



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Detección de anticuerpos neutralizantes contra el virus del papiloma humano en una población representativa de mujeres colombianas y su relación con la presencia de lesiones cervicales y ADN viral: Un estudio longitudinal

Erika Gilma Vega Ruiz

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Posgrado Interfacultades de Microbiología

Bogotá, Colombia

2014

Detección de anticuerpos neutralizantes contra el virus del papiloma humano en una población representativa de mujeres colombianas y su relación con la presencia de lesiones cervicales y ADN viral: Un estudio longitudinal

Erika Gilma Vega Ruiz
Código: 01186467

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Microbiología

Director:

DrSc José Manuel Lozano Moreno
Profesor Asociado
Departamento de Farmacia
Universidad Nacional de Colombia

Investigador Asociado
Fundación Instituto de Inmunología de Colombia-FIDIC

Línea de Investigación:
Interacción Hospedero-Patógeno

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias

Posgrado Interfacultades de Microbiología

Bogotá, Colombia

2014

Agradecimientos

Mis más sinceros agradecimientos al posgrado Interfacultades de Microbiología de la Universidad Nacional de Colombia. A los diferentes grupos funcionales de investigación de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia-FIDIC en cabeza del Profesor Manuel Elkin Patarroyo. En especial al grupo funcional Virología-Biología Molecular por la valiosa colaboración de las investigadoras Sara Soto, Milena Camargo y Marina Muñoz en el aporte de datos para detección de infecciones por PCR, al Doctor José Manuel Lozano por sus enseñanzas, por su entrega, apoyo y dedicación, a la Doctora Alba Lucía Combita por compartir conmigo sus conocimientos, por su dirección y acompañamiento en la biología molecular práctica, a la Asociación de Investigación Solidaria SADAR sin cuyo aporte no hubiese sido posible el desarrollo de la investigación.

De igual manera quiero agradecer a los hospitales de Engativá (Bogotá), San Rafael de Girardot (Girardot) y San Juan Bautista (Chaparral) por su colaboración en la obtención de muestras para este estudio, al Dr. John Schiller Ph.D, del Instituto Nacional del Cáncer, NIH (Bethesda, Estados Unidos) por la donación de los plásmidos codificantes para las proteínas L1 y L2 para VPH-18, 6, VPB y el plásmido reportero así como también las células 293TT y al Dr. Martin Müller del Centro de Investigaciones del Cáncer (DKFZ) (Alemania) por haber concedido amablemente el plásmido que codifica para la proteína L1 y L2 de VPH-16.

Resumen

El cáncer cervico-uterino es el segundo cáncer más común entre las mujeres a nivel mundial, aproximadamente se reportan 500.000 casos nuevos al año. La infección con el Virus del Papiloma Humano (VPH) es la enfermedad de transmisión sexual más común y es considerada un factor obligado para el desarrollo del cáncer de útero. Para el entendimiento de la resolución de la infección y la regresión de la lesión, se han tenido en cuenta diversos estudios de cohorte, puesto que la mayoría de las infecciones por VPH son transitorias e intermitentes. Este estudio tiene como objetivo principal evaluar la relación entre la respuesta humoral mediada por anticuerpos neutralizantes y la presencia de infección por VPH en un estudio longitudinal de mujeres con o sin lesión cervical. Ya que la seroconversión en pacientes infectadas con VPH desarrolla anticuerpos con actividad neutralizante en el presente trabajo se generaron pseudoviriones (PsVs) por medio de un método sencillo de alto rendimiento los cuales fueron evaluados en ensayos de neutralización como una posible herramienta que permita determinar la cinética de la respuesta inmune humoral producida por estos anticuerpos y su correlación con la incidencia o resolución de la infección.

Palabras clave: Virus del Papiloma Humano, cáncer cervical, pseudovirión, ensayos de neutralización.

Abstract

Cervical cancer is the second most common cancer among women worldwide, approximately 500,000 new cases are reported annually. Infection with human papillomavirus (HPV) is a sexually transmitted disease most common and is considered a factor required for the development of cervical cancer. For the understanding of the resolution of the infection and the regression of the lesion, are taken into account various cohort studies, since the majority of HPV infections are transient and intermittent. This study aims to evaluate the relationship between primary humoral response mediated by neutralizing antibodies and the presence of HPV infection in a longitudinal study of women with and without cervical lesion. Since seroconversion in patients infected with HPV develops antibodies with neutralizing activity in the present work were generated pseudovirions (PSVs) via a simple high performance which were evaluated in neutralization assays as a possible tool to determine the kinetics humoral response produced by these antibodies and their correlation with the incidence or resolution of the infection.

Keywords: Human papillomavirus, cervical cancer, pseudovirion, neutralization assays.

Contenido

	Pág.
Resumen	VII
Lista de figuras	XI
Lista de tablas	1
Introducción	1
1. Planteamiento del problema	5
2. Justificación	6
3. Estado del arte	7
3.1. Cáncer de útero	7
3.2. Infección con VPH.....	7
3.3. Epidemiología	8
3.4. Estudios longitudinales.....	8
3.5. Características del VPH	9
3.6. Métodos de detección del VPH	11
3.7. Respuesta inmune contra VPH	12
3.8. Vacunas contra el VPH	15
3.9. Relación entre anticuerpos neutralizantes y la historia natural de la infección ..	16
4. Hipótesis	17
5. Objetivos	19
5.1. OBJETIVO GENERAL	19
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
6. Metodología y procedimientos	20
6.1. Población	20
6.2. Venopunción	20
6.3. Citología.....	20
6.4. Colposcopia – Biopsia.....	21
6.5. Muestra de células cervicales.....	21
6.6. Prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación de ADN VPH.....	21
6.7. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) usando <i>primers</i> tipo-específico: 22	22
6.8. Cultivo de células 293TT.....	24
6.9. Transfección de la línea celular 293TT con los plásmidos recombinantes	25

X Detección de anticuerpos neutralizantes contra el virus del papiloma humano en una población representativa de mujeres colombianas y su relación con la presencia de lesiones cervicales y ADN viral: un estudio longitudinal

6.10 Gradientes de Optiprep®	29
6.11 Evaluación de la actividad invasiva de los PsVs	30
6.12 Detección colorimétrica de la fosfatasa alcalina secretada por PsVs post - invasión a las células 293TT	30
6.13 Ensayo de Neutralización de PsVs por anticuerpos contenidos en muestras de suero 31	
6.14. Análisis estadísticos.....	32
7. Resultados y discusión.....	33
7.1 Análisis estadísticos.....	33
7.1.1 Desenlace Infección	33
7.1.2 Desenlace Lesión	35
7.1.3 Desenlace resolución de las infecciones	36
7.1.4 Desenlace regresión de las lesiones	37
7.2 Cultivo de células 239TT y transfección de éstas con los plásmidos recombinantes	39
7.3 Evaluación de la actividad invasiva de los PsVs	40
7.4 Ensayo de Neutralización de PsVs por anticuerpos contenidos en muestras de suero	41
7. Conclusiones.....	44
9. Recomendaciones.....	45
Artículos realizados y sometidos a publicación a partir de este estudio.....	46
A.Anexo: Cuestionario a pacientes.....	47
B Anexo. Consentimiento informado.....	48
Bibliografía	50

Lista de figuras

Figura 3-1 Características genómicas del Virus del Papiloma Humano (VPH)

Figura 3-2. Propiedades conformacionales del pentámero de la cápside del VPH, proteínas L1 y L2.

Figura 3-3. Respuesta inmune en la infección por VPH (Rincón, 2007)

Figura 6-4. Mapas plasmídicos L1 y L2 del VPH

Figura 7-5. Incidencia de las infecciones por VPH durante el estudio.

Figura 7-6. Incidencia de las lesiones por VPH durante el estudio.

Figura 7-7. Resolución de las infecciones por VPH durante el estudio

Figura 7-8. Regresión de las lesiones por VPH durante el estudio

Figura 7-9. Caracterización electroforética SDS-PAGE de los productos de expresión de L1 y L2

Lista de tablas

Tabla 6-1. Juegos de *primers* utilizados para las PCRs tipo específicas (Karlsen et al., 1996)

Tabla 7-2 Actividad de los PsVs producidos frente a un control neutralizante

Tabla 7-3 Primer ensayo de neutralización con anticuerpos de sueros de pacientes humanos.

Introducción

El cáncer de cérvix es el segundo cáncer más frecuente en la población femenina a nivel mundial, el 85% de los casos de este tipo de cáncer se presentan en los países subdesarrollados como Colombia (Ferlay J, 2010). Los datos aportados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) registran 529.828 nuevos casos al año y 275.128 muertes a nivel mundial (Ferlay J, 2010), se estima que en el mundo hay 292 millones de mujeres con el ADN del VPH y que alrededor de 105 millones de mujeres presentan o han presentado una infección por VPH-16 o VPH-18 al menos una vez (IPPF, 2007), además la Organización Panamericana de la Salud (OPS) estima que más de 33.000 muertes se producen en América Latina y el Caribe debido al cáncer cervicouterino (OPS, 2008). En Colombia, el cáncer de útero es un problema de salud pública presentando una alta incidencia, 48 casos por cada 100.000 habitantes (Combita *et al.*, 2002).

La rápida detección de lesiones cervicales producidas por VPH, en las mujeres sintomáticas o asintomáticas es la herramienta que permite una pronta acción terapéutica con el fin de buscar la resolución de la enfermedad. En la mayoría de los países del mundo se sigue utilizando la citología cervico-vaginal como técnica de tamización para detectar mujeres en riesgo de desarrollar cáncer cervical, aunque esta presenta una sensibilidad del 50 al 60% en la identificación de diferentes lesiones premalignas (Cuzick *et al.*, 2006).

La identificación del ADN viral como principal factor de riesgo ha incrementado significativamente la capacidad de identificar mujeres en riesgo de contraer cáncer de cuello del útero. Sin embargo, su aplicación como herramienta de tamización no presenta el poder epidemiológico deseado; además, no está al alcance de procedimientos corrientemente utilizados en laboratorios clínicos y teniendo en cuenta que las lesiones son focales están sujetos a los mismos errores de muestreo que la citología (Kulasingam & Koutsky, 2001).

La identificación de los anticuerpos inducidos por estos virus ha ofrecido buenas perspectivas para la identificación de mujeres en riesgo de desarrollar lesión cervical y cáncer de cérvix ya

que existe una asociación entre la presencia de anticuerpos anti-VPH y la disminución del riesgo de padecer cáncer cervical. Se ha reportado que la mayoría de mujeres infectadas con VPH presentan una respuesta de anticuerpos, principalmente dirigidas contra epítopes de la proteína L1, que los niveles de anticuerpos contra las proteínas E6 y E7 del VPH se incrementan en los sueros de pacientes con estados avanzados de cáncer cervical y están correlacionados con el estado clínico de la enfermedad (Rosales *et al.*, 2001).

Algunas infecciones virales, producen una respuesta inmune de resistencia desarrollando anticuerpos neutralizantes, dichos anticuerpos han sido difícil de detectar en infecciones producidas por VPH, ya que en un principio se contaba con ensayos de neutralización engorrosos que carecían de sensibilidad para detectar anticuerpos neutralizantes. Actualmente se realizan ensayos de neutralización confiables bien sea con viriones auténticos, viriones pseudotipeados, pseudoviriones (PsVs) que han encapsidado genes o cápsides que portan un gen reportero en su superficie. A diferencia de la técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) basados en partículas semejantes a virus o VLPs (del inglés Virus Like Particles), los ensayos de neutralización pueden ser igual de sensibles, aunque no tan sencillos pero no tienen el problema de detectar anticuerpos no neutralizantes o especie cruzados como en la técnica de ELISA lo que a veces complica la interpretación de los resultados. Los anticuerpos neutralizantes confieren alto nivel de protección tipo-específica cuando se presentan en las infecciones virales, (Breitburd *et al.*, 1995) y son los que se desarrollan como consecuencia de inmunizaciones basadas en VLPs. Este trabajo busca la detección de anticuerpos neutralizantes dirigidos contra el VPH, para la identificación de la seroconversión que no siempre se presenta de la misma manera en todas las pacientes infectadas por el virus y de esta manera obtener una medición de la respuesta inmune humoral especie-específica para el VPH.

Los estudios de población transversales pueden establecer la prevalencia de las infecciones producidas por VPH en un tiempo determinado con una sola medición de la variable, revelando que es bastante común encontrar mujeres infectadas con VPH, pero la mayoría de las infecciones se resuelven rápidamente, mientras que los estudios longitudinales permiten establecer tasas de regresión, persistencia, incidencia y seroconversión durante la infección dependiendo de los cambios de la misma debido a su transitoriedad. Estudios en este sentido, han revelado que con el incremento de la persistencia de la infección la oportunidad de resolución disminuye considerablemente (Rodríguez *et al.*, 2008) y esto está relacionado con la producción de anticuerpos neutralizantes. Otras investigaciones han reportado que la presencia

de anticuerpos que neutralizan virus se encuentra en un porcentaje alto en pacientes que no registran lesión cervical y por el contrario son casi indetectables en mujeres con carcinoma (Kawana *et al.*, 2002). Además se ha encontrado que la regresión en mujeres con lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado tiene una estrecha relación con la presencia de anticuerpos neutralizantes y estos a su vez con la presencia de un bajo nivel en el número de copias virales. (Rodríguez *et al.*, 2008).

Este estudio propone obtener PsVs que expresen los genes que codifican para las proteínas L1 y L2 presentes en la cápside de diferentes serotipos del VPH, por medio de una técnica relativamente sencilla y altamente eficiente basada en procedimientos publicados previamente (Pastrana *et al.*, 2004). La eficiencia del efecto neutralizante de los anticuerpos presentes en sueros de pacientes infectadas con VPH reclutadas en un estudio de cohorte, se evaluó por medio de la producción de fosfatasa alcalina en un método colorimétrico que ha demostrado ser más económico y accesible aunque menos sensible que otros métodos como los basados en la quimioluminiscencia para la detección de anticuerpos neutralizantes en ensayos de neutralización, y por medio del cual se podrían encontrar respuestas sobre el papel funcional de los anticuerpos neutralizantes en pacientes infectadas con el VPH y su valor predictivo en cuanto a la aparición de lesiones cervicales, condiciones clínicas que afectan a un número importante de pacientes en nuestro país.

1. Planteamiento del problema

1. Planteamiento del problema

El cáncer cervico-uterino el cual es producido principalmente por el VPH, es un problema de salud pública a nivel mundial, especialmente en los países subdesarrollados en donde la incidencia de la enfermedad tiende a aumentar y no se cuenta con planes de salud apropiados para suplir las necesidades de la población afectada. En Colombia aunque se ha venido implementando en distintos centros de salud de primer nivel jornadas para la toma de la citología anual, la idiosincrasia, los bajos recursos económicos y la falta de información de la población terminan haciendo inaccesible la participación en estas actividades, esto sin mencionar que el Plan Obligatorio de Salud (POS) no contempla ningún otro examen de rutina para la detección temprana de éste cáncer ni estudios de seguimiento que puedan dar una idea del comportamiento del VPH en la población colombiana a través del tiempo.

Este estudio busca encontrar una correlación entre la infección y la seroconversión producida por el VPH y cómo estas características conllevan a la aparición de lesiones pre-malignas y cáncer cervical.

2. Justificación

Sabiendo la problemática de salud pública actual que representa la infección por el VPH, se ha visto la necesidad de estudiar la cinética de la enfermedad debido a que la seroconversión es intermitente y la infección transitoria

La realización de ensayos de neutralización en conjunto con pruebas de rutina como la citología y ensayos de biología molecular (PCR) aplicados en estudios longitudinales o de cohorte podrían facilitar el entendimiento en cuanto a la respuesta inmune humoral, detectada por la seroconversión, y su relación con la regresión o persistencia de infecciones en mujeres que han estado en contacto con el VPH. En este estudio se implementó la producción de pseudoviriones por medio de una técnica fácil y de alto rendimiento para ser utilizados en ensayos de neutralización y de esta manera obtener resultados que permitan entender el comportamiento de los anticuerpos neutralizantes en un grupo de mujeres.

Por otra parte la relación entre infección, seroconversión y factores de riesgo todavía no ha sido esclarecida, este proyecto se pudo encontrar en la población de estudio factores predisponentes para presentar infección y desarrollar lesiones en pacientes con o sin presencia de ADN viral o anticuerpos neutralizantes, y de esta manera contribuir al diagnóstico temprano y pronta acción terapéutica.

