



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, AC.**

DIVISIÓN DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**EFICACIA POTENCIAL DE VACUNAS PROFILÁCTICAS
DIRIGIDAS CONTRA LA PROTEÍNA L1 DE
PAPILOMAVIRUS TIPO 16 EN MUJERES DE SAN LUIS
POTOSÍ Y GUANAJUATO, MÉXICO**

Tesis que presenta
María Aurora Londoño Avendaño

Para obtener el grado de
Maestra en ciencias en Biología Molecular

Director de la tesis
Dr. Rubén López Revilla

San Luis Potosí, S.L.P., enero de 2006



ACTA DE APROBACIÓN DE LA TESIS

La tesis **"Eficacia potencial de vacunas profilácticas dirigidas contra la proteína L1 de papilomavirus tipo 16 en mujeres de San Luis Potosí y Guanajuato, México"**, presentada para obtener el Grado de de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **María Aurora Londoño Avendaño** y aprobada el **30 de enero de 2006** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Rubén López Revilla
Director de la tesis

Dr. Alejandro de las Peñas
Asesor de la tesis

Dra. Lina Riego Ruiz
Asesor de la tesis



CRÉDITOS INSTITUCIONALES

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Rubén López Revilla.

Parte del trabajo fue posible por el apoyo financiero del Fondo Mixto CONACYT-San Luis Potosí (Proyecto FMSLP4441) y del Fondo Mixto CONACYT-Guanajuato (Proyecto FONINV-Gto-C01-5751).

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C. y un apoyo económico para finalización del trabajo de grado del Consejo Potosino de Ciencia y Tecnología.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

COPIA CERTIFICADA

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 022 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 30 días del mes de enero del año 2006, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Alejandro De las Peñas Nava	Presidente	IPICYT
Dra. Lina Raquel Riego Ruiz	Secretario	IPICYT
Dr. Rubén López Revilla	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

María Aurora Londoño Avendaño

sobre la Tesis intitulada:

Eficacia potencial de las vacunas profilácticas dirigidas contra la proteína L1 de papilomavirus tipo 16 en mujeres de San Luis Potosí y Guanajuato, México

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Rubén López Revilla

El Jurado, después de deliberar, determinó

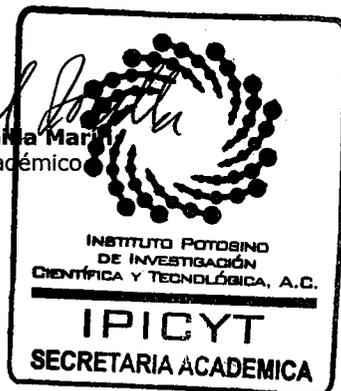
APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 14:35 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 30 días del mes enero de 2006.


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico


Mtra. Ma. Elisa Lucio Aguilar
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares



A

Silvia Blair Patiño

... la liberté attache mieux l'imagination que les chaînes, puisqu'elle confronte incessamment l'imagination avec la vraie chose, et parce qu'elle se cache dans le familier fait des gestes les rêves les plus étranges.

M. Foucault

AGRADECIMIENTOS

Al IPICYT por la oportunidad de realizar esta maestría y al Dr. Rubén López Revilla, por su apoyo y guía en la realización de esta tesis.

A la QFB Luz Aurora Martínez Contreras, por su trabajo en el diagnóstico y tipificación de VPH.

A la Biol. Mireya Sánchez Garza, por sus consejos oportunos en el trabajo de laboratorio.

A los doctores Lina Riego-Ruiz y Alejandro de las Peñas por sus comentarios y aportes.

A los doctores Julio Ortiz Valdez, Yolanda Terán, Ma. de Lourdes Martínez de Blanco y a la Lic. Enf. Dalila Álvarez Fortanelli, quienes proveyeron las muestras de San Luis Potosí incluidas en este trabajo. A los doctores Raúl Rojas Hernández y Silvia Quintana Vargas por la recolección de las muestras de Guanajuato incluidas en este trabajo.

A los compañeros del Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria, y a todos los mexicanos que me dieron su apoyo y amistad durante todo este tiempo.

RESUMEN

En este trabajo fueron analizados dos de los principales factores determinantes de la eficacia de la vacunación profiláctica contra la infección por papilomavirus humanos tipo 16 (HPV16) y el desarrollo cáncer cervicouterino (CaCu) en el centro de México: el fondo genético de los alelos del complejo principal de histocompatibilidad de la población sujeta a vacunación y la variación de la proteína L1 de HPV16.

Las secuencias nucleotídicas completas del marco de lectura abierto (ORF) del gen L1 (1509 pares de bases) fueron obtenidas de 26 aislados de HPV16 provenientes del cuello uterino de mujeres de los estados de San Luis Potosí y Guanajuato, México, con infección única por HPV16. Los ORF tuvieron una variabilidad nucleotídica del 3.9% y aminoacídica del 2.2%. El 81% de los aislados de HPV16 fueron del subtipo Europeo (E) y 15% del subtipo Asiático-Americano (AA). Los efectos estructurales de la variabilidad de la proteína L1, evaluados en la base de datos Swiss Model, fueron: 1) aumento del tamaño de la hélice 5 (26 casos), 2) pérdida de las hélices 210-213 (un caso) y 3 (dos casos), y 3) pérdida de la capacidad de autoensamble de los pentámeros (dos casos).

El aporte del fondo genético de las mujeres fue evaluado mediante tipificación de los alelos de los loci HLA DQA1 y DQB1 con la técnica RSCA en 55 mujeres con infección por HPV16 (entre ellas estaban incluidas las 26 portadoras de los aislados de los ORF secuenciados). En ellas estuvieron sobrerrepresentado dos alelos DQA1: DQA1*0301, ampliamente reconocido como un alelo de susceptibilidad a CaCu (34% de las mujeres eran homocigotas), así como DQB1*0603, considerado como un alelo protector. El 24% de las pacientes tenían las combinaciones DQA1*0301/DQB1*0302 y DQA1*0501/DQB1*030101, que se saben asociados a la susceptibilidad a CaCu. No hubo asociaciones significativas entre los alelos MHC II y los subtipos E y AA.

Relacionamos la variabilidad antigénica de los virus circulantes con el genotipo de las pacientes mediante la predicción de los nonapéptidos de la proteína L1 capaces de unirse a las glicoproteínas MHC II generadas por los alelos DQA1*0301/DQB1*0302, DQA1*0501/DQB1*0201 y el alelo DQB1*0301 con el programa RankPep. Los efectos inmunológicos de la variabilidad de L1 pudieron agruparse en dos categorías: 1) epítomos expuestos en la superficie de la cápside viral y 2) potencial antigénico de cada aislado según la afinidad de sus epítomos individuales. Los efectos de la variabilidad sobre la primera categoría fueron: pérdida de epítomos (dos epítomos en dos aislados), cambios en el asa conectora D-E (ocho cambios en cinco aislados) y cambios en el asa conectora H-I (dos epítomos en dos aislados). Identificamos 11 epítomos no expuestos y uno expuesto que no habían sido descritos. El potencial antigénico del 73-80% de los aislados fue similar al de la proteína L1 que se usa para producir la VLP, y fue mayor en el resto de los aislados; las modificaciones del perfil antigénico de los aislados virales dependieron de cambios de aminoácidos en el 30% de los casos. En todas las interacciones MHC II/nonapéptido predichas la afinidad de unión estuvo por debajo del 45% respecto al péptido ideal correspondiente.

Nuestras observaciones indican que en esta región una vacuna basada en VLP de HPV16 podría ser menos eficaz que en poblaciones donde la poza genética de los alelos MHC II predominantes determina afinidades mayores hacia los epítomos vacunales.

ABSTRACT

In this work two major factors determining the efficacy of prophylactic vaccines against human papillomavirus type 16 (HPV16) infection and cervical cancer (CC) were assessed for Central Mexico: genetic background of the major histocompatibility complex in the population subject to vaccination and variation of the L1 protein in circulating HPV16 viruses.

Nucleotide sequences of the open reading frame (ORF) from the L1 gene (1509 base pairs) were obtained from 26 HPV16 isolates derived from the cervix of women residing in the states of San Luis Potosí and Guanajuato, Mexico, infected only by HPV16. The ORFs had 3.9% nucleotide and 2.2% amino acid sequence variability. Eighty-one percent of the HPV16 isolates were of the European (E) subtype and 15% of the Asian-American (AA) subtype. The structural effects of L1 protein variability, assessed by the Swiss Model software and database, were: 1) increased length of the helix 5 (26 cases), 2) loss of helices 210-213 (one case) and 3 (two cases), and 3) loss of L1 pentamer self-assembly (two cases).

The contribution of the genetic background of the patients was assessed by typing the HLA DQA1 and DQB1 loci with the RSCA technique in 55 women infected by HPV16 (including the 26 ones of the sequenced ORFs). Two DQA1 alleles were over-represented in them: DQA1*0301, widely recognized as a CC susceptibility allele (34% of the women were homozygous), and DQB1*0603 considered as a protective allele. Twenty-three percent of the patients had the two predominant haplotypes (DQA1*0301/DQB1*0302 and DQA1*0501/DQB1*0301), known to be associated with CC susceptibility. No significant association was found between MHC II alleles and the E and AA subtypes.

Antigenic variability of the circulating viruses was correlated with the patients' genotype by predicting the L1 protein epitopes capable of binding the MHC II glycoproteins produced by the alleles DQA1*0301/DQB1*0302, DQA1*0501/ DQB1*0201 and the allele DQB1*0301 with the RankPep software program. The immunologic effects of L1 variability fell in two categories: 1) epitopes exposed on the surface of the viral capsid and 2) antigenic potential of each viral isolate depending on the affinity of its individual epitopes. The effects of variability on the first category were: loss of epitopes (two epitopes from two isolates), changes in the D-E connecting loop (eight changes in five isolates) and changes in the HI connecting loop (two epitopes from two isolates). Eleven unexposed and one exposed epitope identified had not been described before. In 73-80% of the isolates the antigenic potential was similar to the L1 isolate used to produce the VLP for immunization; in the remaining of isolates the antigenic profile was higher. Overall affinity values were = 45% compared to the corresponding ideal peptide in all MHC II/nonapeptide interactions predicted.

Our results suggest that in this region a HPV16 VLP vaccine might be less efficient than in areas where the predominant MHC II alleles of the vaccinees determine higher affinities for the vacunal epitopes.

ÍNDICE

ACTA DE APROBACIÓN DE LA TESIS	II
CREDITOS INSTITUCIONALES.....	III
DEDICTORIA.....	IV
AGRADECIMIENTOS.....	V
RESUMEN.....	VI
ABSTRACT.....	VII
LISTA DE TABLAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS	X
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	6
MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
Muestras.....	7
Diagnóstico y tipificación de HPV.....	7
Secuenciación del ORF del gen L1.....	8
Tipificación de HLA clase II.....	9
RESULTADOS.....	12
Alelos MHC II en las mujeres de la muestra.....	12
Variación de la secuencia nucleotídica del ORF L1.....	13
Consecuencias de la variación en la secuencia nucleotídica del ORF L1.....	15
Sobre la estructura y función de la proteína L1.....	15
Sobre la inmunogenicidad de la proteína L1.....	17
1. Exposición de epítomos.....	17
2. Asociaciones entre subtipos de HPV16 y alelos MHC II.....	18
DISCUSIÓN.....	22
Alelos HLA II en las mujeres de la muestra.....	22
Variación en la secuencia de la proteína L1.....	23
Subtipos y variantes de HPV16 en los aislados.....	24
Consecuencias estructurales de la variación en L1.....	25
Consecuencias inmunológicas de la variación en L1.....	26
1. Cambios en los epítomos neutralizantes.....	26
2. Variación en los epítomos lineales.....	27
3. Cambios en el perfil antigénico de las proteínas.....	27
Implicaciones de los alelos identificados sobre la eficacia de la vacunación.....	28
REFERENCIAS.....	30

LISTA DE TABLAS

1. Distribución de genotipos para los loci HLA DQA1 y DQB1	37
2. Prueba de desviación del equilibrio Hardy-Weinberg para el locus HLA DQA1	38
3. Comparación de las frecuencias alélicas de las pacientes incluidas en este trabajo con una muestra representativa del centro de México	39
4. Combinaciones posibles de moléculas DQA1/DQB1	40
5. Polimorfismos de nucleótidos encontrados en el ORF L1	42
6. Epítomos MHC II predichos para los aislados de HPV16	43

LISTA DE FIGURAS

1. Esquema de la respuesta inmune contra HPV	44
2. Estructura de la molécula MHC II	45
3. Estrategia de amplificación y secuenciación del ORF L1	46
4. Ejemplo de amplificaciones por PCR directa y semi-anidada	47
5. Ejemplo de tipificación de alelos HLA por RSCA	48
6. Árbol filogenético obtenido con las 26 secuencias nucleotídicas	49
7. Subtipos y variantes de HPV16 identificados	50
8. Árbol filogenético de las 26 secuencias de aminoácidos del ORF L1	51
9. Distribución de las sustituciones de aminoácido encontradas, según la estructura de L1	53
10. Cambios en la estructura secundaria de L1 encontrados en los aislados	54
11. Asociaciones entre subtipos HPV16 encontrados y alelos DQA1 en las pacientes	55
12. Asociaciones entre subtipos HPV16 encontrados y alelos DQB1 en las pacientes	56
13. Perfiles de afinidad de los epítomos exhibidos por las variantes HPV16 para la combinación de alelos DQA1*0301/DQB1*0302	57
14. Perfiles de afinidad de los epítomos exhibidos por las variantes HPV16 para la combinación de alelos DQA1*0501/DQB1*0201	58
15. Perfiles de afinidad de los epítomos exhibidos por las variantes HPV16 para el alelo DQB1*0301	59

INTRODUCCIÓN

Cáncer del cuello del útero e infección por papilomavirus

El cáncer cervicouterino (CaCu) es el segundo tipo de cáncer más común en las mujeres de todo el mundo. Es también la principal causa de muerte por cáncer en las mujeres de los países en vías de desarrollo, donde aparecen el 80% de los casi 500,000 nuevos casos de CaCu diagnosticados cada año (Muñoz et al. 2003, Lewis 2004). Se trata de una enfermedad con un patrón de transmisión sexual en la que el principal factor de riesgo para el inicio y la progresión de las lesiones neoplásicas es la infección persistente por papilomavirus humanos (HPV) denominados de “alto riesgo” (AR).

El calificativo de HPV-AR se aplica a los tipos HPV-16, -18, -31 -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59, -66, y -68 (Schiffman y Castle 2003, Muñoz et al. 2004), los cuales están en más del 99% de los casos de CaCu invasor (Walboomers et al. 1999, Clifford et al. 2003); el tipo HPV16 se presenta en un 60% de estos casos. Los HPV-AR afectan la regulación del ciclo celular por la interacción de las oncoproteínas E6 y E7 con las proteínas celulares p53 y pRB, respectivamente (Chakrabarty y Krishna 2003, Schiffman y Castle 2003). También la integración del DNA viral al genoma celular y las alteraciones genéticas recurrentes independientes de la infección por HPV-AR aportan al desarrollo de las lesiones neoplásicas (Lazo 1999).

Importancia del MHC en la relación entre HPV y CaCu

El complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) consiste en un conjunto de genes que codifican una serie de glicoproteínas de membrana y otras moléculas accesorias que participan en el proceso de presentación de antígenos. La presentación de antígenos es el mecanismo mediante el cual las células en contacto con un patógeno o sus derivados se encargan de indicarle a las células T (LT) la presencia del agente extraño. En general el proceso consiste en generar

péptidos del patógeno con un tamaño entre nueve y 25 aminoácidos y expresarlos en la superficie celular unidos a una glicoproteína de membrana (la molécula MHC) para que sean reconocidos por el receptor del linfocito T (TCR) y se induzca la producción de anticuerpos específicos y/o la destrucción del patógeno. Casi todos los genes del MHC están en el mismo locus, el cual en humanos también se conoce como antígeno leucocitario humano (HLA) y se ubica en la región 6p21.3 (Kumanovics et al. 2003). Este locus contiene tres regiones de genes. Las regiones I y II codifican las glicoproteínas de clase I (que unen péptidos de origen intracelular procesados en el proteasoma) y las de clase II (que unen péptidos antigénicos extracelulares procesados en el citosol y endosomas) y otras moléculas implicadas en la modulación de su expresión (MHC-DM, MHC-DO y TAP). Los genes de la región III codifican proteínas con diversas funciones, entre ellas citocinas, proteínas del complemento, de choque térmico y transportadores ABC (Kumanovics et al. 2003).

Las moléculas HLA de las clase I y II juegan un papel clave en la erradicación viral y la vigilancia inmunológica de las neoplasias producidas por HPV-AR (Zoodsma et al. 2005a). El 80% de las infecciones por HPV son resueltas por la respuesta inmunológica y el resto progresan a lesiones preneoplásicas (zur Hausen 2002). En las lesiones relacionadas con HPV-AR al inicio de la infección aumenta la expresión de las moléculas MHC, pero en las lesiones que progresan hasta producir lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado se observa disminución de la presentación de antígenos por efecto de las oncoproteínas virales (Ryu et al. 2001, zur Hausen 2002, Vambutas et al. 2004). La razón por la cual los oncogenes son importantes en el montaje de la respuesta se debe a la relación intrincada que hay entre la presentación de antígenos y la generación de inmunidad celular y humoral. Esta relación se describe de manera más detallada la Figura 1.

Otra evidencia importante de que la composición genética del locus MHC juega un papel importante en la dirección que toma una infección por HPV la constituye el amplio número de asociaciones reportadas entre alelos de los genes MHC y la susceptibilidad a infectarse con HPV-AR y a desarrollar lesiones

neoplásicas y carcinomas del cuello del útero (Zoodsma et al. 2005a, Zoodsma et al. 2005b).

Importancia del MHC II en la respuesta inmune protectora contra HPV

La respuesta inmunológica protectora y duradera contra HPV se debe a los anticuerpos neutralizantes de clase IgG, capaces de inducir la destrucción del virus o de inhibir su patogenicidad. Estos anticuerpos están dirigidos contra epítomos de la proteína L1 expuestos en la superficie del virión. Los epítomos de L1 que quedan expuestos también se conocen como epítomos conformacionales porque son reconocidos por las inmunoglobulinas de superficie del linfocito B (LB) y/o por su respectivo anticuerpo monoclonal sólo cuando están en un virión intacto (Carter et al. 2003, Odunsi y Ganesan 2001, Touze et al. 1998, Yang et al. 2005).

