

DETECCIÓN DE LINFOCITOS DE MEMORIA ESPECÍFICOS CONTRA EL VPH-16 EN HOMBRES Y MUJERES CON VIDA SEXUAL ACTIVA.

Carlos Parra-López^{(1, 2, 3)*}; Darnel Marchena-Mendoza⁽¹⁾; Gabriela Delgado^(1, 2); Alejandro Pachón^(3,4); Carlos Melo^(3,4); Alba Lucia Cómbita⁽⁵⁾; Luis Eduardo Vargas⁽¹⁾ y Manuel Elkin Patarroyo^(1, 2)

Resumen

En este trabajo se investigó la respuesta de linfocitos de memoria y la identificación de péptidos en la proteína L1 del virus del papiloma humano (VPH) responsables de la estimulación de estos linfocitos, en muestras de sangre de 44 individuos expuestos a la infección, distribuidos en cuatro grupos: mujeres sanas, trabajadoras sexuales, pacientes con neoplasia intracervical NIC y hombres. La expansión *in vitro* con interleuquina-2 (IL-2) representó una importante ventaja para evidenciar la respuesta de linfocitos de memoria, específicos contra el virus en la mayoría de individuos estudiados. Para investigar el estatus de la respuesta de estos linfocitos, se utilizaron células dendríticas (CDs) autólogas pulsadas con pseudo partículas virales (VLPs) construidas a partir de la proteína L1 del VPH-16 [VLPs VPH-16/L1] como células presentadoras del antígeno (APCs). El uso de CDs como APCs en este estudio nos permitió evidenciar por una parte una vigorosa producción de IFN- γ por linfocitos de memoria en la mayoría de individuos estudiados y por otra descubrir un fenotipo supresor inducido por las CDs en la respuesta de linfocitos de memoria, específicos contra el virus detectable en especial en pacientes con NIC. La universalidad de la respuesta inmune celular a la proteína L1, puesta en evidencia en nuestros resultados, quizás explique la alta eficacia protectora mostrada por las vacunas basadas en VLPs VPH-16/L1, en experimentación por otros investigadores.

Abreviaturas utilizadas en el texto: virus del papiloma humano (VPH); pseudo partículas virales (VLPs); VLPs construidas de la proteína L1 del VPH serotipo 16 (VLPs VPH-16/L1); linfocitos de sangre periférica (PBLs); índice de estimulación (IE); neoplasia intra cervical (NIC); células presentadoras del antígeno (APCs); interleuquina-2 (IL-2), células dendríticas humanas derivadas de monocitos de sangre periférica (CDs), línea celular de linfocitos T específica contra VLPs dependiente de IL-2 (TCLs).

Introducción

La relación entre la infección por ciertos serotipos de virus del VPH como 16, 18, 31 y 45, y la incidencia de cáncer cervical está ampliamente documentada en la literatura.¹ La principal infección viral de transmisión sexual es la causada por VPH y representa un importante problema de salud pública mundial. El cáncer cervical es una importante causa de muerte en la mujer en los países en vías de desarrollo. Aunque el uso de la

citología vaginal ha representado un gran esfuerzo de los sistemas de salud pública como programa para el diagnóstico precoz de la enfermedad, solo se ha logrado una amplia cobertura de la población mediante esta medida preventiva en países de altos ingresos. El desarrollo de una vacuna que prevenga la infección por VPH se considera la alternativa más importante para el control de la infección por el virus, pues se cree que la inmunoprofilaxis tendrá un profundo impacto en la prevención del riesgo de cáncer cervical en las mujeres. Por esta razón, la investigación y búsqueda de vacunas contra los serotipos de VPH de alto riesgo, es hoy en día motivo de activa investigación en diferentes laboratorios del mundo.²⁻⁵

La cápside del VPH está compuesta de 72 pentámeros regularmente dispuestos, de manera que forman

¹⁾ Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC). Grupo Funcional Inmunología Molecular. ²⁾ Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias. ³⁾ Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud (FUCS). ⁴⁾ Hospital de San José - Departamento de Ginecología y Obstetricia. Bogotá. ⁵⁾ Instituto Nacional de Cancerología de Colombia.

* Investigador Principal: Dr. Carlos A. Parra-López M. D. Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC). Carrera 50 # 26 - 00. Bogotá, Colombia, Sur América. Tel: +57 1 481 5219 Fax: +57 1 481 5269. e-mail: carlos_parra@fidic.org.co

una cápside de 600 Angström de diámetro y representa la estructura importante durante el proceso de infección del virus al epitelio cervical.^{6,7} Esta cápside está conformada en forma mayoritaria por la proteína L1, un polipéptido de 52 kDa que se autoensambla formando pseudo partículas virales conocidas comúnmente como VLPs (por sus iniciales en inglés viral like particles). Recientemente, se evaluó una vacuna basada en VLPs construidas de la proteína L1 del VPH serotipo 16 (VLPs VPH-16/L1), en un ensayo clínico fase II y demostró ser muy efectiva (100 % de eficacia protectora en las mujeres vacunadas comparado con el grupo placebo) para prevenir la infección por el VPH-16 en una población de 2500 mujeres, luego de 17 meses de seguimiento.³

En relación con los mecanismos inmunológicos responsables de la protección inducida por este tipo de vacunas, como norma se acepta que la generación de anticuerpos neutralizantes del virus juega papel importante.^{2,8,9} Las bases del reconocimiento de estos anticuerpos contra las VLPs ha sido ampliamente caracterizada y se han reportado en esta proteína anticuerpos neutralizantes del virus que reconocen epítopes (pequeñas secuencias hasta de diez aminoácidos en L1, que son blanco del reconocimiento por anticuerpos) de tipo lineal¹⁰ y conformacional¹¹. Aunque el paradigma de la respuesta inmune celular implicaría la existencia dentro de la proteína L1 de fragmentos que al ser procesados y presentados por las células infectadas en el contexto de moléculas de histocompatibilidad de clase II activen los linfocitos T CD4, la identidad de tales epítopes ayudadoras (en adelante denominadas Th por T-helper) en la proteína L1, que promueven la producción de anticuerpos contra el virus por los linfocitos B, aún no se ha establecido (ver diagrama, **Figura 1**). Debido a que la identificación de este tipo de epítopes lineales Th va a contribuir a una mejor comprensión de las bases inmunológicas de la respuesta de anticuerpos contra el VPH y otros virus, en este trabajo de investigación se busca la identificación de epítopes Th en la proteína L1.