3. Estado del arte

3.1. Cáncer de útero

El cáncer de útero es una preocupación mundial por la creciente afectación de mujeres en edad fértil y la muerte temprana de la población femenina en edad productiva; este tipo de cáncer se presenta en todas las regiones del mundo; es el segundo cáncer más frecuente en mujeres a nivel mundial después del cáncer de seno, anualmente se registran más de 500.000 nuevos casos y aproximadamente 275.000 mujeres mueren por esta enfermedad (Ferlay J, 2010). Según datos del Instituto Nacional de Cancerología (INC), el cáncer de útero es un problema de salud pública en Colombia, presentando una alta incidencia (48 casos / 100.000 habitantes) (Combata *et al.*, 2002); constituyendo la segunda causa de muerte por cáncer femenino en éste país, encontrándose una mayor tasa de mortalidad en las mujeres que habitan en las regiones de Meta, Caquetá, Tolima, Arauca y Amazonas y aunque en los últimos siete años la mortalidad ha disminuido las cifras son menores de lo esperado. En países como Chile, Canadá, Estados Unidos e Inglaterra se han implementado nuevas tecnologías con el fin de mejorar la prevención, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad, en Colombia por el contrario, la poca efectividad en las medidas de prevención y la inaccesibilidad para los programas de citología han llevado a buscar otras alternativas para el control de éste cáncer, según reporte institucional sobre el cáncer del cuello uterino emitido por el Instituto Nacional de Cancerología (INC, 2009).

Los estudios de prevalencia de VPH, en casos tanto de adenocarcinomas como de carcinoma escamocelular en el cuello del útero, han demostrado que el VPH está presente en el tejido tumoral en casi el 100% de los casos. Se ha reportado que el alto número de copias virales está relacionado con un incremento en el riesgo de desarrollar lesiones cervicales asociadas. Otros factores de riesgo además de la infección por VPH son: el uso de estrógenos, tabaquismo, alcoholismo, dieta, multiparidad, alto número de compañeros sexuales, inicio temprano de la vida sexual, inmunosupresión, entre otros (Ardeleanu *et al.*, 2001).

3.2. Infección con VPH

El VPH es epiteliotrópico, entra al organismo a través de pequeños cortes o abrasiones en la piel o las mucosas y llega a la capa basal del epitelio. Los signos y síntomas pueden ser variados, desde su ausencia total hasta la sensación de masa evidente, dolores pélvicos severos, leucorreas, hemorragias vaginales y dispareunia (Sanclemente & Gill, 2002). Las infecciones por VPH de bajo riesgo producen lesiones benignas de la vulva y de la vagina como el condiloma acuminado, mientras que las producidas por VPH

de alto riesgo (VPHAR) progresan a cáncer cervical en un 20% de las mujeres infectadas después de un largo periodo de latencia, el restante 80% resuelve la infección por mecanismos inmunológicos (zur Hausen, 2002). Cuando el virus no es eliminado, el resultado es una infección persistente; esto hace que la lesión permanezca y que progrese de lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LEI-BG) a lesión escamosa intraepitelial de alto grado (LEI-AG) y de ahí a cáncer cervical invasivo. Según estudios realizados anteriormente, aproximadamente un 50% de mujeres después de la infección por VPH pueden desarrollar LEI-BG en un plazo de 3 años (Winer *et al.*, 2005).

Los VPHAR se han detectado en todos los casos de cáncer de útero, en un 70–85% en las LEI-AG y de 40 a 60 % en LEI-BG y un 50-60 % de atipia de significancia indeterminada en células escamosas (ASCUS) (Levert *et al.*, 2000), aclarando que todo cáncer cervical presenta ADN de VPHAR, pero no toda lesión cervical es producida por tipos virales de alto riesgo.

3.3. Epidemiología

Los VPHAR oncogénicos tipo 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 58, y 59 son los más prevalentes en África y América Latina; el VPH 16 es el más frecuente en el mundo excepto en Indonesia y Argelia donde el VPH 18 es el más común; el VPH 45 presenta alta frecuencia en África Occidental; los tipos 33, 39 y 59 se concentran en Centro y Sur América (Rivera Z *et al.*, 2002)

La incidencia de VPHAR a nivel mundial es variable de acuerdo a la comunidad afectada, sus tipos de costumbres, idiosincrasia, carácter moral, cepas virales prevalentes y la eficiencia en los programas de tamización. Hay regiones con baja incidencia como Israel (3.8 por 100.000) y regiones con alto número de casos como Perú (54.6 por 100.000) (Santos *et al.*, 2001). Actualmente, el cáncer cervical afecta principalmente mujeres entre 40 y 50 años, con una incidencia global de 400 mil casos nuevos diagnosticados cada año.

La incidencia, prevalencia y mortalidad han disminuido en la mayoría de países desarrollados, influenciados por el compromiso de los gobiernos con esta enfermedad, donde las tamizaciones son obligatorias, gratuitas y efectivas. En nuestro país se presentan entre 24 y 48 casos por cada 100.000 habitantes (Combata *et al.*, 2002) y en los últimos años esta incidencia no ha disminuido.

3.4. Estudios longitudinales

Los estudios transversales no permiten determinar la evolución de las infecciones producidas por el VPH ni establecer el tiempo de resolución de las lesiones cervicales o persistencia de la infección viral, por lo tanto se ha visto la necesidad de desarrollar estudios longitudinales, también llamados de incidencia, seguimiento o de cohorte, para

evaluar el comportamiento del sistema inmune frente a la infección por el virus a través del tiempo, éstos estudios muestran que la mayoría de las infecciones son transitorias y sólo las mujeres que albergan infecciones persistentes logran desarrollar una lesión escamosa intraepitelial cervical (Moscicki *et al.*, 1993), otros factores son probablemente influenciados por la historia natural de las infecciones por VPH.

Determinantes virales incluyendo el tipo y la carga viral, han sido identificados como marcadores de persistencia o neoplasia cervical (Bosch *et al.*, 2002). Sin embargo factores de riesgo medioambientales pueden jugar un papel importante en la carcinogénesis cervical, aunque no se sabe con certeza en qué estadio de la infección estos cofactores son influenciados (Castellsagué *et al.*, 2002). Además la definición de persistencia ha variado significativamente entre los estudios y cada estudio de cohorte difiere en cuanto a métodos de detección y los tiempos del seguimiento. (Hildesheim *et al.*, 1994).

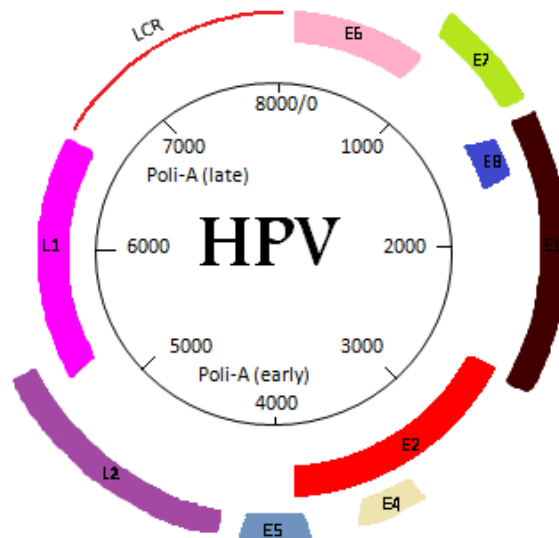
Investigaciones recientes han evaluado estudios de cohorte en donde se ha observado la actividad neutralizante de anticuerpos anti VPH, empleando pseudoviriones y se ha demostrado que mujeres con infección persistente para VPH16 se sero-convierten a los 10.6 meses, en otros a los 11.8 meses con tasas de seroconversión de 59.1 % para VPH 16 y de 54.8% para VPH18 (Carter *et al.*, 2000). Estos datos sugieren que la seroconversión puede ser transitoria y que la seropositividad sería intermitente fluctuando los niveles de anticuerpos alrededor del umbral de la detección.

3.5. Características del VPH

EL VPH es un virus no encapsulado, icosaédrico, constituido por ADN circular de doble cadena de aproximadamente 8.000 pares de bases como se observa en la Figura 3-1, protegido por una cápside asociada a histonas con un diámetro aproximado de 52-55 nm.

La cápside consiste de 360 copias de L1, organizadas en 72 pentámeros y 7 lados icosaédricos, con pequeñas inclusiones de la proteína menor de la cápside L2. (Sanclemente & Gill, 2002).

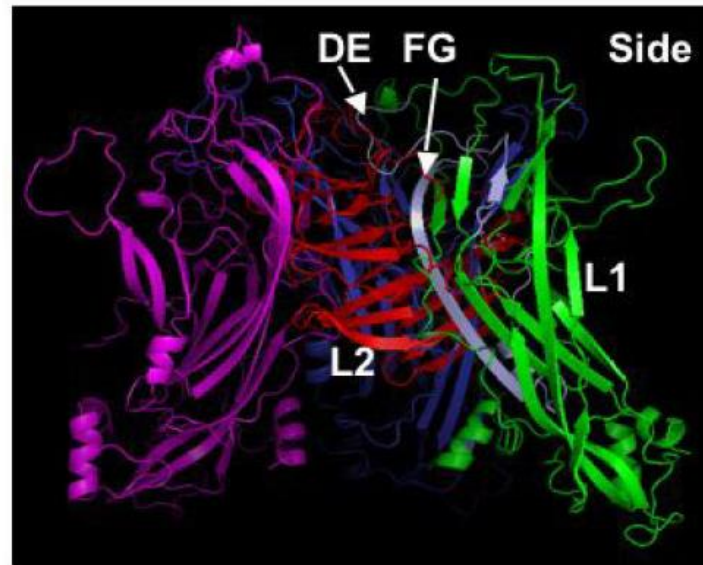
Figura 3-1 Características genómicas del Virus del Papiloma Humano (VPH)



El genoma puede ser dividido en tres fragmentos principales: una región temprana (E) de aproximadamente 4 kb que codifica para proteínas no estructurales, una región tardía (L) de aproximadamente 3 kb que codifica para dos proteínas estructurales de la cápside y una región de control larga (LCR). Los genes E codifican las proteínas reguladoras (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) necesarias para los procesos de replicación, transcripción y cito transformación. E1 y E2 juegan un papel importante en la replicación del genoma viral. E4 codifica la proteína tardía NS y aparentemente rompe el citoesqueleto, E5 actúa como proteína transformante interactuando con los factores de crecimiento celular. Las proteínas E6 son pequeñas, de aproximadamente 150 aminoácidos que contiene dos dominios que consisten de motivos CXXC apareados y cada uno está relacionado al carboxi-terminal de la proteína E7. La proteína E7 es una fosfoproteína ácida unida al zinc que es detectada en el citoplasma y en el núcleo de las células transformadas por VPH, esta proteína interactúa con la proteína supresora de tumor de retinoblastoma (pRB) y daña su función como reguladora de crecimiento celular (Qin *et al.*, 2005).

Los genes L codifican las proteínas mayoritarias de la cápside viral (L1 y L2) (Figura 3-2) que ensamblan nuevos viriones en las capas cutáneas superiores. La proteína principal de la cápside es L1, que comprende más del 90% de las proteínas del virión, es el principal componente de la superficie del virus, pesa 55 kDa. La proteína está implicada en la invasión del virus a las células epiteliales.

Figura 3-2. Modelo predictivo en 3D de la interacción entre las proteínas L 1 y L2 del VPH. Predicción de la orientación de la proteína L2 dentro de la estructura pentamérica de la proteína L1 (Lowe *et al.*, 2008).



L2 despliega un dominio de unión a ADN de VPH y también un epítipo expuesto en la superficie que media específicamente en el reconocimiento inmune (Finnen *et al.*, 2003).

Existen más de 100 tipos de VPH, pueden clasificarse como de alto riesgo (tipos 16 y 18), de riesgo intermedio (VPH tipos 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 82) o de bajo riesgo (VPH tipos 6 y 11, 26, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 55, 62, 66) según su capacidad de inducir cambios histológicos de carcinoma escamoso. Mientras el genotipo 16 se asocia con mayor frecuencia en carcinomas escamo-celulares, el genotipo 18 a adenocarcinomas (Stanley, 2008).

3.6. Métodos de detección del VPH

La técnica de Papanicolaou, ha demostrado ser una poderosa herramienta en la detección de lesiones precursoras de cáncer y carcinomas. Se ha reportado que la sensibilidad de la citología convencional es de 47% con un reporte de falsos negativos muy variables que van del 1.5% al 55% (Ojeda *et al.*, 2008). Análisis retrospectivos realizados en pacientes que desarrollan un cáncer de cérvix a pesar de haber estado sometidas a tamización, encontraron que del 5% al 15% tenían un diagnóstico “falso negativo” y que estos casos correspondían a ASCUS, LEI-BG y LEI-AG (Davey *et al.*, 1993). Además existe un porcentaje de pacientes que desarrollan cáncer de cérvix (13-47%) cuya citología fue negativa en estudios citológicos previos. Esta amplia variabilidad en la sensibilidad de la citología cervical para la detección temprana de cáncer es

atribuida a la subjetividad del lector de la citología y a errores técnicos en la toma de la muestra.

En la actualidad, se han desarrollado técnicas moleculares con el fin de detectar e identificar el ADN viral; una de las más empleadas debido a su alta especificidad es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Bollmann *et al.*, 2003; Cortes-Gutierrez *et al.*, 2003), la cual utiliza el sistema de *Primers* GP5+/6+ y MY09/11, dirigidos hacia una región de la proteína viral L1, con lo cual abarca un mayor espectro en la detección de ADN viral (Hubbard, 2003; Husnjak *et al.*, 2000). De hecho, esta prueba es más sensible que la citología (97-100%). Sin embargo, su utilización en el diagnóstico y tamización no presenta el poder epidemiológico deseado (Bollmann *et al.*, 2003).

Una nueva generación del método propuesto por Digene®, Captura Híbrida Viral II (HC-II), incluye un número mayor de tipos de alto riesgo y mejora los límites de detección de la técnica, cuando se realiza junto con la citología se tiene una mejor tamización del paciente infectado (Leder *et al.*, 2001).

Los análisis por metodologías de captura antigénica como el ELISA, han demostrado que entre el 20-50% de las mujeres con lesiones asociadas a VPH o con presencia de ADN viral no presentan niveles detectables de anticuerpos anti VPH; además la reactividad de estos anticuerpos es específica del tipo de virus disminuyendo sensibilidad de un ELISA basado en VLPs, estas partículas se asemejan a los virus pero no son infectivos porque no poseen el genoma viral pero expresan proteínas estructurales de la cápside como la L1. Sin embargo, se ha descrito que en parte la falla en la detección por ELISA de la infección por VPH es debido a la falta de optimización del ensayo (Karem *et al.*, 2002).

Los pseudoviriones son también partículas semejantes a virus pero en este caso en la cápside expresan la proteína L1 y L2, y además portan un gen reportero. Se ha reportado que los ensayos de neutralización basados en pseudoviriones tienen una sensibilidad similar y una especificidad más alta que los ensayos de ELISA basados en VLPs. Estos ensayos han sido desarrollados para la detección de anticuerpos que neutralizan el virus y que reconocen principalmente epítopes conformacionales de L1 presentados en VLPs o después de una infección natural. Los anticuerpos neutralizantes son en un principio restringidos al tipo viral usado para la inmunización indicando la presencia de un epítope tipo-específico inmunodominante. La relación entre los títulos de anticuerpos neutralizantes y la presencia de ADN VPH en el tracto genital aún es incierta (Wu *et al.*, 2009).

3.7. Respuesta inmune contra VPH

Como es el caso de muchas infecciones virales, tanto la respuesta innata como la adaptativa son importantes en la defensa contra el VPH. Existe evidencia del estrés

celular en el proceso innato que conduce a la destrucción del virus y a las células afectadas por éste sin embargo el VPH es muy hábil para evadir este proceso.

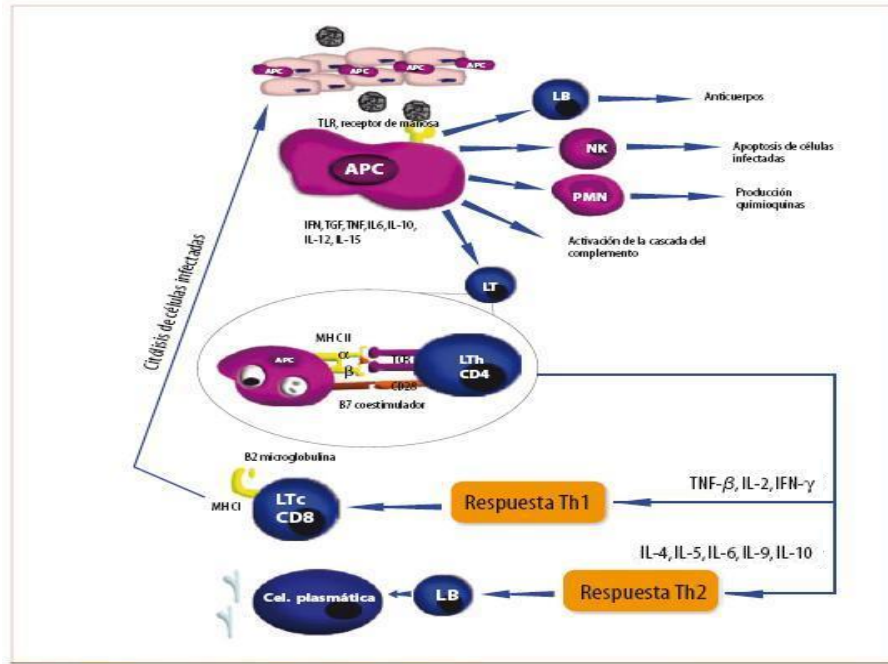
Una vez se ha producido la infección y el VPH ha entrado por microlesiones, los viriones mucosotrópicos permanecen en el sitio inicial de la infección sin inducir lisis de las células afectadas. Durante la replicación natural las proteínas de la cápside antigénica no son expresadas hasta que la célula huésped se ha diferenciado en las capas superficiales del epitelio donde las células dendríticas no pueden reconocerlos. Los transcritos de los genes tempranos del VPH, en particular E6 y E7, comienzan a trabajar rápidamente en contra del sistema inmune innato por medio de la desregulación de funciones relacionadas con el interferón (INF) y con la señalización nuclear del factor- κ B (Scheurer *et al.*, 2005).