El proceso que genera la respuesta de tipo IgG involucra a las células dendríticas (DCs) como las principales células presentadoras de antígenos. Las DCs presentan antígenos exclusivamente por la vía MHC II. En las DCs la eficiencia de la presentación es determinada por el polimorfismo de los genes involucrados en la generación de complejos MHC II-epítomo sobre la superficie celular y por la afinidad de los epítomos de las diferentes variantes de las proteínas del virus que se presenten por ésta vía (Odunsi y Ganesan 2001, Zehbe et al. 2001). Los péptidos de la proteína L1 son los que más se presentan por la vía MHC II ya que esta proteína es la primera que entra en contacto con el sistema inmune; antes de la inmunización algunos viriones se destruyen sin poder infectar la célula y después de la inmunización aumenta el número de viriones destruidos.

Problemas en la eficacia de la vacunación profiláctica contra HPV/CaCu

La proteína L1 es el blanco principal de la respuesta inmunológica contra HPV y constituye la base de las vacunas profilácticas que se encuentran en fases avanzadas de desarrollo. Para producir estas vacunas se usan proteínas L1 recombinantes autoensambladas como partículas similares a viriones (virus-like particles VLP) (Kirnbauer et al. 1996, Berry y Palefsky 2003).

Se prevé que este tipo de vacunas serán liberadas para su uso masivo en el año 2008 ya que en las pruebas de fase III han mostrado una eficacia del 98% para disminuir la incidencia de infecciones persistentes y entre el 80 y el 96% para prevenir las reinfecciones (Koutsky et al. 2003, Harper et al. 2004, Villa et al. 2005). Las diferencias dependen de las poblaciones inmunizadas, el tipo de vacunas y el protocolo de inmunización. Los principales factores que disminuyen la eficacia de la vacunación en una localidad consisten en: 1) diferencias en el predominio de los tipos virales de alto riesgo y sus variantes respecto al tipo de virus empleado para preparar la vacuna en cuestión, 2) escape inmunológico por parte del virus y 3) mayor susceptibilidad a la infección y al desarrollo de las lesiones por HPV debida al fondo genético de la población en riesgo (Stanley 2003, Prendiville y Davies 2004).

Importancia del MHC II en la vacunación profiláctica contra HPV/CaCu

El mayor aporte del fondo genético al problema en la vacunación es el polimorfismo de los genes del MHC, por sus implicaciones en la generación de la respuesta inmune. Las DCs tienen un papel crucial en la generación de inmunidad contra HPV y presentan antígenos exclusivamente por la vía MHC II, lo que hace que el polimorfismo de los genes MHC II esté involucrado en la calidad de la respuesta que montan los individuos contra la infección. En los encuentros con el virus posteriores a la inmunización las DCs fagocitan restos de la cápside destruida gracias a los anticuerpos específicos de los LB de memoria, los procesan a complejos epítomo-MHC II y los presentan a los linfocitos Th1 para inducir la proliferación y diferenciación de clones de linfocitos productoras de anticuerpos específicos (Man 1998, Scott et al. 2001).

Los genes más polimórficos del locus MHC son DQA1, DQB1 y DRB1. Los genes DQA1 y DQB1 codifican las subunidades alfa y beta de una glicoproteína del tipo DQ, respectivamente. Del gen DQA1 hay al menos 32 alelos descritos y del gen DQB1 hay unos 68 alelos conocidos (Base de datos IMGT/HLA 2006). Cada individuo puede portar dos alelos de cada gen y eso le da la posibilidad de expresar hasta cuatro moléculas DQ distintas en la superficie de sus células. Los

polimorfismos en estos genes le confieren a cada glicoproteína una característica conocida como especificidad antigénica. Esta especificidad consiste en que cada combinación DQA1/DQB1 genera una proteína con una estructura tridimensional en la que se genera un surco con hendiduras donde tienen que encajar los péptidos (epítomos) de la proteína L1 que se pueden unir (Suri et al. 2003) (Ver Fig. 2). Los epítomos que se unen tienen entre 13 y 25 aminoácidos, pero una región de nueve aminoácidos (*core*) es la que tiene la mayor interacción con el surco, y sólo cierto tipo de aminoácidos en las posiciones 1, 4, 6 y 9 pueden encajar en las hendiduras que caracterizan a cada glicoproteína (Sercarz y Maverakis 2003). Las características de los aminoácidos del *core* dan la afinidad del péptido para unirse a la molécula DQ. Los péptidos con mayor afinidad pueden permanecer unidos a la molécula DQ hasta por 24 horas, dándole la oportunidad de entrar en contacto con el TCR de un linfocito T.

La afinidad de las moléculas HLA de clase II por los epítomos de la proteína L1 es importante para las vacunas profilácticas contra los HPV-AR porque esta estrategia de vacunación supone la generación de LT y LB de memoria. La activación de estos linfocitos de memoria en los encuentros con el virus posteriores a la vacunación es dada por los epítomos de la proteína L1 que pueden unirse al receptor de células T (TCR) y a las inmunoglobulinas de superficie del LB y por la presentación de epítomos neutralizantes en las glicoproteínas de membrana de la superficie de la DCs (Scott et al. 2001).

La capacidad diferencial de las proteínas DQ para unir epítomos de la proteína L1 implica riesgo de falla en la protección inmunológica contra HPV inducida por VLPs cuando los virus circulantes tienen epítomos diferentes a los de la vacuna que se aplica o cuando predominan alelos de MHC II que codifican proteínas incapaces de unir el repertorio de péptidos disponible.

OBJETIVOS DEL TRABAJO

Para contar con una primera aproximación sobre la eficacia potencial de las vacunas profilácticas contra HPV16 basadas en VLPs en la región del centro de México, en este trabajo hemos determinado:

- 1) La frecuencia de los alelos de los genes DQA1 y DQB1 entre mujeres los estados de San Luis Potosí y Guanajuato con infecciones del cérvix causadas por HPV16.
- 2) La variabilidad de la proteína L1 de los subtipos y variantes de HPV16 circulantes en la región.
- 3) La afinidad potencial de las proteínas MHC II codificadas por los alelos DQA1 y DQB1 más frecuentes en la población muestreada por los epítomos lineales de las proteínas L1 de las variantes de HPV16 identificadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Dentro del proyecto “Epidemiología molecular de la infección por HPV” que se lleva a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria del IPICYT fueron obtenidos raspados cervicovaginales de mujeres que asistieron a consulta ginecológica en diferentes centros atención a la salud de los estados de San Luis Potosí (jurisdicción sanitaria de la capital del estado) y Guanajuato (jurisdicciones sanitarias de Celaya, Irapuato y León). El conjunto incluyó 55 muestras de mujeres con lesiones del cuello uterino de bajo grado (LSIL, lesión intraepitelial escamosa de bajo grado) y de alto grado (HSIL, lesión intraepitelial escamosa de alto grado) diagnosticadas mediante Papanicolaou, colposcopia y/o histopatología. El diagnóstico de LSIL incluye la infección por HPV (IHPV) y la neoplasia intraepitelial del cérvix (NIC) de grado I (NIC I), en tanto que el de HSIL abarca las lesiones NIC II y NIC III (o carcinoma *in situ*) y el carcinoma cervicouterino (CaCu) invasor.

Diagnóstico y tipificación de HPV

Con el procedimiento general aplicado a los exudados del cérvix en el laboratorio, el DNA total fue extraído mediante lisis con dodecil sulfato de sodio (SDS) y digestión con proteinasa K y los tipos de HPV-AR fueron identificados por la amplificación del DNA viral mediante PCR anidada de la región E6/E7 empleando la pareja de oligonucleótidos iniciadores LCRS/E7AS (5'AAGGGAGTAACCGAAAACGGT3' y 5'TCATCCTCCTCCTCTGAG3', respectivamente) en la primera reacción y la pareja pU1M/pU2R (5'TGTCAAAAACCGTTGTGTCC3'/5'GAGCTGTCGCTTAATTGCTC3') –específica para secuencias de HPV-AR– en la segunda reacción ((Hwang 1999, Sasagawa et al. 2000, Martínez-Contreras 2005). Las muestras negativas para HPV-AR fueron luego analizadas para detectar cualquier tipo de HPV de alto o bajo riesgo con las parejas de oligonucleótidos universales MY09/11

(5'CGTCCMARRGGAWACTGATC3'/5'GCMCAGGGWCATAAYAATGG3') y GP5+/6+ (5'TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC3'/5'GAAAATAAACTGTAAATCATATTC3') (Carrillo et al. 2004); en las muestras que siguieron siendo negativas para HPV la calidad del DNA PCR fue evaluada a través de la amplificación del gen de β -globina (oligonucleótidos PCO₄ /GH₂O, 5'CAACTTCATCCACGTTCAACC3'/5'GAAGAGCCAAGGACAGGTAC3'). Con este procedimiento solamente el 2.1% de los exudados analizados resultaron negativos para HPV y sólo en el 0.8% de las muestras no observamos el producto de amplificación del gen de β -globina (Martínez-Contreras 2005).

La tipificación de los HPV-AR se realizó por análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (en inglés, restriction fragment length polymorphism, RFLP) de los productos de PCR generados con la pareja de oligonucleótidos pU1M/pU2R (Fujinaga et al. 1991, Hwang 1999, Martínez-Contreras 2005) y fue confirmada por secuenciación de los mismos productos (Pineda-Martínez 2005). Entre las muestras diagnosticadas como infecciones únicas por HPV16 que contenían más de 2 μ g de DNA total seleccionamos 55 para tipificación de los loci DQA1 y DQB1 del MHC II y en 26 de ellas se amplificó y secuenció el ORF de la proteína L1.

Secuenciación del ORF del gen L1

Para obtener la secuencia del ORF L1 de HPV16 (1509 de los 1587 pb del gen de la proteína L1), llevamos a cabo dos reacciones de PCR semi-anidada usando oligonucleótidos tipo-específicos que amplifican el ORF completo en la primera PCR y oligonucleótidos consenso para regiones internas en la segunda reacción, con las cuales obtuvimos dos productos independientes que se traslapan alrededor de 540 pb (Fig. 3). Usamos esta estrategia porque en la mayoría de los casos la PCR directa con los oligonucleótidos tipo-específicos no generaba suficiente producto amplificado para la secuenciación (ver ejemplo en la Fig. 4).

La primera PCR fue realizada con Taq DNA polimerasa Platinum (Invitrogen, Carlsbad, CA) en mezclas de reacción de 50 μ l que contenían 1 U de enzima, amortiguador para PCR 1 \times (Tris-HCl 200 mM, KCl 500 mM, pH 8.4),

MgCl₂ 3 mM, cada dNTP 400 μM, cada oligonucleótido 0.3 μM y 25-50 ng de DNA total de la muestra problema. Las reacciones semianidadas se llevaron a cabo con Taq DNA polimerasa (Promega, Madison, WI) en mezclas de 50 μl con 1 U de enzima, amortiguador para PCR 1× (Tris-HCl 200 mM, KCl 500 mM, pH 8.4), MgCl₂ 2 mM, cada dNTP 400 μM, cada oligonucleótido 0.4 μM y 0.5 μl de la mezcla con el producto de la primera reacción. Los amplicones de la segunda reacción fueron recuperados de geles de agarosa al 1%, purificados con el kit Wizard PCR Preps DNA Purification Systems (Promega, Madison, WI) y secuenciados automáticamente en el DNA Analyzer 3700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) en el Laboratorio Nacional de Genómica del CINVESTAV-Irapuato. Los dos fragmentos fueron secuenciados de manera independiente y en ambas direcciones, alcanzando a cubrir 2.7 veces la región de interés. En algunos casos fue necesario introducir un oligonucleótido adicional para cubrir una parte de la primera región del gen (ver Fig. 3).

Tipificación de HLA clase II

La tipificación de los loci MHC II se realizó mediante el análisis conformacional de cadenas de referencia con alta resolución –Reference Strand Mediated Conformation Analysis, RSCA– de Arguello y Madrigal (1999) en el laboratorio DNA Diagnóstica (Torreón, México) con DNA remanente de las muestras que había sido empleado para el diagnóstico de la infección y tipificación de HPV-AR y la amplificación del gen L1.

La técnica consiste en la amplificación del locus problema mediante PCR; el producto amplificado se mezcla con moléculas de DNA de cadena doble (dsDNA) amplificadas de líneas celulares de referencia para alelos HLA y marcadas en la cadena 5'-3' con un fluoróforo. Las moléculas de esta mezcla se desnaturalizan y se permite la hibridación para generar dúplex de las cadenas sentido (marcadas) y antisentido (no marcadas) con las moléculas de la muestra problema. Los dúplex tienen varias características que hacen la técnica muy sensible y permiten la automatización de la interpretación. Por un lado, sólo los que contienen la cadena

marcada son identificados por un sistema de detección por láser en un secuenciador automático; por lo tanto, sólo se pueden distinguir homodúplex de referencia y heterodúplex con la muestra problema. Por otro lado, los heterodúplex detectados tienen una capacidad diferencial para migrar en los capilares que contienen geles de poliacrilamida usados en este sistema de detección, ya que su velocidad de migración depende del tipo y cantidad de fallas de apareamiento (“mismatch”) entre la cadena de referencia y la(s) cadena(s) problema (Arguello et al., International Histocompatibility Working Group). Un programa de cómputo permite identificar los alelos en función de la velocidad de migración del (de los) heterodúplex en geles capilares en comparación con el alelo de referencia usado; un ejemplo de esta tipificación se describe en la Fig.5.

Comparación de secuencias e identificación de subtipos de HPV16

Los alineamientos de las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos se realizaron por el método Clustal W (Thompson et al. 1994) con el programa MegAlign del paquete DNASTar (DNASTAR, Inc., Madison, WI). La aplicación Clustal W se basa en el método Neighbor-Joining de Saitou y Nei (1987) y los parámetros que se usaron para construir los dendrogramas fueron: Penalización por deleciones = 10, Penalidad de longitud de deleción = 1, Peso de transiciones = 0.5. La identificación de las variantes de HPV16 se basó en la clasificación de Yamada et al. (1997) y en el agrupamiento de las secuencias en los dendrogramas.

Modelaje y predicción de epítomos de la proteína L1 para moléculas MHC II

El modelaje de la estructura de las variantes de la proteína L1 se realizó con el programa Swiss Model (<http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>) (Schwede et al. 2003). Los nonapéptidos de los diferentes ORF de la proteína L1 con capacidad de unión a las moléculas codificadas por los alelos MHC II fueron predichos con el programa RankPep (<http://mif.dfci.harvard.edu/Tools/rankpep.html>) (Reche et al. 2004).

Análisis estadístico

Las pruebas de significación estadística (χ^2) fueron realizadas en línea con el paquete "Calculation for the Chi-square test" (Preacher 2003). La prueba de equilibrio Hardy-Weinberg para los genotipos DQA1 se realizó con el paquete TFGA 1.3 (Miller 1997).

RESULTADOS

Alelos MHC II en las mujeres de la muestra

Los genes DQA1 y DQB1 codifican sendas glicoproteínas (moléculas MHC II del tipo DQ) que al expresarse sobre la superficie de una célula presentadora de antígeno y unir algún péptido derivado del virus posibilitan la producción de la respuesta inmune mediada por células T, esencial para la resolución de las infecciones por HPV inducida también por vacunas basadas en VLP. Los alelos de los genes DQA1 (al menos 32 han sido descritos) y DQB1 (unos 68 conocidos) codifican moléculas MHC II con afinidades diversas hacia los péptidos presentes en la proteína L1 en función de las combinaciones DQA1/DQB1 del genoma individual (hasta cuatro moléculas DQ distintas).

La Tabla 1 muestra la frecuencia de los genotipos de los alelos DQ identificados en las pacientes. El 35% resultaron homocigotas para el alelo DQA1*0301, lo cual de entrada sugiere que puede haber una asociación significativa entre este alelo y la infección por HPV16.

Para analizar estadísticamente el efecto de estas pacientes homocigotas al interior de la muestra realizamos una prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg en la que encontramos que el genotipo DQA1*0301/*0301 tiene casi del doble de la frecuencia esperada (19.6%), lo que demuestra que la homocigocidad para el alelo DQA1*0301 no es un efecto aleatorio del muestreo, si no que más bien sobrerrepresenta lo esperado para el conjunto, a pesar de que la muestra total no tiene déficit de heterocigotos (Tabla 2).

La asociación entre la infección por HPV16 y el alelo DQA1*0301 fue examinada por una segunda vía mediante la comparación de las frecuencias alélicas de nuestra muestra con la población mestiza mexicana que incluye individuos del estado de Guanajuato (Gorodezky et al. 2001). La Tabla 3 muestra las frecuencias alélicas encontrados por nosotros en comparación con las determinadas por Gorodezky et al. (2001). En la población mestiza mexicana los

alelos DQA1 más frecuentes son en orden descendente *0301, *0501 y *0401 y no *0301, *0501 y *0101, como observamos nosotros. Con este análisis inferimos con mayor claridad la asociación no aleatoria de la infección por HPV16 y el alelo *0301, único alelo del locus DQA1 sobrerrepresentado en la muestra.

Para el locus DQB1 la distribución de los genotipos observados por nosotros fue más uniforme (Tabla 1) y el genotipo más frecuente fue *030101/0302 (13%), seguido por otros con frecuencias muy cercanas. Al comparar nuestras frecuencias alélicas con las de Gorodezky et al. (2001) sólo encontramos que el alelo *0603 tiene una frecuencia significativamente mayor en nuestra muestra. Los alelos más frecuentes en la población mestiza son *0301 (*030101 con una tipificación mas fina), *0302 y *0201, igual que en nuestro conjunto de pacientes. En nuestra muestra hubo alelos raros que no pudimos identificar quizá por ser de origen amerindio, entre ellos el que llamamos "Alelo 1", con una frecuencia bastante alta (3.7%) en comparación con otros considerados como más comunes entre la población mestiza.

Las combinaciones de alelos DQA1/DQB1 más comunes fueron *0301/*0302 (12.6%) y *0501/*030101 (11.1%), seguidos por *0301/*030101 y *0401/*0402, ambos en el 5.2% de las pacientes (Tabla 4). En la población mestiza mexicana utilizada como control los haplotipos más comunes son *0301/*0302 y *0401/*0402, cada uno de los cuales en asociación con el alelo DRB1*0407 y el DRB1*0802, respectivamente, representan combinaciones clásicas de la población amerindia.