Por otro lado, varios estudios han identificado la presencia de ADN del virus VPH-16 en áreas genitales en una alta proporción de hombres y mujeres con vida sexual activa, sin lesión causada por el virus.¹² Si la in-

fección por un serotipo de alto riesgo como el VPH-16, cursa sin lesión en un porcentaje alto de individuos infectados en la población, esto significa que posiblemente la respuesta inmune contra el virus juega un papel importante en la protección contra la enfermedad en estos individuos. Si la respuesta inmune celular (mediada por linfocitos T CD4+ o CD8+) contra el virus (ver diagrama **Figura 1**) juega un papel importante en el control de la enfermedad en individuos asintomáticos, el estudio de la respuesta inmune celular a antígenos virales en ellos quizás permita establecer las bases de una respuesta de tipo celular protectora contra el virus. En este trabajo hacemos un análisis comparativo de la respuesta inmune humoral y celular contra la proteína L1 en individuos sanos con vida sexual activa y mujeres con NIC atribuida a infección por VPH. La comparación de la respuesta inmune entre individuos sanos y con lesión, se hizo con el fin de identificar rasgos de susceptibilidad o resistencia a la enfermedad asociados a características de la respuesta inmune humoral y celular (por ejemplo: la producción de anticuerpos, la respuesta de proliferación de linfocitos T específicos contra el virus y la producción de interleuquinas por linfocitos T y células que procesan y presentan antígenos virales a linfocitos), presentes en los dos tipos de individuos. El análisis del status inmunológico contra el virus en individuos con y sin lesión causada por VPH, quizás redunde en una mejor comprensión de los mecanismos de respuesta inmune celular y humoral asociados con la resistencia o susceptibilidad al desarrollo de lesión por este virus. Por ello, en este trabajo se compara la respuesta inmune humoral y celular específica contra la proteína L1 en linfocitos de sangre periférica de individuos expuestos al virus (hombres y mujeres sanos con vida sexual activa y mujeres trabajadoras sexuales), con la de un grupo de mujeres con NIC, con el fin de valorar las características de la respuesta inmune contra la proteína mayor de cápside del virus, entre grupos de individuos e identificar epítopes Th en esta proteína. Aunque se evidenció una vigorosa respuesta inmune celular a VLPs hechas de VPH-16/L1 en linfocitos de sangre periférica en la mayoría de los cuarenta y cuatro individuos incluidos en el estudio, no se pudo identificar un epítope lineal Th a pesar de que por experimentos *in vitro* se demostró un epítope universal (que se une a distintos haplotipos