A escala cervical, como defensa, tras la primera infección de las células del epitelio por VPH, se desencadena una serie de respuestas inespecíficas acompañadas de procesos inflamatorios, quimio atracción de neutrófilos, activación de macrófagos, intervención de células asesinas naturales (NK), de anticuerpos naturales, e incluso del sistema del complemento, que formarán una primera barrera defensiva de inmunidad inespecífica.

Las células reticulares de Langerhans, y algunos queratinocitos funcionan como células presentadoras de antígenos (APC). Estas células fagocitan las partículas virales para digerirlas en endosomas y comenzar un proceso de activación, que incluye la presentación en superficie de cadenas polipeptídicas del antígeno junto con HLA clase II, así como la migración a los ganglios linfáticos locales. Las células reticulares de Langerhans junto con el HLA, moléculas coestimuladoras y citoquinas como IL-12 o IL-10, activan los linfocitos T nativos y dirigen su diferenciación hacia células efectoras. La información adquirida por las células dendríticas dirige la inmunidad mediada por linfocitos T ayudadores o citotóxicos, Th1 o Th2 (Rincon, 2007)

Los linfocitos T CD4+ activados evolucionarán hacia linfocitos T ayudadores (Th) en el contexto local de expresión de ciertas interleuquinas, de modo que si predomina la de tipo IL-12, se promoverá la diferenciación hacia una vía Th1 que inducirá la activación y proliferación de los linfocitos T CD8+ citotóxicos específicos y la producción de IL-2 e Interferón- γ fundamentalmente; por el contrario, si en el contexto local no se expresa IL-12, se promoverá la vía Th2 que inducirá la activación y expansión de linfocitos B, los cuales evolucionarán, diferenciándose, hacia células plasmáticas productoras de anticuerpos frente a las proteínas virales; por otra parte, se inducirá expresión de interleuquinas del tipo IL4, IL5, IL6, IL10. La infección viral de los queratinocitos contribuye a la inmunodeficiencia local mediante la inhibición de la producción de moléculas solubles y de membrana, importantes para la migración y función de las APCs, tal como se ilustra en la Figura 3-3 (Rincon, 2007).

Figura 3-3. Respuesta inmune en la infección por VPH (Rincon, 2007)



Todos los mecanismos para evadir al sistema inmune confieren al VPH la habilidad para permanecer oculto y extiende el período que toma para que una infección sea resuelta por el sistema inmune. Mientras que la respuesta innata es inmediata, la seroconversión de anticuerpos contra VPHAR puede tomar aproximadamente entre seis meses a un año después de que ADN viral haya sido hallado en el tejido (Scheurer *et al.*, 2005).

Las proteínas L1 de la cápside de VPH son antígenos efectivos para estudios serológicos y pueden ser usados para detectar una respuesta inmune humoral tipo específica en suero de pacientes (Kirnbauer *et al.*, 1992). Existe una seroconversión del 50 al 70% de las mujeres infectadas con VPH dentro de los 18 meses posteriores a la detección viral; las mujeres que presentan VPH 16 y 18 tienen un tiempo aproximado de seroconversión de 11.8 meses y 12.6 meses respectivamente. Pocas seroconversiones ocurren después de los 18 meses, se ha reportado que un significativo grupo de mujeres con infección por VPH no desarrollan anticuerpos (Carter *et al.*, 2000; de Gruijl *et al.*, 1997; Petry *et al.*, 2002).

Algunos investigadores han afirmado que a medida que se presentan lesiones cervicales los niveles de anticuerpos neutralizantes tienden a disminuir, encontrándose los niveles altos en pacientes sin lesión cervical aunque positivas para ADN viral y por el contrario niveles casi indetectables en pacientes con cáncer cervical (Kawana *et al.*, 2002).

Los niveles de anticuerpos contra las proteínas E6 y E7 del VPH se incrementan en los sueros de pacientes con estados avanzados de cáncer cervical y están relacionados con el estado clínico de la enfermedad, también ha sido reportado que el 20.5% de cáncer cervical y 15.8% de LEI-BG presentan anticuerpos contra la proteína E7 de VPH16.

Estos anticuerpos pueden ser detectados en mujeres con infección persistente y adicionalmente pueden ser usados como marcadores de procesos infecciosos en mujeres asintomáticas (Carter *et al.*, 2000). Otros estudios de citotoxicidad empleando péptidos de E6 demuestran que aunque estos péptidos son capaces de inducir linfocitos T citotóxicos, no presentan habilidad para reconocer líneas celulares infectadas con VPH y esto se debe a una disminución en la expresión de moléculas CMH clase I, proteínas transportadoras como TAP1 y TAP2, y proteínas del proteasoma, estos datos sugieren que tales defectos pueden existir en tejidos cancerosos y pueden presentar un obstáculo para la inmunoterapia contra el cáncer, sin embargo, es necesaria la búsqueda de nuevos antígenos candidatos para una vacuna terapéutica y nuevos modelos de experimentación (Evans *et al.*, 2001).

3.8. Vacunas contra el VPH

El desarrollo de vacunas representa la mejor herramienta para prevenir y controlar la enfermedad, es importante tener en cuenta mecanismos que involucren la biología del virus, así como posibles antígenos blanco, respuesta inmune del hospedero frente a la infección con VPH, nivel de protección que puede brindar y su forma de administración (Huh & Roden, 2008).

Las vacunas profilácticas actuales Gardasil® y Cervarix®, están basadas en la integración de VLPs de diferentes tipos de VPH. La primera es una vacuna tetravalente diseñada a partir de VLP L1 de los tipos 6,11, (causan del 75-90% de verrugas genitales externas) 16 y 18 (causan el 70% de cáncer cervical) y la segunda es bivalente compuesta de los tipos 16 y 18. Ambas vacunas necesitan ser mantenidas en cadena de frío y son administradas intramuscularmente en el área del deltoides. Ambas presentan alta inmunogenicidad en ensayos clínicos, resultando en 100% de seroconversión. Observando los títulos de anticuerpos para las dos vacunas, después de un mes de la tercera dosis estos evidenciaron altos títulos aproximadamente a los 6 meses declinando sobre los siguientes años (4.0 y 4.5 años para Cervarix® y Gardasil® respectivamente) (Garland *et al.*, 2007).

Otro enfoque para el desarrollo medicamentos contra el VPH es la producción de compuestos terapéuticos. El objetivo principal de estas sustancias es la erradicación de las lesiones LEI-AG y hasta el cáncer cervical. Existen varios tipos de medicamentos terapéuticos como las basadas en péptidos derivados de genes virales, así como la utilización de ADN y ARN viral para el diseño de constructos en vectores bacterianos. Todas estas aproximaciones apuntan a inducir respuestas inmunes de tipo celular en los que el blanco principal son las proteínas E6 y E7 (Stanley, 2008).

3.9. Relación entre anticuerpos neutralizantes y la historia natural de la infección

Estudios previos realizados en mujeres infectadas con VPH han demostrado que hay una asociación entre la presencia de anticuerpos neutralizantes y la prevención en el desarrollo de lesiones premalignas a cáncer, encontrándose que mujeres que presentan ADN viral y no presentan lesiones tienen una incidencia mayor de presentar anticuerpos neutralizantes que las que tienen lesiones, y que las que presentan lesiones leves hacen regresión al desarrollar estos anticuerpos. (Kawana *et al.*, 2002).

Algunos autores debaten esto y aseguran que el desarrollo de anticuerpos neutralizantes no favorece un mejor resultado de las lesiones cervicales de bajo grado y que la detección de anticuerpos neutralizantes generados por la infección natural puede reflejar persistencia viral y por lo tanto ayudar a identificar a las mujeres que están en alto riesgo de progresión de la enfermedad (Ochi *et al.*, 2012).

Los ensayos de neutralización basados en PsVs - teniendo en cuenta que un pseudovirión es una partícula semejante a un virus que no contiene ADN viral si no un gen reportero que codifica para la expresión de una sustancia que permite evidenciar su actividad, posee en su cápside las proteínas L1 y L2 y es producido mediante la transfección de plásmidos en células eucariotas - permiten evidenciar la acción neutralizante de anticuerpos al bloquear la invasión de pseudoviriones a células blanco *in vitro*, y son considerados el método Gold Standard para evaluar la respuesta inmune humoral funcional contra el VPH (Nie *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2014).

La mayoría han sido utilizados para evaluar la funcionalidad neutralizante de anticuerpos en pacientes vacunadas o animales inmunizados (Barzon *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014), y aunque en un principio eran muy engorrosos ahora son de alto rendimiento gracias a las modificaciones genéticas en plásmidos y células blanco (Buck *et al.*, 2005).

Estos ensayos permiten detectar la actividad de los anticuerpos neutralizantes por medio de la sustancia generada por el gen reportero la cual es medida en la mayoría de los estudios por quimioluminiscencia (Buck *et al.*, 2005; Sehr *et al.*, 2013; Vidyasagar *et al.*, 2014), técnica mucho más costosa que una medición realizada por un método colorimétrico.

4. Hipótesis

4. Hipótesis

La identificación de anticuerpos neutralizantes por medio de ensayos de neutralización basados en pseudoviriones y revelados por métodos colorimétricos podría realizarse a un costo menor que los realizados con quimioluminiscencia, además en conjunto con pruebas de rutina y técnicas moleculares aplicadas en estudios de cohorte podrían aclarar el comportamiento del virus a través del tiempo y ayudar a tomar decisiones en cuanto a un mejor diagnóstico, tratamiento y seguimiento clínico para las mujeres afectadas.

5.Objetivos

5.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la relación existente entre la presencia de anticuerpos neutralizantes, infección y lesiones cervicales causadas por el VPH en mujeres colombianas sometidas a un estudio longitudinal durante el período de 2007-2009.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la respuesta inmune humoral contra el VPH por medio de ensayos de neutralización.
2. Evaluar la resolución o persistencia de la infección por VPH a través de la citología y la presencia de ADN viral durante el seguimiento.
3. Identificar correlación entre la infección causada por el VPH y la seroconversión en mujeres con o sin lesiones cervicales.

6. Metodología y procedimientos

El presente estudio estuvo enmarcado en el macro proyecto que fue desarrollado por la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), el cual llevaba por título “Cáncer de útero en mujeres: Detección y seguimiento de anormalidades citológicas, infección por VPH, Anticuerpos anti-VPH en 25.000 mujeres de diferentes regiones de Colombia y caracterización inmunológica de péptidos candidatos a vacuna contra VPH.”

6.1. Población

Mujeres entre los 18 y 60 años de edad que asistieron al servicio de citología de los distintos centro de salud: Hospital de Engativá (Bogotá, D.C., Colombia), Hospital San Rafael de Girardot (Girardot, Cundinamarca, Colombia), Hospital San Juan Bautista (Chaparral, Tolima, Colombia), quienes estuvieron dispuestas a participar en el estudio por un plazo aproximado de dos años con intervalos de seis meses \pm 2 entre cada visita. A cada participante se le tomó una muestra de sangre para estudios serológicos y fueron sometidas a una examinación pélvica para extracción de células cervicales para la citología y detección de VPH. Cada participante llenó a conformidad la historia clínica (Anexo A) y firmó el consentimiento informado (Anexo B). Que detalla los objetivos del proyecto e informa de qué manera la paciente contribuyó al estudio, así como los posibles riesgos como consecuencia de la toma de la muestra y el beneficio que el estudio representa para ella. Todos los procedimientos realizados en el presente estudio fueron aprobados por los Comités de Ética de cada uno de los hospitales que participaron en él.

6.2. Venopunción

Para la toma de la muestra se seleccionó la vena más indicada y se desinfectó el área de venopunción con alcohol antiséptico, realizando la limpieza con movimiento circular de adentro hacia afuera. La aguja se aseguró en la camisa (porta - aguja) luego se colocó el torniquete en el antebrazo y posteriormente se punzó la vena de cada paciente. El tubo se retiró cuando se tomaron 5 ml de sangre y luego se retiró la aguja. Por último sobre el sitio de la punción se procedió a colocar una torunda de algodón seca ejerciendo presión para facilitar el proceso de coagulación y finalmente se descartó la aguja en el guardián. Se permitió la retracción del coágulo a temperatura ambiente y se centrifugó el tubo tapado a 2.500 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos. Finalmente se separó el suero en viales o tubos secos y se remitieron al Instituto de Inmunología de Colombia debidamente rotulados e identificados.

6.3. Citología

La prueba de Papanicolaou o citología fue realizada de acuerdo a las últimas normas del servicio de salud de Colombia “La norma técnica para la detección temprana del cáncer de útero y guía de atención de lesiones pre-neoplásicas de cuello uterino” (hace parte de

la Resolución número 00412 de 2000). Para el análisis de las muestras se tuvo en cuenta la clasificación de Bethesda 2001, ya que establece una mayor correlación entre los hallazgos citológicos, los datos clínicos y los correspondientes cuadros histológicos, e incluye, además, criterios sobre la calidad de la muestra.

6.4. Colposcopia – Biopsia

La colposcopia fue una técnica creada por Hinselman en 1925, la cual permite la observación estereoscópica de la superficie del cuello uterino mediante el colposcopio. Es un examen visual especializado del cérvix, la vagina y algunas veces de los labios vaginales externos o la vulva. Este examen se practica en aquellos casos donde la prueba Papanicolaou o citología ha mostrado células anormales. Se requiere un examen visual utilizando el colposcopio, diferentes lentes de aumento o filtros de color y soluciones tales como ácido acético o yodo, lo cual ayuda a identificar cambios en el cérvix y la vagina que no siempre pueden ser detectados mediante un examen rutinario. Tiene aproximadamente una duración de 10-20 minutos. Si se identifican áreas anormales, usualmente se toma una pequeña muestra de éste tejido llamada biopsia (Allard *et al.*, 2005).

Por lo tanto a las mujeres que presentaron citología anormal se les realizó durante el estudio una colposcopia según la técnica estándar avalada por la Secretaria Distrital de Salud y en los casos en que el resultado fuera anormal (VPH, LEI-BG, LEI-AG) y hubiese sospecha de infiltración, se procedía a tomar una biopsia del sitio de la lesión.

6.5. Muestra de células cervicales

En el momento de realizar la citología se obtuvo por medio de un cepillo citobrush una muestra de epitelio cervical, la cual se colocó en tubo de vidrio con 2.5 ml de etanol al 95% (Cervantes *et al.*, 2003; Lema *et al.*, 2001) y se almacenó a 4° C.

Cada muestra se centrifugó y se lavó 1 vez con PBS; después se incubó en 100 µL de buffer de lisis (10 mM Tris-HCL [pH 7.9], 0.45% Nonidet p-40, 0.45% Tween 20 y 60 µg/ml de Proteinasa K) a 60° C por 1 hora y a continuación a 95° C durante 10 minutos (Nelson *et al.*, 2000). A todas las muestras se les realizó una amplificación usando los *primers* GH20/PC04 de la β-globina humana, prueba utilizada para garantizar la presencia de ADN (de Roda Husman *et al.*, 1995; Saiki *et al.*, 1988; Saiki *et al.*, 1985)

6.6. Prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación de ADN VPH

A los sobrenadantes obtenidos del tratamiento con buffer de lisis se les practicaron dos protocolos de PCR; el primero utilizando *primers* consenso GP5+/GP6+ y el segundo con *primers* MY09/ MY11, para amplificar la región L1 de genoma de VPH de alto riesgo (de Roda Husman *et al.*, 1995; Karlsen *et al.*, 1996; Qu *et al.*, 1997).

La reacción con los *primers* GP5+/GP6+ (de Roda Husman *et al.*, 1995), se realizó a un volumen final de 20 µl, en condiciones: 2 µl de buffer 10x (Bioline®), 100 µM de cada dNTP (Bioline®), 3 mM MgCl₂ (Bioline®), 1 U de Taq Polimerasa (Bioline®) y 40 pmol de cada *primer*. La mezcla de PCR se desnaturalizó a 94° C por 10 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificación en termociclador Perkin Elmer CETUS-USA; cada ciclo consistió en 94° C por 30 segundos, 42° C por 30 segundos y 72° C por 30 segundos; la elongación final se hizo a 72° C durante 7 minutos.

La reacción con los *primers* MY09/MY011 (Qu *et al.*, 1997), se realizó con un volumen final de 20 µl: 2 µl de buffer 10x, 100 µM de cada dNTP, 3 mM MgCl₂, 1 U de Taq Polimerasa (Bioline®), y 40 pmol de cada *primer*. La mezcla de PCR se desnaturalizó a 94° C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de amplificación en un termociclador Perkin Elmer CETUS-USA; cada ciclo consistió en 94° C por 30 segundos, 51°C por 45 segundos y 72° C por 45 segundos; la elongación final se realizó a 72° C durante 7 minutos.