Variación de la secuencia nucleotídica del ORF L1

Las 26 secuencias nucleotídicas completas del ORF L1 de HPV16 incluidas en este trabajo tuvieron 1503-1509 nucleótidos debido a que en algunas detectamos pequeñas deleciones. Antes de iniciar los análisis editamos cada secuencia para 1) añadir la porción correspondiente a los oligonucleótidos en los casos en que éstos no estaban incluidos en los datos de secuenciación, 2) ensamblar las dos regiones secuenciadas, 3) confirmar las sustituciones de nucleótidos encontradas (consideramos las sustituciones encontradas al menos en dos de las 2.7 veces o

más que fue secuenciada cada muestra o esclarecidas al analizar el cromatograma; indicamos también las que a pesar de este análisis fueron dudosas) y 4) corregir los cambios en las secuencias L1 de HPV16 que introdujo el uso de oligonucleótidos consenso. Posteriormente comparamos las secuencias nucleotídicas con la secuencia de la variante europea de referencia, E-P (acceso en GeneBank: NC_001526) a partir de la cual determinamos las sustituciones correspondientes (Tabla 5). El alineamiento producto de esta comparación de secuencias nucleotídicas mostró una similitud cercana al 98%, siendo todas variantes del gen L1 de HPV16, el más relacionado filogenéticamente con HPV11 (Fig. 6).

Entre las posiciones analizadas de los 1509 nucleótidos, 59 (3.9%) contenían variaciones puntuales y 33 (56%) de estas estuvieron en muestras únicas (cambios singulares). Todas las muestras contenían ocho cambios que ya han sido observados en todos los aislados de HPV16 reportados en la literatura después del aislado de referencia: carecían de C en la posición 604 y A en la posición 798, contenían la inserción ATC en las posiciones 1266, 1267 y 1268, respectivamente y la delección CAT en las posiciones 1318, 1319 y 1320. Además de estos ocho eventos característicos, el 58% (15) de los aislados tuvo al menos un cambio nucleotídico respecto a la secuencia de referencia. Entre estos 51 polimorfismos de un solo nucleótido (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 33 (65%) fueron cambios no sinónimos y 18 (35%) fueron cambios sinónimos, con una frecuencia máxima de nueve cambios no sinónimos por aislado. La mayoría (82%) de los cambios no sinónimos fueron singulares (i.e., ocurrieron en un solo aislado) y aparecieron especialmente en tres aislados (el aislado 0014 con siete cambios de aminoácido singulares; el aislado 0122 con seis cambios de aminoácido singulares y el 0124 con cuatro cambios de aminoácido singulares). La muestra 0123 tuvo una delección de seis pares de bases que implica la pérdida de dos residuos aminoacídicos.

De acuerdo a la clasificación de Yamada et al. (1997) las secuencias analizadas corresponden a dos subtipos de HPV16: el Europeo (E) en 21 muestras (81%) y el Asiático-Americano (AA) en cuatro muestras (15.4%). La

clasificación de una sola muestra no pudo ser definida por contener nucleótidos característicos del subtipo E en algunas posiciones y del subtipo AA en otras (Fig. 5); en el árbol basado en la secuencia de nucleótidos esta muestra se agrupa con las del subtipo E (Fig. 6). Entre los dos subtipos de HPV16 identificados encontramos las variantes indicadas también en la Fig. 7.

La clasificación de las variantes se basó en los 14 cambios indicados en la Tabla 5 y es consistente con la agrupación de las muestras en el dendrograma de las secuencias nucleotídicas (Fig. 5). Esta agrupación discrepa de la agrupación de las muestras en el dendrograma basado en la secuencia de aminoácidos (Fig. 8) debido a que el número de cambios no sinónimos encontrados por nosotros es más alto que los reportados antes (Yamada et al. 1997, Base de datos de ETSs Los Alamos National Laboratory 1996). Entre estas discrepancias resaltan dos muestras: 1) la 0119 que se agrupa con el subtipo E por su secuencia nucleotídica y con el subtipo AA por su secuencia de aminoácidos y 2) la muestra 0133, indefinida según la clasificación de Yamada et al. (1997) pero que corresponde al subtipo E por su secuencia nucleotídica y al subtipo AA por su secuencia de aminoácidos; esta última tiene otra serie de nucleótidos característicos del subtipo AA (Tabla 5).

Consecuencias de la variación en la secuencia nucleotídica del ORF L1

Sobre la estructura y función de la proteína L1

Entre los 33 cambios de aminoácidos inferidos de las secuencias nucleotídicas de L1 hay 16 (48.5 %) que parecen no haber sido descritos. Las sustituciones de aminoácidos se distribuyen a lo largo de la proteína L1 pero se concentran en las asas que conectan las hélices y las hojas β que conforman la estructura secundaria de la proteína (ver Fig. 9). Estas sustituciones pueden tener efectos estructurales a varios niveles: 1) sobre la estructura secundaria y terciaria de la proteína L1, 2) sobre la formación de los pentámeros que conforman los capsómeros y 3) sobre el ensamble de los pentámeros para formar los viriones icosaédricos.

Los efectos estructurales teóricos de los cambios de aminoácidos sobre la estructura secundaria y terciaria fueron determinados modelando la estructura de la proteína L1 con el programa Swiss Model. La Figura 10 muestra los cambios en la estructura secundaria de los aislados respecto al aislado K02718. En la figura sólo aparecen los resultados de muestras con los cambios más drásticos (0123 y 0305) y la del aislado 0002 en representación de las 24 muestras restantes. Todas las muestras tuvieron la hélice cinco (*h5*) más larga que el aislado de referencia, del que difieren por tener A en lugar de L en la posición 473. La estructura terciaria de las diferentes proteínas L1 se observa aparentemente intacta. Los aislados 0123 y 0305 tuvieron cambios adicionales en la estructura secundaria que se describen a continuación.

El aislado 0305 perdió la hélice tres (*h3*) debido al cambio T397A. La alanina no puede aportar el puente de hidrógeno que se forma entre T397 y E400 en la proteína normal; este puente es un factor importante en la estabilidad de la *h3* (ver detalle en Fig. 10E y 10F); la falta de este puente implica un giro de casi 180° para L399 que también afecta seriamente la formación de una hélice. En el aislado 0123 la delección de los aminoácidos T212 y L213 tuvo como consecuencia la pérdida de la hélice 210-213.

Como la mayoría de los cambios de aminoácidos ocurrieron en las asas conectoras, responsables de las interacciones entre los monómeros de L1, su efecto no pudo ser modelado como para la estructura secundaria de L1; por tanto el significado de la mayoría de las sustituciones no puede determinarse con los datos de este trabajo. Sin embargo, por otros trabajos se conocen algunas sustituciones que afectan la formación de los pentámeros y de la cápside viral o de los pseudoviriones, entre ellas F50L (Carter et al. 2003), P78R, F83S, R97W (Touze et al. 1998), C175S (Li et al. 1998), H202D, D223G, N327S/I385M, y F446S (Yang et al. 2005). En dos de nuestros aislados (0124 y 0316) encontramos el cambio C175S. La cisteína 175 forma un puente disulfuro con la cisteína de la posición 428. Este puente es conservado en los diferentes tipos de HPV ya que se encuentra en el asa *E-F*, que junto con las hélices dos, tres y cuatro (*h2*, *h3* y *h4*) constituyen las regiones responsables de las interacciones entre pentámeros,

necesarias para mantener la estructura icosaédrica de la cápside. Ninguno de los aislados tuvo alguno de los otros cambios mencionados arriba.

Finalmente en la región 495-506, dominio de unión inespecífico al DNA que participa en el empaque del genoma viral, ocurrió un cambio de A por T (A499T) que podría favorecer el proceso de empaque de los viriones ya que esa región tiende a ser muy rica en residuos polares. En la región 484-505, señal de localización nuclear, encontramos el cambio S493L, probablemente sin efectos en esta función.

Sobre la inmunogenicidad de la proteína L1

Las consecuencias inmunológicas de la variabilidad observada en la proteína L1 fueron analizadas en función de los siguientes aspectos:

1. Exposición de epítomos

Las regiones más variables de la proteína L1 en todos los tipos de HPV son las que quedan expuestas en la superficie del virión y a la vez son responsables de la variación en la especificidad antigénica entre tipos y aún en el mismo tipo viral. Estas regiones corresponden a las asas conectoras *D-E*, *F-G* y *H-I* (ver Fig. 10A). En el asa *D-E* hubo ocho cambios de aminoácidos, todos singulares; en el asa *F-G* no hubo ningún cambio, y en el asa *H-I* estuvieron los cambios T353P (cinco aislados) y E368S (un aislado). Los cambios en el asa *D-E* se dieron en cinco aislados (0014, 0058, 0122, 0123 y 0124), uno de los cuales tuvo tres cambios en esta región (0124). El asa *E-F* no está directamente expuesta a la superficie, pero en ella ocurrieron los cambios C175S (ya descrito), T176N, T203S y F205L. Como se mencionó antes, el asa *E-F* tiene un papel importante en las interacciones entre monómeros, ya que se asocia directamente con el asa *H-I* del monómero vecino, lo cual puede explicar por qué se han descrito varios anticuerpos neutralizantes para *E-F* (Williams et al. 2002, Luxton et al. 2003).

Otras regiones expuestas en la VLP según los modelos estructurales de la cápside de HPV16 son las 1-20 y 82-96 en el extremo amino terminal de L1 y los aminoácidos 402-449 del extremo carboxi terminal. En la región 1-20 encontramos

dos cambios (S19F y K20G) en aislados distintos; en la segunda región N-terminal no hubo cambios. En la zona C-terminal, también conocida como brazo C-terminal no observamos cambios, salvo un caso en el cual un nucleótido resultó ambiguo y no pudimos resolver si hubo cambio en W402.

2. Asociaciones entre subtipos de HPV16 y alelos MHC II

Algunos autores proponen que la oncogenicidad diferencial de las variantes de HPV16 ocurre en un contexto poblacional (Matsumoto et al. 2003) por lo cual decidimos ver si los subtipos de HPV16 identificados por nosotros muestran alguna tendencia a asociarse con ciertos alelos de los loci HLA II.

En el caso del alelo DQA1 las pacientes resultaron estar infectadas indiscriminadamente por el subtipo E o AA de HPV16. Hubo al menos una mujer portadora de cada alelo entre las infectadas por el subtipo E, el número de pacientes con un alelo determinado siguió el patrón de la frecuencia alélica y la distribución fue proporcional al número de aislados de cada subtipo, aunque no hubo pacientes con el alelo *0102 infectadas por el subtipo AA (Fig. 11). Para el locus DQB1 encontramos que las pacientes con el alelo *0603 estaban infectadas únicamente por virus del subtipo E (Fig. 12), al igual que las pacientes portadoras del Alelo 1, mientras que las mujeres portadoras de los alelos *0202 y Alelo 2 sólo estaban infectadas por el subtipo AA.

El caso de los alelos DQA1*0102, DQB1*Alelo 1 y DQB1*Alelo 2 puede ser consecuencia de la baja frecuencia de estos alelos. La frecuencia de DQB1*0603 (15%), tercer alelo más frecuente del locus DQB1, sugiere que el alelo puede estar relacionado a susceptibilidad al subtipo E; sin embargo, las pacientes consideradas para hacer esta asociación fueron sólo 24 (fueron excluidas la paciente con subtipo indefinido y las que tenían algún locus no tipificado), lo cual genera una muestra muy pequeña en la que las diferencias resultan sin valor estadístico; posiblemente por esta razón la probabilidad de que la proporción de pacientes DQB1 *0603+VPH16-E difiera de la de pacientes DQB1*0603+VPH16-AA no es significativa ($p = 0.68$).

3. Afinidad de los epítomos por las moléculas HLA II

Cada molécula del complejo mayor de histocompatibilidad tiene una afinidad característica para cada péptido. Usando las matrices del programa Rankpep pudimos predecir nonapéptidos de la proteína L1 de cada uno de los aislados de HPV16 capaces de unirse a las moléculas MHC II más comunes en las pacientes (DQA1*0301/DQB1*0302), y para la combinación DQA1*0502/DQB1*0201, que aunque no es la segunda más frecuente, está entre las pocas combinaciones para las cuales el programa tiene matrices. También pudimos predecir los epítomos afines al alelo DQB1*030101 porque éste por sí solo puede determinar la especificidad antigénica de una molécula DQ.

La Tabla 6 contiene el listado de nonapéptidos predichos para estas combinaciones. Catorce (40%) de los epítomos predichos caen por completo en las regiones expuestas y 12 (34.3%) no habían sido descritos. Entre los 12 nuevos epítomos, uno (165-174, caso DQA1*0301/DQB1*0302) cae en una región expuesta y 11 en regiones internas de la cápside (estos los consideraremos como epítomos lineales ya que probablemente sólo funcionan como antígenos después de ser procesados). Identificamos dos epítomos neutralizantes ya descritos para la combinación DQA1*0501/DQB1*030101, cuatro para DQA1*0301/DQB1*0302 y cinco para el alelo DQB1*0301. Dos casos independientes (diferente aislado y epítomo: aislados 0122 y 0124 y epítomos 131-140 y 144-153, respectivamente) perdieron un epítomo neutralizante.

La región 260-282 contiene epítomos de unión a los tres determinantes de especificidad analizados. Los péptidos predichos en esta región estuvieron entre los tres de mayor afinidad por las respectivas moléculas DQ. En esta región se encuentran los principales epítomos neutralizantes contra HPV16 conocidos. La segunda región con epítomos para los tres casos fue 469-483; dos de estos casos tuvieron afinidad baja y otro la afinidad más alta (Fig. 12); algunos aislados tienen sustituciones que alteran la capacidad de unión de los péptidos de esta región.

Los aislados de L1 HPV16 empleados para producir las VLPs son el 114/K, 114/B y el Rochester (White et al. 1999) y su secuencia de aminoácidos es idéntica a la de la variante E-P. Las gráficas del perfil de epítomos de las variantes

para la combinación DQA1*0301/DQB1*0302 (Fig. 13) indican que la proteína NC_01526 tiene un potencial inmunogénico mucho menor que nuestros aislados. Sin embargo, la mayoría de nuestros aislados (84.6%) comparten el perfil de epítomos para este tipo de moléculas MHC II con el de los aislados con los que se hacen las VLPs. Aunque 261-270 es el principal epítomo neutralizante descrito para HPV16, para esta combinación el epítomo con la mayor afinidad es el 471-480. Este epítomo sólo aparece en las muestras del subtipo AA, mientras en el subtipo E este nonapéptido tiene L en lugar de F en la cuarta posición (epítomo 471-480b), lo cual reduce su afinidad por las mismas moléculas MHC II. Otras posiciones que afectan el perfil de epítomos para esta combinación de alelos DQA1/DQB1 respecto a la variante E-P son L113E, A137S y N138K, todas de distintas muestras únicas. Los epítomos 131-140 y 261-270 caen en las asas conectoras *D-E* y *F-G* respectivamente, expuestas a la superficie; el epítomo 471-480 cae en el asa C-terminal; los 232-241 y 426-435 están en regiones que implican asas y hélices; el 28-37 está en una hoja beta y el 105-114 en una hélice. Todos los epítomos predichos para esta combinación de alelos alcanzan el umbral de unión y están dentro del 85% de los péptidos con mayor afinidad.

En el caso del genotipo DQA1*0501/DQB1*0201 los perfiles de los epítomos de nuestros aislados y el de los aislados con que se produce la VLP (Fig. 14) muestran más semejanza con la proteína de referencia que en el caso del genotipo DQA1*0301/DQB1*0302; además observamos que el epítomo conservado 264-273 tiene una calificación más alta que todos los epítomos predichos para esa molécula MHC II. La sustitución L113E aumenta considerablemente la afinidad del epítomo 107-116; la sustitución T353P (característica del subtipo AA), la L470F (presente sólo en la muestra 0058) y la L475F (del subtipo AA) cambian ligeramente la afinidad de estos epítomos lineales de L1. Es importante anotar que ninguno de los epítomos predichos para este genotipo alcanzó el umbral de unión y por tanto, no están entre el 85% de los péptidos con mayor afinidad por esta combinación de moléculas. Los dos nonapéptidos con mayor calificación, 107-116 y 264-273, forman la hoja beta *D* y el asa *F-G* respectivamente.

Un solo alelo del locus DQ también puede definir la especificidad antigénica, especialmente el gen DQB1 por ser el más polimórfico. Por ello empleamos la matriz de Rankpep para predecir los epítomos que podrían ser presentados por el alelo DQB1*0301, el de mayor frecuencia entre las pacientes tipificadas (Fig. 15). Nuestros resultados indican que para este genotipo el perfil de epítomos está muy conservado entre las variantes de HPV16; también analizamos los cambios en el péptido 133-142, del cual hay cuatro variantes con diferente afinidad por moléculas MHC II codificadas por el alelo DQB1*0301, la cual aumenta con un aminoácido de carga positiva en la posición 6. Otros cambios de aminoácido con leves efectos sobre el perfil inmunogénico son T203S, F205L, T397A y L475F. Entre los epítomos predichos dos no alcanzan el umbral de unión; de los seis restantes el 133-142 y el 126-135 (nótese que se traslapan) caen en el asa *D-E* y el 273-282 en el asa *F-G*.

El servidor Rankpep tiene matrices para muy pocos alelos DQA y DQB por lo cual no pudimos extender la predicción a otros alelos; sin embargo, el análisis de los efectos posibles con dos determinantes de especificidad DQA y tres DQB indica que al menos 10 de los 33 cambios de aminoácido identificados están involucrados. El perfil de los epítomos para los mismos alelos no estuvo asociado al subtipo viral ya que en un solo caso un aminoácido característico del subtipo AA aumentó la afinidad del péptido.

DISCUSIÓN

Aunque hay un trabajo sobre las implicaciones de los polimorfismos del MHC en la susceptibilidad de las mujeres mejicanas al CaCu (Silva et al. 1999), este es el primero que se hace con un nivel de tipificación fina de los alelos. El nivel de tipificación de HLA va desde el serotipo (determinado por pruebas de aglutinación), nivel medio (por determinación de regiones semiconservadas de los genes), hasta el nivel de resolución alto (determinado por la secuencia de nucleótidos del alelo, y que indica los cambios de aminoácido en las glicoproteínas MHC). El nivel de tipificación es importante porque genera información detallada sobre la estructura de la molécula MHC. Contar con estos detalles fue lo que nos permitió vincular los alelos de susceptibilidad con el repertorio antigénico del virus. El nivel de tipificación también es muy importante porque no todos los alelos de un serotipo (clasificación media y baja) se asocian a la susceptibilidad. En este sentido, en este trabajo estuvimos trabajando en los mejores niveles en que se pueden explorar las interacciones MHC-epítomo en la actualidad.

Alelos HLA II en las mujeres de la muestra

La sobrerrepresentación del alelo DQA1*0301 en las mujeres incluidas en este trabajo por tener lesiones preneoplásicas y estar infectadas por HPV16 extiende la evidencia de que todas las combinaciones homo y heterocigotas de alelos DQA*03 contribuyen a la susceptibilidad para desarrollar lesiones preneoplásicas y CaCu (Zoodsma et al. 2005b). Las dos principales combinaciones DQA1/DQB1 identificadas por nosotros, DQA1*0301/DQB1*0302 y DQA1*0501/DQB1*030101, ocurrieron en el 24% de las pacientes y ambos haplotipos han sido asociados a la susceptibilidad a lesiones preneoplásicas y CaCu en el meta-análisis de Zoodsma et al. (2005b), a aunque DQA1*0501 por sí solo no ha sido identificado como un alelo de riesgo.

