

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**PAPEL DE LA INMUNIDAD CELULAR EN LA PROGRESIÓN DE LESIONES DE
BAJO GRADO CAUSADAS POR VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO**

Presentado por

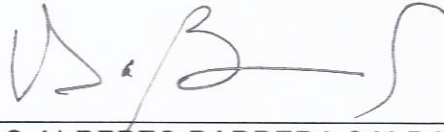
Médico, M. en C. SOFÍA BERNAL SILVA

**Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTOR EN CIENCIAS CON
ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

ENERO, 2013

Papel de la inmunidad celular en la progresión de lesiones de bajo grado causadas por virus del papiloma humano

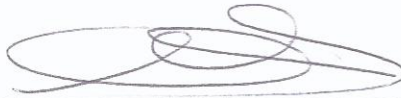
Aprobación de la Tesis:



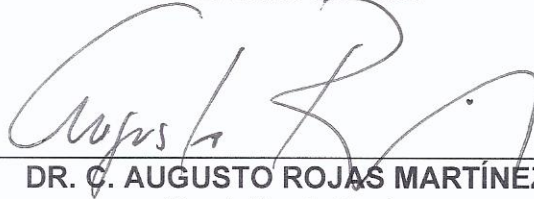
DR. C. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA
Director de Tesis



DR. C. MARIO CÉSAR SALINAS CARMONA
Co-Director de Tesis



DR. C. ALEJANDRO GARCÍA CARRANCÁ
Co-Director de Tesis



DR. C. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ
Comisión de Tesis



DR. med. OSCAR VIDAL GUTIÉRREZ
Comisión de Tesis



DR. med. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO
Subdirector de Estudios de Posgrado

ÍNDICE

I. MARCO TEÓRICO	1
1.1 INTRODUCCIÓN	1
1.2 ANTECEDENTES GENERALES	1
1.2.1 <i>La infección por virus del papiloma humano y el cáncer cérvicouterino.</i>	1
1.2.2 <i>Factores de riesgo asociados al VPH para el desarrollo de cáncer cérvicouterino</i>	2
1.2.3 <i>Recomendaciones generales para prevención del cáncer cérvicouterino</i>	3
1.2.4 <i>Lesiones intraepiteliales cervicales y su historia natural</i>	5
1.2.5 <i>Detección del VPH y su aplicación clínica.</i>	6
1.2.6 <i>La inmunidad en el cáncer cérvicouterino y sus lesiones premalignas.</i>	8
1.2.7 <i>Tratamiento actual para las lesiones premalignas y su impacto socioeconómico.</i>	14
1.3 ANTECEDENTES DEL PROYECTO	16
1.4 JUSTIFICACIÓN	17
II. OBJETIVOS.....	19
2.1 OBJETIVO GENERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
3.1 DETECCIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DE VPH.....	20
3.2 INTEGRACIÓN DE LA COHORTE DE MUJERES CON EVIDENCIA DE INFECCIÓN POR EL VPH POR PRUEBAS MOLECULARES.	22
3.2.1 <i>Genotipificación de alelos del gen DRB1 del CPH</i>	23
3.2.2 <i>Análisis estadístico para la búsqueda de asociaciones con el gen DRB1</i>	25
3.3 INTEGRACIÓN DE LA COHORTE DE MUJERES CON EVIDENCIA DE LIEBG POR CITOLOGÍA.....	26
3.3.1 <i>Perfil de citocinas expresadas en cérvix y su asociación con el desenlace de LIEBG.</i>	27
3.3.1.1 Extracción y concentración de RNA a partir de células de cérvix.	28
3.3.1.2 Retrotranscripción del RNA	29
3.3.1.3 Cuantificación relativa de RNAs de citocinas por RT-PCR en tiempo real utilizando el método $\Delta\Delta CT$	30
3.3.1.4 Análisis estadístico para la cuantificación relativa de los RNAs de las citocinas y la comparación de niveles de su expresión entre los grupos de estudio.	31
3.4 IMPLEMENTACIÓN DE UN SISTEMA DE DETECCIÓN DE LINFOCITOS CD8+ ESPECÍFICAS CONTRA EL VPH. 31	
3.4.1 <i>Producción in vitro de las cadenas pesada y ligera del HLA-A2</i>	32
3.4.2 <i>Selección de la proteína de VPH-16 y el péptido de interés.</i>	37
3.4.3 <i>Reacción de plegamiento para HLA clase I (formación de los monómeros de HLA-A2/péptido de VPH-16).</i>	38
3.4.4 <i>Biotinilación y purificación de los monómeros HLA-A2/péptido</i>	39
3.4.5 <i>Tetramerización de los monómeros HLA-A2/péptido</i>	41
3.4.6 <i>Funcionalidad de los tetrámeros de HLA-A2/péptido</i>	41
IV. RESULTADOS.....	45
4.1 INTEGRACIÓN DE LA COHORTE.....	45
4.2 DETECCIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DEL VPH.....	47
4.3 GENOTIPIFICACIÓN DE ALELOS HLA CLASE II – GEN DRB1.	49

4.4 PERFIL DE CITOCINAS PRESENTE EN CÉRVIX EN MUJERES CON LIEBG.....	52
4.5 PRODUCCIÓN DE TETRÁMEROS DE HLA CLASE I PARA LA DETECCIÓN DE LINFOCITOS CD8+	56
V. DISCUSIÓN.....	61
5.1 ALELOS DE HLA Y SU ASOCIACIÓN CON PERSISTENCIA DE LA INFECCIÓN VIRAL.....	61
5.2 PAPEL DEL AMBIENTE DE CITOCINAS EN LA EVOLUCIÓN DE LESIONES DE BAJO GRADO.....	63
5.3 TIPOS DE VPH EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO.	67
5.4 TETRÁMEROS DE HLA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE CD8+-ESPECÍFICOS.....	67
VI. CONCLUSIONES	68
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

I. MARCO TEÓRICO

1.1 Introducción

1.2 Antecedentes generales

1.2.1 La infección por virus del papiloma humano y el cáncer cérvicouterino.

El cáncer cervicouterino (CaCU) es una enfermedad prevenible, común, grave, multifactorial con un fuerte componente genético. Sí, a través de métodos de tamizaje se detectan sus lesiones precursoras, es posible evitar que este padecimiento se presente. Su prevención requiere, entonces, la erradicación oportuna de estas lesiones precursoras (Denny LA 2005). Sin embargo, el CaCU es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Representa el 13% de los procesos malignos en mujeres con un estimado, en el mundo, de 530,000 casos nuevos en el año 2008 y 275,000 defunciones reportadas en ese mismo año (GLOBOCAN 2008 - IARC 2012). Más del 85% de estos se produce en los países en desarrollo, donde los programas de detección oportuna no están bien arraigados o son muy poco eficaces (GLOBOCAN 2008 - IARC 2012). En los países en desarrollo, la incidencia del CaCU ocupa el segundo lugar, detrás del cáncer de mama, siendo la principal causa de fallecimientos debidos al cáncer en las mujeres. Del año 2000-2008 murieron en México 38,262 mujeres por esta causa (Sánchez-Barriga 2012) siendo, de los tumores malignos que afectan a la población femenina, el segundo más frecuente representando un 14.4% de las defunciones por tumores malignos, lo que equivale al deceso de una mujer cada dos horas por esta causa.

El principal factor implicado en la etiopatogenia del CaCU es la infección persistente por virus del papiloma humano (VPH) del tipo oncogénico. Este grupo de virus oncogénicos está formado, hasta el día de hoy, por los siguientes quince tipos virales: VPH-16, 18, 31,

33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82. La infección por VPH es una entidad frecuente dentro de las mujeres en edad productiva. Se sabe que la prevalencia global de esta infección es del 10.4% (IC del 95% 10.2 – 10.7). La prevalencia por regiones se presenta de la siguiente forma: para África 22.1% (20.9 – 23.4), América Central y México 20.4% (19.3-21.4), América del Norte 11.3% (10.6-12.1), Europa 8.1% (7.8-8.4) y para Asia 8% (7.5-8.4) (Clifford GM 2005). Como se puede observar, son los países en desarrollo los que presentan prevalencias más elevadas. En todas las regiones del mundo la prevalencia es mayor para mujeres menores de 35 años y disminuye en mujeres de 45 años o más. Se estima que alrededor de 291 millones de mujeres a nivel mundial son portadoras del DNA del VPH, de las cuales más del 30% están infectadas con los tipos -16 o -18 o con ambos. Los tipos virales detectados en mujeres asintomáticas son muy parecidos a aquellos detectados en lesiones premalignas y cáncer, a pesar de encontrarse substancialmente menos frecuente al tipo 16 y 18 en las primeras mujeres (de Sanjosé S 2007).

1.2.2 Factores de riesgo asociados al VPH para el desarrollo de cáncer cérvicouterino

El agente etiológico del CaCU y de sus lesiones precursoras es la infección persistente por VPHs oncogénicos. La infección por estos tipos virales es necesaria más no suficiente para desarrollar dichas lesiones y CaCU. Existen co-factores de riesgo que contribuyen a la aparición del tumor, encontrándose entre los más comunes el uso prolongado de anticonceptivos orales, múltiples parejas sexuales, tabaquismo e historia de infecciones de transmisión sexual (Garcea RL and DiMaio D. The Papillomaviruses. Editorial Springer Science + Business Media LLC. 2007. USA). Hay una marcada diferencia para el riesgo de acuerdo a variables demográficas como estado socioeconómico, religión ocupación, estatus marital y etnicidad. Estudios epidemiológicos, la mayoría de ellos de casos y controles, han mostrado asociación consistente entre el riesgo de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) y

el inicio de vida sexual temprana, alto número de compañeros sexuales, estos factores principalmente asociados al riesgo de contraer la infección por VPH. Sin embargo, algunos factores ambientales pueden aumentar el riesgo de cáncer invasor, entre ellos se incluye el número aumentado de embarazos, exposición prolongada a anticonceptivos orales, tabaquismo y la co-infección por otros microorganismos considerados de transmisión sexual como *Chlamydia trachomatis* y Herpes simple tipo 2. Además, parece haber cierta predisposición genética así como la infección por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

1.2.3 Recomendaciones generales para prevención del cáncer cérvicouterino

El CaCU es prevenible; en primer lugar porque es causado por un agente infeccioso y en segundo lugar porque su génesis toma años en desarrollarse. La prevención de esta patología nos ofrece grandes oportunidades para intervenir en momentos oportunos y de esta manera prevenir la progresión de la infección hacia una enfermedad establecida, se trate de una enfermedad premaligna o del CaCU en sí.

Existen tres tipos de prevención para las enfermedades: prevención primaria: la cual consiste en evitar el agente causal, prevención secundaria: que consiste en la detección oportuna de lesiones precursoras, y la prevención terciaria: la cual consiste en el tratamiento de la enfermedad propiamente dicha (Garcea RL and DiMaio D. The Papillomaviruses. Editorial Springer Science + Business Media LLC. 2007. USA).

En el caso del CaCU, la prevención primaria consiste en estrategias o intervenciones destinadas a evitar o reducir la exposición al VPH y los co-factores de riesgo mencionados con anterioridad. Esto se logra, generalmente, con modificaciones en comportamiento, educación sexual, retardo en inicio de vida sexual, así como uso estricto del preservativo.

En la actualidad, se cuenta con vacunas profilácticas, altamente inmunológicas y efectivas en la prevención de lesiones precursoras como son NIC 2/3. La prevención secundaria está enfocada en la detección temprana y tratamiento de lesiones precursoras como es el caso de las lesiones intraepiteliales de bajo y alto grado (LIEBG y LIEAG, respectivamente). El mayor énfasis se ha enfocado en el tamizaje de poblaciones asintomáticas, lo cual se ha conseguido, durante mucho tiempo, desde los años 40, con la citología cérvico-vaginal y más recientemente se han incorporado pruebas moleculares para la detección y determinación del VPH para aumentar la sensibilidad y especificidad de la citología (Saslow D, Solomon D, Lawson HW, Killackey M, Kulasingam SL, Cain J, García FAR, Moriarty AT, Waxman AG, et al. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology Screening Guidelines for the Prevention and Early Detection of Cervical Cancer. CA Cancer J Clin 2012;00:000-000).

El cribado, o prevención secundaria, basado en la citología cérvico-vaginal, debe iniciarse a los 21 años siempre y cuando se haya iniciado vida sexual. Deberá practicarse con citología convencional o en base líquida cada 3 años de los 21 a 29 años, citología y estudio molecular de VPH cada 5 años de los 30 a los 64 años y se suspenderá el tamizaje a los 64 años siempre y cuando no exista un antecedente de riesgo para la paciente (haber padecido o haber sido tratada por una lesión precursora o CaCU) (Saslow D, Solomon D, Lawson HW, Killackey M, Kulasingam SL, Cain J, García FAR, Moriarty AT, Waxman AG, et al. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology Screening Guidelines for the Prevention and Early Detection of Cervical Cancer. CA Cancer J Clin 2012;00:000-000).

1.2.4 Lesiones intraepiteliales cervicales y su historia natural

Se ha descrito que, además de los co-factores antes mencionados, existe cierta susceptibilidad por parte del huésped, tanto para la persistencia viral, como para el desarrollo de lesiones premalignas y CaCU. Dentro de estos factores se han descrito inserciones y deleciones cromosómicas, mutaciones en genes supresores de tumores (p53), polimorfismos en genes implicados en la respuesta inmune [como sería factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)] y de reguladores de esta (como en ciertas interleucinas).

La historia natural de la enfermedad muestra que una vez que el VPH ha infectado el epitelio cervical, es capaz de ir expresando sus proteínas a través de la activación de promotores de forma diferencial en las distintas capas del epitelio. Si la infección es persistente, ésta evoluciona a lesiones precursoras, las cuales pueden ser detectadas a través del Papanicolaou. Existen dos grados de lesiones de acuerdo a la clasificación de Bethesda: 1) lesión intraepitelial de bajo grado (LIEBG) y 2) lesión intraepitelial de alto grado (LIEAG). Una vez detectadas estas lesiones, deben ser confirmadas mediante su estudio histopatológico y se clasifican de acuerdo al nivel del epitelio que se encuentra afectado como: 1) neoplasia intraepitelial cervical grado I (NIC I), si sólo un tercio del epitelio está afectado. 2) neoplasia intraepitelial cervical grado II (NIC II), si son dos tercios del epitelio los que se encuentran afectados. 3) neoplasia intraepitelial cervical grado III (NIC III), si se afectan más de dos tercios del epitelio cervical.

Existen varios reportes sobre la historia natural de la enfermedad. Se conoce que la mayoría de las LIEBGs (NIC I) presentan regresión sin tratamiento y la mayoría de las LIEAGs persisten o progresan dependiendo si se trata de NIC II o NIC III. Aproximadamente un 40% de los NIC II presentan regresión y un 30% de los NIC III regresan.

Las LIEBG se reportan en 2.9% de las muestras de citología en base líquida. Algunos autores reportan que del 73 al 76.6% de las LIEBG resultan positivas para VPH (Wright and cols, 2006). Estas lesiones presentan regresión hasta en el 70.3% de los casos y se ha reportado que el tiempo de regresión varía de acuerdo al grado oncogénico del virus detectado, siendo de 26 meses en promedio para lesiones con virus de alto riesgo (HR-HPV) y de 7.8 meses para lesiones con virus de bajo riesgo (LR-HPV); no obstante, el 11% de las LIEBG progresarán a LIEAG (Song SH 2006). El tipo viral que se encuentra con mayor frecuencia en las LIEBG es el VPH-16 y se presentan infecciones múltiples hasta en el 33% de los casos (Herrero R 2000). Dado que el riesgo de infección por el VPH a lo largo de toda la vida es del 70% al 80%, debe haber otros factores que expliquen por qué el porcentaje de mujeres que terminan desarrollando CaCU es relativamente pequeño (menos del 5%). Actualmente, solamente se cuenta con la prueba positiva para VPH-AR como marcador de las LIEBG con mayor riesgo a progresar hacia una LIEAG reportándose que la positividad para VPH-AR es muy alta en mujeres menores de 29 años (80%) y menor en mujeres mayores de 40 años (56-1%). El valor predictivo positivo (VPP), independiente de la edad, es de 15% para presencia de NIC-2 y de 6.7% para NIC-3. Sin embargo, el valor predictivo negativo (VPN) sí mejora para mujeres de mayor edad. El VPP aumenta considerablemente cuando la prueba es específica para VPH-16, siendo del 25.4% para NIC-2 y de 13.6% para NIC-3 (Cuzick J 2012).

1.2.5 Detección del VPH y su aplicación clínica.

Los métodos actuales para la detección oportuna del CaCU presentan una baja sensibilidad. La prueba de Papanicolaou, la más utilizada, presenta como desventaja inherente una baja sensibilidad, como promedio del 50%, que aún puede ser menor en entornos con escasos recursos [2]. En algunos países desarrollados, los programas de tamizaje de Papanicolaou,

también conocidos como programas de tamizaje citológico, han dado resultados notables en cuanto a la reducción de la incidencia del CaCU y de la mortalidad. La incidencia del CaCU puede reducirse hasta en un 90% si los procedimientos de tamizaje son buenos y se logra una cobertura elevada (Eddy 1986). Por ejemplo, en Finlandia, un programa de tamizaje de CaCU nacional puesto en marcha en 1963, permitió reducir la tasa de CaCU a 5.5 casos por 100,000 mujeres, uno de los valores más bajos del mundo (Hakama M 1975). En cambio, en los países en desarrollo, donde se produce el 80% de todos los casos nuevos, se ha estimado que sólo el 5% de mujeres se han realizado una prueba de Papanicolaou en los últimos cinco años. Aunque en muchos países en desarrollo se han puesto en práctica actividades de tamizaje empleando la prueba de Papanicolaou, en general el éxito ha sido escaso. Por ejemplo, en México, donde se han puesto en marcha programas nacionales de tamizaje mediante la prueba de Papanicolaou a partir del año 1974, la tasa de mortalidad en las mujeres de más de 15 años se mantuvo constante en 16 por 100,000 mujeres (Lazcano-Ponce EC 1999). Esto se debe, en gran parte, a que se realizaban exámenes reiterados a las mujeres más jóvenes de las zonas urbanas, pero los programas no estaban llegando a las mujeres cuya situación de riesgo era mayor. Además, las lesiones precursoras de esta enfermedad, constituyen uno de los problemas de salud que más comúnmente se encuentran en mujeres en edad reproductiva en países como Estados Unidos de América.