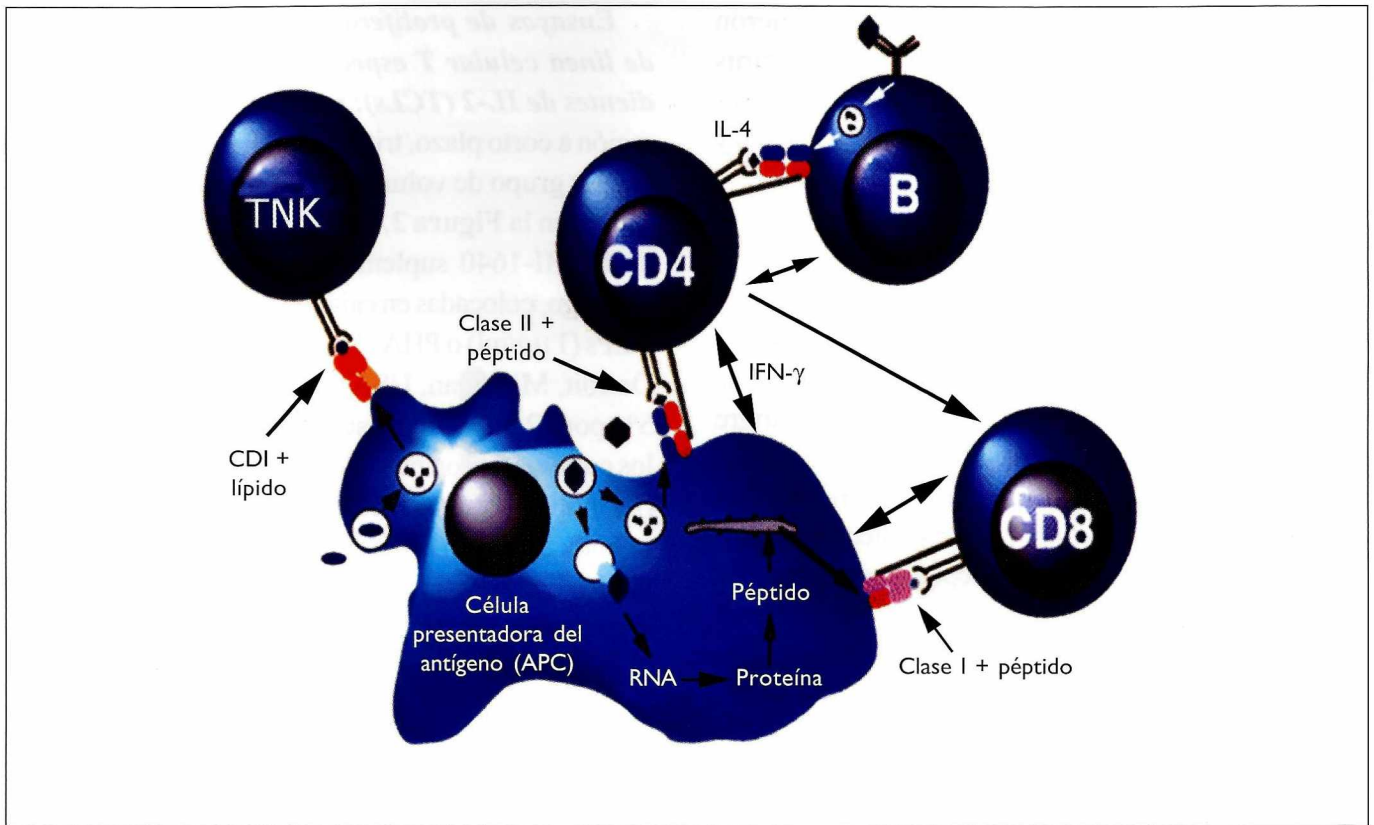


Figura 1. Reconocimiento del antígeno por el sistema inmune. La célula presentadora del antígeno luego de ser infectada por un patógeno (virus, bacterias o protozoos) tiene la capacidad de digerir estos micro-organismos debido a su capacidad fagocítica y por poseer lisosomas cargados de enzimas digestivas. Los linfocitos T encargados de la vigilancia inmunológica contra estos agentes infecciosos, responden a la infección una vez son estimulados por un complejo HLA-péptido (linfocitos T CD4 y CD8) o CDI-lípido (linfocitos TNK) sobre la superficie de la célula presentadora del antígeno (APC). Mientras los linfocitos T CD4+ se estimulan por un complejo MHC clase II/péptido producido en los lisosomas luego de la fagocitosis del patógeno, los linfocitos T CD8+ se estimulan por complejos MHC clase I/péptido, ensamblados en el citoplasma de la célula infectada por un virus, como el VPH. Una vez estimulados por el MHC clase II + péptido, los linfocitos T CD4 inducen la respuesta inmune de la APC y los linfocitos citotóxicos a través de la producción del IFN- γ , así como la síntesis de anticuerpos por los linfocitos B por intermedio de la IL-4 que ellos producen.

HLA-DRB1* muy frecuentes en la población en estudio). Se discute la implicación de estos hallazgos en el contexto del uso de las vacunas basadas en VLPs de (VPH-16/L1) para la inmunopprofilaxis de la infección por VPH,²⁻⁵ como medida para la prevención del carcinoma del cuello uterino en la mujer.

Sujetos, materiales y métodos

Población: las pacientes con NIC (n=10) fueron reclutadas en la consulta externa del Hospital de San José y del Centro de Salud Ricaurte de Bogotá. Se estudiaron además, voluntarios sanos femeninos y masculinos con los mismos criterios de exclusión. Los hombres sanos

(n=10) y las mujeres sanas (n=18) fueron seleccionados con base en la historia de vida sexual activa. Se conformó un grupo de alto riesgo con trabajadoras sexuales (n=6) dentro de una población que consultó a varios Centros de Salud en Bogotá. Se excluyeron en este estudio: (i) personas menores de 17 y mayores de 65 años, (ii) personas con diagnóstico de diabetes mellitus, infección por VIH o SIDA, (iii) personas con tratamiento inmunosupresor, cáncer de cualquier otro origen, así como personas en quimio o radioterapia. Todos los individuos incluidos en el estudio firmaron el consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética del Hospital de San José el cual revisó y aprobó el estudio.

Generación de las VLPs de VPH: Se produjeron en células de insecto Sf-21 por medio de báculo virus recombinante que codifica el gen L1 de VPH-16, según el protocolo descrito previamente por Cómbita y colaboradores.¹³

Síntesis de péptidos: 27 péptidos secuenciales de la proteína L1 de VPH-16 fueron sintetizados por el método de síntesis de péptidos en fase sólida.

Caracterización de las células dendríticas: Las CDs fueron diferenciadas de monocitos de sangre periférica (PBLs) como lo describieron Delgado y colegas¹⁴ con algunas modificaciones. En resumen, los PBLs de los voluntarios fueron aisladas por gradiente de densidad con Lymphoprep de sangre heparinizada. Después de dos horas de adherencia al plástico de cajas de 12 pozos, las células no adherentes se removieron por medio de lavado vigoroso con tampón salino pH 7.4 y el restante de las células adherentes fue cultivado en RPMI-1640 suplementado con 10% de plasma autólogo, 250 U/ml de IL-4 y 100 ng/ml de GM-CSF. Las células fueron cultivadas con medio fresco y citoquinas cada 48 horas. El séptimo día (48 horas previas a la adición de los linfocitos T efectores específicos contra VLPs) se transfirieron 10^4 CDs inmaduras a cajas de 96 pozos de fondo redondo y se trataron con 2 μ g/ml Poly I:C, ARN de doble cadena, (SIGMA., Biochemicals, St. Louis MO. USA) para lograr la maduración de las CDs y pulsaron con 1 μ g/ml de VLPs o péptidos. Se realizó un control del cultivo sin antígeno en este paso con el fin de monitorear el ruido de fondo. Después de 48 horas los sobrenadantes fueron cosechados y congelados para la cuantificación de la producción de citoquinas (IL-6, IL-12 y TNF- α) por las CDs por el método de ELISA. Para esta cuantificación la concentración en pg/ml se estimó usando kits comerciales OptEIA Human IL-4, IL-12, IL-6, TNF- α y IFN- γ sets (Pharmingen, San Diego CA.). Los monocitos y las CDs fueron caracterizadas por citometría de flujo usando anticuerpos específicos para CD11c, CD1b-FITC, CD86-PE (Pharmingen, San Diego, CA, USA) a una dilución 1:200 y las muestras analizadas en un citómetro de flujo (Beckton Dickinson, San José, CA, USA). Los histogramas que miden intensidad de fluorescencia relativa en los canales FL1 (FITC) y FL2 (PE) fueron realizados y analizados después de adquirir 10.000 eventos.

