripción detallada de la misma se encuentra en el anexo 7). Los estudios han revelado que la respuesta inmune celular se divide en dos grandes

categorías: aquellas mediadas por linfocitos T citotóxicos (CTL) y aquellas mediadas por linfocitos T cooperadores (Th).

Los CTLs usualmente son CD8<sup>+</sup> y juegan un papel vital en la eliminación de células infectadas por virus. Los antígenos virales son reconocidos y expuestos en la superficie de las células infectadas por el MHC. La activación de los CTLs requiere de la presentación antigénica por parte de los APC (células presentadoras de antígeno). Una vez activados, los CTLs proliferan, se diferencian y participan en la lisis de las células blanco por tres caminos diferentes:

- Secretan perforinas y otras proteínas que perforan la membrana celular.
- Liberan sustancias que inducen la muerte celular programada (apoptosis).
- Liberan citocinas como el INF- $\alpha$  y el TNF que limitan la actividad viral dentro de las células y atraen macrófagos y otros fagocitos que pueden destruir a la célula. El INF- $\gamma$  inhibe la expresión de los genes virales y estimula la expresión de las moléculas de clase I del complejo MHC en los queratinocitos humanos, lo que permite una mejor presentación de los antígenos virales y con ello una respuesta inmune aumentada [130].

Por otra parte los Ths son CD4<sup>+</sup> y pueden tener un papel ya sea positivo o negativo en la inmunidad. Pueden producir citocinas para activar a las células B para la producción de anticuerpos, así como citocinas para activar y sostener una respuesta CD8<sup>+</sup> (CTL). También promueven la respuesta inflamatoria, la cual en el contexto de una respuesta a patógenos puede ser benéfica. En contraste a las células CD8<sup>+</sup>, las células CD4<sup>+</sup> reconocen a los antígenos exógenos, los cuales son tomados del entorno de los APC por endocitosis. La mayoría de los péptidos que son presentados a las células CD4<sup>+</sup> son derivados de proteínas exógenas o de unión a membranas, probablemente porque estos péptidos tienen el acceso a la vía MHC II. Al parecer estas proteínas son degradadas preferencialmente en el citoplasma. También existe la posibilidad de que las proteínas del VPH puedan ser liberadas al espacio extracelular como resultado de la muerte del queratinocito; estos antígenos pueden ser entonces tomados por los APC y ser presentados a las células CD4<sup>+</sup>. Esto es posible en el CaCU y lesiones avanzadas, donde se ha encontrado infiltrados de linfocitos (incluyendo APCs). Sin embargo, en las lesiones de bajo grado (e infección por VPH en general) se caracterizan por una inflamación local y la ausencia de muerte celular.

### **1.2.8.3.2 Respuesta inmune humoral**

La respuesta humoral es importante sobre todo ante infecciones virales productivas, en las que las partículas virales salen al espacio extracelular por exocitosis o durante la lisis celular por efecto del propio virus o las células citotóxicas del huésped. La mayoría de las veces ésta respuesta permite detener la diseminación del virus a otras células. Los linfocitos B se desarrollan en la médula ósea y emergen como células maduras vírgenes que circulan en la sangre y la linfa y están al acecho en los órganos secundarios linfoides esperando encontrarse con un antígeno.

En este tipo de inmunidad adquieren importancia dos clases de moléculas: Las inmunoglobulinas (Igs) y los receptores antigénicos de las células T (TCR) [131, 132]. La variedad y heterogenicidad de estas moléculas permite el adecuado reconocimiento de diferentes antígenos. Cada célula madura B lleva consigo un receptor unido a membrana B, una inmunoglobulina, o una molécula anticuerpo que es específica para un epítipo discreto de un antígeno [132]. Los virus son procesados en el interior de las células y posteriormente son presentadas en la superficie celular como péptidos antigénicos (véase anexo 8). La célula B reconoce al antígeno por medio de su receptor de las células B (BCR) con la inmunoglobulina de membrana (IgM), lo que desencadena la endocitosis y procesamiento endosómico de dicho antígeno. Algunos de los péptidos resultantes se exportan y se muestran en el surco de moléculas MHC-II del propio linfocito B. El Th activado interacciona ahora mediante su receptor de las células T (TCR) con el complejo epítipo-MHC-II del linfocito B. En este contacto entre ambas células tiene lugar un intercambio de señales químicas que conduce a la activación, proliferación clonal y diferenciación de las células B en dos subclones hermanos: uno de células plasmáticas secretoras de anticuerpos, y otro de células B cebadas de memoria. En este primer encuentro con el antígeno, una respuesta primaria se genera, después, un reencuentro con el mismo antígeno causa una respuesta secundaria más rápida, produciendo altos niveles de anticuerpos con una alta afinidad de unión por el antígeno blanco [133]. Los anticuerpos producidos en suero sistémicos también tienen la capacidad de neutralizar tipos de virus oncogénicos en el cérvix, pero los niveles de anticuerpos deben estar en suficiente concentración para atravesar el epitelio cervical y llegar al sitio de la infección. La ayuda de las

células T es crucial, ya que genera diferentes clases de anticuerpos e isotipos, y el desarrollo de células B de memoria específicas [134].

Los anticuerpos antivirales pueden ser generados contra cualquier proteína viral. Sin embargo, los más importantes son los generados contra proteínas expresadas en la envoltura viral (cápside) o en las membranas de las células infectadas. No se sabe cómo se genera esta respuesta humoral, pero quizá durante la lisis de células cancerosas por linfocitos T citotóxicos, salgan antígenos virales al espacio extracelular. Además se ha encontrado que los títulos de anticuerpos contra estas proteínas varían de acuerdo con el estadio clínico y con la manera en que es tratada la enfermedad. Estos anticuerpos virales pueden activar el complemento produciendo lisis celular, o ser mediadores de la activación de células efectoras citotóxicas.

Por otra parte, no se conoce cuál es el papel de la respuesta inmune humoral en los tumores invasores, es decir, si juega un papel en contra del tumor, quizá en colaboración con las células NK y los macrófagos, o si solamente se presenta como un efecto secundario asociado al desarrollo de la enfermedad. Aunque se sabe que los desórdenes en la inmunidad humoral no resulta en una mayor susceptibilidad a la infección por VPH [135], se ha visto en modelos animales con verrugas, que los anticuerpos neutralizantes en suero son más altos en la regresión de la verruga [136]. A pesar de los bajos títulos de anticuerpos inducidos por una infección natural, los animales permanecen resistentes al reto con grandes dosis de virus infecciosos por el resto de su vida. Estudios epidemiológicos y de historia natural sugieren que la respuesta inmune humana contra la infección por VPH sigue un patrón similar [50, 137]. Las diferentes etapas de los ensayos de vacunación han proporcionado información vital acerca del efecto protector de los anticuerpos que se inducen al administrar VLPs. Los resultados han sido asombrosos, ya que los anticuerpos producidos son neutralizantes [138] tipo-específico que evitan la infección por VPH.

Aún queda mucho por entender acerca de la inmunología humoral y su participación en la historia natural de la infección, mientras tanto, se sabe que niveles continuos y elevados de anticuerpos producidos contra los VLPs son útiles para la profilaxis de la infección por VPH y queda por aclarar su papel en las infecciones ya establecidas.

#### **1.2.8.4 Evasión del sistema inmune por el VPH**

Una respuesta inmune anti-viral normalmente sólo se detecta en la etapa tardía de la infección o una vez que las lesiones han progresado a malignidad, probablemente debido al incremento en la carga de antígenos virales y en el caso de tumores, a la infección de las células en tejido extravascular, siendo estas más accesibles al reconocimiento por parte del sistema inmune [139]. El mecanismo de evasión del sistema inmune por el VPH se describe en detalle en el anexo 9.

#### **1.2.8.5 Estudios de seroprevalencia con VLPs**

Estudios en la inmunidad humoral al VPH, particularmente a los VPHs de alto riesgo, fueron obstaculizados en el pasado por la falta de blancos antigénicos adecuados para los ensayos serológicos, ya que ni las lesiones clínicas ni los sistemas de cultivo *in vitro* son fuentes prácticas de virus. Estos problemas han sido resueltos por la expresión de la proteína de la cápside L1 vía vectores recombinantes, que resulta en un auto-ensamblaje de VLPs que son conformacionalmente correctas. Los VLPs son estructural y antigénicamente muy similares a los viriones auténticos, y la inmunización con los VLPs de L1 inducen anticuerpos dirigidos a epítopes conformacionales que se exponen en la superficie viral de las cápsides [140]. Numerosos estudios sero-epidemiológicos se han llevado a cabo usando VLPs como antígenos para pruebas de ELISA [141]. Sin embargo, la baja sensibilidad de los ensayos y la gran variabilidad del intervalo entre la infección y la seroconversión sugieren que la respuesta de anticuerpos en suero aún no es útil en el diagnóstico, aunque sí de valor como marcador de infección pasada o presente por VPH en estudios de poblacionales.

#### *Prevalencia de anticuerpos anti-VPH-VLP*

Después de una infección por VPH, aproximadamente el 50% de las mujeres desarrollan una respuesta sistémica humoral inmune dirigida en su mayoría a la proteína mayor de la cápside viral, la cual es detectable con un ensayo ELISA con VLP [142]. Los niveles de anticuerpos neutralizantes en suero después de una infección por VPH natural, aún en títulos pico, son bajos [143]. Esto puede ser debido a que las titulaciones descienden a través del tiempo en los individuos infectados y probablemente refleja el ciclo infeccioso exclusivamente intraepitelial (la ausencia de

viremia), así como la producción de partículas virales en las células epiteliales superficiales, distantes de las APC y los macrófagos patrulleros. Estos factores limitan la respuesta al antígeno, transporte a los nódulos linfáticos, y presentación a las células B y T vírgenes.

Numerosos estudios reportan que la seroprevalencia de anticuerpos a VLPs de VPH-16 dentro de mujeres con citología normal infectadas, varía de un 46- 59% [144]. Studentsov y cols. en el 2003 reportaron que la seroprevalencia de IgG anti - VLPs de VPH-16 fue de 55% entre mujeres con DNA VHP-16, 33% entre aquellas con tipos relacionados a éste, mientras que 19% con otros tipos de VPHs [145]. En este estudio se sugiere que el desarrollo de anticuerpos a un nivel detectable después de una infección natural puede ser un proceso lento, que no ocurre en todas las mujeres necesariamente [143, 146-148]. Un año después, Ho y cols. en el 2004 reportaron que los sujetos infectados con VPH-16 y sus tipos relacionados (VPHs 31, 33, 35, 52 y 58) tienen mayor probabilidad de presentar anticuerpos que aquellos que son infectados por VPHs de otro tipo. Las probabilidades de presentar anticuerpos en sujetos infectados por VPH-16 y VPHs relacionados al 16 se incrementan por una carga viral alta al igual que por la persistencia [58].

Existen también otros estudios que evalúan la seroprevalencia en diferentes grupos, por ejemplo, ésta fue del 13% en mujeres vírgenes según un estudio realizado en Korea del Sur [149] y del 8% en población abierta de España [150]; hasta del 61.6% en prostitutas en comparación con el 10.4% de la población en general [150] y del 46% en un grupo de adolescentes norteamericanas sexualmente activas [147].

Determinar si la respuesta confiere protección contra una re-infección con el mismo u otro tipo relacionado de VPH es importante para el entendimiento de la historia natural de la infección y tiene implicaciones para la transmisión de VPH y para la eficacia de las vacunas. Un estudio poblacional grande prospectivo de VPH en la provincia de Guanacaste, Costa Rica, no pudo demostrar que los anticuerpos en suero contra VPH 16, 18 o 31 provocados por una infección natural estuvieran asociados con protección inmune contra re-infección con VPH de tipos homólogos o heterólogos [151, 152]. En 1996 Lehtinen y cols. a través de un estudio de casos y controles, determinaron que la presencia anti-VLPs se asocia con un aumento en el riesgo de desarrollar CaCU [153]. Recientemente en el 2007, el estudio realizado por Sitas y cols, coincide con los

estudios anteriores y sugiere que los valores altos de los anticuerpos contra VPH-16 indican una relación directa con la carga viral y la persistencia, lo que se traduce en un incremento en el riesgo a desarrollar CaCU [154]. Sin embargo, un estudio en mujeres de universidad en Estados Unidos de América demostró que la presencia sostenida de anticuerpos contra VPH 16 estaba asociada con un riesgo reducido de una infección subsecuente con VPH 16 y tipos genéticamente relacionados [155]. La comparación directa entre estos estudios es difícil, debido a las características demográficas de las poblaciones, definición del estado inmune, duración del seguimiento y diferencias en los métodos de análisis empleados.

#### *Anticuerpos y HLA*

Estudios sobre HLA clase II y CaCU han demostrado que los alelos DQB1\*030X [156] y el haplotipo DRB1\*1501/DQB1\*0602, que se encuentra en desequilibrio de ligamiento, parecen contribuir un riesgo elevado para el desarrollo de neoplasia intraepitelial. Por otro lado, el haplotipo más comúnmente asociado con disminución en el riesgo para desarrollar la enfermedad es el DRB1\*1301-5/DQB1\*0603 [157]. Sin embargo, debido a que la presentación antigénica es el paso más importante para montar la respuesta inmune, el estudio de los alelos HLA y su relación con la producción de anticuerpos es de suma importancia. La producción de IgG contra VLP-L1 se estudió en el trabajo publicado por Grujil y cols., en el cual se demostró que se favorece su producción en las mujeres con los alelos HLA DRB1\*0101/DQB1\*501 [158].

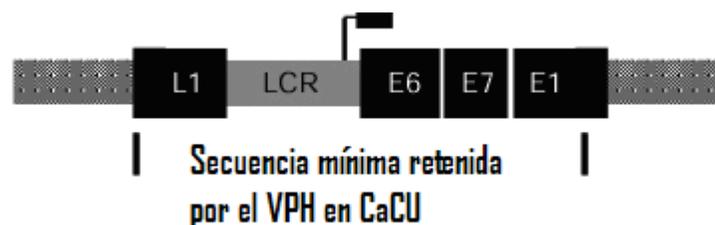
#### *Factores que se involucran en la producción de anticuerpos*

Los estudios de seguimiento han demostrado que la seroconversión ocurre de 6 a 18 meses después de la detección de DNA-VPH. Anticuerpos Anti – VLP son raramente observados en pacientes con VPH transitoria [159], pero éstos son asociados con VPH persistentes. Los anticuerpos pueden persistir varios años y pueden ser un indicador, ya sea de infección pasada o actual. Se ha demostrado que un número elevado de parejas sexuales incrementan el riesgo de seroconversión [150, 154]. El consumo de tabaco también ha sido documentado. Comparando con no fumadoras, existe 2.8 veces más riesgo de seroconversión en las fumadoras [58]. Y por último, la edad, que en el estudio poblacional de Guanacaste en Costa Rica de seguimiento a la seroconversión por medio de ELISA, determinó que es mayor en mujeres de 18-24

años y declina con el incremento de la edad [152]. En el estudio de Sitas y cols., realizado en el 2007, se determinó que la seroconversión es más común en mujeres de 18-34 años [154].

### **1.2.8.6 Ensayos con otras proteínas virales como antígenos**

Los VLPs han sido utilizados en los ensayos ELISA en gran manera, pero se sabe que la producción de viriones activos se limita a las etapas iniciales de la enfermedad, por lo tanto, la producción de anticuerpos contra esta fracción proteica puede disminuir e incluso cesar al descender la exposición antigénica y presentación del mismo. Conforme la infección progresa ocurren cambios en la expresión de las proteínas virales (véase figura 10). Las proteínas E4, L1 y L2 se localizan tanto en el citoplasma como en el núcleo y se expresan a niveles importantes, pero sólo en los queratinocitos bien diferenciados, los cuales son rápidamente descamados del epitelio, impidiendo su adecuado reconocimiento por el sistema inmune [155]. Conforme la infección va progresando, el DNA episomal del virus se integra al DNA de la célula huésped y una parte del genoma viral (genes E5, E4 y E2) es excluido al integrarse. La integración de los virus resulta en la disrupción del gen L1 y la consecuente producción de la proteína codificada por éste [132].



**Figura 10. Secuencia mínima retenida por el VPH en CaCU.** Conforme la infección por el VPH avanza, el DNA episomal del virus se integra al DNA de la célula huésped, en este proceso se excluyen algunos de los genes virales, como los son E5, E4, E2 y otros pueden ser interrumpidos, como el gen L1.

Modificado de <http://www.bioscience.org/2002/v7/d/munger/fig3.jpg>

Por lo tanto, la producción de anticuerpos en contra de las proteínas de la cápside puede disminuir y éstos pueden ser producidos en contra de otras fracciones virales dependiendo del estadio de la infección, por ejemplo en contra de las proteínas E6 y E7 en CaCU. Se ha aceptado que estas últimas proteínas son producidas en grandes cantidades en células cancerosas. Consecuentemente los anticuerpos anti-E6 y anti-

E7 se han asociado con progresión de la enfermedad y su detección es óptima en pacientes con CaCU [160, 161]. Estos resultados han sido confirmados usando péptidos sintéticos, y proteínas traducidas *in vitro* o de sistemas de baculovirus/células de insectos. Los estudios que usan las proteínas recombinantes muestran que los anticuerpos anti-E6 y anti-E7 se detectan en el 50-60% de los pacientes con CaCU [162-164] y su ausencia en población sin cáncer sugiere que estas proteínas no se expresan en cantidades suficientes o que no se encuentran en el sitio apropiado para ser reconocidos por el sistema inmunológico durante la infección primaria o latente [162]. También se ha comprobado que la ausencia de estos anticuerpos no parece estar asociada con la existencia de variantes antigénicas [165].

La seroreactividad a la región inmunodominante de la proteína E7 de VPH 16 fue examinada usando un ELISA en un estudio de una cohorte longitudinal de mujeres que inicialmente presentaban infección por VPH con leve o moderada discariosis [166]. Durante el seguimiento, la cohorte se dividió en aquellos que eliminaron la infección, aquellos que tuvieron una infección fluctuante y aquellas que tuvieron una infección persistente. Los títulos más altos y el número más alto de respondedores fueron encontrados en aquellos que eliminaron la infección, pero pacientes con infección persistente fueron seronegativos. Un análisis interesante de las subclases de IgG mostró que la IgG2 fue dominante en pacientes que eliminaron la infección mientras que las IgG1 e IgG2 fueron producidas por igual en pacientes con carcinoma invasivo, sugiriendo que la eliminación está asociada con una respuesta celular o una respuesta Th1, y la progresión involucra un cambio a la respuesta Th2 [167].

En otro estudio realizado en México por Rosales y cols. se encontró que los niveles de anticuerpos contra las proteínas de VPH 16 E2, E6 y E7 son mayores (66%, 52% y 36% respectivamente) en mujeres con infección por VPH y anormalidades citológicas, que en mujeres no infectadas y sin anormalidades citológicas. Después de un seguimiento a los 6 y 12 meses se encontró un decremento muy leve en los niveles de anticuerpos anti- VPH E2, E6 y E7 [168]. Sin embargo, el valor pronóstico de la detección de anticuerpos es muy limitada [169], algunos estudios demuestran que la producción de los mismos contra las proteínas E6 y E7 no contribuyen en la regresión de las lesiones [170].

Por otra parte, la detección de anticuerpos en contra de las proteínas E2 y E4 ha sido posible gracias a su exitosa producción en los nuevos sistemas de expresión. Ha sido posible detectar anticuerpos contra la proteína E2 en 2/3 de sujetos infectados con VPH. Un estudio que uso la proteína E2 derivada de baculovirus en un RIPA (ensayo de radioinmunoprecipitación, de sus siglas en inglés RadioImmuno Precipitation Assay) indicó que existe una correlación entre la detección de anti-E2 IgA y la severidad de las lesiones, aunque estos anticuerpos desaparecen a través del curso de la evolución de la neoplasia [171]. Las respuestas a la proteína E2 de virus de alto riesgo ha sido reportada en otros estudios [172], aunque la significancia de estos estudios, muchos de los cuales son basados en péptidos, es difícil de evaluar.

Debido a que existe una fuerte sobre-regulación de la producción de E4 a través del ciclo viral, se ha propuesto que los anticuerpos anti-E4 sean un marcador de replicación viral [173]. No obstante, los resultados han sido inconsistentes con algunos estudios revelando porcentajes de aproximadamente 40% de positividad anti-E4 en sujetos infectados [174].

Di Bonito y cols. en el 2006 desarrollaron una nueva técnica ELISA basada en cinco proteínas (L1, L2, E4, E6 y E7) desnaturalizadas recombinantes de VPH. En este ensayo la detección de anticuerpos en suero de pacientes con infección con VPH fue positiva en aproximadamente el 89% de los mismos, con este método es posible detectar la producción de anticuerpos con mayor sensibilidad y para múltiples virus, debido al uso de proteínas desnaturalizadas que muestran epítopes lineales [175].

#### **1.2.8.7 Reacción cruzada en los ensayos**

Se ha descrito que la respuesta inmune humoral despierta la producción de anticuerpos específicos, la inmunización con VLPs de VPH genera predominantemente anticuerpos tipo-específico [176]. La primera prueba desarrollada para probar los anticuerpos neutralizantes fue basada en un sistema xenógrafo de ratón [177, 178]. Sin embargo, el número de tipos de VPH que se han podido crecer con éxito es muy limitante y la técnica consume mucho tiempo. La segunda forma de medir los anticuerpos neutralizantes es generar pseudoviriones y medir *in vitro* la inhibición de la transferencia y expresión de genes debido a los pseudoviriones. Existen diversos

métodos para producir los pseudoviriones [179, 180], algunos de las cuales son fácilmente aplicables a diferentes tipos de VPHs.

Por medio de estos ensayos se ha logrado determinar que los únicos VPHs que comparten epítopes neutralizantes son los VPHs 6 y 11 [181], VPHs 16, 31, 33 y 58 y los VPHs 18, 39, 59 y 45 [182]. Sin embargo, la neutralización cruzada inducida por los anticuerpos producidos ante estos epítopes, puede ser muy baja como para conferir protección [183, 184].

### **1.2.9 Vacuna**

#### *Vacunas Profilácticas*

Como se sabe, la infección por VPH es la infección viral de transmisión sexual más común [185]. La infección persistente (definida como la presencia del mismo tipo viral en un intervalo de 6 meses o mayor) con VPH-AR, especialmente el 16 y 18, es el factor de riesgo más importante de progresión a lesiones de alto grado, las cuales tienen que ser tratadas para prevenir el desarrollo de un cáncer invasivo. La identificación de un agente viral, como el VPH, como causa de CaCU implica que es posible una intervención profiláctica o terapéutica en contra del agente que lo causa. Se han desarrollado exitosamente antivirales para el tratamiento de algunas infecciones virales, como el VIH y la influenza, lamentablemente no se logrado para virus como el VPH. Aunque existen en desarrollo algunas vacunas terapéuticas contra VPH, ninguna hasta el momento ha sido efectiva clínicamente en gran manera.

El desarrollo de vacunas profilácticas frente al VPH representa uno de los avances más importantes en la prevención primaria del CaCU. La vacuna frente al VPH es la segunda, después de la hepatitis B, que se incorpora al grupo de vacunaciones para la prevención de un tipo de cáncer.

Las vacunas que se encuentran en la actualidad en el mercado están formadas de cápsides compuestas de la proteína L1. Esta se encuentra en su forma nativa y está ensamblada como un multímero, siendo esta conformación necesaria para la generación de anticuerpos. La producción de proteínas L1 ha sido lograda gracias a la inserción del gen L1 en vectores de expresión, como los baculovirus recombinantes

para la expresión en células de insectos, o plásmidos para expresión en levaduras. En estas células, las proteínas expresadas se auto ensamblan en VLPs. El VLP de L1 tiene una conformación correcta y morfológicamente idéntica al virión de VPH, además carece de DNA. Cuando las VLPs se introducen a las células, la proteína L1 es procesada a través de la vía de las moléculas del MHC-I. De esta forma se induce una respuesta de linfocitos T citotóxicos. La respuesta celular T a los VLPs ha sido medida por linfoproliferación y ensayos de citocinas [186, 187] . La IgA se produce en las superficies mucosas y previene la ocurrencia de la infección. La IgG es la clase de anticuerpo más importante para la neutralización directa de las partículas virales en suero y otros líquidos corporales. Los anticuerpos generados por estas vacunas de VLPs son esencialmente de tipo IgG, y no de IgA. No obstante, la IgG parece llegar en cantidades suficientes a la mucosa por exudación desde el torrente sanguíneo [188].

La generación actual de vacunas de VLP contiene solo dos de los virus de alto riesgo, VPH 16 y 18. A continuación se da una breve descripción de las vacunas utilizadas actualmente en la prevención de la infección por VPH:

- *Gardasil (Merck y Co. Inc.)*. Vacuna tetravalente aprobada en Estados Unidos de América en Junio del 2006 y en Junio del 2007 en México. Cada dosis contiene VLPs de los tipos 16, 18, 6 y 11. Los VLPs son adsorbidos en un adyuvante que contiene aluminio. La vacuna se debe almacenar en refrigeración (2-4 °C). Se administra intramuscularmente como tres dosis separadas de 0.5 mL, al tiempo 0, al mes 2 y al 3. Los protocolos realizados muestran un 100% de efectividad (IC= 80.9%–100%) para la prevención de CIN 2/3 o adenocarcinoma causado por VPH 16 o 18 [189].
- *Cervarix (Glaxo Smith Kline)*. Vacuna bivalente aprobada por La Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) a finales de Octubre del 2007 en México. Esta diseñada para prevenir la infección de los tipos 16 y 18 del VPH y se encuentra adyuvada con AS04 (hidróxido de aluminio / monofosforil desacilado). Adicionalmente, se observó que esta vacuna ofrece protección contra las lesiones precancerosas causadas por los tipos 31, 45 y 52. Al igual que Gardasil se administra en tres dosis. Los estudios de seguimiento han demostrado que la vacuna es eficaz en 100% para prevenir CIN 2/3 (IC= 95%) o adenocarcinoma causado por VPH 16 o 18, habiendo sido el período de seguimiento de 4.5 años.[189]

*Vacunación de mujeres sexualmente activas mayores de 25 años.* La vacunación de mujeres sexualmente activas mayores de 25 años se justifica porque existe un segundo pico de aumento en la incidencia de infección por VPH hacia los 35-55 años de edad [137], cuando la mujer es más susceptible a padecer una infección persistente. Este hecho se explica por la disminución de la inmunidad en esta edad que permitiría la reactivación de una infección que habría permanecido indetectable hasta ese momento, o más probablemente, por un cambio de los hábitos sexuales que generen una nueva situación de riesgo de adquisición de la infección [137]. Sin embargo, la eficacia de la vacunación a esta edad es, probablemente, mucho menor, por la elevada proporción de mujeres que presentan inmunidad espontánea para el VPH. Se calcula que a los 2-3 años de iniciadas las relaciones sexuales, la prevalencia acumulada de infección por VPH podría alcanzar el 50-82% [190]. Las vacunas que se encuentran en el mercado deben ser aplicadas solamente como profilácticas, según lo recomienda la Sociedad Americana de Cancerología [189]. Estudios como el realizado en 2,189 mujeres de Costa Rica, indican que la aplicación de la vacuna en mujeres con previa infección por VPH no acelera su eliminación y demuestra que ésta no debe ser usada como una vacuna terapéutica [191].

Los anticuerpos generados por las vacunas al parecer son tipo específicos [192, 193]. Así, la inmunización por VLPs L1 de VPH 16 se esperaría protegiera contra la infección por VPH 16 pero no contra otros tipos de VPH. La generación actual de vacunas de VLP contiene solo dos de los virus de alto riesgo, VPH 16 y 18. VPH 16 es responsable de 50-60%, y VPH 18 del 10-12% de los casos de cáncer, así que, en el mejor escenario, si se cubriera el 100% de la población blanco, aproximadamente el 70% de los CaCU se pueden prevenir a menos que las vacunas induzcan una protección cruzada significativa con otros tipos de VPH oncogénicos.

Los VLPs han mostrado ser exitosos en inducir una respuesta innata y celular [194]. En un estudio se observó reactividad cruzada [195], implicando que los epítopes de la célula T cooperadora son conservados serológicamente entre los distintos genotipos. Sin embargo, esto no es una observación consistente, ya que la reactividad cruzada de las células T a VPH L1 es general y la protección que confieren aún queda por ser demostrada. Actualmente se llevan a cabo estudios acerca de esta protección cruzada y los resultados serán publicados en un futuro no muy lejano.

*Impacto:* El objetivo principal de la inmunización frente al VPH es prevenir las infecciones naturales. Por lo tanto, es prioritario vacunar antes del inicio sexual y existe un amplio consenso respecto a la vacunación de las adolescentes. Sin embargo, la vacunación de mujeres jóvenes y grupos de riesgo es objeto de controversia. Los aspectos que se deben considerar son los siguientes: 1) Exposición previa de las mujeres a los tipos de VPH incluidos en la vacuna.

2) Beneficio y seguridad de la vacuna en las mujeres infectadas ya por estos tipos. 3) Impacto a largo plazo de las diferentes estrategias de vacunación. 4) Eficiencia del programa.

Si se tiene en cuenta que el CaCU es muy poco frecuente antes de los 30 años, una estrategia de vacunación dirigida únicamente a adolescentes supone el impacto del programa no se detectará hasta transcurridos 15 o 20 años. En el modelo propuesto por Brisson y cols. se hace un análisis del impacto que tendrá la vacuna en la población canadiense, se predice que la vacunación del 100% de las niñas reduciría significativamente la incidencia de verrugas genitales, lesiones intraepiteliales y CaCU. Sin embargo, los beneficios (particularmente en términos de CaCU) dependen de la duración de la protección de la vacuna, de la cual existe evidencia limitada [196]. Otros autores como Sanders y cols., utilizando el modelo de estadístico Markov, proponen que el riesgo de CaCU será reducido de un 20% a un 66%, dependiendo de la duración de la protección de la vacuna [197]. El estudio de Fraser y cols. acerca de la respuesta inmune a largo plazo a la vacuna de VPH, utilizando un modelo de recaída de anticuerpos, indica que después de las tres dosis en mujeres de 16 a 23 años, los niveles de anticuerpos se mantendrán arriba de los inducidos por una infección natural por 12 años, y arriba de los niveles detectables por 32 años. En el mejor escenario, la vacuna podría estar protegiendo a todas las adolescentes al menos por 32 años, aunque se ha propuesto que la exposición con los VPHs podría actuar como un estímulo que puede aumentar los niveles de anticuerpos.

Además de las vacunas profilácticas, en la actualidad se encuentran en desarrollo numerosas vacunas terapéuticas, de las cuales se hace una breve descripción en el anexo 9.

### **1.3 Justificación**

En países desarrollados se ha logrado disminuir la incidencia y mortalidad por CaCU, gracias a programas de detección oportuna. En nuestro país se ha establecido igualmente un programa de esta índole, sin embargo, las tasas de incidencia y mortalidad por esta neoplasia continúan siendo relevantes.

La infección con el VPH es muy común en mujeres que han iniciado su vida sexual. La introducción al mercado de dos vacunas contra el VPH ha traído consigo grandes expectativas, esperándose una baja en las tasas de incidencia de CaCU a largo plazo. Lamentablemente, la vacunación de mujeres que han sido expuestas anteriormente y/o infectadas por VPH no aporta ningún beneficio, existiendo evidencia de que la vacuna no tiene efecto terapéutico [191] y debe ser administrada solo como profilaxis. Esto trae como consecuencia que un gran número de mujeres queden desprotegidas aún y con la introducción de la vacuna.

Debido a que se desconoce mucho acerca del papel de la inmunología humoral y dentro de ésta la asociación de los anticuerpos y la eliminación/progresión de la infección, el abordar nuevas técnicas de monitoreo y diagnóstico temprano es de gran importancia para enfrentar este mal. Gracias a la conjunción de los esfuerzos de nuestro grupo en la Facultad de Medicina de la UANL, su Hospital Universitario y la Secretaría de Salud, se ha logrado dar seguimiento a un número importante de mujeres infectadas en el 2002, todas residentes del área metropolitana de Nuevo León, de las cuales se cuenta con información epidemiológica, clínica, estudios de gabinete y especímenes biológicos almacenados. Resulta muy interesante evaluar en este extraordinario grupo de mujeres, cual es el papel que tienen los anticuerpos en la persistencia viral y en la progresión de lesiones.

La identificación de anticuerpos en suero y su relación con la persistencia y la progresión a lesiones sería una herramienta que aunada a las técnicas tradicionales (papanicolaou y colposcopia) y moleculares (captura de híbridos, PCR y secuenciación) ayudaría a detectar a la población con mayor riesgo para desarrollo de lesiones.

## **CAPÍTULO II. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo general**

Detectar anticuerpos anti-VPH en sueros recolectados a partir de un grupo de mujeres reclutadas en el 2002 con una prueba de detección de VPH positiva, a las cuales se les está dando seguimiento integral, con el objetivo de determinar si existe asociación entre la presencia de dichos anticuerpos y la persistencia o eliminación de la infección.

### **2.2 Objetivos específicos**

- 1) Investigar la presencia de anticuerpos anti-VPH en la población de estudio.
- 2) Determinar si la presencia o ausencia de anticuerpos se asocia con la persistencia viral.
- 3) Evaluar si existe relación entre la producción de anticuerpos y los alelos HLA presentes en la población estudiada.

## CAPITULO III. MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Origen de las muestras biológicas

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Genómica y Bioinformática del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la UANL, en conjunto con el Departamento de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, el área de Salud Reproductiva de la Secretaria de Salud del Estado de Nuevo León y el Centro Universitario contra el Cáncer. Además, contó con el apoyo de la Universidad de California en Irvine, que contribuyó con la tecnología de microarreglos para la detección de anticuerpos.

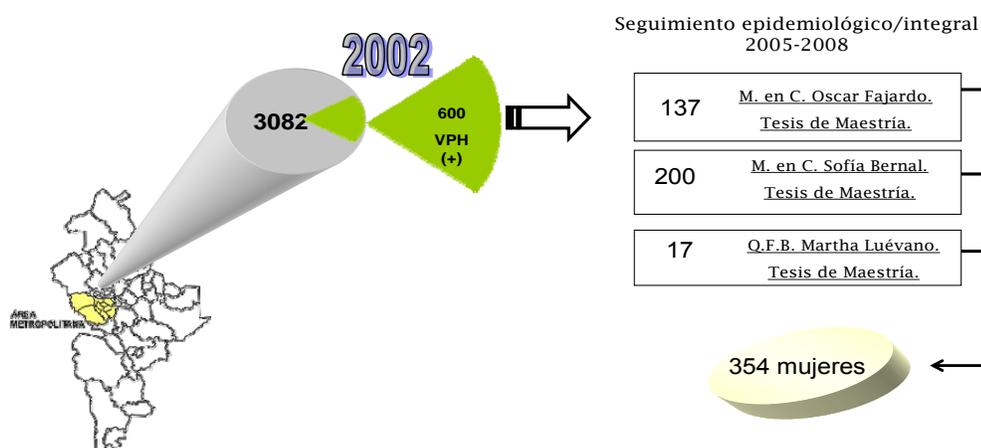
#### 3.1.2 Grupos de estudio y sus características

El presente trabajo inició con un valioso grupo de estudio reclutado en el área metropolitana de Nuevo León al que denominamos “Seguimiento”, este grupo de mujeres es de particular interés ya que se cuenta con un punto de referencia muy importante, en un principio todas las participantes estuvieron infectadas con VPH. A través del tiempo y gracias al seguimiento que se ha logrado dar, hemos podido observar muy de cerca la historia natural de la infección, algunas de ellas lograron eliminar el virus mientras otras no, esto nos permite investigar, entre otras cosas, cuales son los factores del huésped que determinan el desenlace de la infección. Con el objetivo de comprobar los hallazgos epidemiológicos, moleculares y serológicos que condicionan la persistencia viral, nos propusimos formar un grupo de estudio constituido por mujeres con lesiones ya establecidas (anormalidades citológicas), grupo denominado “Lesiones”, éste sirve como una referencia debido a que esta reportado que las lesiones son producidas por la persistencia viral. Este último grupo fue formado en colaboración con el Servicio de Ginecología del Hospital Universitario “José Eleuterio González”.

##### *# 1. Grupo de estudio de “Seguimiento”.*

En el 2002 se realizó un estudio de prevalencia de VPH en población abierta con la ayuda de la Secretaría de Salud del estado de Nuevo León. Se logró reclutar a poco más de 3000 mujeres aparentemente sanas a las cuales se les realizó una prueba de Papanicolaou, una pequeña encuesta y la detección molecular de VPH. De este

enorme grupo estudiado, 600 mujeres resultaron ser positivas para VPH. Este grupo de 600 mujeres es de gran valor, ya que es posible mediante seguimiento, observar las características genéticas, moleculares y serológicas además de los cofactores de riesgo ambientales y epidemiológicos que permiten, ya sea el establecimiento de la infección o la eliminación de la misma. Gracias a un enorme esfuerzo, entre el año 2005 y 2008 se logró el seguimiento de 354 mujeres, de las cuales se cuenta con muestras de suero, estudios de colposcopia, papanicolaou y cepillado cervical a partir del cual se hizo la detección de VPH (figura 11). A cada mujer se le explicó ampliamente en lo que consiste el proyecto de investigación y se les pidió que leyesen y firmasen la hoja de consentimiento informado (anexo 11).