En los programas de prevención del CaCU de todo el mundo, hay cada vez más interés en la prueba de VPH, ya sea como complemento de los procedimientos de tamizaje citológico o como prueba de tamizaje primario.

En un estudio de detección de LIEAGs y de CaCU realizado en Costa Rica, en el que participaron más de 9,000 mujeres sexualmente activas de 18 o más años de edad, se

determinó que la prueba de captura de híbridos de segunda generación (HC II) tenía una sensibilidad del 88.4% y una especificidad del 89%. Cuando los resultados se desglosaron por edad, la especificidad fue más alta (93.2%) para las mujeres de 41 o más años de edad. En general, la prueba de VPH realizada usando la prueba HC II fue más sensible que la prueba convencional de Papanicolaou (88% vs 78%, respectivamente) para detectar las LIEAGS y los tumores, pero menos específica (89% vs 94%, respectivamente) (Schiffman M 2000).

1.2.6 La inmunidad en el cáncer cérvicouterino y sus lesiones premalignas.

La respuesta inmune ante la infección por el VPH, como en cualquier infección, es determinante para la eliminación de éste. Cualquier falla en alguno de los pasos desde el procesamiento y presentación antigénica, hasta la activación de la respuesta inmune adaptativa celular, puede llevar a la persistencia del agente infeccioso y desencadenar en transformación celular, como es el caso del VPH cuando persiste en el epitelio cervical. Incluso una vez que existe transformación celular, la respuesta inmune anti-tumoral es prioritaria para evitar la formación de tumores invasivos.

En la actualidad se conoce una gran diversidad de marcadores moleculares de riesgo para esta enfermedad. Dentro de los más comunes y de mayor utilidad se encuentran la carga viral, los marcadores de proliferación [p16 (INK4A)], Ki 67, ciclinas, inhibidores dependientes de ciclinas (CDK), antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), proteínas de mantenimiento de minicromosomas (MCMs), cambios epigenéticos (metilación de genes como Caderina-E), telomerasa y los alelos del complejo principal de histocompatibilidad (CPH) (86).

Para el caso de la inmunología humoral, se ha descrito que no es un factor determinante para la eliminación de la infección por VPH ni ha sido de utilidad como un marcador de riesgo para la enfermedad. Se conoce que solamente el 50% de las mujeres llegan a presentar anticuerpos séricos anti-VPH (Wang SS 2004). Recientemente ha quedado claro que el papel de la inmunología humoral es de gran relevancia en el caso de las vacunas anti-VPH que en los últimos años se han aplicado en la población mundial. Dichas vacunas tienen la capacidad de despertar una respuesta humoral muy elevada, al comparar con la enfermedad natural, basada en la producción de anticuerpos neutralizantes que llegan a proteger al 100% contra la infección por los genotipos incluidos (The Future II Study Group 2007). Así mismo, se ha estudiado ampliamente el papel de la inmunología celular en la historia natural de la enfermedad y para la búsqueda de marcadores inmunológicos que permitan detectar algunas de las causas de la persistencia viral y el desarrollo de lesiones premalignas y malignas (Luevano M 2010).

La respuesta inmune celular, especialmente la de células T específicas de antígeno, es crucial para la eliminación de células infectadas por VPH, habiéndose descrito que pacientes con defectos persistentes en la respuesta inmune celular (SIDA, inmunosupresión terapéutica y deficiencias congénitas, entre otras condiciones) presentan mayor riesgo de infección persistente y de CaCU (87).

La respuesta antiviral adaptativa se inicia con la presentación de péptidos específicos, derivados de virus o de tumor, a células T y su reconocimiento a través del receptor de células T. Estos péptidos específicos son presentados por moléculas de superficie celular MHC clase I (las cuales están presentes en todas las células nucleadas) a los linfocitos CD8+ y por moléculas de superficie celular MHC clase II a los linfocitos CD4+. Una

respuesta efectiva de células T CD8+ se caracteriza por la generación y expansión clonal de linfocitos T citotóxicos efectores (CTLs) con la capacidad de reconocer y eliminar células que cargan antígenos específicos. Por su parte, los linfocitos T CD4+ se caracterizan por la generación de células efectoras con capacidad de producir interleucinas que estimulan a otras células del sistema inmune para su activación.

Estos linfocitos T CD4+ o cooperadores, conocidos también como Th0, se pueden diferenciar hacia linfocitos Th1 y llevar hacia una respuesta del tipo inflamatoria o bien, hacia linfocitos Th2 y llevar hacia una respuesta principalmente anti-inflamatoria con mayor producción de anticuerpos. Los linfocitos T CD4+ se requieren también para la generación de la respuesta primaria de linfocitos CD8+.

Existen diversos estudios sobre los linfocitos CD4+ y sus subpoblaciones en asociación con el desarrollo de cáncer. Algunas de las subpoblaciones estudiadas han sido los linfocitos T reguladores, los cuales se han visto aumentados en frecuencia y asociados a actividad supresora en CaCU (Visser J 2007). Otros autores como Jong y cols., proponen que la falta de la función en los linfocitos CD4+ puede explicar el desarrollo de lesiones en los casos de infecciones por VPH (de Jong A 2004).

Los linfocitos T CD8+ son componentes clave de la respuesta inmune celular contra infecciones y tumores a través de su actividad citolítica y su producción de citocinas. La diferenciación de los linfocitos CD8+ hacia CTLs se da en respuesta a dos señales: 1) la presencia del péptido antigénico en el MHC clase I y 2) Una señal co-estimuladora. Ésta únicamente puede darse a través de células presentadoras de antígeno profesionales (APCs), como es el caso de las células dendríticas (DCs).

Estos linfocitos CD8+ activados son conocidos como linfocitos citotóxicos o CTLs y tienen la capacidad de destruir a células infectadas, así como células tumorales, ello mediante la producción de proteínas (perforinas y granzimas) que se instalan en las membranas de las células diana produciendo agujeros y la consecuente muerte celular (Scott M 2001). El papel de estas células en la historia de la enfermedad (lesiones premalignas causadas por VPH) no ha sido tan ampliamente estudiado y los resultados no son concluyentes. Estudios con inmunohistoquímica han revelado la presencia de CTLs en muestras con lesiones intraepiteliales y en modelos murinos de laboratorio se ha observado regresión tumoral mediada por esta subpoblación celular (Monnier-Benoit S 2006). Sin embargo, los resultados de los diversos estudios reportados en la literatura no son concluyentes en cuanto al papel de los CTLs en el desarrollo de lesiones intraepiteliales y CaCU.

Se ha descrito que tanto en pacientes con NIC asociada a VPH-16, así como en adultos sanos, se muestra una reacción positiva para pruebas cutáneas realizadas con los péptidos E2, E6 y E7 del VPH-16 (van den Hende M 2008). También se ha demostrado que existe respuesta inmune local en los casos de enfermedad clínica, la cual se ha evidenciado como infiltrados dentro de las lesiones; sin embargo, la proporción de células T específicas en dichos infiltrados es desconocida. Así mismo, existe evidencia que muestra que las NICs asociadas a VPH presentan un infiltrado de células T substancialmente mayor que las lesiones que sufren regresión y se ha descrito que el ratio de células CD4+/CD8+ disminuye o es menor en aquellas lesiones que progresan hacia CaCU (Edwards RP 1995); sin embargo, se desconoce el fenotipo de las células implicadas y la funcionalidad de las células presentes en los infiltrados.

Existen reportes en donde se ha estudiado la respuesta de linfocitos CD8+ específica contra epítopes de la proteína viral E7 en pacientes con CaCU (92), pero la mayoría de autores han referido que la respuesta contra epítopes de la proteína viral E6 podría ser más representativa para evaluar la respuesta inmune (93, 94). Así mismo, a pesar de tratarse de una infección localizada sin viremia sistémica, la correlación entre la respuesta encontrada en cérvix y en sangre es alta (95), habiéndose descrito que el perfil de citocinas que se encuentra en las lesiones de diferentes grados podrían estar jugando un papel muy importante en la funcionalidad de los linfocitos T de la respuesta inmune montada para combatir al VPH y sus lesiones (90). Otra de las proteínas estudiadas ha sido la proteína temprana del VPH-16 conocida como E2. Esta proteína se expresa de manera uniforme durante la infección productiva por VPH, así como en lesiones de bajo grado, más se pierde en lesiones avanzadas como LIEAG y CaCU. De hecho, en estudios en donde utilizan el modelo del conejo de cola de algodón se ha encontrado que la respuesta inmune contra la proteína E2 está asociada con regresión espontánea de lesiones cutáneas causadas por VPH (96). Existen epítopes descritos de esta proteína, los cuales están restringidos por el HLA clase I A2, siendo este alelo muy frecuente en la población general (hasta en el 80%) (90). Los péptidos más representativos han sido seleccionados inicialmente en base a programas computacionales, para definir aquellos con unión al HLA-A2 y posteriormente han sido probados en modelos de cultivo celular para evaluar la afinidad de unión y de estabilización del complejo formado por el HLA más el péptido (96, 97, 98, 99, 100).

Como se ha venido mencionando, el aclaramiento de la infección por VPH implica una respuesta inmune citotóxica. Por ejemplo, la regresión espontánea de verrugas genitales causadas por VPH es acompañada por infiltración de células T, principalmente del tipo

CD8+ y macrófagos. Además, la inflamación asociada al tumor ha sido implicada en la promoción de la carcinogénesis, presumiblemente a través de células inflamatorias que promueven la secreción de citocinas, quimiocinas, factores angiogénicos y proteasas. Y el papel de las citocinas secretadas es clave para determinar la activación adecuada de las células inmunes y sus mecanismos efectores. Las citocinas de tipo Th1, tales como el interferón gamma (IFN- γ), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleucina dos (IL-2) y la interleucina 12 (IL-12), se producen principalmente por linfocitos CD4+ del tipo Th1, células presentadoras de antígenos (APC) y las células asesinas naturales (NK). Las citocinas de tipo Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 e IL-10) son producidas principalmente por los linfocitos CD4+ del tipo Th2 y cuentan con un papel inmuno-inhibidor para las respuestas celulares y en la inducción de inmunidad humoral. El cambio de un perfil de respuesta de tipo Th1 a uno de tipo Th2 se ha encontrado en pacientes con VPH asociados a lesiones cervicales, aunque es importante recordar que el cuello del útero se compone de epitelio y que los queratinocitos tienen un papel importante en el inicio de la inflamación secretando citocinas tales como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-10, entre otras (Barker JNWN 1991). Los niveles de estas pueden aumentar por varios estímulos exógenos. La desregulación de su producción puede afectar la respuesta inmune local y podría proporcionar un entorno más favorable para la persistencia de la infección por el VPH. Existe evidencia sobre la reducción significativa en la expresión de citocinas específicas, como la IL-1 β , IL-8, IL-6, GM-CSF y TNF- α , en las células cervicales inmortalizadas por el VPH-16 ó -18 (Woodworth CD 1993).

1.2.7 Tratamiento actual para las lesiones premalignas y su impacto socioeconómico.

En la mayoría de los países desarrollados, en el manejo de las afecciones cervicouterinas pre-invasoras, la aplicación de procedimientos quirúrgicos hospitalarios ha sido desplazada por el uso de procedimientos ambulatorios menos invasivos. Esto se debe a varios factores, entre los que cabe mencionar la introducción de la colposcopia, un mayor conocimiento de la historia natural de las displasias cervicouterinas y la existencia de técnicas de tratamiento ambulatorio eficaces y de bajo costo. No obstante, en muchos países en desarrollo donde se practica el diagnóstico y el tratamiento de estos trastornos para tratar las displasias, los médicos todavía deben recurrir principalmente a los métodos hospitalarios, como la biopsia por conización y la histerectomía (Bishop A 1996). A medida que han ido avanzando los conocimientos sobre la historia natural del CaCU y sobre el papel que desempeña en ésta el VPH, la estrategia de tratamiento más habitual en la mayoría de los países desarrollados es tratar sólo las lesiones precancerosas de alto grado (NIC II y III) y vigilar a las mujeres que presentan displasias de bajo grado (NIC I). Aun así, la vigilancia de estas mujeres con displasias bajo grado continua siendo una fuente importante de gastos en cuidados sanitarios. En Estados Unidos de América (E.U.A.) los costos anuales para la evaluación cervical son aproximadamente de \$2.3 mil millones USD, las pruebas falsas positivas de Papanicolaou (Pap) cuestan alrededor de \$350 millones USD y los costos médicos directos de los resultados anormales de Pap son de \$4.6 mil millones USD por año (Insinga RP 2005). Aunado al impacto económico, se encuentra el impacto psicosocial en las mujeres con un resultado de Pap anormal. Muchas mujeres reaccionan a los resultados anormales de Pap con estrés y ansiedad. En una muestra de mujeres evaluadas cinco años después de dos citologías consecutivas de Pap especificadas como LIEBG, 59% informó sentimientos de ansiedad y preocupación , y 8%, influencia negativa de los resultados de las pruebas en su

sexualidad (Kahn JA 2005) (Idestrom M 2003). Las mujeres también comentaron sentir miedo en cuanto a si desarrollarían cáncer o que estas anormalidades interfirieran en su capacidad para tener hijos (Lagro-Janssen T 2005). Las mujeres jóvenes, en las cuales la infección por VPH es más prevalente, experimentan índices altos de lesiones precancerosas de bajo grado. Hasta 37% de las mujeres adolescentes tiene citología cervical anormal en al menos un examen, pero la mayoría de estos cambios citológicos tendrá regresión (Brown DR 2005). Sin embargo, aun continúa la interrogante de cómo detectar a aquellas mujeres con LIEBG con mayor riesgo de progresión. Se considera que habría claros beneficios clínicos si se contara con un juego de marcadores que permitieran la identificación precisa de aquellos casos de LIEBG con mayor probabilidad de convertirse en lesiones de alto grado con mayor riesgo de progresión a CaCU.

1.3 Antecedentes del proyecto

Como se ha mencionado previamente, el CaCU continúa siendo una causa importante de mortalidad tanto en México como en el mundo. Y es bien conocido que para que éste se desarrolle es necesaria la infección persistente por VPH de alto riesgo (VPH-AR) aunado a co-factores epidemiológicos propios del huésped. No todas las mujeres con infección persistente desarrollan CaCU, además, se ha visto que los co-factores pueden tener diferente impacto dependiendo de la población en estudio. Es importante considerar factores propios del huésped que pudieran estar contribuyendo a la susceptibilidad para el desarrollo del CaCU. La infección por VPH lleva al desarrollo de lesiones intraepiteliales que inician siendo de bajo grado (LIEBG). Estas lesiones de bajo grado suelen desaparecer en el lapso de dos años gracias a su eliminación por mecanismos efectores de la inmunidad del huésped. Sin embargo, se ha observado que en algunas ocasiones la respuesta inmune no es efectiva y en estos casos, la LIEBG suele persistir, lo que conlleva a que la lesión siga evolucionando hacia una lesión intraepitelial de alto grado (LIEAG). Las LIEAG suelen presentar regresiones espontáneas en un menor porcentaje que las LIEBG y tienen mayor potencial oncogénico. Por lo tanto, se cree que el papel de la inmunidad es de suma importancia para evitar que una infección inicial por VPH tenga un desenlace maligno al cabo del tiempo.

Debido a lo anterior, se inició estudiando el papel de la inmunología humoral en la eliminación de la infección por VPH. Por lo que, como parte de una tesis de maestría (Luévano M et al. Tesis de Maestría, UANL) del mismo grupo de investigación en el cual se ha venido desarrollando la presente tesis doctoral, se hizo la comparación de la presencia de anticuerpos dirigidos contra una variedad de VPHs utilizando tecnología de punta basada en microarreglos de proteínas (Luevano M 2010). Los resultados de dicho trabajo

dio soporte a lo ampliamente descrito en la literatura, la inmunidad humoral natural ante la infección por VPH no es relevante para la eliminación de la infección. Con dicho trabajo se concluyó que la infección por VPH y sus lesiones no conducen necesariamente a una respuesta serológica importante contra las proteínas virales que conduzca a un patrón para identificar pacientes con riesgo para la progresión de la enfermedad (Luévano M y cols. *Virology* 405 (2010) 31–40). Se sabe, que la inmunidad humoral tiene gran importancia solamente cuando dicho tipo de inmunidad es adquirido al exponer al huésped a la vacuna con partículas parecidas al virus (VLPs, por sus siglas en inglés).

Con las conclusiones anteriores se decidió iniciar una investigación sobre el papel de la inmunología celular en la resolución de la infección por VPH. Para esto, como parte de la presente tesis doctoral, se plantearon tres objetivos principales. En primer lugar, estudiar el papel del polimorfismo genético de los alelos del gen DRB1 perteneciente al complejo principal de histocompatibilidad (CPH) en pacientes con infección persistente *vs* pacientes que eliminan la infección de manera adecuada. En segundo lugar, estudiar el perfil de citocinas presente en el cérvix de mujeres y verificar si este es diferente en mujeres que pueden o no eliminar una LIEBG. En tercer y último lugar, establecer un método para cuantificar la cantidad de linfocitos T CD8+ específicos contra VPH.

1.4 Justificación

Por lo descrito anteriormente, consideramos necesario contar con marcadores de susceptibilidad que distingan a las mujeres con riesgo de progresión de sus lesiones de bajo a alto grado o CaCU. Dado que la inmunología humoral ya ha sido estudiada por nuestro grupo y el de otros investigadores y destacando la importancia de la inmunología celular en

la regresión de las lesiones y tumores, consideramos importante investigar el rol de esta última en el desenlace de la enfermedad.