Ensayos de proliferación celular y generación de línea celular T específica contra VLPs dependientes de IL-2 (TCLs): para los ensayos de proliferación a corto plazo, triplicados de 2×10^5 PBLs de un primer grupo de voluntarios cuyos resultados se presentan en la **Figura 2**, fueron suspendidos en 200 μ L de RPMI-1640 suplementado con 10% de plasma autólogo, colocadas en cajas de 96 pozos, pulsadas con VLPs (1 μ g/ml) o PHA (10 μ g/ml) (Difco laboratories, Detroit, Michigan, USA) e incubadas a 37°C y CO₂ 5% por 72 horas. Dieciseis horas antes de la cosecha los cultivos fueron pulsados con 0.5 μ Ci [³H]-timidina (Amersham-Pharmacia, Buckinghamshire, UK) y luego se midieron en un contador beta (Beckman Coulter LS 6500). Los resultados se expresaron como índices de estimulación (IE) = promedio de las cuentas por minuto (c. p. m.) en el cultivo estimulado / c. p. m. en el cultivo control (PBLs sin estímulo). Se consideró positivo cuando la respuesta fue de dos o superior.

Las TCLs específicas contra VLPs (resultados presentados en **Tabla 1**), fueron logradas luego de colocar $3 - 5 \times 10^6$ PBLs obtenidas por Lymphoprep de los voluntarios en cajas de 12 pozos y cultivadas en 1 ml de RPMI-1640 suplementado con 10% de plasma autólogo, 8 μ g/ml de VLPs y 100 U/ml de rIL-2 (Pharmingen, San Diego. CA). Las células fueron cultivadas a 37 °C y 5% de CO₂ hasta el día diez con medio fresco e IL-2 cada 72 horas. Las TCLs fueron estimuladas de dos maneras: (i) [TCL] presentadas en la **tabla 1A**, corresponden a los datos de las TCLs reestimuladas directamente con VLPs. (ii) [TCL + DCs] presentadas en la **tabla 1B**, corresponden a los datos de las TCL reestimuladas con 10^4 CDs autólogas maduras pulsadas previamente con VLPs por 48 horas. El sobrenadante de estos cultivos fue cosechado y congelado a -70 °C para la posterior determinación de IL-4 e IFN- γ . Luego los cultivos fueron pulsados por 16 horas con 100 μ l/pozo con medio completo y 0.5 μ Ci [³H]-timidina y cosechados como se describió en el párrafo anterior. Los resultados fueron expresados como índices de estimulación (IE), = promedio de las cuentas por minuto (c. p. m.) en el cultivo estimulado / c. p. m. en el cultivo control (TCLs + CDs sin estímulo). Se consideró positivo si la respuesta fue de dos o superior.