Como control negativo para ambas reacciones se utilizó agua free (GIBCO) y como control positivo se usaron células Sf21 infectadas con ADN de la proteína L1 de VPH-16 y VPH-18, la cual se extrajo a partir de epitelios cervicales infectados. Las PCRs se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con SYBR safe (Invitrogen), utilizando el escáner Molecular Imagen Fx BIO RAD® y el software Quantity One®.

6.7. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) usando *primers* tipo-específico:

Las muestras positivas para uno o ambos sistemas genéricos utilizados, se amplificaron usando *primers* tipo-específico para los subtipos VPH-16 y VPH-18. La reacción utilizó *primers* específicos para las regiones que codifican para las proteínas E6 y/o E7, según sea el caso (Tabla 6-1) (Karlsen *et al.*, 1996). Ésta se realizó a un volumen final de 15 µl en condiciones: 1.5µl de buffer 10x (Bioline®), 100 µM de cada dNTP (Bioline®), 3 mM MgCl₂ (Bioline®), 1 U de Taq Polimerasa (Bioline®) y 40 pmol de cada *primer*. La mezcla de PCR se desnaturalizó a 94° C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificación en termociclador Perkin Elmer CETUS-USA; cada ciclo consistió en 94° C por 30 segundos, 53° C por 30 segundos para VPH 16, 55° C por 30 segundos para VPH 18 y 72° C por 1 minuto; la elongación final se realizó a 72° C durante 10 minutos.

Las muestras que no amplificaron para los *primers* tipo-específicos de VPH-16 o VPH-18, se sometieron a tipificación para los tipos 31, 33, 45 y 58 dirigidos hacia las regiones E5, E6 y E7 según sea el caso (Tabla 6-1) (Karlsen *et al.*, 1996; Walboomers *et al.*, 1999).

Para VPH-31 y 33 la mezcla se realizó a un volumen final de 10 μ l, utilizando 1 μ l de buffer 10x (Bioline®), 250 μ M de cada dNTP (Bioline®), 4 mM MgCl₂ (Bioline®), 1 U de Taq Polimerasa (Bioline®), y 10 pmol de cada *primer*. La mezcla de PCR se desnaturalizó a 95° C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificación en termociclador Perkin Elmer CETUS-USA; cada ciclo consistió en 95° C por 1 minuto, 60° C por 1 minuto y 72° C por 1 minuto; la elongación final se hizo a 72° C durante 5 minutos.

Para VPH-45 y 58 la mezcla se realizó a un volumen final de 10 μ l, de la siguiente manera: 1 μ l de buffer 10x (Bioline®), 250 μ M de cada dNTP (Bioline®), 3 mM MgCl₂ (Bioline®), 1 U de Taq Polimerasa (Bioline®) y 5 pmol de cada *primer*. La mezcla de PCR se desnaturalizó a 95° C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificación en termociclador Perkin Elmer CETUS-USA. Cada ciclo consistió en 95° C por 1 minuto, 65° C por 1 minuto y 72° C por 1 minuto; la elongación final se realizó a 72° C durante 5 minutos.

Como control negativo para las reacciones se utilizó agua free (GIBCO) y como controles positivos genes sintéticos de VPH-16, 31, 45, 58 y muestras de pacientes infectadas con VPH 18 y 33. Las PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con SYBR safe (Invitrogen) y utilizando el escáner Molecular Imagen Fx BIO RAD® y el software Quantity One®.

Tabla 6-1. Juegos de *primers* utilizados para las PCRs tipo específicas (Karlsen *et al.*, 1996)

Tipo	Primer	Secuencia Primer (5'-3')	Región Blanco	Tamaño (pb)
β-Globina	GH20	GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC	β-Globina	268
	PCO4	CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC	β-Globina	268
GP+	GP5+	TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC	L1	140
	GP6+	GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C	L1	140
MY	MY09	CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC	L1	450
	MY11	GCM CAG GWG CAT AAY AAT GG	L1	450
VPH-16	PrD	TCA AAA GCC ACT GTG TCC TGA	E6	120
	PrR	CGT GTT CTT GAT GAT CTG CAA	E6	120

VPH-18	PrD	CGACAGGAACGACTCCAACGA	E6-E7	202
	PrR	GCTGGTAAATGTTGATGATTA ACT	E6-E7	202
VPH-31	PrD	CTA CAG TAA GCA TTG TGC TAT	E5	155
	PrR	ACG TAA TGG AGA GGT TGC AAT AAC CC	E5	155
VPH-33	PrD	AAC GCC ATG AGA GGA CAC AAG	E7	212
	PrR	ACA CAT AAA CGA ACT GTG GTG	E7	212
VPH-45	PrD	ACG GCA AGA AAG ACT TCG CA	E6-E7	134
	PrR	CAC AAC AGG TCA ACA GGA TC	E6-E7	134
VPH-58	PrD	CGA GGA TGA AAT AGG CTT GG	E7	109
	PrR	ACA CAA ACG AAC CGT GGT GC	E7	109

6.8 Cultivo de células 293TT

Para llevar a cabo los ensayos de neutralización se obtuvieron PsVs que contenían un gen reportero, estos PsVs se produjeron a partir de la transfección de las células eucariotas 293TT con plásmidos que codifican para los genes estructurales L1 y L2 del VPH junto con un plásmido reportero tal como se describió anteriormente por el Laboratorio de Oncología Celular del Instituto Nacional del Cáncer, Bethesda, Estados Unidos de Norteamérica (Laboratory of Cellular Oncology, 2010).

La línea celular eucariota 293TT consiste en células de riñón embrionario humano transformadas por Adenovirus que expresan altos niveles del antígeno-T largo del virus del simio vacuolado el cual promueve la generación de un alto número de copias virales de pseudogenomas al ser transfectadas (Buck *et al.*, 2005).

La línea celular 293TT se mantuvo a 37°C en un ambiente de CO₂ al 5% y 95% de O₂ y un adecuado nivel de humedad en medio de cultivo DMEM-10% de suero fetal bovino suplementado con 50mg/ml de higromicina B (Roche, Suiza) para mantener la expresión del antígeno T del SV40. Cuando estas células alcanzaron una confluencia del 95% se despegaron del frasco de cultivo por tratamiento con tripsina-EDTA al 0,05% tal como se reportó previamente (Buck *et al.*, 2005).

6.9 Transfección de la línea celular 293TT con los plásmidos recombinantes

Para realizar el proceso de transfección de las células 293TT con los plásmidos recombinantes cada plásmido se reprodujo en células competentes de la cepa *E. coli* DH5a las cuales se clonaron y ampliaron para generar suficientes reservorios.

La producción de células competentes de la cepa *E. coli* DH5a se llevó a cabo de la siguiente manera: Se tomó una colonia de *E. coli* DH5a y se dejó crecer en medio Luria broth (LB) sin antibióticos toda la noche a 37°C con agitación. Posteriormente se hizo una dilución 1:40 del cultivo en caldo de cultivo LB. Seguidamente esta dilución se cultivó en agitación a 37°C durante 1 hora y media, y la densidad óptica (OD) se leyó a 600 nm en un espectrómetro UV-Vis Spectronic Unicam UV1 (Unicam laboratories, Midland, ON, Canadá). El cultivo se detiene cuando la OD alcanza valores entre 0.3 y 0.4 unidades de absorbancia (UA). Posteriormente se centrifugó a 4500 rpm a 4°C por 10 minutos. El precipitado se resuspendió en una dilución 1:10 del volumen inicial en CaCl₂ 50 mM frío y luego se mantuvo durante 30 minutos en hielo. Seguidamente la suspensión anterior se centrifugó a 4500 rpm durante 10 minutos a 4°C y luego se resuspendió en una proporción 1:40 del volumen inicial en una solución de CaCl₂ 50 mM con glicerol al 15%. Finalmente se hicieron alícuotas de 300 µl a 400 µl en crioviales estériles y se mantuvieron a -80°C hasta su uso (Sambrook J, 1989).

Las células competentes se transfectaron con cada uno de los plásmidos recombinantes para L1 y L2 de cada tipo viral a estudiar y luego se cultivaron en medio LB de forma masiva para aislar el ADN plasmídico por medio de purificación por lisis alcalina. Esta purificación se llevó a cabo de la siguiente manera: las células competentes con el plásmido de interés se sometieron a crecimiento en un volumen de 3 ml de LB durante toda la noche a 37°C con agitación. Posteriormente la suspensión se centrifugó a 10000 rpm durante 30 segundos y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 100 µl de solución I (50mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 10mg/ml de lisozima y 10 µg/ml de RNAsa).

Posteriormente se adicionaron 200µl de solución II (0,2 N NaOH, 1%SDS) se mezcló suavemente observando que la solución se tornó viscosa. Esta se incubó posteriormente durante 5 minutos a temperatura ambiente, luego se adicionaron 150µl de solución III (3M acetato de potasio en frío) y se mezcló hasta que se evidenció la formación de un precipitado blanco para luego incubar por 10 minutos en hielo y centrifugar a 14000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfirió a un tubo que contenía 280µl de isopropanol y se incubó por 20 minutos a -20°C, luego se centrifugó a 14000 rpm por 30 minutos a 4°C. Posteriormente el sobrenadante se removió completamente y al precipitado se adicionó 1 ml de etanol al 70% en frío, nuevamente se

centrifugó por 10 minutos a 14000 rpm y el sobrenadante se removió completamente. El ADN obtenido se resuspendió en 50 μ l de Tris base 10 mM-EDTA 5 mM (TE) en una proporción 10:1 (Sambrook J, 1989).

A los plásmidos recombinantes amplificados se les determinó la concentración de ADN y para poder estimar la cantidad necesaria para realizar la transfección de las células 293TT con cada uno de los distintos plásmidos de L1 y L2 de los tipos virales VPH-16, VPH-18, VPH-6 y BPV, junto con el plásmido que codifica para el gen reportero de la fosfatasa alcalina. Para ello se colocaron 10 millones de células 293TT en 20 ml de medio DMEM sin antibióticos ni higromicina B en un frasco de cultivo durante 16 a 24 horas previas a la transfección. Luego se adicionaron 19 μ g de cada uno de los plásmidos recombinantes a las células en ensayos por separado dependiendo del tipo viral: BPV1 (pSheLL) (Figura 6-4A), VPH6 (p6sheLLr) (Figura 6-4B), VPH16 (p16sheLL) (Figura 6-4C), VPH18 (p18sheLL) (Figura 6-4D), cada plásmido codifica para las proteínas estructurales tardías L1 y L2 del VPH, además en todos los casos se debe acompañar la mezcla con el plásmido reportero para la fosfatasa alcalina (pYSEAP) (Figura 6-4E). Posteriormente a esta mezcla se adicionaron 85 μ l de lipofectamina-2000 (Invitrogen, California, USA) para dar lugar al proceso de transfección. El complejo Lípido/ADN se incubó sobre las células 293TT a 37°C por un periodo de 3 a 6 horas. Posteriormente los PsVs son liberados de las células por medio de lisis por adición de una dilución 1:20 de una solución de Triton-X100 al 10% y una dilución 1:40 de sulfato de amonio 1 M. Luego el lisado celular se incubó a 37°C durante toda la noche para permitir la maduración de los PsVs. Finalmente se solubilizó 0,17 veces en una solución de cloruro de sodio 5M y luego se centrifugó a 4000 rpm por 20 minutos para remover impurezas (Buck *et al.*, 2005).

Figura 6-4. Mapas plasmídicos L1 y L2 del VPH

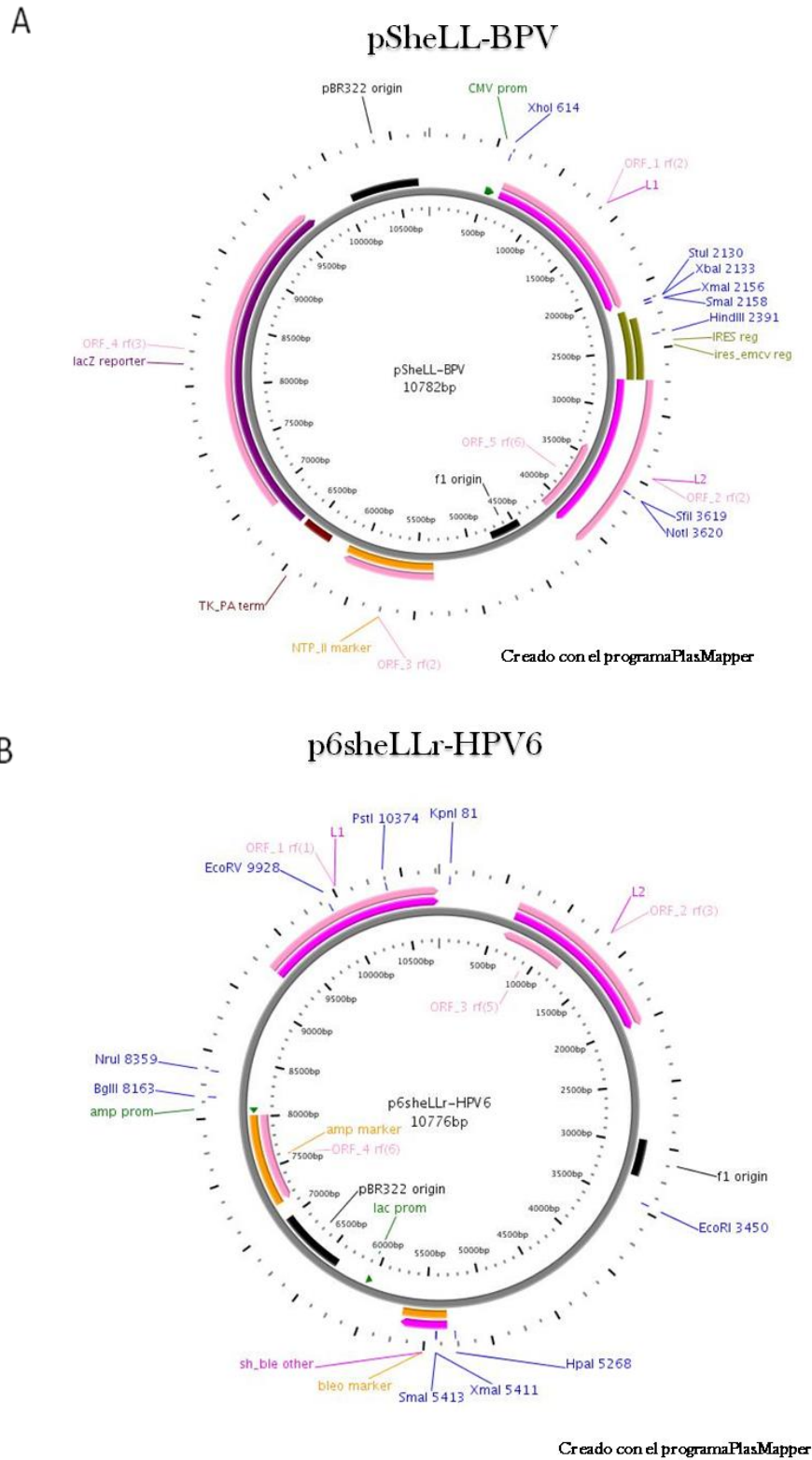


Figura 6-4 (Continuación)