Siendo la presentación antigénica un paso primordial para el reconocimiento del antígeno y en este caso, la eliminación de la infección por VPH, consideramos relevante estudiar la probable asociación de alelos del gen HLA-DRB1 con susceptibilidad y/o resistencia para la persistencia viral.

Tomando en cuenta la función de las citocinas como mediadoras de la respuesta inmune celular, y más específicamente su papel durante la respuesta efectora activando a los linfocitos T citotóxicos para la eliminación viral, consideramos importante estudiar el perfil de citocinas presente en el cérvix y su probable asociación con el destino de las lesiones de bajo grado en su evolución natural.

Finalmente, a pesar de la información con la que se cuenta en la literatura sobre el papel de los linfocitos T en la historia natural de la enfermedad, consideramos que aun falta establecer con mayor claridad el papel de los linfocitos CD8+ antígeno-específicos en el control y eliminación de las lesiones de bajo grado causadas por VPH. Dadas las características mencionadas de los péptidos que se han estudiado, en especial las que se refieren a péptidos de la proteína E2 del VPH-16, así como su importancia durante la infección y el desarrollo de lesiones de bajo grado, es deseable establecer una técnica en el laboratorio que permita estudiar el rol de los CD8+ antígeno-específicos en la respuesta a esta proteína.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Investigar el rol de la inmunología celular en la persistencia de la infección por VPH y su evolución a malignidad.

2.2 Objetivos específicos

1. Integrar una cohorte de mujeres con evidencia de infección por el VPH por pruebas moleculares y/o citología con LIEBG, que tras su seguimiento permita dividir las en aquellas que eliminaron la infección o lesión, aquellas que persistieron con éstas y aquellas que progresaron a lesiones de mayor grado o CaCU. (COHORTE).
2. Establecer el tipo de VPH de las infecciones de las mujeres de la cohorte, para considerar el papel del grado oncogénico viral en el desenlace de las infecciones. (VPH).
3. Practicar en los grupos de estudio la genotipificación de los alelos HLA clase II, para evaluar su posible asociación con el destino de la infección. (HLA).
4. Determinar el perfil de citocinas Th1/Th2 presente en cérvix de las mujeres de los grupos de estudio, para evaluar su posible papel en el destino de las lesiones de bajo grado. (CITOCINAS).
5. Establecer un método que revele la presencia de linfocitos citotóxicos específicos contra el VPH en sangre de pacientes, como un biomarcador de activación de la respuesta inmune citotóxica respectiva. (TETRÁMEROS).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Para este capítulo, se realizará la descripción de acuerdo a los objetivos planteados. Cabe mencionar que el segundo objetivo (VPH), se realizó en todas las pacientes incluidas para cada uno de los objetivos y el desarrollo metodológico se menciona a continuación.

3.1 Detección y genotipificación de VPH

La detección y tipificación del VPH a partir de muestras de cepillado cervical se realizó en el Laboratorio de Genómica y Bioinformática del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la UANL.

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

Se detectó y genotipificó el VPH a partir del DNA extraído de las células cervicales utilizando el estuche comercial “Amplicor HPV” (Roche). La detección consistió en la amplificación por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de una región de L1 del genoma viral de aproximadamente 450pb, utilizando los iniciadores específicos PGMY 09/11(Roche) y como control interno se usó el gen de la β -globina con los iniciadores incluidos en el estuche comercial. Los iniciadores PGMY 09/11 consisten en un “pool” de iniciadores específicos para la detección de aproximadamente 37 tipos diferentes de VPH. Las condiciones de PCR utilizadas fueron: desnaturalización a 95°C por 12 minutos, seguido de 40 ciclos consistiendo cada uno de desnaturalización a 95°C por 30 seg, alineamiento de iniciadores a 55°C por un min y extensión a 72°C por un min. Al final de los 40 ciclos, se incluyó uno de extensión a 72°C por cinco min (Gravitt, Peyton y Apple,

Genotyping of 27 human papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by a single-hybridization, reverse line blot detection method 1998) (Gravitt, Peyton y Alessi, Improved amplification of genital human papillomaviruses 2000).

La genotipificación se llevó a cabo por hibridación reversa del producto amplificado con sondas de DNA específicas adheridas a tiras de nylon colorimétricas, las cuales están incluidas también en el estuche comercial previamente mencionado (Roche). La identificación se realizó revelando los sitios donde ocurrió la hibridación por una reacción cromogénica y utilizando una plantilla incluida en el mismo estuche.

Se tomaron los resultados de las muestras que fueron positivas para el gen β -globina. En caso de no dar positividad para éste, se repitió el análisis con el doble de cantidad de templado y de continuar negativas se realizó PCR anidada que se realizó como se menciona a continuación. Esto para no dejar dudas de los resultados falsos negativos.

PCR anidadas para muestreo de los resultados negativos para VPH.

En caso de no coincidir el resultado histopatológico con el estudio genético de detección y genotipificación de VPH, se procedió a realizar una PCR anidada sobre el producto amplificado de 450pb obtenido usando los iniciadores PGMY 09/11, recurriendo para ello a los iniciadores GP5+/6+ que dan como amplicón un producto de 195pb.

La región del genoma viral de interés que se amplificó mediante la PCR anidada utilizando los iniciadores GP5+ (5'-TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC-3') y GP6+ (5'-GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C-3'), resultó de las siguientes condiciones de la reacción: desnaturalización inicial a 95°C por 12 minutos, seguida de 40 ciclos consistiendo cada uno de desnaturalización a 95°C por 30 seg, alineamiento de iniciadores a 43.5°C por

un min y extensión a 72°C por un min., para al final de los 40 ciclos, incluir una incubación final de extensión a 72°C por cinco min (d. R. Jacobs MV 1995).

Los resultados de las PCRs anidadas se verificaron resolviéndolos por electroforesis en geles de agarosa al 2%, considerándose positivas aquellas con el producto esperado de 195 pb. Para la genotipificación en base al producto de la PCR anidada, fue necesario realizar la secuenciación del mismo pero, clonándolo primero en el vector Topo de Invitrogen. Para esto último se incubó por 5 min con el vector para posteriormente incubar con células calciocompetentes por media hora y plaquear en agar con kanamicina. A las 12 hrs se picaron colonias para crecerlas en medio de cultivo LB por 12-18 hrs a 37°C y se realizó la minipreparación para extraer DNA plasmídico, detectar y caracterizar a los candidatos para llevar a cabo la reacción de secuenciación (S. P. Jacobs MV 1997).

3.2 Integración de la cohorte de mujeres con evidencia de infección por el VPH por pruebas moleculares.

Para cumplir con el objetivo, se diseñó un estudio longitudinal, observacional y comparativo que incluyó a mujeres que participaron en un estudio transversal llevado a cabo en el Depto. de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la UANL en Monterrey, N.L en el 2002. A partir de dicho estudio se incluyeron mujeres mayores de edad que habían sido positivas para la infección por VPH y reclutaron, nuevamente en el 2005, un total de 200 mujeres para darles seguimiento y realizar, en esta segunda visita, la genotipificación del gen DQB1 del complejo principal de histocompatibilidad (CPH) (resultados de la tesis de maestría Bernal-Silva S, Facultad de Medicina de la UANL). Para el desarrollo del presente trabajo como parte de la tesis

doctoral se incluyeron un total de 95 pacientes reclutadas durante la segunda visita y se dividieron en tres grupos de acuerdo al estado de la infección viral, denominados: 1) VPH-persistente (n = 21); 2) VPH-eliminado (n = 61); y 3) VPH-reinfectado (n = 13). Se realizó la genotipificación de alelos del gen DRB1 del CPH clase II para la búsqueda de asociación con riesgo de persistencia. Así mismo, se incluyeron un par de grupos control externos provenientes de fuentes de la literatura. Uno consistió de mujeres mexicanas aparentemente sanas (Alaez-Verson C 2011) y el otro de mujeres mexicanas con CaCU (Hernández-Hernández DM 2009). La genotipificación del gen DRB1 se realizó en colaboración con el Dr. Julio Granados Arreola del Depto. de Inmunogenética del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, utilizando la metodología de xMAP® creada por la compañía Luminex® como se describe a continuación.

3.2.1 Genotipificación de alelos del gen DRB1 del CPH

Para el análisis genético del CPH clase II se tomó una muestra de 5 ml de sangre venosa periférica (SVP) anticoagulada con EDTA. A partir de ésta se realizó extracción de DNA genómico con la técnica TSNTE-Sevag. Para la precipitación se utilizó etanol al 100% (Merck). Para la tipificación de alelos DRB1 del CPH clase II, fueron empleados como substrato 100 ng de DNA genómico de sangre periférica y la plataforma Luminex® 100/200. El sistema Luminex 100/200 es la combinación de tres tecnologías. La primera consta de las microesferas xMAP®, que es un grupo de 100 esferas de poliestireno de 5.6 micras etiquetadas con marcadores fluorescentes los cuales actúan como identificadores y en su superficie sólida se puede construir el ensayo, que en este caso consistió en sondas de oligonucleótidos de secuencia específica (SSOP, por sus siglas en inglés) complementarias a las secuencias blanco para los diferentes alelos del gen DRB1 del CPH clase II. La segunda consta de la detección por citometría de flujo, la cual integra componentes clave de

detección xMAP® como el láser, la óptica, fluidos y procesador de señales de alta velocidad. El tercer componente es el software Xponent ®, que está diseñado para la adquisición de datos basado en el análisis de regresión de los datos.

En un primer paso se realizó la amplificación del locus correspondiente al gen por medio de la PCR siguiendo las especificaciones del fabricante (Gen-Probe Transplant Diagnostics, Inc. Stanford, CT). Se trata de una PCR múltiplex con oligonucleótidos biotinilados en su extremo 3', en donde uno de ellos (sentido o anti-sentido) en cada juego se encuentra a una mayor concentración que el otro con la finalidad de dar origen, durante la reacción, tanto a DNA marcado de cadena sencilla como a DNA marcado de doble cadena (~280 pb). Cada reacción de PCR se realizó de la siguiente forma y se corrió en el termociclador como a continuación se muestra:

Reactivo	Volumen
“Master Mix”	15 µl
DNA genómico (20ng/µl)	10 µl
Taq polimerasa (5U/ µl)	0.5 µl
Agua libre de nucleasas	24.5 µl

95°C por 5 minutos
Número de ciclos: 1
95°C por 30 segundos
60°C por 45 segundos
72°C por 45 segundos
Número de ciclos: 8
95°C por 30 segundos
63°C por 30 segundos
72°C por 45 segundos
Número de ciclos: 32
72°C por 15 minutos
Número de ciclos: 1

Como segundo paso, se realizó la hibridación de los productos fluorescentes siguiendo los pasos que se muestran a continuación:

1. La solución de microesferas se calentó a 55°C por 5 minutos y se incubó en un baño sonicador (Fisher Scientific) por 5 minutos para resuspender las microesferas.
2. Se realizó la mezcla de 15µl de las esferas con 5µl de producto amplificado en cada pozo de una placa de 96 pozos (Costar®)
3. La hibridación se realizó en el termociclador bajo las condiciones siguientes: 97°C durante cinco minutos seguido de 47°C por 30 minutos y 56°C durante 10 minutos y se mantuvo, finalmente a esa temperatura final.
4. Se preparó una dilución 1:200 de la mezcla “Dilution Solution (DS)/Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE)” (solución de dilución del conjugado + conjugado) y se agregaron 170µl de la dilución a cada muestra después de 10 minutos a 56°C en el termociclador mientras se mantiene a 56°C.
5. Al terminar de cargar el conjugado (máximo 5 minutos mientras se mantiene en el termociclador a 56°C) la placa se movió al equipo Luminex®.

Como tercer y último paso, cada placa de 96 pozos se leyó en el equipo Luminex® para ser analizadas con el software de la compañía. Para cada muestra se consideró un número de eventos mínimo de 60 para poder ser analizada y el límite de detección de la intensidad media de fluorescencia para cada muestra se especificó en cada corrida de acuerdo al número de lote de las microesferas. Lo anterior se realizó con la finalidad de eliminar el ruido de fondo. La interpretación para la genotipificación fue realizada por el software basándose en el total de sondas positivas y negativas para cada muestra.

3.2.2 Análisis estadístico para la búsqueda de asociaciones con el gen DRB1

Las frecuencias genotípicas observadas en los controles fueron probadas y se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg. Las frecuencias de HLA DRB1 se compararon entre los

grupos utilizando la prueba exacta de Fisher con tablas de contingencia de 2×2 o, en su caso, mediante la prueba de χ^2 con corrección de Mantel-Haenszel. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos. La corrección de Bonferroni para múltiples pruebas no fue necesaria. Se calculó la razón de momios (OR de Haldane) dentro del intervalo de confianza (IC) del 95%.

3.3 Integración de la cohorte de mujeres con evidencia de LIEBG por citología.

Para cumplir con este objetivo se desarrolló un estudio de cohorte el cual se llevó a cabo en el Instituto Nacional de Cancerología (INCan) en México, D.F., tanto en el laboratorio de virus y cáncer a cargo del Dr. Alejandro García Carrancá, como en el Depto. de Colposcopia a cargo del Dr. Gilberto Solorza Luna/Dr. Aarón González Enciso. Este estudio consistió en evaluar pacientes referidas con diagnóstico de LIEBG al Servicio de Colposcopia del INCan que contaran con los siguientes criterios de inclusión:

1. Diagnóstico citológico y/o colposcópico de LIEBG confirmado o no por biopsia.
2. Mayores 18 años.
3. Que aceptaran participar y firmaran la carta de consentimiento informado.

Aquellas pacientes embarazadas y/o con diagnóstico de diabetes mellitus (DM), VIH/SIDA o cualquier otra condición inmunosupresora, fueron excluidas del estudio.

A todas las pacientes incluidas se les explicó ampliamente en qué consistía el proyecto de investigación y se les pidió que leyeran y firmaran el Consentimiento Informado. Posteriormente, se les solicitó que llenaran una encuesta para recabar datos socio-demográficos y co-factores de riesgo epidemiológicos para CaCU. Además, se les realizó

examen cito-colposcópico y se les tomaron dos muestras de cérvix con la brocha cervical (Colpo Tre^{MR}) para detección del VPH, así como para la extracción de RNA.

Se les citó para entrega de resultados a los diez días de su revisión y se les realizó un seguimiento para control del diagnóstico de envío cada 6 meses, el cuál consistió en toma de Pap y colposcopia. El seguimiento fue desde su ingreso hasta su última cita en el año 2012.

3.3.1 Perfil de citocinas expresadas en cérvix y su asociación con el desenlace de LIEBG.

Se realizó la extracción de RNA a partir de cepillados cervicales de la cohorte de mujeres con LIEBG. Se cuantificó el nivel de expresión relativa de los RNAm de un total de ocho citocinas: IL-1, IL-6, IL-10, IFN- γ , IL-8, IL-12, IL-15 y TGF- β por transcripción reversa (TR) acoplada a PCR en tiempo real, empleando sondas Taqman y el equipo Abi7500 (Applied Biosystems). Las citocinas cuyos niveles de sus RNAm fueron estudiados se muestran en el siguiente cuadro, donde se describen brevemente algunas de sus características más destacadas:

Cuadro XXX. Citocinas estudiadas y sus funciones principales.

	Interleucina	Función principal
1	IL-1	Producida en <u>macrófagos y células epiteliales</u> , es un inductor de fase aguda.
2	IL-6	Conocido como el factor con <u>actividad anti-viral</u> secretado por <u>fibroblastos</u> , participa en reacciones de fase aguda.
3	IL-10	Producida por <u>células Th2</u> y linfocitos CD8 entre otros, <u>inhibe</u> macrófagos y <u>células dendríticas activadas</u> .
4	IFN-gamma	Producido por linfocitos CD4, <u>CD8</u> y NK. Actividad <u>antiviral</u> y antiparasitaria e inhibición de la proliferación de células transformadas.
5	IL-8	Producida por <u>macrófagos</u> , monocitos, fibroblastos y <u>células epiteliales</u> . Función importante como <u>quimioatrayente de neutrófilos y linfocitos CD8</u> .
6	IL-12	Conocido como factor de <u>maduración de linfocitos CD8</u> (citotóxicos). Sintetizado por células B, macrófagos y <u>dendríticas</u> .
7	IL-15	Producida por <u>células epiteliales</u> . Mediadora del <u>crecimiento</u> de células T, es especial de <u>CD8+</u> de memoria y proliferación de linfocitos NK.
8	TGF-beta	Producida por <u>células epiteliales</u> , linfocitos y macrófagos. En células epiteliales, promueve la <u>expresión de inhibidores del ciclo celular</u> . Durante el desarrollo tumoral puede perderse su expresión y proporcionar una ventaja adaptativa a las células tumorales.

3.3.1.1 Extracción y concentración de RNA a partir de células de cérvix.

A partir de una de las muestras de cérvix obtenidas con la brocha cervical Colpo Tre^{MR} y almacenadas en líquido de preservación (PreservCyt®), se realizó la extracción de RNA utilizando el estuche comercial Quick-RNATM MiniPrep (Zymo Research Corp, USA). El método fue diseñado para el aislamiento fácil, confiable y rápido de hasta 25 microgramos de RNA total de células o muestras de tejido. El procedimiento combina la extracción del RNA en un solo paso con un buffer de extracción/lavado con la tecnología de columnas y garantiza el aislamiento de RNA de alta calidad en poco tiempo. Inicialmente, se resuspendió el botón celular de la muestra de cérvix con el buffer de lisis/lavado incluido en el kit, se mezcló y se pasó por una columna; después de lavar dos veces la columna se procedió a eluir el RNA en 60 µl de buffer de elución.

Los 60µl eluidos de RNA fueron concentrados utilizando el estuche comercial “RNA Clean & ConcentratorTM-5” (Zymo Research Corp. Irvine, CA) siguiendo el protocolo descrito para la eliminación de RNAs de pequeño tamaño, bajo las recomendaciones del fabricante.