El genotipo DQA1*0301/DQB1*0302 junto con el alelo DRB1*0407 y el *0501/*030101 con el DRB1*1406 conforman el 67% de los haplotipos de la población mestiza mexicana, y son genotipos de origen amerindio (Gorodezky et al. 2001). Esta frecuencia probablemente contribuye sustancialmente al incremento de la susceptibilidad de las mujeres mexicanas al CaCu (Silva et al. 1999), ya que la población mestiza mexicana tiene un aporte ancestral amerindio del 40% (Cerdeña-Flores et al. 2002).

Los alelos DQB1*0201 y todos los DQB1*03 podrían estar sobrerrepresentados en la muestra debido a que son alelos de riesgo para el desarrollo de lesiones preneoplásicas y CaCu. Los alelos DQA1*0101 y *0103 se consideran alelos protectores contra la infección por HPV, por lo cual esperábamos que su proporción fuera significativamente menor en las pacientes que en la población general. También para DQB1*0501 y *0603 esperábamos frecuencias menores ya que las mujeres portadoras de alelos DQB1*05 incluyendo *0501 tienen menor riesgo de desarrollar lesiones preneoplásicas y CaCu y el alelo DQB1*0603 se considera un alelo de protección (Zoodtsma et al. 2005b). Sin embargo, encontramos al alelo DQB1*0603 sobrerrepresentado y el otro tuvo una frecuencia normal. Estos hallazgos sugieren que la susceptibilidad a la infección por HPV podría estar dissociada de la susceptibilidad al desarrollo de lesiones neoplásicas.

Variación en la secuencia de la proteína L1

La variación en el ORF L1 observada en este trabajo (3.9%) es la más alta que ha sido reportada hasta ahora, ya que en trabajos previos estuvo entre 2.2 y 2.9% (Yamada et al. 1995, Base de datos ETSs Los Alamos -1996, Chen et al. 2005). Los dos últimos trabajos citados incluyeron sólo las posiciones que implican cambios no sinónimos y si hiciéramos una comparación similar con nuestros aislados, la variabilidad resultaría del 2.2%.

El hecho de que el 56% de los cambios observados haya sido singular (i.e., en un solo aislado) y la mayoría hayan sido no sinónimos (casi el 50% de éstos no

habían sido descritos antes) sugiere que las variantes analizadas por nosotros difieren significativamente en ciertas posiciones nucleotídicas de las de otras regiones geográficas y que estas diferencias no se deben a errores de copiado durante la amplificación con la Taq polimerasa ya que cada polimorfismo fue observado en dos o más reacciones de secuenciación independientes para cada aislado y confirmado mediante el análisis de los cromatogramas respectivos.

Aunque en los aislados hubo numerosos cambios singulares de aminoácidos, la variabilidad en las secuencias aminoacídicas se concentró en las asas conectoras, como ya se ha descrito, y la frecuencia máxima de sustituciones aminoacídicas por muestra encontrado por nosotros (nueve) fue similar a las observadas en trabajos en los cuales se han identificado aislados hasta con siete sustituciones de aminoácidos (Base de datos ETSs Los Alamos National Laboratory-1996). A pesar de la variabilidad observada por nosotros, las diferencias entre aislados conservan la proporción esperada de no más del 5% entre variantes de HPV16 (Chan et al. 1992, Yamada et al. 1995). Por otra parte, la secuenciación confirmó que todas las muestras efectivamente son del tipo HPV16, lo cual valida el sistema de tipificación basado en PCR-RFLP empleado en nuestro laboratorio; otro hecho que valida esta tipificación es que la similitud entre nuestros aislados y HPV11 (el tipo mas parecido a HPV16) es cercana al 80%, que está en el rango de diferencias que permiten definir un tipo de HPV.

Subtipos y variantes de HPV16 en los aislados

La secuenciación de productos de amplificación de la región E6 que acaba de ser realizado por nuestro grupo (para otro conjunto de muestras de pacientes infectadas por HPV16, también tipificadas con el método de PCR-RFLP) también demostró que el subtipo E es el predominante en la región y que el único subtipo adicional circulante es el AA (Pineda-Martínez 2005). E parece ser el subtipo de HPV16 predominante en México (Berumen et al. 2001, González-Losa et al. 2004), pero el subtipo AA es mucho más oncogénico (Ordonez et al. 2004) y su frecuencia es significativamente mayor en las pacientes con carcinoma invasor

que en las pacientes con lesiones de bajo grado. En este trabajo no contamos con información suficiente para esclarecer la asociación entre el CaCu invasor y el subtipo de HPV16.

La clasificación de subtipos y variantes mediante el análisis de los cambios en las 14 posiciones nucleotídicas de L1 es equivalente a los cambios en las posiciones nucleotídicas en la secuencia de E6 propuestas por Yamada et al. (1997). Sin embargo, las posiciones de L1 son menos polimórficas y por tanto menos potentes para identificar variantes, especialmente las del subtipo E. Quizás por esta falta de sensibilidad todos nuestros aislados de este subtipo correspondieron a la variante E-P.

No hubo concordancia completa entre la clasificación en subtipos virales por su agrupamiento en el dendrograma de secuencias nucleotídicas y las 14 posiciones propuestas por Yamada et al. (1997) y la clasificación en subtipos derivada del dendrograma de las secuencias de aminoácidos. Además una muestra no pudo clasificarse por el método de Yamada et al. (1997). Es posible que el uso de otros métodos para la construcción de árboles filogenéticos o el cambio de los parámetros usados aquí permita agrupar las muestras no coincidentes en diferentes árboles. Es importante resolver esta inconsistencia debido a que el subtipo AA es el más oncogénico de HPV16 y su identificación tiene alto valor pronóstico. Si el aumento de la oncogenicidad está directamente relacionado con la actividad de las oncoproteínas E6 y E7 o con la inmunogenicidad contra las oncoproteínas o contra la proteína L1, la identificación del subtipo probablemente debe basarse más en los cambios que reflejen la actividad biológica de las proteínas que en las sustituciones sinónimas.

Consecuencias estructurales de la variación en L1

Observamos dos tipos de cambios en la estructura secundaria de la proteína: aumento del tamaño de hélices y pérdida de hélices. En estos cambios estuvieron involucrados un evento de sustitución y uno de delección, respectivamente.

Observamos también la modalidad de pérdida de la capacidad de autoensamble

del pentámero. Las proteínas que pierden las hélices 3 y 5 probablemente tienen una capacidad reducida para formar pseudoviriones por tratarse de hélices que participan en la unión entre pentámeros (Chen et al. 2000, Modis et al. 2002).

Los cambios observados por nosotros implican que la variabilidad en las secuencias de L1 en algunos casos determina la producción de proteínas defectuosas. Los aislados que producen proteínas L1 defectuosas parecen no ser infrecuentes y hay un buen número de publicaciones sobre esta característica (White 1999, Yang et al. 2005). Los papilomavirus parecen recurrir a la complementación (empaquetamiento del genoma mutante en cápsidas de variantes coinfectantes) para mantener en circulación estos genomas mutados. Sin embargo, los defectos encontrados en estas proteínas no parecen ser un mecanismo de escape inmunológico ya que ninguno incluyó la pérdida de alguna de las regiones con epítomos neutralizantes.

Consecuencias inmunológicas de la variación en L1

1. Cambios en los epítomos neutralizantes

Actualmente se acepta que todos los anticuerpos dirigidos contra epítomos localizados en asas expuestas en la superficie del virión son neutralizantes (i.e. son capaces de destruir el virus o inhibir su infectividad). Esta característica hace que los aminoácidos de estas regiones sean considerados como los más importantes para asegurar la eficacia de la vacunación.

En este trabajo observamos cambios en siete de los 11 epítomos neutralizantes predichos en las asas conectoras expuestas, los cuales afectarían la afinidad hacia los diferentes alelos de MHC II analizados. En dos aislados virales independientes el cambio involucró la pérdida completa del epítomo. La frecuencia de aislados virales con pérdida de epítomos neutralizantes fue baja (7.7%), pero estos casos representan un mecanismo de evasión de la respuesta inmunológica.

En los 26 aislados fue detectado un nonapéptido posible con afinidad aparente a las glicoproteínas esperadas en pacientes con el genotipo

DQA1*0301/DQB1*0302 que no había sido descrito antes. Este péptido cae en el asa *E-F*, quedando expuesto a la superficie del virión. Su afinidad es 78% menor que la del péptido ideal, por lo cual su uso no parece promisorio.

2. Variación en los epítomos lineales

Los epítomos conformacionales señalados antes constituyen el blanco de los anticuerpos neutralizantes, pero también se han descrito varios epítomos lineales de L1 cuya actividad antigénica, en contraste con la de los conformacionales, ocurre en regiones conservadas de la proteína y confiere inmunidad cruzada contra otros tipos virales (Combita et al. 2002). La mayoría de estos determinantes antigénicos es no-neutralizante, a pesar de que los títulos de anticuerpos contra ellos son los más altos (Duggan-Keen et al. 1998). Dentro de este grupo de epítomos logramos predecir 11 que no habían sido descritos antes. Además de su importancia para conferir protección cruzada, los epítomos lineales podrían ser de utilidad como marcadores diagnósticos ya que se ha observado que los títulos de anticuerpos contra algunos difieren significativamente en pacientes con lesiones de bajo grado y de alto grado (Rocha-Zavaleta et al. 2004, Urquiza et al. 2005).

3. Cambios en el perfil antigénico de las proteínas

Los perfiles antigénicos de los aislados tendieron al predominio de epítomos con mayor afinidad de unión a las moléculas MHC II que los de la variante vacunal, y fueron modificados por el 30% de las sustituciones de aminoácido encontradas en los aislados, lo cual indica un aporte significativo de variabilidad, aunque permanecieron epítomos lineales y conformacionales conservados con potencial para generar inmunoprotección.

Los péptidos antigénicos de L1 predichos para nuestros aislados de HPV16 no se acercan a los péptidos ideales para las moléculas MHC II, ya que ninguno alcanza más del 45% de la afinidad del péptido ideal correspondiente. Estas predicciones indican además que la variabilidad de la proteína L1 sí parece jugar un papel relevante en la generación de la respuesta inmune mediada por células

dendríticas ya que al menos 10 (30%) de los cambios de aminoácido encontrados modifican el perfil antigénico de las proteínas.

Implicaciones de los alelos identificados sobre la eficacia de la vacunación

Nuestros hallazgos indican que en esta región del país circulan variantes de HPV16 con epítomos que parecen tener mayor afinidad hacia las moléculas MHC II que los de la proteína L1 de la variante vacunal. Si los epítomos de los virus circulantes no pueden inducir inmunidad protectora contra las infecciones, cabe esperar que menos podrán hacerlo los epítomos vacunales de menor afinidad. La situación podría ser aún más complicada en el caso de la vacunación de una población en la cual predomine el haplotipo HLA DQA1*0301/DQB1*0302, asociado con la susceptibilidad para desarrollar lesiones preneoplásicas graves (Zoodsma et al. 2005b).

Nuestras observaciones implican que en esta región la vacuna basada en VLPs de HPV16 podría ser menos eficaz que en otras poblaciones donde la poza genética de los alelos MHC II predominantes determine mayor afinidad hacia los determinantes antigénicos principales de las VLPs.

La estrategia de vacunación profiláctica depende de la aplicación parenteral de la proteína L1 recombinante autoensamblada en forma de VLPs, dado que la protección depende de epítomos conformacionales. Sin embargo, los epítomos inmunodominantes que conforman las asas de L1 quizás podrían ser empleados como péptidos independientes o en construcciones poliepítomo ya que en realidad son lineales (un epítomo conformacional depende de aminoácidos no contiguos en la estructura de la proteína).

El uso de VLPs completas para inmunizar tiene la ventaja de que estas partículas son polivalentes ya que cada pentámero exhibe el epítomo cinco veces, hay 72 pentámeros por VLP y existe un arsenal de epítomos adicionales a los neutralizantes. La principal desventaja de las VLPs es el costo de producción, mucho mayor que el de polipéptidos no ensamblados. El uso de polipéptidos no ensamblados tendría la ventaja de facilitar la inmunización simultánea con

epítomos de diferentes tipos y variantes virales y sería más adaptable para la vacunación dirigida al fondo genético de la población en riesgo.

REFERENCIAS

- Arguello JR, Madrigal JA. 1999. HLA typing by reference strand mediated conformation analysis (RSCA). *Rev Immunogenet.* 1:209-19.
- Arguello JR, Soteriou B, McWhinnie A, Garcia C, Perez-Rodriguez M, et al. Typing for HLA alleles by Strand Mediated Conformation Analysis (RSCA). Manual técnico de International Histocompatibility Working Group.
<http://www.ihwg.org/tmanual/TMcontents.htm>.
- Base de datos de secuencias en enfermedades de transmisión sexual. Los Alamos National Laboratory Bioscience Division. 1996. <http://hvp-web.lanl.gov/>
- Base de datos IMGT/HLA. 2006. <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/>.
- Berry JM, Palefsky JM. 2003. A review of human papillomavirus vaccines: from science to clinical trials. *Front Biosci* 8:s333-45.
- Berumen J, Ordoñez RM, Lazcano E, Salmeron J, Galvan SC, Estrada RA, Yunes E, Garcia-Carranca A, Gonzalez-Lira G, Madrigal-de la Campa A. 2001. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J Natl Cancer Inst.* 93: 1325-30.
- Carrillo A, Mohar A, Meneses A, Frías-Mendivil M, Solorza G, Lizano M. 2004. Utilidad en la combinación de oligonucleótidos universales para la detección del virus del papiloma humano en cáncer cervicouterino y lesiones premalignas. *Salud Publica Mex.* 46:7-15.
- Carter JJ, Wipf GC, Benki SF, Christensen ND, Galloway DA. 2003. Identification of a human papillomavirus type 16-specific epitope on the C-terminal arm of the major capsid protein L1. *J. Virol.* 77: 11625-32.
- Cerda-Flores RM, Villalobos-Torres MC, Barrera-Saldana HA, Cortes-Prieto LM, Barajas LO, et al. 2002. Genetic admixture in three Mexican Mestizo populations based on D1S80 and HLA-DQA1 loci. *Am J Hum Biol.* 14:257-63.
- Chakrabarty O, Krishna S. 2003. Molecular interactions of 'high risk' human papillomaviruses E6 and E7 oncoproteins: implications for tumour progression. *J Biosc.* 28:337-48.

- Chan SY, Ho L, Ong CK, Chow V, Drescher B, et al. 1992. Molecular variants of human papillomavirus type 16 from four continents suggest ancient pandemic spread of the virus and its coevolution with humankind. *J Virol.* 66:2057-66.
- Chen XS, Garcea RL, Goldberg I, Casini G, Harrison SC. 2000. Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol Cell.* 5:557-67.
- Chen Z, Terai M, Fu L, Herrero R, DeSalle R, Burk RD. 2005. Diversifying selection in human papillomavirus type 16 lineages based on complete genome analyses. *J Virol.* 79:7014-23.
- Christensen ND, Dillner J, Eklund C, Carter JJ, Wipf GC, Reed CA, Cladel NM, Galloway DA. 1996. Surface conformational and linear epitopes on HPV-16 and HPV-18 L1 virus-like particles as defined by monoclonal antibodies. *Virology.* 223:174-84.
- Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Muñoz N, Franceschi S. 2003. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer.* 88:63-73.
- Combita AL, Touze A, Bousarghin L, Christensen ND, Coursaget P. 2002. Identification of two cross-neutralizing linear epitopes within the L1 major capsid protein of human papillomaviruses. *J Virol.* 76:6480-86.
- Duggan-Keen MF, Brown MD, Stacey SN, Stern PL. 1998. Papillomavirus vaccines. *Front Biosci.* 3:D1192-208.
- Fujinaga Y, Shimada M, Okazawa K, Fukushima M, Kato I, Fujinaga K. 1991. Simultaneous detection and typing of genital human papillomavirus DNA using the polymerase chain reaction. *J Gen Virol.* 72:1039-44.
- Gonzalez-Losa MR, Laviada Mier y Teran MA, Puerto-Solis M, Garcia-Carranca A. 2004. Molecular variants of HPV type 16 E6 among Mexican women with LSIL and invasive cancer. *J Clin Virol.* 29:95-98.
- Gorodezky C, Alaez C, Vazquez-Garcia MN, de la Rosa G, Infante E, et al. 2001. The genetic structure of Mexican Mestizos of different locations: tracking back their origins through MHC genes, blood group systems, and microsatellites. *Hum Immunol.* 62:979-91.
- Harper DM, Franco EL, Wheeler C, Ferris DG, Jenkins D, Schuind A, et al. 2004. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *Lancet.* 364 (9447):1757-65.

- Hwang T. 1999. Detection and typing of human papillomavirus DNA by PCR using consensus primers in various cervical lesions of Korean women. *J Korean Med Sci.* 14:593-99.
- Kaufmann AM, Backsch C, Schneider A, Durst M. 2002. HPV induced cervical carcinogenesis: molecular basis and vaccine development. *Zentralbl Gynakol.* 124:511-24.
- Kirnbauer R, Chandrachud LM, O'Neil BW, Wagner ER, Grindlay GJ, et al. 1996. Virus-like particles of bovine papillomavirus type 4 in prophylactic and therapeutic immunization. *Virology.* 219:37-44.
- Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, Brown DR, Barr E, et al. 2002. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N Engl J Med.* 347:1645-51.
- Kumanovics A, Takada T, Lindahl KF. 2003. Genomic organization of the mammalian MHC. *Annu Rev Immunol.* 21:629-57
- Lazo PA. 1999. The molecular genetics of cervical carcinoma. *Br J Cancer.* 80:2008-18.
- Lewis MJ. 2004. A situational analysis of cervical cancer in Latin America and the Caribbean. Organización Panamericana de la Salud, Washington D.C.
- Li M, Beard P, Estes PA, Lyon MK, Garcea RL. 1998. Intercapsomeric disulfide bonds in papillomavirus assembly and disassembly. *J Virol.* 72:2160-67.
- Luxton JC, Nath R, Derias N, Herbert A, Shepherd PS. 2003. Human papillomavirus type 16-specific T cell responses and their association with recurrence of cervical disease following treatment. *J Gen Virol.* 84:1063-70.
- Man S. 1998. Human cellular immune responses against human papillomavirus in cervical neoplasia. *Expert reviews in molecular medicine.* ISSN 1462-94. <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/smc/txt001smc.pdf>.
- Martinez-Contreras LA. 2005. Tesis de maestría en biología molecular. Tipos de papilomavirus de alto riesgo circulantes en mujeres de San Luis Potosí y Guanajuato. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. San Luis Potosí, Mexico.
- Matsumoto K, Yasugi T, Nakagawa S, Okubo M, Hirata R, et al. 2003. Human papillomavirus type 16 E6 variants and HLA class II alleles among Japanese women with cervical cancer. *Int J Cancer.* 106:919-22.
- Miller MP. 1997. Tools for population genetics analysis (TFPGA). A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by the author.