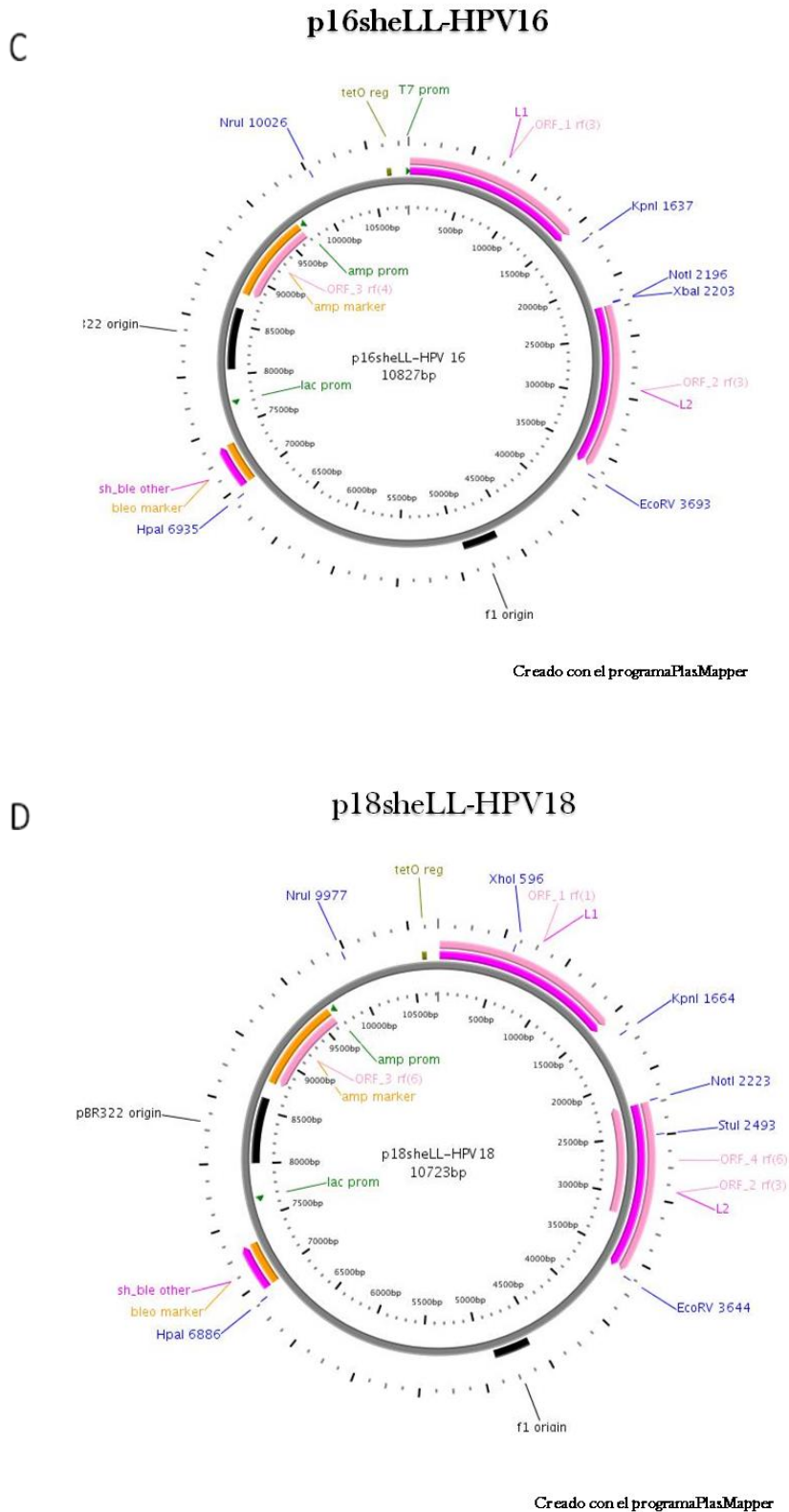
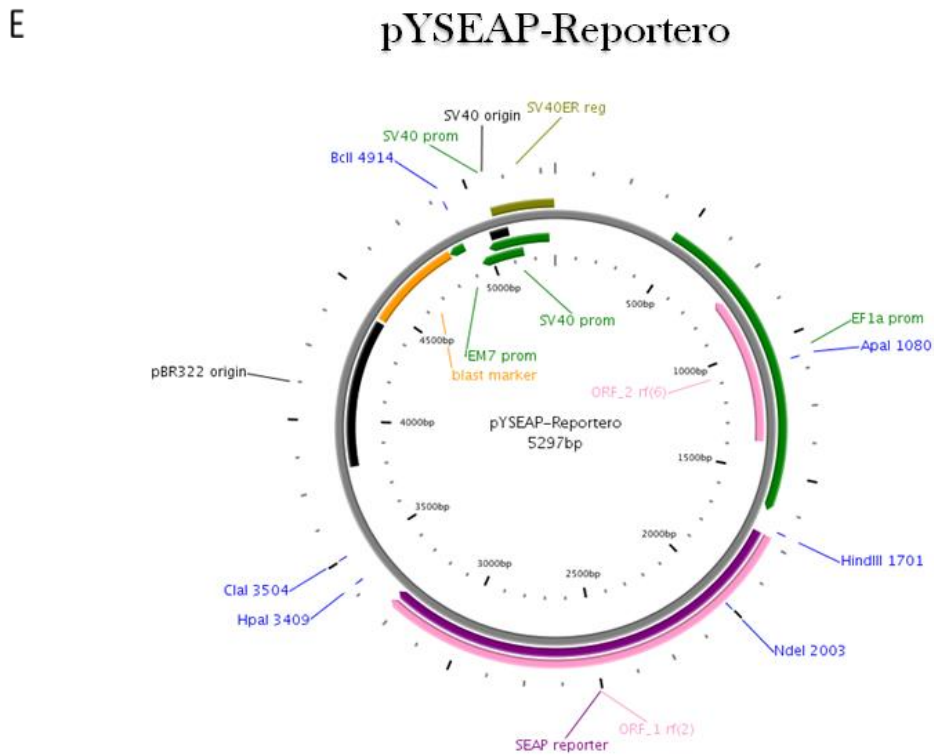


Figura 6-4 (Continuación)



Creado con el programa PlasMapper

6.10 Gradientes de Optiprep®

Los PsVs fueron purificados por medio de ultracentrifugación en gradientes de Optiprep® (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) o gradiente discontinuo no iónico de iodixanol. Luego se realizaron gradientes de Optiprep® (iodixanol al 60%) de la siguiente manera; a partir de la solución de iodixanol 60% se obtuvo una solución stock al 46%, y a partir de esta se produjeron soluciones de Optiprep® al 27%, 33% y 39%. Posteriormente en tubos para ultracentrifuga se dispensaron 1,4 ml de cada una de estas soluciones en este mismo orden y por último se añadió el lisado celular, luego se realizó una ultracentrifugación a 50000 rpm en una ultracentrifuga Beckman L8-80M (Global Medicinal Instrumentation

Inc, Ramsey, MN, USA), durante 3,5 horas a 16°C. Después de la centrifugación se observó en el gradiente una capa uniforme de color gris en la tercera porción del mismo, se sugiere que esta capa correspondió a la proteína L1 como ya se ha reportado previamente, por lo tanto se recolectaron distintas fracciones de este gradiente de la siguiente manera: Se extrajeron del tubo de abajo hacia arriba los primeros 750 µl como la primera fracción, luego 10 fracciones de 250 µl y los últimos 2 ml de la parte superior se descartaron (Laboratory of Cellular Oncology, 2010). Para evidenciar la presencia de las proteínas L1 (55kD) y L2 (72kD) en los PsVs las fracciones fueron sometidas a una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y las fracciones que mostraron contener la proteína fueron separadas y se realizaron alícuotas de las mismas. Finalmente la cuantificación de la concentración de las proteínas L1 y L2 de VPH en los PsVs se realizó por medio del método del ácido bicinonínico (BCA) (Pierce, Meridian Rd, Rockford, IL USA) y las fracciones escogidas se almacenaron a -80°C.

6.11 Evaluación de la actividad invasiva de los PsVs

Una muestra de 100 µl de una suspensión de células 293TT con una concentración de 100000 células /ml en medio de neutralización (DMEM sin rojo de fenol, 10%SFB, 1% aminoácidos no esenciales, 1% HEPES, 1% glutamax, 1% antibiótico antimicótico) se colocó en cajas de 24 pozos y se incubaron a 37°C en un ambiente de CO₂ al 5% y 95% de O₂. En otra caja de 24 pozos se dispensaron 250 µl por pozo, por triplicado, de cada uno de los tipos de PsVs en una concentración de 1,40 µg/ml. Posteriormente se añadieron a cada triplicado de PsVs, 80 µl de heparina (16,000 kDa) de mucosa intestinal porcina (Sigma-Aldrich St Louis, MO, USA) a una concentración de 1mg/ml (control positivo de neutralización), también se realizaron triplicados de cada uno de los tipos de PsVs sin la adición de heparina, luego se incubaron en hielo las mezclas durante una hora y se adicionaron a las células previamente plaqueadas, posteriormente se incubó la mezcla a 37°C durante 72 horas en un ambiente de CO₂ al 5% y 95% de O₂ como se ha descrito previamente (Buck *et al.*, 2005).

6.12 Detección colorimétrica de la fosfatasa alcalina secretada por PsVs post - invasión a las células 293TT

Los PsVs producidos durante este estudio encapsidan un plásmido que codifica para la fosfatasa alcalina (pYSEAP). Cuando los PsVs infectan las células 293TT el pYSEAP que porta un sitio de origen ori para SV40 es replicado a un alto número de copias, esto

conduce a altos niveles en la producción de fosfatasa alcalina que es secretada en el medio de cultivo, por lo tanto la neutralización mediada por anticuerpos de pacientes infectadas con VPH resulta en una disminución de la expresión de la fosfatasa alcalina (Buck *et al.*, 2005).

La actividad de la fosfatasa alcalina puede ser detectada por métodos colorimétricos, aunque el método quimioluminiscente da una señal más alta en relación con el ruido de fondo, el método colorimétrico es más económico, sencillo y puede utilizar un espectrofotómetro convencional para lectura de placas de ELISA Multiskan (Thermo Scientific, USA) además se puede mejorar la sensibilidad aumentando las concentraciones tanto de PsVs como de muestra de suero. (Buck *et al.*, 2005).

Para realizar la detección colorimétrica de la fosfatasa alcalina se agregaron 20µl de una dilución Triton-X100 al 10% y una dilución 1:40 de sulfato de amonio 1 M por pozo en una placa de 96 pozos, posteriormente se dispensaron 50 µl del sobrenadante a analizar y 200 µl del sustrato (una tableta de P- Nitrofenil fosfato diluida en una solución de dietanolamina 5M) a cada pozo y esta mezcla se incubó a 37°C durante 2 a 4 horas y la OD fue leída a 405 nm

6.13 Ensayo de Neutralización de PsVs por anticuerpos contenidos en muestras de suero

Una muestra de 100 µl de una suspensión de 100000 células/ml se dispuso a cada pozo en cajas de 24 pozos 2 a 4 horas previas al ensayo de neutralización, posteriormente se dispensaron 250 µl de cada uno de los PsVs y se mezclaron con 80 µl de los sueros de pacientes y 80 µl de controles según el caso, luego esta mezcla se incubó en hielo durante una hora y después se agregó esta mezcla a las células y se llevó a incubación a 37°C por 72 horas en un ambiente de CO₂ al 5% y 95% de O₂. En el sobrenadante obtenido a partir del ensayo ya descrito se analizó la presencia de fosfatasa alcalina por medio del método colorimétrico a través de una lectura espectrofotométrica. La positividad para neutralización en un suero se evidenció cuando éste reducía la absorbancia de la fosfatasa alcalina en un 50% en comparación a la actividad mostrada en los pozos que contenían PsVs pero no muestra de suero (Buck *et al.*, 2005).

6.14. Análisis estadísticos

El análisis estadístico para el presente estudio fue de tipo descriptivo, se utilizó el programa STATA 9.0® para el procesamiento de los datos. La incidencia, resolución y persistencia de las infecciones se expresaron en función de tasas, obtenidas a partir de la tabulación de los resultados de PCR junto con la información obtenida con base en los resultados clínicos y la información recopilada en la historia clínica del paciente en cada una de las visitas de seguimiento, esto también permitió la correlación de los resultados con algunos factores de riesgo y la presencia o no de anticuerpos neutralizantes, la curva de Kaplan Meier permitió representar de forma gráfica los distintos comportamientos de la infección por VPH en la población en estudio, teniendo en cuenta las entradas y salidas de las participantes del seguimiento, en tiempos distintos.

7. Resultados y discusión

7.1 Análisis estadísticos

En el estudio se reclutaron un total de 1433 mujeres durante los años 2007-2009, de las cuales 1245 contaban con exámenes completos, es decir, poseían un resultado muestra satisfactoria para PCR con un resultado bien sea negativo o positivo, resultado de citología, diligenciamiento y firma de la encuesta para la historia clínica y el consentimiento informado, para cada uno de los seguimientos en los cuales haya participado la paciente. El promedio de edad en las participantes del estudio fue de 42 años (22% 14-30, 58% 31-60), el intervalo y duración de las visitas osciló entre seis meses +/- 2, las mujeres permanecieron entre un año y tres años en el estudio. Estas pacientes se agruparon según las características de la línea base en el estudio, para los distintos análisis de incidencia, persistencia y resolución. De esta manera se obtuvo un grupo de 526 mujeres que iniciaron el estudio sin infección (PCR negativa) y sin lesión (citología negativa), y otro grupo de 619 mujeres que en la visita inicial presentaban infección (PCR positiva) con o sin lesión cervical.

Con el primer grupo de 526 se pudieron obtener resultados acerca de la incidencia de infección por VPH y de las lesiones, para esto se analizaron dos desenlaces: para infección y para lesión.

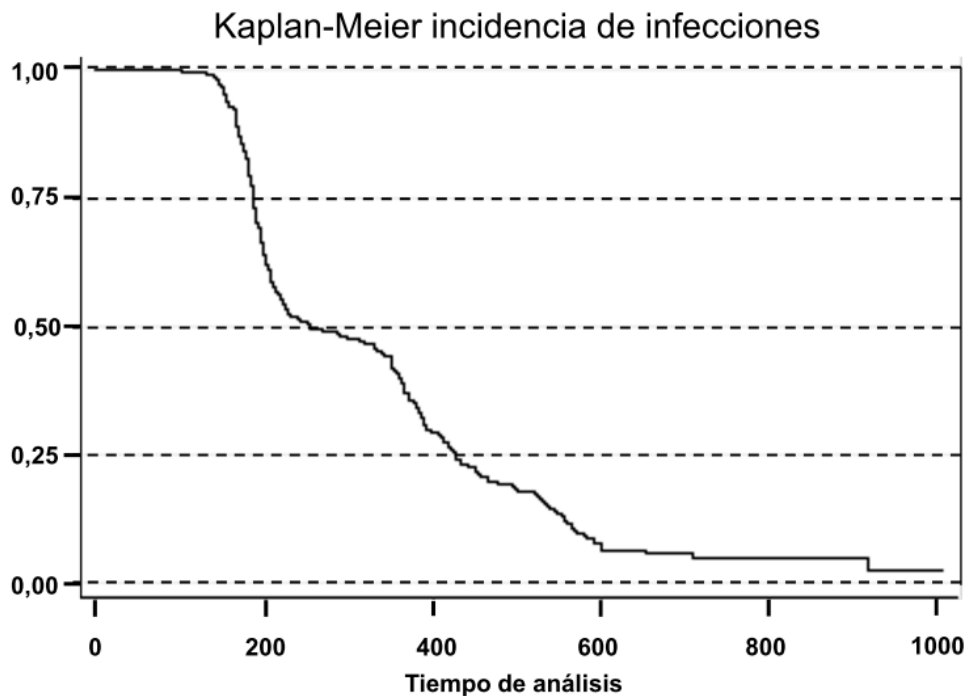
7.1.1 Desenlace Infección

Las 526 mujeres de este subgrupo aportaron para este estudio un momento en riesgo de 150.022 días, esto es el período durante el cual la participante está en riesgo de desarrollar infección, en este caso, durante el seguimiento.

Para este estudio la tasa de incidencia fue de 2,49 infecciones/1000 mujeres/día (IC 95%; 2,25-2,75). El 50% de la población se infectó a los 254 días (mediana de incidencia de la infección) con un total de 373 mujeres que presentaron infección en algún momento de la cohorte.

La curva de Kaplan-Meier obtenida para este grupo permite observar que aproximadamente a los 1000 días del seguimiento es baja la probabilidad de encontrar alguna mujer que no se haya infectado durante la cohorte (Figura 7-5).

Figura 7-5. Incidencia de las infecciones por VPH durante el estudio.



Al correlacionar los datos obtenidos con otros estudios de cohorte se observan diferencias ya que las condiciones y características de las poblaciones difieren. Safaeian en el 2010 (Safaeian *et al.*, 2010), reportó una tasa de 0,10 infecciones/1000 mujeres/día para VPH 16 en 291 mujeres; y una tasa de 0,05 infecciones/1000 mujeres/día en 178 mujeres para VPH 18 en una cohorte realizada en Costa Rica:

La curva de Kaplan-Meier obtenida para este grupo permite observar que aproximadamente a los 1000 días del seguimiento es baja la probabilidad de encontrar alguna mujer que no se haya infectado durante la cohorte (Figura 7-5).

La característica distintiva del análisis con el método de Kaplan-Meier es que la proporción acumulada que sobrevive se calcula para el tiempo de supervivencia individual de cada paciente y no se agrupan los tiempos de supervivencia en intervalos. Por esta razón es especialmente útil para estudios que utilizan un número pequeño de

pacientes. El método de Kaplan-Meier incorpora la idea del tiempo al que ocurren los eventos.