De forma breve, el buffer de unión para RNA se mezcló 1:1 con etanol al 100% y se utilizó en una proporción 2:1 con el volumen total de RNA (60µl). La mezcla se colocó sobre la columna y se centrifugó por un minuto para que el RNA se uniera a la matriz de la columna. El RNA adherido a la columna se lavó dos veces el RNA y posteriormente se eluyó haciendo pasar por la columna en 10µl de agua libre de nucleasas (Promega) y centrifugando ésta durante un minuto. El RNA eluido se cuantificó y fue almacenado a -70°C para utilizarlo posteriormente como molde para la RT a fin de generar DNA complementario (cDNA), tal y como se describe a continuación.

3.3.1.2 Retrotranscripción del RNA

La retrotranscripción (RT) del RNA extraído a partir de células de cérvix se llevó a cabo utilizando el estuche comercial “Omniscript® Reverse Transcription Kit” (Qiagen) para la obtención del cDNA. Las condiciones de la reacción se describen en el siguiente cuadro:

Reactivo	Volumen
Master mix Buffer para RT 10X	2µl
Mezcla de dNTP (5mM de cada uno)	2µl
Primer Oligo dT (10µM)	2µl
Inhibidor de RNasa (10 U/µl)	1µl
Enzima Transcriptasa Reversa (5U/µl)	1µl
Templado de RNA (~ 0.2µg/µl)	5µl
Agua libre de nucleasas	Para un volumen total de 20µl

La reacción se incubó a 37°C por 60 minutos y el cDNA resultante fue cuantificado determinó en un espectrofotómetro de micro-volumen (Thermo Scientific NanoDrop 2000) y almacenado a -20°C.

3.3.1.3 Cuantificación relativa de RNAs de citocinas por RT-PCR en tiempo real utilizando el método $\Delta\Delta CT$.

Para la cuantificación relativa de los RNAs de correspondientes de las citocinas se utilizó como templado el cDNA almacenado de las muestras de pacientes. Los niveles de expresión se determinaron por PCR en tiempo real. Los oligos y las sondas utilizadas para la cuantificación de cada uno de los RNAs de cada una de las citocinas se adquirieron de la compañía Life Technologies y se utilizaron siguiendo las recomendaciones para ensayos de PCR en tiempo real específicos para expresión génica usando sondas TaqMan (Fluorocromo reportero: FAM). En el cuadro siguiente se muestran los números de parte y características generales de las sondas correspondientes para cada una de las regiones génicas sedes del ensayo de RT-PCR cuantitativa:

Citocina	Número de parte	Cromosoma	Exones	Tamaño del amplicón
IL-1B	Hs01555410_m1	2	3 – 4	91 pb
IFN- γ	Hs00989291_m1	12	3 – 4	73 pb
IL-15	Hs01003716_m1	4	9 – 10	117 pb
IL-12A	Hs01073447_m1	3	1 – 2	52 pb
IL-6	Hs00985639_m1	7	2 – 3	66 pb
IL-8	Hs00174103_m1	4	1 – 2	101 pb
IL-10	Hs00961622_m1	1	4 – 5	74 pb
TGF β	Hs00998133_m1	19	6 – 7	57 pb

Se utilizaron dos formatos de placa de 96 pozos diferentes, uno para los RNAs de las citocinas que se corrieron con el RNAm del gen de referencia (el de la GAPDH) como control endógeno (Placa tipo 1) y otra para los RNAs de las citocinas que se corrieron con el RNAm del gen de referencia (el de la HPRT1) como control endógeno (Placa tipo 2). Las condiciones tanto de la reacción de PCR como para el programa del termociclador, fueron las mismas para ambos tipos de placas y se muestran a continuación. El

termociclador de tiempo real utilizado fue el instrumento 7500 Fast Real-Time PCR System.

Placas tipo 1 y 2	1 X
2X Master Mix (Applied biosystems)	10 µl
Primers y sonda para citocina/endógeno	1 µl
cDNA	1 µl
H ₂ O libre de nucleasas	8 µl
Volumen total	20 µl

Termociclado para PCRq

50°C por 20 segundos 95°C por 10 minutos 40 ciclos: 95°C por 15 segundos 60°C por 1 minuto
--

3.3.1.4 Análisis estadístico para la cuantificación relativa de los RNAs de las citocinas y la comparación de niveles de su expresión entre los grupos de estudio.

Los resultados obtenidos a partir de las curvas de amplificación por tiempo real, incluyendo el ciclo umbral (C_T , por sus siglas en inglés) para cada mensajero y su control endógeno, fueron analizados utilizando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak KJ 2001). Se tomó la media del triplicado del valor de C_T de cada curva de amplificación de los RNAs y del RNA del gen endógeno correspondiente y se calculó con ellos el ΔCT ($C_{T_{citocina}} - C_{T_{endógeno}}$).

3.4 Implementación de un sistema de detección de linfocitos CD8+ específicas contra el VPH.

Para cumplir con este objetivo se realizó la producción *in vitro* de tetrámeros de HLA de clase I en base a la restricción de las células CD8+. Para este modelo se utilizó el alelo

HLA-A2 debido a la alta frecuencia en la población mundial (~80%) y el VPH tipo 16 debido a que es el responsable de aproximadamente el 50% de los casos de CaCU en el mundo. El modelo se montó gracias a la colaboración realizada con el Dr. Alejandro Madrigal Fernández del Instituto Anthony Nolan en Londres, Inglaterra. Cabe mencionar que toda la parte metodológica que se señalará a continuación se realizó en el laboratorio de Inmunogenética del Instituto previamente mencionado con el apoyo del programa de becas mixtas del CONACYT. Para la producción de los tetrámeros se utilizó el método definido originalmente por Garboczi y Wiley en 1992 y por Altman y cols en 1998 y se describe en a continuación. Todos los reactivos utilizados para los amortiguadores que se describen a continuación, fueron adquiridos de Sigma o BDH (Inglaterra).

3.4.1 Producción in vitro de las cadenas pesada y ligera del HLA-A2

La cadena pesada de HLA, así como la cadena $\beta 2$ -microglobulina ($\beta 2M$) utilizadas en este proyecto habían sido producidas previamente en los laboratorios del Instituto de Investigación Anthony Nolan en Londres, Inglaterra. De forma breve, el cDNA que codifica la porción extracelular de la cadena pesada del HLA clase I se clonó en el vector pET-3d (Novagen, Cambridge Bioscience, Inglaterra), cuyo el mapa se encuentra en el apéndice. Dicha porción extracelular fue modificada con la adición de un sitio de biotilación en la porción carboxi-terminal para permitir, al agregar biotina, la unión de estreptavidina acoplada al marcador fluorescente alofococianina (APC). Se utilizó la enzima ligasa de biotina BirA para biotilar los monómeros de HLA. Posterior a la biotilización de los monómeros, se agregó la estreptavidina, que al contar con cuatro sitios de unión a biotina, permite la formación de los tetrámeros (Figura X). La construcción pET-3d para expresar la cadena pesada fue utilizada para transformar bacterias BL21pLysS (Novagen, Inglaterra).

El cassette expresor de la cadena β 2M fue donado gentilmente por el Dr. Don Wiley en el vector PHN1 ya transformado en la cepa XA90 de *Escherichia coli*.

3.4.1.1 Inducción de la expresión de proteínas

A partir de stocks de glicerol congelados se sembraron bacterias de la cepa BL21pLysS de *Escherichia coli* en placas de agar (20gr de agar LB para 500ml de agua destilada) con ampicilina (100 μ g/ml) y se incubaron a 37°C toda la noche. Al día siguiente se tomó una colonia para inocular 10 ml medio LB (10gr de triptona, 5gr de levadura y 10gr de NaCl por litro de agua destilada) también con ampicilina (100 μ g/ml) y se incubó a 37°C en agitación toda la noche.

Posteriormente, los 10ml de cultivo, se utilizaron para inocular un litro de medio LB con ampicilina y se incubó a 37°C en agitación (150 rpm) hasta que el cultivo creciera en forma exponencial alcanzando una densidad óptica de 0.4 a 550nm. Antes de la inducción, se tomó un ml del cultivo y se almacenó para correrlo en SDS-PAGE en etapas posteriores (muestra pre-inducción). La expresión de proteínas fue inducida agregando isopropil β -D-thiogalactopiranosido (IPTG, Alexis Corporation Ltd, Inglaterra) a una concentración final de 1mg/ml. Después de 4 horas de incubación se tomó un ml de muestra del cultivo, se almacenó (muestra post-inducción) y las bacterias fueron cosechadas y transferidas a una botella de un litro para ser centrifugadas a máxima velocidad por 30 minutos a 4°C (Centrífuga Beckman JB-6). El sobrenadante fue inactivado con solución clorada y se descartó. La pastilla de bacterias fue resuspendida en 10ml de buffer de lisis [50mM de Tris-Cl pH8.0, EDTA 1mM, 25% (w/v) de sacarosa, esterilizado por filtración] y se transfirió a un tubo Falcon de 50ml (BD Pharmingen, Inglaterra). A partir de este punto,

todos los pasos siguientes fueron llevados a cabo en hielo. El tubo fue centrifugado por 10 minutos a 4,000g a 4°C (centrífuga Beckman JB-6) para desechar el remanente del sobrenadante. En este paso, la pastilla fue utilizada para la purificación de los cuerpos de inclusión, pero de ser necesario se puede resuspender en 20ml de buffer salino de fosfatos (PBS, Bio Wittaker, Estados Unidos), congelar de forma rápida con nitrógeno líquido y almacenar a -70°C para utilizarla posteriormente.

3.4.1.2 Purificación de los cuerpos de inclusión

Las proteínas sintetizadas recombinantes como cuerpos de inclusión por las cepas de *E. coli*, como la BL21pLysS, necesitan ser purificadas del resto de proteínas bacterianas. Para esto, se resuspendió la pastilla obtenida en el paso previo en 30ml de buffer de resuspensión (50mM de Tris a pH 8.0, 100mM de NaCl, 1mM de EDTA y 1mM de DTT) con ayuda de agitación durante 20 minutos. Posteriormente se transfirió a un vaso de precipitado de polipropileno de 100ml con una barra magnética de media pulgada, se colocó sobre una placa de agitación a velocidad moderada y se agregó gota a gota lo siguiente: 600µl de lisozima a 50mg/ml (concentración final=1mg/ml), 150µl de MgCl₂ 1M (concentración final=5mM), 500µl de Dnasa I a 2mg/ml en 50% de glicerol con 75mM de NaCl, 300µl de Tritón-X 100 (concentración final=1%) y 300µl de DTT 1M (concentración final=10mM).

Para asegurar que las bacterias se lisaran eficientemente y que el DNA se eliminara por completo, la suspensión fue sonicada (cinco pulsos de 15 segundos en intervalos de 45 segundos) en hielo. La suspensión fue centrifugada a 15,000 rpm por 30 minutos a 4°C para empastillar los cuerpos de inclusión. La pastilla se lavó cinco veces con 50ml de solución de lavado con Tritón (Tris 50mM a pH8, NaCl 100mM, EDTA 1mM, 0.5% de Tritón-X

100 y DTT 1mM) y se centrifugó a 15,000 rpm por 30 minutos a 4°C. Al final se realizó un último lavado con 50ml de buffer de resuspensión y se centrifugó nuevamente a 4°C por 30 minutos. Los cuerpos de inclusión se solubilizaron toda la noche a 4°C en 30ml de buffer de urea (para la cadena pesada: Urea 8M, MES 50mM a pH 6.5, EDTA 0.1mM y DTT 0.1mM; para b2M: Urea 8M, NaH₂PO₄ 0.1M, Tris-HCl 0.01M a pH 8.0, EDTA 0.1mM y DTT 0.1mM). Antes de agregar el DTT, el buffer se desionizó agregando 20gr de resina para intercambio de iones (Duolite, Chemical Process Company. Redwood City, California) y la resina se removió por filtración. La concentración de las proteínas se determinó en un espectrofotómetro de micro-volumen (Thermo Scientific NanoDrop 2000). El coeficiente de extinción para la cuantificación tanto de la cadena pesada como de la β2M, se calculó con el método Gill y von Hippel (Gill SC 1989) basándose en las secuencias primarias de las proteínas reportadas en la página de internet del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (NCBI).

3.4.1.3 Electroforesis en gel de sodio dodecil sulfato-poliacrilamida (SDS-PAGE)

La electroforesis SDS-PAGE permite separar proteínas desnaturalizadas y cargadas negativamente de acuerdo a su peso molecular. Después de la reducción de los puentes disulfuro calentando la muestra en presencia de β-mercaptoetanol, el SDS (detergente aniónico) cubre las cadenas polipeptídicas de la proteína para enmascarar la carga eléctrica. De esta manera, la carga de la proteína a un pH neutral estará relacionada con la masa molecular de la misma. Las proteínas son entonces separadas por electroforesis en gel en donde el grado de separación es proporcional a la masa molecular de la proteína.

Los geles fueron preparados en el aparato BioRad Mini protein gel electroforesis. El gel separador de poliacrilamida fue preparado al 15% y sobre él se preparó el gel concentrador al 5%, también de poliacrilamida. Los reactivos y volúmenes utilizados para el gel se muestran en el cuadro XX. Para crear una superficie uniforme se agregó isopropanol sobre el gel separador hasta que éste se gelificó, después de lo cual el isopropanol se retiró y se vertió el gel concentrador insertando un peine para crear los pocillos.

Cuadro XX. Componentes del gel para electroforesis SDS-PAGE

Reactivo	Gel separador	Gel concentrador
Solución A [92g/l Tris, 2% (w/v) SDS]	5ml	2.5ml
30% Acrilamida-0.8% Bisacrilamida (Protogel, National Diagnostics)	10ml	1.65ml
Agua destilada	5ml	5.45ml
N-N-N'-N' tetrametiletilen diamina (TEMED, BDH)	20µl	20µl
5% (w/v) Persulfato de amonio (APS, BDH)	220µl	380µl

Para correr las muestras en el gel, éstas se centrifugaron por un minuto a 13,000 rpm. Posteriormente, la pastilla fue resuspendida en buffer de corrida 4X [2.5ml de solución A, 0.1% (w/v) de SDS, 1% (w/v) de sacarosa y 0.1% (w/v) de azul de bromofenol] con 4% (w/v) de β-mercaptoetanol. Para reducir los puentes disulfuro de las proteínas, las muestras se incubaron a 100°C por 5 minutos en presencia de β-mercaptoetanol. Posteriormente, se cargaron las muestras en cada pozo del gel concentrador junto con el marcador de peso molecular (BioRad, Inglaterra). Los geles se corrieron a 150 volts por 30-40 minutos en buffer de corrida [250mM de glicina, 25mM de Tris, 0.1% (w/v) de SDS]. Una vez que el colorante azul corrió hasta el fondo del gel, los geles fueron removidos de los vidrios y se tiñeron con solución azul de Coomassie al 1% (azul de Coomassie 1%, metanol:ácido glacial:agua 4:1:6) por 15 minutos y fueron desteñidos con solución desteñidora de azul de

Coomassie (metanol:ácido glacial:agua 4:1:6) por 4-8 horas. Finalmente, los geles fueron secados al vacío en un secador de geles (Gel Dryer, modelo 583, BioRad, Inglaterra) por 2 horas.

3.4.2 Selección de la proteína de VPH-16 y el péptido de interés.

Para la selección del péptido a utilizar para la construcción de los monómeros de HLA previamente descritos, se hizo una revisión de la literatura desde 1997 al 2010. Varios autores han estudiado el papel de la proteína E2 tratando además de determinar los péptidos inmunogénicos e inmunodominantes de esta proteína. La información se resume en las publicaciones de cinco autores quienes contribuyen con información que fue de utilidad para la presente investigación.

Autores	Año	AA	Péptidos	Metodología	Mayor afinidad	Mayor respuesta
Konya et al.,	1997	9 mer	1- 69-77 2- 93-101 3- 138-147	Diseño en base a motivos de unión. Ensayos de afinidad de unión.	El 1 Por lo que solo hicieron pruebas con este.	
De Jong et al.,	2004	Pools/30mer c/ péptido	1- 31-60 y 61-75 2- 301-330 y 331-345	Estímulo de células con los pools de péptidos para medir proliferación.	No definida	El pool 1 y 2. No es posible saber cuál de los dos péptidos es el responsable. Además, péptidos muy grandes.
Qian et al.,	2006	10 mer	1- 7-16 2- 69-77 3- 138-147 4- 93-101	Programas(BIMAS, SYFPEITH). Ensayos de afinidad de unión.	El 2 y 3	El número 3. Probados en modelo animal.
Van Poelgeest et al.,	2006	Pools/30mer c/péptido	1- 241-315 2- 286-365	ELISPOT	No definida en el estudio.	El pool 2. No se sabe cuál de los cuatro es el responsable. Péptidos muy grandes.
Dillon et al.,	2007	9 mer	1- 69-77 2- 93-101 3- 138-147	ELISPOT tanto para E2 completa como para los péptidos.	1 y 3	3

En base a la información descrita en el cuadro anterior, se decidió mandar sintetizar el péptido inmunogénico E2₆₉₋₇₇ (ALQAIELQL) del VPH-16 (AltaBioscience, Birmingham, Inglaterra).

3.4.3 Reacción de plegamiento para HLA clase I (formación de los monómeros de HLA-A2/péptido de VPH-16).

El plegamiento de la porción extracelular de HLA-A*0201 con el péptido de interés y la cadena β -2-microglobulina se llevó a cabo utilizando un protocolo de dilución. Se preparó buffer de plegamiento combinando los siguientes componentes (todo con grado para uso en HPLC) para un volumen final de 200ml: 100mM de Tris-HCl pH8.0, 400mM de L-arginina-HCl, 2mM de EDTA, 5mM de glutatión reducido, 0.5mM de glutatión oxidado y 0.5mM de fenilmetilsulfóxido (PMSF). El buffer se enfrió a 4°C antes de agregar el glutatión reducido y el glutatión oxidado. Posteriormente, se agregó el glutatión reducido y el glutatión oxidado, el pH se ajustó a 8.3 y se agregaron la β -2 microglobulina, la cadena pesada de HLA y el péptido, en ese orden, a las siguientes concentraciones:

Cuadro XX. Componentes de la reacción de plegamiento

Proteína solubilizada	Concentración final
β -2 microglobulina	20 μ g/ml
HLA-A*0201	25 μ g/ml
Péptido en DMSO	32 μ g/ml

Las proteínas solubilizadas que se muestran en el cuadro **NUMERO** fueron agregadas por separado gota a gota con una jeringa de 3cc con aguja de 26g lo más cercano al agitador magnético que fuera posible. La mezcla de la reacción de plegamiento se incubó por 48 horas en agitación (70 rpm) a 4°C. El producto de la reacción se transfirió a un tubo Falcon de 50ml estéril y se centrifugó a 2,000 g por 15 minutos a 4°C para eliminar los agregados.