- Modis Y, Trus BL, Harrison SC. 2002. Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO J.* 21:4754-62.
- Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, et al. 2003. Epidemiological classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Eng J Med.* 348:518-27.
- Odunsi K, Ganesan T. 2001. Motif analysis of HLA class II molecules that determine the HPV associated risk of cervical carcinogenesis. *Int J Mol Med.* 8:405-12.
- Ordonez RM, Espinosa AM, Sanchez-Gonzalez DJ, Armendariz-Borunda J, Berumen J. 2004. Enhanced oncogenicity of Asian-American human papillomavirus 16 is associated with impaired E2 repression of E6/E7 oncogene transcription. *J Gen Virol.* 85:1433-44.
- Pineda-Martínez MA. 2005. Una nueva variante del Papilomavirus humano Tipo 16 circulante en San Luis Potosí. Tesis de maestría en biología molecular. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. San Luis Potosí, Mexico.
- Preacher KJ. 2003. Calculation for the Chi-square test. <http://www.unc.edu/~preacher/chisq/chisq.htm>.
- Prendiville W, Davies P. 2004. HPV handbook 1: Human papillomavirus and cervical cancer. Taylor and Francis Group, Abingdon, Oxon, UK.
- Reche PA, Glutting JP, Zhang H, Reinherz EL. 2004. Enhancement to the RANKPEP resource for the prediction of peptide binding to MHC molecules using profiles. *Immunogenetics.* 56:405-19.
- Reddy KJ, Banapour B, Anderson DE, Lee SH, Marquez JP, Carlos MP, Torres JV. 2004. Induction of immune responses against human papillomaviruses by hypervariable epitope constructs. *Immunology.* 112:321-27.
- Rocha-Zavaleta L, Ambrosio JP, Mora-Garcia Mde L, Cruz-Talonia F, Hernandez-Montes J, et al. 2004. Detection of antibodies against a human papillomavirus (HPV) type 16 peptide that differentiate high-risk from low-risk HPV-associated low-grade squamous intraepithelial lesions. *J Gen Virol.* 85:2643-50.
- Ryu KS, Lee YS, Kim BK, Park YG, Kim YW, et al. 2001. Alterations of HLA class I and II antigen expression in preinvasive, invasive and metastatic cervical cancers. *Exp Mol Med.* 33:136-44.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 4:406-25.

- Sasagawa T, Minemoto Y, Basha W, Yamazaki H, Nakamura M, et al. 2000. A new PCR-based assay amplifies the E6-E7 genes of most mucosal human papillomaviruses (HPV). *Virus Res.* 67:127-39.
- Schiffman M, Castle PE. 2003. Human papillomavirus: Epidemiology and public health. *Arch Pathol Lab Med.* 27:930-34.
- Schwede T, Kopp J, Guex N, and Peitsch MC. 2003. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.* 31:3381-3389.
- Scott M, Nakagawa M, Moscicki AB. 2001. Cell-mediated immune response to human papillomavirus infection. *Clin Diagn Lab Immunol.* 8(2):209-20.
- Sercarz EE, Maverakis E. 2003. MHC-guided processing: binding of large antigen fragments. *Nat Rev Immunol.* 3:621-29.
- Silva B, Vargas-Alarcon G, Zuniga-Ramos J, Rodriguez-Reyna TS, et al. 1999. Genetic features of Mexican women predisposing to cancer of the uterine cervix. *Hum Pathol.* 30:626-28.
- Stanley M. 2003. Genital human papillomavirus infections-Current and prospective therapies. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 31:117-124.
- Suri A, Walters JJ, Kanagawa O, Gross ML, Unanue ER. 2003. Specificity of peptide selection by antigen-presenting cells homozygous or heterozygous for expression of class II MHC molecules: The lack of competition. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100:5330-35.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22(22):4673-80.
- Touze A, El Mehdaoui S, Sizaret PY, Mougín C, Muñoz N, Coursaget P. 1998. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 16 variants affects yield of virus-like particles produced in an insect cell expression system. *J Clin Microbiol.* 36:2046-51.
- Urquiza M, Guevara T, Espejo F, Bravo MM, Rivera Z, Patarroyo ME. 2005. Two L1-peptides are excellent tools for serological detection of HPV-associated cervical carcinoma lesions. *Biochem Biophys Res Commun.* 332:224-32.
- Vambutas A, Bonagura VR, Reed EF, Abramson AL, Mullooly V, et al. 2004. Polymorphism of transporter associated with antigen presentation 1 as a potential determinant for severity of disease in recurrent respiratory papillomatosis caused by human papillomavirus types 6 and 11. *J Infect Dis.* 189:871-79.

- van Doornum GJ, Prins M, Pronk L, Coutinho RA, Dillner J. 1994. A prospective study of antibody responses to defined epitopes of human papillomavirus (HPV) type 16 in relationship to genital and anorectal presence of HPV DNA. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1:633-39.
- Villa LL, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, Ault KA, et al. 2005. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *Lancet Oncol.* 6:271-78.
- Walboomers J, Jacobs M, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 189:12-19.
- Wang X, Wang Z, Christensen ND, Dillner J. 2003. Mapping of human serum-reactive-epitopes in virus-like particles of human papillomavirus types 16 and 11. *Virology.* 311:213-21.
- White WI, Wilson SD, Palmer-Hill FJ, Woods RM, Ghim S-j, et al. 1999. Characterization of a major neutralizing epitope on human papillomavirus type 16 L1. *J. Virol.* 73:4882-89.
- Williams OM, Hart KW, Wang EC, Gelder CM. 2002. Analysis of CD4(+) T-cell responses to human papillomavirus (HPV) type 11 L1 in healthy adults reveals a high degree of responsiveness and cross-reactivity with other HPV types. *J Virol.* 15:7418-29.
- Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Munoz N, Bosch FX, Wheeler CM. 1997. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol.* 71:2463-72.
- Yamada T, Wheeler CM, Halpern AL, Stewart AC, Hildesheim A, Jenison SA. 1995. Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments. *J Virol.* 69:7743-53.
- Yang R, Wheeler CM, Chen X, Uematsu S, Takeda K, et al. 2005. Papillomavirus capsid mutation to escape dendritic cell-dependent innate immunity in cervical cancer. *J Virol.* 79:6741-50.
- Zehbe I, Tachezy R, Mytilineos J, Voglino G, Mikyskova I, et al. 2001. Human papillomavirus 16 E6 polymorphisms in cervical lesions from different European populations and their correlation with human leukocyte antigen class II haplotypes. *Int J Cancer.* 94:711-16.

- Zhao X, Rush M, Schwartz S. 2004. Identification of an hnRNP A1-dependent splicing silencer in the human papillomavirus type 16 L1 coding region that prevents premature expression of the late L1 gene. *J Virol.* 78:10888-905.
- Zoodsma M, Nolte IM, Schipper M, Oosterom E, van der Steege G, et al. 2005a. Analysis of the entire HLA region in susceptibility for cervical cancer: a comprehensive study. *J Med Genet.* 42:e49.
- Zoodsma M, Nolte IM, Te Meerman GJ, De Vries EG, Van der Zee AG. 2005b. HLA genes and other candidate genes involved in susceptibility for (pre)neoplastic cervical disease. *Int J Oncol.* 26:769-84.
- zur Hausen H. 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2:342-50.

Tabla 1
Distribución de genotipos para los loci HLA DQA1 y DQB1

Genotipo	DQA1		Genotipo	DQB1	
	Pacientes (n = 52) ^a	FG		Pacientes (n = 54) ^a	FG
*0101/*0101	3	5.8	*0201/*030101	2	3.7
*0101/*0103	1	1.9	*0201/*0302	2	3.7
*0101/*0301	3	5.8	*0201/*0402	3	5.6
*0101/*0401	3	5.8	*0201/*0501	2	3.7
*0101/*0501	1	1.9	*0201/*0603	4	7.4
*0102/*0102	1	1.9	*0202/*030101	1	1.8
*0102/*0301	1	1.9	*030101/*030101	2	3.7
*0102/*0501	2	3.8	*030101/*0302	7	13.0
*0103/*0401	1	1.9	*030101/*0402	5	9.3
*0103/*0501	2	3.8	*030101/*0501	1	1.8
*0301/*0301	18	34.6	*030101/*0603	4	7.4
*0301/*0401	1	1.9	*0302/*0302	2	3.7
*0301/*0501	5	9.6	*0302/*0402	3	5.6
*0401/*0401	1	1.9	*0302/*0501	4	7.4
*0401/*0501	5	9.6	*0302/*0603	2	3.7
*0501/*0501	4	7.7	*0302/*Alelo 1 ^b	3	5.6
			*0402/*0402	1	1.8
			*0402/*0603	1	1.8
			*0402/*Alelo 2 ^b	1	1.8
			*0501/*0501	1	1.8
			*0501/*Alelo 1	1	1.8
			*0603/*0603	2	3.7

FG: Frecuencia genotípica (porcentual)

^a El número de pacientes entre loci difiere porque en algunas muestras no pudieron ser tipificados los dos.

^b Los alelos denominados 1 y 2 probablemente son raros porque no pudieron ser identificados con el DNA de referencia disponible.

Tabla 2
Prueba de desviación del equilibrio Hardy-Weinberg para el locus
HLA DQA1

Genotipo	Observado	Esperado
11	3	0.9423
12	0	0.6731
13	1	0.5385
14	3	6.1923
15	3	1.6154
16	1	3.0962
22	1	0.1202
23	0	0.1923
24	1	2.2115
25	0	0.5769
26	2	1.1058
33	0	0.0769
34	0	1.7692
35	1	0.4615
36	2	0.8846
44	18	10.1731
45	1	5.3077
46	5	10.1731
55	1	0.6923
56	5	2.6538
66	4	2.5433
N	52	

p = 0.0000 S.E. = 0.0000000

Nomenclatura:

- 1 *0101 p
- 2 *0102 q
- 3 *0103 r
- 4 *0301 s
- 5 *0401 t
- 6 *0501 u

x Cualquier alelo excepto *0301

Ecuación de Hardy-Weinberg:

$$p^2 + 2pq + 2pr + 2ps + 2pt + 2pu + q^2 + 2qr + 2qs + 2qt + 2qu + r^2 + 2rs + 2rt + 2ru + s^2 + 2su + 2st + u^2 + 2ut + t^2 = 1$$

ALELO QUE SACO DEL EQUILIBRIO

Genotipo	Observado	Esperado
4 4	18	10.1731
4 x	10	25.6538
x x	24	16.1731
N	52	

p = 0.0000

Tabla 3
Comparación de las frecuencias alélicas de las pacientes
incluidas en este trabajo con una muestra representativa del
Centro de México

DQA1				DQB1			
Alelo	2n = 104	FA	$p^{a,b}$	Alelo	2n = 108	FA	$p^{a,b}$
*0101	14	13.5	0.090	*0201	13	12.0	0.550
*0102	5	4.8	0.409	*0202	1	0.9	0.573 ^b
*0103	4	3.8	0.095	*030101	27	25.0	0.850
*0301	46	44.2	0.005	*0302	23	21.3	0.933
*0401	12	11.5	0.547	*0402	14	13.0	0.847
*0501	23	22.1	0.252	*0501	10	9.3	0.500
				*0603	15	13.9	3×10^{-5} ^c
				Alelo 1	4	3.7	---
				Alelo 2	1	0.9	---

FA: Frecuencia alélica (porcentual).

^a Las frecuencias alélicas para estos loci en el estado de Guanajuato fueron determinadas por Gorodezky et al. (2001).

^b Las diferencias estadísticamente significativas están resaltadas en negritas ($p < 0.05$ con la prueba de χ^2).

^c χ^2 con corrección de Yates (para casos con valores menores a 5 en una celda).

Tabla 4
Combinaciones posibles de moléculas DQA1/DQB1

DQA1	DQB1	Casos ^a	FH ^b	DQA1	DQB1	Casos ^a	FH
*0101	*0201	2	1.5	*0301	*0201	6	4.4
	*030101	2	1.5		*030101	7	5.2
	*0302	3	2.2		*0302	17	12.6
	*0402	4	3.0		*0402	5	3.7
	*0501	2	1.5		*0501	5	3.7
	*0603	2	1.5		*0603	6	4.4
	Alelo 1	2	1.5		Alelo 1	2	1.5
	Alelo 2	1	0.74	*0401	*0201	3	2.2
*0102	*0201	1	0.74		*030101	5	3.7
	*030101	3	2.2		*0302	2	1.5
	*0302	2	1.5		*0402	7	5.2
	*0603	2	1.5		*0603	1	0.74
*0103	*0201	1	0.74		Alelo 1	1	0.74
	*0202	1	0.74		Alelo 2	1	0.74
	*030101	2	1.5	*0501	*0201	4	3.0
	*0402	1	0.74		*0202	1	0.74
	*0603	1	0.74		*030101	15	11.1
					*0302	4	3.0
					*0402	5	3.7
					*0501	1	0.74
					*0603	5	3.7

FH: Frecuencia "haplotípica" (porcentual)

^aSe excluyeron las pacientes en las que no fueron tipificados ambos loci.

^bExpresada como % de pacientes con la combinación DQA1/DQB1. No se consideran haplotipos porque no se tuvo en cuenta la fase gamética.

Tabla 5
Polimorfismos de nucleótidos encontrados en el ORF L1^a

Evento	Tipo	Cambio de aa	Casos (n)	ID
C56T	SN	S19F	1	0122
A58G	SN	K20G	1	0014
A59G	SN	K20G	1	0014
G60A	SS	---	4	0063 0123 0124 0133
G122T	SN	R41I	1	0316
C226T	SN	<u>H76Y</u>	4	0063 0123 0124 0133
C226Y		H76?	1	0122
T273C	SS	---	5	0063 0122 0123 0124 0133
A332W	SN	Q111X	1	0124
T337G	SN	L113E	1	0014
T338A	SN	L113E	1	0014
A349T	SN	I117F	1	0014
A353N	SN	G118X	1	0014
A385G	SN	T128A	1	0124
A387C	SS	---	4	0063 0123 0124 0133
A387G	SS	---	1	0122
T396C	SS	---	1	0058
A408T	SS	---	1	0122
G409T	SN	A137S	1	0122
T414G	SN	N138K	1	0124
G418C	SN	G140R	1	0058
T429G	SN	N143G	1	0123
T436G	SN	C146G	1	0124
A522C	SS	---	1	0316
T523A	SN	<u>C175S</u>	2	0124 0316
C527A	SN	<u>T176N</u>	3	0063 0124
T613T	SN	F205L	1	0014
634-640	D	Δ T212- 213L	1	0122
A678G	SS	---	4	0063 0123 0124 0133
A733G	SS	---	1	0317
A798G	SN	<u>T266A</u>	26	
A1058C*	SN	<u>T353P</u>	5	0063 0122 0123 0124 0133
G1083A*	SS	---	4	0063 0123 0124 0133
G1102A	SN	E368S	1	0122
A1103G	SN	E368S	1	0122
G1104C	SN	E368S	1	0122
A1165T*	SN	T388S	1	0063
A1189G	SN	T397A	1	0305
T1195C	SS	---	1	0002
T1204N	SN	W402X	1	0305
C1216T*	SS	---	4	0063 0122 0123 0124
T1224C*	SS	---	4	0122 0123 0124
C1226T*	SS	---	4	0063 0122 0123 0124
1266A*	I	422S	26	
1267T	I	422S	26	
1268C	I	422S	26	
G1318	D	D440	26	
A1319	D	D440	26	
T1320	D	D440	26	
C1335T*	SS	---	4	0063 0122

^a Respecto a la variante E-P de HPV16 (NC_001526).

Evento	Tipo	Cambio de aa	Casos (n)	ID
				0133
A542C	SN	<u>N181T</u>	1	0063
T549C	SS	---	3	0092 0118
T549A				0124
C604G	SN	<u>H202D</u>	26	
A607T	SN	T203S	1	0037
T609C	SS	---	5	0063 0122 0123 0124 0133

Evento	Tipo	Cambio de aa	Casos (n)	ID
				0123 0124
A1350C	SS	---	2	0305 0317
G1359A*	SS	---	4	0063 0122 0123 0124
A1410T	SN	L470F	1	0058
G1425T	SN	<u>L475F</u>	5	0063 0119 0122 0123 0124
T1478C	SN	S493L	1	0133
G1495A	SN	A499T	1	0155

ID: clave de la muestra.

SS: sustitución sinónima.

SN: sustitución no-sinónima.

D: deleción.

I: inserción.

*Posición usada para la clasificación de subtipos y variantes por Yamada et al. (1997), además de 1188(C), 1230(A), 1293(T), 1323(C) y 1330(A) en las que no hubo polimorfismos.

Negritas: Cambio típico del subtipo AA.

Subrayado: sustituciones de aminoácidos descritas por otros autores.