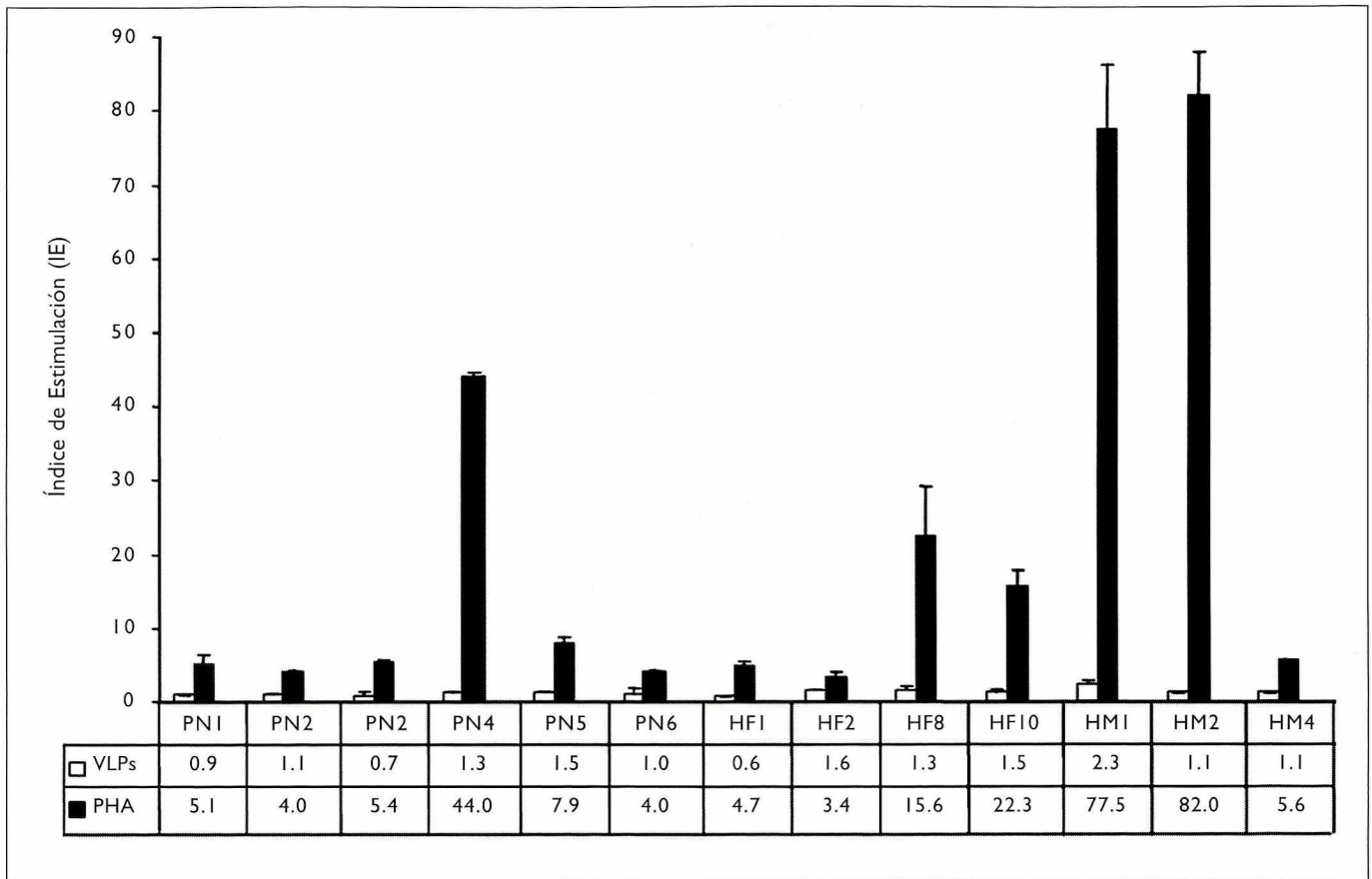


Figura 2. Niveles de proliferación de linfocitos de sangre periférica estimulados con VLPs de VPH-16. Los leucocitos de sangre periférica (PBLs) de tres grupos de individuos con vida sexual activa: pacientes con NIC (PN-1 a PN-6), mujeres sanas (HF-1, 2, 8 y 10) y hombres sanos (HMI, 2 y 4) se cultivaron tres días *in vitro* en presencia de VLPs o del mitógeno PHA (utilizado para monitorear la viabilidad de las células, como se describe en *materiales y métodos*). La figura muestra niveles de proliferación a VLPs (barras blancas) y a PHA (barras negras) medidos como (IE). Un valor IE ≥ 2 fue considerado positivo y los números en las cajas corresponden a los valores absolutos de IE. La viabilidad de las células en el cultivo se demostró por IE a PHA ≥ 2 en linfocitos de todos los individuos. PHA: Phytohemaglutinina. HF: mujeres sanas, PN: pacientes con NIC y HM: hombres sanos.

ELISA para determinación de anticuerpos contra VLPs: la medición de los títulos de anticuerpos contra VLPs-L1 de VPH-16 se realizó en plasma usando diluciones de 1:100 como describió Cómbita y colaboradores.¹³ El punto de corte fue establecido como tres desviaciones estándar por encima del valor de plasma DOD 620 de 20 muestras de cordón umbilical.

Caracterización del haplotipo HLA-DR β de los voluntarios y ensayos de unión a péptidos: la tipificación HLA-DR β de los voluntarios del estudio y los ensayos de unión a péptidos fueron realizados por métodos moleculares (PCR utilizando cebadores específicos que permiten amplificar los haplotipos HLA-DR β 1* -0101, -0401, -0701 y -1101) como aparece reportado.¹⁴

Resultados y Discusión

Varios ensayos clínicos recientes de vacunas basadas en (VLPs VPH-16/L1), han demostrado que estas vacunas son muy eficaces para prevenir la infección por este serotipo de VPH agente etiológico asociado a más del 50% de casos de carcinoma cervical en mujeres en países del tercer mundo. Aunque la capacidad de la proteína L1 de VPH, utilizada como vacuna, para generar respuesta inmune protectora contra el virus se ha demostrado en varios ensayos,²⁻⁵ son poco conocidas las bases de la respuesta inmune celular a la proteína L1 del virus. Por otra parte, existen evidencias de que el ADN del VPH-16 puede aislarse con facilidad de hombres y mujeres sanos con vida sexual activa que no desarrollan enfermedad. El hecho de que la infección por

Tabla 1. Características de voluntarios (código y edad) y respuesta inmune humoral y celular de líneas celulares (TCL) específicas contra VLPs de los individuos estudiados.