El sobrenadante se transfirió a una célula con agitación de Amicon para ultrafiltración (modelo 8400, Amicon) y se concentró hasta 20 ml a través de una membrana de microfiltración para pesos moleculares hasta de 10,000 daltones (YM 10, 10,000 MWCO, Millipore) utilizando presión con gas (CO₂). Los 20 ml obtenidos se transfirieron a un concentrador Vivaspin de 20 ml (10,000 MWCO, Vivascience) y fueron concentrados a 1 ml por centrifugación en dicho concentrador (2,000 g a 4°C).

Los monómeros concentrados se almacenaron a 4°C y se purificaron por cromatografía FPLC (por sus siglas en inglés, fast protein liquid chromatography) en las siguientes 12 a 24 horas.

3.4.4 Biotinilación y purificación de los monómeros HLA-A2/péptido

3.4.4.1 Biotinilación de los monómeros de HLA.

La biotinilación del sustrato peptídico presente en la región C-terminal de las moléculas de HLA clase I, se llevó a cabo utilizando la enzima Bir A de *E. coli*. Esta enzima cataliza la formación de biotín-5'-adenilato a partir de adenosina tri-fosfato (ATP) y biotina y transfiere la biotina a un residuo particular de lisina en la proteína. Esto es lo que permite la biotinilación de los monómeros de HLA, la cual se llevó a cabo después de concentrar hasta 200 µl la fracción purificada de HLA plegada correctamente (en buffer de Tris 20mM, NaCl 5mM, pH 8.0). La reacción consistió en ocho partes de la solución de monómeros de HLA, una parte de buffer Biomix A (0.5 M de Bicina, pH 8.3), una parte de buffer Biomix B (100 mM ATP, 100 mM MgOAc, 400 mM de biotina) así como 10 µl de enzima Bir A (1mg/ml). Se agregó a la reacción un cocktail inhibidor de proteasas (Complete protease inhibitor cocktail, Boehringer Mannheim). La reacción se incubó toda la noche a

temperatura ambiente y el producto biotinilado fue purificado por FPLC para eliminar el exceso de biotina.

3.4.4.2 Purificación de los monómeros y los monómeros biotinilados de HLA por FPLC.

La purificación de los monómeros (posterior a la reacción de plegamiento) y de los monómeros biotinilados (posterior a la reacción de biotinilación) se llevó a cabo por cromatografía líquida de rendimiento rápido (FPLC) en el equipo Akta 10 (Akta FPLC, Amersham Pharmacia Biotech), utilizando una columna XK 16/70 con 100 ml de una matriz de Superdex 75 (Dextran unido covalentemente a agarosa, Pharmacia).

El sistema de FPLC permite la separación de proteínas en base a su peso molecular. La columna utilizada fue equilibrada en buffer previo a su utilización y la muestra fue cargada a un presión máxima de 0.5 MPa y se corrió a 1 ml/min. La elución de las proteínas fue programada utilizando un sistema operativo IBM 2 (OS 2) y el software Unicorn 3.10. Al finalizar la elución se midió la absorbancia con luz UV para determinar la fracción en la que las proteínas fueron eluidas, recolectando fracciones de 1 ml. Previo a la biotinilación, los monómeros fueron purificados en un buffer con bajo contenido en sales (20 mM Tris y 5 mM NaCl, pH 8.0) para realizar un intercambio con el buffer de purificación. Lo anterior se realizó debido a que la enzima Bir A se inhibe bajo concentraciones altas de sales. Para la purificación de los monómeros biotinilados, el intercambio de buffer no fue necesario, por lo que se realizó en un buffer con niveles fisiológicos de sales (20 mM Tris y 150 mM NaCl, pH 8.0) y fue el buffer en el que se almacenaron finalmente los monómeros una vez biotinilados.

3.4.5 Tetramerización de los monómeros HLA-A2/péptido

La formación de los tetrámeros es necesaria debido a la afinidad relativamente baja que tiene el receptor de células T. La estructura tetramérica se formó por la adición de estreptavidina, la cual cuenta con cuatro sitios de unión a biotina. Para permitir la visualización por citometría de flujo de las células T positivas para el tetrámero, la estreptavidina estaba conjugada a un marcador fluorescente. Los monómeros fueron biotinilados por la enzima Bir A, la cual, como se mencionó previamente, añadió biotina a la porción C-terminal de los monómeros. Posteriormente, la estreptavidina fue añadida y formó puentes no covalentes con la biotina, induciendo así la formación de los tetrámeros.

La tetramerización de los monómeros de HLA biotinilados se llevó a cabo utilizando estreptavidina acoplada al fluorocromo aloficocianina (APC) (Biogenesis, Inglaterra). Los monómeros biotinilados se colocaron en agitación a 4°C (10 rpm) y se agregó la estreptavidina-APC en una proporción molar 4:1, respectivamente. Fue añadida en alícuotas 1/10 de forma lenta en intervalos de 1hr. Finalmente, los tetrámeros fueron almacenados en 0.1% de azida de sodio en alícuotas adecuadas a -70°C (una vez descongelada una alícuota, debe almacenarse a 4°C, debiéndose tomar nota de que su vida media una vez descongelada es de aproximadamente 4-8 semanas).

3.4.6 Funcionalidad de los tetrámeros de HLA-A2/péptido

Para probar la funcionalidad de los tetrámeros producidos *in vitro*, se escogieron aquellas mujeres con resultado de LIEBG positivas para VPH-16 pertenecientes a la cohorte descrita con anterioridad de mujeres con evidencia de LIEBG por citología, así como un número igual de mujeres con resultado de LIEBG positivas para un tipo de VPH que no fuera el -16. Se les tomó una muestra de 5ml de sangre venosa periférica (SVP) para aislar el DNA y utilizarlo para genotipificación de HLA clase I (restringido por linfocitos CD8+). A las

mujeres que contaban con el alelo HLA-A2 de clase I se les tomó una muestra adicional de 30ml de SVP y se aislaron células mononucleares (CMN) a partir de dicha muestra utilizando un gradiente de densidad con Ficoll-hypaque (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). Las CMN se utilizaron para probar la funcionalidad de los tetrámeros de HLA para la detección de células CD8+ VPH-específicas por citometría de flujo con el equipo BD FACSCalibur Flow Cytometer (BD Biosciences, NJ, USA).

3.4.6.1 Genotipificación de HLA clase I

Se aisló el DNA a partir de la muestra de sangre venosa periférica anticoagulada con EDTA empleando la técnica TSNTE-Sevag. Para la precipitación se utilizó etanol al 100% (Merck). Para la tipificación de alelos DQB1 del HLA clase II, fueron empleados como substrato 600 - 800 ng/ μ l de DNA genómico de sangre periférica para la técnica de PCR con iniciadores específicos del estuche comercial de Innogenetics para amplificar el exón 2 (261 pb) y el exón 3 (250 pb) pertenecientes al locus del MHC clase II DQB1 en los grupos de estudio.

En una primera parte se realizó la amplificación del locus correspondiente bajo las siguientes condiciones de PCR (en un volumen total de 20 μ l en el termociclador Perkin-Elmer con tapa caliente): etapa inicial de desnaturalización a 95°C por 5 min., segunda de treinta y cinco ciclos integrada cada uno por tratamientos consecutivos de desnaturalización a 95°C por 20 seg, alineamiento a 58°C por 20 seg y polimerización a 72°C por 20 seg. También aquí se incluyó una etapa de extensión a 72°C por 10 min. Los productos amplificados se corrieron en un gel de agarosa al 2% para ser visualizados por tinción con bromuro de etidio en un fotodocumentador.

Posteriormente se realizó la técnica de Dot Blot Reverso para la tipificación de los alelos a partir de los productos amplificados previamente. La técnica es una variación del Dot Blot tradicional, en la cual las sondas a emplear para la tipificación se encuentran inmovilizadas sobre una tira de nitrocelulosa. Después de realizar la PCR genérica de locus usando iniciadores marcados con biotina, se procedió a desnaturalizar las cadenas del DNA del producto amplificado empleando una solución de hidróxido de sodio. El DNA desnaturalizado se incubó por 30 minutos a 56°C en presencia de la solución de hibridación con las sondas que se encuentran en la membrana y después de tres lavados con solución astringente y solución de lavado se procedió a la detección de la hibridación mediante un método colorimétrico, incubando a temperatura ambiente por 30 minutos en presencia de solución de conjugado que contiene estreptavidina y fosfatasa alcalina. Se realizaron dos lavados después de incubar con el conjugado y se procedió a agregar la solución del sustrato de la enzima, incubando a temperatura ambiente durante 30 minutos para el desarrollo de color en aquellos casos donde se llevó a cabo la hibridación. Finalmente, se lavaron las membranas y se interpretaron los resultados considerando la línea como positiva en aquellos casos en donde aparecía una banda de color púrpura claro o marrón. Las líneas positivas se leyeron con una plantilla y el número de cada sonda positiva se introdujo en el software de análisis (Liras por Lipa) que provee la compañía.

3.4.6.1 Detección de linfocitos CD8+ específicos por citometría de flujo.

Se tomó una muestra de SVP de aquellas pacientes portadoras del alelo A2 de HLA clase I que presentaron LIEBG por VPH tipo -16. A partir de la muestra de sangre se aislaron los linfocitos a través de un gradiente de ficoll-hypaque (Sigma).

IV. RESULTADOS

4.1 Integración de la cohorte

Por un lado, se estudiaron un total de 215 mujeres con un promedio de edad de 34.16 años (18 a 68 años), las cuales fueron referidas al Instituto Nacional de Cancerología (INCan) (México, D.F.) entre Noviembre de 2008 y Octubre de 2009 por alteraciones premalignas citológicas y/o colposcópicas predominantemente de bajo grado. A todas las pacientes se les invitó a participar en el estudio y firmaron una hoja de consentimiento informado. Posteriormente, se les realizó una encuesta para factores epidemiológicos y socio-demográficos. Finalmente, a las pacientes se les realizó una toma de muestra para Papanicolaou y dos muestras de cepillado cervical para detección y tipificación de VPH, así como un estudio colposcópico; además, en los casos indicados, toma de biopsia para estudio histopatológico. A aquellas pacientes que resultaron positivas para la infección por VPH-16 se les realizó una toma de sangre venosa para probar la funcionalidad de los tetrámeros descritos en el capítulo de la metodología (Figura 1).

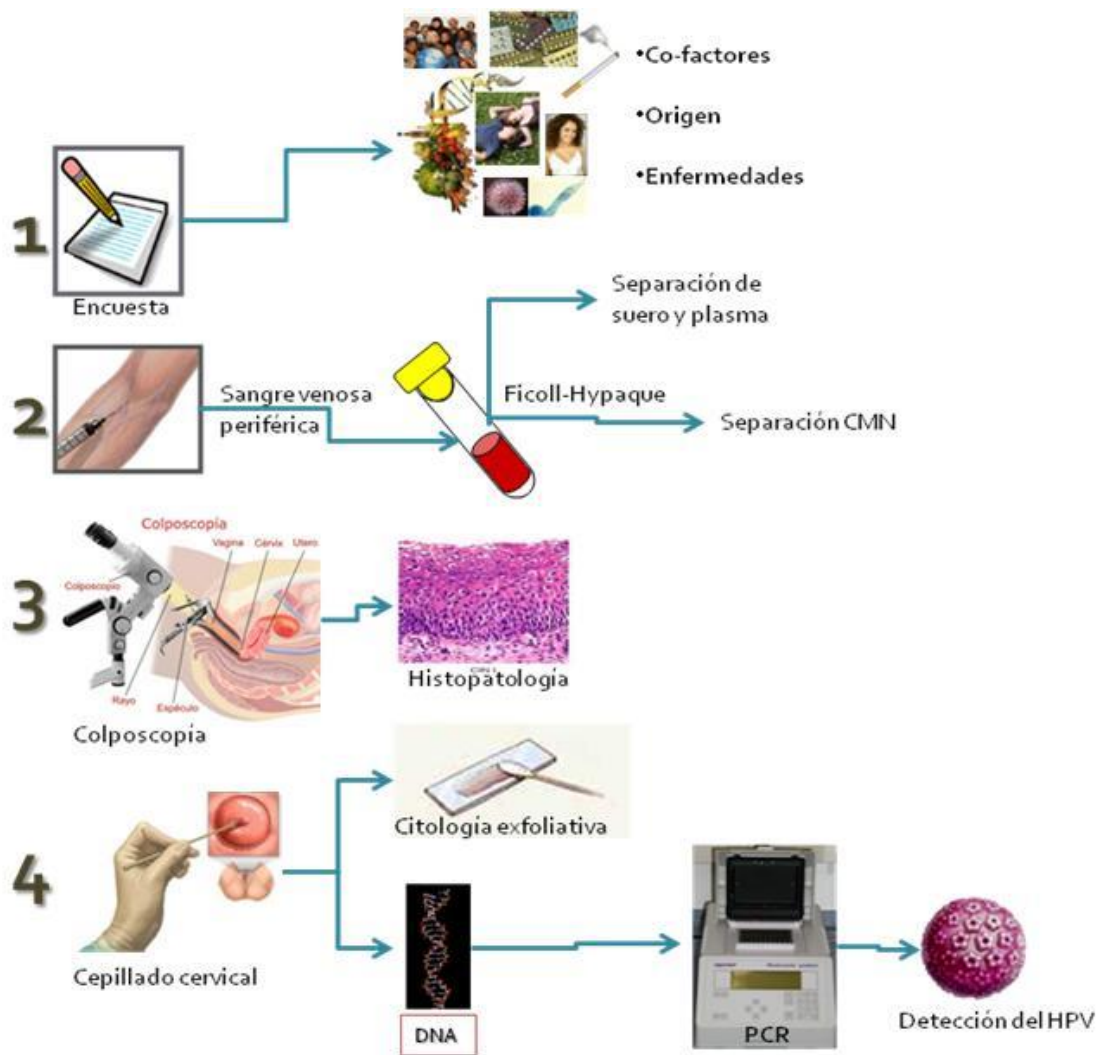


Figura 1. Procedimientos realizados. A cada paciente se le realizó inicialmente el paso 1, 3 y 4. A las pacientes que finalmente fueron incluidas por diagnóstico confirmatorio de LIEBG + VPH-16, se les realizó el paso 2.

Por otro lado, se reunió un grupo de mujeres de las cuales ya se contaba con los resultados para el gen DQB1 del HLA clase II. Las pacientes incluidas fueron positivas para algún tipo de VPH al inicio de la investigación (año 2002). A partir del DNA de sangre de las pacientes se realizó la genotipificación para un segundo gen de HLA clase II (DRB1). Se estudiaron un total de 95 pacientes en una segunda visita para el estudio del gen DQB1 (año 2005), con una edad promedio de 42.2 años ($DE \pm 11.8$ años); con las muestras de esas

mismas pacientes se realizó la genotipificación del segundo gen mencionado para buscar asociaciones con persistencia de la infección por VPH.

4.2 Detección y genotipificación del VPH

Del total de pacientes incluidas para formar la cohorte en base a la presencia de LIEBGs, 88 fueron positivas (42.3%) para la infección por alguno de los 37 virus que se pueden detectar con la metodología utilizada. La frecuencia de infecciones múltiples fue de 17% encontrando, en la mayoría de los casos, infecciones con dos tipos virales. Los cinco tipos virales encontrados con mayor frecuencia en la población general de estudio fueron: VPH-16, VPH-39, VPH-31, VPH-59 y VPH-45 (Figura 3).

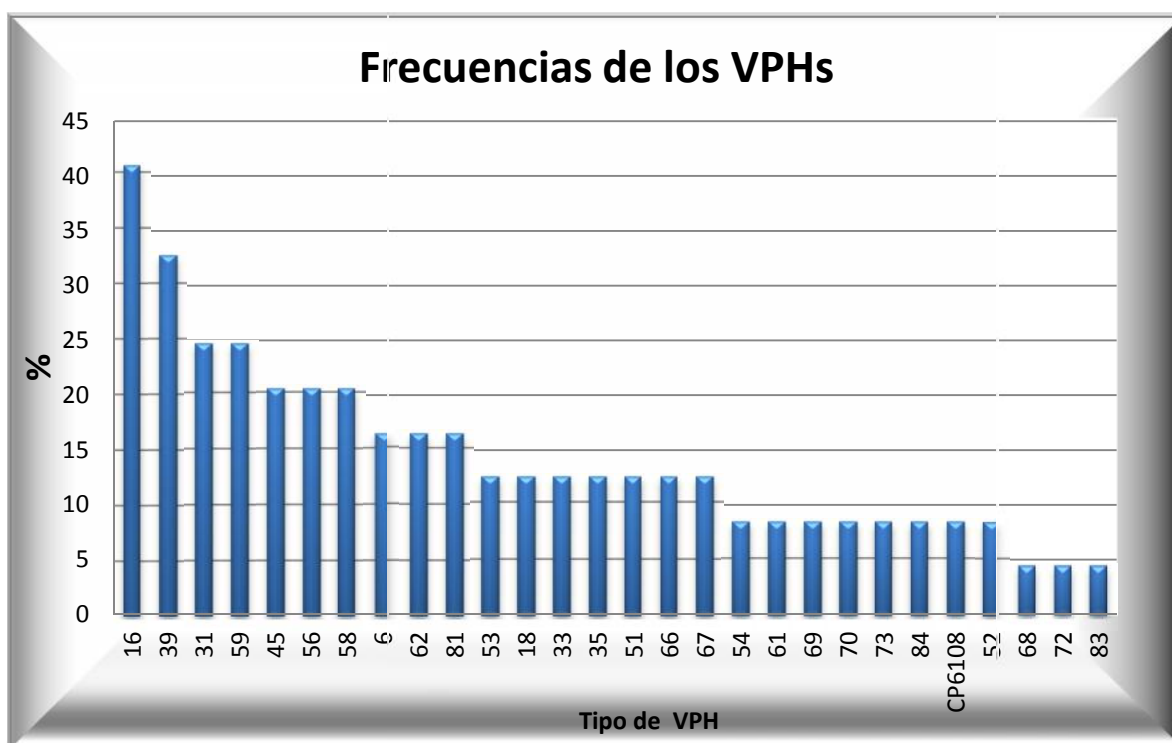


Figura 3. Distribución de frecuencias de los VPH. Se puede observar que dentro de los cinco tipos virales más frecuentes se encuentra a la cabeza el VPH-16. El VPH-31 se encuentra en tercer lugar, siendo uno de los VPH de alto riesgo más comúnmente encontrados. El VPH-18 se encuentra ocupando la posición número 12.