**Figura 11. Historia del estudio.** En el 2002 se realizó un estudio de prevalencia de VPH en mujeres sanas voluntarias del área metropolitana de Nuevo León, resultando 600 de ellas positivas para la infección. Desde el 2005 se ha venido dando el seguimiento a estas mujeres, lográndose reclutar a la fecha 354 de las mismas.

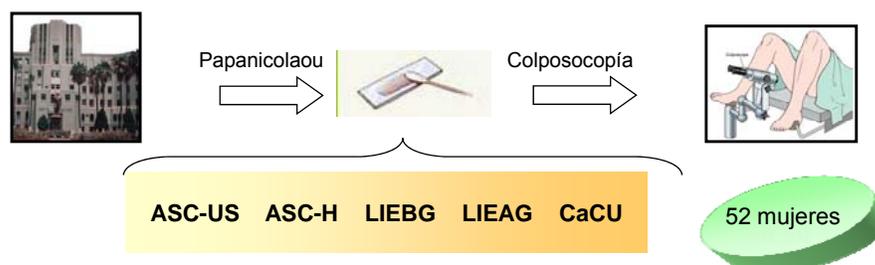
o *Características del grupo de estudio*

Se trata de un estudio observacional, prospectivo, de casos y controles anidados a una cohorte, transversal y comparativo. Las mujeres serán agrupadas de acuerdo a la persistencia/eliminación del virus, a su vez, cada grupo será estratificado de acuerdo a la presencia o no de lesiones. En este grupo de mujeres podremos observar cuales son los factores que se involucran en la persistencia de la infección, incluidos dentro de los mismos la presencia de anticuerpos anti-VPH en suero. En el cuadro 7 se resumen los criterios de inclusión y exclusión del grupo de estudio.

**# 2. Grupo de estudio de "Lesiones".**

El grupo de estudio "Lesiones" fue reclutado en el Hospital Universitario "José E.

González” a partir de septiembre del 2007. Este grupo incluye mujeres con sospecha de lesiones, ya sea de bajo o alto grado diagnosticadas por Papanicolaou, referidas al Servicio de Colposcopia del mismo Hospital (figura 12). A cada mujer se le explicó ampliamente en lo que consiste el proyecto de investigación y se les pidió que leyesen y firmasen la hoja de consentimiento informado (anexo 11).



**Figura 12. Grupo de estudio “Lesiones”.** A partir de septiembre del 2007 se inició el grupo de estudio “Lesiones”, en el que se incluyen todas aquellas mujeres que presentaron alguna lesión en su examen de Papanicolaou y que posteriormente son referidas al servicio de colposcopia del Hospital Universitario.

o *Características del grupo de estudio*

Se trata de un estudio observacional, prospectivo, transversal y comparativo. Las mujeres fueron agrupadas de acuerdo al grado de lesión presentada. Este grupo de estudio nos sirvió para comprobar los patrones de anticuerpos anti-VPH obtenidos en el grupo de seguimiento, ya que las lesiones son causadas por la infección persistente de VPHs de alto riesgo [49], estas pacientes deben de mostrar patrones parecidos a las mujeres persistentes del grupo de seguimiento. En el cuadro 7 se resumen los criterios de inclusión y exclusión del grupo de estudio.

Cuadro 7. Criterios para el diseño experimental de los grupos a estudiar.

INCLUSIÓN		EXCLUSIÓN	ELIMINACIÓN
“Seguimiento”			
Casos (infección persistente)	Control negativo (infección transitoria)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mujeres embarazadas.</li> <li>Mujeres con VIH/SIDA.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>DNA insuficiente o de mala calidad</li> <li>Suero hemolizado</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>VPH (+) en el 2002.</li> <li>VPH (+) en la actualidad con el mismo tipo viral que en el 2002.</li> </ul>	Control positivo Mujeres con resultado de citología anormal, incluyendo: ASC-US, ASC-H, LIEBG, LIEAG y CaCU.		

### **3.1.3 Materiales de laboratorio**

Los tubos de microcentrifuga (de 0.2, 0.5, 1.5 y 2.0 ml) así como las micropipetas de precisión de volumen de 2, 10, 20, 200 y 1000  $\mu$ l fueron adquiridos de Eppendorf Corporation (Westbury, Ny, EUA). Los tubos cónicos de polipropileno (15 ml), guantes de látex y puntillas utilizados fueron adquiridos en Cell Associates (Houston TX, EUA).

Los cepillos vaginales y tubos vacutainer se adquirieron en DM (Distrito Federal, Mex.) y Becton Dickinson and Company (Pine Brook, NJ, E.U.A), respectivamente. Las criocajas de polipropileno se adquirieron en Daigger Lab Equipment and Supplies, (Foster City, CA, E.U.A).

### **3.1.4 Reactivos de laboratorio**

#### *Detección de VPH*

Para la conservación de las muestras se utilizó el reactivo PreservCyt adquirido de Cytec Corporation, (Boxborough, MA, E.U.A). Para el aislamiento de DNA se utilizó EDTA, SDS, NaCl, Tris-EDTA, fenol y acetato de amonio, comprados en Sigma Chemical Company (Saint Louis, MO, E.U.A). Los solventes orgánicos (cloroformo, etanol e isopropanol), así como el ácido acético fueron de la marca Merck (Monterrey, Mex.). La enzima Proteinasa K fue adquirida de Roche Diagnostics Corporation (Indianapolis, IN, EUA). Para las reacciones de PCR, el amortiguador de reacción, el cloruro de magnesio y las enzimas GoTaq y Taq Gold DNA polimerasas fueron de Promega (Madison, WI, E.U.A). Para la detección de VPH se utilizó el estuche de detección Amplicor VPH adquirido en Roche Inc. Molecular Systems (Alameda, CA, E.U.A.)

Para la electroforesis en gel de agarosa se utilizó agarosa, Tris-EDTA, ácido bórico, azul de bromofenol, xilencianol y bromuro de etidio de Sigma Chemical Company.

Para llevar a cabo la clonación de los productos amplificados se utilizó el estuche comercial TOPO TA cloning de Invitrogen (Carlsbad, CA, E.U.A), así como las células calciocompetentes TOP 10 de la misma compañía. La peptona, extracto de levadura, agar y cloruro de sodio se adquirieron en Spectrum CTR (Monterrey, Mex.).

Para la purificación de los productos amplificados o clonados se utilizaron las enzimas *SAP* y *ExoI* distribuidas por la compañía USB (Cleveland, OH, E.U.A.). La reacción de secuenciación se realizó utilizando el estuche comercial ABI PRISM<sup>®</sup> BigDye<sup>™</sup>. Terminator Versión 3.1 de la compañía Applied Biosystems (Foster City, CA, E.U.A.). Para la precipitación de los productos secuenciados se utilizó acetato de sodio y etanol de la compañía Sigma.

#### DetECCIÓN DE ANTICUERPOS

El amortiguador bloqueador de proteínas utilizado para la dilución de las muestras y el bloqueo de las muestras fue adquirido de Whatman Schleicher & Schuell (Saint Louis, MO, E.U.A), al igual que los cámaras de incubación y vidrios de impresión para los microarreglos.

Los anticuerpos adquiridos de la compañía Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, E.U.A) fueron: Anti IgG cabra (cadena pesada y ligera) conjugado con biotina y producido en conejo, Anti IgG humano (cadena pesada y ligera) conjugado con biotina y producido en cabra. De Martek (Columbia, MD, E.U.A) el conjugado de StreptAvidina SensiLight PBXL-3 (Fluor Cy5).

#### **3.1.5 Equipo de laboratorio**

En el aislamiento de DNA se utilizó una microcentrífuga modelo 5412, un Thermomixer modelo 5436, y una centrífuga modelo 5702 R, todos adquiridos de la compañía Eppendorf (Hamburgo, Alemania), además de una balanza analítica Adventure SL AS313 de la compañía Ohaus Corporation (Pine Brook, NJ, E.U.A.). La cuantificación fue realizada en el Biofotómetro marca Eppendorf.

El termociclador utilizado fue el Mastercycler gradient de la compañía Eppendorf. Para el análisis de los productos amplificados por la PCR se utilizó la cámara de electroforesis horizontal de CBS Scientific Company (Del Mar, CA, E.U.A.) y una fuente de poder Gibco-BRL modelo 250 (Gaithersburg, MD, E.U.A.).

Los geles fueron visualizados y fotografiados con un Fotodocumentador marca Gel Doc modelo 1000 de Bio-Rad (Hercules, Ca, E.U.A.).

Para la detección de anticuerpos se utilizó el escáner confocal de láser ScanArray 4000 (GSI Lumonics, Billerica, MA) y para su cuantificación el software QUANTARRAY de la misma compañía. El procesamiento de los datos fue realizado en la computadora Hp Pavillion dv6000. El procesador de texto utilizado fue *Microsoft Word 2003* (Microsoft Corporation), el de gráficos fue *Microsoft Power Point 2003* (Microsoft Corporation). Para la edición de las secuencias nucleotídicas se utilizó el programa Chromas Lite versión 2.01.

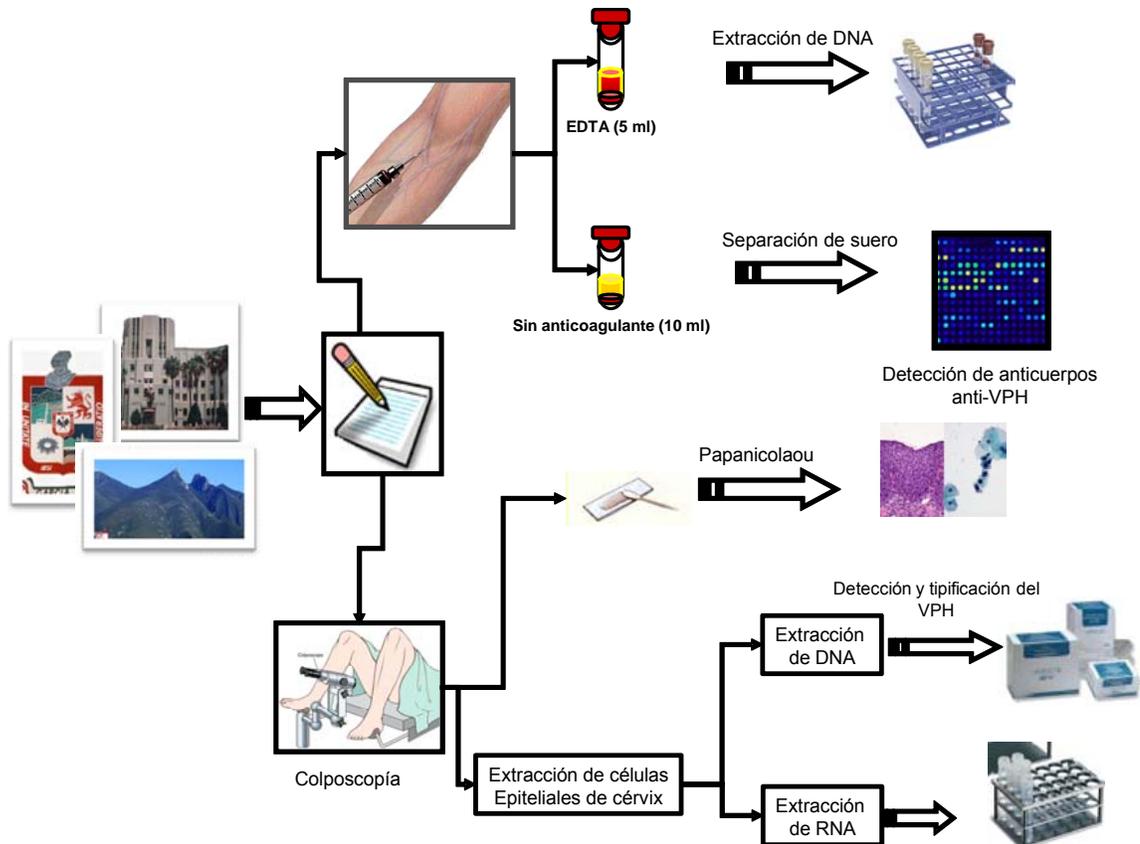
### 3.2 Métodos

#### 3.2.1 Estrategia general

La descripción de la temporalidad de las tomas de muestras para cada grupo de estudio se muestra en la figura 13. A cada una de las pacientes, una vez firmado el consentimiento informado, se les realizó una batería de estudios que se describen en la figura 14.



**Figura 13. Calendario de tomas de muestras.** Durante el período de septiembre 2007 a abril 2008, con la ayuda de la Secretaría del Estado de Nuevo León, se realizó el seguimiento a las pacientes con positividad en la detección del VPH del 2002. Durante este mismo período en el Hospital Universitario "José E. González" se inició el nuevo grupo de estudios denominado "Lesiones".



**Figura 14. Estrategia general del estudio.** Una vez localizadas las pacientes de seguimiento, se les realizaron nuevas historias clínicas y encuestas con cofactores de riesgo para CaCU. Posteriormente se obtuvieron dos tubos de sangre venosa periférica, uno de ellos con anticoagulante (EDTA) y el otro sin el mismo. A partir del tubo con anticoagulante se obtuvo el suero para la detección de anticuerpos. Finalmente se realizó una exploración ginecológica completa, en la que se incluye la colposcopia, la toma de Papanicolaou, cepillado cervical para la detección de VPV, y en caso de ser necesario biopsia. Para el caso de las nuevas voluntarias ingresadas al estudio del proyecto “Lesiones”, se aplicó la misma estrategia general.

### 3.2.2 Procedimientos para estudio epidemiológico

Para evaluar los factores de riesgos epidemiológicos y sociales a los que las pacientes han sido expuestas, se realizó una nueva encuesta a las mujeres que se vieron en los diferentes Centros de Salud de la Secretaría de Salud del Estado, así como en el Hospital Universitario “Dr. José E. González”, durante el periodo de reclutamiento (figura 13). La encuesta (anexo 11) incluía las variables descritas en el cuadro 8.

Cuadro 8. Variables epidemiológicas incluidas en la encuesta.

1. Edad	2. Estado civil
3. Grado de escolaridad	4. Ocupación
5. Número de parejas sexuales	6. Edad de inicio de vida sexual
7. Uso de métodos anticonceptivos	8. Consumo de tabaco
9. Alcohol	10. Drogas
11. Consumo de vitaminas del complejo B	12. Paridad
13. Edad al primer embarazo	14. Antecedente heredo-familiar de CaCU
15. Grado de conocimiento del estudio citológico.	

### 3.2.3 Procedimientos para estudio clínico gineco-histopatológico

A todas las pacientes se les realizó una exploración ginecológica completa con toma de citología y estudio colposcópico, el cual fue efectuado por el Servicio de Ginecología-Oncología del Departamento de Ginecología del Hospital Universitario “Dr. José E. González” y por el Servicio de Colposcopia de la Secretaría de Salud del Estado de Nuevo León. La toma de biopsia se indicó en caso de observar una colposcopia sospechosa de lesión, como podría ser: aspecto de mosaico, punteado grueso, áreas de leucoplasia de amplio grosor bordes espicados y vasos atípicos irregulares de acuerdo a la clasificación de Coppersley [198]. Todos los estudios histopatológicos se realizaron en la Facultad de Medicina de la UANL y las mujeres con lesiones, ya sea de alto o bajo grado, fueron remitidas sin demora para tratamiento.

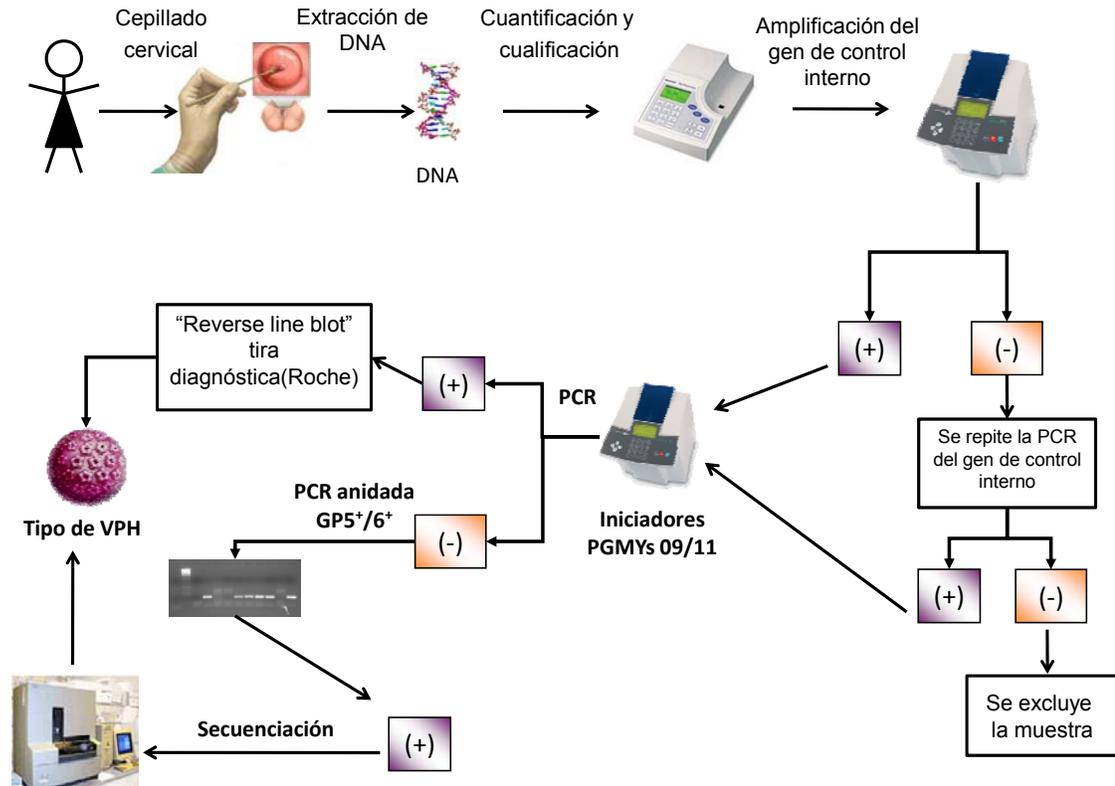
### 3.2.4 Obtención de suero

El suero fue obtenido a partir de sangre periférica venosa recolectada en tubos con anticoagulante (EDTA) el mismo día en el que se realizaron la batería de estudios. Se almacenaron seis alícuotas de 200 µl en tubos de 0.6 ml y se preservaron a -70° C hasta su uso.

### 3.2.5 Detección y tipificación de VPH

La detección y tipificación del VPH a partir de muestras de cepillado cervical se realizó en el Laboratorio de Genómica y Bioinformática del Departamento de Bioquímica y

Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la UANL. Un esquema de la metodología para la detección y tipificación del VPH se muestra en la figura 15.



**Figura 15. Esquema de rastreo, detección y tipificación del VPH.** A partir de cepillados de cérvix se realiza la extracción de DNA. Posteriormente se efectúa una cuantificación en el espectrofotómetro y visualización del DNA en gel de agarosa y se le realiza una PCR con un gen control interno para comprobar su integridad. En ausencia de amplicón, se repite la PCR y en caso de que no amplifique el gen de control interno se excluye la muestra. Una vez que se comprobó la integridad del DNA, se realiza la PCR con los iniciadores PGMYS 09/11s. Si ésta es positiva se ejecuta la hibridación en las tiras (Roche); en caso de ser negativa se realiza una PCR anidada con los iniciadores GP5<sup>+</sup>/6<sup>+</sup>; si se obtienen amplicones se secuencian para obtener el tipo viral.

A partir de las muestras cervicales colectadas en medio de conservación, se realizó la extracción de DNA con la técnica de digestión con proteinasa K, precipitación con isopropanol y resuspensión en TE (10mM de Tris-HCl, pH8 y 0.1mM de EDTA).

Para verificar el rendimiento de la extracción de DNA, éste se cuantificó en el biofotómetro y para juzgar la integridad fue corrido en un gel de agarosa al 1%. Para

comprobar su calidad para los estudios de genotipificación, se corrió una PCR con un par de iniciadores específicos para el gen de la hormona del crecimiento humano (GH) (sentido: 5'ATTAAGGGTACCGTGGACAGCTCACCTAG y antisentido: 3'CCTCGAGATATCCTAGAAGCCACAGCT) bajo las condiciones detalladas en el Cuadro 9 y el programa descrito en el Cuadro 10.

Cuadro 9. Condiciones de reacción utilizadas en la PCR para integridad del DNA.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen por reacción (µl)
Buffer	10x	1x	2.5
Mg	25mM	1.5mM	1.5
dNTPs	10mM	0.4mM	1
Primer 1	5µM	0.2µM	1
Primer 2	5µM	0.2µM	1
Taq DNA polimerasa	5U/ul	0.075 U/ul	0.5
DNA	(----	50 ng/ µl	(----
Agua MiliQ	(----	(----	(----
Volumen Final			25uL

Cuadro 10. Programa de amplificación para el gen de la hormona del crecimiento.

Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1. Desnaturalización inicial	95°C	5 min	1
2. Desnaturalización	94°C	1 min	30
3. Alineamiento	61.5°C	45 seg	
4. Extensión	72°C	1:30 min	
5. Extensión final	76°C	6 min	1

El DNA extraído de células cervicales, cuya calidad, cantidad e integridad resultaron aceptables, se usó para detectar y tipificar el VPH a partir de DNA viral, utilizando el estuche comercial "Amplicor HPV" (Roche). La detección consistió en la amplificación de la región de L1 del genoma viral de aproximadamente 450 pb, utilizando los iniciadores específicos referidos como PGMY 09/11 (Roche). Como control interno para verificar el buen funcionamiento de los reactivos de la PCR se usó el gen de la  $\beta$ -globina, con los iniciadores incluidos en el estuche comercial. Los iniciadores PGMY 09/11 consisten en un "pool" de iniciadores específicos para la detección de 37 tipos de VPH diferentes.

Las condiciones de PCR y el programa de amplificación para los estudios de VPH se muestran en el cuadro 11 y 12, respectivamente (Van der Brule y cols. 2002) [199].

Cuadro 11. Condiciones de reacción utilizadas en la PCR para detección de VPH.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen por reacción (µl)
Buffer	10x	1x	3
Mg	25mM	4mM	4.8
dNTPs	10mM	0.2mM	0.6
PGMY09	50uM	1uM	0.6
PGMY11	50uM	1uM	0.6
Taq Gold	5U/ul	0.075 U/ul	0.45
Beta glob 5'	50uM/5uM	0.05 U/ul	0.3
Beta glob 3'	50uM/5uM	0.05 U/ul	0.3
DNA	(----	400 ng	(----
H2O	(----	(----	(----
Volumen Final			30uL

Cuadro 12. Programa de amplificación utilizado para la detección de VPH.

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1. Desnaturalización inicial	95°C	12 min	1
2. Desnaturalización	95°C	1 min	40
3. Alineamiento	55°C	1 min	
4. Extensión	72°C	1 min	
5. Extensión final	72°C	5 min	1

La tipificación se llevó a cabo por hibridación reversa del producto amplificado con sondas de DNA específicas adheridas a tiras de nylon, las cuales están incluidas también en el estuche comercial previamente mencionado (Roche). La interpretación se realizó utilizando una plantilla incluida en el mismo.

Sólo fueron incluidas las muestras que resultaron positivas para  $\beta$ -globina. En los casos en que no dió positividad para la misma, se repitió el análisis con el doble de cantidad de templado y de continuar negativa, se excluyó la muestra. A las muestras positivas para  $\beta$ -globina y negativas para PGMY 09/11 (Roche) se les realizó PCR anidada utilizando los iniciadores GP5+/6+, que dan como amplicón un producto de aproximadamente 195 pb; esto para evitar resultados falsos negativos, realizándose como se menciona a continuación.

### 3.2.6 PCR anidadas para examinar resultados negativos para VPH

En todos los casos en el que la detección por PGMY resultó negativa, se procedió a realizar una PCR anidada del gen L1 del genoma viral, utilizando como templado el producto amplificado de 450 pb obtenido usando los iniciadores PGMY 09/11, para

confirmar resultados. La región del virus de interés se amplificó mediante la PCR anidada utilizando los iniciadores GP5<sup>+</sup> sentido (5'- TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC-3') y GP6<sup>+</sup> antisentido (5'-GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C-3'), bajo las condiciones de PCR y el programa de amplificación que se muestran en el cuadro 13 y 14, respectivamente [200].

Cuadro 13. Condiciones de reacción utilizadas en la PCR anidada para detección del VPH.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen por reacción (µl)
Buffer	10x	1x	3
Mg	25mM	3.5mM	4.2
dNTPs	10mM	0.2mM	0.6
GP5+	10uM	0.5uM	3
GP6+	10uM	0.5uM	3
Taq Gold	5U/ul	0.075 U/ul	0.45
DNA	(----)	0.1ul	0.1
H2O	(----)	(----)	15.65
Volumen Final			30uL

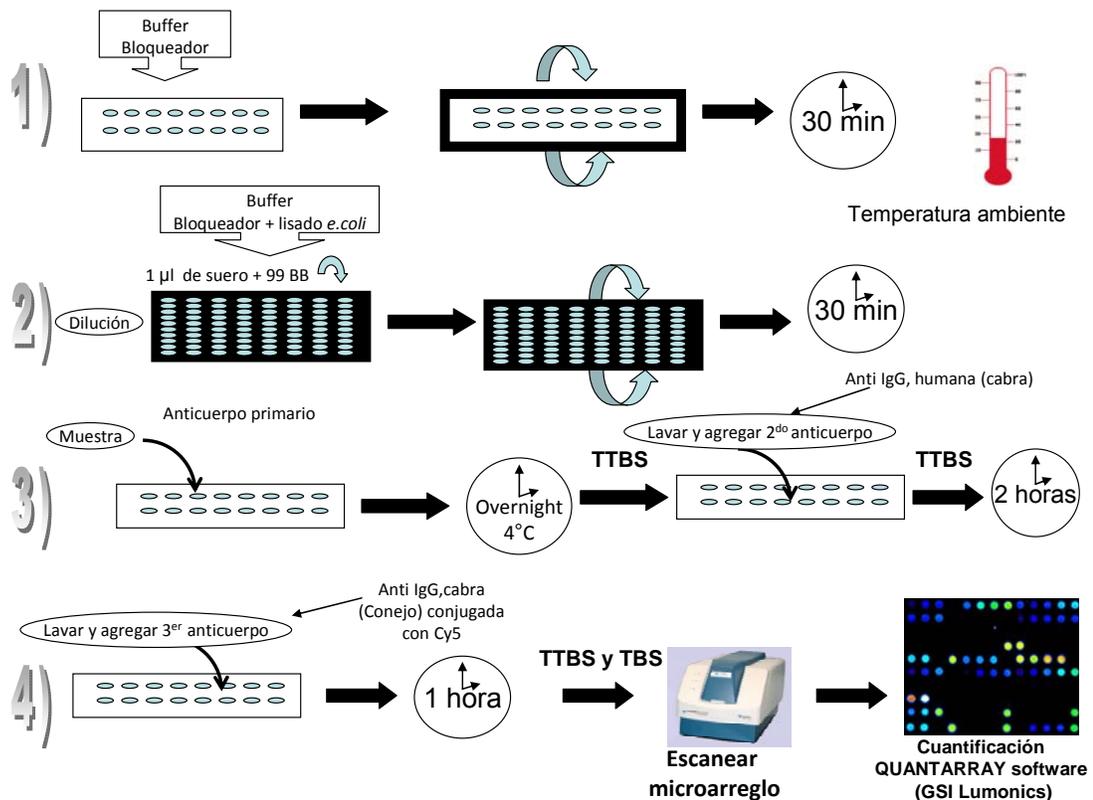
Cuadro 14. Programa de amplificación utilizado para la detección del VPH.

Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1. Desnaturalización inicial	94°C	12 min	1
2. Desnaturalización	94°C	45 seg	40
3. Alineamiento	48°C	04 seg	
4. Alineamiento	38°C	30 seg	
5. Alineamiento	42°C	05 seg	
6. Alineamiento	66°C	05 seg	
7. Alineamiento	71°C	1:30 min	
8. Extensión final	72°C	10 min	1

Las reacciones se corrieron en geles de agarosa al 2%, considerándose positivas aquellas con un producto esperado de aproximadamente 195 pb. Para la tipificación de estos virus fue necesario realizar la secuenciación del producto obtenido. En el caso de que se obtuviera una secuencia de mala calidad, se realizó la clonación del amplicón en el vector Topo de Invitrogen. Para esto último se incubó por cinco min con el vector para posteriormente incubar con células calciocompetentes por media hora y plaquear en agar con kanamicina. A las 12 horas se picaron colonias para crecerlas en medio de cultivo LB por 12-18 horas a 37°C y se realizó la minipreparación para extraer DNA plasmídico, a fin de detectar y caracterizar a los candidatos para llevar a cabo la reacción de secuenciación.

### 3.2.7 Determinación de anticuerpos

La identificación de anticuerpos en suero se realizó en colaboración con el laboratorio de Biología Molecular ubicado en la Universidad de Irvine, California, el cual desarrolló un chip (portaobjetos) con pequeñas membranas que tienen adheridas antígenos de todas las proteínas virales de 13 tipos diferentes de virus (VPHs 45, 16, 31, 18, 4, 2, 1, 8, 35, 5, 53, 11 y 6). Cada una de las laminillas contiene 16 membranas de nylon con dichas proteínas virales. Un esquema del proceso de hibridación se muestra en la figura 16.



**Figura 16. Detección de anticuerpos anti-VPH en suero.** Para la detección de anticuerpos se utiliza un microarreglo que consta de proteínas virales adheridas en membranas de nylon. El microarreglo primero es bloqueado con un amortiguador bloqueador de proteínas, en paralelo, se prepara una dilución (1:100) del suero a analizar en el mismo amortiguador. Después de 30 min de incubación, la dilución se hibrida con el microarreglo y se deja incubando toda la noche, según lo publicado por Davies y cols. Posteriormente, después de veinticuatro horas, se agrega el anticuerpo secundario y a continuación se realizan lavados con amortiguador TTBS, para finalmente agregar el tercer anticuerpo (marcado con una molécula fluorescente). El microarreglo es leído y cuantificado con un software especial.

Los pasos para la detección de anticuerpos anti-VPH en suero son los siguientes:

1. Se desliza la laminilla en una placa para la inmovilización de la misma y la delimitación y el aislamiento de cada uno de las membranas (16 por cada laminilla).
2. Se llena cada pozo con 100  $\mu$ l de amortiguador bloqueador de proteínas y se deja en agitación moderada por 30 minutos para re-hidratar los pozos. Mientras tanto, se diluyen las muestras de suero (1:100) en el amortiguador bloqueador de proteínas, que contiene 10% de lisado de *E. coli* y enseguida se incuba por 30 minutos a temperatura ambiente con agitación leve para bloquear los anticuerpos anti-*E. coli*.
3. Se remueve el amortiguador bloqueador de los pozos y se reemplaza con el suero preincubado, dejando en incubación toda la noche a 4°C con agitación leve.
4. Al siguiente día se remueve el anticuerpo primario por medio de succión a vacío de cada una de las membranas con mucho cuidado, evitando la contaminación entre las mismas, se realizan lavados con amortiguador TTBS (Tris-HCl a 20 mM, NaCl a 0.5M y Tween 20 al 0.05%). Los lavados se realizan tres veces con una duración de cinco minutos y agitación vigorosa.
5. Se realiza una dilución 1:200 en amortiguador bloqueador de proteínas del anticuerpo biotinilado secundario (Anti-humano IgG producido en cabra). Después de los lavados, se coloca el anticuerpo secundario y se incuba de 1-2 horas en temperatura ambiente con agitación leve.
6. Terminado el tiempo de incubación, se aspira el anticuerpo secundario y se realiza una serie de tres lavados por cinco minutos con TTBS.
7. Posteriormente se prepara el fluorocromo (dilución 1:200 en amortiguador bloqueador de proteínas), se añade y se incuba por una hora evitando el contacto con la luz.
8. Al término de la incubación se aspira el fluorocromo, se lava la laminilla con TTBS tres veces con agitación vigorosa.
9. Se realizan lavados con TBS (Tris-Hcl a 20 mM, NaCl a 0.5M) tres veces y por último se lava con agua fría por cinco minutos.
10. Terminados los lavados se centrifuga la laminilla en tubos de 50 ml para secar y se almacena en un lugar seco y oscuro.
11. Por último las laminillas son leídas con el aparato ScanArray 4000, cuantificados e interpretados.

### **3.2.8 Construcción de Mapas de Intensidad de la Señal**

Por medio de la cuantificación de la señal de fluorescencia de cada proteína viral (software QUANTARRAY) se construyó en un programa bioinformático llamado GALGO [201] un “Mapa de intensidad de fluorescencia” [202], que consiste en la asignación de un gradiente de colores de acuerdo a la intensidad de la señal detectada por el escáner de microarreglos.

### **3.2.9 Análisis estadístico**

El programa estadístico StatCalc de Epi Info versión 3.4 fue utilizado para el cálculo de la n necesaria para la obtención de datos con significancia estadística.

Para la información epidemiológica: se realizó estadística descriptiva de las variables dependientes e independientes como persistencia viral, edad de inicio de la vida sexual antes de los 16 años, índice tabáquico mayor de 10, número de parejas sexuales mayor a dos. Se utilizó un análisis univariado de asociación mediante tablas de contingencia ( $\chi^2$  o prueba exacta de Fisher) para las variables discretas.

Para determinar la asociación entre anticuerpos y persistencia/HLA se realizó un análisis multivariado con el programa computacional GALGO [201] y para la asociación entre los anticuerpos y las diferentes variables mencionadas anteriormente se utilizó un análisis univariado de asociación mediante tablas de contingencia ( $\chi^2$  o prueba exacta de Fisher).

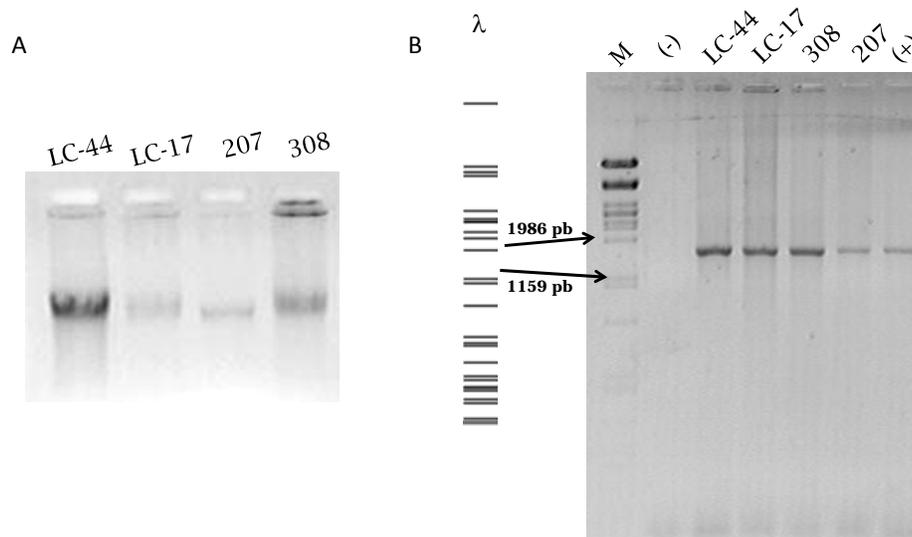
## CAPITULO IV. RESULTADOS

## 4.1. Hallazgos de laboratorio

El procesamiento de las muestras de los grupos de “seguimiento” y de “lesiones” se llevó a cabo de forma paralela. A continuación se muestran imágenes representativas de los resultados obtenidos en el laboratorio para la detección y tipificación del VPH en ambos grupos.

*Extracción de DNA*

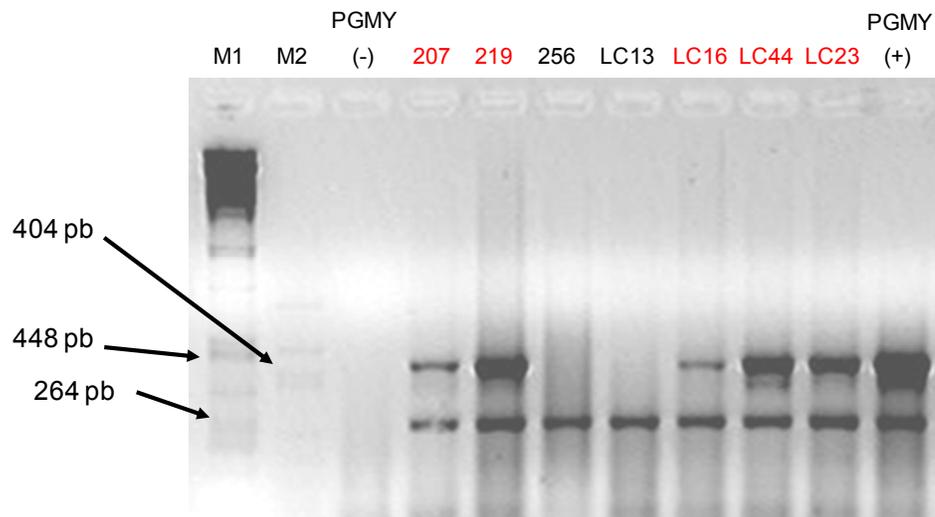
Para la detección del VPH se realizó la extracción de DNA genómico a partir de células de cérvix y se verificó su integridad y su calidad por medio de análisis electroforético en gel de agarosa y espectrofotométrico, respectivamente. La calidad del DNA para servir de sustratos en PCRs se calificó mediante amplificación de un gen control GH (figura 17).