Tabla 6

Epítomos MHC II predichos para los aislados de HPV16

Haplotipo ó alelo	Epítopo	Casos (n)	Región L1	Referencia (epítomos descritos)
DQA1*0301/ DQB1*0302	28-37	26	$\beta B1$	Williams et al. 2002
	33-44	1	$\beta B1$	---
	100-109	25	βD	Christensen et al. 1996
	105-114	1	βD	Wang et al. 2003
	131-140	25	<i>D-E</i>	Carter et al. 2003
	144-153	25	<i>D-E</i>	Combata et al. 2002
	165-174	26	<i>E-F</i>	---
	232-241	26	<i>h1</i>	---
	261-270	26	<i>F-G</i>	Carter et al. 2003
	402-411	25	<i>h3 + loop h3h4</i>	---
	426-435	26	<i>h4 + loop h4βJ</i>	van Doornum et al. 1994
	471-480	26	<i>C-ter</i>	Carter et al. 2003 Combata et al. 2002 Reddy et al. 2004
	DQA1*0501/ DQB1*0201	5-14	26	<i>N-ter</i>
43-52		26	$\beta B2$	---
107-116		26	βD	Christensen et al. 1996 Wang et al. 2003
156-165		26	βE	---
250-259		26	$\beta E + F-G$	Williams et al. 2002
264-273		26	<i>F-G</i>	Carter et al. 2003 Reddy et al. 2004
323-332		26	$\beta G2 + \beta EH1$	Luxton et al. 2003
346-355		5	<i>HI</i>	Carter et al. 2003
363-372		25	βI	---
410-419		2	<i>loop h3h4 + h4</i>	---
435-444		26	<i>h4βJ</i>	van Doornum et al. 1994 Carter et al. 2003
469-478	21	<i>h5 + C-ter</i>	Combata et al. 2002 Reddy et al. 2004	
DQB1*030101	34-43	26	$\beta B1$	---
	95-104	25	<i>C-D + βD</i>	---
	126-135	26	<i>D-E</i>	Combata et al. 2002
	133-142	26	<i>D-E</i>	Carter et al. 2003
	147-156	26	<i>D-E + βE</i>	---
	198-207	4	<i>E-F</i>	Williams et al. 2002
	200-209	2	<i>E-F</i>	Luxton et al. 2003
	257-266	26	<i>F-G</i>	Williams et al. 2002 Carter et al. 2003
	273-282	26	<i>F-G</i>	Combata et al. 2002 Williams et al. 2002 Reddy et al. 2004
	323-332	26	$\beta G2 + \beta EH1$	Luxton et al. 2003
	390-399	24	<i>bisagra h2h3</i>	Carter et al. 2003
469-478	22	<i>h5 + C-ter</i>	Combata et al. 2002 Reddy et al. 2004	

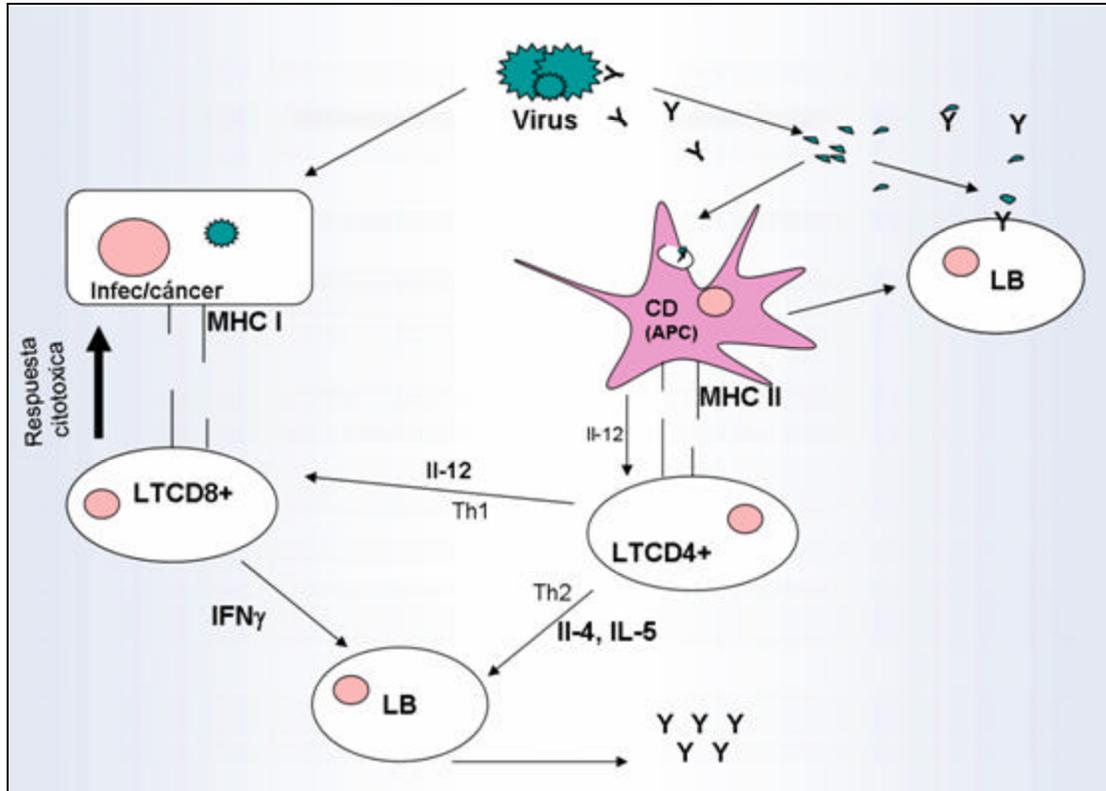


Figura 1. Esquema de la respuesta inmune contra HPV. Se produce respuesta tanto de tipo celular como humoral para las proteínas L1, L2, E1, E2, E5, E6 y E7. La respuesta es mediada por la activación de linfocitos T CD4+ y CD8+. Los LTCD8+ son citotóxicos y capaces de eliminar algunas células infectadas con el virus y/o que exhiben antígenos tumorales y virales (la mayoría derivados de las proteínas E6 y E7) a través del MHC I. Las DC endocitan porciones del virus (especialmente de la cubierta) y las presentan por el MHC II para estimular LTCD4+ vírgenes e inducir la respuesta humoral. Estos LTCD4+ se diferencian en clones de linfocitos Th según el patrón de citocinas que predomine. El grupo Th1 secreta $IFN\gamma$, $FNT\beta$ e IL-2, que son importantes para completar la activación de LTCD8+. Los linfocitos Th2 inducen la producción de anticuerpos, principalmente IgG e IgA, que son los principales tipos de anticuerpos que se generan durante las infecciones por HPV, a través de la secreción de IL-4 e IL-5 (Duggan-Keen et al. 1998, Man 1998). Después de la exposición al virus o de una inmunización se generan linfocitos B de memoria que expresan inmunoglobulinas de membrana capaces de unirse a los antígenos del virus en infecciones posteriores. La proliferación de los LB de memoria en los encuentros posteriores con el virus es mediada por DCs.

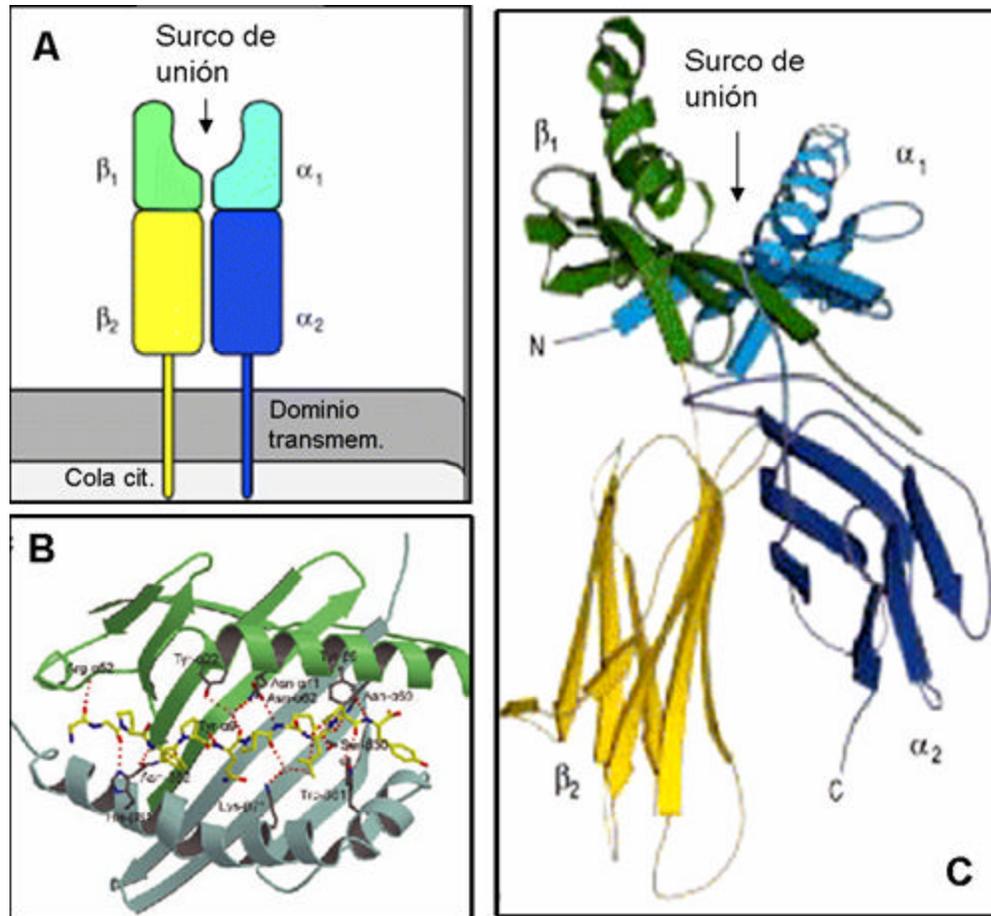


Figura 2. Estructura de la molécula MHC II. Las moléculas MHII están formadas por una cadena α y una β codificadas por genes diferentes (DQA y DQB). Cada cadena tiene una parte extracelular, un fragmento transmembrana de 20 -25 aa, y una cola citoplasmática de 12-15 aa (panel A). La parte extracelular de cada cadena se divide en dos regiones y la interacción de las regiones “uno” de cada una (α_1 y β_1) es la que genera el surco de unión, por el aporte de una alfa-hélice y cuatro cadenas beta por parte de α_1 y otro tanto semejante por β_1 (paneles A, B y C). El surco de unión es abierto en los extremos y puede unir péptidos entre 13 y 25 aminoácidos. La estabilidad de la unión péptido MHC II depende del anclaje de residuos de la región central del péptido (*core* de 9 aas) en bolsillos que se generan en el surco de unión de la molécula (panel B), donde los residuos mas importantes son 1, 4, 6 y 9.

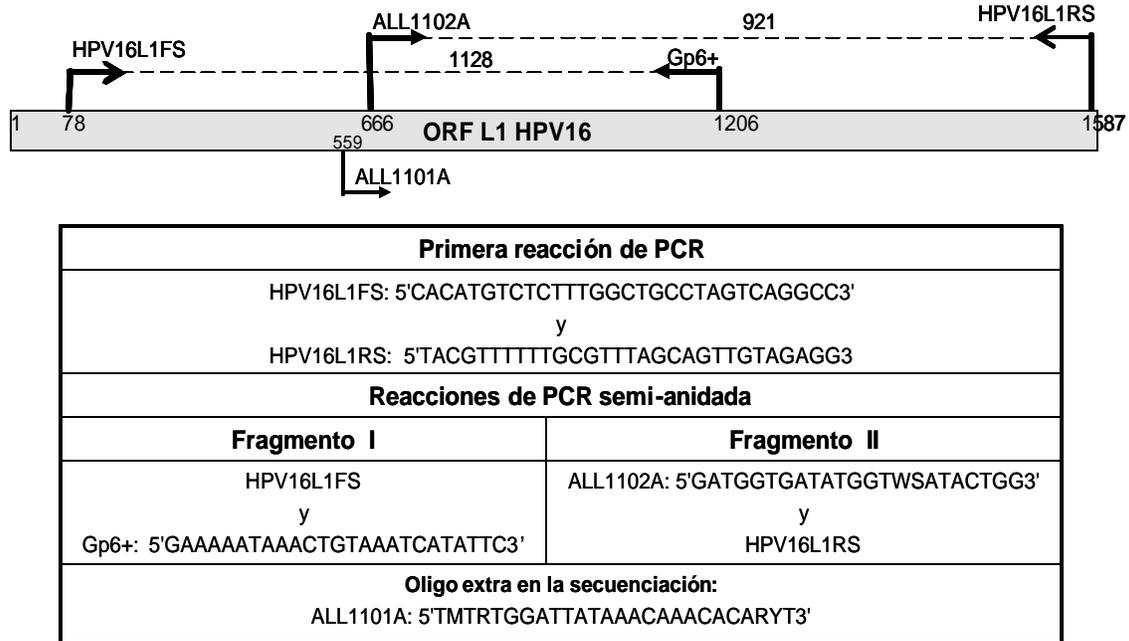


Figura 3. Esquema de la estrategia de amplificación y secuenciación del ORF L1. El gen L1 empieza en la posición 5559 del genoma de HPV16 (acceso NC_001526 de GeneBank) pero el ORF empieza en la posición 5637 (Chen et al. 2000), ya que los 78 pb restantes forman parte de un sitio de splicing que regula la expresión de los genes tardíos (Zaho et al. 2004). Las parejas de oligonucleótidos empleados por nosotros amplifican desde el inicio del ORF hasta -10 nt del final. Nótese que la reacción semi-anidada para el fragmento II se usó un oligo nucleótido consenso que introduce cambios en la secuencia de la proteína. Estos cambios fueron editados en las secuencias obtenidas y se les asignó el nucleótido correspondiente en el fragmento I, ó en su defecto el de la secuencia de referencia.

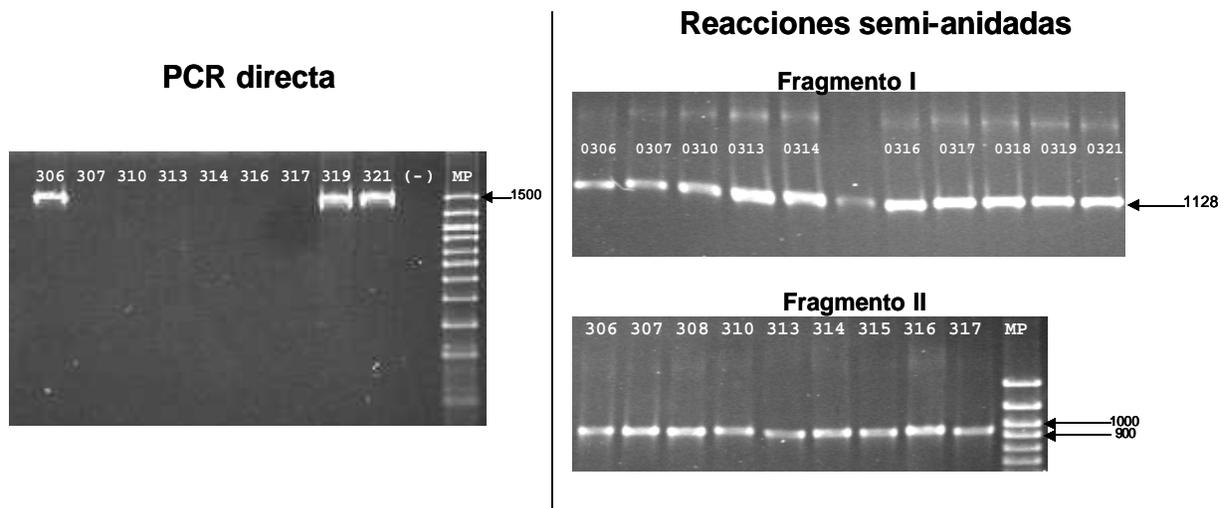


Figura 4. Ejemplo de amplificaciones por PCR directa y semi-anidada. El rendimiento de la amplificación en las reacciones directas (para amplificar 1509 pb con oligos específicos para HPV16) fue muy reducido y podría depender de la carga viral de las muestras. La estandarización del contenido de DNA total en las mezclas de reacción no aumentó la amplificación de L1 y por eso optamos por hacer las reacciones semi-anidadas que permitieron obtener cantidades suficientes de DNA de las porciones del ORF L1 en las muestras seleccionadas.

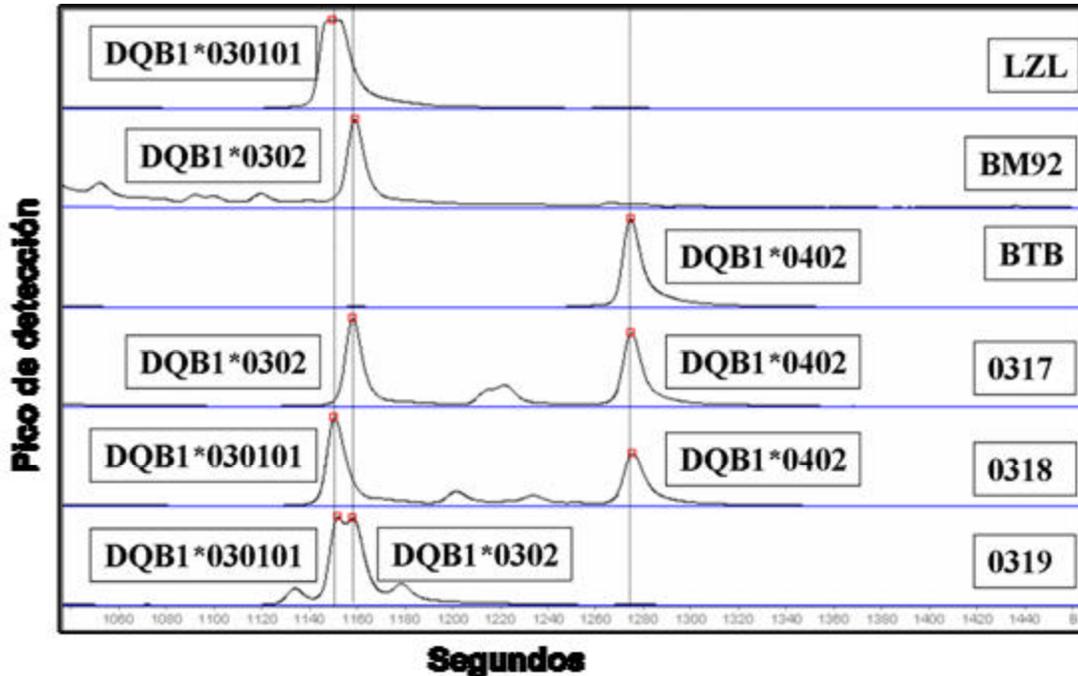


Figura 5. Ejemplo de tipificación de alelos HLA por RSCA. Se muestra la tipificación del gen HLA-DQB1 utilizando el alelo DQB1*0201 como referencia marcada. Las líneas celulares LZL, BM92 y BTB, homocigotas para los alelos *030101, *0302 y *0402 respectivamente, sirvieron de control en esta corrida. Las muestras 0317, 0318 y 0319 forman parte de las 54 muestras tipificadas para este locus y todas son heterocigotas. Nótese que pueden ocurrir casos como el de la muestra 0319 en la que los dos alelos DQB1 de la muestra forman heteroduplex marcados con patrones de migración muy parecidos entre sí y resultan difíciles de diferenciar. En estos casos debe usarse otro alelo de referencia.