Como se puede observar (Figura 3), la mayoría de los VPHs encontrados en la población de estudio son virus de alto riesgo oncogénico (VPH-AR), siendo que en 55 de los casos de infección por VPH se trató de al menos un virus de AR (aproximadamente 60%).

Del total de pacientes con LIEBG confirmada 51 presentaron infección por alguno de los VPHs estudiados (65.4%). Siendo más comúnmente encontrado el VPH-31 seguido por el VPH-16 (Figura 4).

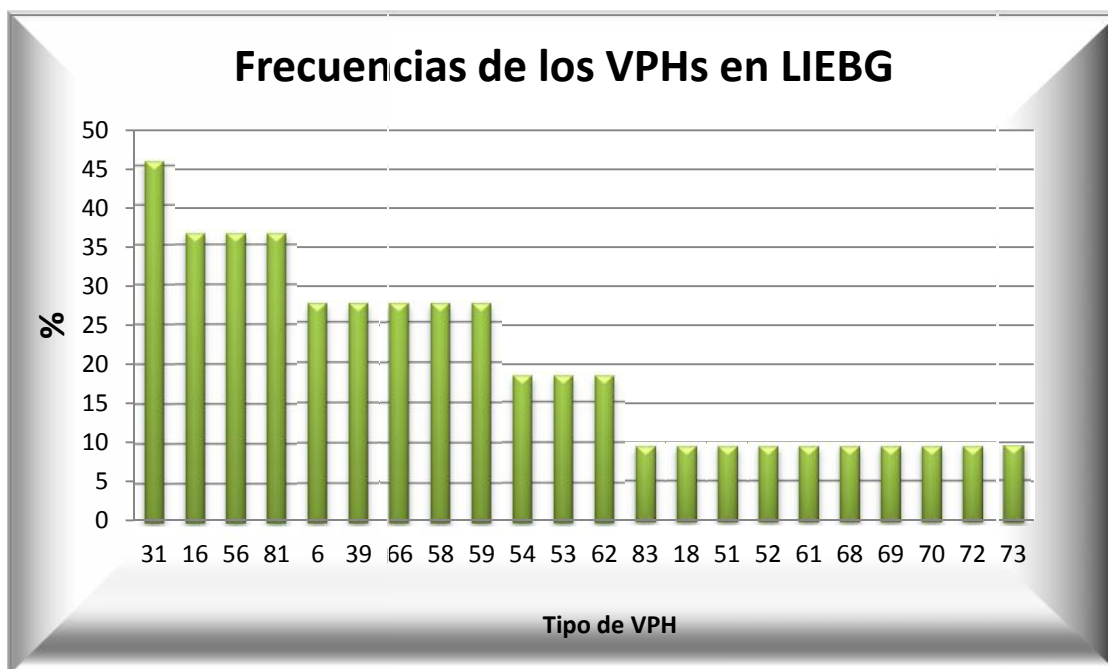


Figura 4. Distribución de frecuencias de los VPHs en LIEBGs. Se puede observar que dentro de los cinco tipos virales más frecuentes se encuentran el VPH-31, -16, -56, -81 y -6 diferente a lo observado en la población general de estudio. El VPH-31 se encuentra en primer lugar, el -16 en segundo lugar y el -18 ocupando el décimocuarto lugar.

Al revisar el tipo viral en el grupo de seguimiento para estudiar asociación entre persistencia viral y alelos del HLA, se encontraron 34 muestras positivas, de las cuales el 22.1% (n = 21) fueron infección persistente (infección con el mismo tipo viral comparando con los resultados al inicio de la investigación) mientras que en el resto se evidenciaron re-

infecciones. En ocho de las 34 mujeres positivas para VPH (23.5%), se detectaron infecciones múltiples (más de un tipo viral). El análisis de los resultados obtenidos también arrojó que el 52.9% de las infecciones fueron causadas por al menos un tipo viral de alto riesgo, 23.5% por virus de bajo riesgo y 23.6% por alguno de riesgo oncogénico indeterminado. De entre los tipos virales detectados, los tres más prevalentes fueron el VPH-83 en primer lugar (38%), enseguida el VPH-62 (28.5%) y el VPH-18 (19%) en tercero. El VPH-16 ocupó el cuarto lugar de frecuencia (14.2%) y los tipos virales 67, 63, 69, 56 y 71 solo se encontraron como parte de co-infecciones.

4.3 Genotipificación de alelos HLA clase II – gen DRB1.

El total de mujeres estudiadas (n = 95), pertenecientes al grupo de seguimiento, se dividió en tres grupos de acuerdo al seguimiento de la infección por VPH (resultado de la tipificación viral en el 2005, tesis de maestría Bernal-Silva S, Facultad de Medicina de la UANL): 1) VPH-persistente (n = 21); 2) VPH-eliminador (n = 61); y 3) VPH-reinfección (n = 13). Además, para el análisis se incluyeron dos grupos de control externo. Por un lado, se contó con un grupo de control externo de mujeres sanas con Papanicolaou negativo (n = 88), cuyas frecuencias génicas para los alelos del gen en estudio fueron publicadas recientemente (26). Por otro lado, se tomó otro grupo de control externo de mujeres con CaCU (n = 104), cuyas frecuencias génicas para los alelos del gen DRB1 fueron también publicadas recientemente (25). Las frecuencias génicas de los grupos de estudio, así como de los grupos de control externos, se encuentran descritas en el cuadro 1. Las pacientes en el grupo de VPH-persistente fueron consideradas como casos para comparar dicho grupo contra los otros dos grupos de estudio (VPH-eliminador y VPH-reinfección), así como contra los dos grupos de control externo mencionados previamente. Dado que la persistencia viral se ha asociado directamente con el desarrollo de lesiones premalignas y

cáncer, y con la finalidad de buscar posibles asociaciones entre alelos del gen HLA-DRB1 y susceptibilidad o resistencia a persistencia viral y CaCU, se decidió comparar los tres grupos de estudio descritos previamente contra los grupos de control externos mencionados con anterioridad (25 y 26).

Cuadro 1. Frecuencia génica (f.g.) para el alelo DRB1 en los grupos de estudio.

DRB1	Individuos sanos ²⁶		VPH-Persistente		VPH -eliminado		VPH -reinfección		CaCU ²⁵	
	n	f.g.	n	f.g.	n	f.g.	n	f.g.	n	f.g.
	N = 176		N = 42		N = 122		N = 26		N = 208	
04	49	0.278	11	0.262	32	0.262	1	0.038	63	0.3029
08	29	0.164	5	0.119	22	0.180	4	0.154	41	0.1971
07	7	0.039	2	0.048	13	0.107	4	0.154	11	0.0529
14	16	0.090	6	0.143	10	0.082	3	0.115	11	0.0529
11	11	0.062	4	0.095	9	0.074	2	0.077	8	0.0385
15	13	0.073	1	0.024	5	0.041	1	0.038	12	0.0577
03	9	0.051	1	0.024	8	0.066	3	0.115	13	0.0625
01	15	0.085	4	0.095	7	0.057	3	0.115	12	0.0577
13	13	0.073	3	0.071	9	0.074	1	0.038	16	0.0769
16	9	0.051	2	0.048	5	0.041	1	0.038	13	0.0625
09	2	0.011	1	0.024	1	0.008	0	0.000	0	0.0000
12	2	0.011	0	0.000	1	0.008	1	0.038	1	0.0048
10	1	0.005	2	0.048	0	0.000	2	0.077	7	0.0336

Comparación entre los alelos de los diferentes grupos del grupo de estudio.

Al comparar las frecuencias génicas (f. g.) para los alelos del gen DRB1 encontrados en el grupo VPH-persistente contra las f. g. de los encontrados en el grupo de VPH-reinfección,

se observó un aumento para la del alelo DRB1*04 en el grupo de reinfección ($p = 0.02$, OR = 8.8, IC95% = 1.0-196; Cuadro 2). No hubo diferencia significativa al realizar comparaciones con y entre otros grupos. Por otro lado, al contrastar el grupo VPH-eliminador contra el grupo de control externo de mujeres sanas (Ref#), se encontró un aumento en la f. g. del alelo DRB1*07 en el grupo eliminador ($p = 0.04$, OR = 2.88, IC95% = 1.03-8.3; Cuadro 2). Así mismo, encontramos un incremento en el valor de OR para el mismo alelo al comparar un grupo formado por los tres grupos de estudio (VPH-persistente + VPH-eliminador + VPH-reinfección) contra el grupo de control externo de mujeres sanas ($p = 0.04$, OR = 2.7, IC 95% = 1.03-7.2; Tabla 2). Al comparar las f. g. de los alelos encontrados al agrupar a los grupos VPH-persistente con el VPH-reinfección contra los alelos del grupo de control externo de mujeres sanas (26) se encontró un OR elevado para el alelo DRB1*10 ($p = 0.03$, OR 10.9, IC95% = 1.12-261; Tabla 2). Parece relevante mencionar que el alelo DRB1*14 mostró un OR = 0.34 (IC95% = 0.11-1.09) al comparar los dos grupos mencionados previamente (VPH-persistente + VPH-reinfección vs mujeres sanas) (Cuadro 2). Se intentó realizar comparaciones entre los grupos formando haplotipos y genotipos con la finalidad de revisar si los alelos del gen DQB1 que formaban los haplotipos y genotipos entre grupos marcaba alguna diferencia significativa; sin embargo, el número de pacientes fue muy bajo para permitir dichas comparaciones.

Cuadro 2. Razón de momios (OR) encontrados al comparar los grupos de estudio.

Grupo 1	Grupo 2	Alelo DRB1	Valor de p, OR e IC 95%
VPH -persistente	VPH -reinfectado	14	0.02, OR 8.8 (1.0 -196)
VPH -eliminador	Individuos sanos	07	0.04, OR 2.8 (1.03 -8.3)
VPH -persistente +reinfección +eliminador	Individuos sanos	07	0.04, OR 2.7 (1.03 -7.2)

VPH -persistente + reinfectado	Individuos sanos	10	0.03, OR 10.9 (1.12 -261)
VPH -persistente	CaCU	14	0.07, OR 0.34 (0.11 -1.09) ^{n.s.}

^{n.s.} No significativo

4.4 Perfil de citocinas presente en cérvix en mujeres con LIEBG

De las 215 mujeres que se reunieron para formar la cohorte en base a la presencia de LIEB, 11 presentaban una lesión avanzada (7%) y 52 se perdieron durante el seguimiento (24.2%). De las 152 pacientes restantes se pudieron establecer cuatro grupos de comparación: **1)** Grupo de mujeres en las que **nunca se confirmó** una lesión de bajo grado con un 46.1% (n = 70), **2)** Pacientes con **persistencia** de la lesión de bajo grado con un 13.1% (n = 20), **3)** Pacientes que **eliminaron** la lesión de bajo grado representando un 31.5% (n = 48) y **4)** Pacientes en las que la lesión de bajo grado **avanzó** con un 9.3% (n = 14). En estos grupos se realizaron los estudios de perfil de citocinas para buscar una asociación entre el perfil encontrado y la historia natural de la enfermedad. Para esto, se realizó la extracción del RNA utilizando un estuche comercial de la compañía Qiagen en las 152 muestras de las pacientes incluidas en la cohorte, se cuantificó y se verificó su calidad. Del total de muestras, 21 de ellas no contaron con suficiente material para realizar la retrotranscripción y los experimentos posteriores, por lo que fueron eliminadas. En el resto de las muestras, (n = 123) se realizó la retrotranscripción a cDNA correspondiente (DyNAmo). Los cDNAs fueron cuantificados y se utilizaron para determinar el perfil de citocinas por tiempo real utilizando sondas TaqMan y el equipo 7500 de Applied Biosystem.

El gen endógeno elegido para los estudios fue GAPDH para las citocinas IL-8, TGFβ1, IL-15, IL-10, IL-6 e IL-1β y el endógeno HPRT1 para las citocinas IFN-γ e IL-12. Lo anterior se determinó en base al valor de la pendiente de la recta en la regresión lineal para las curvas de validación de las citocinas en estudio y de los dos genes endógenos previamente mencionados. En la Figura 7 se muestran dos gráficas representativas de las comparaciones para una citocina (TGFβ1).

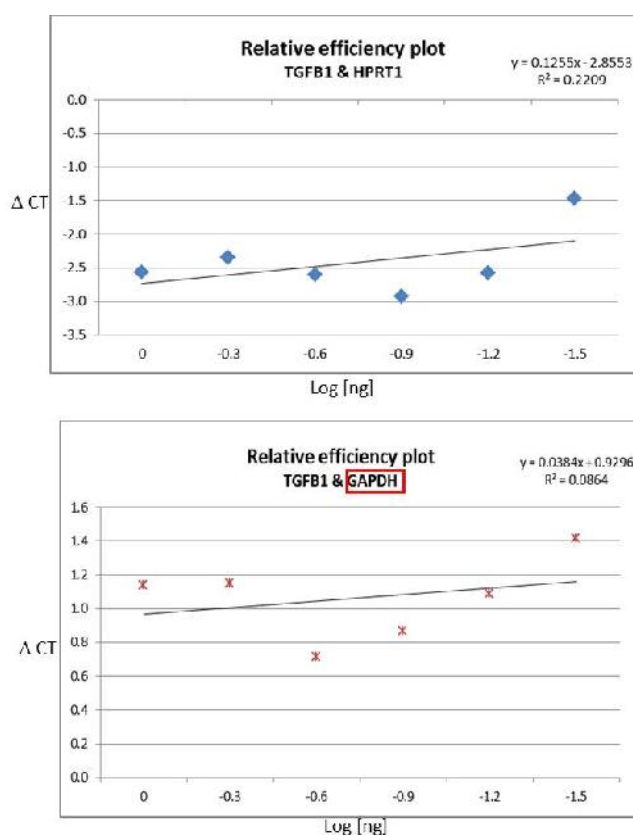


Figura 7. Regresión lineal para las curvas de validación para la citocina TGFβ1. Se puede observar los valores para la pendiente obtenidos para cada uno de los endógenos utilizados, en donde el valor recomendado fue obtenido solamente para el gen GAPDH (pendiente = 0.0384), siendo que el valor absoluto de la pendiente es más cercano a cero.

La cuantificación de las citocinas se realizó utilizando el método de cuantificación relativa $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak KJ 2001) tomando como grupo calibrador a las mujeres del grupo en donde

nunca se confirmó la presencia de lesión (grupo de mujeres “sanas” o control) (Figura XXX). Para la IL-8 se encontró que el nivel de expresión en el grupo de mujeres con persistencia y progresión de la lesión es mayor que en las mujeres “sanas” aumentando una vez la expresión por encima del grupo control. Para TGF β , el nivel de expresión aumentó casi de igual manera en los tres grupos al comparar con las mujeres sanas. En el caso de la IL-15 e IL-12 se pudo observar un incremento de más de ocho y casi siete veces en la expresión comparando con el grupo sano, respectivamente para cada interleucina. Siendo que para el grupo de mujeres con progresión de la LIEBG, la expresión para ambas citocinas fue similar al nivel de expresión encontrado en el grupo sano o un poco por debajo en el caso de la IL-12. Al estudiar la expresión para IL-1 β se encontró un aumento de casi el doble para el grupo con progresión de la lesión en relación al grupo de mujeres sanas y de 1.2 veces más en el caso de pacientes con persistencia de la lesión. La expresión de esta citocina (IL-1 β) en el grupo que eliminó la lesión es similar al nivel de expresión encontrado en el grupo sano. Una de las dos citocinas que mostraron valores disminuidos en la expresión al comparar con el grupo sano fue la IL-6 (0.9 veces por debajo para el grupo de progresión y 0.8 veces por debajo para el grupo con persistencia de la lesión).