**Figura 17. Comprobación de integridad y calidad del DNA extraído a partir de células de cérvix en ambos grupos de estudio. A.** Muestras de DNA genómico resueltas en gel de agarosa al 1%. Las muestras cuyo código incluye LC corresponden a DNA de cérvix del grupo “lesiones” y las que no lo incluyen, a las del grupo “seguimiento”. **B.** Resolución electroforética y visualización del amplicón (1553 pb) generado por los iniciadores del gen GH empleado como control de la “amplificabilidad” del DNA. En el primer carril se muestra el marcador del DNA del bacteriófago Lambda digerido con *Pst*I, después el control negativo (sin DNA), posteriormente muestras de “lesiones” y de “seguimiento”, y por último el control positivo (PCR empleando el BAC que contiene el gen GH como DNA sustrato).

### Identificación del VPV

Comprobadas sus óptimas calidades, los DNA fueron luego sometidos a la detección del VPV utilizando el estuche comercial “Amplicor HPV” de Roche. La amplificación se centró en la región L1 de aproximadamente 450 pb del genoma viral e incluyó como control interno a una región de 250 pb del gen  $\beta$ -globina (figura 18).

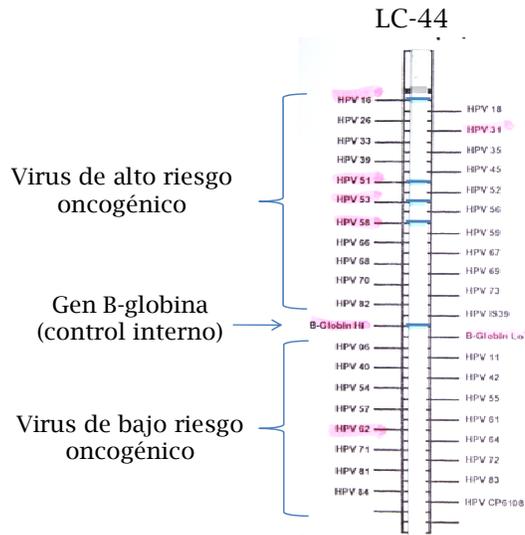


**Figura 18. Amplificación con los iniciadores del estuche comercial “Roche”.** En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular (igual que en la figura anterior y en lo sucesivo referido como  $\lambda$ ), en el segundo el marcador correspondiente a la digestión del plásmido PBS con *MspI*, en el tercero el control negativo (sin DNA) y en el resto de los carriles las muestras de “seguimiento” y de “lesiones”, rematados al final con el control positivo (DNA de la línea celular HeLa que se sabe posee en su material genético insertado el genoma del VPV 18). Para las muestras positivas para VPV se esperaba una banda a la altura de aproximadamente 450 pb y como el estuche contiene también iniciadores para el gen de control interno  $\beta$ -globina, el amplicón de este (de aproximadamente 250 pb), debe también estar presente en todas las muestras con DNA de óptima calidad.

### Tipificación del VPV

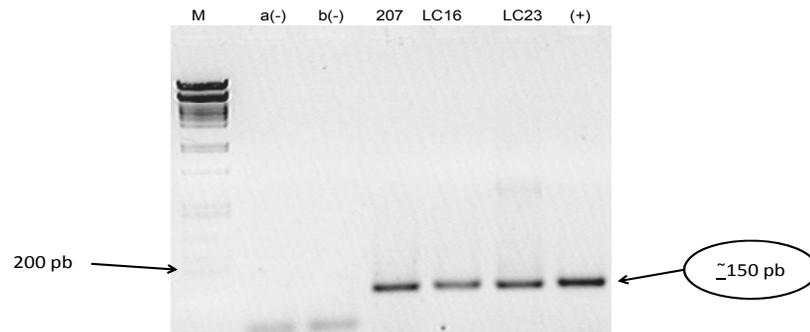
La tipificación viral se llevó a cabo por hibridación reversa del producto amplificado contra sondas de DNA específicas adheridas a tiras de nylon, las cuales están incluidas también en el estuche comercial previamente mencionado (de Roche).

La interpretación se realizó utilizando la plantilla incluida en el estuche (figura 19).



**Figura 19. Tipificación del VPH.** Se muestra una tira de nylon del estuche comercial (Roche), con la que se analizó una muestra del grupo de estudio de “lesiones”. La tira tiene adheridas sondas específicas de DNA de 37 tipos virales. En el centro de la tira se observa la sonda para el gen de control interno  $\beta$ -globina, encima de éste las de los virus de alto riesgo oncogénico y bajo éste las de los de bajo riesgo. Al revelar la tira, una banda color celeste delataría que existe hibridación. En este ejemplo se observa positividad para los virus 16, 51, 53 y 58, además del gen control  $\beta$ -globina.

A las muestras en las que la detección del virus por el estuche comercial resultó negativa, se les practicó una PCR anidada a partir de la reacción inicial (con iniciadores PGMY) con los iniciadores GP5<sup>+</sup>/6<sup>+</sup> (figura 20). Posteriormente, cuando ésta última resultó positiva, sus productos fueron clonados y secuenciados, así como analizados con el programa Nucleotide BLAST disponible en internet ([www.ncbi.nlm.gov/Blast](http://www.ncbi.nlm.gov/Blast)) para, vía sus alineamientos determinar el tipo viral.



**Figura 20. PCR anidada con los iniciadores GP5<sup>+</sup>/6<sup>+</sup> a partir de la reacción previa con los iniciadores PGMY.** El primer carril muestra el marcador de peso molecular  $\lambda$ . El segundo y el tercer carriles muestran los controles negativos [a (-)= reacción sin DNA, b (-)= control negativo de la reacción con PGMY], a continuación se incluyen tres muestras, una de “seguimiento” (207) y dos de “lesiones” (LC16 y LC23). Por último, el control positivo (+), consistente en una PCR practicada al DNA de la línea celular HeLa.

En las siguientes secciones se describen los resultados de aplicar la tecnología ilustrada con estos casos representativos, a los grupos de estudio.

## **4.2. Grupo de estudio “seguimiento”**

### **4.2.1. Características**

Como se mencionó en la sección de Material y Métodos, nuestro grupo principal “seguimiento” forma parte de una cohorte de poco más de 3,000 mujeres sanas tamizadas en el 2002, de las cuales aproximadamente 600 (~ 20%) resultaron positivas para la detección del VPH. Del año 2005 a la fecha se efectuó una segunda visita a 354 de estas mujeres.

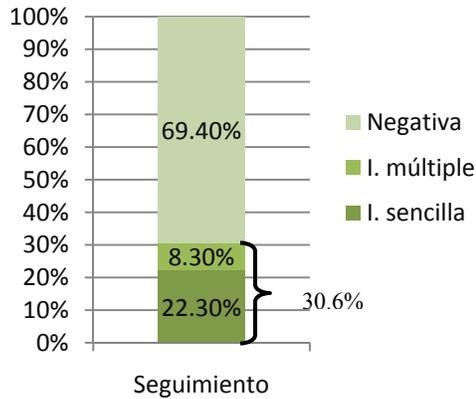
Para la obtención de datos con significancia estadística que nos permitan probar la hipótesis del involucramiento de anticuerpos en la eliminación de estas infecciones, se hizo el cálculo del tamaño de la muestra necesaria, utilizando el programa StatCalc de Epi Info versión 3.4. Se consideró un poder estadístico del 80% con nivel de confiabilidad del 95% y tomando en cuenta que sólo el 50% de las mujeres infectadas con VPH desarrollan anticuerpos [50]. Este resultó ser de 26 casos (infección persistente) y de 78 controles (infección transitoria).

En el presente trabajo se incluyen a 22 casos y 135 controles. La edad promedio del grupo fue de 39.58 (DE  $\pm$  12.66), su residencia en el área metropolitana y su origen en un 65% de Nuevo León versus 35% de otras entidades federativas, siendo la mayoría del vecino estado de San Luis Potosí.

### **4.2.2. Frecuencia del VPH y sus tipos**

#### **4.2.2.1. Detección viral**

Al total del grupo de mujeres en seguimiento (n=157) se les realizó la detección molecular del VPH, encontrándose positivas a 48 de ellas (30.6%), de las cuales 13 (8.3%) presentaban coinfecciones (presencia de más de un tipo viral, mostradas en el cuadro 15) y las 109 restantes resultaron negativas para la detección del virus, implicando que ya habían eliminado éste (figura 21).



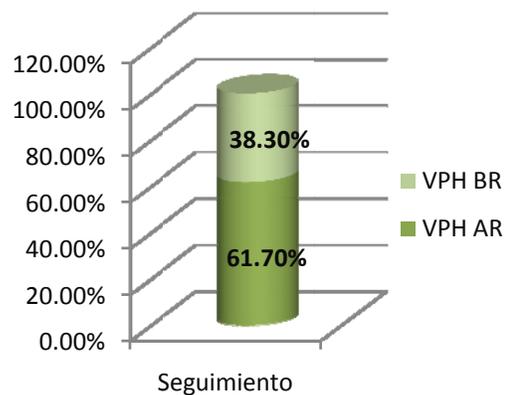
**Figura 21. Frecuencia de la infección de VPH en el grupo “seguimiento”.** La figura muestra el porcentaje de mujeres positivas para la infección, ya sea con uno o varios tipos virales a la vez..

**Cuadro 15. Coinfecciones presentadas en el grupo de “seguimiento”.**

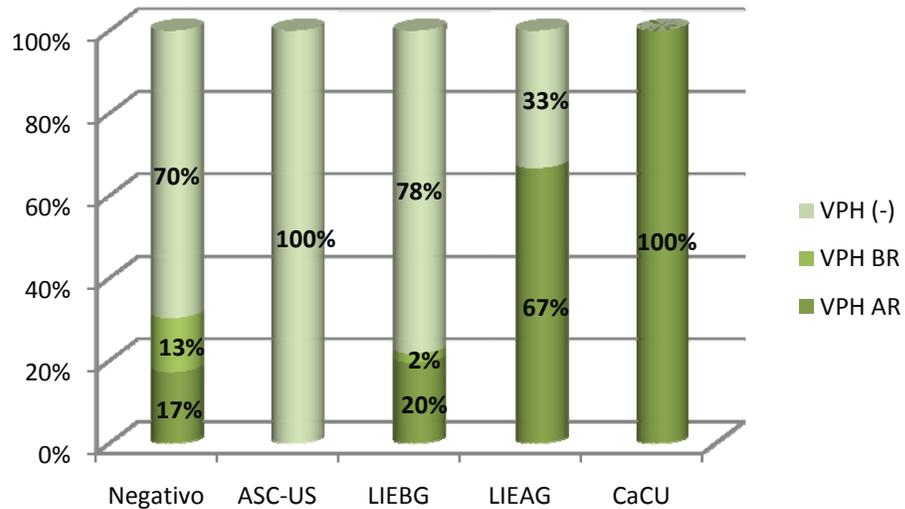
VPBs	Frecuencia n, (%)
16, 18, 31, 33, 59	1, (8%)
16, 83	1, (8%)
18, 61, 81	1, (8%)
31, 58	1, (8%)
16, 51, 69	1, (8%)
52, 62, 83, 84	1, (8%)
53, 62	2, (15%)
56, 66	3, (23%)
59, 62	1, (8%)
71, 81, 83	1, (8%)

El análisis de los resultados obtenidos mostró que el 61.7% de las infecciones presentaban VPBs de alto riesgo oncogénico, mientras que el 38.3% restante poseían tipos virales de bajo riesgo (figura 22).

**Figura 22. Frecuencia de VPH de alto y bajo riesgo oncogénico en el grupo de “seguimiento”.** Se muestran los porcentajes de mujeres positivas para la infección con VPH, ya sea de alto o bajo riesgo oncogénico.



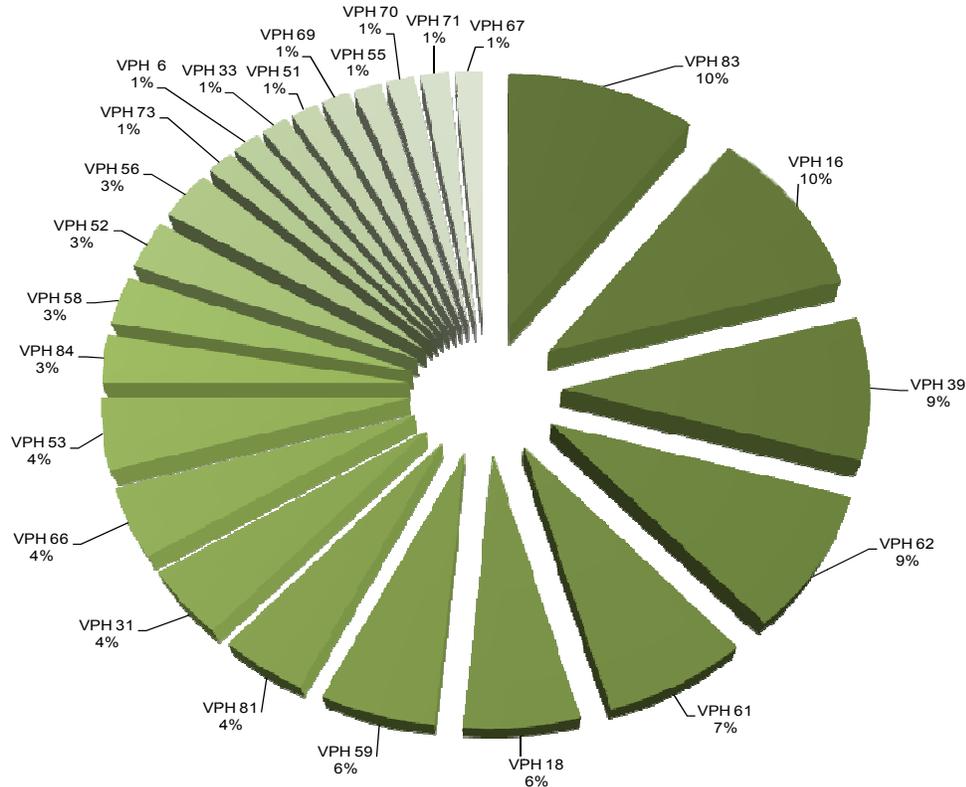
Clasificando a las mujeres del grupo de “seguimiento” de acuerdo al resultado de su citología, la distribución de la frecuencia viral acorde a su potencial oncogénico se muestra en la figura 23.



**Figura 23. Clasificación del grupo de seguimiento de acuerdo a su citología y frecuencia viral.** Se muestra la frecuencia de la infección por VPH, ya sea de alto o de bajo riesgo oncogénico, en el grupo “seguimiento” estratificado de acuerdo al resultado de la citología. ASC-US = células escamosas de significancia indeterminada; LIEBG y LIEAG = lesión intraepitelial de bajo y alto grado, respectivamente; CaCU = cáncer cervicouterino escamoso.

#### 4.2.2.2. Frecuencia de los tipos virales

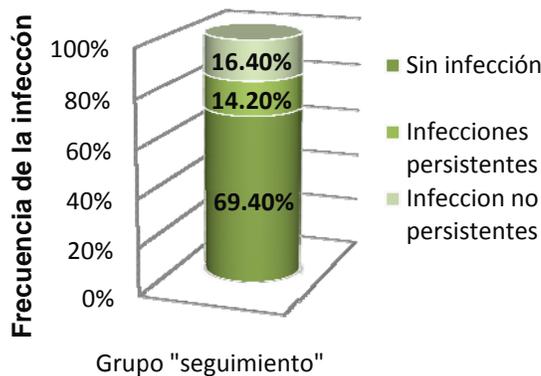
De entre las 48 mujeres del grupo de “seguimiento” que continuaron siendo VPH positivas, se detectaron 24 genotipos virales diferentes. Los más frecuentes en el grupo fueron los VPHs 83 y 16 en primer lugar, seguidos por los VPHs 39 y 62 en segundo lugar, el VPH 61 en tercer lugar y los VPHs 18 y 59 en cuarto lugar (figura 24).



**Figura 24. Análisis de las frecuencias de los tipos virales en el subgrupo positivo para VPH del grupo de estudio “seguimiento”.** De los 37 tipos virales capaces de ser detectados por la tecnología usada, se detectaron 24 genotipos, mostrándose sus porcentajes y ordenados de acuerdo a su abundancia.

**4.2.2.3. Persistencia viral**

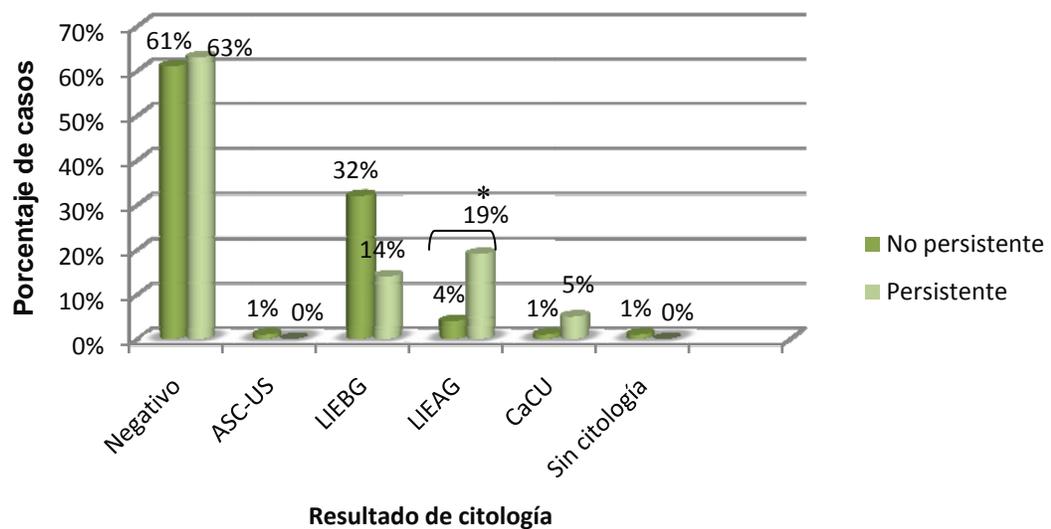
Del total de mujeres estudiadas en esta segunda visita de “seguimiento” (157), sólo 22 (14.02%) presentaba infección con el mismo tipo viral (persistencia), considerando el resultado de la primera visita que data del 2002 (figura 25).



**Figura 25. Resultados del curso de las infecciones en la segunda visita.** Se representa los porcentajes de infecciones persistentes, no persistentes y sin infección.

#### 4.2.2.4. Manifestaciones clínicas

Todas las participantes fueron sometidas a una exploración ginecológica completa, en la cual se incluyó una toma de muestra para citología (Papanicolaou). Comparando los resultados citológicos entre las mujeres con infección persistente y no persistente (incluidas las mujeres con presencia de un nuevo tipo viral y las que eliminaron la infección), se pudo observar que las lesiones de alto grado se presentaron con mayor frecuencia en mujeres con persistencia viral (figura 26).



**Figura 26. Distribución de las infecciones de acuerdo a la citología.** Se muestra el porcentaje de mujeres del grupo con infección persistente y del grupo no persistente (como se definió anteriormente), de acuerdo a su resultado en el estudio de citología, incluyendo aquellas a las que no fue posible realizarles este estudio.

\* Valor de  $p < 0.05$  (prueba  $\chi^2$ )

#### 4.2.3. Análisis de los cofactores de riesgo

Se analizaron los factores de riesgo relacionados con el estilo de vida conocidos por facilitar la persistencia de la infección por VPH. Dentro de estos se incluyeron: tabaquismo, edad de inicio de vida sexual (IVSA), número de parejas sexuales y uso de anticonceptivos orales por más de cinco años (ACH). Los resultados se muestran en el cuadro 15.

Cuadro 16. Factores de riesgo relacionados con el estilo de vida potencialmente asociados a persistencia viral.

Característica	Infección persistente	Infección eliminada	OR (IC 95%)	Valor de "p"
<b>Tabaquismo</b>	<b>59.1%</b>	<b>4.65%</b>	<b>31.05</b>	<b>0.000</b>
<b>IVSA &lt; 16</b>	<b>59.1%</b>	<b>50%</b>	<b>2.88</b>	<b>0.031</b>
# de parejas > 2	13.63%	25%	0.63	0.574
ACH	4.5%	3.05%	1.56	0.535

El análisis estadístico arrojó significancia estadística para la asociación entre tabaquismo y persistencia de la infección así como inicio de la vida sexual antes de los 16 años y ésta.

### 4.3. Grupo de estudio "lesiones"

#### 4.3.1. Características

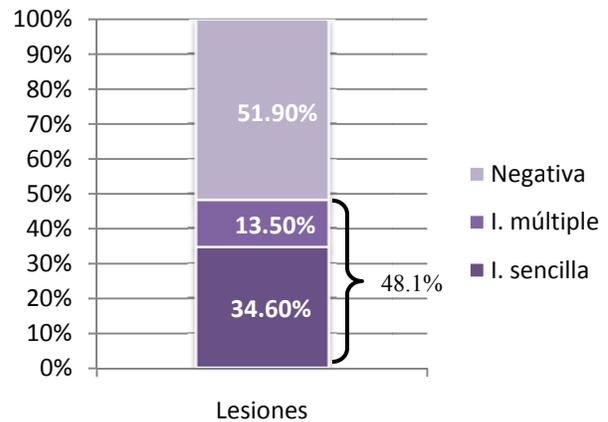
Este segundo grupo de estudio de nuestro proyecto consiste de pacientes que fueron referidas al servicio de Colposcopia del Departamento de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario "José E. González". El criterio de inclusión de estas pacientes fue el contar con un resultado anormal en su citología. Se lograron reclutar 52 mujeres, cuya edad promedio fue de 40.73 años (DE  $\pm$  13.45) y residencia en su mayoría (63.5%) del estado de Nuevo León.

#### 4.3.2. Frecuencia del VPH y sus tipos

##### 4.3.2.1. Detección viral

En el grupo de lesiones, se encontró que de las 52 mujeres, casi la mitad (48.1%) presentaron infección por VPH y de éstas el 13.5% (7 mujeres, mostrándose los VPHs involucrados en el cuadro 16) presentaron coinfecciones (véase figura 27).

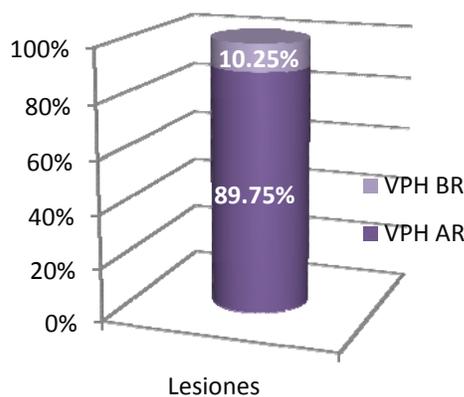
**Figura 27. Frecuencia de la infección por VPV en el grupo “lesiones”.** Se ilustra el porcentaje de mujeres positivas para la infección y de éstas si su infección es con un solo tipo viral o múltiples tipos virales.



**Cuadro 17. Coinfecciones virales en el grupo de “lesiones”.**

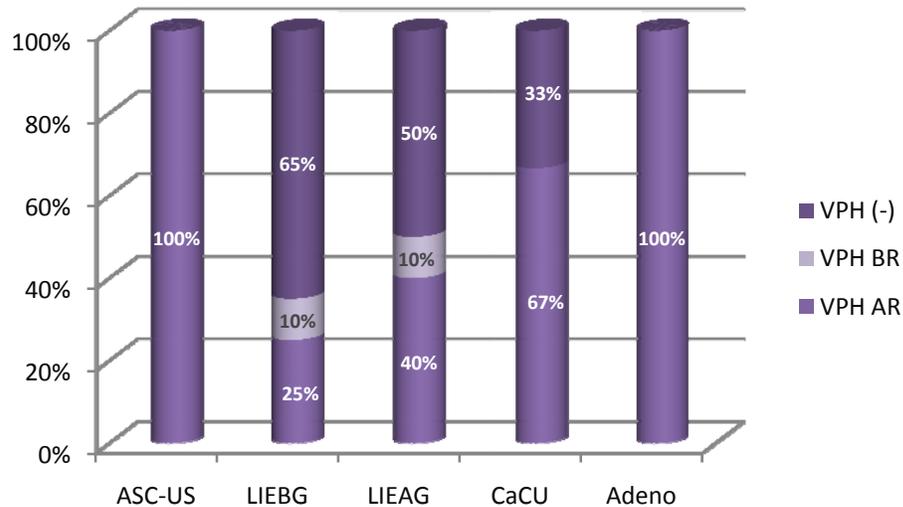
VPVs	Frecuencia n, (%)
<b>16, 83</b>	3, (43%)
<b>16, 6</b>	1, (14%)
<b>16, 52</b>	1, (14%)
<b>53, 58</b>	1, (14%)
<b>16, 31, 51, 53, 58, 62</b>	1, (14%)

El análisis de los resultados obtenidos para este grupo de “lesiones” arrojó un alto valor (89.75%) de infecciones que presentaron VPVs de alto riesgo oncogénico, correspondiendo al resto el valor relativamente bajo (10.25%) a VPVs de bajo riesgo (figura 28).



**Figura 28. Frecuencia de VPVs de alto y bajo riesgo oncogénico en el grupo “lesiones”.** Se muestran los porcentajes de mujeres positivas para la infección con VPV, ya sea de alto o bajo riesgo.

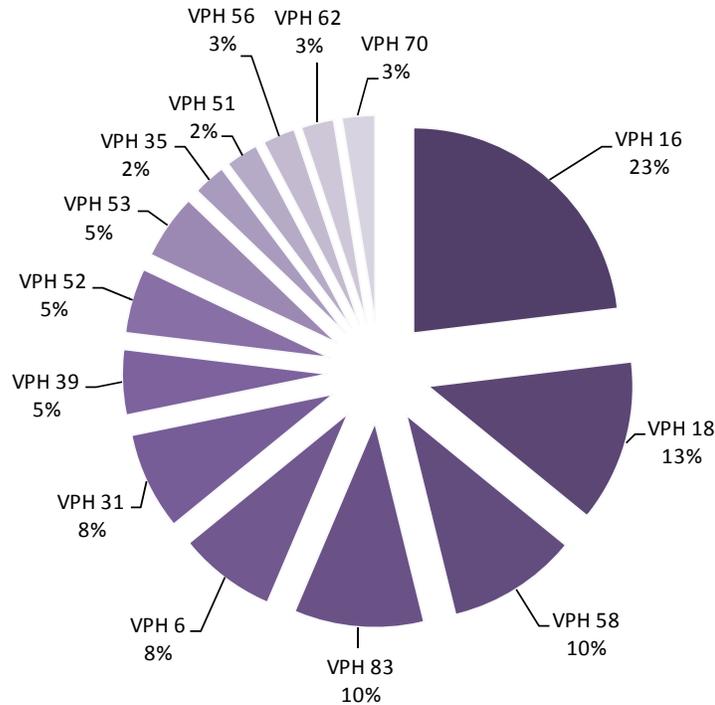
Se clasificó a las mujeres del grupo de “lesiones” en función a la clasificación de los virus en alto y bajo riesgo oncogénico y a lo largo del espectro de los resultados citológicos, observándose la elevada frecuencia de los grupos de alto riesgo conforme el grado de lesión avanza (figura 29).



**Figura 29. Frecuencia de la infección de VPH de alto y bajo riesgo oncogénico en el espectro de resultados citológicos.** La figura muestra el porcentaje de mujeres positivas para la infección de acuerdo al grado de lesión (mismas abreviaciones que en la figura 23). Adeno = Adenocarcinomas

#### 4.3.2.2. Frecuencia de los tipos virales

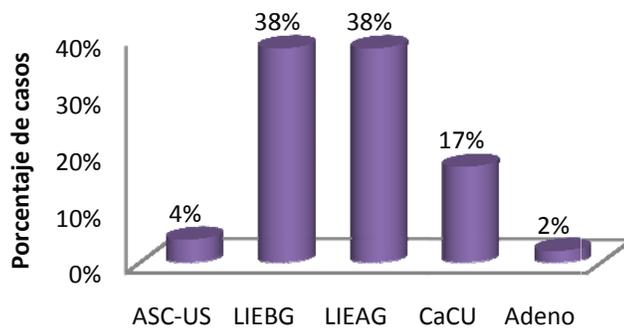
Para el caso de este grupo de “lesiones” se observó una menor diversidad de virus (16 genotipos), siendo el más frecuente el VPH 16, siguiéndole el VPH 18 y resultando empatados en tercer lugar empatados los VPHs 58 y 83 (figura 30).



**Figura 30. Análisis de las frecuencias de los tipos virales en el subgrupo positivo para VPH del grupo de estudio “lesiones”.** Se muestran los porcentajes correspondientes a los tipos virales detectados. El VPH más frecuente fue el 16, seguido del VPH 18 y en tercer lugar los VPHs 58 y 83.

**4.3.2.3. Manifestaciones clínicas**

Como se mencionó anteriormente (criterio de inclusión), todas las mujeres incluidas en este grupo de “lesiones” presentaban alguna anomalía en el resultado del estudio de citología. Al examinar las anomalías citológicas en las mujeres incluidas, se encontró como las más comunes a las categorías de bajo (LIEBG) y alto (LIEAG) grado abarcando entre ambas tres cuartas partes de los casos (figura 31).



**Figura 31. Clasificación de los casos de acuerdo a las anomalías citológicas.** Se observan los porcentajes de los diferentes tipos de lesiones presentadas en las 52 pacientes incluidas en el estudio.

**4.3.3. Análisis de los cofactores de riesgo**

También en este grupo de “lesiones” se buscaron asociaciones de factores relacionados con el estilo de vida potencialmente predisponentes a la infección viral (cuadro 18).

Cuadro 18. Análisis de factores de riesgo relacionados con el estilo de vida que predisponen a infección viral.

Característica	VPV (+)	VPV (-)	OR (IC 95%)	Valor de “p”
<b><i>Tabaquismo</i></b>	<b>43.05%</b>	<b>6.52%</b>	<b>10.83</b>	<b>0.000</b>
<b><i>IVSA &lt; 16</i></b>	<b>44.83%</b>	<b>26.81%</b>	<b>2.31</b>	<b>0.008</b>
# de parejas > 2	20.83%	19.56%	1.08	0.857
ACH	2.77%	5.79%	0.464	0.500

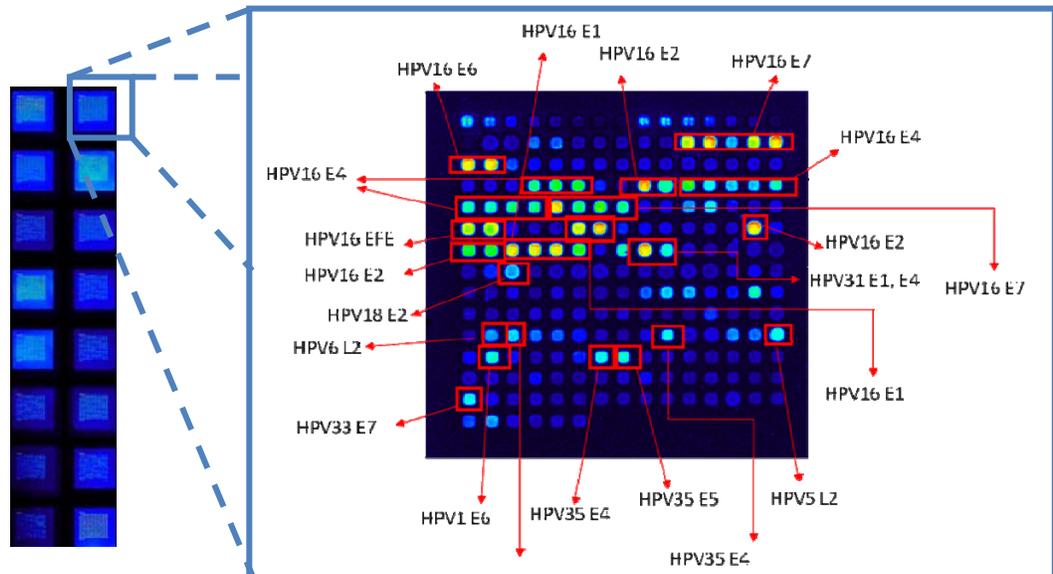
Se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de la infección y el tabaquismo así como entre la primera y el inicio de una vida sexual antes de los 16 años de edad.

#### 4.4. Papel de los anticuerpos en la persistencia viral.

##### 4.4.1. Descripción de la tecnología

La determinación de anticuerpos fue realizada usando portaobjetos convertidos en microarreglos de proteínas tal y como se describió en la sección de Material y Métodos. Cada uno de los microarreglos constó de 16 pequeñas membranas capaces de detectar en el suero de sendos individuos anticuerpos contra 202 proteínas virales diferentes. Cuando existe un reconocimiento entre las mismas y los anticuerpos de los sueros se genera una señal fluorescente detectable mediante un equipo de escaneo para microarreglos. La significancia de la señal se deduce al compararla con controles negativos y positivos incluidos en cada una de las membranas. Dada la ubicación predeterminada de las proteínas virales en los microarreglos, la posición de la señal identifica al antígeno viral reconocido por los anticuerpos (figura 32).

Los resultados mostrados en esta sección y en adelante corresponden al análisis de todas las muestras abarcadas en el presente estudio: 157 del grupo “seguimiento” y 52 de grupo “lesiones”.

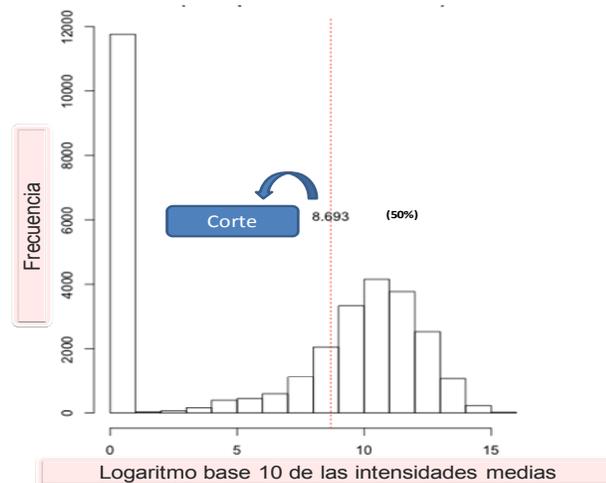


**Figura 32. Microarreglo de proteínas virales para la detección de anticuerpos anti-VPH.**

En el extremo izquierdo se muestra un portaobjetos o microarreglos portando 16 pequeñas membranas cada una de las cuales se hacen reaccionar con sendos sueros de las pacientes. Se muestra la ampliación de una de las membranas, evidenciándose en el caso de esta paciente (diagnóstico CaCU) que existen anticuerpos contra una amplia gama de proteínas virales.

#### 4.4.2. Prevalencia de anticuerpos

Para considerar como positiva una señal proveniente de alguno de los diferentes puntos de las membranas de los microarreglos, se asignó un punto de corte basal (figura 33) y todo valor que lo sobrepasase se calificó como positivo (es decir; reconocimiento entre antígeno-anticuerpo). Este criterio fue validado al verificar manualmente en los microarreglos, el que todas las señales con intensidades por encima de este valor de corte basal resultaran obvias a la inspección visual.



**Figura 33. Punto de corte de las señales en los microarreglos.** La gráfica muestra en el eje de las ordenadas la frecuencia de las intensidades medias de las señales de las muestras y en el eje de las abscisas el logaritmo base 10 de las mismas. El punto de corte se fijó en aquellas señales cuyo antilogaritmo fuera igual o superior a 8.6993 (5,961 unidades relativas)

De acuerdo con el criterio anterior, se determinó la prevalencia de anticuerpos (seroprevalencia) en los dos grupos de estudio (“seguimiento” y “lesiones”) y el resultado obtenido se sometió al análisis estadístico (chi<sup>2</sup>) descrito en el cuadro 19.

Se observó que hubo una diferencia estadísticamente significativa entre las seroprevalencias del grupo de “seguimiento” y de “lesiones”; de igual forma, al estratificar a las participantes de ambos grupos en mujeres con y sin lesiones.

Cuadro 19. Seroprevalencia en los grupos de estudio “seguimiento” y “lesiones”.