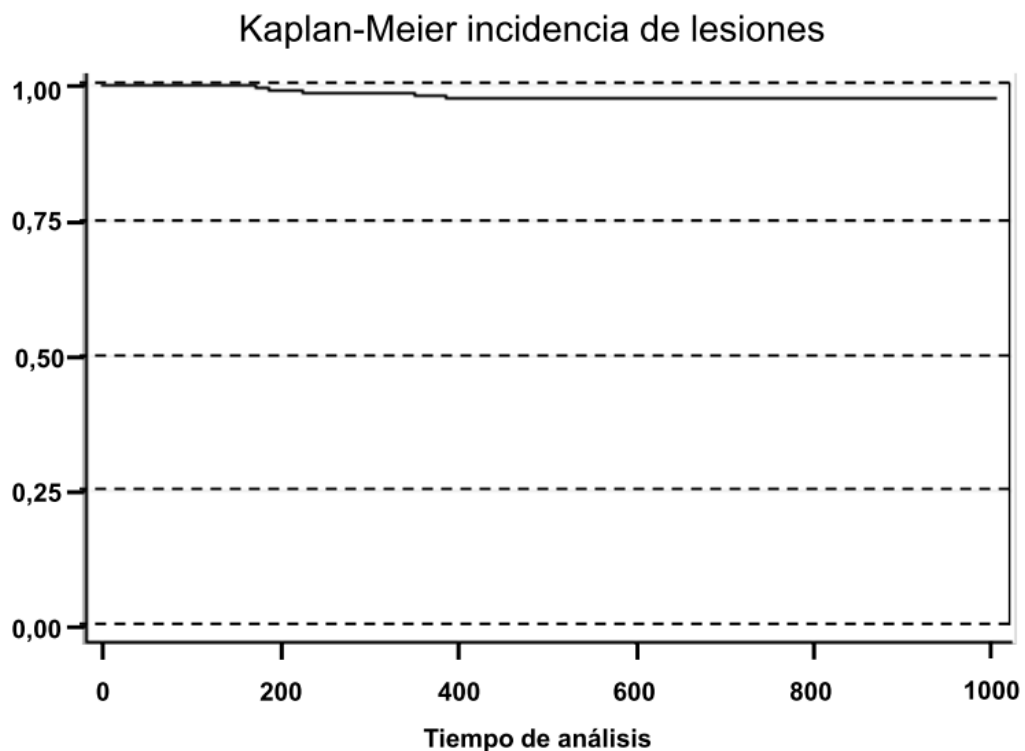
7.1.2 Desenlace Lesión

Para este desenlace las 526 mujeres de este subgrupo aportaron un momento en riesgo de 187.211 días, período de tiempo durante el cual cada participante está en riesgo de desarrollar lesión, para este caso, durante el seguimiento.

En este estudio la tasa de incidencia fue de 0,043 lesiones/1000 mujeres/día (IC 95%; 0,021-0,086). No fue posible determinar una mediana de incidencia de la lesión, sólo 8 mujeres desarrollaron lesión en este grupo durante el seguimiento.

La curva de Kaplan-Meier obtenida para este grupo permite observar que la mayoría de las participantes de este subgrupo mantienen la condición inicial, siendo muy baja la probabilidad de encontrar mujeres que desarrollen lesión durante el seguimiento (Figura 7-6).

Figura 7-6. Incidencia de las lesiones por VPH durante el estudio.



Los datos obtenidos son comparables con otros estudios de cohorte que determinan incidencia de lesiones, como el estudio de Louvanto en el 2010 (Louvanto *et al.*, 2010) quien reportó una tasa de 0,0273 lesiones/1000 mujeres/día en una cohorte de 329 mujeres en Finlandia, donde 14 desarrollaron lesión, esto se explica por el hecho de que las lesiones premalignas tardan en desarrollarse entre 5 a 10 años y en un estudio de cohorte de dos años es muy difícil medir la incidencia de las lesiones.

La curva de Kaplan-Meier obtenida para este grupo permite observar que la mayoría de las participantes de este subgrupo mantienen la condición inicial, siendo muy baja la probabilidad de encontrar mujeres que desarrollen lesión durante el seguimiento.

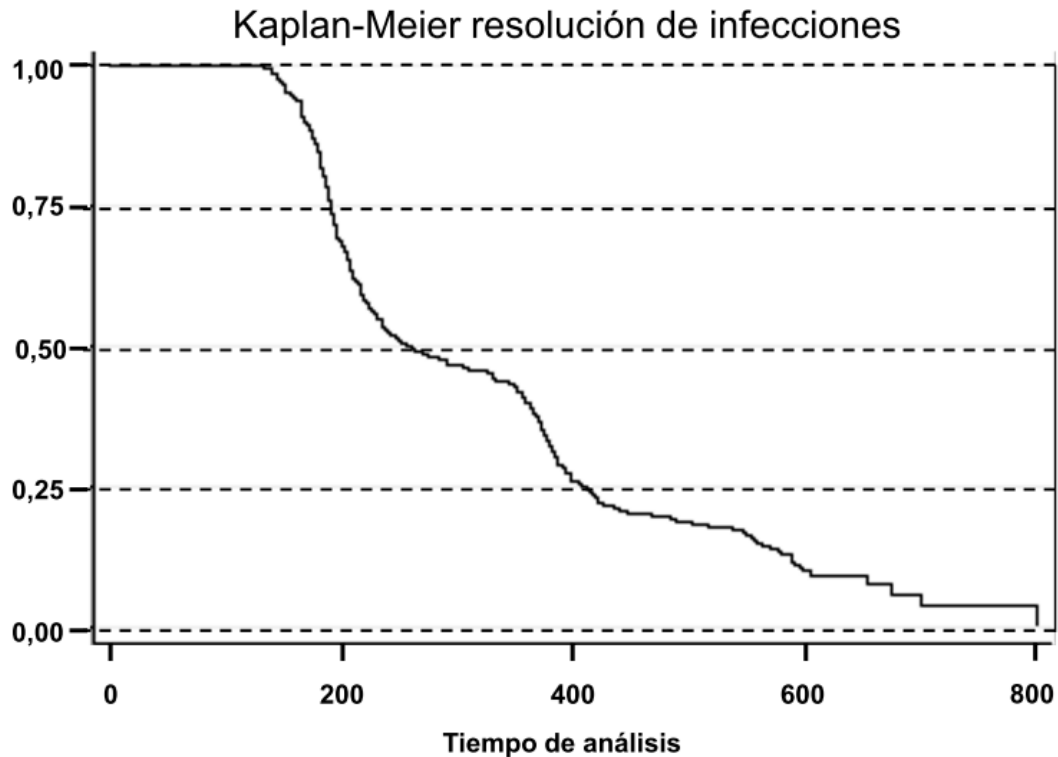
Con el segundo grupo de 619 participantes se pudieron obtener resultados acerca de la resolución y persistencia de la infección, como se observa a continuación.

7.1.3 Desenlace resolución de las infecciones

En este desenlace se incluyeron 619 mujeres pertenecientes a este subgrupo las cuales aportaron un momento en riesgo de 180.930 días, período de tiempo durante el cual cada participante está en riesgo de resolver la infección, para este caso, durante el seguimiento.

En este estudio la tasa fue de 2,47 infecciones resueltas/1000 mujeres/día (IC 95%; 2,25-2,71). El 50% de la población hizo resolución de la infección a los 260 días (mediana de resolución de la infección). Durante el seguimiento en este grupo 447 mujeres resolvieron la infección y por lo tanto 172 (27,8%) hicieron una infección persistente.

La curva de Kaplan-Meier obtenida para este grupo permite observar que aproximadamente a los 800 días del seguimiento es baja la probabilidad de encontrar alguna mujer que no haya hecho resolución de la infección (Figura 7-7).

Figura 7-7. Resolución de las infecciones por VPH durante el estudio.

7.1.4 Desenlace regresión de las lesiones

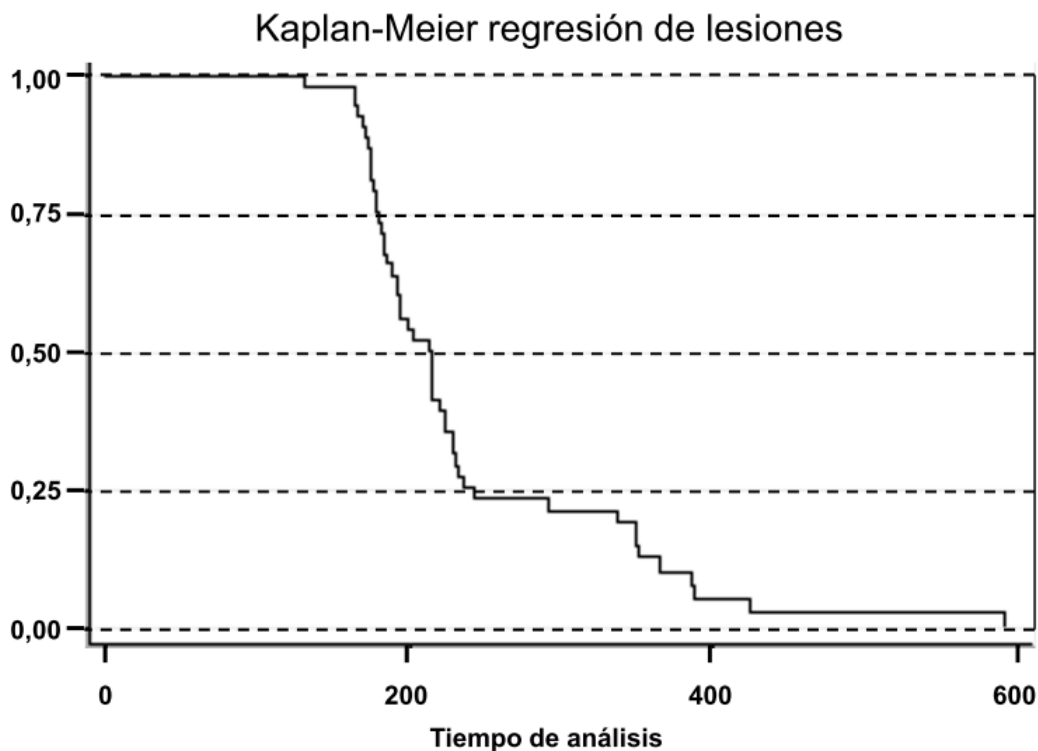
Dentro de este grupo de mujeres con infección al inicio del seguimiento se encontró un subgrupo de mujeres que además de presentar infección por VPH también presentaron lesiones cervicales en sus citologías y aunque fue un grupo pequeño se analizó en ellas la regresión de las lesiones durante el seguimiento.

Este subgrupo correspondió a mujeres 55 mujeres que contribuyeron con un momento en riesgo de 12.748 días, período de tiempo durante el cual cada participante está en riesgo de presentar regresión de la lesión, para este caso, durante el seguimiento.

Para este grupo de mujeres la tasa de regresión para las lesiones fue de 3,92 regresiones/1000 mujeres/día (IC 95%; 2,97- 5,17). El 50% de la población hizo regresión a los 214 días (mediana de regresión de la lesión). 50 mujeres hicieron regresión de las lesiones durante el estudio sólo 5 (10%) tuvieron lesiones cervicales persistentes.

La curva de Kaplan-Meier obtenida para este grupo permite observar que aproximadamente a los 600 días del seguimiento es muy bajo el porcentaje de mujeres con lesión (Figura 7-8).

Figura 7-8. Regresión de las lesiones por VPH durante el estudio.



Este tipo de análisis estadístico que se da en función de tasas para las diferentes variables permite ser aplicado en un estudio donde hay un intervalo considerable entre visita y visita por parte de cada una de las participantes del estudio, eso sumado a las variaciones de la duración en función del tiempo de las mujeres sometidas al seguimiento.

Cabe resaltar que los resultados obtenidos darán la pauta para la realización de otros estudios de cohorte con intervalos más estrictos, mayor duración del estudio y que además abarquen la totalidad del territorio colombiano contribuyendo de esta manera a un conocimiento más aproximado sobre la incidencia y resolución de la enfermedad, pues aunque hasta ahora existen estudios de seguimiento similares a éste, ninguno abarca otras zonas de país aparte de la capital (Bogotá), lo cual es muy importante

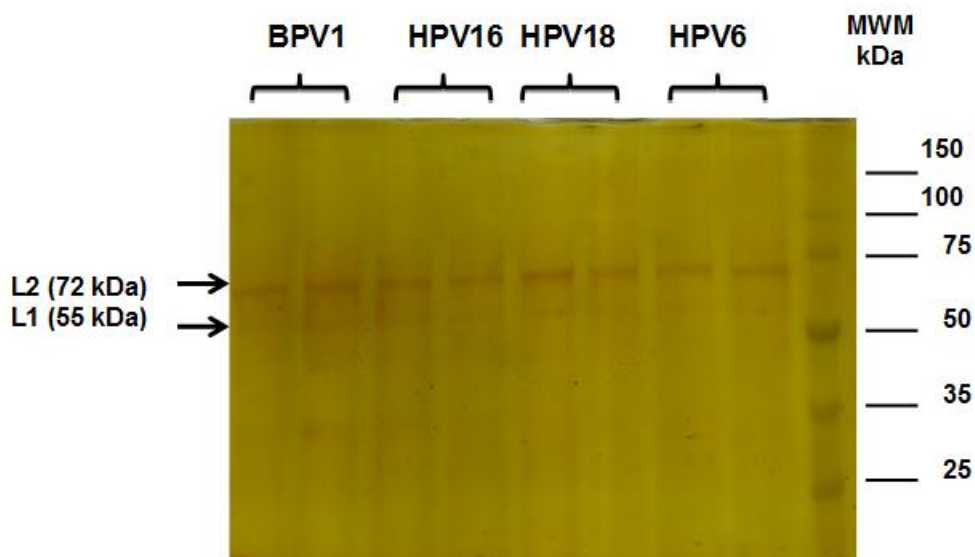
debido a la diferencias socioeconómicas, culturales y climáticas que afectan el comportamiento del virus del papiloma humano en las diferentes poblaciones femeninas y de igual manera su aporte para el desarrollo del cáncer de útero.

7.2 Cultivo de células 239TT y transfección de éstas con los plásmidos recombinantes

Con la ampliación del stock plasmídico se lograron obtener cantidades considerables para cada uno de los tipos virales y para el reportero: 161µl de pSheLL con una concentración de 4,187µg/ml, 140µl de p6sheLLr (4,469µg/ml), 500µl de p16sheLL (3,084 µg/ml), 110µl de p18sheLL (2,331 µg/ml) y 300µl de pYSEAP (2,603µg7ml). De igual manera el mantenimiento y la ampliación del cultivo de 293TT proporcionó células suficientes tanto para la transfección como para la realización de los ensayos de neutralización, así como también para la producción de un stock de células.

Después de purificar los PsVs por medio de gradientes de Optiprep (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) y se realizaron SDS-PAGE con el fin de detectar la presencia de las proteínas L1 y L2 de VPH para cada uno de los constructos ó PsVs (Figura 7-9) en donde se pueden evidenciar las proteínas L1 y L2 para cada uno de los tipos virales de VPH ubicadas en las bandas de los geles correspondientes a los 55kDa y 72 kDa respectivamente.

Figura 7-9. Caracterización electroforética SDS-PAGE de los productos de expresión de L1 y L2



Antes de realizar la detección protéica por medio del método del ácido bicinonínico (BCA) (Pierce, Meridian Rd, Rockford, IL USA) para los PsVs purificados, estos fueron sometidos a tres ultrafiltraciones por membranas de centricon (10.000 NMWL) (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) cada una de 20 min a 4000 rpm para obtener una muestra más concentrada.

Se realizaron diversas determinaciones por medio del método del ácido bicinonínico ó micro BCA (Pierce, Meridian Rd, Rockford, IL USA) debido a que se produjeron PsVs con diferentes agentes para la transfección, para la estandarización de la lectura de la actividad neutralizante presentada por los anticuerpos por medio del método colorimétrico, en las cuales las concentraciones para cada uno de los PsVs fueron las siguientes:

VPH16 8,62 µg/ml; VPH 18 10,40 µg/ml; VPH 6 7,95 µg/ml; VPH BPV 7,95 µg/ml este ensayo se realizó transfectando con lipofectamina 2000 (Invitrogen, California, USA).

Segunda producción de PsVs; esta vez también se utilizó lipofectamina 2000 (Invitrogen, California, USA) durante la transfección obteniéndose las siguientes concentraciones de PsVs: VPH 16 6,42 µg/ml, VPH 18 11,51 µg/ml.

Tercera producción de PsVs, para esta última producción se utilizó el reactivo para transfección HiFect® (Lonza, Cologne, Germany): VPH 16 10,53 µg/ml; VPH18 13,11 µg/ml.

A pesar de que las concentraciones obtenidas en cada una de las producciones de PsVs fueron buenas se pudo observar, que las concentraciones se mantienen transfectando con lipofectamina 2000, mientras que el rendimiento utilizando HiFect® (Lonza, Cologne, Germany) es mejor.

7.3 Evaluación de la actividad invasiva de los PsVs

Después de varios ensayos para determinar la concentración de PsVs a utilizar en ensayos de neutralización, teniendo en cuenta que el método colorimétrico es menos sensible y más sencillo que el quimio-luminiscente y que requiere una mayor concentración de antígeno y anticuerpo para evidenciar la actividad de los PsVs, se concluyó que la concentración ideal del PsVs para poder observar una respuesta neutralizante en el ensayo fue de aproximadamente 1,40 µg/ml obtenida a partir de ensayos similares con VLPs.

Los ensayos para evaluar la actividad de los PsVs para los tipos VPH16 y VPH18 frente a un control neutralizante conocido, arrojaron los siguientes resultados dados en unidades de absorbancia (UA) y expresados como OD (Tabla 7-2).