	A						B			
	Código	Edad	(a) Anti VLPs	TCL			HLA-DRβ1*	TCL + CD8		
				IE. (b)				IE. (b)		
			VLPs	PHA	IFN-γ		VLPs	PHA	IFN-γ	
Mujeres sanas	HF1	47	0,114	1,0	2,4	0	11	2,5	5,2	127
	HF2	37	0,168	8,5	3,4	302	*	6,4	4,8	227
	HF3	47	0,232	14,5	9,4	600	*	8,5	9,4	0
	HF4	48	0,770	1,2	6,4	0	4	7,6	14,9	102
	HF5	38	0,229	1,5	80,8	0	*	3,5	34,3	0
	HF6	64	0,794	2,5	2,8	-	4,7	3,6	15,5	-
	HF7	37	0,223	7,3	5,5	425	1,4	6,5	6,6	318
	HF8	21	0,553	5,6	8,6	0	*	8,5	20,8	624
	HF9	18	0,204	0,9	6,4	0	*	10,3	14,7	639
	HF10	22	0,088	6,4	10,6	537	4	2,9	2,4	0
	HF11	23	0,263	1,4	11,9	0	*	3,9	14,0	0
	HF12	26	0,370	32,1	67,6	0	4	8,7	13,1	0
	HF13	29	0,617	8,1	25,2	0	4	3,8	23,0	341
	HF14	25	0,140	1,1	14,1	0	*	6,4	21,3	297
	HF15	26	0,207	3,6	12,1	0	4	3,5	13,4	106
	HF16	24	0,237	2,3	4,8	0	*	3,2	5,9	494
	HF17	26	0,837	1,5	3,8	0	*	5,4	17,8	0
	HF18	22	0,156	14,1	11,9	102	4	1,4	14,0	267
T. sexuales	SW1	31	0,730	1,9	9,9	-	4,7	5,7	8,8	464
	SW2	28	0,439	11,0	5,0	-	11	5,1	4,5	0
	SW3	45	0,024	2,8	3,9	-	*	1,0	26,4	0
	SW4	43	0,139	5,6	6,5	161	*	8,0	10,3	-
	SW5	33	0,243	3,6	3,5	769	7	6,8	5,2	-
	SW6	34	0,193	63,4	51,0	211	*	1,0	13,7	-
Pacientes NIC	PN1	26	0,225	13,9	28,6	0	4	3,6	20,0	111
	PN2	22	0,278	24,1	32,8	0	7	10,3	24,6	131
	PN3	21	0,699	14,8	10,8	0	*	5,4	2,0	0
	PN4	27	0,193	6,8	10,4	0	4	9,1	2,0	44
	PN5	28	0,733	3,9	4,4	133	*	9,1	17,0	170
	PN6	24		5,5	24,6	0	*	1,0	23,5	783
	PN7	30	0,130	1,2	6,5	0	4	1,8	3,2	0
	PN8	32		3,2	87,0	0	4	0,8	3,0	626
	PN9	38	0,656	12,1	10,7	0	*	1,5	3,7	0
	PN10	39	0,210	8,2	35,7	0	*	2,8	12,1	23
Hombres	HM1	47	0,339	1,7	15,2	1160	4,7	5,3	20,0	46
	HM2	40	0,103	3,3	4,5	283	4	2,1	3,5	580
	HM3	47	0,172	3,1	17,5	0	*	7,8	20,2	200
	HM4	35	0,188	2,7	15,4	282	1	1,5	13,1	-
	HM5	26	0,132	2,5	8,0	0	4,7	7,9	7,6	280
	HM6	24	0,113	10,8	2,2	0	4	2,4	33,1	137
	HM7	25	0,090	38,2	15,5	0	4	1,9	7,9	0
	HM8	36	0,158	3,4	6,4	40	*	4,8	5,3	814
	HM9	57	0,200	2,1	9,0	0	*	4,3	8,2	334
	HM10	29	0,124	3,9	7,2	0	4	3,3	5,8	485

(a) Valores que corresponden a títulos de anticuerpos por ELISA contra VLPs (anti-VLPs), aquellos en negrilla son los considerados títulos de anticuerpos positivos contra el virus. (b) Valores de los índices de estimulación de TCLs estimuladas directamente con VLPs ó PHA [TCL] (panel A) e índices de estimulación de TCLs estimuladas con CDs [TCL + CDs] (panel B); valores de IE > 2 considerados positivos se resaltan en negrilla. Los valores de interferón gama (IFN-γ) detectados en sobrenadantes de linfocitos estimulados aparecen en la columna IFN-γ. La columna HLA-DRβ1* corresponde a los resultados de la tipificación por PCR del haplotipo HLA de los voluntarios. HF: mujeres sanas, SW: trabajadoras sexuales, PN: pacientes con NIC, HM: hombres sanos. PHA: Phytohemaglutinina utilizada como mitógeno para evaluar viabilidad de las células.

VPH-16 al parecer está ampliamente distribuida en población sana, permite predecir que posiblemente la respuesta inmune al virus en estos individuos contribuye al exitoso control de la infección. Por estas razones, decidimos hacer un estudio comparativo en el que se examinara la respuesta inmune a la proteína L1 de VPH-16 en individuos sanos (hombres y mujeres) con vida sexual activa, con la de un grupo de mujeres con NIC, con el fin de: (i) evaluar las características de la respuesta inmune celular a L1; (ii) identificar epítopes Th en L1 que puedan ser utilizadas como péptidos candidatos a vacuna contra el VPH y (iii) evaluar el estatus de la respuesta de interleuquinas de células infectadas con VLPs hechas de L1 y de linfocitos T CD4 que proliferan en respuesta a este antígeno.

Para el estudio de la respuesta inmune celular, mediante el uso de VLPs VPH-16/L1 como fuente de antígeno viral, decidimos examinar en un primer grupo de individuos con vida sexual activa: pacientes, mujeres y hombres sanos (codificados como Pa-f, HF- y HM respectivamente en la **Figura 2**), el grado de proliferación celular como respuesta a VLPs VPH-16/L1 de linfocitos T presentes en PBLs tomados en una muestra de sangre periférica, haciendo uso de un ensayo convencional de incorporación del nucleótido timidina [marcado con tritio] en un período de 4 días como se explica en la sección de *materiales y métodos*.

Como se muestra en la **Figura 2**, en este experimento no fue posible evidenciar un grado importante de linfoproliferación a VLPs, medida en términos de ($SI \geq 2$) sugestivo de una respuesta positiva en este tipo de análisis en linfocitos de la mayoría de individuos examinados. El resultado de que mediante el uso de un ensayo convencional de linfo-proliferación de cuatro días no fue posible evidenciar respuesta inmune de linfocitos de memoria específicos contra el virus en la mayoría de individuos, incluso en aquellos con enfermedad activa, nos puso de presente la necesidad de evaluar la respuesta de linfocitos de memoria al virus mediante el uso de condiciones experimentales distintas a las utilizadas en este ensayo.