Variable	% Con anticuerpos	% Sin anticuerpos	OR (95%)	Valor de “p”
“Lesiones”	35	65	} 0.267	< 0.00005
“Seguimiento”	66	34		
NO persistente	69	31	} 0.447	0.078
Persistentes	50	50		
<b>Ambos grupos</b>				
VPH (+)	50	50	} 0.581	0.063
VPH (-)	63	37		
Sin lesiones	69	31	} 0.433	0.003
Con Lesiones	49	51		

Asimismo, se realizó el análisis de la seroprevalencia en subgrupos clasificados de acuerdo a algunas variables epidemiológicas (cuadro 20),

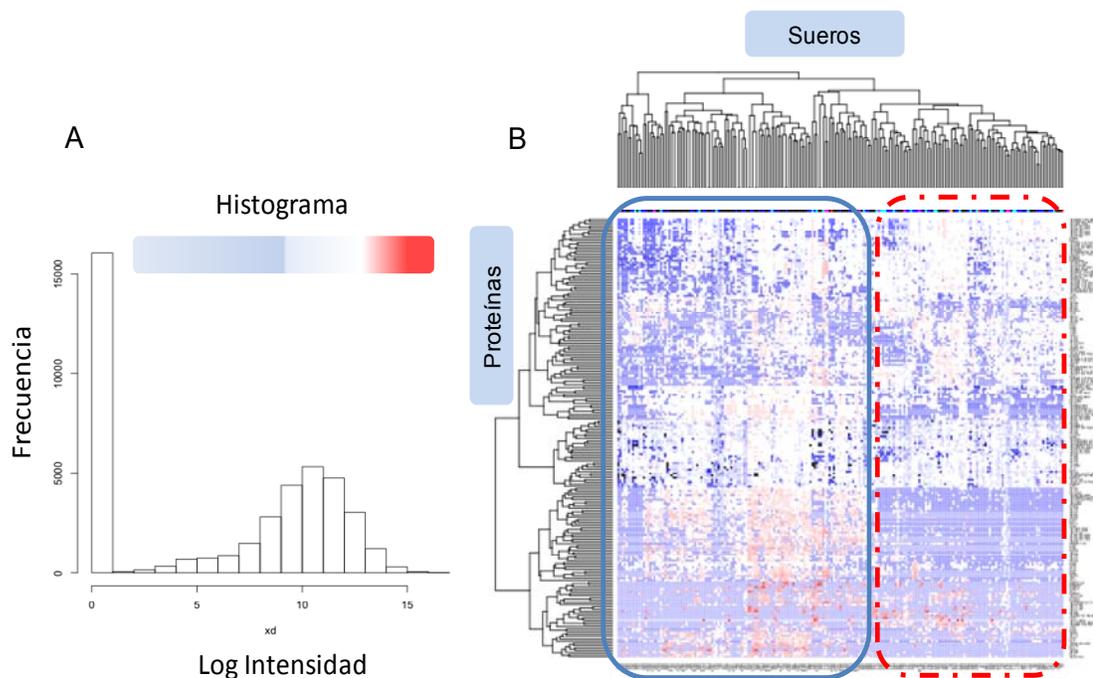
Cuadro 20. Seroprevalencia en los grupos de estudio “seguimiento” y “lesiones” de acuerdo a variables epidemiológicas.

Variable	% con anticuerpos	% Sin anticuerpos	OR (95%)	Valor de “p”
Edad $\leq$ 25	41	59	0.529	0.101
Edad $\geq$ 25 $\leq$ 35	65	35	1.307	0.373
Edad $\geq$ 35	51	49	1.095	0.746
No fumadora	47	53	} 0.574	0.121
Fumadora	61	39		
# parejas sexuales < 2	60	40	} 0.685	0.269
# parejas sexuales > 2	51	49		
IVSA >16 años	60	40	} 0.839	0.552
IVSA < 16 años	56	44		

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la seroprevalencia y los subgrupos.

#### 4.4.3. Patrón de anticuerpos

Las intensidades de fluorescencia de los microarreglos hibridados correspondientes a los sueros de ambos grupos fueron convertidos en un “Mapa de intensidad de fluorescencia” por medio de un programa bioinformático (ver Material y Métodos). En esta clase de mapas, cada una de las columnas representa el suero de una paciente y en las filas se listan las proteínas virales. Así, a través del mapa se ordenan los sueros de acuerdo a su patrón de anticuerpos, dándonos un panorama general en el que podemos observar las proteínas más inmunogénicas y las muestras más reactivas (figura 34).



**Figura 34. Mapa de intensidad de las señales de fluorescencia. A.** Se muestra en el eje de las ordenadas la frecuencia de las intensidades medias de las señales de las muestras y en el eje de las abscisas el logaritmo base 10 de las mismas, incluyendo en la parte superior un gradiente de color que indica la intensidad de la reactividad de la señal (menor a mayor).

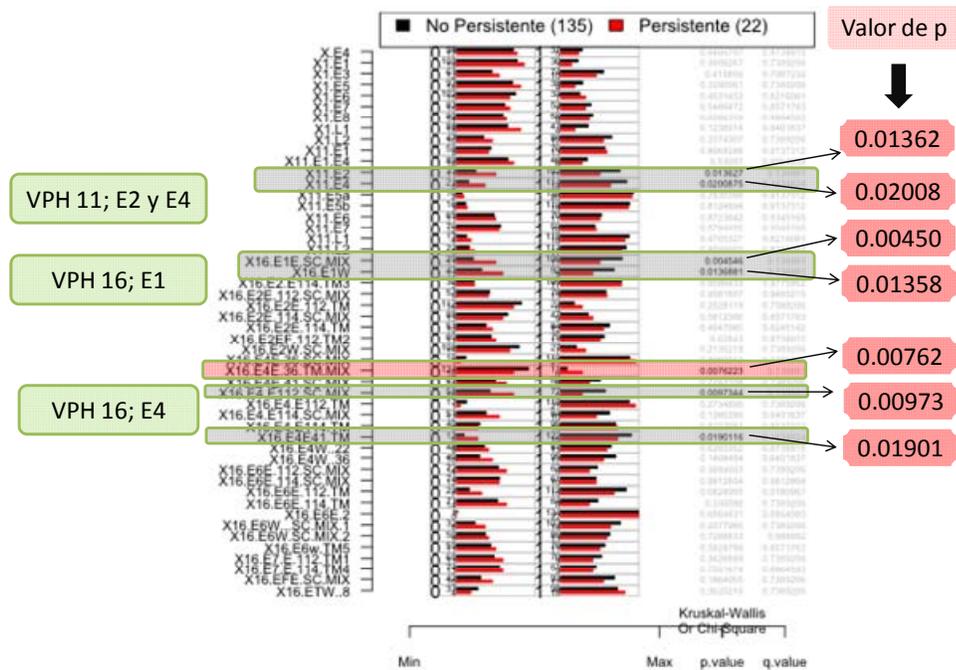
**B.** Mapa de intensidad de las señales de fluorescencia cuyas columnas corresponden a los sueros de las pacientes y filas a las proteínas virales. En el rectángulo de línea sólida se señalan todas las pacientes correspondientes al grupo de “seguimiento” y el de línea punteada señala las correspondientes al grupo de “lesiones”.

Debido a la enorme cantidad de datos obtenidos para cada paciente, fue necesario simplificar esta información. Esto se realizó por un Análisis de Componentes

Principales (PCA, del inglés *Principal Component Analysis*), con el que se pretendió establecer si nuestros grupos de estudio (persistente, no persistente y lesiones) tienen alguna tendencia a agruparse en patrones particulares. El resultado arrojó que solo en el caso del grupo de “lesiones” tienden a tener un patrón de fluorescencia en los mapas de intensidad de la señal característico. Los detalles de éste complejo análisis se describen en el anexo XII.

#### 4.4.4. Perfil de anticuerpos

Por medio de los análisis estadísticos ( $\chi^2$  y Kruskal-Wallis) en el grupo de mujeres de “seguimiento”, fue posible obtener perfiles de anticuerpos característicos para los casos y para los controles (infección persistente vs infección transitoria). En la figura 35 se muestra un ejemplo de dichos análisis para un subconjunto de las proteínas virales, sometidas al análisis con la técnica estadística de  $\chi^2$ .



**Figura 35. Comparación de perfil de anticuerpos.** Se observa en la figura un ejemplo del perfil de anticuerpos de las mujeres con infección persistente y con infección transitoria (no persistente). La columna del lado izquierdo enlista las proteínas virales contra las que los anticuerpos reaccionaron, las siguientes dos columnas representan la ausencia o presencia de anticuerpos (0 para el primer caso y 1 el segundo) cuya pareja de barras asociadas a cada punto de ambas columnas comparan el número de mujeres con y sin persistencia de esa categoría en particular. La cuarta columna es el valor de p, tomándose como menor de 0.05 diferencia significativa (prueba estadística  $\chi^2$ ), mientras que la última muestra el valor de p corregido por múltiples pruebas usando la técnica de FDR (del inglés *False Discovery Rate*).

Este análisis da como resultado una serie de anticuerpos contra proteínas virales determinadas, presentes preferencialmente en infección transitoria (figura 36).

Proteínas candidatas a biomarcadores marcadores de eliminación viral	
1.	VPV 11 E2
2.	VPV 11 E4
3.	VPV 16 E1
4.	VPV 16 E4
5.	VPV 16 E7
6.	VPV 18 E2
7.	VPV 18 E7
8.	VPV 31 L2
9.	VPV 33 L2

**Figura 36. Biomarcadores candidatos de eliminación viral.** Se enlistan en el cuadro las proteínas que reaccionan con los anticuerpos de mujeres que eliminaron la infección (transitoria).

Para estas nueve proteínas que reaccionaron con los anticuerpos de las mujeres cuya infección resultó transitoria y basándonos en el supuesto de que las mujeres que presentan lesiones no fueron capaces de eliminar la infección [49], no esperaríamos anticuerpos contra estas proteínas en estas últimas mujeres cuyas infecciones progresaron a lesiones.

Para probar esta hipótesis se realizó un análisis por medio de la prueba estadística Kruskal-Wallis entre los grupos “lesiones” y de “seguimiento (sin lesiones)”. El resultado del análisis (figura 37) muestra que sólo cinco proteínas de las nueve propuestas resistieron esta prueba y por ende se les puede considerar como probables biomarcadores de eliminación viral.

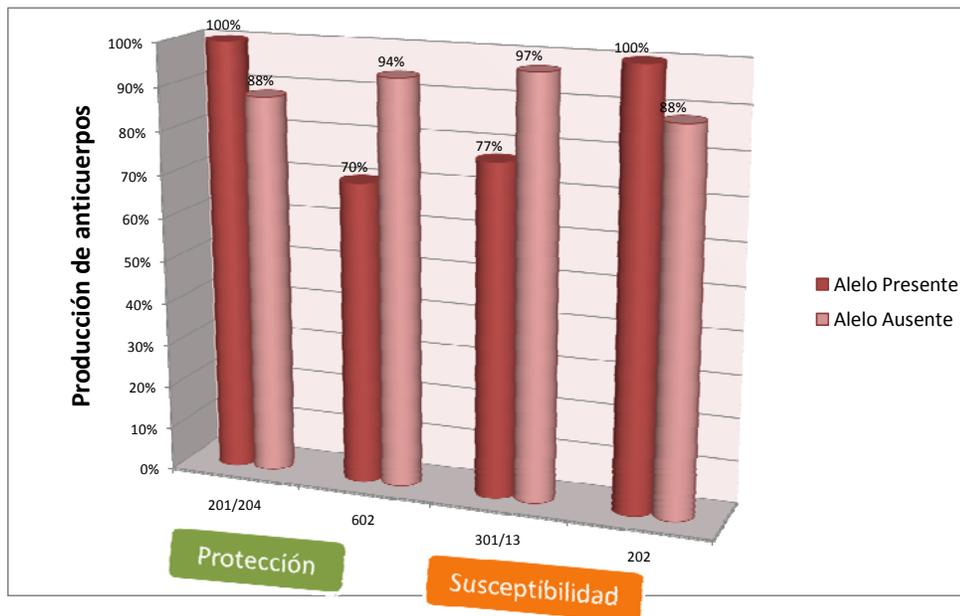
Biomarcador candidato	Detección por anticuerpos de mujeres con infección transitoria	Detección por anticuerpos de mujeres con lesiones	Validación
1. VPH 11 E2	Presente	Presente	No validado
2. VPH 11 E4	Presente	<b>Ausente</b>	<b>Validado</b> ✓
3. VPH 16 E1	Presente	Presente	No validado
4. VPH 16 E4	Presente	<b>Ausente</b>	<b>Validado</b> ✓
5. VPH 16 E7	Presente	<b>Ausente</b>	<b>Validado</b> ✓
6. VPH 18 E2	Presente	Presente	No validado
7. VPH 18 E7	Presente	Presente	No validado
8. VPH 31 L2	Presente	<b>Ausente</b>	<b>Validado</b> ✓
9. VPH 33 L2	Presente	<b>Ausente</b>	<b>Validado</b> ✓

**Figura 37. Comparación de anticuerpos presentes en infecciones transitorias versus lesiones.** Se ordenan en la primera columna los biomarcadores candidatos, en la segunda y tercera la presencia o ausencia de anticuerpos contra los mismos en infección transitoria y en lesiones, respectivamente. Para terminar, la última columna muestra si el biomarcador fue o no validado.

#### 4.4.5. Asociación de los anticuerpos anti-VPH y los alelos del HLA

Para determinar si existe una asociación entre los resultados previos de nuestro laboratorio (S. Bernal y H. Barrera, resultados no publicados) de tipificación de alelos HLA DQB de algunas de las mujeres del grupo de “seguimiento” y la presencia de anticuerpos anti-VPH en los sueros de estas, se realizó una comparación con la técnica estadística  $\chi^2$ . Se eligieron dos alelos identificados en dichos resultados como de protección (HLA DQB1\*201/204 y DQB1\*602) y dos alelos de susceptibilidad (DQB1\*301/13 y DQB1\*202).

El análisis estadístico no arrojó diferencias estadísticas para las comparaciones de los alelos investigados (figura 38).



**Figura 38. Asociación entre alelos HLA y presencia de anticuerpos.** La gráfica muestra para cada alelo el porcentaje de mujeres que presentaron anticuerpos, cuyo escrutinio estadístico no reveló diferencias significativas.

## **CAPITULO V. DISCUSIÓN**

### **5.1 Valor de las investigaciones en el grupo de “seguimiento”**

#### **5.1.1 Detección y frecuencia viral**

Según Bosch y cols. la prevalencia de la infección por VPH en México es del 20.4% [203], porcentaje similar a los resultados de nuestra investigación en el 2002. Sin embargo, los resultados del presente trabajo muestran que la incidencia de la infección aumentó en el grupo de pacientes seleccionados que estuvo previamente expuesto al virus y que se ha venido dando seguimiento en nuestro laboratorio por ya seis años (20% en 2002 vs 30.6% en 2008). El significado de esta observación alerta sobre el hecho de que una vez que la paciente está expuesta a la infección por VPH y aún tiene la capacidad de eliminarla, tiene más riesgo de contraer una infección por otro tipo de VPH, muy probablemente debido a su estilo de vida, incluida su conducta sexual que en caso de no ser modificada, predisponen a re-infecciones por el virus [52]. Es importante destacar que los virus más frecuentes resultaron ser el 83 y el 16, que en segundo lugar estuvieron 39 y 62, que en tercer lugar le siguió 61 y que finalmente la cuarta posición la ocuparon el 18 y el 59. Tratándose de población abierta, Bosch y cols. en su meta-análisis refieren que el 23.3% de las mujeres con citología normal están infectadas con VPH 16 y el 8.5% con VPH 18 [203], diferenciando estos porcentajes a los encontrados en nuestro grupo de estudio (10% y 6%, respectivamente).

#### **5.1.2 Persistencia viral**

Se encontró una persistencia viral del 14.2% en este grupo de “seguimiento”, parecido a lo reportado en la literatura [204, 205]. Los tipos virales con mayor tendencia a persistir resultaron ser los de alto riesgo, aunque cabe mencionar que los de bajo riesgo también presentaron un alto porcentaje de incidencias en la infecciones persistentes (55% AR vs 45% BR). Se sabe que los virus de alto riesgo tienden más a persistir y que su tiempo de eliminación es considerablemente más largo en comparación con los de bajo riesgo [205, 206], pudiendo haber sido esta la razón de

que en nuestro estudio tras casi seis años de seguimiento, se observe una mayor frecuencia de estos virus en las infecciones persistentes.

Los análisis de los factores epidemiológicos que contribuyen a la persistencia viral arrojaron como significativos las asociaciones con tabaquismo e IVSA menor a 16 años, ambos parámetros reportados previamente como factores de riesgo a desarrollar CaCU por múltiples autores [69, 71, 157].

### **5.1.3 Manifestaciones clínicas**

Debido a que el estudio del grupo de “seguimiento” consiste de mujeres asintomáticas con infección por VPH, se esperaba la aparición de lesiones tras casi ya seis años de seguimiento, ya que un elevado porcentaje estas presentaron al inicio del estudio (2002) virus de alto riesgo (75.8%), conocidos como principales causantes de anormalidades citológicas [49]. En las mujeres con infección persistente se observó que un 14% y un 19% presentaron lesiones de bajo y alto grados, respectivamente; en contraste con las infecciones transitorias, en las que se encontró un alto porcentaje de lesiones de bajo grado (32%) y únicamente un 4% de alto grado. Esto implica que las infecciones persistentes típicamente asociadas a VPH de alto riesgo oncogénico conllevan a riesgo elevado para el desarrollo de lesiones de alto grado [85, 207, 208].

## **5.2 Contribuciones del grupo de “lesiones” a nuestro estudio**

### **5.2.1 Detección y frecuencia viral**

La incidencia de la infección por VPH en este grupo resultó ser alta, encontrándose positividad para esta en casi la mitad de los casos (48.1%). El VPH 16 ocupó el primer lugar en frecuencia, seguido del VPH 18, coincidiendo con lo reportado globalmente [203], reforzando la noción de que la aplicación de las vacunas contra VPH (Gardasil® y/o Cervarix®) en México contribuiría a prevenir las lesiones causadas por estos tipos virales, que abarcan casi la mitad de los casos en nuestro estudio (véase figura 30). Sin embargo, aún existe un notable número de lesiones causadas por otros virus (VPHs 83, 31, 39 y 52) que al no ser incluidos en las vacunas disponibles en la actualidad, seguirán causando lesiones en las mujeres de nuestra población. Además se desconoce si la ausencia de los tipos más frecuentes pudiera cambiar el impacto

que los tipos menos frecuentes ejercen sobre el desarrollo de la neoplasia. Esta distribución de los tipos virales encontrados en el grupo de “lesiones” concuerda parcialmente con la referida en el estudio realizado en la Ciudad de México por Kouri y cols., donde se encontró que los VPHs 16 y 18 ocupan las primeras posiciones, seguidos por los VPHs 45, 39, 59 y 58 [209], revelando que la distribución de los diferentes genotipos virales varía notablemente de región en región aún dentro de un mismo país.

### **5.2.2 Manifestaciones clínicas**

Como se ilustró en la figura 31, la mayoría de las mujeres referidas al servicio de Colposcopia del departamento de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario “José E. González” manifestaron lesiones de bajo y alto grado (38% y 38%, respectivamente). Esta es una situación inquietante, ya que el porcentaje de mujeres en esta última categoría, es elevado. Dado que se sabe que para que se desarrolle LIEAG es necesario padecer una infección persistente por un período de varios años (5 años con VPH-AR y 7 años con VPH-BR) [210]. Delatando su abundancia el que los métodos de tamizaje usados no tienen la suficiente sensibilidad para detectar oportunamente las lesiones [211]; aunado al hecho de que se ha fallado en educar a las mujeres sobre una cultura de prevención de este importante padecimiento [212].

## **5.3 Comparaciones entre los hallazgos de ambos grupos**

### **5.3.1 Detección viral**

La diferencia en las frecuencias de la infección por VPH en ambos grupos (48.1% en “lesiones” y 30.1% en “seguimiento”) claramente resulta de las características de los mismos, siendo de esperar que el grupo de “lesiones” presente un alto porcentaje de VPH en comparación con el de “seguimiento”. Asimismo, el que los VPHs de alto riesgo se encontraran más frecuentemente en el grupo de “lesiones” que en el de seguimiento (89.75% vs 61.70%), demuestra que la mayoría de las anomalías citológicas son causadas por estos virus, como se ha descrito previamente en numerosas investigaciones [46, 127, 210, 213].

Los hallazgos de detección viral en función de la evolución de la infección en los grupos de estudio se comparan en el cuadro 20 con estudios similares referidos en la literatura.

Cuadro 20. Reportes de la incidencia de la infección por VPH.

Dato	Este estudio Grupo 1	Este estudio Grupo 2	Herrero y cols., 2000 [214]	Evans y cols., 2006 [215]	Kouri y cols., 1998 [209]
Característica del grupo	Lesiones	Población abierta	Población abierta	Lesiones	Lesiones
Lugar de estudio	Monterrey N.L., Mex.	Monterrey N.L., Mex.	Guanacaste Costa Rica.	EUA	Cd. México, Mex.
Tamaño de la muestra	53	157	9,175	300	185
Método de detección	PGMY09/11 Roche	PGMY09/11 Roche	PCR MY09/MY11	PCR GP5+/6+	PCR MY09/MY11
Sin lesión intraepitelial	N/R	29%	N/R	27%	N/R
ASCU-S	50%	0%*	N/R	89.5%	N/R
LIEBG	31.8%	23%	73%	97.5%	33%
LIEAG	52.40%	64%	89%	96.5%	83%
CaCU	63%	100%	86%	N/R	87%

N/R: No reportado

\* Solo se encontraron tres casos.

Teóricamente, todas las lesiones de bajo grado implican una infección por VPH activa, por ende, darían un resultado positivo en estudios de detección del genoma viral [214]. Sin embargo, en nuestros hallazgos, solo se detectó este en el 70% de los casos. Esto pudo haberse debido a errores en la clasificación citológica, en la toma de la muestra, limitaciones de la técnica de detección viral utilizada, o en última instancia a que la lesión se encontrara en un estado de regresión [216].

Aunque en principio nuestros hallazgos de la frecuencia del virus en LIEAG y CaCU resultaron más bajos en comparación a lo reportado por otros autores [47], se requiere incrementar el tamaño de la muestra (29 LIEAG y 11 CaCU) para ver si esta observación se sostiene [85].

### 5.3.2 Frecuencia viral

En el cuadro 21 se puede observar que los genotipos frecuentemente presentes en las lesiones son también comunes en la población general (VPHs 16,18 y 83).

Cuadro 21. Frecuencia de VPH por grupo de estudio.

Tipo	Seguimiento (n=157)			Lesiones (n=52)		
	Simple	Múltiple	Total (%)	Simple	Múltiple	Total (%)
VPH negativo			109 (69.4%)			27 (51.9%)
VPH positivo	35	13	48 (30.6%)	45	7	25 (48.07%)
Oncogénico	22	12	34	20	7	27
No Oncogénico	12	8	20	3	4	7
VPH positivo						
Oncogénico						
16	4	3	7 (10%)	3	6	(23%)
39	6	0	6 (9%)	1	0	(5%)
18	2	2	4 (6%)	5	0	(13%)
59	2	2	4 (6%)	0	0	(0%)
31	1	2	3 (4%)	2	1	(8%)
53	1	2	3 (4%)	0	2	(5%)
56	3	0	3 (4%)	1	0	(10%)
58	1	1	2 (3%)	2	2	(10%)
52	2	0	2 (3%)	0	1	(5%)
73	1	0	1 (1%)	0	0	(0%)
33	0	1	1 (1%)	0	0	(0%)
51	0	1	1 (1%)	0	1	(3%)
70	1	0	1 (1%)	1	0	(3%)
35	0	0	0 (0%)	1	0	(3%)
No						
Oncogénicos						
83	4	3	7 (10%)	1	3	(10%)
62	2	4	6 (9%)	0	1	(3%)
61	4	1	5 (7%)	0	0	(0%)
81	1	2	3 (4%)	0	0	(0%)
66	0	3	3 (4%)	0	0	(0%)
84	1	1	2 (3%)	0	0	(0%)
6	1	0	1 (1%)	2	1	(8%)
69	0	1	1 (1%)	0	0	(0%)
67	1	0	1 (1%)	0	0	(0%)
71	0	1	1 (1%)	0	0	(0%)
55	0	0	0 (0%)	0	0	(0%)
Total	38	30	68	19	18	37

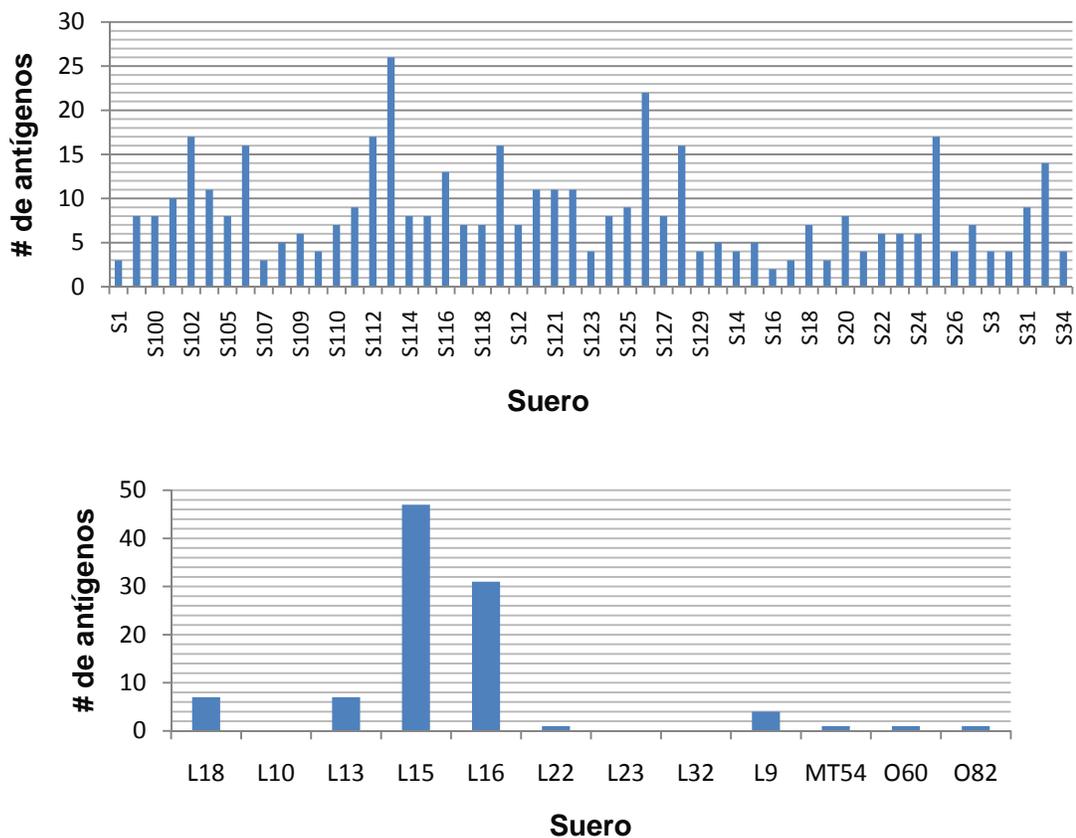
El VPH 83 resultó ocupar junto con el VPH 16 el primer lugar en frecuencia en el grupo de “seguimiento” y el tercer lugar en el grupo de “lesiones”. Este virus se presentó en el 50% (6/12) de las infecciones como co-infección y de estas últimas el 67% (4/6) fueron con VPH 16 (este último presente en más del 50% de los cánceres a nivel mundial [217]). El VPH 83 ha sido reportado por algunos autores como de alto riesgo [208, 218]. Aunque en nuestras investigaciones sobre el tema la presencia de VPH 83 por sí solo no se ha relacionado con CaCU, existe un reporte en la literatura en el que se le asocia con cáncer [218]. Si bien es un reporte aislado, queda por aclarar el papel de este tipo viral en el establecimiento de la infección por VPH 16 y su posible involucramiento en la persistencia y progresión de la misma hacia lesiones malignas.

Estos resultados indican que los virus que predominan en la población son los causantes de la mayoría de los casos de lesiones, reforzando la idea de que la implementación de la detección de VPH como herramienta adicional a los métodos de tamizaje tradicionales, traería consigo un diagnóstico oportuno con mayor sensibilidad y especificidad [126]. Igualmente el que las vacunas dirigidas contra los mismos podrán contribuir a combatir este importante problema de salud pública.

### **5.3.3 Hallazgos preliminares en tumores**

Al extender el análisis a la reducida cantidad de mujeres de ambos grupos que ya manifestaban CaCU se encontró seroprevalencia en el 75% de ellas. Esto parece concordar con lo reportado por algunos autores, en los que se ha encontrado seroprevalencias (anti-E6/E7) del 50% en mujeres con carcinoma *in situ* [219] y hasta del 82% en mujeres con cáncer invasivo [220].

Si consideramos que la herramienta utilizada es capaz de detectar anticuerpos contra 202 proteínas virales, podemos darnos una idea de la intensidad de la respuesta inmune dependiendo de la cantidad de proteínas con las que estos reaccionan, clasificando como leve los sueros que reaccionen con menos de 10 proteínas, moderada de 11 a 20, y fuerte de 21 en adelante. En las pacientes con cáncer que fueron seropositivas su respuesta inmune resultó ser leve en 7 de 9 casos, y alta en dos (figura 40).



**Figura 40. Intensidad de la respuesta inmune.** En la parte superior se muestra la representación gráfica de una serie de sueros del grupo “seguimiento”, siendo posible observar que la mayoría presentan anticuerpos contra una gran variedad de antígenos, contrario a los caso de cáncer (gráfica inferior) donde es evidente la poca reactividad de los mismos en la mayoría de estos, llamando la atención de la intensidad de la respuesta en los dos tumores que se apartan de la tendencia.

#### 5.4 Anticuerpos

En las infecciones virales, el desarrollo de anticuerpos contra epítopes de la superficie del virus en cuestión brindan protección en contra de ésta [221]. Para el caso de los VPs este precepto fue comprobado al demostrar en modelos experimentales, en los que la protección puede ser transferida a animales vírgenes por medio de suero o IgG inducidas por la inmunización con partículas semejantes a virus generadas en el laboratorio. Se ha demostrado que las vacunas formadas por esta clase de VLPs generadas para los VPs humanos y administradas a voluntarios generan altos niveles

de anticuerpos [222] e incluso que reducen la incidencia de la infección [189]. Por este motivo, se incluyó en el alcance de nuestro trabajo el investigar el posible papel de los anticuerpos generados durante una infección natural en el curso de la misma.

#### **5.4.1 Seroprevalencia**

En la mayoría de los estudios sobre seroprevalencia (presencia de anticuerpos en suero) se ha examinado la presencia de anticuerpos mediante pruebas ELISA, ensayos Luminex competitivos (cLIA) y Radio Inmuno Análisis (RIA), entre otros. En los mismos se ha empleado como antígeno precisamente a los VLPs de los VPHs 16 o 18, por lo que a lo más que se puede aspirar es a demostrar la existencia de anticuerpos contra la proteína L1 que es el componente mayoritario de dichas partículas. Por lo que debe destacarse que en nuestro caso al haber tenido acceso a una innovadora metodología de detección de anticuerpos contra todas las proteínas codificadas por el genoma del VPH en 14 tipos virales, nuestros resultados arrojan información sobre la antigenicidad de cerca de 200 proteínas diversas que representan la gama de antígenos virales a los que estuvo expuesta nuestra población. Estos antígenos abarcan polipéptidos tempranos, tardíos y de diferentes tipos virales.

Los resultados del análisis de anticuerpos con el referido microarreglo arrojó seroprevalencias del 66% en el grupo “seguimiento” y del 35% en el grupo “lesiones”, valores que resultaron estadísticamente diferentes y reveladores de una menor cantidad de casos de “lesiones” presentando los anticuerpos anti-VPH en suero.

##### **5.4.1.1 Hallazgos de anticuerpos en el grupo de “seguimiento”**

Este grupo tiene un antecedente de vital importancia; una infección por VPH que data de casi seis años atrás. Diversos autores refieren que la duración de los anticuerpos en suero llega a ser de hasta al menos cinco años [105, 189]. Dado que todas las mujeres de este grupo estuvieron infectadas en la primera visita, los resultados de seroprevalencia obtenidos en esta segunda visita estarían revelando la duración de la respuesta inmune a la infección inicial, sin embargo no podemos descartar que en el curso intermedio de las dos visitas se hubiesen presentado re-infecciones y por lo tanto nuevas producciones de anticuerpos. Los hallazgos de anticuerpos en este grupo

revelaron que el 56% de las mujeres infectadas montaron una respuesta inmune, mientras que el 44% no lo lograron. La observación de que este último grupo de mujeres infectadas inicialmente (2002) ahora resultaran seronegativas (ausencia de anticuerpos en suero), se encuentra bien documentado, ya que según algunos autores aún después de 4 años con una infección persistente puede que jamás se de la seroconversión (presencia de anticuerpos en suero) [129, 223]. Recordemos que la producción de anticuerpos ante la infección viral además de ser un proceso lento y débil no sucede en todas las mujeres [58, 129]. Esto explica en buena parte, el porqué esta grave enfermedad llega a ser una importante causa de muerte a nivel mundial, ya sea debido a que la enfermedad no se detecta a tiempo o debido a que el sistema inmune no tiene la capacidad de ser montado con eficiencia desde un inicio [224].

Otro dato interesante fue que al estratificar el grupo “seguimiento” en infecciones persistentes y transitorias, las últimas resultaron tener una mayor seroprevalencia (50% vs. 69%, respectivamente), sugiriendo que fue gracias a los anticuerpos anti-VPH el que las mujeres en este último grupo pudieron eliminar la infección. Nuevamente este hallazgo de nuestro estudio se suma a otros previos de la literatura revelando el posible papel protector de los anticuerpos en las infecciones por VPH. Entre estos destaca un estudio en mujeres realizado en Estados Unidos de América, donde se demostró que la presencia sostenida de anticuerpos contra VPH 16 estaba asociada con un riesgo reducido de una infección subsecuente con VPH 16 y tipos genéticamente relacionados [155]. Este pudiera ser el caso de las mujeres en nuestro grupo, en las que ocurrió eliminación viral y presencia de anticuerpos. Igualmente, el trabajo de Grujil y cols. revela en su estudio longitudinal que las mujeres que eliminaron la infección se mantuvieron seropositivas, en comparación con las que tenían infección persistente, las cuales se mantuvieron en su mayoría seronegativas [166]. Ambos estudios coinciden con Viscidi y cols., que reporta que un nivel elevado de anticuerpos se asocia con una reducción en el 40% del riesgo de reincidir en infección [152].

Una pregunta que surgió durante nuestras investigaciones fue el saber si había diferencias en cuanto a los tipos de antígenos reconocidos por los anticuerpos de los subgrupos de infecciones persistentes y transitorias en el grupo de “seguimiento”, lo que podría llevar a identificar diferencias en antigenicidad de las proteínas incluidas en

el microarreglo. Esto es de vital importancia, ya que se sabemos de estudios aislados que han abordado el tema del comportamiento de la infección y su relación con las proteínas virales específicas siendo reconocidas por los anticuerpos. Algunos autores han postulado que la presencia de anticuerpos anti-E6/E7 pudiera representar un mayor riesgo a desarrollar CaCU [163], mientras que anticuerpos contra las proteínas tardías L1 y L2, podrían representar marcadores de infección activa o pasada [147] y hasta ser un biomarcador de un buen pronóstico [219]. Otros autores consideran que la presencia de anticuerpos contra la proteína E4 constituye un biomarcador de replicación viral [169]. Aunque se pueden seguir mencionando otros estudios en este tema, es importante destacar que todos ellos analizan un solo antígeno o a lo mucho unos cuantos, a diferencia del presente trabajo, donde, como ya se mencionó se abarcaron todas las proteínas de 14 diferentes tipos virales con el objeto de obtener un valor pronóstico del desenlace de la infección.

#### **5.4.1.2 Hallazgos de anticuerpos en el grupo “lesiones”**

La seroprevalencia en el grupo de estudio “lesiones” fue casi dos veces menor en comparación con el de “seguimiento” (66% vs 35%), sugiriendo que la mayoría de las mujeres cuyas infecciones avanzaron hasta lesiones no montaron una respuesta inmune humoral, si lo hicieron esta no perduro. Interesantemente aunque este hallazgo coincide con los de algunos pocos autores [225], contradice los que muestran la mayoría de los reportes en la literatura, que señalan que a mayor cantidad de anticuerpos, más riesgo a desarrollar lesiones primero y finalmente CaCU [143, 153, 160, 161]. A pesar de que nuestros resultados son claros, aún hace falta incrementar el número de pacientes (53 “lesiones” vs 157 “seguimiento”) para poder tener una conclusión respaldada con una mayor solidez estadística.

#### **5.4.2 Factores asociados a la respuesta inmune humoral**

##### *Estatus de infección por VPH*

Al realizar el análisis en mujeres con infección por VPH activa, se encontró que la seroprevalencia fue de un 50%, coincidiendo con numerosos estudios que reportan que la seroprevalencia de anticuerpos anti-VLPs de VPH-16 varía de un 46 - 59% [144]. En este subgrupo de mujeres VPH positivas, en el 43.8% de las mujeres con

VPH AR y en el 60% de las que presentaban VPH BR se detectaron anticuerpos. Estos porcentajes contradicen la idea de que los VPH de alto riesgo inducen la producción de anticuerpos con mayor frecuencia que los de bajo riesgo propuesta por algunos autores [154], no obstante es difícil comparar estudios debido a las técnicas de detección utilizadas. En mujeres VPH negativas se observó un 63% de seroprevalencia, indicando que los anticuerpos en suero funcionan como marcador no sólo de infección activa, sino también de infecciones pasadas, como lo indican varios autores [150, 226].

### *Lesiones*

Al dividir ambos grupos (“seguimiento” y “lesiones”) en mujeres con lesiones y sin éstas, se observó una diferencia estadísticamente significativa (49% vs 69%), coincidiendo nuevamente en que existe una menor seroprevalencia entre las mujeres que presentan lesiones en comparación con las que no presentan. Resultados similares han sido reportados por Grujil y cols. en 1996, quienes detectaron anticuerpos anti-E7 en grupos de mujeres con y sin lesiones, observando una mayor cantidad de anticuerpos en mujeres de este último grupo [166]. Estos datos coinciden con los publicados por otros autores, en los que se menciona que la presencia de anticuerpos se relaciona inversamente con la presencia de lesiones [39, 223].