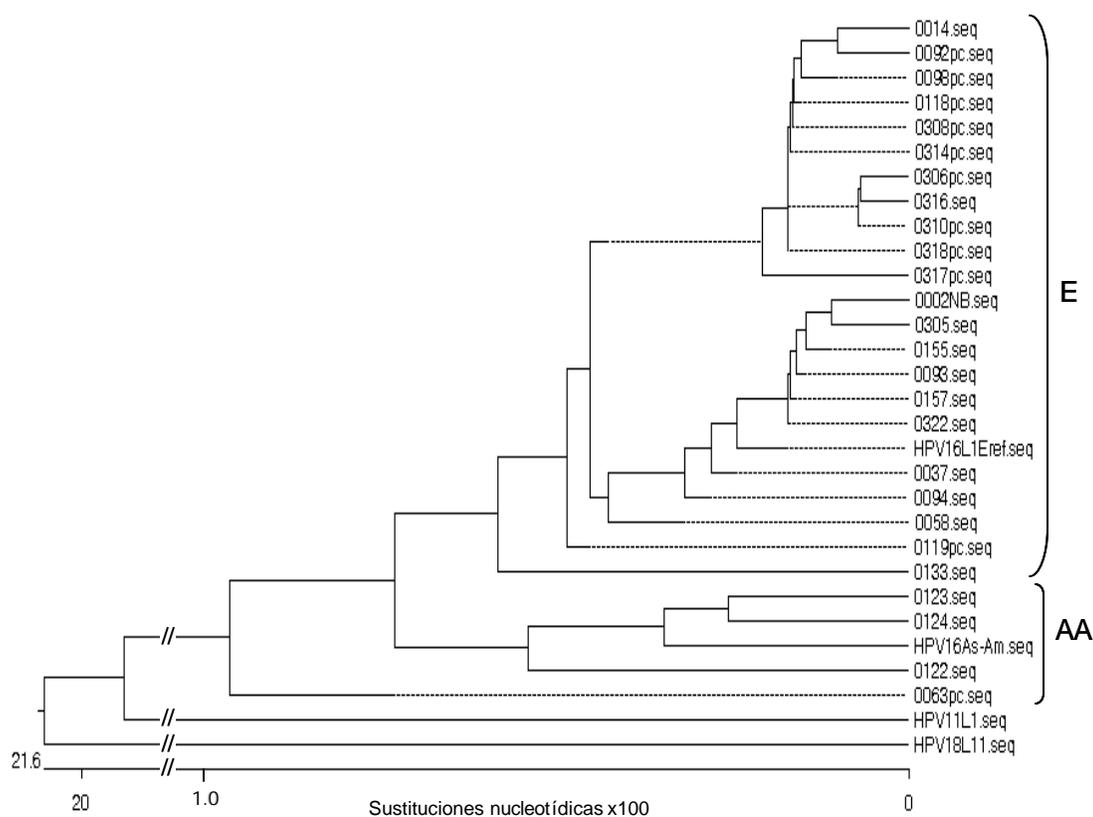


Figura 6. Árbol filogenético obtenido con las 26 secuencias nucleotídicas del ORF L1. El alineamiento fue realizado por el método de Neighbor-Joining en la aplicación Clustal W. La figura fue editada para mejorar la definición de los clados, incluyendo el corte de una región constante, que se indica como //. Fueron incluidos dos grupos externos, los prototipos de HPV11 y HPV18, y dos secuencias de referencia de HPV16, una del subtipo E (HPV16L1Eref, GeneBank NC_001526) y otra del subtipo AA (HPV16L1As-Am, GeneBank AF402678).

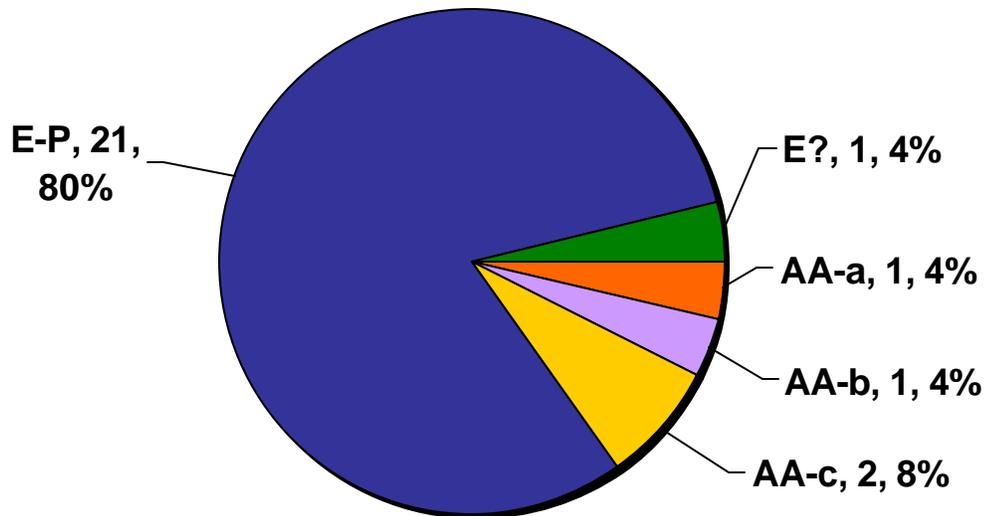


Figura 7. Subtipos y variantes de HPV16 identificadas. Para la identificación de subtipos y variantes fueron usadas 14 posiciones nucleotídicas de L1 que generan información equivalente a la basada en el gen E6, según Yamada et al. (1997). **E**: subtipo Europeo; **E-P**: variante prototipo E; **AA**: subtipo Asiático-Americano; **AA-a, -b, -c**: variantes del subtipo AA; **E?**: caso condos de las 14 posiciones usadas para la identificación exclusivas del subtipo AA, y el resto características del subtipo E.

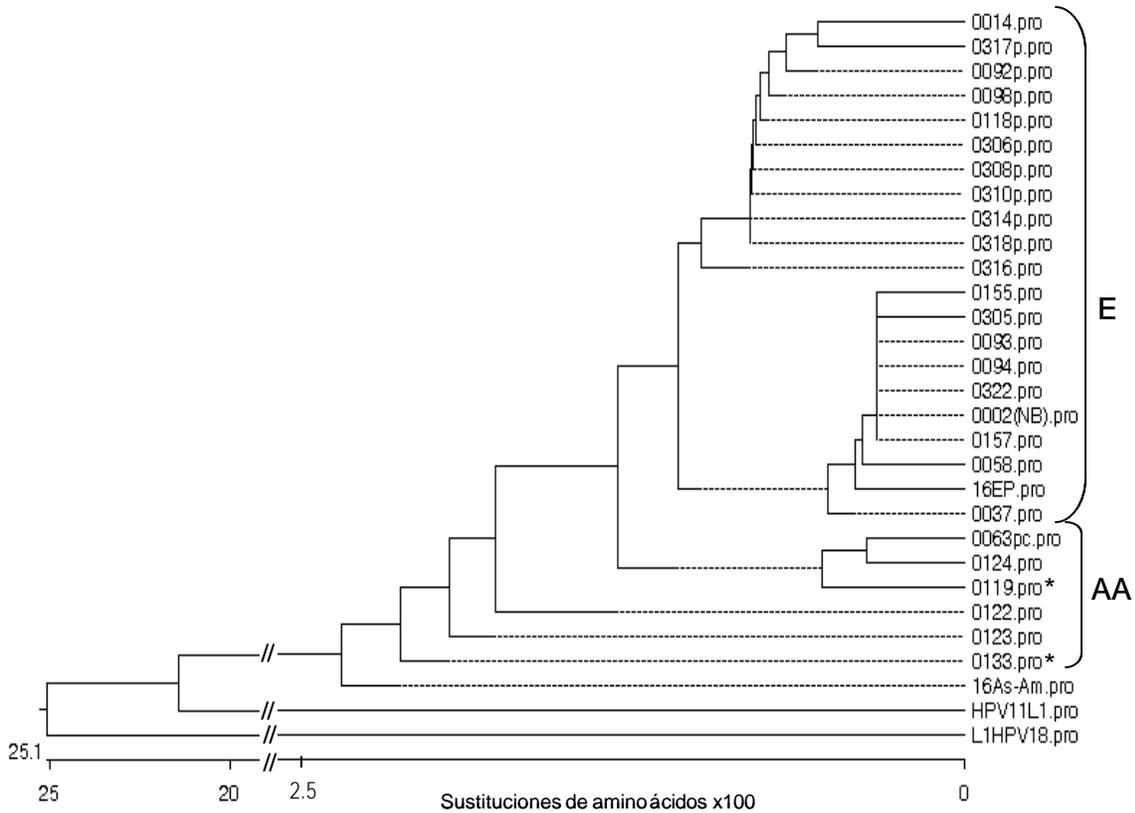


Figura 8. Árbol filogenético de las 26 secuencias de aminoácidos del ORF L1 obtenidas. Las secuencias fueron alineadas por el método Neighbor-Joining en la aplicación Clustal W. La figura fue editada para mejorar la definición de los clados, incluyendo el corte de la región constante que se indica con //. Fueron incluidos dos tipos externos (HPV11 y HPV18) y dos secuencias de referencia, una del subtipo E (HPV16L1Eref, GeneBank NC_001526) y otra del subtipo AA (HPV16L1As-Am, GeneBank AF402678).

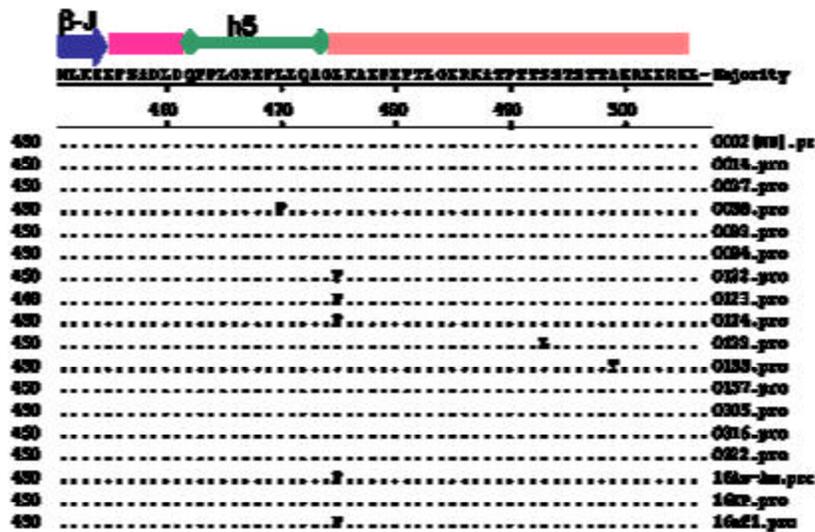
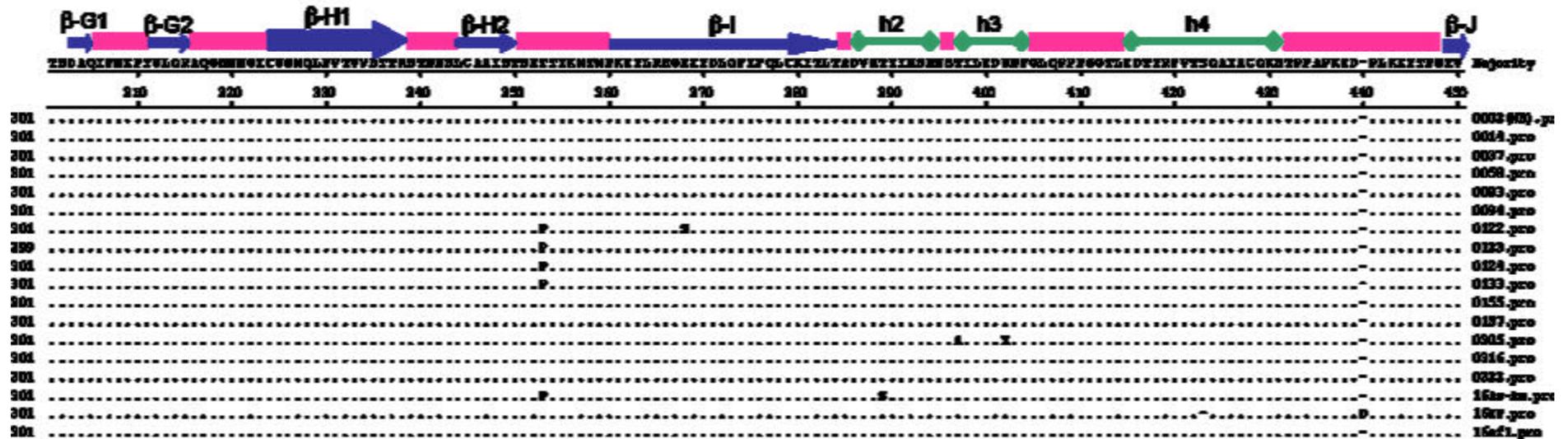


Figura 9. Distribución de las sustituciones de aminoácido encontradas, según la estructura de L1. Las líneas coloreadas indican la estructura en la que participa cada región de la siguiente manera:

Hojas beta 
 Hélices 
 Asas conectoras 
 Señal de localización nuclear y sitio de unión de DNA 

Los cambios marcados con X corresponden a cambios nucleotídicos no esclarecidos. Se incluyen tres secuencias de referencia, las de los subtipos E y AA mencionadas en el texto, y del subtipo Africano (16A1) (GeneBank AF472508).

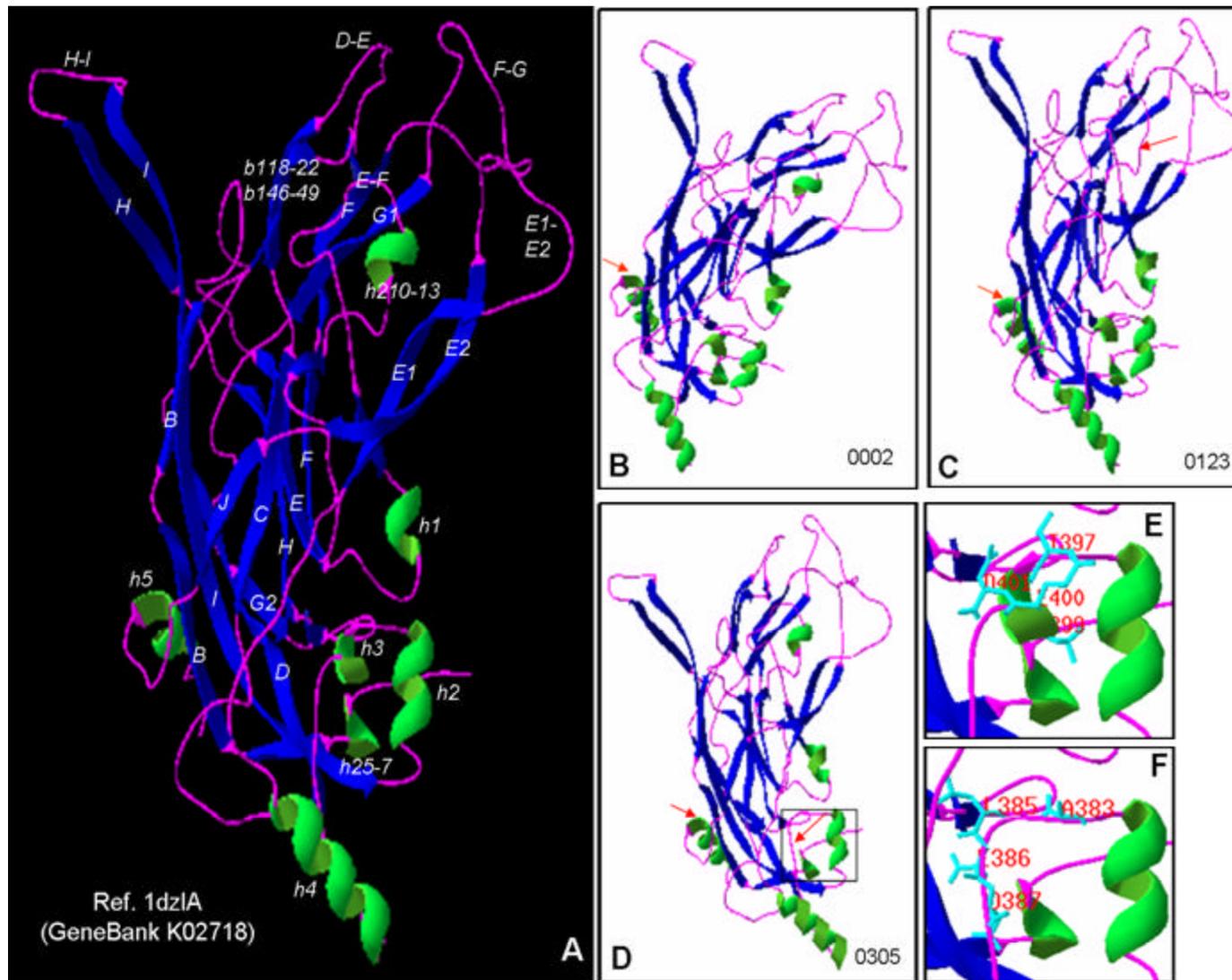


Figura 10. Cambios en la estructura secundaria de L1. La estructura de L1 se modeló en Swiss Model en base a la estructura tridimensional reportada por Chen et al. 2000, que es de un aislado diferente al que estuvimos usando como referencia en secciones anteriores. El panel A muestra la estructura del aislado K02718. Los paneles B-D muestran los modelos de los aislados que tuvieron cambios en la estructura secundaria con respecto a éste aislado. Los cambios están indicados por las flechas rojas. El cambio que se muestra para el aislado 0002 ocurrió en los 26 aislados. Los paneles E y F corresponden al detalle del caso del aislado 0305 (F) comparado con el detalle de esa misma región en la proteína de referencia (E); los aminoácidos del detalle en 0305 corresponden a posiciones +14 en la Fig. 9 y en la proteína referencia.