Los linfocitos de memoria, específicos contra el VPH, están presentes en sangre periférica de individuos con vida sexual activa y expanden cuando se cultivan en IL-2.

Se acepta hoy en día que en las células blancas circulantes de la sangre periférica existen dos tipos de linfocitos de memoria,¹⁶ los cuales se caracterizan por una diferente distribución tisular: los EM (efectores de memoria que circulan en tejidos como hígado, y pulmón etc.) y los CM (memoria central que se localizan en nodulos linfoides). Distintas evidencias experimentales muestran que estas dos poblaciones de linfocitos de memoria, además de diferencias en su distribución tisular, tienen funciones efectoras distintas (ejemplo: rapidez de respuesta y tipo de citoquina que producen). En vista de que experimentalmente se ha demostrado que la inmunidad a la infección por algunos parásitos o virus está ligada a la detección en sangre periférica de linfocitos de memoria tipo CM, específicos para antígenos de estos patógenos, que expanden *in vitro* luego de ser cultivados en presencia de interleuquina-2 (IL-2),¹⁷ decidimos utilizar similares condiciones de cultivo *in vitro* tratando de evidenciar la presencia de este tipo de linfocitos específicos contra el VPH en sangre periférica de un mayor número de individuos expuestos a la infección por este virus.

La **tabla 1** (panel A) muestra las características de los voluntarios estudiados (codigo, edad) y los resultados de la evaluación de la respuesta de anticuerpos contra el virus, medidos por ELISA (anti-VLP) en el plasma de 44 individuos distribuidos en cuatro grupos [18 mujeres sanas (HF); 6 trabajadoras sexuales (SW); 10 pacientes con NIC (PN) y 10 hombres sanos (HM)]. Además, se muestra el nivel de linfo-proliferación (medida como IE) y producción de interferón gama (pg/ml) por TCLs obtenidas de linfocitos de sangre periférica expandidos en IL-2 luego de ser estimulados *in vitro* con VLPs VPH-16/L1 como se describe en *materiales y métodos*.

La evaluación de los niveles de anticuerpos contra el virus en los plasmas de estos individuos (anti-VLP) evidenció títulos altos de anticuerpos contra VLPs en 12/18 mujeres sanas; 3/6 trabajadoras sexuales; 6/8 traba-

jadoras sexuales comprobándose la exposición al virus en la mayoría de los individuos estudiados. Cabe anotar que tanto la ausencia de anticuerpos contra el virus en algunos pacientes con NIC, como la baja detección de anticuerpos en hombres expuestos al virus, han sido descritos con anterioridad por otros investigadores.

Como se presenta en la **tabla 1**, la presencia en sangre periférica, en individuos expuestos al virus, de linfocitos de memoria específicos contra VLPs VPH-16/L1 que expanden vigorosamente cuando se cultivan *in vitro* con IL-2, se demostró con éxito en este nuevo experimento. Se detectó una vigorosa respuesta de proliferación de estos linfocitos en respuesta al virus en 34/44 individuos estudiados (ver $IE \geq 2$ de TLCs resaltados en negrilla en **tabla 1A**). Se demostró con claridad que la expansión de precursores contra el virus se favoreció mediante el cultivo de linfocitos de sangre periférica en IL-2 al valorar los resultados de IE de linfocitos de las mujeres sanas (voluntarias HF-2, HF-6 y HF-10) y de los varones (HM1, HM2 y HM4), quienes habiendo dado una respuesta de proliferación negativa en el primer ensayo (**Figura 2**), fueron positivos en el segundo [(comparar de $IE \leq 2$ obtenidos en cultivo de cuatro días sin IL-2 de linfocitos de individuos HF-2, HF-6, HF-10 y HM1, HM2, HM4 presentados en **Figura 2**, con $IE \geq 2$ en **tabla 1A** que corresponden a IE de los mismos individuos a partir del cultivo de los linfocitos en presencia de IL-2)].

Es de notar que mientras 7/18 TCL generadas con IL-2 de las mujeres sanas no proliferaron a VLPs, tan solo una línea celular de cada uno de los otros tres grupos (trabajadoras sexuales, pacientes y hombres) mostraron igual incapacidad para proliferar. Este resultado sugiere que el número de precursores de linfocitos de memoria en sangre periférica, específicos contra el virus, es distinto en los diferentes grupos estudiados y quizás este número esté ligado al grado de exposición al virus (alto en trabajadoras sexuales, pacientes con NIC y bajo en mujeres sanas). De manera sorprendente los resultados mostraron que a pesar de no haberse detectado anticuerpos por ELISA en la mayoría de los varones (ver cifras de anti-VLPs en hombres en **tabla 1A**), en 9/10 fue posible expandir precursores de linfocitos de memoria, específicos contra el virus. Esta alta frecuencia de precursores contra el virus en hom-

bres sin síntomas clínicos de lesión causada por VPH, permite argüir en favor de dos posibilidades: la primera, que la respuesta inmune celular contra el virus en el hombre tal vez sea la responsable de su resistencia natural para desarrollar lesiones causadas por este virus y la segunda, que en las diferencias detectadas en nuestros estudios a nivel de respuesta inmune humoral (títulos anti-VLPs) y celular, quizás radique el rasgo de resistencia/susceptibilidad a desarrollar lesión por VPH ligada al sexo, sugerida por otros investigadores.¹⁸