### *Edad*

Debido a que el funcionamiento del sistema inmune decrece conforme la edad aumenta, se realizó el análisis de seroprevalencia acorde a tres grupos de edades, el primero abarcando a las de 18-24 años de edad, el segundo a las de 25-35 y por último a las mayores de 36 años. Nuestro estudio revela que las mujeres con mayor seroprevalencia fueron las del grupo de edad intermedio. Diversos autores mencionan que la producción de anticuerpos se ve favorecida en edades entre 18-24 [151], otros entre los 25-30 años de edad [147] y otros más abarcando un rango más amplio, entre 18 y 34 años [154]. Resulta obvio esperar una mayor respuesta inmune en mujeres jóvenes, sin embargo, es importante señalar que la edad promedio de nuestro grupo de estudio fue de 40 ( $DE \pm 12.66$ ) y solamente 29 de 209 (13.9%) mujeres menores de 25 años fueron incluidas en nuestro estudio. Esta pudiera ser la razón de que la seroprevalencia resultara más elevada en las mujeres de 25-35 años en nuestro grupo.

### *Conducta sexual*

La promiscuidad y el IVSA a temprana edad son factores de riesgo muy importantes en la incidencia de la infección por VPH [60, 62]. De igual manera, la presencia de anticuerpos ha sido estrechamente asociada con la conducta sexual, relacionándose en forma directa con el número de parejas sexuales y el IVSA [150]. En el presente trabajo se analizaron ambas variables y los resultados de seroprevalencias en los grupos no mostraron diferencia significativa, al igual que en el caso de la edad, con la mayoría de las mujeres en el estudio reportando dos o menos compañeros sexuales (80%) y más de la mitad de ellas (67%) habiendo iniciado su vida sexual después de los 16 años.

#### **5.4.3 Patrón de anticuerpos**

En el presente estudio se realizó un patrón de anticuerpos que constituye una aportación nunca antes realizado en el campo de la serología del VPH. Aunque no fue posible observar agrupamiento entre los grupos persistente vs los no persistentes, resulta sorprendente como se pueden observar agrupaciones de sueros en función de si son incluidas o no lesiones (figura 34). Este mapa de intensidades de la señal de reactividad del suero con los antígenos corona lo que ha venido emergiendo con anterioridad: las lesiones tienden a tener menos anticuerpos y la intensidad de la señal generada por los mismos es inferior a las reflejadas por las mujeres sin lesiones o con infecciones transitorias. De la misma forma, al realizar el análisis de los componentes principales claramente se observa que las lesiones tienden a agruparse. Esto representa un enorme avance, ya que estos patrones pueden ser utilizados como complemento o *per se* en el diagnóstico de las lesiones causadas por VPH.

#### **5.4.4 Perfil de anticuerpos**

Al realizar el patrón de anticuerpos de las 157 mujeres, fue posible obtener los proteínas más inmunogénicas en el grupo de estudio “seguimiento”, a partir de las mismas y por medio de análisis estadísticos se obtuvo una lista de los antígenos más frecuentemente reconocidos por los anticuerpos de mujeres con infección persistente y

transitoria. Estos análisis revelaron la existencia de nueve proteínas candidatas a ser biomarcadores de eliminación viral. Se esperaba que estos anticuerpos se encontrasen preferentemente en mujeres con infección transitoria y que en las mujeres con infección persistente y lesiones debiesen estar ausentes. Al realizar la búsqueda en estos últimos grupos, se descartaron cuatro proteínas reduciendo la lista a cinco candidatos (VPH 11 E4, VPH16 E4/E7, VPH 18 E7 y VPH 33 L2). La mayoría de estos pertenecen a virus de alto riesgo (a excepción de VPH 11) y son proteínas tempranas (a excepción de VPH 33 L2). La presencia de anticuerpos contra VPH 11 en nuestro caso es de menor relevancia, ya que siendo un virus de bajo riesgo causante de verrugas genitales, su presencia no se asocia con la progresión a lesiones intraepiteliales; sin embargo, los VPHs 16, 18 y 33 son los causantes de la mayoría de los cánceres a nivel mundial [44], resultando trascendental nuestro hallazgo de que las mujeres sin lesiones y capaces de eliminar la infección presentaron preferentemente anticuerpos contra proteínas de estos virus.

#### **5.4.5 Biomarcadores candidatos de eliminación de infecciones por VPH.**

##### *Anticuerpos anti-L1/L2*

Algunos autores mencionan que una respuesta inmune humoral elevada contra la proteína de la cápside L1, es observada en mujeres que eliminan la infección viral [227]. La producción de anticuerpos se espera encontrarse en mayor cantidad en etapas tempranas de la infección, donde las proteínas se producen en mayor cantidad. Un estudio realizado por Heim y cols. en el que se correlaciona la presencia de anticuerpos y la evolución de la enfermedad de pacientes con CaCU, demostró que las tasas de sobrevivencia son mayores en mujeres con anticuerpos anti-VLP, que en aquellas seronegativas [219]. En nuestro estudio, los anticuerpos contra esta proteína no fueron muy comunes, sin embargo, las mujeres que eliminaron la infección presentaron anticuerpos contra la proteína tardía L2, la cual es mencionada por muchos autores como una proteína más inmunogénica que la L1 [170, 177] y con mayor cantidad de epítopes compartidos (mayor reacción cruzada) [176, 228].

##### *Anticuerpos anti-E4*

Estudios de anticuerpos contra proteínas tempranas como la E4, han sido referidos por algunos autores previamente, más ninguno con objeto de describir la persistencia viral,

sino más bien como marcador de replicación viral [173, 229]. No obstante, los resultados han sido inconsistentes entre algunos estudios revelando porcentajes de aproximadamente 40% de positividad anti-E4 en sujetos infectados y sin valor como marcador de infección actual [174]. En el presente estudio, los anticuerpos anti-E4 parecen ser biomarcadores de eliminación viral, ya que la mayoría de las pacientes con infección transitoria los presentan y están ausentes en las lesiones.

#### *Anticuerpos anti-E7*

Se conoce que la oncoproteína E7 es producida en mayor cantidad en lesiones de alto grado y CaCU, por lo tanto es lógico suponer que debería existir una exposición constante de esta proteína en etapas tardías de la enfermedad [230]. Los anticuerpos anti-E7 se han descrito como marcadores de progresión a CaCU, ya que son encontrados en casi el 50% de los cánceres [163]. Interesantemente, nuestros resultados sugieren que puede ser un biomarcador de eliminación viral estando ausente en la mayoría de los cánceres estudiados. Esto pudiera significar que existe un reconocimiento temprano de la oncoproteína y que ello contribuye a que el sistema inmune tiene la capacidad de eliminar la infección.

No se omite mencionar que la validación de estos biomarcadores es urgente, para lo cual en nuestro grupo se continúa reclutando mujeres de los diferentes grupos aquí descritos, a las que se les realizará un monitoreo de sus anticuerpos en suero y un seguimiento más estrecho.

#### **5.4.6 Alelos HLA y su asociación con la presencia de anticuerpos**

A los alelos de los genes del HLA se les ha asignado un papel clave en el montaje de una respuesta inmune adecuada y en la presentación apropiada de los péptidos virales para el éxito de la misma [156]. Aprovechando que a nuestro grupo de estudio “seguimiento” un trabajo paralelo al presente de nuestro laboratorio le determinó a las mujeres los alelos de sus genes HLA DQB, otra pregunta que fue planteada fue el investigar la posible asociación entre estos y la presencia de los anticuerpos aquí estudiada. Nuestros hallazgos no revelaron asociación significativa alguna entre los alelos previamente tipificado (HLA DQB1\*201/204, DQB1\*602, DQB1\*301/13, DQB1\*202) y la presencia de anticuerpos. No deja de llamar la atención nuestro

resultado a la luz del estudio de Sanjeevi y cols. en el que se demostró que existe una fuerte asociación entre el alelo DQB1\*602 y la producción de anticuerpos [231], así como en el de Grujil y cols. con los alelos DQB1\*0301 y DQB1\*0501 [158]. Esta discrepancia puede resultar de las limitantes de nuestro estudio sobre alelos de HLA y persistencia viral, pues a decir de los expertos que colaboraron en esa parte, el tamaño de muestra aún no era suficiente, por lo que resolver esta paradoja tendrá que esperar al avance de nuestras investigaciones (en virtud de la multiplicidad de alelos y el tamaño reducido de la muestra).

## CAPITULO VI. CONCLUSIONES

El estudio de mujeres de los grupos “seguimiento” y de “lesiones” por separado y comparativo permite concluir que:

- La frecuencia viral detectada en el grupo de seguimiento a seis años aumentó en un 50% (20% vs. 30.6%, respectivamente).
- La persistencia viral se asoció principalmente a virus de alto riesgo.
- Al comparar el grupo de seguimiento con el grupo de lesiones ya establecidas la frecuencia viral fue mayor en este último.
- Hubo una concordancia entre los tipos virales encontrados como más frecuentes en la población general y en las lesiones, siendo encabezados por los VPVs 16, 83 y 18.
- En ambos grupos de estudios los únicos factores epidemiológicos asociados estadísticamente con la incidencia y la persistencia viral fueron el tabaquismo y el inicio de vida sexual antes de los 16 años.
- Se encontró que la mayoría de las mujeres con lesiones no presenta anticuerpos (34% “lesiones” vs 66% sin lesiones).
- Al haber incluido en nuestras investigaciones el grupo “lesiones”, fue posible anticipar la evolución de la infección viral y poder usarlo como un control para validar conclusiones a las que se llegó con el grupo de seguimiento.
- La comparación de ambos grupos permitió la identificación como potenciales biomarcadores para eliminación de la infección viral a cinco proteínas virales al estar éstas presentes en las mujeres con infección transitoria y ausentes en mujeres con persistencia viral y lesiones.

---

*Determinación de anticuerpos anti-VPH y su asociación con el pronóstico de la infección viral*

- No se encontró asociación entre los alelos HLA y la producción de anticuerpos en nuestro grupo de estudio.
- Una vez plenamente validados, ampliando nuestras investigaciones los biomarcadores potenciales aquí descubiertos se sumarían al valor de la detección molecular del VPH para una detección y pronóstico oportunos que permitan reducir el impacto del CaCU en nuestras mujeres.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Luciani, S., Winkler J., Cervical Cancer Prevention in Peru: lessons learned from the TATI demonstration project. Washington, OPS, 2006.
2. Gage, J.C. y cols., Follow-up care of women with an abnormal cytology in a low-resource setting. *Cancer Detect Prev*, 2003. 27(6): p. 466-71.
3. Organización Panamericana de la Salud, América Latina y el Caribe, 2008 a 2015. in *Estrategia y plan de acción regionales para la prevención y el control del cáncer cervicouterino*. 2007. Washington, D.C., EUA: 140.a Sesión del Comité Ejecutivo.
4. Sankaranarayanan, R. y cols., A cluster randomized controlled trial of visual, cytology and human papillomavirus screening for cancer of the cervix in rural India. *Int J Cancer*, 2005. 116(4): p. 617-23.
5. Goldie, S.J. y cols., Cost-effectiveness of cervical-cancer screening in five developing countries. *N Engl J Med*, 2005. 353(20): p. 2158-68.
6. Gaffikin, L. y cols., Safety, acceptability, and feasibility of a single-visit approach to cervical-cancer prevention in rural Thailand: a demonstration project. *Lancet*, 2003. 361(9360): p. 814-20.
7. Denny, L. y cols., Screen-and-treat approaches for cervical cancer prevention in low-resource settings: a randomized controlled trial. *Jama*, 2005. 294(17): p. 2173-81.
8. Sankaranarayanan, R. y cols., A critical assessment of screening methods for cervical neoplasia. *Int J Gynaecol Obstet*, 2005. 89 Suppl 2: p. S4-S12.
9. Jacob, M. y cols., Experience using cryotherapy for treatment of cervical precancerous lesions in low-resource settings. *Int J Gynaecol Obstet*, 2005. 89 Suppl 2: p. S13-20.
10. Maciag, P.C. y cols., Major histocompatibility complex class II polymorphisms and risk of cervical cancer and human papillomavirus infection in Brazilian women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2000. 9(11): p. 1183-91.
11. Epidemiología, D.G.d., Registro Histopatológico de Neoplasias en México. 1999, Secretaría de Salud de México p. 15-28.
12. Institute, T.N.C. Cancer Definitions. 1998 [cited March 17 2008]; Available from: [http://www.webmd.com/content/article/8/1680\\_50151.htm](http://www.webmd.com/content/article/8/1680_50151.htm).
13. Grizzi, F. and M. Chiriva-Internati, Cancer: looking for simplicity and finding complexity. *Cancer Cell Int*, 2006. 6: p. 4.
14. Dillner, J., Trends over time in the incidence of cervical neoplasia in comparison to trends over time in human papillomavirus infection. *J Clin Virol*, 2000. 19(1-2): p. 7-23.
15. Robles, S.C., F. White, and A. Peruga, Trends in cervical cancer mortality in the Americas. *Bull Pan Am Health Organ*, 1996. 30(4): p. 290-301.
16. Agency for Health Care Policy and Research Evaluation of cervical cytology. Technology Assessment Report No. 5. 1999 [cited; Available from: <http://www.ahcpr.gov/clinic/tp/cervtp.htm>].

17. Ostor, A., Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gyn Path*, 1993(12): p. 186-92.
18. IARC, Cancer incidence in five continents. Volume VII. *IARC Sci Publ*, 1997(143): p. i-xxxiv, 1-1240.
19. Parkin, D.M. y cols., Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, 2005. 55(2): p. 74-108.
20. Castellanos, M., Cáncer cervicouterino y el VPH. Opciones de detección. *Rev Fac Med UNAM*, 2003. 46: p. 63-66.
21. INEGI, Información sobre tumores malignos. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, 2006.
22. Salud, O.P.d.I., Manual de normas y procedimientos para el control del cáncer de cuello uterino. Washington, DC, 1990. Serie: PALTEX(No. 6).
23. Cancer, W.H.O.I.A.f.R.o. Globocan 2002. 2002 [cited 2008 17 March 2008].
24. Gonzalo Gutiérrez-Trujillo, H.R.-M., Análisis del descenso de la mortalidad por cáncer cervicouterino en el IMSS, 1991-2005. *rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 2006. Supl 1: p. s129-134.
25. Atlas de ginecología. [cited 2008 March 18 2008]; Available from: <http://www.iqb.es/ginecologia/atlas/utero/cuello/clasificacion01.htm>.
26. Benedet, J.L. y cols., Carcinoma of the cervix uteri. *Int J Gynaecol Obstet*, 2003. 83 Suppl 1: p. 41-78.
27. JC, R., The pathological diagnosis of incipient carcinoma of the uterus. *Am J Obstet Gynecol*, 1910. 62: p. 668.
28. Broders, A., Carcinoma in situ contrasting with benign infiltrating epithelium. *JAMA*. 99:: p. 1670- 1932.
29. Galvin GA, T.L.R., Present day status of non-invasive cervical carcinoma. *Am J Obstet Gynecol Oncol*, 1949. 57: p. 15.
30. Richart, R., Cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Ann*, 1973. 8: p. 301.
31. Richart, R., A Theory of Cervical Carcinogenesis. *Ostet and Gynec Surv*, 1969. 24: p. 874.
32. The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytological diagnoses. National Cancer Institute Workshop. *Jama*, 1989. 262(7): p. 931-4.
33. The Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses: revised after the second National Cancer Institute Workshop, April 29-30, 1991. *Acta Cytol*, 1993. 37(2): p. 115-24.
34. Valente, P.T., Update on the Bethesda System for reporting cervical/vaginal diagnoses. *Cancer Treat Res*, 1994. 70: p. 15-28.
35. Solomon, D. y cols., The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *Jama*, 2002. 287(16): p. 2114-9.
36. Christine Bergeron, M., The 2001 Bethesda System. *Salud Publica Mex* 2003, 2003. 45(3): p. S340-S344.
37. Pelea, C.L., Nomenclatura de las lesiones cervicales (de Papanicolau a Bethesda 2001). *REV ESP PATOL*, 2003. 36(1): p. 5-10.

38. Chen, Y.C. and D.J. Hunter, Molecular epidemiology of cancer. *CA Cancer J Clin*, 2005. 55(1): p. 45-54; quiz 57.
39. Bosch, F.X. y cols., The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*, 2002. 55(4): p. 244-65.
40. CH., H., *Current Obstetric & Gynecologic Diagnosis & Treatment, Premalignant & Malignant Disorders of the Uterine Cervix*. 9th ed ed, ed. N.L. DeCherney AH, eds. 2003, New York, NY: Lange Medical Books/McGraw-Hill. 894-915.
41. de Villiers, E.M., L. Gissmann, and H. zur Hausen, Molecular cloning of viral DNA from human genital warts. *J Virol*, 1981. 40(3): p. 932-5.
42. zur Hausen, H., Papillomaviruses in human cancers. *Proc Assoc Am Physicians*, 1999. 111(6): p. 581-7.
43. zur Hausen, H., Human genital cancer: synergism between two virus infections or synergism between a virus infection and initiating events? *Lancet*, 1982. 2(8312): p. 1370-2.
44. Munoz, N. y cols., Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, 2003. 348(6): p. 518-27.
45. Bosch, F.X. and N. Munoz, The viral etiology of cervical cancer. *Virus Res*, 2002. 89(2): p. 183-90.
46. Villa, L.L., Human papillomaviruses and cervical cancer. *Adv Cancer Res*, 1997. 71: p. 321-41.
47. Walboomers, J.M. y cols., Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*, 1999. 189(1): p. 12-9.
48. Holowaty, P. y cols., Natural history of dysplasia of the uterine cervix. *J Natl Cancer Inst*, 1999. 91(3): p. 252-8.
49. Ho, G.Y. y cols., Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst*, 1995. 87(18): p. 1365-71.
50. Ho, G.Y. y cols., Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med*, 1998. 338(7): p. 423-8.
51. Schiffman, M. y cols., The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology*, 2005. 337(1): p. 76-84.
52. Hildesheim, A. y cols., Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *J Infect Dis*, 1994. 169(2): p. 235-40.
53. Gorodeski, G.I. y cols., Human uterine cervical epithelial cells grown on permeable support--a new model for the study of differentiation. *Differentiation*, 1994. 56(1-2): p. 107-18.
54. Hatch KD, B.J., *Intraepithelial Disease of the Cervix, Vagina, and Vulva*. Novak's Gynecology, ed. P. Lippincott Williams & Wilkins, PA. 2002. 471-505.
55. Virus del papiloma humano: Información sobre el VPH para los médicos. Agosto de 2007, Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC).
56. VPH – El virus por transmisión sexual más común. Planned Parenthood.

57. Bonnez W, R.R., Papillomaviruses. Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th ed. 2005: andell, Douglas, Bennett M. 1841-1856.
58. Ho, G.Y. y cols., Natural history of human papillomavirus type 16 virus-like particle antibodies in young women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2004. 13(1): p. 110-6.
59. Moscicki, A.B. y cols., Persistence of human papillomavirus infection in HIV-infected and -uninfected adolescent girls: risk factors and differences, by phylogenetic type. *J Infect Dis*, 2004. 190(1): p. 37-45.
60. Burk, R.D. y cols., Sexual behavior and partner characteristics are the predominant risk factors for genital human papillomavirus infection in young women. *J Infect Dis*, 1996. 174(4): p. 679-89.
61. Sellors, J.W. y cols., Incidence, clearance and predictors of human papillomavirus infection in women. *Cmaj*, 2003. 168(4): p. 421-5.
62. Moscicki, A.B. y cols., Risks for incident human papillomavirus infection and low-grade squamous intraepithelial lesion development in young females. *Jama*, 2001. 285(23): p. 2995-3002.
63. Adam, E. y cols., Papillomavirus detection: demographic and behavioral characteristics influencing the identification of cervical disease. *Am J Obstet Gynecol*, 2000. 182(2): p. 257-64.
64. Burk, R.D. y cols., Declining prevalence of cervicovaginal human papillomavirus infection with age is independent of other risk factors. *Sex Transm Dis*, 1996. 23(4): p. 333-41.
65. Muñoz N, F.S., Bosetti C, Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet*, 2002. 359(9312): p. 1093-1101.
66. Brinton LA, R.W., Brenes MM Parity as a risk factor for cervical cancer. *American Journal of Epidemiology*, 1989. 130: p. 486-496.
67. Thomas DB, Q.Q., Kuypers J, Human papillomavirus and cervical cancer in Bangkok. Risk factors for in situ and invasive squamous cell cervical carcinomas. . *American Journal of Epidemiology*, 2001. 153: p. 732-739.
68. Moreno V, B.F., Muñoz N Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. . *Lancet* 2002. 359(9312): p. 1085-1092.
69. Hildesheim A, H.R., Castle PE, HPV co-factors related to the development of cervical cancer: results from a population-based study in Costa Rica. *British Journal of Cancer*, 2001. 84(9): p. 1219-1226.
70. Szarewski A, C.J., Smoking and cervical neoplasia: a review of the evidence. *Journal of Epidemiological Biostatistics*, 1998. 3: p. 229-256.
71. Coker, A.L. y cols., Active and passive smoking, high-risk human papillomaviruses and cervical neoplasia. *Cancer Detect Prev*, 2002. 26(2): p. 121-8.
72. Castellsagué X, B.F., Muñoz, N., Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. . *Virus Research* 2002. 89(2): p. 191-199.

73. Piyathilake, C.J. y cols., Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism increases the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Anticancer Res*, 2000. 20(3A): p. 1751-7.
74. Dos Santos IS, B.V., Socio-economic differences in reproductive behaviour. IARC Scientific Publications, 1997. 138(285-308).
75. Jastreboff, A.M. and T. Cymet, Role of the human papilloma virus in the development of cervical intraepithelial neoplasia and malignancy. *Postgrad Med J*, 2002. 78(918): p. 225-8.
76. Manos, M.M. y cols., Identifying women with cervical neoplasia: using human papillomavirus DNA testing for equivocal Papanicolaou results. *Jama*, 1999. 281(17): p. 1605-10.
77. Lonky, N.M. y cols., Triage of atypical squamous cells of undetermined significance with hybrid capture II: colposcopy and histologic human papillomavirus correlation. *Obstet Gynecol*, 2003. 101(3): p. 481-9.
78. Bergeron, C. y cols., Human papillomavirus testing in women with mild cytologic atypia. *Obstet Gynecol*, 2000. 95(6 Pt 1): p. 821-7.
79. Solís, C., Manejo del cáncer cérvico uterino localmente avanzado. *Rev Chil Obst Ginecol*, 2006. 71(5): p. 349-356.
80. de Villiers, E.M. y cols., Classification of papillomaviruses. *Virology*, 2004. 324(1): p. 17-27.
81. HPV handbook 1: Human papillomavirus and cervical cancer. Taylor & Francis Group. Walter Prendiville and Philip Davies.
82. Klumpp, D.J. and L.A. Laimins, Differentiation-induced changes in promoter usage for transcripts encoding the human papillomavirus type 31 replication protein E1. *Virology*, 1999. 257(1): p. 239-46.
83. Ozbun, M.A. and C. Meyers, Characterization of late gene transcripts expressed during vegetative replication of human papillomavirus type 31b. *J Virol*, 1997. 71(7): p. 5161-72.
84. Hans-Ulrich, B., The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J. of Clinical Virology*, 2005. 32S: p. S1-S6.
85. Alejandro López Saavedra, M.L.S., Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. *Cancerología*, 2006. 1: p. 31-55.
86. Calleja-Macias, I.E. y cols., Genomic diversity of human papillomavirus-16, 18, 31, and 35 isolates in a Mexican population and relationship to European, African, and Native American variants. *Virology*, 2004. 319(2): p. 315-23.
87. Ho, L. y cols., The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *J Virol*, 1993. 67(11): p. 6413-23.
88. Ong, C.K. y cols., Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *J Virol*, 1993. 67(11): p. 6424-31.
89. Yamada, T. y cols., Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol*, 1997. 71(3): p. 2463-72.

90. Stoppler, M.C. y cols., Natural variants of the human papillomavirus type 16 E6 protein differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation. *J Virol*, 1996. 70(10): p. 6987-93.
91. Berumen, J. y cols., Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J Natl Cancer Inst*, 2001. 93(17): p. 1325-30.
92. Da Costa, M.M. y cols., Increased risk of high-grade anal neoplasia associated with a human papillomavirus type 16 E6 sequence variant. *J Infect Dis*, 2002. 185(9): p. 1229-37.
93. Wheeler, C.M. y cols., Human papillomavirus type 16 sequence variants: identification by E6 and L1 lineage-specific hybridization. *J Clin Microbiol*, 1997. 35(1): p. 11-9.
94. Villa, L.L. y cols., Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol*, 2000. 81(Pt 12): p. 2959-68.
95. Kammer, C. y cols., 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(Pt 8): p. 1975-81.
96. Slichero, L., E.L. Franco, and L.L. Villa, Different P105 promoter activities among natural variants of human papillomavirus type 18. *J Infect Dis*, 2005. 191(5): p. 739-42.
97. Evander, M. y cols., Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol*, 1997. 71(3): p. 2449-56.
98. Giroglou, T. y cols., Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol*, 2001. 75(3): p. 1565-70.
99. Yoon, C.S. y cols., alpha(6) Integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. 283(3): p. 668-73.
100. Day, P.M., D.R. Lowy, and J.T. Schiller, Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology*, 2003. 307(1): p. 1-11.
101. Li, M. y cols., Intercapsomeric disulfide bonds in papillomavirus assembly and disassembly. *J Virol*, 1998. 72(3): p. 2160-7.
102. Wilson, V.G. y cols., Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus Genes*, 2002. 24(3): p. 275-90.
103. Sherman, L. y cols., Inhibition of serum- and calcium-induced differentiation of human keratinocytes by HPV16 E6 oncoprotein: role of p53 inactivation. *Virology*, 1997. 237(2): p. 296-306.
104. Doorbar, J. y cols., Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature*, 1991. 352(6338): p. 824-7.
105. Frazer, I.H., Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev Immunol*, 2004. 4(1): p. 46-54.
106. Cuzick, J. y cols., Human papillomavirus testing in primary cervical screening. *Lancet*, 1995. 345(8964): p. 1533-6.

107. Remmink, A.J. y cols., The presence of persistent high-risk HPV genotypes in dysplastic cervical lesions is associated with progressive disease: natural history up to 36 months. *Int J Cancer*, 1995. 61(3): p. 306-11.
108. Meijer, C.J. y cols., Detection of human papillomavirus in cervical scrapes by the polymerase chain reaction in relation to cytology: possible implications for cervical cancer screening. *IARC Sci Publ*, 1992(119): p. 271-81.
109. Bollen, L.J. y cols., Clearance of cervical human papillomavirus infection by treatment for cervical dysplasia. *Sex Transm Dis*, 1997. 24(8): p. 456-60.
110. Bulkman, N.W. y cols., POBASCAM, a population-based randomized controlled trial for implementation of high-risk HPV testing in cervical screening: design, methods and baseline data of 44,102 women. *Int J Cancer*, 2004. 110(1): p. 94-101.
111. Cox, J.T. y cols., Human papillomavirus testing by hybrid capture appears to be useful in triaging women with a cytologic diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance. *Am J Obstet Gynecol*, 1995. 172(3): p. 946-54.
112. Kobelin, M.H. y cols., Incidence and predictors of cervical dysplasia in patients with minimally abnormal Papanicolaou smears. *Obstet Gynecol*, 1998. 92(3): p. 356-9.
113. Solomon, D., M. Schiffman, and R. Tarone, Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance: baseline results from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst*, 2001. 93(4): p. 293-9.
114. Kornegay, J.R. y cols., Nonisotopic detection of human papillomavirus DNA in clinical specimens using a consensus PCR and a generic probe mix in an enzyme-linked immunosorbent assay format. *J Clin Microbiol*, 2001. 39(10): p. 3530-6.
115. Chan, P.K. y cols., Biases in human papillomavirus genotype prevalence assessment associated with commonly used consensus primers. *Int J Cancer*, 2006. 118(1): p. 243-5.
116. Vernon, S.D., E.R. Unger, and D. Williams, Comparison of human papillomavirus detection and typing by cycle sequencing, line blotting, and hybrid capture. *J Clin Microbiol*, 2000. 38(2): p. 651-5.
117. Josefsson, A., K. Livak, and U. Gyllensten, Detection and quantitation of human papillomavirus by using the fluorescent 5' exonuclease assay. *J Clin Microbiol*, 1999. 37(3): p. 490-6.
118. Baseman, J.G. y cols., Evaluation of primary cervical cancer screening with an oncogenic human papillomavirus DNA test and cervical cytologic findings among women who attended family planning clinics in the United States. *Am J Obstet Gynecol*, 2008.
119. Belinson, J. y cols., Shanxi Province Cervical Cancer Screening Study: a cross-sectional comparative trial of multiple techniques to detect cervical neoplasia. *Gynecol Oncol*, 2001. 83(2): p. 439-44.
120. Kulasingam, S.L. y cols., Evaluation of human papillomavirus testing in primary screening for cervical abnormalities: comparison of sensitivity, specificity, and frequency of referral. *Jama*, 2002. 288(14): p. 1749-57.
121. Saslow, D. y cols., American Cancer Society guideline for the early detection of cervical neoplasia and cancer. *CA Cancer J Clin*, 2002. 52(6): p. 342-62.

122. Cuzick, J. y cols., Chapter 10: New dimensions in cervical cancer screening. *Vaccine*, 2006. 24 Suppl 3: p. S90-7.
123. Koliopoulos, G. y cols., Diagnostic accuracy of human papillomavirus testing in primary cervical screening: a systematic review and meta-analysis of non-randomized studies. *Gynecol Oncol*, 2007. 104(1): p. 232-46.
124. Cuzick, J. y cols., Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer*, 2006. 119(5): p. 1095-101.
125. ACOG Practice Bulletin. Clinical Management Guidelines for Obstetrician-Gynecologists. Number 61, April 2005. Human papillomavirus. *Obstet Gynecol*, 2005. 105(4): p. 905-18.
126. Khan, M.J.y cols., The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst*, 2005. 97(14): p. 1072-9.
127. Schlecht, N.F.y cols., Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *Jama*, 2001. 286(24): p. 3106-14.
128. Alvarez, R.D. and T.C. Wright, Effective cervical neoplasia detection with a novel optical detection system: a randomized trial. *Gynecol Oncol*, 2007. 104(2): p. 281-9.
129. Frazer, I., Correlating immunity with protection for HPV infection. *Int J Infect Dis*, 2007. 11 Suppl 2: p. S10-6.
130. Nickoloff, B.J.y cols., Antiproliferative effects of recombinant alpha- and gamma-interferons on cultured human keratinocytes. *Lab Invest*, 1984. 51(6): p. 697-701.
131. Klein, J. and A. Sato, The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med*, 2000. 343(10): p. 702-9.
132. Frazer, I.H. y cols., Potential strategies utilised by papillomavirus to evade host immunity. *Immunol Rev*, 1999. 168: p. 131-42.
133. Einstein, M.H., Acquired immune response to oncogenic human papillomavirus associated with prophylactic cervical cancer vaccines. *Cancer Immunol Immunother*, 2008. 57(4): p. 443-51.
134. McHeyzer-Williams, L.J. and M.G. McHeyzer-Williams, Antigen-specific memory B cell development. *Annu Rev Immunol*, 2005. 23: p. 487-513.
135. Lutzner, M.A., Papillomavirus lesions in immunodepression and immunosuppression. *Clin Dermatol*, 1985. 3(4): p. 165-9.
136. Ghim, S. y cols., Spontaneously regressing oral papillomas induce systemic antibodies that neutralize canine oral papillomavirus. *Exp Mol Pathol*, 2000. 68(3): p. 147-51.
137. Schiffman, M. and S.K. Kjaer, Chapter 2: Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 2003(31): p. 14-9.
138. Klasse, P.J. and Q.J. Sattentau, Mechanisms of virus neutralization by antibody. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2001. 260: p. 87-108.
139. Konya, J. and J. Dillner, Immunity to oncogenic human papillomaviruses. *Adv Cancer Res*, 2001. 82: p. 205-38.

140. Harper, D.M. y cols., Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. *Lancet*, 2006. 367(9518): p. 1247-55.
141. Lowy, D.R. and J.T. Schiller, Papillomaviruses: prophylactic vaccine prospects. *Biochim Biophys Acta*, 1999. 1423(1): p. M1-8.
142. Carter, J.J. y cols., Use of human papillomavirus type 6 capsids to detect antibodies in people with genital warts. *J Infect Dis*, 1995. 172(1): p. 11-8.
143. Carter, J.J. y cols., The natural history of human papillomavirus type 16 capsid antibodies among a cohort of university women. *J Infect Dis*, 1996. 174(5): p. 927-36.
144. Carter, J.J. y cols., Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. *J Infect Dis*, 2000. 181(6): p. 1911-9.
145. Studentsov, Y.Y. y cols., Polymer-based enzyme-linked immunosorbent assay using human papillomavirus type 16 (HPV16) virus-like particles detects HPV16 clade-specific serologic responses. *J Clin Microbiol*, 2003. 41(7): p. 2827-34.
146. Wideroff, L. y cols., Epidemiologic determinants of seroreactivity to human papillomavirus (HPV) type 16 virus-like particles in cervical HPV-16 DNA-positive and-negative women. *J Infect Dis*, 1996. 174(5): p. 937-43.
147. Viscidi, R.P. y cols., 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*, 1997. 4(2): p. 122-6.
148. Kirnbauer, R. y cols., 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*, 1994. 86(7): p. 494-9.
149. Clifford, G.M. y cols., Serologic response to oncogenic human papillomavirus types in male and female university students in Busan, South Korea. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2007. 16(9): p. 1874-9.
150. Touze, A. y cols., Prevalence of anti-human papillomavirus type 16, 18, 31, and 58 virus-like particles in women in the general population and in prostitutes. *J Clin Microbiol*, 2001. 39(12): p. 4344-8.
151. Wang, S.S. y cols., Determinants of human papillomavirus 16 serological conversion and persistence in a population-based cohort of 10 000 women in Costa Rica. *Br J Cancer*, 2004. 91(7): p. 1269-74.
152. Viscidi, R.P. y cols., Seroreactivity to human papillomavirus (HPV) types 16, 18, or 31 and risk of subsequent HPV infection: results from a population-based study in Costa Rica. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2004. 13(2): p. 324-7.
153. Lehtinen, M. y cols., Serologically diagnosed infection with human papillomavirus type 16 and risk for subsequent development of cervical carcinoma: nested case-control study. *Bmj*, 1996. 312(7030): p. 537-9.
154. Sitas, F. y cols., The relationship between anti-HPV-16 IgG seropositivity and cancer of the cervix, anogenital organs, oral cavity and pharynx, oesophagus and prostate in a black South African population. *Infect Agent Cancer*, 2007. 2: p. 6.

155. Ho, G.Y. y cols., Risk factors for subsequent cervicovaginal human papillomavirus (HPV) infection and the protective role of antibodies to HPV-16 virus-like particles. *J Infect Dis*, 2002. 186(6): p. 737-42.
156. Helland, A. y cols., DQA1 and DQB1 genes in patients with squamous cell carcinoma of the cervix: relationship to human papillomavirus infection and prognosis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1994. 3(6): p. 479-86.
157. Hildesheim, A. and S.S. Wang, Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review. *Virus Res*, 2002. 89(2): p. 229-40.
158. de Gruijl, T.D. y cols., Immune responses against human papillomavirus (HPV) type 16 virus-like particles in a cohort study of women with cervical intraepithelial neoplasia. I. Differential T-helper and IgG responses in relation to HPV infection and disease outcome. *J Gen Virol*, 1999. 80 ( Pt 2): p. 399-408.
159. Suzich, J.A. y cols., Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(25): p. 11553-7.
160. Dillner, J., Mapping of linear epitopes of human papillomavirus type 16: the E1, E2, E4, E5, E6 and E7 open reading frames. *Int J Cancer*, 1990. 46(4): p. 703-11.
161. Mann, V.M. y cols., Occurrence of IgA and IgG antibodies to select peptides representing human papillomavirus type 16 among cervical cancer cases and controls. *Cancer Res*, 1990. 50(24): p. 7815-9.
162. Meschede, W. y cols., Antibodies against early proteins of human papillomaviruses as diagnostic markers for invasive cervical cancer. *J Clin Microbiol*, 1998. 36(2): p. 475-80.
163. Muller, M. y cols., Antibodies to HPV-16 E6 and E7 proteins as markers for HPV-16-associated invasive cervical cancer. *Virology*, 1992. 187(2): p. 508-14.
164. Stacey, S.N. y cols., Expression of human papillomavirus type 16 E6 protein by recombinant baculovirus and use for detection of anti-E6 antibodies in human sera. *J Gen Virol*, 1992. 73 ( Pt 9): p. 2337-45.
165. Nindl, I. y cols., Absence of antibody against human papillomavirus type 16 E6 and E7 in patients with cervical cancer is independent of sequence variations. *J Infect Dis*, 2000. 181(5): p. 1764-7.
166. de Gruijl, T.D. y cols., Analysis of IgG reactivity against Human Papillomavirus type-16 E7 in patients with cervical intraepithelial neoplasia indicates an association with clearance of viral infection: results of a prospective study. *Int J Cancer*, 1996. 68(6): p. 731-8.
167. Ghim, S.J., P.S. Basu, and A. Jenson, Cervical Cancer: Etiology, Pathogenesis, Treatment, and Future Vaccines. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2002. 3(3): p. 207-214.
168. Rosales, R., M. Lopez-Contreras, and R.R. Cortes, 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*, 2001. 65(4): p. 736-44.
169. Gaarenstroom, K.N. y cols., Prognostic significance of serum antibodies to human papillomavirus-16 E4 and E7 peptides in cervical cancer. *Cancer*, 1994. 74(8): p. 2307-13.