Tabla 7-2 Actividad de los PsVs producidos frente a un control neutralizante

PsVs 16		PsVs 18	
0,581	Sin Heparina pseudovirion tipo 16 solo	0,586	Sin Heparina pseudovirion tipo 18 solo
0,244 (58%)	Con Heparina (control de neutralización)	0,000 (100%)	Con Heparina (control de neutralización)
0,000	Control con células 293TT solas	0,000	Control con células 293TT solas

La concentración de 1,40 µg/ml para los PsVs fue la mínima concentración en la que se puede observar el comportamiento reflejado en la tabla anterior, en donde el control de heparina (control neutralizante conocido) para ambos tipos de PsVs, disminuye la absorbancia mostrada por el PsVs en un 50% o más (Buck *et al.*, 2005).

7.4 Ensayo de Neutralización de PsVs por anticuerpos contenidos en muestras de suero

Para el ensayo de neutralización se pusieron en contacto los PsVs tanto con el control de heparina como con 7 muestras de sueros de distintas mujeres y una muestra de suero de una niña para evidenciar la presencia de anticuerpos neutralizantes en las distintas muestras por medio de la reducción de la fosfatasa alcalina, reflejada en la disminución del valor de la absorbancia en un 50% con respecto a la absorbancia mostrada por el PsVs en ausencia de algún agente neutralizante.

En el primer ensayo la paciente 1 presenta anticuerpos neutralizantes para el PsVs tipo 18 pero no para el tipo VPH16 (nótese el porcentaje de reducción de la absorbancia para cada caso con respecto a la presentada por el PsVs de cada tipo denotado en rojo en la tabla 7-3), durante el seguimiento esta mujer nunca presentó infección por VPH 18, esto sugiere que pudo haber tenido un contacto previo al inicio de la cohorte y por lo tanto la generación de anticuerpos neutralizantes impidió detectar la infección por VPH 18.

La paciente 2 presentó infección por VPH 16 en su primera visita, pero la resolvió en las siguientes visitas, esto puede deberse a la generación de anticuerpos neutralizantes dirigidos contra el tipo 16, lo cual se evidencia en la Tabla 7-3.

Tabla 7-3 Primer ensayo de neutralización con anticuerpos de sueros de pacientes humanos.

Primer ensayo con pacientes (2)			
0,349	Pseudovirion 16	0,970	Pseudovirion 18
0,000 (100%)	Con heparina	0,242 (75%)	Con heparina
0,280 (20%)	Paciente 1	0,435 (55%)	Paciente 1
0,000 (100%)	Paciente 2	0,565 (41%)	Paciente 2
0,000	Control células	0,000	Control células

En el segundo ensayo todas las pacientes inician el estudio y continúan durante varias visitas infectadas por el VPH 16 (nótese el porcentaje de reducción de la absorbancia para cada caso con respecto a la presentada por el PsVs de cada tipo denotado en rojo en la tabla 7-4) y por lo tanto se evidencia en esta tabla la producción de anticuerpos neutralizantes para este tipo, mientras que para el tipo viral VPH18 ninguna presenta infección con excepción de la paciente 4 que presenta infección con este tipo viral en su tercera visita, sin embargo se puede evidenciar en los resultados de este ensayo (Tabla 7-4) la presencia de anticuerpos neutralizantes tipo 18 para las pacientes 2, 3 y 4 probablemente generados en infecciones originadas antes de empezar el estudio lo que da una idea de la acción neutralizante de estos anticuerpos en el tiempo y de la transitoriedad de la infección en el caso de la paciente 4. La niña participante en el estudio no presentó anticuerpos neutralizantes como era de esperarse, su suero podría ser utilizado como control negativo en este tipo de ensayos.

Tabla 7-4. Segundo ensayo de neutralización con anticuerpos de sueros de pacientes humanos.

Segundo ensayo con pacientes (6)			
0,493	Pseudovirion 16	0,495	Pseudovirion 18
0,000 (100%)	Con heparina	0,007 (99%)	Con heparina
0,154 (69%)	Paciente 1	0,431 (13%)	Paciente 1
0,000 (100%)	Paciente 2	0,075 (85%)	Paciente 2
0,167 (66%)	Paciente 3	0,144 (71%)	Paciente 3
0,241 (51%)	Paciente 4	0,216 (56%)	Paciente 4
0,098 (80%)	Paciente 5	0,379 (23%)	Paciente 5
0,473 (4%)	Niña	0,401 (19%)	Niña
0,000	Control células	0,000	Control células

Aunque estos ensayos fueron realizados en pocas pacientes en algunas de ellas la existencia de anticuerpos se relaciona con prevención de reinfecciones o persistencia, sin embargo en otras no, lo que demuestra que el nivel de anticuerpos producidos no es suficientemente protector para contrarrestar la infección.

Cabe resaltar que el tamaño de la muestra fue escogida al azar y es bastante pequeña debido a varios inconvenientes a lo largo del desarrollo de este estudio.

7. Conclusiones

1. La metodología descrita permitió la generación de PsVs aptos para ser utilizados en ensayos *in vitro* en donde se pueda evidenciar la presencia de anticuerpos neutralizantes en sueros de pacientes después de una infección natural
2. La estandarización de la técnica permitió desarrollar un ensayo de neutralización colorimétrico de alta eficiencia
3. La tasa de incidencia de infecciones durante el estudio de cohorte fue de 2,49 infecciones /1000 mujeres/día.
4. La incidencia de lesiones durante el estudio fue muy baja, solo 8 mujeres presentaron lesión en algún momento de la cohorte
5. La presencia de anticuerpos neutralizantes en el suero de algunas pacientes se pudo correlacionar con el historial de infecciones por VPH teniendo en cuenta la transitoriedad e intermitencia del virus en el tiempo.
6. Los resultados reportados tienen semejanzas y diferencias con otros estudios realizados en otros países lo cual se puede explicar por las diferencias de culturas y costumbres enmarcadas en zonas geográficas del mundo totalmente distintas.
7. La realización de ensayos que permitan la detección de anticuerpos neutralizantes contra el VPH, en conjunto con pruebas moleculares, exámenes diagnósticos y estudios longitudinales puede ayudar a la comprensión de la dinámica del virus, pues su transitoriedad y la intermitencia hacen inefectiva su detección en una sola medición.
8. Este trabajo permitió reportar una técnica para revelar la presencia de anticuerpos neutralizantes basada en PsVs revelada por un método colorimétrico lo cual disminuyó notablemente los costos e hizo la prueba más asequible que aquellas reveladas por quimioluminiscencia.

9. Recomendaciones


Para poder continuar con el estudio sobre la importancia de la detección de los anticuerpos neutralizantes dirigidos hacia el VPH presentes en el suero de mujeres infectadas con el virus, es importante profundizar en cuanto a la estandarización del ensayo de neutralización para ser leído por medio del método colorimétrico en un número mayor de mujeres, en un estudio longitudinal de ser posible mayor a cuatro años para poder correlacionar la presencia o ausencia de éstos anticuerpos con el desarrollo del cáncer y de esta manera poder implementar esta técnica como apoyo junto con otras pruebas de tamización y moleculares en pro del tratamiento de la enfermedad.

Realizar estudios de cohorte a nivel nacional podría aclarar el comportamiento del virus en las diferentes zonas geográficas del país, incluso en aquellas poblaciones aisladas como las tribus indígenas, teniendo en cuenta que lo ideal sería comenzar el estudio con mujeres vírgenes para poder establecer de una forma más exacta el desarrollo de la infección y su relación con variables sociodemográficas permitiendo determinar la incidencia y regresión de la enfermedad a partir de datos obtenidos en intervalos de tiempo precisos, de esta manera la red de salud nacional podría enfocar brigadas de prevención teniendo como base datos estadísticos concretos que evalúen posibles momentos de transitoriedad y seroconversión desde el momento del contagio con VPH y que este seguimiento conlleve a una pronta acción terapéutica o mejor aún a la prevención del desarrollo del cáncer.

Artículos realizados y sometidos a publicación a partir de este estudio

1. **Vega EG**, Sánchez R, Lozano JM (2013). Análisis epidemiológico sobre la incidencia y resolución de la infecciones por el Virus del Papiloma Humano en mujeres sometidas a un estudio de seguimiento retrospectivo. Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.,42(2), 284-297.
2. **Vega EG**, Patarroyo ME, Lozano JM (En preparación 2014). Generating L1 and L2 protein pseudovirions from high risk human papilloma virus types 16 and 18 for detecting the neutralising activity of patients' antibodies


A.Anexo: Cuestionario a pacientes

 <p style="text-align: center;">PROYECTO ·Cáncer de útero en mujeres: Detección y seguimiento de anomalías citológicas, infección por VPH, Anticuerpos anti-VPH en 25.000 mujeres de diferentes regiones de Colombia y caracterización inmunológica de péptidos candidatos a vacuna contra VPH. FUNDACIÓN INSTITUTO DE INMUNOLOGIA DE COLOMBIA</p>		
1. Fecha	2. Ciudad:	3. Participante N°:
4. Nombres y Apellidos:		5. Cédula:
6. Dirección de residencia habitual		7. Teléfono Fijo:
8. Teléfono Celular:		
9. Ha pensado cambiar de residencia en los próximos dos años: <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No		
10. Esta dispuesta a continuar un seguimiento clínico cada seis meses durante dos años: <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No		
11. Fecha de Nacimiento:D/M/A		12. Edad:
13. Con cuántas personas de su familia vive:		
14. Cuanto promedian sus ingresos mensuales:		15. Nivel de escolaridad:
<input type="checkbox"/> Analfabeta <input type="checkbox"/> Primaria <input type="checkbox"/> Secundaria <input type="checkbox"/> Técnica <input type="checkbox"/> Universitaria		
16. Raza: <input type="checkbox"/> Indígena <input type="checkbox"/> Negra <input type="checkbox"/> Blanca <input type="checkbox"/> Mestiza <input type="checkbox"/> Otra: Cual : _____		
17. Estado civil: <input type="checkbox"/> Soltera <input type="checkbox"/> Unión libre <input type="checkbox"/> Casada <input type="checkbox"/> Separada <input type="checkbox"/> Viuda		
18. Ha fumado alguna vez:	<input type="checkbox"/> Si	19. Actualmente Fuma: <input type="checkbox"/> Si
	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No
20. Hace cuanto tiempo fuma?		21. Cuantos cigarrillos fuma al día:
<input type="checkbox"/> Menos 1 año <input type="checkbox"/> Mas de 3 años <input type="checkbox"/> 1 a 3 años		<input type="checkbox"/> 1 - 5 <input type="checkbox"/> 10 - 20 <input type="checkbox"/> 5 - 10 <input type="checkbox"/> Mas de 20
22. Cuando fumó, por cuanto tiempo lo hizo:		<input type="checkbox"/> Mas de 3 años
23. Ha tenido relaciones sexuales:		25. Vida sexual activa:
<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No		<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No
24. Edad primera relación sexual:		
26. N° de compañeros sexuales: <input type="checkbox"/> Ninguno <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> Mas de 3		
27. Cual es su método más frecuente de planificación, usado en los últimos 5 años:		
<input type="checkbox"/> 1. Sin Método <input type="checkbox"/> 3. Ant orales <input type="checkbox"/> 5. Condón <input type="checkbox"/> 7. Norplant o Jadell <input type="checkbox"/> 2. D.I.U <input type="checkbox"/> 4. Inyectables <input type="checkbox"/> 6. Cirugía <input type="checkbox"/> 8. Otro Cual: _____		
28. Gestaciones: _____ Partos: _____ Vivos: _____ Abortos: _____ <input type="checkbox"/> Embarazo <input type="checkbox"/> Menopausia		
29. Alguna vez ha tenido infección de transmisión sexual por:		
<input type="checkbox"/> 1. Vaginosis <input type="checkbox"/> 2. Chlamydia <input type="checkbox"/> 3. VPH Cervical <input type="checkbox"/> 4. Trichomona <input type="checkbox"/> 5. Gonorrea <input type="checkbox"/> 6. HIV <input type="checkbox"/> 7. Sífilis <input type="checkbox"/> 8. Ninguna <input type="checkbox"/> 9. Otra Cual: _____		
30. Citologías previas: <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No Primera vez		31. Fecha última citología. D/M/A Resultado: <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Anormal
32. Alguna vez le practicaron:		
<input type="checkbox"/> Conización del Cuello Uterino <input type="checkbox"/> Radioterapia <input type="checkbox"/> Crioterapia <input type="checkbox"/> Cauterización del Cuello Uterino <input type="checkbox"/> Histerectomía <input type="checkbox"/> Biopsia <input type="checkbox"/> Ninguna		
33. Citología compatible con:		
<input type="checkbox"/> 0. ASC-US <input type="checkbox"/> 4. Lesión intraepitelial escamosa de Alto grado (LEI AG) <input type="checkbox"/> 1. ASC-H <input type="checkbox"/> 5. Cáncer: _____ <input type="checkbox"/> 2. AGC (Atipias de células glandulares) <input type="checkbox"/> 6. Negativo para lesiones intraepiteliales o malignidad <input type="checkbox"/> 3. Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LEI BG) <input type="checkbox"/> 7. Muestra Insatisfactoria		
34. Colposcopia: <input type="checkbox"/> Satisfactoria <input type="checkbox"/> Insatisfactoria		
<input type="checkbox"/> 0. Negativo para lesiones intraepiteliales o malignidad <input type="checkbox"/> 3. Lesión intraepitelial escamosa de Alto grado (LEI AG) <input type="checkbox"/> 1. Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LEI BG) <input type="checkbox"/> 4. Cáncer: _____		
35. Biopsia: <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No		
<input type="checkbox"/> 0. Negativo para lesiones intraepiteliales o malignidad <input type="checkbox"/> 2. Lesión intraepitelial escamosa de Alto grado (LEI AG) <input type="checkbox"/> 1. Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LEI BG) <input type="checkbox"/> 3. Cáncer: _____		
Observaciones:		
Firma del Responsable: _____		

B Anexo. Consentimiento informado.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Participante N°

 FIDIC	PROYECTO "Cáncer de útero en mujeres: Detección y seguimiento de anomalías citológicas, infección por VPH, Anticuerpos anti-VPH en 25.000 mujeres de diferentes regiones de Colombia y caracterización inmunológica de péptidos candidatos a vacuna contra VPH.
	FUNDACIÓN INSTITUTO DE INMUNOLOGIA DE COLOMBIA

Solo ingresará al estudio previo a la firma de este consentimiento informado. Se le recuerda que su participación es totalmente voluntaria.

El virus de papiloma humano o VPH causa el **cáncer de útero**.

Es el segundo cáncer más frecuente en las mujeres del mundo y el primero en países en vías de desarrollo como el nuestro.

Su participación en este estudio es una generosa contribución al desarrollo de la ciencia y a la mejoría de la salud de nuestros semejantes, así como su propio beneficio.

Procedimientos a seguir

Si usted está de acuerdo en participar en este estudio, previa evaluación médica, se le solicitará la donación de una (1) muestra de sangre de 5 cc y una (1) muestra citológica cérvico-uterina para análisis de ADN viral que se tomara en el momento de realizar la colposcopia.

Período de participación

Tiempo necesario para la toma de la muestra de sangre (Aproximadamente 5 minutos).

Riesgos

Este estudio se considera de bajo riesgo. El volumen de sangre por individuo es mínimo (5cc). Se puede tener algo de dolor o enrojecimiento en el área de la veno-punción y en raras ocasiones se presenta sensación de mareo de la que se recupera espontáneamente. La toma de la muestra cervical no presenta molestias adicionales a la colposcopia.

Beneficios

Usted recibirá a través de su servicio de salud, el resultado de laboratorio de la seropositividad o no para el **Virus del Papiloma Humano**. Esto ayudará a su médico tratante para la toma de decisión en su caso particular. Además significa un nuevo conocimiento acerca de los mecanismos de defensa del ser humano contra la infección por **Virus del Papiloma Humano** y hace parte del proceso de evaluación de la prueba que podría, en el futuro, ser la base para el desarrollo de métodos de diagnóstico más precisos y posibles vacunas.

Confidencialidad

Su nombre no será usado en ningún informe de este estudio.

Hallazgos nuevos de importancia para su salud

Cualquier información adicional e importante encontrada durante el periodo de duración del estudio, que pudiese resultar importante para su salud, le será comunicada inmediatamente.

IMPORTANTE: Si existe alguna parte de este documento que no entienda, por favor pregunte a uno de los investigadores antes de firmar.

Por medio de la presente constancia, en pleno y normal uso de mis facultades mentales, otorgo en forma libre mi consentimiento a la FUNDACIÓN INSTITUTO DE INMUNOLOGIA DE COLOMBIA para que me sea practicada la prueba de tamización para la detección de anticuerpos contra el virus del papiloma humano (VPH), mediante la técnica ELISA.

Declaro que se me ha suministrado información sobre la prueba y aspectos concernientes a la infección por el VPH, dentro del desarrollo de un trabajo de investigación que busca detectar este virus en la muestra de mi sangre que se toma cuando la citología vaginal presenta resultados anormales para recibir posteriormente las indicaciones que se requieran en el manejo de esta infección.

La información acerca del resultado de esta prueba se maneja con confidencialidad por parte del equipo de salud que participa de la investigación.