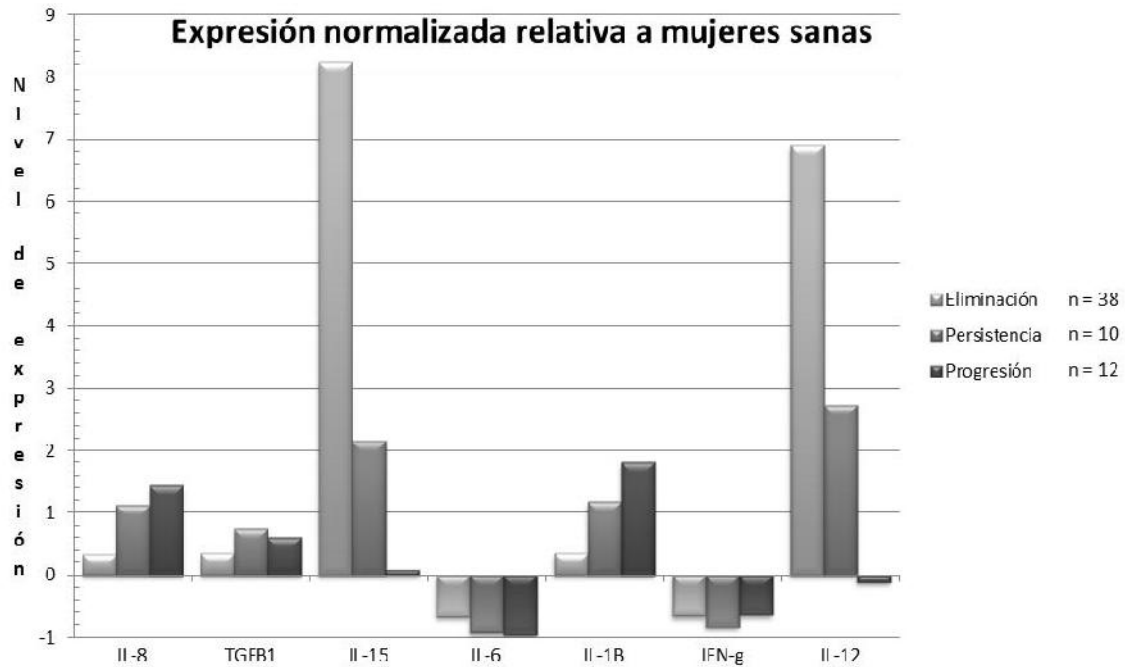


Figura XX. Niveles de expresión relativos. Se puede observar el incremento/disminución en la expresión de las diferentes citocinas estudiadas en relación al grupo de mujeres sanas. Los niveles de expresión se muestran cómo veces por arriba o por debajo de la expresión encontrada para el grupo sano.

Los niveles de expresión encontrados para la IL-10 también se encontraron disminuidos al comparar con el grupo de mujeres sanas. Los niveles fueron similares para los tres grupos de estudio (Figura XXXX).

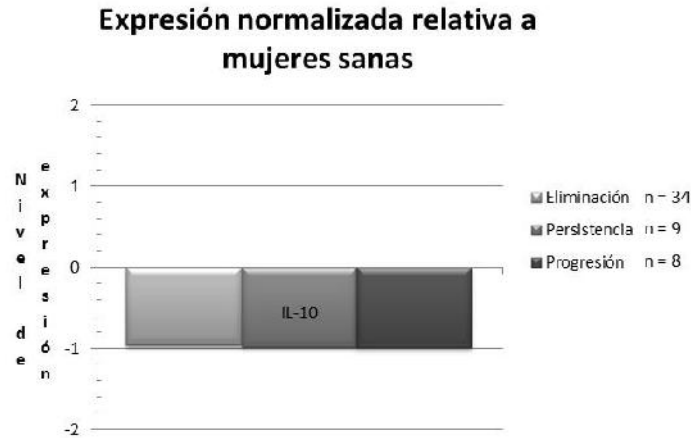


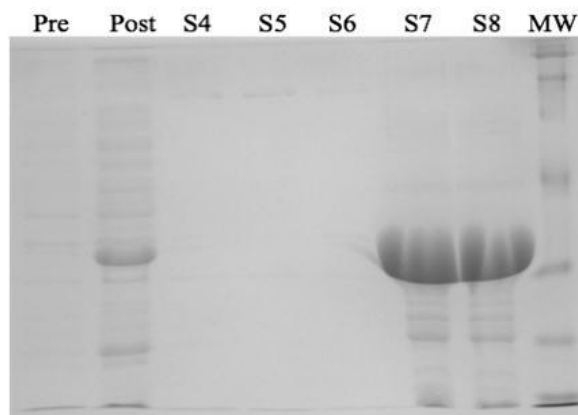
Figura XX. Niveles de expresión relativos para la citocina IL-10. Se observa que los niveles de expresión encontrados se encuentran disminuidos de igual forma para los tres grupos.

4.5 Producción de Tetrámeros de HLA clase I para la detección de linfocitos CD8+

Se realizó una estancia en el Laboratorio de Inmunología del Instituto Anthony Nolan en Londres, Inglaterra bajo la supervisión del Dr. Alejandro Madrigal. Durante dicha estancia se estandarizaron los protocolos para la producción de los complejos de tetrámeros de HLA clase I/péptido así como para los modelos celulares para expansión de células específicas contra los péptidos seleccionados y las tinciones extra e intracelulares de dichas células tanto para marcadores de superficie como para citocinas intracelulares como el interferón gamma y la interleucina 4 (Th1 y Th2, respectivamente).

Inicialmente se produjeron, en bacterias, las cadenas pesada y ligera del HLA-A2 induciendo su producción con IPTG. Los cuerpos de inclusión fueron purificados y las proteínas solubilizadas en buffer de urea. Las muestras que se almacenaron durante el proceso (pre-inducción, post-inducción, lavados y resuspensión en buffer de urea) se

corrieron en un gel SDS-PAGE. Lo anterior se realizó, por un lado, para la cadena ligera β -2-microglobulina y por otro lado, para la cadena pesada A2 de HLA (Figura XXX).



Pre = Muestra pre-inducción
Post = Muestra post-inducción
S4-S6 = Sobrenadantes de los lavados
S7 = Sobrenadante después del buffer de urea
S8 = Sobrenadante postcentrifugación del S7
MW = Marcador de peso molecular (Bio-Rad)

Figura XX. Electroforesis en SDS-PAGE. De forma representativa, se muestra la imagen de la electroforesis para la purificación de la cadena pesada de HLA-A2 (A2). Se puede observar que la proteína fue obtenida en el sobrenadante obtenido después de purificar los cuerpos de inclusión y solubilizar en el medio las proteínas con buffer de urea.

Posteriormente, se formaron los monómeros de HLA utilizando las dos proteínas purificadas así como el péptido de interés (ALQ del VPH-16, ver metodología). Los monómeros fueron biotinilados y purificados por HPLC (Figura XXXX).

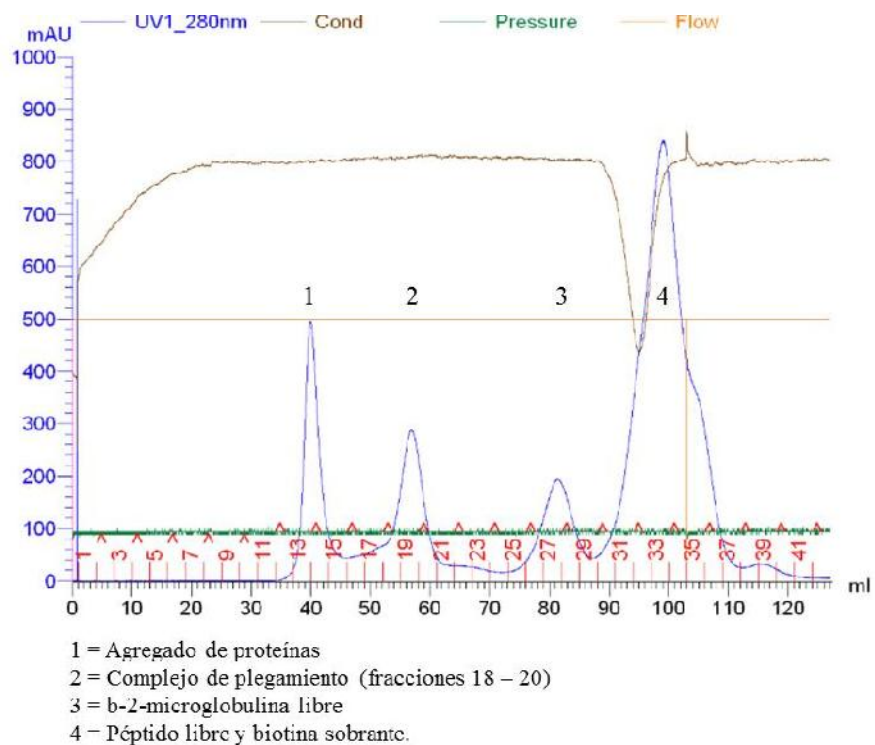


Figura XX. Purificación de monómeros por HPLC. Después de la biotilación de los monómeros formados durante la reacción de plegamiento, estos se llevaron a purificación utilizando la técnica de HPLC. Se puede observar que los monómeros biotilados se recuperaron en las fracciones 18-20.

Los tetrámeros formados gracias a la estreptavidina acoplada al fluorocromo APC (complejo HLA-A2/Péptido ALQ) fueron purificados por HPLC y se probaron en muestras de pacientes como se menciona a continuación.

Siendo el VPH tipo -16 el más comúnmente encontrado en lesiones premalignas así como en cáncer, se decidió producir los tetrámeros para detectar linfocitos CD8+ específicos contra este tipo viral. Se sabe que la presentación antigénica realizada por las moléculas de HLA es muy específica y se realiza a través de péptidos del agente infeccioso. En el caso del VPH-16 se han caracterizado péptidos inmunogénicos que son presentados por moléculas de HLA clase I que son muy comunes en la población general, como es el HLA-

A2. En base a lo anterior, se partió de las pacientes que integraron la cohorte de LIEBG que resultaron positivas para el VPH-16. A estas pacientes se les realizó la genotipificación del HLA clase I para escoger un par de pacientes que fueran portadoras del alelo HLA-A2 para probar el tetrámero producido (Cuadro 1).

Cuadro 1. Alelos del HLA clase I.

ID	HLA-A	HLA-B
18	*1101	*0702
79	*0201	*0801
157	*0206	*3501
127	*0201	*3501
1	*6801	*3501
88	*3301	*1402
9	*0201	*3501
50	*2402	*1510
38	*3101	*3901
22	*6801	*3901
3	*0201	*1801
13	*0201	*3901
179	*0201	*3901
96	*0201	*1501
80	*0201	*0702
48	*0206	*3517
29	*0201	*3901
6	*2402	*3517
181	*0201	*3901
99	*0206	*3901
87	*3001	*5701

Finalmente, los tetrámeros producidos fueron probados por citometría de flujo en células de pacientes para comprobar su función. Se pudo observar entre 1 y 3% de células CD8+ tetrámero/péptido específicas (Figura XXX)

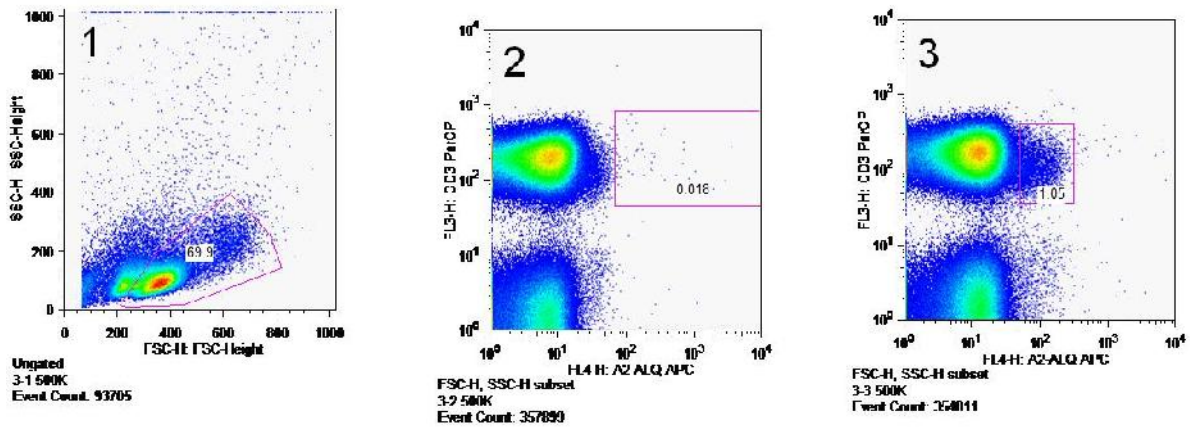


Figura XXX. Células positivas para la tinción con tetrámero/péptido-VPH. Se realizó la tinción extracelular para marcaje de células doble positivas CD8+/Tetrámero. El complejo Tetrámero/péptido utilizado fue con el péptido ALQ de la proteína E2 del VPH-16. Los tetrámeros se marcaron con APC para ser utilizados en citometría de flujo. Se pueden observar las células de cultivo (1) a partir de las cuales se realizaron los análisis. En el cuadro 2 se muestran las células teñidas para CD8 con tetrámero sin estímulo previo con el péptido de interés y en el cuadro 3 las células doble positivas después de 1 semana de incubación con el péptido de interés (ALQ) y co-estímulo

V. DISCUSIÓN

El presente proyecto se desarrolló con la finalidad de comprender, de una mejor manera, el papel de la inmunología celular en la persistencia de la infección por VPH y en el desarrollo de lesiones premalignas del cérvix. Para esto, se planteó estudiar, por un lado características de la respuesta inmune involucradas en la presentación antigénica como lo son las moléculas del HLA y por otro lado la propia respuesta celular y el papel del ambiente inmunológico local en la evolución de LIEBG.

5.1 Alelos de HLA y su asociación con persistencia de la infección viral.

Para el estudio de los alelos de HLA y su posible asociación con la persistencia viral se estudiaron alelos de clase II dada la importancia en la presentación antigénica a linfocitos cooperadores encargados de la producción de citocinas. Se trabajó con un grupo de mujeres que participaron en un estudio transversal llevado a cabo en el Depto. de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la UANL en Monterrey, N.L en el 2002. A partir de dicho estudio se incluyeron mujeres mayores de edad que habían sido positivas para la infección por VPH y se localizaron, nuevamente en el 2005, un total de 200 mujeres para darles seguimiento y realizar, en aquél entonces, la genotipificación del gen DQB1 del CPH (resultados de la tesis de maestría Bernal-Silva S, Facultad de Medicina de la UANL). Para el presente estudio se incluyeron un total de 95 pacientes y se dividieron en tres grupos de acuerdo al estado de la infección viral, denominados: 1) VPH-persistente (n = 21); 2) VPH-eliminador (n = 61); y 3) VPH-reinfección (n = 13). Se realizó la genotipificación de alelos del gen DRB1 del CPH clase II para la búsqueda de asociación con riesgo de persistencia. Así mismo se incluyeron un par de grupos de control externo provenientes de fuentes de la literatura, uno consistía en mujeres mexicanas aparentemente sanas (Alaez-

Verson C 2011) y el otro de mujeres mexicanas con CaCU (Hernández-Hernández DM 2009). Este trabajo menciona por primera vez el papel del HLA-DRB1*14 como alelo de protección contra CaCU en mujeres mexicanas. En un estudio similar, en pacientes mexicanas con CaCU, reportado por Hernández y cols. se encontró el alelo DRB1*15 de riesgo para CaCU y ninguno de protección, sin embargo el diseño es distinto al planteado en el presente trabajo, pues aquí se enfocó a la infección por el VPH y su persistencia en una cohorte a seguimiento por 5 años, mientras que el de Hernández y cols. se enfocó a casos confirmados de CaCU, independiente a la infección por VPH (Hernández-Hernández DM 2009). A nivel internacional, dos estudios en particular consideramos relevantes por tratarse de asociaciones entre alelos del HLA y persistencia de la infección. Maciag y cols. en el 2002 realizaron un estudio de cohorte para buscar asociaciones entre alelos del HLA clase II y la historia natural de las infecciones por VPH en mujeres de la ciudad de Sao Paulo, Brasil. Al igual que en el presente estudio, encontraron disminución de la frecuencia génica del alelo DRB1*03 en mujeres con infección persistente al comparar con mujeres negativas para la infección (Maciag PC 2000). Algunos de los alelos reportados en el trabajo de Maciag y cols. son el DRB1*16 y DRB1*3. Este último, en el caso de las mexicanas mostró tendencia a estar incrementado pero sin significado estadístico; lo cual puede explicarse a diferencias en la estructura de la genética de población de ambos grupos étnicos. Esto se encontró también para el alelo DRB1*08, el cual, al presentarse en la población Brasileña, parece ser un factor de riesgo, contrario a lo encontrado en el presente estudio, donde asociado al DRB1*04, brinda al portador una ventaja para la eficiente eliminación viral. Otro hallazgo de importancia fue la asociación, aunque no significativa, del alelo DRB1*14 con la persistencia de la infección por VPH, que al realizar el análisis comparando con el grupo de mujeres con CaCU se encontró que este mismo alelo se asocia

con baja probabilidad de progresión de la enfermedad hacia etapas tardías. El mismo hallazgo se reporta por Maciag y cols. en cuanto a este alelo y su asociación con persistencia, sin embargo ellos no realizaron análisis para conocer su papel en el desarrollo de CaCU (Maciag PC 2000).

En un estudio más reciente, reportado por Mahmud y cols. en el 2007, en donde se estudiaron únicamente ciertos alelos de clase II y el alelo B7 de clase I, se encontró asociación entre el alelo DRB1*13 y el riesgo acumulado para adquirir infección por VPH (Mahmud SM 2007). Sin embargo, esto no se pudo demostrar en nuestro estudio, probablemente porque el diseño del presente estudio no estuvo hecho para este fin, sino para estudiar el papel de los alelos de HLA en la persistencia por la infección viral.

5.2 Papel del ambiente de citocinas en la evolución de lesiones de bajo grado.

Para estudiar el ambiente de citocinas presente en cérvix y su relación con la progresión de LIEBGs, se planteó integrar una cohorte de pacientes con dicho tipo de lesiones (ver metodología). Se estudiaron 152 pacientes y se lograron establecer cuatro grupos de comparación en base al seguimiento: **1)** Grupo de mujeres en las que **nunca se confirmó** una lesión de bajo grado con un 46.1% (n = 70), **2)** Pacientes con **persistencia** de la lesión de bajo grado con un 13.1% (n = 20), **3)** Pacientes que **eliminaron** la lesión de bajo grado representando un 31.5% (n = 48) y **4)** Pacientes en las que la lesión de bajo grado **avanzó** con un 9.3% (n = 14). En estos grupos se realizaron los estudios de perfil de citocinas para buscar una asociación entre el perfil encontrado y la historia natural de la enfermedad.