170. Park, J.S. y cols., HPV-16-related proteins as the serologic markers in cervical neoplasia. *Gynecol Oncol*, 1998. 69(1): p. 47-55.
171. Rocha-Zavaleta L, J.D., Pepper S, Corbitt G, Clarke F, Maitland NJ and e. al., Difference in serological IgA responses to recombinant baculovirus derived human papillomavirus E2 protein in the natural history of cervical neoplasia. *Br J Cancer*, 1997. 75: p. 1144-1150.
172. Stanley, M., N. Coleman, and M. Chambers, The host response to lesions induced by human papillomavirus. *Ciba Found Symp*, 1994. 187: p. 21-32; discussion 32-44.
173. Muller, M. y cols., Papillomavirus capsid binding and uptake by cells from different tissues and species. *J Virol*, 1995. 69(2): p. 948-54.
174. Kanda, T. y cols., Independent association of antibodies against human papillomavirus type 16 E1/E4 and E7 proteins with cervical cancer. *Virology*, 1992. 190(2): p. 724-32.
175. Walboomers, J.M. and C.J. Meijer, Do HPV-negative cervical carcinomas exist? *J Pathol*, 1997. 181(3): p. 253-4.
176. Di Bonito, P. y cols., 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: p. 6.
177. Roden, R.B. y cols., Neutralization of bovine papillomavirus by antibodies to L1 and L2 capsid proteins. *J Virol*, 1994. 68(11): p. 7570-4.
178. Roden, R.B. y cols., In vitro generation and type-specific neutralization of a human papillomavirus type 16 virion pseudotype. *J Virol*, 1996. 70(9): p. 5875-83.
179. Bonnef, W. y cols., Propagation of human papillomavirus type 11 in human xenografts using the severe combined immunodeficiency (SCID) mouse and comparison to the nude mouse model. *Virology*, 1993. 197(1): p. 455-8.
180. Christensen, N.D. y cols., Detection of human serum antibodies that neutralize infectious human papillomavirus type 11 virions. *J Gen Virol*, 1992. 73 ( Pt 5): p. 1261-7.
181. Christensen, N.D. y cols., Monoclonal antibodies to HPV-6 L1 virus-like particles identify conformational and linear neutralizing epitopes on HPV-11 in addition to type-specific epitopes on HPV-6. *Virology*, 1996. 224(2): p. 477-86.
182. Giroglou, T. y cols., Immunological analyses of human papillomavirus capsids. *Vaccine*, 2001. 19(13-14): p. 1783-93.
183. Combita, A.L. y cols., Identification of two cross-neutralizing linear epitopes within the L1 major capsid protein of human papillomaviruses. *J Virol*, 2002. 76(13): p. 6480-6.
184. Lenz, P., D.R. Lowy, and J.T. Schiller, Papillomavirus virus-like particles induce cytokines characteristic of innate immune responses in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol*, 2005. 35(5): p. 1548-56.
185. Steinbrook, R., The potential of human papillomavirus vaccines. *N Engl J Med*, 2006. 354(11): p. 1109-12.

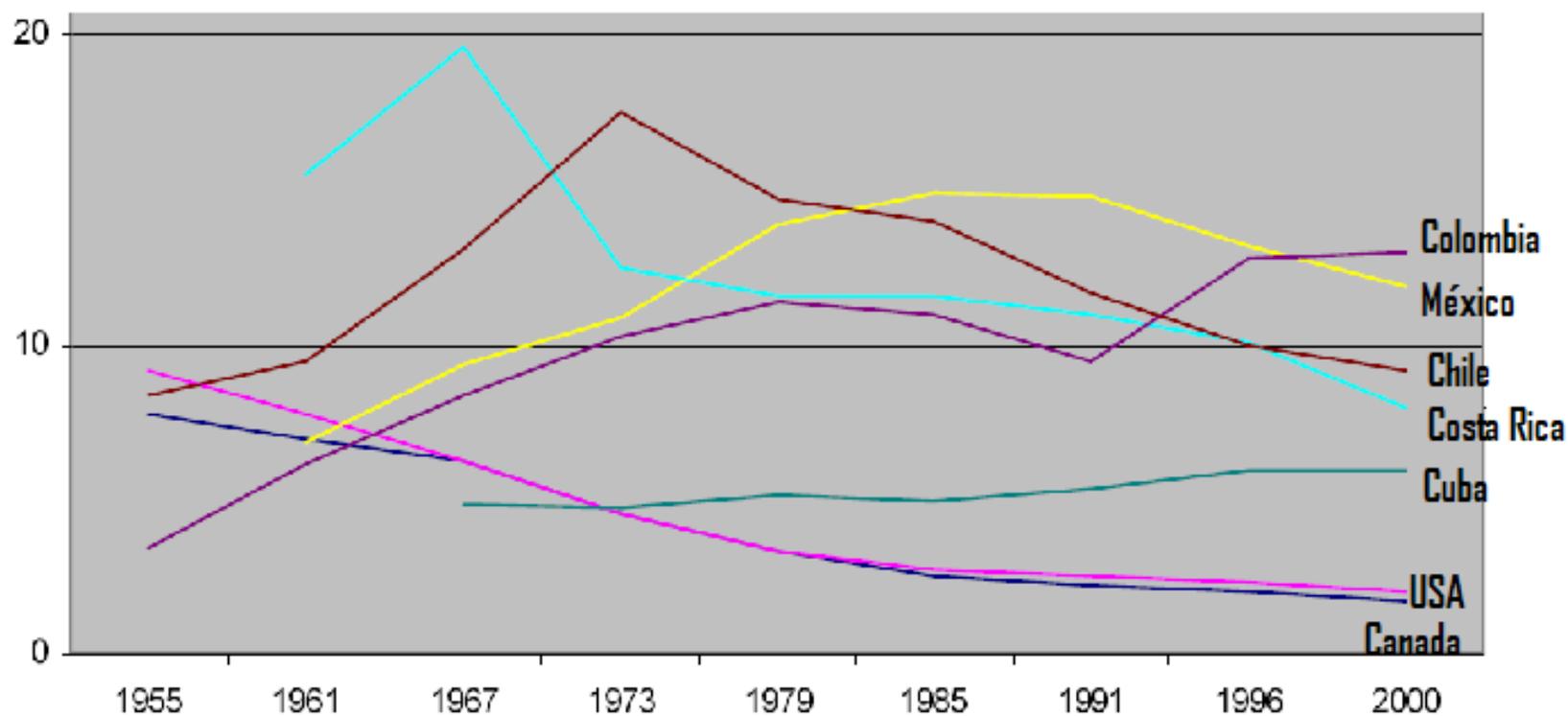
186. Emeny, R.T. y cols., Priming of human papillomavirus type 11-specific humoral and cellular immune responses in college-aged women with a virus-like particle vaccine. *J Virol*, 2002. 76(15): p. 7832-42.
187. Pinto, L.A. y cols., Cellular immune responses to human papillomavirus (HPV)-16 L1 in healthy volunteers immunized with recombinant HPV-16 L1 virus-like particles. *J Infect Dis*, 2003. 188(2): p. 327-38.
188. Schiller, J.T. and D.R. Lowy, Papillomavirus-like particle based vaccines: cervical cancer and beyond. *Expert Opin Biol Ther*, 2001. 1(4): p. 571-81.
189. Saslow, D. y cols., American Cancer Society Guideline for human papillomavirus (HPV) vaccine use to prevent cervical cancer and its precursors. *CA Cancer J Clin*, 2007. 57(1): p. 7-28.
190. Winer, R.L. y cols., Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol*, 2003. 157(3): p. 218-26.
191. Hildesheim, A. y cols., Effect of human papillomavirus 16/18 L1 viruslike particle vaccine among young women with preexisting infection: a randomized trial. *Jama*, 2007. 298(7): p. 743-53.
192. Wang, Z. y cols., A monoclonal antibody against intact human papillomavirus type 16 capsids blocks the serological reactivity of most human sera. *J Gen Virol*, 1997. 78 ( Pt 9): p. 2209-15.
193. Christensen, N.D. y cols., Human papillomavirus types 6 and 11 have antigenically distinct strongly immunogenic conformationally dependent neutralizing epitopes. *Virology*, 1994. 205(1): p. 329-35.
194. Lenz, P. y cols., Interaction of papillomavirus virus-like particles with human myeloid antigen-presenting cells. *Clin Immunol*, 2003. 106(3): p. 231-7.
195. Evans, T.G. y cols., A Phase 1 study of a recombinant viruslike particle vaccine against human papillomavirus type 11 in healthy adult volunteers. *J Infect Dis*, 2001. 183(10): p. 1485-93.
196. Brisson, M. y cols., Estimating the number needed to vaccinate to prevent diseases and death related to human papillomavirus infection. *Cmaj*, 2007. 177(5): p. 464-8.
197. Sanders, G.D. and A.V. Taira, Cost-effectiveness of a potential vaccine for human papillomavirus. *Emerg Infect Dis*, 2003. 9(1): p. 37-48.
198. Wright, V.C., When to suspect cancer at colposcopy. Vol. 9. 2001: *Nurse pract.* 50-56, 59-61.
199. van den Brule, A.J. y cols., GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. *J Clin Microbiol*, 2002. 40(3): p. 779-87.
200. Fuessel Haws, A.L. y cols., Nested PCR with the PGMY09/11 and GP5(+)/6(+) primer sets improves detection of HPV DNA in cervical samples. *J Virol Methods*, 2004. 122(1): p. 87-93.
201. Trevino, V. and F. Falciani, GALGO: an R package for multivariate variable selection using genetic algorithms. *Bioinformatics*, 2006. 22(9): p. 1154-6.

202. Alon, U. y cols., Broad patterns of gene expression revealed by clustering analysis of tumor and normal colon tissues probed by oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(12): p. 6745-50.
203. de Sanjose, S. y cols., Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, 2007. 7(7): p. 453-9.
204. Cristiani, P. y cols., Follow-up of screening patients conservatively treated for cervical intraepithelial neoplasia grade 2-3. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2007. 133(2): p. 227-31.
205. Trottier, H. and E.L. Franco, The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine*, 2006. 24 Suppl 1: p. S1-15.
206. Longworth, M.S. and L.A. Laimins, Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2004. 68(2): p. 362-72.
207. Cuschieri, K.S. y cols., Multiple high risk HPV infections are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening population. *J Clin Pathol*, 2004. 57(1): p. 68-72.
208. Cuschieri, K.S., M.J. Whitley, and H.A. Cubie, Human papillomavirus type specific DNA and RNA persistence--implications for cervical disease progression and monitoring. *J Med Virol*, 2004. 73(1): p. 65-70.
209. Torroella-Kouri, M. y cols., HPV prevalence among Mexican women with neoplastic and normal cervixes. *Gynecol Oncol*, 1998. 70(1): p. 115-20.
210. Schlecht, N.F. y cols., Human papillomavirus infection and time to progression and regression of cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst*, 2003. 95(17): p. 1336-43.
211. Rivera, J., Correlación colpo-cito-histológica de lesiones intraepiteliales en el diagnóstico temprano de cáncer cervicouterino (CaCu) en 2,722 casos. *Enfermedades del Tracto Genital Inferior*, 2007. 1(1): p. 45-46.
212. Palacio, L.S., Cervical cancer, a disease of poverty: Mortality differences between urban and rural areas in Mexico. *Salud pública de México*, 2003. 45(3).
213. Castellsague, X., Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol*, 2008. 110(3 Suppl 2): p. S4-7.
214. Herrero, R. y cols., Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Natl Cancer Inst*, 2000. 92(6): p. 464-74.
215. Evans, M.F. y cols., Distribution of human papillomavirus types in ThinPrep Papanicolaou tests classified according to the Bethesda 2001 terminology and correlations with patient age and biopsy outcomes. *Cancer*, 2006. 106(5): p. 1054-64.
216. Eltoun, I.A. y cols., Significance and possible causes of false-negative results of reflex human Papillomavirus infection testing. *Cancer*, 2007. 111(3): p. 154-9.
217. Ault, K.A., Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections in the female genital tract. *Infect Dis Obstet Gynecol*, 2006. 2006 Suppl: p. 40470.
218. Albrecht, V. y cols., Immunohistochemical and molecular study of severe cervical dysplasia associated with HPV-83. *Gynecol Oncol*, 2007. 105(1): p. 252-5.

219. Heim, K. y cols., Antibodies to human papillomavirus 16 L1 virus-like particles as an independent prognostic marker in cervical cancer. *Am J Obstet Gynecol*, 2002. 186(4): p. 705-11.
220. Combita, A.L. y cols., Serologic response to human oncogenic papillomavirus types 16, 18, 31, 33, 39, 58 and 59 virus-like particles in colombian women with invasive cervical cancer. *Int J Cancer*, 2002. 97(6): p. 796-803.
221. Plotkin, S.A., Immunologic correlates of protection induced by vaccination. *Pediatr Infect Dis J*, 2001. 20(1): p. 63-75.
222. Harro, C.D. y cols., Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine. *J Natl Cancer Inst*, 2001. 93(4): p. 284-92.
223. Hagensee, M.E. y cols., Detection of cervical antibodies to human papillomavirus type 16 (HPV-16) capsid antigens in relation to detection of HPV-16 DNA and cervical lesions. *J Infect Dis*, 2000. 181(4): p. 1234-9.
224. Philippa M. O'Brien, M.S.C., Evasion of host immunity directed by papillomavirus-encoded proteins. *Virus Research* 2002. 88: p. 103-117.
225. Sheu, B.C. y cols., Immune concept of human papillomaviruses and related antigens in local cancer milieu of human cervical neoplasia. *J Obstet Gynaecol Res*, 2007. 33(2): p. 103-13.
226. Wideroff, L. y cols., 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*, 1999. 180(5): p. 1424-8.
227. Nakagawa, M. y cols., Time course of humoral and cell-mediated immune responses to human papillomavirus type 16 in infected women. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2002. 9(4): p. 877-82.
228. Roden, R.B. y cols., Minor capsid protein of human genital papillomaviruses contains subdominant, cross-neutralizing epitopes. *Virology*, 2000. 270(2): p. 254-7.
229. Doorbar, J. y cols., Characterization of events during the late stages of HPV16 infection in vivo using high-affinity synthetic Fabs to E4. *Virology*, 1997. 238(1): p. 40-52.
230. Doorbar, J., The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol*, 2005. 32 Suppl 1: p. S7-15.
231. Sanjeevi, C.B. y cols., Different HLA-DR-DQ haplotypes are associated with cervical intraepithelial neoplasia among human papillomavirus type-16 seropositive and seronegative Swedish women. *Int J Cancer*, 1996. 68(4): p. 409-14.

## Anexo I

## Tasas de mortalidad CaCU estandarizadas por edad en diferentes países



Fuente: base de datos sobre mortalidad de la OMS

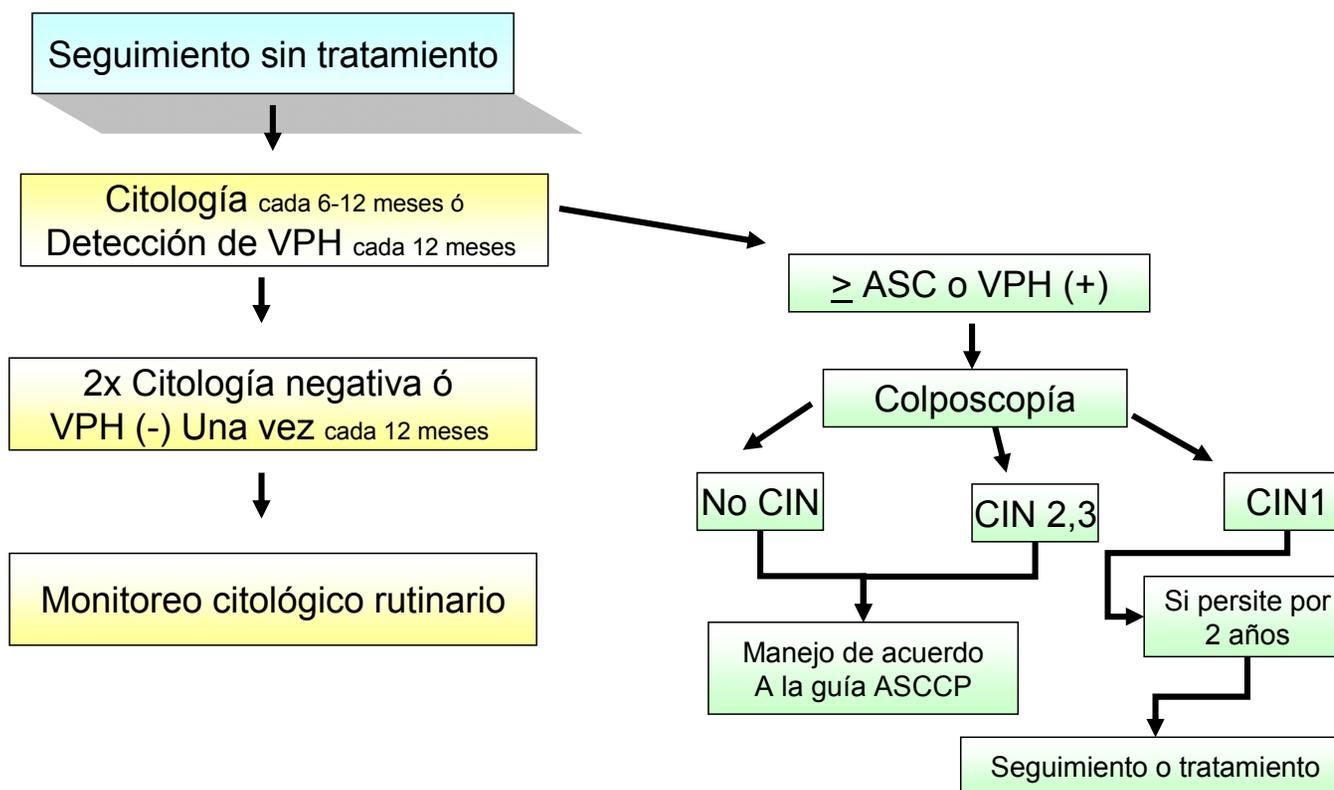
## Anexo II

Cuadro I. Clasificación del cáncer de cérvix. Modificado de Benedet (Benedet, Odicino et al. 2003).

<b>Etapa</b>	<b>Características</b>	<b>Estimación de supervivencia a 4 años</b>
0	Carcinoma <i>in situ</i> , neoplasia intraepitelial	>99%
I	Carcinoma estrictamente confinado al cérvix	
IA	Cáncer invasivo identificado solo microscópicamente, la invasión se limita al estroma $\leq 5$ mm de profundidad y $\leq 7$ mm de ancho	94%
IB	Lesiones clínicas se confinan al cérvix y son mayores a IA	79%
II	El carcinoma se extiende mas allá del cérvix pero no a la pared pélvica. Puede afectar a la vagina, pero no a su tercio inferior	39%
III	El carcinoma se ha extendido a la pared pélvica, el tumor se involucra en la vagina (un tercio).	26%
IIIA	Sin extensión a la pared pélvica, pero con afectación del tercio inferior de la vagina	
IIIB	Extensión hasta la pared pélvica o hidronefrosis o riñón no funcionando.	
IV	Carcinoma se ha extendido mas allá de la pelvis o se ha involucrado clínicamente en la mucosa del riño o el recto.	0%
IVA	Propagación a órganos adyacentes.	
IVB	Propagación a órganos distantes (metástasis).	

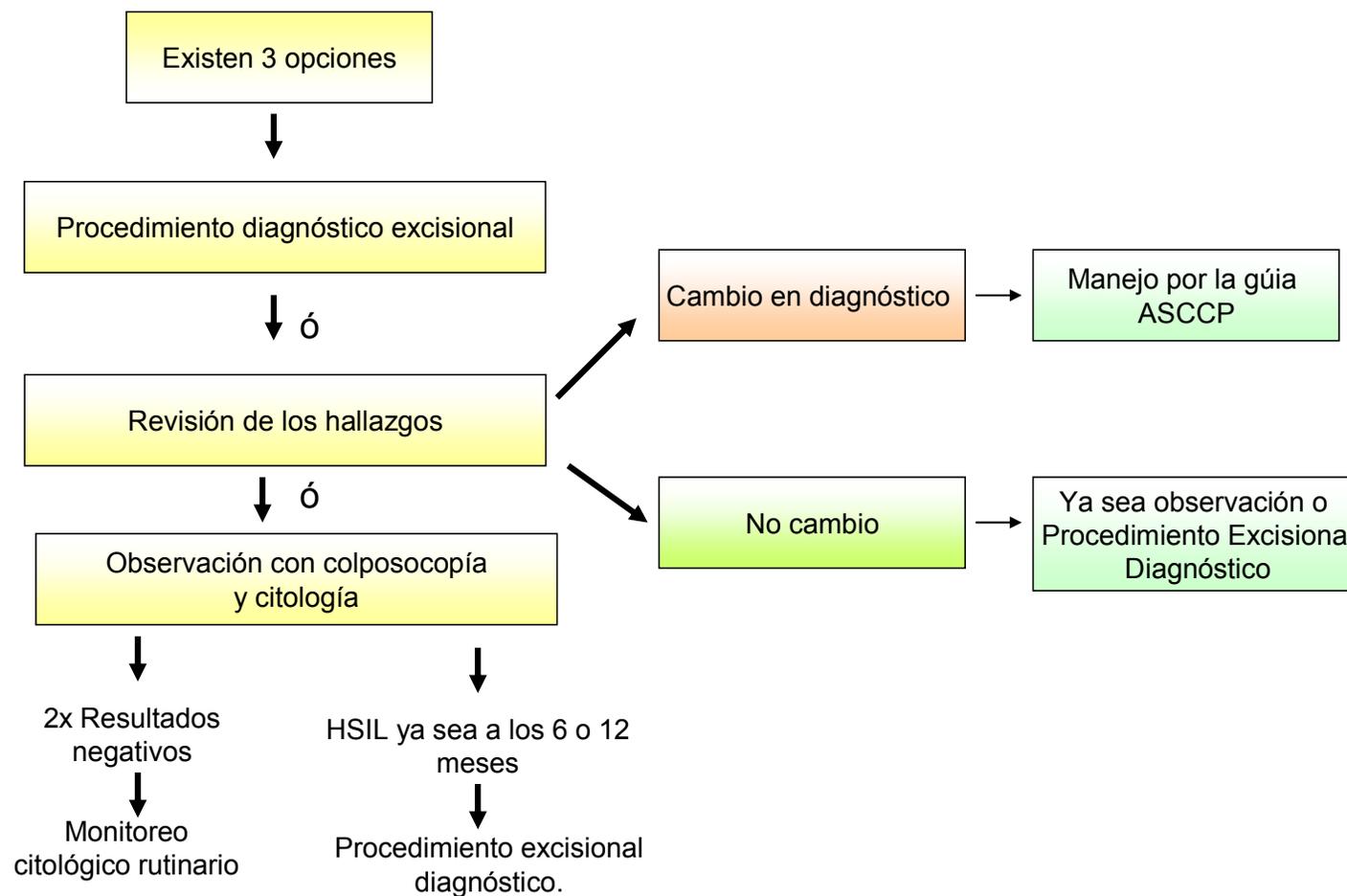
## Anexo III

Manejo de mujeres con diagnóstico histológico de Neoplasia Intraepitelial Cervical grado 1 (CIN I). Precedida por citología ASC-US, ASC-H o LSIL.



## Anexo IV

## Manejo de mujeres con diagnóstico histológico de Neoplasia Intraepitelial Cervical grado 1 (CIN I). Precedida por citología HSIL.



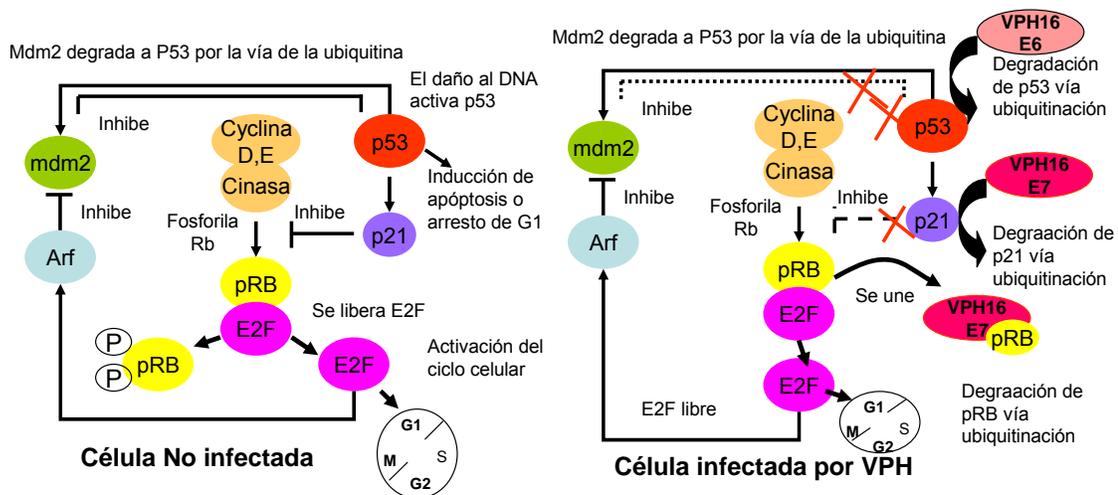
## **Anexo V**

### ***Proteínas virales y su función***

#### *La proteína E6*

El gen E6, de aproximadamente 450 a 500 pb, codifica para una proteína de casi 150 aminoácidos. La proteína tiene un potencial oncogénico débil en algunas líneas celulares y coopera con E7 para la plena capacidad transformante e inmortalizante. E6 es de las que se expresan muy tempranamente durante una infección por VPH. Esto le confiere varias funciones que alteran el ambiente celular, como por ejemplo el bloqueo de la apoptosis mediante la degradación de p53, la alteración de la transcripción de genes celulares a través de la interacción con p300 y CBP, e incremento de la vida celular por la sobre activación de la telomerasa. La acción clave de E6 de los VPH de alto riesgo (E6 – AR) es neutralizar la función de p53, una proteína supresora de tumores, mediante su degradación por la vía de la ubiquitina (Hengstermann, Linares et al. 2001; Mantovani and Banks 2001). Para ello E6 requiere de la proteína celular asociada a E6 (E6-AP), la cual reemplaza a Mdm2, que en células normales no infectadas es la que degrada a p53 (véase figura A).

Este cambio reduce dramáticamente la vida media de p53 (desde 3 horas hasta 20 minutos) y el nivel de proteína en las células de CaCu a menos de la mitad del nivel presente en las células normales. La mayoría de las proteínas E6 de los VPH de bajo riesgo (E6 – BR) no se unen a p53 o lo hacen débilmente y no lo degradan. E6 también puede retener a p53 en el citoplasma bloqueando su translocación al núcleo y así inhibiendo su función independientemente de su degradación (Mantovani and Banks 1999). En consecuencia E6 inhibe la capacidad de p53 para activar o reprimir la transcripción de sus genes blanco. E6 puede superar la apoptosis dependiente e independiente de p53. A este último respecto se ha visto que E6 interactúa con Bak, una proteína proapoptótica que se expresa en altos niveles en las capas superiores del epitelio en diferenciación (Krajewski, Krajewska et al. 1996). El incremento de p53, que se daría por la proliferación inducida por el VPH, así como la consecuente inducción de apoptosis, probablemente mataría a una célula infectada por VPH antes de que la replicación de este ocurriera. Por tanto la modulación de los niveles de p53 por parte de E6 es importante para una infección productiva.



**Figura A. Efecto de E6 y E7 en el ciclo celular.** El blanco de E6 es la proteína supresora de tumores conocida como p53, E6 promueve su degradación a través de la ubiquitina. El proceso de apoptosis es interferido a través de p53 y de otros mecanismos en los que influye E6 para evitar la muerte celular programada. Esto se logra a través del bloqueo del ciclo celular por el inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina p21, que es una proteína proapoptótica presente en los epitelios indiferenciados y que puede ser degradada por E6 a través de la ubiquitina. Por otra parte, la interacción de E7 con las proteínas de la familia Rb produce la inhibición del factor de transcripción E2F, por tanto, E7 forma un complejo con Rb y su degradación se promueve a través del sistema de ubiquitinización. Modificada de Saavedra (Alejandro López Saavedra 2006).

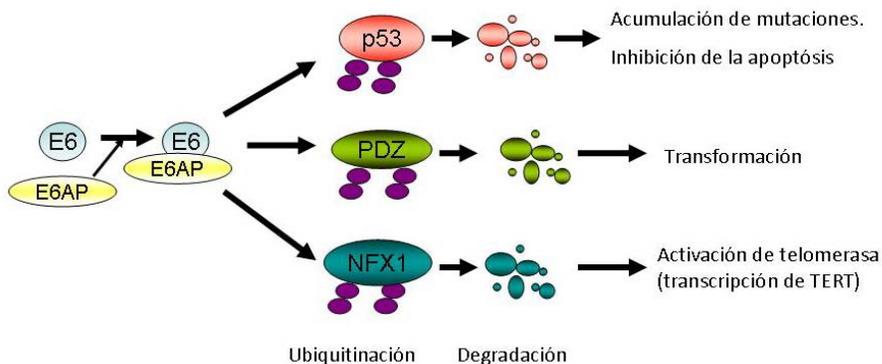
E6 se expresan muy tempranamente durante una infección por VPH. Esto le confiere varias funciones que alteran el ambiente celular, como por ejemplo el bloqueo de la apoptosis mediante la degradación de p53, la alteración de la transcripción de genes celulares a través de la interacción con p300 y CBP, e incremento de la vida celular por la sobre activación de la telomerasa.

Recientemente, el producto del gen *Notch1* ha sido identificado como un blanco de p53 (Lefort, Mandinova et al. 2007). *Notch1* funciona como un oncogen en el desarrollo de la leucemia de células T (Ellisen, Bird et al. 1991), pero también actúa como un determinante en la diferenciación de queratinocitos (Rangarajan, Talora et al. 2001). Aunque la expresión de *Notch1* se ha encontrado en lesiones neoplásicas cervicales, particularmente en carcinomas escamosos bien diferenciados (Zagouras, Stifani et al. 1995), desaparece en las etapas tardías o CaCU poco diferenciado (Talora, Sgroi et al. 2002). La inducción de *Notch1* a través de p53 ocurre en respuesta de estrés genotóxico. Por lo tanto, su regulación negativa a través de p53 con E6/E6AP (véase

figura B) ha sido descubierta como un mecanismo supresor de tumores bloqueando el desarrollo de la carcinogénesis inducida por VPH (Yugawa, Handa et al. 2007).

Otra área de investigación que incide en CaCU, es la de la telomerasa humana, una ribonucleoproteína compuesta de por lo menos la transcripasa reversa catalítica (hTERT) y un componente de RNA (hTR). hTERT se expresa solamente en células del linaje germinal, células madres proliferativas y células cancerosas. La expresión de hTERT en células normales reconstituye la actividad de la telomerasa y suprime la senescencia. Debido a que la actividad telomerasa es detectada pobremente en tejido somático, los telomeros se acortan con cada división celular, llevando a envejecimiento, debido a una síntesis incompleta de los extremos de las hebras de DNA. La actividad telomerasa se observa en mas del 85% de células humanas cancerosas, indicando un papel en la tumorigénesis (Pendino, Tarkanyi et al. 2006). La proteína E6 induce la actividad telomerasa, contribuyendo a la inmortalización de las células epiteliales por medio del mantenimiento de la longitud de los telomeros. La interacción de E6 y Myc activa el promotor de la transcriptasa reversa-telomerasa (Veldman, Liu et al. 2003), y en presencia de E6, un complejo represor del promotor TERT, que contiene USF1 y USF2, es reemplazado por Myc, lo que termina en la transcripción elevada de TERTy actividad de la telomerasa.

La proteína E6 de VPHs de alto riesgo se ha demostrado que interactúa con proteínas que contienen el dominio PDZ, a través de su motivo C-terminal, llevándolas a degradación. Esta habilidad de E6, que es distinta a la de unión y degradación de p53, es importante en la transformación celular debido a que las proteínas que contienen los dominios PDZ están involucradas en una variedad de funciones como la señalización célula-célula y la adhesión celular. Recientemente, varias proteínas han sido identificadas como blancos de E6, incluyendo los homólogos de mamíferos de DLG (hDLG), Mupp1, MAGI-1,-2,-3 PSD95 entre otras, las cuales son responsables de la adhesión célula-célula y sus interacciones (Nguyen, Nguyen et al. 2003). E-6 induce la degradación de estas proteínas y causa la pérdida de contactos célula-célula y contribuye a la pérdida de polaridad celular observada en cáncer asociado a VPH (Nakagawa and Huibregtse 2000).



**Figura B. Interacción de E6 con proteínas celulares.**

En el cuadro I se resume la interacción de E6 con otras proteínas celulares, que se ha establecido gracias a nuevos estudios en el tema, así como las posibles consecuencias funcionales que le puede acarrear a la célula.

**Cuadro II. Efecto de E6 sobre otras proteínas**

PROTEÍNA BLANCO	FUNCIÓN CELULAR DE LA PROTEÍNA BLANCO	DEGRADACIÓN (+/-)	POSIBLES CONSECUENCIAS DE LA INTERACCIÓN PARA LA CÉLULA
<b>c-Myc</b>	Factor de transcripción; inducción de apoptosis	+	Impedir la apoptosis dependiente de c-Myc.
<b>AMF/Gps2</b>	Incrementa la actividad de P300	+	Supresión de Gps2. Activación de la transcripción.
<b>Bak</b>	Miembro de la familia Bcl2; proteína proapoptótica.	+	Efecto antiapoptótico
<b>Mcm7</b>	Iniciación de la replicación del ADN	+	Omisión del punto de arresto en G1. Posible modulación de la abundancia de Mcm7.
<b>PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN SEÑALIZACIÓN CÉLULA-CÉLULA Y ADHESIÓN CELULAR.</b>			
<b>hDlg</b>	Homólogo humano de la proteína supresora de tumores de los discos largos de Drosophila, importante en la formación de polaridad en células epiteliales en diferenciación. Formación y mantenimiento de las uniones intercelulares.	+	Afecta la adhesión celular, polaridad y proliferación, lo que contribuye a la actividad invasora de las células transformadas.
<b>Mupp1</b>	Proteína de andamiaje con múltiples sitios PDZ. Posible papel en la transducción de señales.	-	Rompimiento del ensamblaje de los complejos de señalamiento en las membranas de las células epiteliales.
<b>MAGI-1/2/3</b>	Proteínas de unión estrecha, formación de complejo con $\beta$ -catenina. Regulador supresor de tumores PTEN.	+	Afecta la señalización Akt. Inhibición de la apoptosis independiente de P53.

### La proteína E7

El gen E7, de aproximadamente 300 a 320 pb, codifica para una proteína de aproximadamente 100 aminoácidos. E7 tiene la mayor capacidad transformante y

*Determinación de anticuerpos anti-VPH y su asociación con el pronóstico de la infección viral*

actúa mediante la unión a proteínas celulares supresoras de tumores de la familia pRB, que a su vez interactúan con factores de transcripción de la familia E2F. La familia pRB controla la replicación celular (Boyer, Wazer et al. 1996), actuando como reguladores del ciclo celular. Se sabe que Rb hipofosforilado controla la transición de la fase G1/S del ciclo celular a través de la unión con la familia de factores de transcripción E2F, que activan la transcripción de muchos componentes involucrados en la fase S. En células normales, la fosforilación de Rb por el complejo ciclina-cinasa lleva a la liberación de E2F y transcripción de los genes de la fase S. La unión de E7 a la forma activa de pRB conduce a la liberación de los factores de transcripción E2F independientemente de la presencia de factores de crecimiento externos, lo que promueve el progreso de la fase S del ciclo celular y por tanto la replicación celular (véase figura A)(Munger, Basile et al. 2001). E7 también se asocia con otras proteínas tales como desacetilasas de histonas, AP1 e inhibidores de los complejos CDK, como p21 y p27. Como resultado de la liberación de E2F se expresa ciclina E, importante para el progreso de la fase S.

En el cuadro II se resume la interacción de E7 con otras proteínas celulares y las posibles consecuencias funcionales que le puede acarrear a la célula.

Cuadro III. Proteínas celulares que se unen a E7.