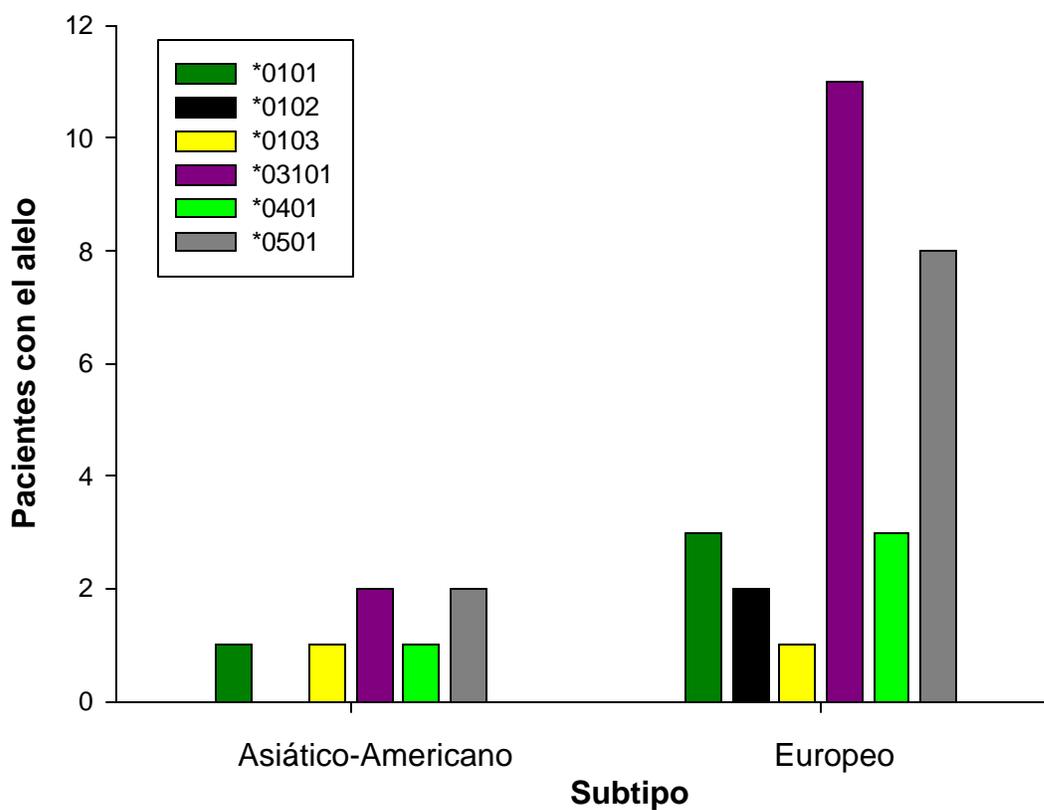


Figura 11. Asociaciones entre los subtipos de HPV16 encontrados y los alelos DQA1 identificados en las pacientes de este trabajo. Para éste análisis se consideraron solo 24 pacientes, ya que se excluyeron aquellas con el subtipo viral indefinido y en las que el locus MHC no estaba tipificado.

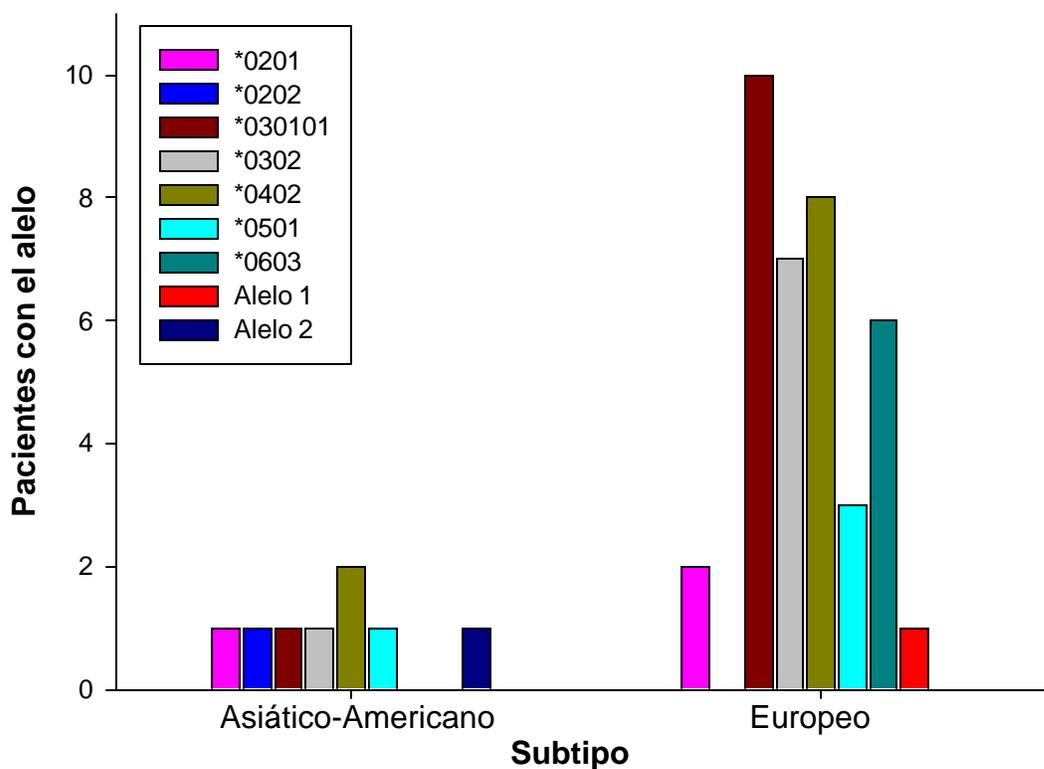
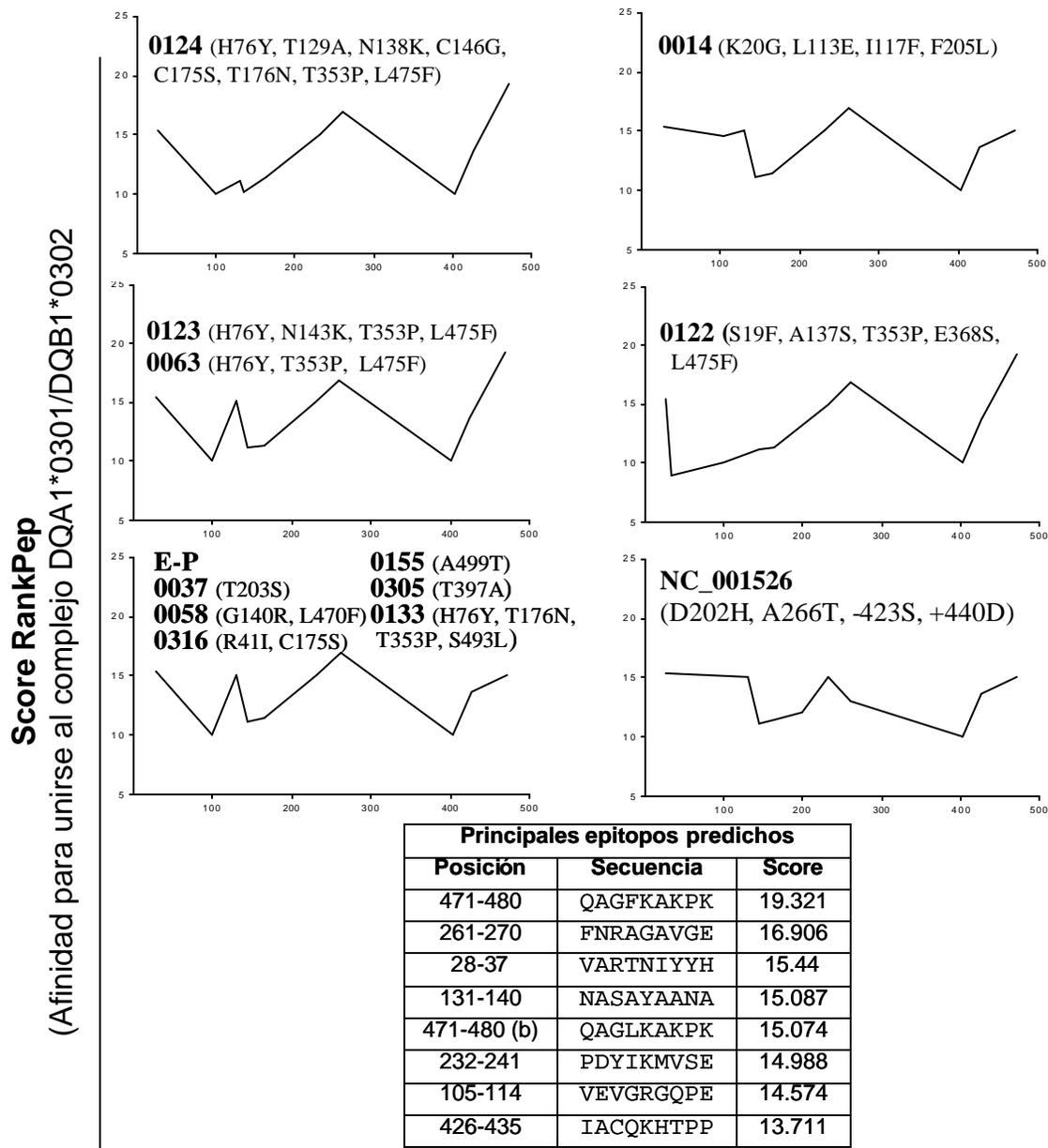


Figura 12. Asociaciones entre los subtipos de HPV16 encontrados y los alelos DQB1 identificados en las pacientes de este trabajo. Para éste análisis se consideraron solo 24 pacientes, ya que se excluyeron aquellas con el subtipo viral indefinido y en las que el locus MHC no estaba tipificado.



Aminoácido al inicio de cada epítopo inmunodominante de 9 mer

Figura 13. Perfil de epítomos predichos en los aislados del ORF L1 de HPV16 para la combinación de alelos DQA1*0301/DQB1*0302. Cada pico indica el inicio de un epítopo de nueve aminoácidos predicho para el aislado (eje X) y su capacidad para unirse a la molécula MHC II (eje Y). Se indican entre paréntesis los cambios que caracterizan a cada aislado (ver Fig. 8). La secuencia consenso que se une a esta combinación de alelos es WARHKMFPE. El valor máximo de afinidad que puede alcanzar un péptido unido es 51.37 y el umbral de unión (calificación lograda con el 85% de los péptidos en la matriz) es 12.63. E-P representa 15 aislados. En la tabla se anexan datos sobre los ocho epítomos con mayor calificación. + y – en la proteína NC_001526 son una inserción y una deleción, respectivamente.

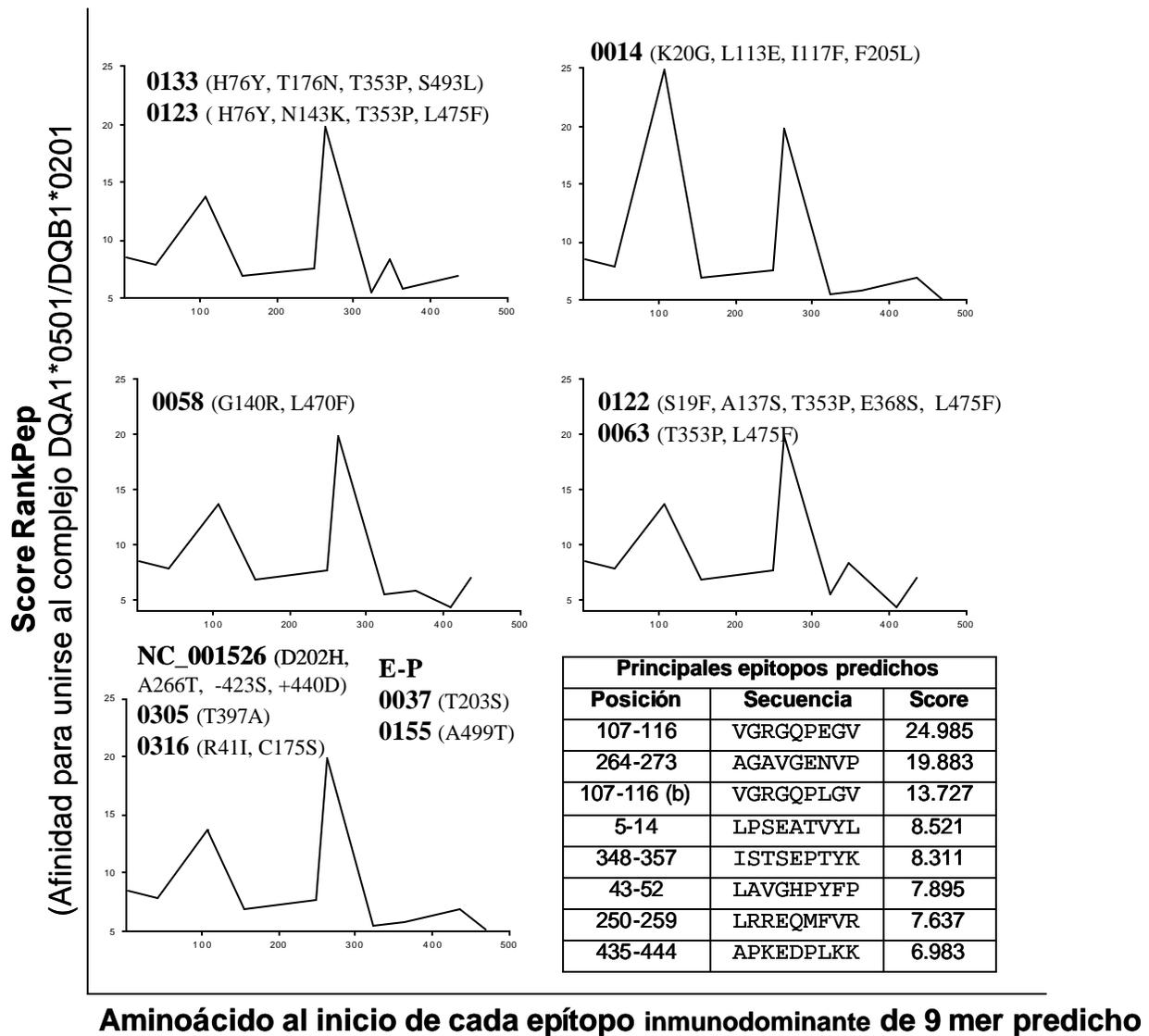
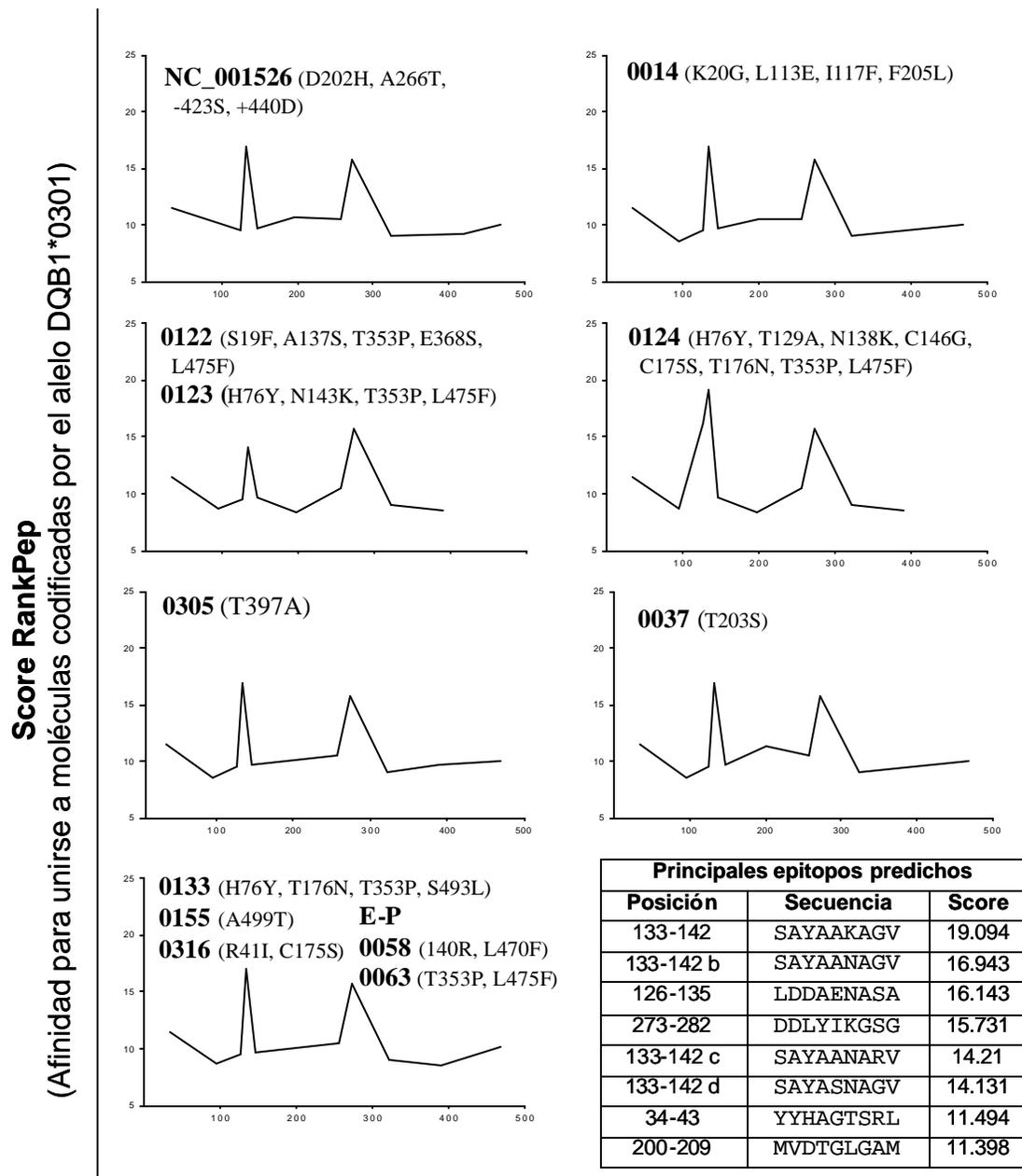


Figura 14. Perfiles de afinidad de los epítomos predichos en los aislados del ORF L1 para la combinación de alelos DQA1*0501/DQB1*0201. Cada pico indica el inicio de un epítopo de nueve aminoácidos predicho para el aislado (eje X) y su capacidad para unirse a la molécula MHC II (eje Y). Se indican entre paréntesis los cambios que caracterizan a cada aislado (ver Fig. 8). La secuencia consenso que se une a esta combinación de alelos es IWQEGPEYW. El valor máximo de afinidad que puede alcanzar un péptido unido es 71.85 y el umbral de unión (calificación lograda con el 85% de los péptidos en la matriz) es 31.45. E-P representa 15 aislados. En la tabla se anexan datos sobre los ocho epítomos con mayor calificación. + y - en la proteína NC_001526 son una inserción y una deleción, respectivamente.



Aminoácido al inicio de cada epítomo inmunodominante de 9 mer predicho

Figura 15. Perfiles de afinidad de los epítomos predichos en los aislados del ORF L1 para unirse a moléculas con DQB1*0301. Cada pico indica el inicio de un epítomo de nueve aminoácidos predicho para el aislado (eje X) y su capacidad para unirse a la molécula MHC II (eje Y). Se indican entre paréntesis los cambios que caracterizan a cada aislado (ver Fig. 8). La secuencia consenso que define los antígenos específicos para este alelo es IWHAVHAWH. El valor máximo de afinidad que puede alcanzar un péptido unido es 45.67 y el umbral de unión (calificación lograda con el 85% de los péptidos en la matriz) es 11.70. E-P representa 15 aislados. En la tabla se anexan datos sobre los ocho epítomos con mayor calificación. + y – en la proteína NC_001526 son una inserción y una deleción, respectivamente.