Existen estudios que han demostrado que el epitelio cervical secreta activamente una variedad de citocinas como IL-1 α , IL-1 β , IL-1RA, IL-6, IL-8, GM-CSF y TNF- α . Debido a la capacidad de estas células epiteliales para secretar citocinas se consideran células

capaces de participar directamente en la respuesta inmune del cérvix contra infecciones (Woodworth CD and Simpson S. Comparative lymphokine secretion by cultured normal human cervical keratinocytes, papillomavirus-immortalized, and carcinoma cell lines. American Journal of Pathology 1993;142(5):1544-1555). Así mismo, se ha encontrado disminución significativa en la expresión de citocinas como IL- β , IL-8, IL-6, GM-CSF y TNF- α , lo que pudiera estar favoreciendo un ambiente para la persistencia viral. Sin embargo, en el presente estudio se encontró que citocinas como IL-8 e IL-1 β aumentan en LIEBG persistentes y mucho más en lesiones que evolucionan a un mayor grado. Una de las funciones de la IL-8 es el servir como quimioattractante de linfocitos citotóxicos, por lo que su aumento podría relacionarse con un mayor reclutamiento de estos linfocitos en un intento del sistema inmune por acabar con las células que se encuentran en un proceso de transformación maligna. Existen estudios que muestran un mayor infiltrado de linfocitos citotóxicos en casos de CaCU (Monnier-Benoit S, Mauny F, Riethmuller D, Guerrini JS, Capilna M, Félix S, Seilles E, Mougín C, Prétet JL. Immunohistochemical analysis of CD4+ and CD8+ T-cell subsets in high risk human papillomavirus-associated pre-malignant and malignant lesions of the uterine cervix. Gynecologic Oncology 2006;102:22-31), lo que respaldaría los resultados encontrados en el presente trabajo en cuanto al aumento de la IL-8 en lesiones con evolución hacia malignidad.

Bais y cols en el 2007 reportaron que existe un aumento significativo en la liberación de citocinas en mujeres positivas para VPHs de alto riesgo sin presencia de lesiones. La liberación de IFN- γ y de IL-12 en pacientes con CaCU fue de la misma magnitud que en pacientes con VPHs de alto riesgo sin manifestaciones clínicas. El ratio Th1/Th2 disminuyó de NIC II a NIC III y aumentó de NIC III a CaCU invasor, todo en sangre de

dichas pacientes (Bais AG, Beckmann I, Ewing PC, Eijkemans MJC, Meijer CJLM, Snijders PJF, Helmerhorst TJM. Cytokine release in HR-HPV(+) women without and with cervical dysplasia (CIN II and CIN III) or carcinoma, compared with HR-HPV(-) controls. *Mediators Inflamm* 2007;2007:24147. doi: 10.1155/2007/24147) En el presente trabajo se encontraron niveles aumentados en la expresión de IL-12 en el grupo de mujeres que eliminaron la lesión, lo que pudiera representar un mecanismo de defensa del organismo al activar una respuesta Th1. Dichos niveles fueron disminuyendo en el grupo de mujeres con lesiones persistentes hasta disminuir, en el grupo de mujeres con progresión de las lesiones, un poco por debajo a lo encontrado en mujeres sanas. Lo mismo para IL-15.

En el presente trabajo se encontró una disminución de algunas citocinas Th2 en pacientes con progresión de las lesiones, como sería el caso de IL-6 e IL-8. Este dato no concuerda con algunos reportes de la literatura como el caso particular de Bais y cols en donde reportan un aumento de los ratios de respuesta Th1 a respuesta Th2 al comparar CaCU con NIC III así como un cambio progresivo hacia una respuesta de tipo Th2 al comparar NIC II contra NIC III. Sin embargo, debemos tomar en cuenta la actividad anti-viral de la citocina IL-6, por lo que en este caso más que tomarse en cuenta por su función dentro de la respuesta Th2, podría explicarse su disminución en mujeres con progresión de la lesión con un aumento en la carga viral y/o en la expresión de proteínas oncogénicas del virus.

Sin embargo, existen otros estudios con los que si coinciden los resultados encontrados en el presente trabajo. Este es el caso de lo reportado por Xu y cols en el 2008, donde al estudiar mujeres con enfermedad condilomatosa encontraron una disminución significativa del ratio Th1/Th2 en mujeres con la enfermedad y con recurrencia de la misma al comparar con mujeres sanas ($p < 0.01$). También es el caso de Paghini y cols, quienes en el 2012

compararon los perfiles de citocinas por ELISA y RT-PCR en biopsias de pacientes con lesiones de bajo y alto grado, CaCU y controles. Encontraron los niveles más elevados de expresión de citocinas Th1 en el grupo de mujeres con LIEBG, mientras que en el grupo de mujeres con LIEAG encontraron un perfil predominantemente de tipo Th2 (Peghini BC, Abdalla DR, Barcelos AC, Teodoro Ld, Murta EF, Michelin MA. Local cytokine profiles of patients with cervical intraepithelial and invasive neoplasia. Hum Immunol 2012;73(9):920-926)

Resultados para interferón no concuerdan con lo reportado por Song y cols en el 2008 (Song SH, Lee JK, Lee NW, Saw HS, Kang JS, Lee KW. Interferon-gamma (IFN-gamma): a posible prognostic marker for clearance of high-risk human papillomavirus (HPV). Gynecol Oncol 2008;108(3):543-548) donde, al estudiar mujeres en seguimiento con diagnóstico de displasia moderada y VPH de alto riesgo, encontraron que las mujeres que eliminaron la infección por VPH eran IFN- γ positivas en un 93% comparado con un 66% de las que fueron IFN- γ negativas ($p = 0.0109$), concluyendo que el IFN- γ podría ser un marcador pronóstico de eliminación de la infección por VPHs de alto riesgo.

Probablemente, esta discordancia se deba al diseño metodológico, ya que Song y cols estudiaron la eliminación viral y en el presente estudio se estudió la evolución de las lesiones de bajo grado a alto grado.

La mayoría de reportes que se encuentran en la literatura sobre el perfil de citocinas asociado a las lesiones producidas por VPH, estudian los perfiles comparando los diferentes grados de lesiones premalignas. Sin embargo, en nuestro conocimiento, son pocos los estudios que, como el aquí presente, estudian dicho perfil en la verdadera evolución de la enfermedad premaligna en un estudio de cohorte. Podemos finalizar resumiendo que existe

una disminución de la respuesta de tipo Th1 (IL-12 e IL-15, por ejemplo) en el caso de LIEBGs que evolucionan a lesiones de mayor grado, así como una incapacidad para la producción de IFN- γ y una disminución de citocinas antivirales como el caso de la IL-6 lo cual podría deberse a la capacidad del VPH para evadir la respuesta inmune, tal como lo menciona Stanley en su revisión de la respuesta epitelial ante el VPH en el 2012 (Stanley MA. Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. Clin Microbiol Rev 2012;25(2):215-222).

5.3 Tipos de VPH en los grupos de estudio.

Al estudiar los tipos virales en aquellas pacientes positivas para la infección, pudimos observar que los resultados coinciden con los reportes de la literatura; en donde los VPHs de alto riesgo resultan predominantes como causa de lesiones. Así mismo, el VPH-16 es el que más comúnmente se asocia al desarrollo de lesiones de alto grado.

5.4 Tetrámeros de HLA para la identificación de CD8+-específicos.

Se pudo establecer en el laboratorio el método para la producción de tetrámeros de HLA para la detección de linfocitos T CD8+ péptido-específicos. El uso de los tetrámeros en un formato de alto rendimiento puede ser la base para el desarrollo de una nueva prueba para evaluar la activación de la respuesta citotóxica específica contra el VPH en etapas tempranas.

VI. CONCLUSIONES

El presente estudio sobre la evolución de las infecciones por el VPH, abordado mediante la integración de: i) una cohorte formada por mujeres que eliminaron la infección, mujeres donde ésta persistió y mujeres que se re-infectaron; ii) determinación del grado oncogénico del agente causal; iii) los tipos de alelos del huésped implicados en la presentación antigénica; y iv) el perfil de citocinas del cérvix determinantes del tipo de respuesta pro-inflamatoria(Th1)/anti-inflamatoria(Th2), apoyan la hipótesis del papel clave de la inmunología celular como un biomarcador del destino de las infecciones por VPH en sus etapas tempranas.

En nuestro grupo de estudio el alelo del gen DRB1 de HLA clase II que resultó asociado a eliminación de la infección viral fue el DRB1*07. Mientras que el alelo DRB1*10 resultó ser un indicador de mayor riesgo para presentar infecciones en algún momento de la vida. El DR14 pudiera estar asociado a protección contra el desarrollo del CaCU a pesar de la persistencia viral. Estos hallazgos demandan ampliar estas investigaciones en nuestra población.

Existe una disminución en la expresión de citocinas del tipo Th1, un aumento el factor quimioattractante de linfocitos CD8+ conocido como IL-8 así como una disminución en la expresión del factor anti-viral denominado IL-6 en el caso de lesiones de bajo grado que evolucionan a lesiones de mayor grado; lo cual pudiera asociarse a la capacidad importante del VPH para evadir la respuesta inmune.

El uso de los tetrámeros para la detección de linfocitos CD8+ específicos en un formato de alto rendimiento sería de interés debido a la información encontrada sobre el posible aumento de las CD8+ en lesiones que evolucionan así como en CaCU.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alaez-Verson C, Berumen-Campos J, Munguía-Saldaña A et al. «HPV-16 and HLA-DRB1 alleles are associated with cervical carcinoma in Mexican Mestizo women.» *Arch Med Res* 42, nº 5 (2011): 421-5.
- Barker JNWN, Mitra RS, Griffiths CEM et al. «Keratinocytes as initiators of inflammation.» *Lancet* 337 (1991): 211-14.
- Bishop A, Sherris J, Tsu V. «Cervical dysplasia treatment in developing countries: a situation analysis.» *Bull Pan Am Health Organ* 30, nº 4 (December 1996): 378-86.
- Brown DR, Shew ML, Qadadri B et al. «A longitudinal study of genital human papillomavirus infection in a cohort of closely followed adolescent women.» *J Infect Dis* 191 (2005): 182-92.
- Clifford GM, Gallus S, Herrero R et al. «Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis.» *Lancet* 366 (2005): 991-98.
- Cuzick J, Cox T, Zhang G et al. «Human papillomavirus testing for triage of women with low-grade squamous intraepithelial lesions.» *Int J Cancer*, 2012: doi:10.1002/ijc.27723.
- de Jong A, van Poelgeest MIE, van der Hulst JM, Drijfhout JW, Fleuren GJ, Melief CJM, Kenter G, Offringa R, van der Burg SH. «Human papillomavirus type 16-positive cervical cancer is associated with impaired CD4+ T-cell immunity against early antigens E2 and E6.» *Cancer Research* 64 (August 2004): 5449-5455.
- de Sanjosé S, Díaz M, Castellsagué X et al. «Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis.» *Lancet Infect Dis* 7 (2007): 453-59.
- Denny LA, Wright TC Jr. «Human papillomavirus testing and screening.» *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 19, nº 4 (2005): 501-515.
- Eddy, DM. «Secondary prevention of cancer: an overview.» *Bulletin of the World Health Organization* 64, nº 3 (1986): 421-8.
- Edwards RP, Kuykendall K, Crowley-Nowick P, Partridge EE, Shingleton HM, Mestecky J. «T lymphocytes infiltrating advanced grades of cervical neoplasia. CD8-positive cells are recruited to invasion.» *Cancer* 76, nº 8 (October 1995): 1411-1415.
- Gill SC, von Hippel PH. «Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data.» *Anal Biochem* 182, nº 2 (November 1989): 319-26.

- GLOBOCAN 2008 - IARC. *Cervical cancer incidence and mortality worldwide in 2008*. 12 de July de 2012. <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/cervix.asp> (último acceso: 11 de december de 2012).
- Gravitt, P E, C L Peyton, y R J Apple. «Genotyping of 27 human papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by a single-hybridization, reverse line blot detection method.» *J Clin Microbiol* 36, nº 10 (1998): 3020-7.
- Gravitt, P E, C L Peyton, y T Q Alessi. «Improved amplification of genital human papillomaviruses.» *J Clin Microbiol* 38, nº 1 (January 2000): 357-61.
- Hakama M, Joutsenlahti U, Virtanen A et al. «Mass screenings for cervical cancer in Finland 1963-71. Organization, extent, and epidemiological implications.» *Annals of Clinical Research*, April 1975: 101-11.
- Hernández-Hernández DM, Cerda-Flores RM, Juárez-Cedillo T et al. «Human leukocyte antigens I and II haplotypes associated with human papillomavirus 16-positive invasive cervical cancer in Mexican women.» *Int J Gynecol Cancer* 19, nº 6 (2009): 1099-106.
- Herrero R, Hildesheim A, Bratti C et al. «Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica.» *J Natl Cancer Inst* 92 (2000): 464-74.
- Idestrom M, Milsom I, Andersson-Ellstrom A. «Women's experience of coping with a positive Pap smear: a register-based study of women with two consecutive Pap smears reported as CIN 1.» *Acta Obstet Gynecol Scand* 82 (2003): 756-61.
- Insinga RP, Dasbach EJ, Elbasha EH. «Assessing the anual economic burden of preventing and treating anogenital human papillomavirus-related disease in the US:analytic framework and review of the literatura.» *Pharmacoeconomics* 23 (2005): 1107-22.
- Jacobs MV, de Roda Husman AM, van den Brule AJ et al. «Group-specific differentiation between high- and low-risk human papillomavirus genotypes by general primer-mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes.» *J Clin Microbiol* 33, nº 4 (1995): 901-5.
- Jacobs MV, Snijders PJ, van den Brule AJ et al. «A general primer GP5+/GP6(+)-mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings.» *J Clin Microbiol* 35, nº 3 (1997): 791-5.
- Kahn JA, Slap GB, Bernstein DI et al. «Psychological, behavioral, and interpersonal impact of human papillomavirus and Pap test result.» *J Womens Health (Larchmt)* 14 (2005): 650-9.
- Lagro-Janssen T, Schijf C. «What do women think about abnormal smear test results? A qualitative interview study.» *J Psychosom Obstet gynaecol* 26 (2005): 141-5.
- Lazcano-Ponce EC, Moss S, Alonso de Ruíz P et al. «Cervical cancer screening in developing countries: why is it ineffective? The case of Mexico.» *Arch Med Res* 30 (1999): 240-50.

- Livak KJ, Schmittgen TD. «Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2-DDCT Method.» *METHODS* 25 (2001): 402-8.
- Luevano M, Bernard HU, Barrera-Saldaña HA et al. «High-throughput profiling of the humoral immune responses against thirteen human papillomavirus types by proteome microarrays.» *Virology* 405, nº 1 (September 2010): 31-40.
- Maciag PC, Schlecht NF, Souza PS, Franco EL, Villa LL, Petzl-Erler ML. «Major histocompatibility complex class II polymorphisms and risk of cervical cancer and human papillomavirus infection in Brazilian women.» *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9, nº 11 (2000): 1183-1191.
- Mahmud SM, Robinson K, Richardson H, Tellier PP, Ferenczy AS, Roger M, Coutlee F, Franco EL. «HLA polymorphisms and cervical human papillomavirus infection in a cohort of Montreal University students.» *J Infect Dis* 196, nº 1 (2007): 82-90.
- Monnier-Benoit S, Mauny F, Riethmuller D, Guerrini JS, Capilna M, Félix S, Seilles E, Mougin C, Pretet JL. «Immunohistochemical analysis of CD4+ and CD8+ T-cell subsets in high risk human papillomavirus-associated pre-malignant and malignant lesions of the uterine cervix.» *Gynecologic Oncology* 102 (2006): 22-31.
- Sánchez-Barriga, JJ. «Tendencias de mortalidad por cáncer cervicouterino en las siete regiones socioeconómicas y en las 32 entidades federativas de México en los años 2000-2008.» *Gaceta Médica de México* 148 (2012): 42-51.
- Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A et al. «HPV DNA testing in cervical cancer screening: results from women in a high-risk province of Costa Rica.» *JAMA* 283, nº 1 (January 2000): 87-93.
- Scott M, Nakagawa M, Moscicki AB. «Cell-mediated immune response to Human Papillomavirus infection.» *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 8, nº 2 (2001): 209-220.
- Song SH, Lee JK, Oh MJ et al. «Risk factors for the progression or persistence of untreated mild dysplasia of the uterine cervix.» *Int J Gynecol* 16, nº 4 (2006): 1608-13.
- The Future II Study Group. «Effect of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like-particle vaccine on risk of cervical intraepithelial neoplasia grade2, grade3, and adenocarcinoma in situ: a combined analysis of four randomised clinical trials.» 369 (2007): 1861-68.
- van den Hende M, van Poelgeest MI, van der Hulst JM, de Jong J, Drijfhout JW, Fleuren GJ, Valentijn AR, Wafelman AR, Slappendel GM, Melief CJ, Offringa R, van der Burg SH, Kenter GG. «Skin reactions to human papillomavirus (HPV) 16 specific antigens intradermally injected in healthy subjects and patients with cervical neoplasia.» *Int J Cancer* 123, nº 1 (July 2008): 146-152.
- Visser J, Nijman HW, Hoogenboom BN, Jager P, van Baarle D, Schuurin E, Abdulahad W, Miedema F, van der Zee AG, Daemen T. «Frequencies and role of regulatory T cells in patients with

(pre)malignant cervical neoplasia.» *Clinical and Experimental Immunology*, 2007: 1365-2249.

Wang SS, Schiffman M, Herrero R et al. «Determinants of human papillomavirus 16 serological conversion and persistence in a population-based cohort of 10 000 women in Costa Rica.» *Br J Cancer* 91, n° 7 (October 2004): 1269-74.

Woodworth CD, Simpson S. «Comparative lymphokine secretion by cultured normal human cervical keratinocytes, papillomavirus-immortalized, and carcinoma cell lines.» *Am J Pathol* 142, n° 5 (1993): 1544-55.