PROTEÍNA CELULAR BLANCO	FUNCIÓN CELULAR DE LA PROTEÍNA BLANCO	POSIBLES CONSECUENCIAS DE LA INTERACCIÓN PARA LA CÉLULA
Miembros de la familia AP1	Factores de transcripción	Abolición de la actividad de IRF-1
Ciclina A Ciclina E	Actividad de cinasa	Activación de la ciclina A y E.
$\alpha$ -glucosidasa	Enzima del control glucolítico	Activación alostérica que sobreconsume las reservas de glucógeno. Promoción de hiperproliferación celular.
Cinasa de la histona H1	Actividad de cinasa	Interferencia con la transición G2/M del ciclo celular
hTid-1	Homólogo al supresor de tumores de <i>Drosophila</i> Tid56, modulador de la apoptosis.	Activación de los promotores que responden a E2F
IGFBP-3 (proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina)	Blanco transcripcional de p53 que limita la disponibilidad de IGF	Decremento en la cantidad de IGFBP
pRB	Regulación del ciclo celular mediante la acomplexación con los factores de transcripción E2F.	Fosforilación de pRB y subsecuente liberación de E2F, ubiquitinación y subsecuente degradación de pRB.
TBP (proteína de unión a la caja TAT)	Involucrada en el inicio de la transcripción	Interferencia con la activación de los promotes que responden a p53.

### *La proteína E5*

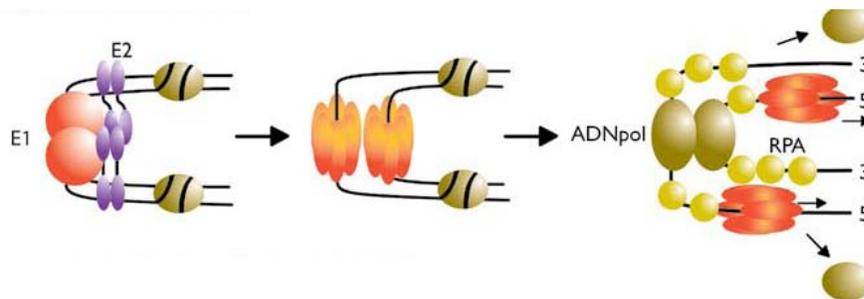
El gen E5, de aproximadamente 230 a 250 pb, codifica para una proteína de 90 aminoácidos con un peso molecular de 14 kDa. Es una proteína de membrana hidrofóbica (Burkhardt, Willingham et al. 1989; Sparkowski, Anders et al. 1995), cuya función principal es acomplejarse y sobre-regular la actividad de los receptores de factores de crecimiento, como el del factor de crecimiento epidermal (EGFR) o el del crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFR) (Hwang, Nottoli et al. 1995). E5 de VPH-16 se une también a la subunidad de 16 KDa de la ATPasa vacuolar (Conrad, Bubb et al. 1993), ésta es un complejo proteico, de unión a membrana, cuya subunidad de 16 KDa forma el poro por lo que pasan los iones  $H^+$  que acidifican el contenido de los endosomas. Se sabe que E5 de VPH-16 inhibe la acidificación de los endosomas, lo que resulta en la retención del receptor, en la prolongación de su señal activa y en el reciclaje del 40% de los receptores para anclarse de nuevo en la superficie en ausencia del ligando. Esto quizás explique el incremento en el número de EGFR observado en los queratinocitos que expresan E5 (Straight, Herman et al. 1995). Dado que el EGF es necesario en la fase G1 del ciclo celular, se sugiere que la actividad de E5 estimula a las células a través de esta fase y en S.

Si E5 inhibe la acidificación de los endosomas tardíos, podría también afectar la interacción de los péptidos antigénicos con las moléculas del MHC-II (Zhang, Li et al. 2003). La molécula del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II) es una proteína heterodimérica compuesta de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . Entrega péptidos antigénicos desde los compartimentos endocíticos hasta la superficie celular para ser reconocidos por las células T  $CD4^+$ .

En la epidermis los queratinocitos humanos normalmente no expresan moléculas MHC-II, a diferencia de las células de Langerhans. Se ha documentado que los queratinocitos pueden expresar moléculas MHC-II, tales como HLA – DR, – DP y – DQ en muchos desórdenes de la piel, lo que les permite funcionar como células presentadoras de antígenos e inducir una respuesta inmune. E5 afecta la maduración de la molécula  $\alpha\beta$  de MHC-II inhibiendo la acidificación de los endosomas. E5 entonces podría disminuir el reconocimiento inmune de los queratinocitos infectados interrumpiendo la función de las proteínas MHC clase II.

### La proteína E1

El gen E1 es el más grande y de los más conservados de los VPs, es una 3' → 5' helicasa hexamérica dependiente de ATP, que participa en la replicación del DNA viral. Estas funciones de ATPasa y de helicasa hacen de esta proteína viral la única con actividad enzimática. E1 se une al origen de replicación, en una secuencia palindrómica de 18 pb rica en A y T que se halla en la LCR, formando hexámeros y dobles hexámeros. El hexámero rodea al DNA de modo que el sustrato pasa a través del centro del anillo hexamérico (Fouts, Yu et al. 1999). La unión de E1 al sitio de origen causa una curvatura, crítico para el correcto ensamblaje del complejo de iniciación y para las primeras etapas de desenrollamiento de la doble hélice (véase figura C) (Gillitzer, Chen et al. 2000).



**Figura C. E1 y E2 y la replicación del genoma viral.** E1 es una 3' → 5' helicasa hexamérica dependiente de ATP. Se une a su sitio en la LCR formando hexámeros. E1 interacciona con la ADN polimerasa  $\alpha$ , mientras que esta necesita las proteínas RPA, que estabilizan la cadena sencilla del duplex abierto, topoisomerasas I y II y los cofactores PCNA y RFC para que se realice la replicación. Sin embargo, la afinidad de E1 por su sitio de unión en la LCR depende de su acomplejamiento con el dominio N-terminal de E2. Tomada de Saavedra (Alejandro López Saavedra 2006).

La proteína E1 interacciona directamente con la DNA polimerasa  $\alpha$ , mientras que esta necesita las proteínas RPA (proteína A de replicación), que estabilizan la cadena sencilla del duplex abierto, topoisomerasas I y II y los cofactores PCNA (antígeno de proliferación celular) y RFC (factor de replicación C) para que se lleve a cabo la replicación. La unión de E1 a su sitio en la LCR depende a su vez de su acomplejamiento con la proteína viral E2, la cual aumenta la especificidad de E1 por su secuencia, así como su capacidad para desenrollar la doble hélice. Las interacciones E2-E1 hacen que E2 atraiga otras moléculas de E1 a un complejo inicial E2-E1-DNA. Conforme se ensamblan oligómeros más grandes de E1, E2 es finalmente desplazado mediante una reacción dependiente de ATP. Se ha demostrado recientemente que el

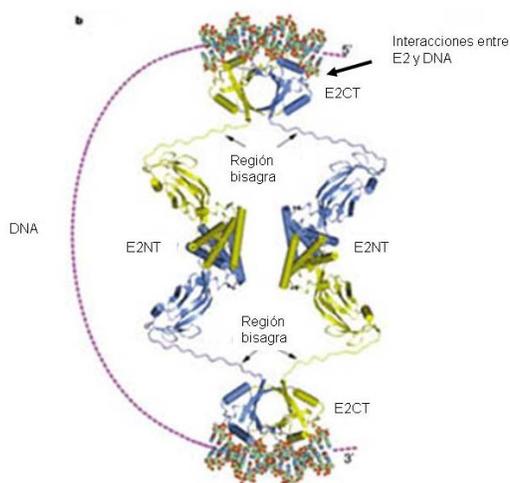
dominio de unión al DNA de E1 (E1DBD) estimula la actividad transcripcional de E2 dependiente de E1, lo que sugiere que la interacción E1DBD - E2TAD funciona más en la regulación de la actividad transcripcional que en la replicación del DNA viral (figura C). Algunas de las interacciones de E1 con otras proteínas celulares se resumen en el cuadro III.

Cuadro IV. Interacciones de proteínas celulares con E1.

Proteína celular blanco	Función celular de la proteína blanco	Posibles consecuencias de la interacción para la célula
ADN polimerasa $\alpha$ (ADN-P $\alpha$ ), subunidades p70 y p180	Replicación	Atracción hacia el complejo de iniciación una vez liberado E2
RPA	Replicación	Estabilización de la cadena sencilla una vez abierto el dúplex
Histona H1	Empaquetamiento de la cromatina	Descondensación de la cromatina por delante de la horquilla de replicación
Ini1/hSNF5	Regulación de la transcripción al remodelar la cromatina	Contribución de SWI/SNF en la replicación al remodelar la cromatina
Chaperona Hsp40 y Hsp70	Maduración de proteínas	Promoción de la unión de e1 hacia el ADN y de la formación de los dihexámeros en el sitio Ori

### La proteína E2

El producto del gen E2, de aproximadamente 1100 pb, es una proteína nuclear de 45 kDa. Se divide en tres dominios funcionales (véase figura D) (Lefebvre, Steger et al. 1997; Hegde 2002).



**Figura D. Interacciones de la proteína E2.** La proteína E2 se divide en tres dominios funcionales. El primero, el extremo amino terminal, promueve la oligomerización e interacción entre moléculas de E2 unidas al DNA en sitios distantes, provocando una curvatura en la molécula de DNA y otros cambios conformacionales, también responsable de regular la transcripción y la replicación del DNA viral. El segundo dominio es el de bisagra, de longitud y secuencia más variables entre los VPs. El tercer dominio, en el extremo carboxilo terminal, es de dimerización y de unión al DNA, de casi 100 aminoácidos. Modificada de Saavedra (Alejandro López Saavedra 2006).

E2 se une al palíndromo de 12 pb ACCgNNNNcGGT, llamado el sitio de unión de E2 (E2BS), que sufre un cambio de conformación al unirse a la proteína. El genoma de los VP-AR contiene 4 sitios E2BS ubicados en la LCR, que se hallan hacia el 5' del promotor viral que regula la expresión de los genes tempranos. La unión de E2 al DNA provoca la represión o activación de dicho promotor y la replicación del DNA viral. A su vez, estas funciones dependen de la concentración intracelular de E2, así como del sitio (de los cuatro existentes), al que se haya unido. La unión al sitio más próximo del promotor, BS1, no solo interfiere con la unión de TBP a la caja TATA, sino también afecta la estabilidad del complejo de preinicio de la transcripción, una vez que TBP ya se unió a su sitio. La unión a los sitios BS2 y BS3 también contribuye a la represión del promotor compitiendo con factores de transcripción como SP1. La unión a BS3 es necesaria para la replicación viral. E2 es más afín a BS4 y la unión a este sitio regula positivamente la expresión génica, aunque los mecanismos para que se lleve a cabo no son del todo claros.

E2 puede también invocar al complejo de preinicio de la transcripción (PIC) e influye en el remodelaje de la cromatina (Lefebvre, Steger et al. 1997), interactuando con el coactivador CBP/p300, el cual se sabe tiene una actividad de acetilasa de histonas (HAT). La interacción es débil pero se sabe que E2 también se une a la proteína celular AMF-1/Gps2, quien también interactúa con el coactivador p300. Por tanto la unión de E2 a AMF-1 atrae a p300 y el resultado es la sobre expresión génica por un efecto aditivo.

E2 también tienen una función anti-proliferativa, pues puede reprimir el crecimiento e inducir apoptosis, en parte mediante la represión de la transcripción de E6 y E7, así como por el consecuente aumento de P53 (Desaintes, Goyat et al. 1999). E2 induce arresto en G1 por medio de la activación del complejo p21/WAF, inhibidor del complejo ciclina E/CDK2. Este arresto lleva a la célula transformada por VPH a senescencia. La reintroducción de E2 en células HeLa provoca muerte por apoptosis (Desaintes, Demeret et al. 1997). A diferencia del arresto en G1, esta apoptosis inducida puede ser tanto independiente de p53 (Desaintes, Goyat et al. 1999), como de secuencias virales.

### *La proteína E4*

La secuencia codificante de E4 de aproximadamente 260 pb, está contenida dentro del marco de lectura mRNA de E2. El transcrito formado entre el procesamiento alternativo en el ORF de E1 y el de E4 (E1<sup>E4</sup>) se expresa de manera abundante durante las etapas tardías del ciclo viral y la replicación vegetativa del DNA viral (Doorbar, Parton et al. 1990). La expresión precede la síntesis de las proteínas estructurales del virus y el ensamblaje de las partículas virales. La proteína E4 se localiza en parte en los filamentos intermedios de queratina del citoplasma (IF) durante las LSIL causadas por VPH 16, pero también se halla de manera difusa en regiones perinucleares y citoplasmáticas. E4 causa el colapso de dichas queratinas y esto se ha relacionado con la liberación de los viriones. E1<sup>E4</sup> de VPH 16 causa arresto en la fase G2 del ciclo celular cuando se expresa en células HeLa y SiHa. Esto sugiere un papel antagónico con la proliferación celular inducida por E7 durante la etapa productiva de la infección, así como el requerimiento de E1<sup>E4</sup> y E2 para inhibir la división celular durante el ciclo viral (Davy, Jackson et al. 2002). E4 puede expresarse junto con E1 y E2 durante la infección. El hecho de que ambas proteínas, E2 y E4, puedan inhibir el ciclo celular, sugiere que cooperan durante el ciclo viral. La expresión elevada de E2 y E4 en células epiteliales en cultivo provoca la acumulación de E2 en el citoplasma y co-localización de esta con E4. La adición de E4 incrementa o disminuye la transcripción mediada por E2, dependiendo de las concentraciones relativas de ambas proteínas. Esta evidencia sugiere que durante la infección productiva, E4 regula los niveles de la proteína nuclear E2 para facilitar la amplificación del genoma viral y la expresión de proteínas tempranas.

### *La proteína E2<sup>E8</sup>*

Recientemente se ha descrito una nueva proteína E2, resultado de una fusión del producto del pequeño marco de lectura E8 con parte de la proteína E2. Esta proteína de 20 kDa reprime la replicación viral, así como la transcripción y por tanto se cree que es importante para el mantenimiento del estado latente observado en las células basales del epitelio infectado (Stubenrauch and Laimins 1999; Stubenrauch, Straub et al. 2007).

### *Las proteínas L1 y L2*

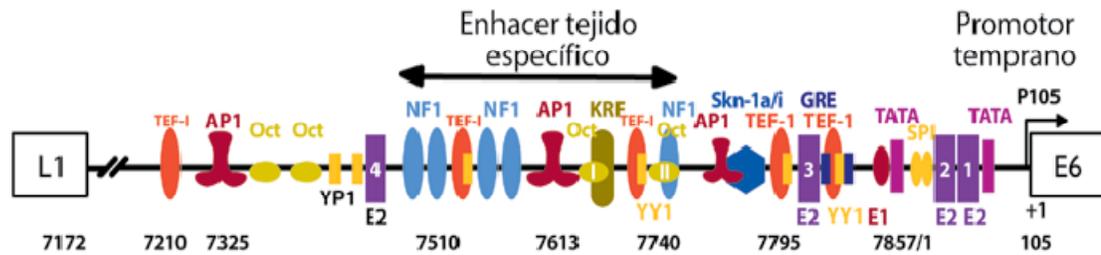
La proteína L2, de 43 a 53 kDa, es la minoritaria de la cápside viral, que como L1, se produce en células que expresan E4 (Doorbar, Foo et al. 1997). La proteína mayoritaria L1, de 57 kDa y que conforma cerca del 80 % de la cápside, se expresa después de L2. La cápside contiene 360 copias de L1 y aproximadamente 12 copias de L2, organizados en 72 capsómeros de una partícula icosaedral. La proteína L2 se acumula en estructuras nucleares conocidas como dominios oncogénicos de la proteína de leucemia pro-monocítica (PML) durante el ensamble del virus y atrae a L1 hacia estos dominios. Se ha sugerido que estos cuerpos PML son el sitio de la replicación del DNA viral (Day, Roden et al. 1998) y que las proteínas de la cápside se acumulan en este sitio para facilitar el empaquetamiento.

### *La región larga de control (LCR)*

La región larga de control (LCR) es un segmento genómico, que no contiene marco de lectura alguno y que sí tiene numerosos elementos de respuesta en cis que gobiernan la expresión génica y la replicación viral. El tamaño varía según el tipo viral, extendiéndose de un 7 a un 11% del genoma y de casi 850 pb en el caso de los VPH genitales. La LCR puede dividirse en 3 partes: el promotor temprano, el amplificador o enhancer, de alrededor de 230 pb y la región más alejada del 5'. Numerosos factores, celulares y virales, interaccionan con esta región (véase figura E) (Demeret, Le Moal et al. 1995).

El promotor temprano, responsable de la transcripción de los oncogenes virales, es activo en células de tejido de CaCU o en los queratinocitos de la piel. Sin embargo, no es activo en las células epiteliales del hígado (HepG2) o del seno (MCF7). Esta especificidad por el tejido, no muy común en muchos virus, corresponde al amplificador transcripcional o enhancer. Se conocen diversos factores proteicos de las células epiteliales asociados a la actividad transcripcional del promotor, que pertenecen a familias de proteínas cuyos miembros se hallan en diferentes cantidades en los diferentes tipos celulares (Thierry, Spyrou et al. 1992; Butz and Hoppe-Seyler 1993; Morris, Dent et al. 1993; Bauknecht, Jundt et al. 1995; Bouallaga, Massicard et al. 2000).

El complejo proteico que se ensambla en el enhancer, conocido como el enhanceosoma, interacciona con las proteínas del aparato basal de transcripción, que se unen en la región promotora hacia el extremo 3' del LCR, aumentando de esta manera la actividad transcripcional del promotor y por ende la expresión de los genes tempranos (Bouallaga, Massicard et al. 2000).



**Figura E. La región larga de control (LCR).** La LCR se divide en 3 regiones en las que numerosos factores, celulares y virales, interaccionan con las mismas, por citar algunas: las proteínas virales E1 y E2, que ya se mencionaron anteriormente y que modulan la actividad transcripcional y la replicación del virus; componentes de la maquinaria basal de transcripción como SP1 y TBP; receptores de glucocorticoides que modulan positivamente la transcripción, así como otros factores que parecen intervenir en la especificidad por el tejido como KRF, Skn – 1a/i, TEF, AP1 , etc. Tomada de Saavedra (Alejandro López Saavedra 2006).

## **Sistema Inmune**

La defensa del huésped ante cualquier sustancia extraña resulta de una estrecha colaboración entre la inmunidad innata (fagocitos, citocinas, barreras epiteliales, etc.) y la inmunidad adaptativa (anticuerpos, células citotóxicas efectoras, etc.). La inmunidad innata actúa como primera línea de defensa, eliminando la mayoría de los ataques de agentes extraños, ésta no tiene memoria específica, pero es responsable de la activación de la inmunidad adaptativa. La inmunidad innata es activada por lesiones en la célula o muerte celular y se manifiesta como inflamación, la respuesta vascular local a una lesión. Durante la inflamación, se reclutan efectores solubles y celulares. Las células locales parénquimales son reclutadas y los fagocitos locales son activados y secretan citocinas inflamatorias y otras moléculas de defensa.

Las células dendríticas son cruciales, al ser las únicas células presentadoras de antígenos (APCs por sus siglas del inglés Antigen Presenting Cells) que pueden activar linfocitos T vírgenes, los cuales comienzan la respuesta inmune adaptativa.

La respuesta inmune adaptativa genera efectores letales específicos en respuesta a antígenos desconocidos, así como células de larga vida con memoria del ataque. La inmunidad mediada por anticuerpos elimina las partículas libres extrañas de los fluidos del cuerpo y puede prevenir re-infecciones virales, mientras que la respuesta inmune mediada por células es esencial para la eliminación de células infectadas por virus y la generación de memoria inmune.

Los linfocitos T juegan un papel central para la inmunidad celular, así como para la humoral. Las células T reconocen los antígenos que han sido procesados en pequeños péptidos, unidos al complejo mayor de histocompatibilidad, y presentadas como un complejo de membrana unido a un receptor en la superficie celular. Existen dos tipos de células T, identificadas por sus marcadores de superficie: CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Las células CD4<sup>+</sup> reconocen los antígenos presentados por el MHC-II; las células T CD8<sup>+</sup> reconocen los antígenos presentados por la clase I del MHC. La activación de las células T CD4<sup>+</sup> resulta en la secreción de una variedad de proteínas pequeñas, o citocinas, que ayudan a la regulación de otras células. El patrón de la expresión de las citocinas define los dos subgrupos de las células T CD4<sup>+</sup>, conocidas como Th1 y Th2.

- Las Th1 secretan IFN- $\gamma$  y crean un entorno en el que los principales efectores citotóxicos – macrófagos, células naturales asesinas y linfocitos citotóxicos CD8<sup>+</sup> – son activados, generando la inmunidad celular.
- Las Th2 secretan IL-4 e IL-10 (y otras citocinas) y ayudan a los linfocitos B estimulados por antígenos a diferenciarse en células plasmáticas y liberar anticuerpos, las moléculas efectoras de la respuesta humoral.

La APC expresa receptores y secreta citocinas locales que determinan si la célula T toma la vía Th2 o Th1.

### **Respuesta inmune ante la infección**

La primera línea de defensa en contra de cualquier patógeno es la inmunidad innata, proporcionada por las superficies mucosas, la piel y respuestas como interferones, citocinas, neutrófilos y macrófagos. La segunda línea de defensa es la inmunidad adquirida, compuesta por la inmunidad humoral y la inmunidad celular. Esta última tiene la capacidad de eliminar la infección hasta en más del 70% de los casos, el resto (20 – 30%) permanece como infecciones persistentes.

#### *Inmunidad Innata*

El principal mecanismo de defensa ante una infección viral requiere la integridad de las superficies epiteliales o endoteliales. Una vez que se altera el mecanismo de barrera, se disparan una serie de mecanismos inespecíficos o innatos tales como la producción de interferones, las células asesinas (NK) y los macrófagos. La infección viral celular induce la producción de interferones, los cuales activan mecanismos antivirales en las células vecinas capaces de resistir la infección.

*Interferones.* Los interferones son moléculas (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ ) sintetizadas por las células infectadas, las cuales combaten la replicación de los virus en las células del huésped. Actúan estimulando la síntesis de una proteína-quinasa que bloquea la iniciación de la traducción de proteínas virales y de una sintetasa A 2'-5' que activa endoribonucleasas, que permiten la degradación del mRNA viral. También activan la

síntesis y expresión de las moléculas MHC clase I, facilitando la presentación de los epítopes virales e incrementando la capacidad citotóxica de los linfocitos T y las células asesinas. Otra molécula IFN ( $\text{INF-}\gamma$ ), producida por las células T activadas y las células asesinas, inducen la expresión de moléculas MHC clase II (Klein and Sato 2000; Scott, Nakagawa et al. 2001) en la superficie de los queratinocitos y monocitos/macrófagos, permitiéndoles actuar como APC y, subsecuentemente, activar la respuesta antiviral. Se ha encontrado que el  $\text{INF-}\gamma$  bloquea la expresión del mRNA de VPH 18 de células derivadas de CaCU (Woodworth, Lichti et al. 1992).

*Factores de Necrosis Tumoral (TNF)*. Estas citocinas son sintetizadas esencialmente por monocitos/macrófagos ( $\text{TNF-}\alpha$ ) y por linfocitos T ( $\text{TNF-}\beta$ ), pero específicamente por los T cooperadores con un perfil Th1. Tienen una acción antiviral y antitumoral muy fuerte.  $\text{TNF-}\alpha$  disminuye la expresión de los genes E6/E7 en las células infectadas por VPH 16 o 18 que no han sido aún transformadas; sin embargo, durante la progresión tumoral, las células infectadas se vuelven insensibles al  $\text{TNF-}\alpha$  (Malejczyk, Malejczyk et al. 1996).

*Factor de Crecimiento tisular (TGF- $\beta$ )*. Este factor es producido por células epiteliales y tienen un papel importante en la inmunosupresión, inhibe la actividad de las células asesinas, la expresión de las moléculas MCH II, y la producción de linfocitos citotóxicos. Inhibe la proliferación de la mayoría de las células, incluyendo aquellas infectadas por VPH (Woodworth and Simpson 1993); puede inhibir o no la expresión del mRNA de las proteínas E6 y E7, ya que durante la progresión tumoral las células se vuelven resistentes al  $\text{TGF-}\beta$ .

*Células naturales asesinas (NK)*. En una displasia moderada se observa un pequeño número de células NK, mientras que en displasias severas ocurre un incremento (Satam, Suraiya et al. 1986). Mientras las lesiones progresan hacia cáncer, se vuelven resistentes a las células NK. La reducción en la actividad de las células NK en pacientes con CaCU no es un fenómeno irreversible, ya que esta actividad puede ser restaurada a través de inmunoterapia. La activación celular puede ser incrementada aumentando los niveles de  $\text{INF-}\alpha$  (Satam, Suraiya et al. 1986) .

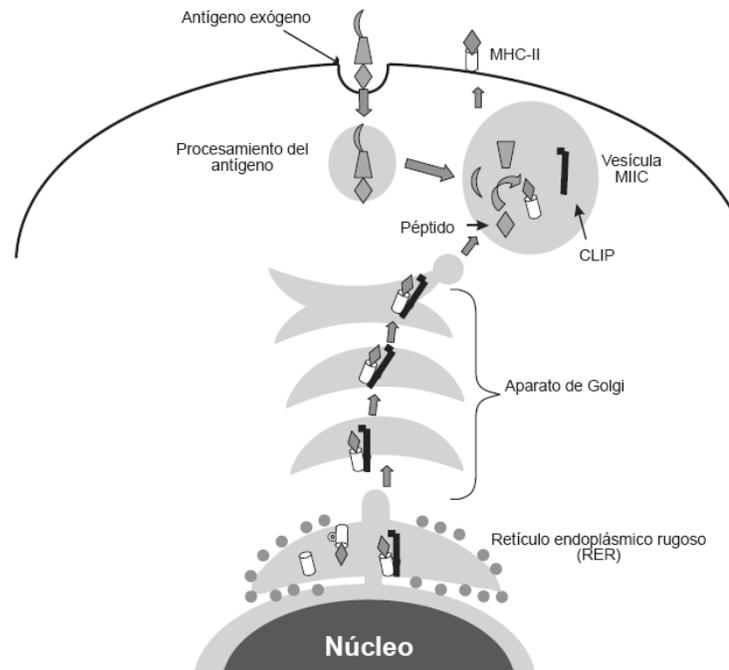
## **Anexo VII**

## **Presentación antigénica**

A medida que la infección viral avanza, se dispara la inmunidad adaptativa en la cual se activan las células T citotóxicas, las células T ayudadoras y los anticuerpos antivirales. La inmunidad celular adaptativa ejerce una respuesta específica hacia el agente viral y va a estar dada por las células efectoras específicas y por las células de memoria que van a repeler un ataque posterior. Las células T reconocen antígenos asociados a MHC. De esta forma, las MHC-I y II actúan como sistemas guías para las células T. Los antígenos son presentados por el MHC en la superficie celular en forma de péptidos previamente procesados. Las células que procesan el antígeno corresponden ya sea a APC o a células infectadas que expresan el antígeno viral.

Las células T citotóxicas ( $CD8^+$ ) son las principales células activadas inicialmente ante una infección viral y mediante la expresión de MHC-I identifican y eliminan a las células infectadas por el virus. Virtualmente cualquier proteína viral puede ser procesada en el citoplasma con el fin de generar péptidos que son transportados al retículo endoplásmico rugoso (RER). Estos péptidos son translocados hacia el lumen del RER mediante transportadores denominados TAP-1 y TAP-2. Una vez en el RER, el péptido (o antígeno endógeno) se une a moléculas MHC-I y a la  $\beta 2$ -microglobulina (esta última es esencial y necesaria para la expresión de las MHC-I). Enseguida, el complejo MHC-I-antígeno- $\beta 2$ microglobulina es transportado hacia la superficie celular en vesículas derivadas del tránsito de este complejo a través del aparato de Golgi. Ya que prácticamente todas las células del cuerpo humano son capaces de expresar moléculas MHC-I, cualquier proteína viral expresada tempranamente en el ciclo de replicación viral permitiría su identificación por las  $CD8^+$ , e induciría la eventual destrucción viral.

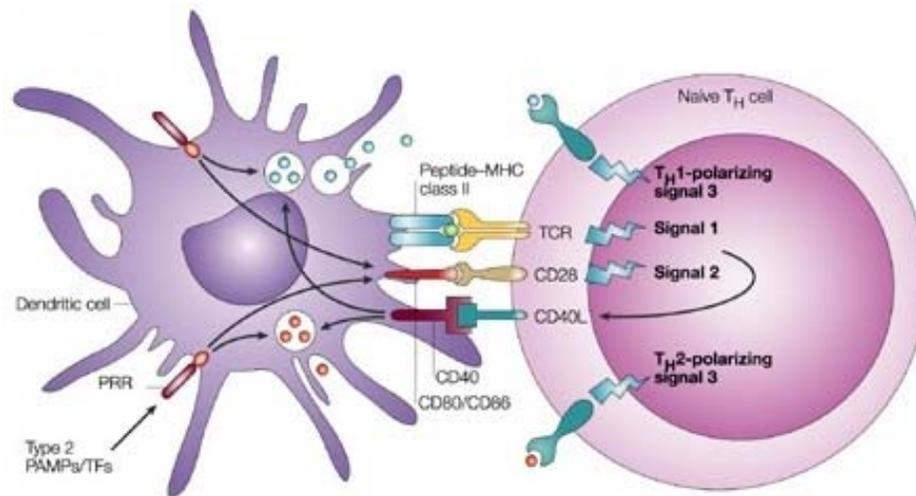
Por otra parte, los linfocitos T ayudadores ( $CD4^+$ ) reconocen los antígenos expresados en macrófagos y células B asociadas con MHC-II. La presentación antigénica por las moléculas del MHC-II se encuentra esquematizada en la figura F.



**Figura F. Esquemmatización del proceso de presentación antigénica por las moléculas del MHC-II.** Los antígenos exógenos son internalizados por APC y son degradados por enzimas proteolíticas en compartimentos intracelulares acidificados denominados MIIC, donde el péptido obtenido "espera" la molécula MHC-II correspondiente. Esta molécula proviene del RER donde se asocia con un polipéptido denominado cadena invariante (Ii), formando un complejo denominado CLIP. Una vez en el MIIC, el péptido antigénico desplaza el CLIP de la MHC-II, el cual es transportado a la superficie celular. Tomado de Sanclemente (Sanclemente\* 2002).

La presentación del antígeno se da en la superficie celular, este complejo es reconocido por el receptor de la célula T (TCR) y esta interacción no sólo es inmunoespecífica sino que, para que se produzca una adecuada presentación antigénica, se requiere la acción de moléculas denominadas co-estimuladoras. Estas últimas corresponden a la molécula de adhesión intercelular1 (ICAM-1), B7-1 (CD80) y B-7-2 (CD86) y LFA-3. Sus ligandos en la célula T son el antígeno funcional linfocítico-1 (LFA-1), CD28 y CD2, respectivamente (véase figura G). El CTLA-4 es un ligando alternativo para B7 y de esta forma las células T no reciben una señal de activación adicional. Todas estas moléculas co-estimuladoras se expresan tanto en células dendríticas, como en monocitos y células B. Las células T en reposo no responden adecuadamente sin la señal co-estimuladora de B7 que en caso de estar ausente se produce un estado de tolerancia inmunológica. Una vez que las células T son activadas, se liberan citocinas como el IFN- $\gamma$ , el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y el ligando CD40 (CD40L) que incrementa la

función de presentación antigénica. Cuando las células presentadoras se activan, se expresa mayor cantidad de MHC-I y MHC-II, más receptores Fc y mayor expresión de moléculas co-estimuladoras que a su vez inducen la producción de otras citocinas como la interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). El antígeno también es capturado por linfocitos B que presentan éste al linfocito T al recibir determinadas señales co-estimuladoras donde se destaca la activación de CD40, que es la señal activadora principal del linfocito B. Estos linfocitos se dividen y se diferencian en células formadoras de anticuerpo y en células B de memoria.



**Figura G. Moléculas co-estimuladoras expresadas en células dendríticas y células T.** Para que se produzca una adecuada presentación antigénica, se requiere la acción de moléculas denominadas co-estimuladoras. En la célula dendrítica se encuentran: ICAM, CD40, CD80, CD86 entre otras, y su contraparte en el linfocito B: LFA-1, CD28 y CD2. Cuando las células presentadoras se activan, se expresa mayor cantidad de MHC-I y MHC-II, más receptores Fc y mayor expresión de moléculas co-estimuladoras que a su vez inducen la producción de otras citocinas como la IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ .

Tomada de [http://www.nature.com/nri/journal/v3/n12/fig\\_tab/nri1246\\_F1.html](http://www.nature.com/nri/journal/v3/n12/fig_tab/nri1246_F1.html)

## Anexo VIII

### Respuesta inmune celular

La adquisición de VPH resulta en una infección con duración variable que puede o no estar asociada a lesiones clínicas. Se ha hecho un esfuerzo recientemente en entender el rol del sistema inmune del huésped en la historia natural de VPH, en particular la inmunidad celular.

La evidencia más persuasiva para la asociación entre los defectos del sistema celular inmune y la infección por VPH proviene de personas infectadas con HIV. En estos pacientes se puede observar una elevada prevalencia de VPH y periodos más largos de persistencia (Scott, Nakagawa et al. 2001). La información acerca de la naturaleza de la respuesta inmune celular a la infección de VPH ha sido proporcionada de los estudios inmunohistológicos de las verrugas genitales que revierten espontáneamente. Las verrugas que no revierten son caracterizadas por una deficiencia de células inmunes en el sitio de infección; los pocos linfocitos intraepiteliales son células CD8<sup>+</sup> y células mononucleares que están presentes en el estroma principalmente. Al examen histológico de las verrugas genitales que sí revierten se revela un infiltrado de células T (CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>) y macrófagos en el estroma y el epitelio. Los linfocitos infiltrantes expresan marcadores de activación, el patrón de citocinas es dominado por citocinas proinflamatorias como IL-12, INF- $\gamma$  e INF- $\alpha$ . Además, existe sobrerregulación de las moléculas de adhesión requeridas para el tráfico de linfocitos en el endotelio de los capilares de la verruga (Coleman, Birley et al. 1994). Esto es característico de una respuesta inmune basada en Th1, pero es importante recordar que los estudios proveen solo un retrato de un proceso muy dinámico. Los estudios en humanos han revelado que la respuesta inmune celular se divide en dos grandes categorías; aquellas mediadas por linfocitos T citotóxicos (CTL) y aquellas mediadas por linfocitos T cooperadores (Th).

Los CTLs usualmente son CD8<sup>+</sup> y juegan un papel vital en la eliminación de células infectadas por el virus. Los antígenos virales son reconocidos y expuestos en la superficie de las células infectadas por el MHC, como se mencionó con anterioridad. La activación de los CTLs requiere de la presentación antigénica por parte de los APC.

Una vez activados, los CTLs proliferan, se diferencian y participan en la lisis de las células blanco por tres caminos diferentes:

- Secretan perforinas y otras proteínas que perforan la membrana celular.
- Liberan sustancias que inducen la muerte celular programada (apoptosis).
- Liberan citocinas como el INF- $\alpha$  y el TNF que limitan la actividad viral dentro de las células y atraen macrófagos y otros fagocitos que pueden destruir a la célula. El INF- $\gamma$  inhibe la expresión de los genes virales y estimulan la expresión de las moléculas de clase I del complejo MHC en los queratinocitos humanos, lo que permite una mejor presentación de los antígenos virales y con ello una respuesta inmune aumentada (Nickoloff, Basham et al. 1984) .

Por otra parte los Ths son CD4<sup>+</sup> y pueden tener un papel ya sea positivo o negativo en la inmunidad. Pueden producir citocinas para activar a las células B para la producción de anticuerpos, así como citocinas para activar y sostener una respuesta CD8<sup>+</sup> CTL. También promueven la respuesta inflamatoria, la cual en el contexto de una respuesta a patógenos puede ser benéfica. En contraste a las células CD8<sup>+</sup>, las células CD4<sup>+</sup> reconoce a los antígenos exógenos, los cuales son tomados del entorno de los APC por endocitosis. La mayoría de los péptidos que son presentados a las células CD4<sup>+</sup> son derivados de proteínas exógenas o de unión a membranas, probablemente porque estos péptidos tienen el acceso a la vía MHC II. Al parecer estas proteínas son degradadas preferencialmente en el citoplasma. También existe la posibilidad de que las proteínas del VPH puedan ser liberadas al espacio extracelular como resultado de la muerte del queratinocito; estos antígenos pueden ser entonces tomados por los APC y ser presentados a las células CD4<sup>+</sup>. Esto es posible en el CaCU y lesiones avanzadas, donde se ha encontrado infiltrados de linfocitos (incluyendo APCs). Sin embargo, en las lesiones de bajo grado (e infección por VPH en general) se caracterizan por una inflamación local y la ausencia de muerte celular.

Usualmente, cerca de un 60% de linfocitos T en sangre periférica son CD4<sup>+</sup> y 20-30% son CD8<sup>+</sup> (2/1); sin embargo, en pacientes con lesiones o cáncer, la relación de CD4/CD8 es más baja. Localmente, en el infiltrado linfocítico, ocurre lo contrario, ya que en las lesiones precancerosas el número de CD4<sup>+</sup> es mayor que los CD8<sup>+</sup>, lo cual muestra que una predominancia de CD4<sup>+</sup> favorece regresión, mientras que los

linfocitos CD8<sup>+</sup> pueden significar persistencia y progresión de la infección viral (Edwards, Kuykendall et al. 1995).