Soy consciente que la sangre que donaré y la colaboración que prestaré, será utilizada con fines de investigación solamente y que nadie obtendrá ningún tipo de lucro con ellas. Soy también consciente que mi participación en este estudio no representa ningún peligro para mi salud y que el procedimiento para la toma de la muestra es seguro, además tengo la certeza de que me puedo retirar del proyecto en el momento que lo decida aunque no se haya terminado el estudio.

Nombre: _____

Identificación _____

Dirección: _____

Lugar y fecha: _____

Testigo

1

Firma e identificación del testigo: _____

Parentesco con Relación con el sujeto de investigación _____

Testigo

2

Firma e identificación del testigo: _____

Parentesco con Relación con el sujeto de investigación _____

BOGOTA, _____

Bibliografía

- Allard, J. E., Rodriguez, M., Rocca, M. & Parker, M. F. (2005).** Biopsy Site Selection During Colposcopy and Distribution of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Journal of Lower Genital Tract Disease* **9**, 36-39.
- Ardeleanu, C., Gugliotta, P., Butur, G., Ceausu, M. & Halalau, F. (2001).** Detection of human papillomaviruses in lesions of the uterine cervix. *J Cell Mol Med* **5**, 96-97.
- Barzon, L., Squarzon, L., Masiero, S., Pacenti, M., Marcati, G., Mantelli, B., Gabrielli, L., Pascucci, M. G., Lazzarotto, T., Caputo, A. & Palù, G. (2014).** Neutralizing and cross-neutralizing antibody titres induced by bivalent and quadrivalent human papillomavirus vaccines in the target population of organized vaccination programmes. *Vaccine* **32**, 5357-5362.
- Bollmann, R., Mehes, G., Torka, R., Speich, N., Schmitt, C. & Bollmann, M. (2003).** Determination of features indicating progression in atypical squamous cells with undetermined significance: human papillomavirus typing and DNA ploidy analysis from liquid-based cytologic samples. *Cancer* **99**, 113-117.
- Bosch, F., Lorincz, A., Muñoz, N., Meijer, C. & Shah, K. (2002).** The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* **55**, 244-265.
- Breitbart, F., Kirnbauer, R., Hubbert, N., Nonnenmacher, B., Trin-Dinh-Desmarquet, C., Orth, G., Schiller, J. & Lowy, D. (1995).** Immunization with viruslike particles from cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) can protect against experimental CRPV infection. *J Virol* **69**, 3959-3963.
- Buck, C., Pastrana, D., Lowy, D. & Schiller, J. (2005).** Generation of HPV pseudovirions using transfection and their use in neutralization assays. *Methods Mol Med* **119**, 445-462.
- Carter, J. J., Koutsky, L. A., Hughes, J. P., Lee, S. K., Kuypers, J., Kiviat, N. & Galloway, D. A. (2000).** Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. *J Infect Dis* **181**, 1911-1919.
- Castellsagué, X., Bosch, F. & Muñoz, N. (2002).** Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res* **89**, 191-199.
- Cervantes, J., Lema, C., Hurtado, L., Andrade, R., Quiroga, G., Garcia, G., Torricos, L., Zegarra, L., Vera, V., Panoso, W., Arteaga, R., Segurondo, D., Romero, F., Dulon, A., Asturizaga, D., Hurtado Gomez, L. & Sonoda, S. (2003).** Prevalence of human papillomavirus infection in rural villages of the Bolivian Amazon. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* **45**, 131-135.
- Combata, A., Bravo, M., Touzé, A., Orozco, O. & Coursaget, P. (2002).** 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* **97**, 796-803.

- Cortes-Gutierrez, E. I., Cerda-Flores, R. M., Leal-Klevezas, D. S., Hernandez-Garza, F. & Leal-Garza, C. H. (2003).** Validating polymerase chain reaction for detecting HPV in cervical intraepithelial neoplasia. *Analytical and quantitative cytology and histology / the International Academy of Cytology [and] American Society of Cytology* **25**, 115-118.
- Cuzick, J., Mayrand, M., Ronco, G., Snijders, P. & Wardle, J. (2006).** Chapter 10: New dimensions in cervical cancer screening. *Vaccine* **24 Suppl 3**, S3/90-97.
- Davey, D. D., Nielsen, M. L., Frable, W. J., Rosenstock, W., Lowell, D. M. & Kraemer, B. B. (1993).** Improving accuracy in gynecologic cytology. Results of the College of American Pathologists Interlaboratory Comparison Program in Cervicovaginal Cytology. *Archives of pathology & laboratory medicine* **117**, 1193-1198.
- de Gruijl, T. D., Bontkes, H. J., Walboomers, J. M., Schiller, J. T., Stukart, M. J., Groot, B. S., Chabaud, M. M., Remmink, A. J., Verheijen, R. H., Helmerhorst, T. J., Meijer, C. J. & Scheper, R. J. (1997).** Immunoglobulin G responses against human papillomavirus type 16 virus-like particles in a prospective nonintervention cohort study of women with cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* **89**, 630-638.
- de Roda Husman, A. M., Walboomers, J. M., van den Brule, A. J., Meijer, C. J. & Snijders, P. J. (1995).** The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* **76 (Pt 4)**, 1057-1062.
- Evans, M., Borysiewicz, L. K., Evans, A. S., Rowe, M., Jones, M., Gileadi, U., Cerundolo, V. & Man, S. (2001).** Antigen processing defects in cervical carcinomas limit the presentation of a CTL epitope from human papillomavirus 16 E6. *J Immunol* **167**, 5420-5428.
- Ferlay J, S. H., Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. (2010).** GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
- Finnen, R., Erickson, K., Chen, X. & Garcea, R. (2003).** Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. *J Virol* **77**, 4818-4826.
- Garland, S. M., Hernandez-Avila, M., Wheeler, C. M., Perez, G., Harper, D. M., Leodolter, S., Tang, G. W., Ferris, D. G., Steben, M., Bryan, J., Taddeo, F. J., Railkar, R., Esser, M. T., Sings, H. L., Nelson, M., Boslego, J., Sattler, C., Barr, E. & Koutsky, L. A. (2007).** Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases. *The New England journal of medicine* **356**, 1928-1943.
- Hildesheim, A., Schiffman, M., Gravitt, P., Glass, A., Greer, C., Zhang, T., Scott, D., Rush, B., Lawler, P. & Sherman, M. (1994).** Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *J Infect Dis* **169**, 235-240.
- Hubbard, R. A. (2003).** Human papillomavirus testing methods. *Archives of pathology & laboratory medicine* **127**, 940-945.
- Huh, W. K. & Roden, R. B. (2008).** The future of vaccines for cervical cancer. *Gynecologic oncology* **109**, S48-56.
- Husnjak, K., Grce, M., Magdic, L. & Pavelic, K. (2000).** Comparison of five different polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus in cervical cell specimens. *J Virol Methods* **88**, 125-134.

- INC (2009).** Todo sobre el cáncer de cuello uterino: Instituto Nacional de Cancerología. Información Institucional.
- IPPF (2007).** Boletín Médico de International Planned Parenthood Federation. **41**, 1-4.
- Karem, K. L., Poon, A. C., Bierl, C., Nisenbaum, R. & Unger, E. (2002).** Optimization of a human papillomavirus-specific enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol* **9**, 577-582.
- Karlsen, F., Kalantari, M., Jenkins, A., Pettersen, E., Kristensen, G., Holm, R., Johansson, B. & Hagmar, B. (1996).** Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of human papillomavirus. *J Clin Microbiol* **34**, 2095-2100.
- Kawana, K., Yasugi, T., Kanda, T., Kawana, Y., Hirai, Y., Yoshikawa, H. & Taketani, Y. (2002).** Neutralizing antibodies against oncogenic human papillomavirus as a possible determinant of the fate of low-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Biochem Biophys Res Commun* **296**, 102-105.
- Kirnbauer, R., Booy, F., Cheng, N., Lowy, D. R. & Schiller, J. T. (1992).** Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 12180-12184.
- Kulasingam, S. L. & Koutsky, L. A. (2001).** Will New Human Papillomavirus Diagnostics Improve Cervical Cancer Control Efforts? *Current infectious disease reports* **3**, 169-182.
- Laboratory of Cellular Oncology, C. f. C. R., National Cancer Institute (2010).** Production of Papillomaviral Vectors (Pseudoviruses).
- Leder, C., Kleinschmidt, J. A., Wiethe, C. & Muller, M. (2001).** Enhancement of capsid gene expression: preparing the human papillomavirus type 16 major structural gene L1 for DNA vaccination purposes. *J Virol* **75**, 9201-9209.
- Lema, C. H., Hurtado, L. V., Segurondo, D., Romero, F., Dulong, A., Asturizaga, D., Panoso, W., Garcia, G., Fujiyoshi, T., Yashiki, S., Li, H. C., Lou, H., Cervantes, J., Gomez, L. H. & Sonoda, S. (2001).** Human Papillomavirus Infection among Bolivian Amazonian Women. *Asian Pac J Cancer Prev* **2**, 135-141.
- Levert, M., Clavel, C., Graesslin, O., Masure, M., Birembaut, P., Quereux, C. & Gabriel, R. (2000).** [Human papillomavirus typing in routine cervical smears. Results from a series of 3778 patients]. *Gynecologie, obstetrique & fertilité* **28**, 722-728.
- Louvanto, K., Rintala, M. A., Syrjänen, K. J., Grénman, S. E. & Syrjänen, S. M. (2010).** Genotype-specific persistence of genital human papillomavirus (HPV) infections in women followed for 6 years in the Finnish Family HPV Study. *J Infect Dis* **202**, 436-444.
- Lowe, J., Panda, D., Rose, S., Jensen, T., Hughes, W. A., Tso, F. Y. & Angeletti, P. C. (2008).** Evolutionary and structural analyses of alpha-papillomavirus capsid proteins yields novel insights into L2 structure and interaction with L1. *Virology* **5**, 150.
- Moscicki, A., Palefsky, J., Smith, G., Siboshski, S. & Schoolnik, G. (1993).** Variability of human papillomavirus DNA testing in a longitudinal cohort of young women. *Obstet Gynecol* **82**, 578-585.
- Nelson, J. H., Hawkins, G. A., Edlund, K., Evander, M., Kjellberg, L., Wadell, G., Dillner, J., Gerasimova, T., Coker, A. L., Pirisi, L., Petereit, D. & Lambert, P. F.**

- (2000). A novel and rapid PCR-based method for genotyping human papillomaviruses in clinical samples. *J Clin Microbiol* **38**, 688-695.
- Nie, J., Huang, W., Wu, X. & Wang, Y. (2014). Optimization and validation of a high throughput method for detecting neutralizing antibodies against human papillomavirus (HPV) based on pseudovirons. *J Med Virol* **86**, 1542-1555.
- Ochi, H., Matsumoto, K., Kondo, K., Oki, A., Furuta, R., Hirai, Y., Yasugi, T., Takatsuka, N., Maeda, H., Mitsuhashi, A., Fujii, T., Kawana, K., Iwasaka, T., Yaegashi, N., Watanabe, Y., Nagai, Y., Kitagawa, T., Kanda, T. & Yoshikawa, H. (2012). Do neutralizing antibody responses generated by human papillomavirus infections favor a better outcome of low-grade cervical lesions? *J Med Virol* **84**, 1128-1134.
- Ojeda, J., Muñoz, R., Pardo, M., Guevara, M. & Hernandez, T. (2008). Comparacion de la toma de citología cervical con calidad satisfactoria con el método Cervex-brush o Cervex-mex. *Ginecol Obstet Mex* **76**, 381-385.
- OPS (2008). Cáncer cervicouterino. Vacuna contra el VPH: Buscan superar obstáculos: El boletín de la Organización Panamericana de la Salud.
- Pastrana, D., Buck, C., Pang, Y., Thompson, C., Castle, P., FitzGerald, P., Krüger Kjaer, S., Lowy, D. & Schiller, J. (2004). Reactivity of human sera in a sensitive, high-throughput pseudovirus-based papillomavirus neutralization assay for HPV16 and HPV18. *Virology* **321**, 205-216.
- Petry, K. U., Bohmer, G., Iftner, T., Davies, P., Brummer, O. & Kuhnle, H. (2002). Factors associated with an increased risk of prevalent and incident grade III cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer among women with Papanicolaou tests classified as grades I or II cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Obstet Gynecol* **186**, 28-34.
- Qin, Y., Wang, X., Cui, H., Cheung, Y., Hu, M., Zhu, S. & Xie, Y. (2005). Human papillomavirus type 16 E7 peptide(38-61) linked with an immunoglobulin G fragment provides protective immunity in mice. *Gynecologic oncology* **96**, 475-483.
- Qu, W., Jiang, G., Cruz, Y., Chang, C. J., Ho, G. Y., Klein, R. S. & Burk, R. D. (1997). PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. *J Clin Microbiol* **35**, 1304-1310.
- Rincon, O., *et al.* (2007). Virus del papiloma humano, respuesta inmune y cáncer cervical: una relación compleja. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología* **58**, 202-212.
- Rivera Z, R., Aguilera T, J. & Larraín H, A. (2002). Epidemiología del Virus Papiloma Humano (HPV). *Revista chilena de obstetricia y ginecología* **67**, 501-506.
- Rodríguez, A., Schiffman, M., Herrero, R., Wacholder, S., Hildesheim, A., Castle, P., Solomon, D. & Burk, R. (2008). Rapid clearance of human papillomavirus and implications for clinical focus on persistent infections. *J Natl Cancer Inst* **100**, 513-517.
- Rosales, R., López-Contreras, M. & Cortes, R. (2001). Antibodies against human papillomavirus (HPV) type 16 and 18 E2, E6 and E7 proteins in sera: correlation with presence of papillomavirus DNA. *J Med Virol* **65**, 736-744.
- Safaeian, M., Porras, C., Schiffman, M., Rodriguez, A. C., Wacholder, S., Gonzalez, P., Quint, W., van Doorn, L. J., Sherman, M. E., Xhenseval, V., Herrero, R., Hildesheim, A. & Group, C. R. V. T. (2010). Epidemiological study of anti-

- HPV16/18 seropositivity and subsequent risk of HPV16 and -18 infections. *J Natl Cancer Inst* **102**, 1653-1662.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988).** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. & Arnheim, N. (1985).** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354.
- Sambrook J, F. E., Maniatis T, (ed) (1989).** *Molecular cloning; A laboratory manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanclemente, G. & Gill, D. (2002).** Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* **16**, 231-240.
- Santos, C., Munoz, N., Klug, S., Almonte, M., Guerrero, I., Alvarez, M., Velarde, C., Galdos, O., Castillo, M., Walboomers, J., Meijer, C. & Caceres, E. (2001).** HPV types and cofactors causing cervical cancer in Peru. *Br J Cancer* **85**, 966-971.
- Scheurer, M., Tortolero-Luna, G. & Adler-Storthz, K. (2005).** Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. *Int J Gynecol Cancer* **15**, 727-746.
- Sehr, P., Rubio, I., Seitz, H., Putzker, K., Ribeiro-Müller, L., Pawlita, M. & Müller, M. (2013).** High-throughput pseudovirion-based neutralization assay for analysis of natural and vaccine-induced antibodies against human papillomaviruses. *PLoS One* **8**, e75677.
- Stanley, M. (2008).** Immunobiology of HPV and HPV vaccines. *Gynecologic oncology* **109**, S15-21.
- Vidyasagar, P., Sridevi, V. N., Rajan, S., Praveen, A., Srikanth, A., Abhinay, G., Siva Kumar, V., Verma, R. R. & Rajendra, L. (2014).** Generation and characterization of neutralizing monoclonal antibodies against baculo-expressed HPV 16 VLPs. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)* **4**, 56-64.
- Walboomers, J. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., Snijders, P. J., Peto, J., Meijer, C. J. & Munoz, N. (1999).** Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of pathology* **189**, 12-19.
- Wang, J. W., Jagu, S., Wang, C., Kitchener, H. C., Daayana, S., Stern, P. L., Pang, S., Day, P. M., Huh, W. K. & Roden, R. B. (2014).** Measurement of neutralizing serum antibodies of patients vaccinated with human papillomavirus L1 or L2-based immunogens using furin-cleaved HPV Pseudovirions. *PLoS One* **9**, e101576.
- Winer, R. L., Kiviat, N. B., Hughes, J. P., Adam, D. E., Lee, S. K., Kuypers, J. M. & Koutsky, L. A. (2005).** Development and duration of human papillomavirus lesions, after initial infection. *J Infect Dis* **191**, 731-738.
- Wu, X., Zhang, C., Feng, S., Liu, C., Li, Y., Yang, Y., Gao, J., Li, H., Meng, S., Li, L., Zhang, Y., Hu, X., Lin, L., Li, X. & Wang, Y. (2009).** Detection of HPV types and neutralizing antibodies in Gansu province, China. *J Med Virol* **81**, 693-702.
- Zhao, H., Lin, Z. J., Huang, S. J., Li, J., Liu, X. H., Guo, M., Zhang, J., Xia, N. S., Pan, H. R., Wu, T. & Li, C. G. (2014).** Correlation between ELISA and pseudovirion-

based neutralisation assay for detecting antibodies against human papillomavirus acquired by natural infection or by vaccination. *Hum Vaccin Immunother* **10**, 740-746.

zur Hausen, H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* **2**, 342-350.