**Regulación.** En años recientes, los estudios de la inmunoregulación se han enfocado a la aparente dicotomía funcional de las citocinas, entre aquellas que apoyan la respuesta inmune celular y aquellas que apoyan la respuesta inmune humoral. La clasificación fenotípica de las células T activadas en INF- $\gamma$ , TNF, e IL-2 produce una respuesta Th1, lo cual estimula la respuesta celular; y la IL-4, IL-5, IL-10, e IL-13 produce respuesta humoral. Algunas citocinas accesorias como la IL-12, que promueve el desarrollo a Th1, también son reguladores importantes de las células T. Adicionalmente, las células accesorias, aún los queratinocitos, contribuyen a la producción de varias citocinas Th1 y Th2, como IL-10 y TNF.

## **Anexo IX**

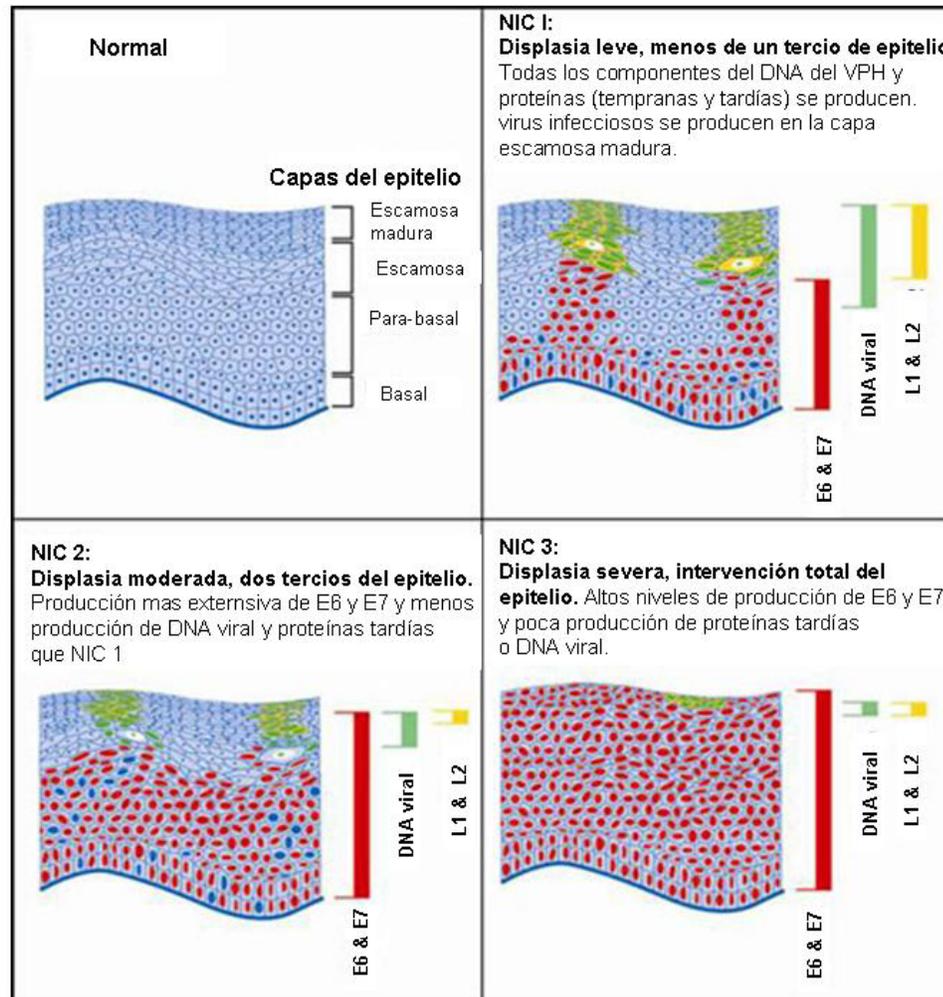
### **Evasión del sistema inmune por el VPV**

Una respuesta inmune anti-viral normalmente sólo se detecta en la etapa tardía de la infección o una vez que las lesiones han progresado a malignidad, probablemente debido al incremento en la carga de antígenos virales y en el caso de tumores, la infección de las células en tejido extravascular (Konya and Dillner 2001).

Una de las ventajas que posee este virus es que no produce lisis celular, por lo cual los antígenos virales no parecen estar disponibles para ser presentados por las APC's y por lo tanto se limita la inducción de células T citotóxicas específicas. Tal como se mencionó anteriormente, la expresión de las proteínas del VPV está cercanamente ligada al estado de diferenciación de la célula epitelial infectada.

Las proteínas E1 y E2 tienen un bajo nivel de expresión, además de que se localizan en el núcleo donde son difícilmente reconocidas por el sistema inmunológico. Las proteínas E6 y E7 a pesar de estar también localizadas en el núcleo y de presentar un nivel bajo de expresión, son capaces de inducir proliferación y retrasar el fenómeno de diferenciación (Frazer, Thomas et al. 1999).

Las proteínas E4, L1 y L2 se localizan tanto en el citoplasma como en el núcleo y se expresan a niveles importantes, pero sólo en los queratinocitos bien diferenciados (véase figura H), los cuales son rápidamente descamados del epitelio, impidiendo su adecuado reconocimiento por el sistema inmune (Frazer, Thomas et al. 1999).



**Figura H. Producción de proteínas de VPH y replicación de DNA viral en NIC 1, NIC 2 y NIC 3.** Expresión de proteínas virales conforme la infección progresa. Se puede observar que a medida que la infección progresa, la integración viral provoca la expresión elevada de las oncoproteínas E6 y E7, mientras que las proteínas de la cápside y de replicación de DNA se mantienen en niveles muy bajos.

En las pacientes con infección cervical persistente por VPH-16 se ha encontrado ausencia de respuesta de los CTL a la proteína E6, lo cual sugiere un papel importante de la respuesta de CTL a E6 para la regresión de las lesiones (Nakagawa, Stites et al. 2000). En general, la gran mayoría de péptidos o antígenos del cáncer son pobremente inmunogénicos. Las células tumorales frecuentemente subregulan la expresión de moléculas MHC-I o inducen mutaciones en el gen de la  $\beta$ 2-microglobulina como estrategia para evadir su reconocimiento por parte del sistema inmunológico (Keating, Cromme et al. 1995; Garrido, Ruiz-Cabello et al. 1997). Se ha encontrado disminución del mRNA del IFN- $\gamma$  en biopsias de pacientes con CaCU invasivo (Tartour, Gey et al.

1998). Por otra parte, en la displasia cervical existe una disminución en las moléculas co-estimuladoras por el decremento en la expresión de TNF- $\alpha$  y un aumento en la secreción de IL-10 (Mota, Rayment et al. 1998). Esto induce la falta de una apropiada activación de los linfocitos T lo cual conduce a la persistencia y la eventual progresión a displasia o cáncer. La IL-10 por su parte, es inmunosupresora y su efecto está mediado por las células presentadoras de antígeno.

También en la displasia cervical existe un aumento en la expresión de HLA-DR y de ICAM-1 con un acumulo de leucocitos activados localizado debajo de las lesiones epiteliales. Sin embargo, parece no establecerse una buena respuesta inmunológica por la ausencia de APC maduras, la ausencia de CD50 (ICAM-3) o CD86 (B7-2) en cualquier tipo de célula, al igual que una subregulación de TNF- $\alpha$  (Mota, Rayment et al. 1998). En la displasia cervical se han encontrado APC (células dendríticas), las cuales expresan todas estas moléculas. Sin embargo, estas células aunque capturan el antígeno y lo procesan eficientemente, parecen ser pobres presentadoras del mismo. Por otra parte los queratinocitos expresan HLA-DR e ICAM-1 y sobrerregulan LFA-3 por lo que se sugiere que estas células son las encargadas de presentar el antígeno en esta mucosa en vez de las células de Langerhans (Coleman, Birley et al. 1994). Ya que estas células no son células presentadoras de antígeno profesionales, pudieran inducir tolerancia. La ausencia entonces de B7-2 induciría tolerancia más que activación de células T efectoras antígeno-específicas.

Por otro lado, se ha encontrado una disminución de la expresión de citocinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-6, GM-CSF y TNF- $\alpha$ ) en células cervicales inmortalizadas e infectadas con VPH 16 o 18. Lo anterior proveería un ambiente más favorable para la infección por VPH (Woodworth and Simpson 1993). En los tumores inducidos por VPH existe infiltración local tanto de CD4<sup>+</sup> como de CD8<sup>+</sup>. No obstante, existe un mayor porcentaje de células T CD8<sup>+</sup>. Los mecanismos ya expuestos prevendrían o retardarían el reconocimiento de las proteínas virales por el sistema inmune. Esto se debe a que el VPH utiliza la maquinaria celular del queratinocito para la producción de partículas virales, sin inducir una respuesta inflamatoria local importante. Esta disminución en la expresión de citocinas pro-inflamatorias pudiera facilitar la replicación viral y el crecimiento y transformación de las lesiones.

## Anexo X

### Vacunas Terapéuticas

*Vacunas basadas en péptidos.* En este tipo de vacunas se sintetizan péptidos a partir de determinadas secuencias de proteínas virales. Estos péptidos actúan como antígenos que se unen a las moléculas del MHC y activan los receptores de las células T. Esta vacuna requiere una configuración del péptido que permita el adecuado transporte intracelular hacia la superficie. Ya que por lo general las células tumorales disminuyen la expresión de MHC-I o desarrollan mutaciones del gen de la  $\beta$ 2-microglobulina, esto limitaría el uso de estas vacunas. Las proteínas virales que se han utilizado para este diseño de vacuna corresponden básicamente a E6 y E7. Los péptidos derivados de estas proteínas se han ligado a moléculas del MHC clase I y específicamente al alelo HLA-A\*0201 (Da Silva, Eiben et al. 2001). Se sabe que el HLA-A2 es la molécula clase I más común en humanos. Alrededor del mundo se han encontrado 22 alelos de HLA-A2 cercanamente relacionados, con una predominancia de HLA-A\*0201 en la población caucásica (> del 95%) y HLA-A\*0204 en indios sudamericanos (Ressing, de Jong et al. 1999). Aunque este tipo de diseño de vacuna es seguro, fácil de sintetizar a gran escala, e induce respuestas inmunológicas específicas, también presenta inconvenientes o dificultades para su producción, como la baja inmunogenicidad del péptido, la restricción de las moléculas de MHC y la necesidad de definir epítopes para los linfocitos T citotóxicos. Se han sugerido soluciones a estas dificultades tales como el aumento del tamaño del péptido, la adición de moléculas coestimuladoras o la utilización de un adyuvante poderoso.

*Vacunas basadas en proteínas.* En este tipo de vacunas se utilizan proteínas completas que incluyan todos los epítopes posibles y potencialmente inmunogénicos para cada haplotipo de MHC. En este diseño, las células presentadoras de antígeno o los macrófagos capturan el antígeno (la proteína) y lo desdoblan en péptidos que son cargados en las moléculas MHC-I y MHC-II, a diferencia de las basadas en péptidos en donde éstos son intercambiados en la superficie de APCs con péptidos endógenos. Así este diseño tendría mayores ventajas que las vacunas basadas en péptidos, por lo que este tipo de vacuna no tendría restricción por determinado alelo de HLA y, al no utilizar la proteína completa, no requeriría la identificación de péptidos específicos (Da Silva, Eiben et al. 2001). Esta vacuna de proteínas purificadas induciría tanto la producción

de anticuerpos como una respuesta inmune de linfocitos T ayudadores y de linfocitos T citotóxicos. Ya que las proteínas utilizadas son degradadas rápidamente luego de su inyección, también requieren adyuvante además de múltiples aplicaciones. Este tipo de vacuna se ha utilizado en estudios clínicos de fase I y fase II en pacientes con condilomas y con displasia anal de alto grado.

*Vacunas de vectores virales (vaccinia/adenovirus).* En general, la inmunización con antígenos solubles no es suficiente para activar una respuesta de linfocitos T citotóxicos, por lo cual se han diseñado vectores virales a los cuales se les introducen genes virales específicos (E6 y/o E7). Estos vectores son utilizados como "vehículos" de transporte del antígeno viral hacia el interior de la célula blanco para de esta forma estimular respuestas de CTLs contra antígenos virales específicos. Así, este antígeno es procesado y presentado por moléculas del MHC-I, induciendo tanto la producción de anticuerpos como la proliferación de células T y la activación de CTLs (Da Silva, Eiben et al. 2001). Para el desarrollo de estas vacunas se ha utilizado el adenovirus, el cual tiene la ventaja de no producir efectos indeseables por la replicación del vector viral.

### **Futuro**

En el futuro inmediato, la genómica proporcionará blancos para nuevas vacunas a un ritmo que aumentará de forma exponencial. Con la vista puesta en ese futuro, se perciben tres áreas muy prometedoras: la administración de vacunas a través de las mucosas, las vacunas de ADN y las vacunas terapéuticas. La introducción de estas y otras nuevas vacunas, así como los avances tecnológicos para su óptima utilización, representan retos que deberán enfrentarse con voluntad política, con alianzas estratégicas e intercambio de ideas entre la industria fabricante de vacunas y las instituciones académicas. Asimismo, será necesaria una respuesta organizada de todas las instituciones del sector salud para garantizar la sustentabilidad de estos productos, que se encuentran entre las prioridades más altas en las intervenciones en salud pública.

**Anexo XI****Hoja de consentimiento informado**

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” y la Secretaría de Salud de Nuevo León.

**Consentimiento Informado Para Exploración Ginecológica y Toma de Sangre**

Estimada Paciente,

La infección por el virus del papiloma humano es una infección común y frecuentemente desapercibida. Algunos tipos de este virus pueden causar cáncer de la matriz.

En esta investigación, queremos conocer los factores que le impiden a su cuerpo combatir eficazmente la infección y predisponen a avanzar a cáncer Cervicouterino.

Para esta investigación se necesitarán muestras de sangre y muestras del examen ginecológico que se utiliza para la detección oportuna del cáncer (Papanicolaou). Si usted desea contribuir voluntariamente en esta investigación, le vamos a pedir que:

- ✓ **Conteste un cuestionario que no tendrá su nombre (anónimo).**
- ✓ **Dé su consentimiento para tomarle muestras de sangre y del Cuello Uterino (Papanicolaou) para nuestra investigación.**

Estoy enterada que:

- Las muestras de sangre y papanicolaou servirán para que los científicos conozcan que factores contribuyen a la persistencia de las infecciones por virus del papiloma humano y cuales otros a eliminarla.
- Para garantizar mi privacidad, la muestra y el cuestionario para este estudio estarán marcados con un número en lugar de mi nombre. Este número será usado para identificar el reporte de mi muestra y sólo será conocido por mi médico y por el laboratorio de citología, perteneciente a la SSNL y/o al Departamento de Patología del Hospital Universitario, según sea el caso, donde rutinariamente se analizan las muestras de Papanicolaou.
- Entiendo que estoy en mi derecho de solicitar información sobre la investigación en cualquier momento del desarrollo de la misma.
- Además entiendo que estoy en la libertad de retirarme en el momento que desee y si tomo esta decisión la atención médica que recibiré no se verá afectada de ninguna manera y recibiré el trato considerado que merezco.
- El Hospital Universitario de la U.A.N.L. estará en la disposición de brindarme tratamiento médico o quirúrgico sin costo, en caso de que resultara dañada directamente por cualquiera de los procedimientos del proyecto de investigación, y en caso de daño permanente, tendré derecho a ser indemnizada de acuerdo al daño sufrido.

\_\_\_\_\_  
Firma o huella digital de la persona que da el consentimiento

\_\_\_\_\_  
Fecha

Dirección: \_\_\_\_\_

**Estudio Multidisciplinario de factores de riesgo moleculares, clínicos y epidemiológicos  
para el desarrollo de Cáncer Cérvicouterino**

Nombre: \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

**Datos Generales**

Fecha de Nacimiento: \_\_\_\_\_ Edad \_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Ocupación: \_\_\_\_\_

Ocupación Pareja: \_\_\_\_\_

Estado Civil:  Soltera  Casada  Viuda  Divorciada  Unión Libre

Nivel de estudios:  Ninguno  Leer y escribir solamente  Primaria

Secundaria-nivel técnico  Preparatoria  Licenciatura

Tipo de Servicio Médico:  IMSS  ISSSTE  SSNL  Seguro Privado  Ninguno

IMSS e ISSSTE  IMSS y SSNL  ISSSTE y SSNL

Registro SSNL: \_\_\_\_\_

Originaria de NL:  Si  No      Tiempo de vivir en N.L.: \_\_\_\_\_

No      ¿De dónde es originaria?: \_\_\_\_\_

**Lugares de Origen de los Familiares**

Padre: \_\_\_\_\_

Abuelo Paterno: \_\_\_\_\_

Abuela Paterna: \_\_\_\_\_

Madre: \_\_\_\_\_

Abuelo Materno: \_\_\_\_\_

Abuela Materna: \_\_\_\_\_

**Antecedentes Familiares**

DM:  Si                      Nefropatía:  Si                      Cardiopatía:  Si  
 No                                       No                                       No

HTA:  Si                      TB:  Si                      Cáncer:  Si  
 No                                       No                                       No

Tipo(s) de Cáncer:

---



---

Otras enfermedades:

---

¿Cuenta con familiar (es) directo (s) con embarazos antes de los 16 años?

---

**Antecedentes Personales**

Cardiopatía:  Si                      HTA:  Si                      Nefropatía:  Si                      DM:  Si  
 No                                       No                                       No                                       No

Anomalías:  Si                      Cirugías:  Si                      TB:  Si                      Alergias:  Si  
 No                                       No                                       No                                       No

Tabaquismo:  Si                      Edad inicio: \_\_\_\_\_                      # Cigarros al día: \_\_\_\_\_  
 No

Suplemento:  Si                      Incluye B12 y/o:  Si                      ¿Por qué lo toma?: \_\_\_\_\_  
vitamínico  No                      ácido fólico  No                      \_\_\_\_\_

Epilepsia:  Si                      Drogas:  Si                      Alcoholismo:  Si                      Cáncer:  Si  
 No                                       No                                       No                                       No

Tipo(s) de Cáncer:

---



---

Observaciones:

---



---

**Antecedentes Gineco-Obstétricos**

Menarquia: \_\_\_\_\_ Ritmo: \_\_\_\_\_ FUM: \_\_\_\_\_

Fenómenos Asociados: \_\_\_\_\_

Sangrado: \_\_\_\_\_

Leucorrea: \_\_\_\_\_

Dolor pélvico: \_\_\_\_\_

Menopausia Fecha de inicio: \_\_\_\_\_

Síntomas: \_\_\_\_\_

Vida Sexual Edad de inicio: \_\_\_\_\_ # Compañeros: \_\_\_\_\_

Dispareunia:	___ Si	Sangrado	___ Si	Compañero con	___ Si
	___ No	post-coito	___ No	circuncisión	___ No
					___ No sé

Método anticonceptivo \_\_\_ DIU \_\_\_ Salpingoclasia \_\_\_ Preservativo \_\_\_ ACOS *Anillo*\_\_\_ *Inyectables* \_\_\_ *Parche* \_\_\_ Ritmo/Billings \_\_\_ Condón Vaginal\_\_\_ *Intradérmico* \_\_\_ Espermaticidas \_\_\_ Vasectomía \_\_\_ Ninguno

Tiempo total de hormonales: \_\_\_\_\_

ETS ¿Ha padecido alguna(s)? \_\_\_ Si ¿Cuál(es)? \_\_\_\_\_

\_\_\_ No

¿En qué fecha(s)? \_\_\_\_\_

Tratamiento(s): \_\_\_\_\_

Último PAP Fecha: \_\_\_\_\_ Lugar: \_\_\_\_\_

Resultado: \_\_\_\_\_

Tratamiento: \_\_\_\_\_

**Antecedentes Gineco-Obstétricos**

GESTA: \_\_\_\_\_ PARA: \_\_\_\_\_ Abortos: \_\_\_\_\_ Cesáreas: \_\_\_\_\_

Término: \_\_\_\_\_ Ectópicos: \_\_\_\_\_ Prematuros: \_\_\_\_\_ Nac. Múltiples: \_\_\_\_\_

Hijos Vivos: \_\_\_\_\_ Edad 1er. Gesta: \_\_\_\_\_ FUP: \_\_\_\_\_

FUA: \_\_\_\_\_ FUC: \_\_\_\_\_

¿Está embarazada actualmente? \_\_\_\_\_ Si \_\_\_\_\_ No

**Datos epidemiológicos**

¿Sabe en qué consiste un PAP? \_\_\_\_\_ Si \_\_\_\_\_ No

Defina en sus propias palabras un PAP:

---



---



---



---



---



---



---



---

¿Se ha realizado algún PAP? \_\_\_\_\_ Si Edad a la que se realizó el 1ero. \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ No ¿Por qué? \_\_\_\_\_

---



---



---



---



---



---

Cantidad de PAP's que se ha realizado en los últimos 5 años:

---

**Exploración Física**

Nombre: \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

TA: \_\_\_\_\_ FC: \_\_\_\_\_ FR: \_\_\_\_\_ Talla: \_\_\_\_\_ Peso: \_\_\_\_\_

General: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_Mamas: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_Abdomen: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Vello púbico: \_\_\_\_\_ Vulva: \_\_\_\_\_

Periné: \_\_\_\_\_ Firme \_\_\_\_\_ Flácido

Vestíbulo: Gl. Bartholin \_\_\_\_\_ Gl. Skene \_\_\_\_\_

Colpocele \_\_\_\_\_ Si Cistocele \_\_\_\_\_ Si Rectocele \_\_\_\_\_ Si  
\_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_ NoVagina: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_Cérvix: Posición Posterior \_\_\_\_\_ Si Lateralizado \_\_\_\_\_ Si  
\_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_ No

Volumen: \_\_\_\_\_ Hipertrófico \_\_\_\_\_ Normal

Superficie: \_\_\_\_\_ Ectropión \_\_\_\_\_ Erosión Leve \_\_\_\_\_ Erosión Severa  
\_\_\_\_\_ Sangrante \_\_\_\_\_ Normal

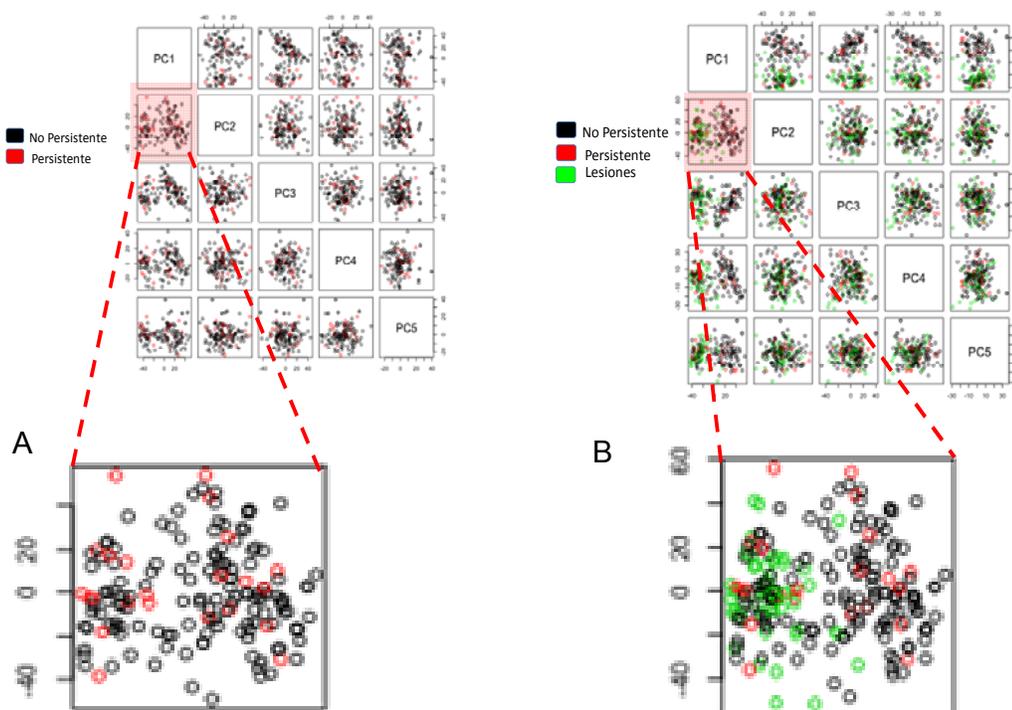
Movilidad: \_\_\_\_\_ Limitada \_\_\_\_\_ Normal

¿Dolor al mover? \_\_\_\_\_ Si Descripción: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_**Análisis**PAP \_\_\_\_\_ Si Fecha \_\_\_\_\_ Biopsia \_\_\_\_\_ Si Fecha \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_ NoColoposcopia \_\_\_\_\_ Si Diagnóstico \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_ No

## Anexo XII

## Análisis de Componentes Principales

Debido a la enorme cantidad de datos obtenidos para cada paciente, fue necesario simplificar esta información. Esto se realizó por un Análisis de Componentes Principales (PCA, del inglés *Principal Component Analysis*), con el que se pretendió establecer si nuestros grupos de estudio (persistente, no persistente y lesiones) tienen alguna tendencia a agruparse en patrones particulares. PCA es una técnica que genera un nuevo conjunto de variables llamadas componentes principales (CPs). Cada componente principal es una combinación lineal de todas las variables originales (señal de los anticuerpos en nuestro caso). Las dos características esenciales del PCA son que por una parte las CPs no están correlacionadas entre sí y por la otra, que las primeras CPs capturan la mayor cantidad de variaciones en los datos.



**Figura I. Análisis de Componentes principales.** **A.** Se muestra la ampliación del componente principal 1, incluidas las muestras del grupo “seguimiento” (mujeres persistentes y no persistentes). **B.** Ampliación de la componente principal 1 en el que se incluye además de las muestras del grupo “seguimiento” el control positivo (grupo “lesiones”).

El resultado arrojó que solo en el caso del grupo de “lesiones” tienden a tener un patrón de fluorescencia en los mapas de intensidad de la señal característico.

**Bibliografía (anexos)**

- Alejandro López Saavedra, M. L. S. (2006). "Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina." *Cancerología* **1**: 31-55.
- Bauknecht, T., F. Jundt, et al. (1995). "A switch region determines the cell type-specific positive or negative action of YY1 on the activity of the human papillomavirus type 18 promoter." *J Virol* **69**(1): 1-12.
- Benedet, J. L., F. Odcino, et al. (2003). "Carcinoma of the cervix uteri." *Int J Gynaecol Obstet* **83 Suppl 1**: 41-78.
- Bouallaga, I., S. Massicard, et al. (2000). "An enhanceosome containing the Jun B/Fra-2 heterodimer and the HMG-I(Y) architectural protein controls HPV 18 transcription." *EMBO Rep* **1**(5): 422-7.
- Boyer, S. N., D. E. Wazer, et al. (1996). "E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway." *Cancer Res* **56**(20): 4620-4.
- Burkhardt, A., M. Willingham, et al. (1989). "The E5 oncoprotein of bovine papillomavirus is oriented asymmetrically in Golgi and plasma membranes." *Virology* **170**(1): 334-9.
- Butz, K. and F. Hoppe-Seyler (1993). "Transcriptional control of human papillomavirus (HPV) oncogene expression: composition of the HPV type 18 upstream regulatory region." *J Virol* **67**(11): 6476-86.
- Coleman, N., H. D. Birley, et al. (1994). "Immunological events in regressing genital warts." *Am J Clin Pathol* **102**(6): 768-74.
- Conrad, M., V. J. Bubb, et al. (1993). "The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein." *J Virol* **67**(10): 6170-8.
- Da Silva, D. M., G. L. Eiben, et al. (2001). "Cervical cancer vaccines: emerging concepts and developments." *J Cell Physiol* **186**(2): 169-82.
- Davy, C. E., D. J. Jackson, et al. (2002). "Identification of a G(2) arrest domain in the E1 wedge E4 protein of human papillomavirus type 16." *J Virol* **76**(19): 9806-18.
- Day, P. M., R. B. Roden, et al. (1998). "The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains." *J Virol* **72**(1): 142-50.
- Demeret, C., M. Le Moal, et al. (1995). "Control of HPV 18 DNA replication by cellular and viral transcription factors." *Nucleic Acids Res* **23**(23): 4777-84.
- Desaintes, C., C. Demeret, et al. (1997). "Expression of the papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis." *Embo J* **16**(3): 504-14.
- Desaintes, C., S. Goyat, et al. (1999). "Papillomavirus E2 induces p53-independent apoptosis in HeLa cells." *Oncogene* **18**(32): 4538-45.
- Doorbar, J., C. Foo, et al. (1997). "Characterization of events during the late stages of HPV16 infection in vivo using high-affinity synthetic Fabs to E4." *Virology* **238**(1): 40-52.
- Doorbar, J., A. Parton, et al. (1990). "Detection of novel splicing patterns in a HPV16-containing keratinocyte cell line." *Virology* **178**(1): 254-62.

- Edwards, R. P., K. Kuykendall, et al. (1995). "T lymphocytes infiltrating advanced grades of cervical neoplasia. CD8-positive cells are recruited to invasion." Cancer **76**(8): 1411-5.
- Ellisen, L. W., J. Bird, et al. (1991). "TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms." Cell **66**(4): 649-61.
- Fouts, E. T., X. Yu, et al. (1999). "Biochemical and electron microscopic image analysis of the hexameric E1 helicase." J Biol Chem **274**(7): 4447-58.
- Frazer, I. H., R. Thomas, et al. (1999). "Potential strategies utilised by papillomavirus to evade host immunity." Immunol Rev **168**: 131-42.
- Garrido, F., F. Ruiz-Cabello, et al. (1997). "Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours." Immunol Today **18**(2): 89-95.
- Gillitzer, E., G. Chen, et al. (2000). "Separate domains in E1 and E2 proteins serve architectural and productive roles for cooperative DNA binding." Embo J **19**(12): 3069-79.
- Hegde, R. S. (2002). "The papillomavirus E2 proteins: structure, function, and biology." Annu Rev Biophys Biomol Struct **31**: 343-60.
- Hengstermann, A., L. K. Linares, et al. (2001). "Complete switch from Mdm2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(3): 1218-23.
- Hwang, E. S., T. Nottoli, et al. (1995). "The HPV16 E5 protein: expression, detection, and stable complex formation with transmembrane proteins in COS cells." Virology **211**(1): 227-33.
- Keating, P. J., F. V. Cromme, et al. (1995). "Frequency of down-regulation of individual HLA-A and -B alleles in cervical carcinomas in relation to TAP-1 expression." Br J Cancer **72**(2): 405-11.
- Klein, J. and A. Sato (2000). "The HLA system. First of two parts." N Engl J Med **343**(10): 702-9.
- Konya, J. and J. Dillner (2001). "Immunity to oncogenic human papillomaviruses." Adv Cancer Res **82**: 205-38.
- Krajewski, S., M. Krajewska, et al. (1996). "Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of Bak expression, a proapoptotic member of the Bcl-2 protein family." Cancer Res **56**(12): 2849-55.
- Lefebvre, O., G. Steger, et al. (1997). "Synergistic transcriptional-activation by the papillomavirus E2 protein occurs after DNA binding and correlates with a change in chromatin structure." J Mol Biol **266**(3): 465-78.
- Lefort, K., A. Mandinova, et al. (2007). "Notch1 is a p53 target gene involved in human keratinocyte tumor suppression through negative regulation of ROCK1/2 and MRCKalpha kinases." Genes Dev **21**(5): 562-77.
- Malejczyk, J., M. Malejczyk, et al. (1996). "Progressive growth of human papillomavirus type 16-transformed keratinocytes is associated with an increased release of soluble tumour necrosis factor (TNF) receptor." Br J Cancer **74**(2): 234-9.
- Mantovani, F. and L. Banks (1999). "Inhibition of E6 induced degradation of p53 is not sufficient for stabilization of p53 protein in cervical tumour derived cell lines." Oncogene **18**(22): 3309-15.

- Mantovani, F. and L. Banks (2001). "The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression." *Oncogene* **20**(54): 7874-87.
- Morris, P. J., C. L. Dent, et al. (1993). "The octamer binding site in the HPV16 regulatory region produces opposite effects on gene expression in cervical and non-cervical cells." *Nucleic Acids Res* **21**(4): 1019-23.
- Mota, F. F., N. B. Rayment, et al. (1998). "Differential regulation of HLA-DQ expression by keratinocytes and Langerhans cells in normal and premalignant cervical epithelium." *Tissue Antigens* **52**(3): 286-93.
- Munger, K., J. R. Basile, et al. (2001). "Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein." *Oncogene* **20**(54): 7888-98.
- Nakagawa, M., D. P. Stites, et al. (2000). "Persistence of human papillomavirus type 16 infection is associated with lack of cytotoxic T lymphocyte response to the E6 antigens." *J Infect Dis* **182**(2): 595-8.
- Nakagawa, S. and J. M. Huibregtse (2000). "Human scribble (Vartul) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase." *Mol Cell Biol* **20**(21): 8244-53.
- Nguyen, M. L., M. M. Nguyen, et al. (2003). "The PDZ ligand domain of the human papillomavirus type 16 E6 protein is required for E6's induction of epithelial hyperplasia in vivo." *J Virol* **77**(12): 6957-64.
- Nickoloff, B. J., T. Y. Basham, et al. (1984). "Antiproliferative effects of recombinant alpha- and gamma-interferons on cultured human keratinocytes." *Lab Invest* **51**(6): 697-701.
- Pendino, F., I. Tarkanyi, et al. (2006). "Telomeres and telomerase: Pharmacological targets for new anticancer strategies?" *Curr Cancer Drug Targets* **6**(2): 147-80.
- Rangarajan, A., C. Talora, et al. (2001). "Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation." *Embo J* **20**(13): 3427-36.
- Ressing, M. E., J. H. de Jong, et al. (1999). "Differential binding of viral peptides to HLA-A2 alleles. Implications for human papillomavirus type 16 E7 peptide-based vaccination against cervical carcinoma." *Eur J Immunol* **29**(4): 1292-303.
- Sanclemente\*, G. (2002). "Lo que los clínicos deben saber acerca de las vacunas contra el virus del papiloma humano." *Gaceta Médica de México* **139**(2): 173-183.
- Satam, M. N., J. N. Suraiya, et al. (1986). "Natural killer and antibody-dependent cellular cytotoxicity in cervical carcinoma patients." *Cancer Immunol Immunother* **23**(1): 56-9.
- Scott, M., M. Nakagawa, et al. (2001). "Cell-mediated immune response to human papillomavirus infection." *Clin Diagn Lab Immunol* **8**(2): 209-20.
- Sparkowski, J., J. Anders, et al. (1995). "E5 oncoprotein retained in the endoplasmic reticulum/cis Golgi still induces PDGF receptor autophosphorylation but does not transform cells." *Embo J* **14**(13): 3055-63.
- Straight, S. W., B. Herman, et al. (1995). "The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes." *J Virol* **69**(5): 3185-92.
- Stubenrauch, F. and L. A. Laimins (1999). "Human papillomavirus life cycle: active and latent phases." *Semin Cancer Biol* **9**(6): 379-86.

- Stubenrauch, F., E. Straub, et al. (2007). "The E8 repression domain can replace the E2 transactivation domain for growth inhibition of HeLa cells by papillomavirus E2 proteins." *Int J Cancer* **121**(10): 2284-92.
- Talora, C., D. C. Sgroi, et al. (2002). "Specific down-modulation of Notch1 signaling in cervical cancer cells is required for sustained HPV-E6/E7 expression and late steps of malignant transformation." *Genes Dev* **16**(17): 2252-63.
- Tartour, E., A. Gey, et al. (1998). "Prognostic value of intratumoral interferon gamma messenger RNA expression in invasive cervical carcinomas." *J Natl Cancer Inst* **90**(4): 287-94.
- Thierry, F., G. Spyrou, et al. (1992). "Two AP1 sites binding JunB are essential for human papillomavirus type 18 transcription in keratinocytes." *J Virol* **66**(6): 3740-8.
- Veldman, T., X. Liu, et al. (2003). "Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(14): 8211-6.
- Woodworth, C. D., U. Lichti, et al. (1992). "Leukoregulin and gamma-interferon inhibit human papillomavirus type 16 gene transcription in human papillomavirus-immortalized human cervical cells." *Cancer Res* **52**(2): 456-63.
- Woodworth, C. D. and S. Simpson (1993). "Comparative lymphokine secretion by cultured normal human cervical keratinocytes, papillomavirus-immortalized, and carcinoma cell lines." *Am J Pathol* **142**(5): 1544-55.
- Yugawa, T., K. Handa, et al. (2007). "Regulation of Notch1 gene expression by p53 in epithelial cells." *Mol Cell Biol* **27**(10): 3732-42.
- Zagouras, P., S. Stifani, et al. (1995). "Alterations in Notch signaling in neoplastic lesions of the human cervix." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(14): 6414-8.
- Zhang, B., P. Li, et al. (2003). "The E5 protein of human papillomavirus type 16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratinocytes treated with interferon-gamma." *Virology* **310**(1): 100-8.

## **RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO**

MARTHA ELIA LUÉVANO SALINAS

Candidato para el grado de

Maestro en Ciencias con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Tesis

“Determinación de anticuerpos anti-VPH y su asociación con el pronóstico de la  
infección viral”

**Campo de estudio:** Biología Molecular

### **Biografía**

Lugar de nacimiento: Monterrey, Nuevo León

Fecha: 12 de Octubre de 1983

Padres: Martha Elia Salinas Solís y Miguel Angel Luévano Alemán

### **Educación**

Licenciatura: Facultad de Ciencias Químicas, UANL

Grado obtenido: Químico Farmacéutico Biólogo