La respuesta de linfocitos T requerida para el control de la infección por patógenos intra y extracelulares es de dos tipos Th1 y Th2 (ver diagrama **Figura 3**). Se cree que para el control del VPH y otros virus es deseable la producción de altos niveles de IFN- γ por linfocitos tipo Th1. Un objetivo importante de este estudio fue la caracterización del status de la respuesta inmune celular y su relación con susceptibilidad (fenotipo encontrada en las pacientes) o resistencia (fenotipo de las trabajadoras sexuales) a la infección por el virus. Por esta razón el fenotipo de la respuesta celular fue explorado midiendo por ELISA los niveles de producción de las citoquinas (IFN- γ e IL-4 prototípicas de las respuestas Th1 y Th2) (ver **Figura 3**) en sobrenadante de cultivo de los linfocitos de memoria que proliferan como respuesta al virus. Aunque no pudieron medirse niveles detectables de IL-4 en ningún individuo estudiado (datos no mostrados), los linfocitos de 13/44 voluntarios estudiados produjeron cantidades altas de IFN- γ en respuesta a VLPs (ver IFN- γ en **tabla 1A**). Aunque la producción de esta citoquina por linfocitos de algunos individuos fue elevada, no fue posible establecer diferencias estadísticamente significativas de su producción entre los grupos de individuos estudiados.

VLPs de VPH-16 < 1 alteran el adecuado proceso de maduración de CDs humanas.

En el desarrollo de una respuesta inmune celular a agentes infecciosos, es posible que el manejo del patógeno por células que presentan el antígeno a los linfocitos T, sea determinante para el tipo de respuesta Th1 o Th2 que se genere. Por la capacidad para producir IL-12, la alta densidad de moléculas MHC clase I y clase II y moléculas de co-estimulación sobre la superficie de

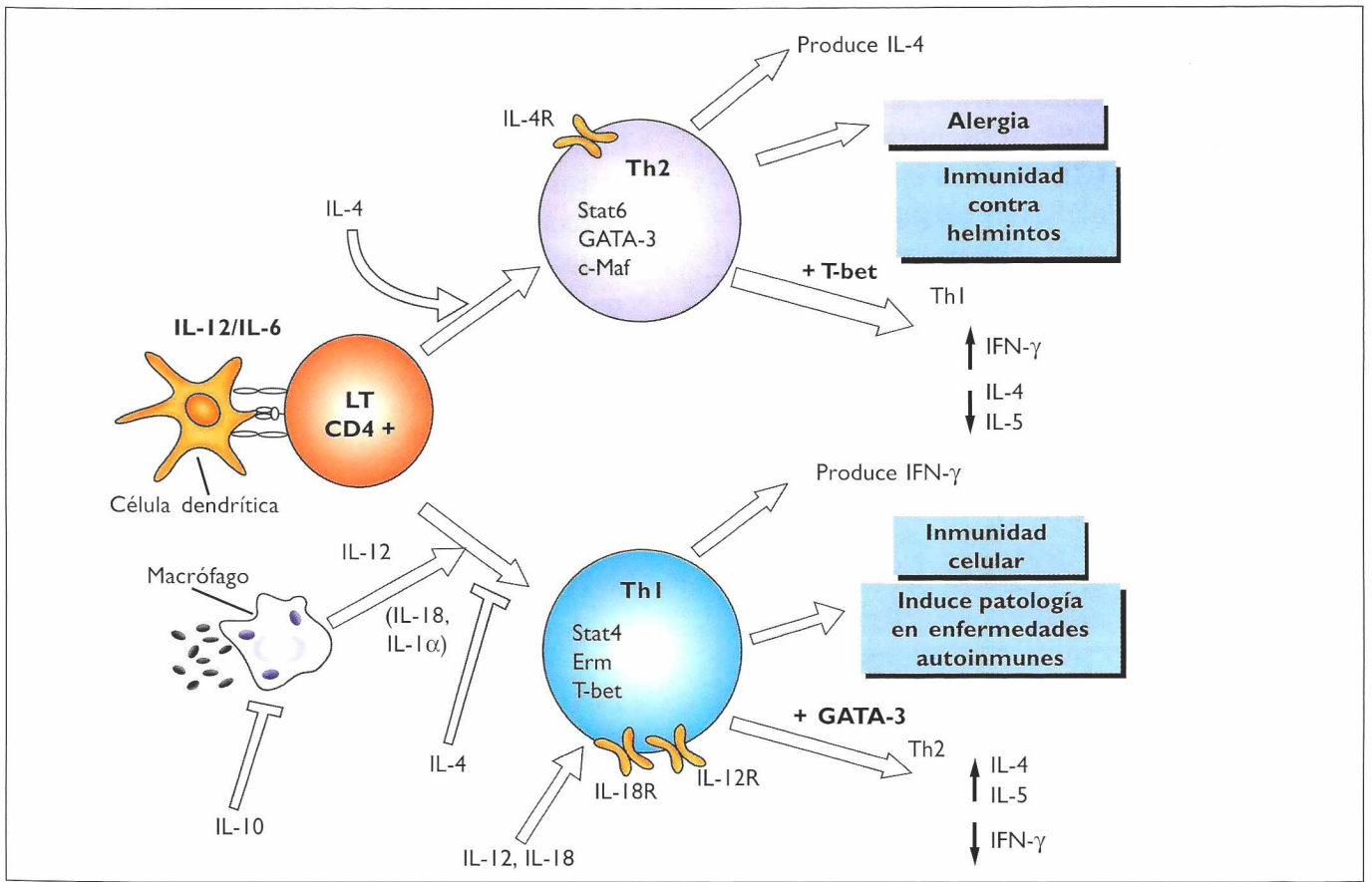


Figura 3. Eventos celulares y moleculares de la polarización de la respuesta ayudadora (Th). Una vez procesado y presentado el antígeno por la célula presentadora del antígeno (APCs) (célula dendrítica o macrófago), esta presenta un péptido al linfocito T CD4+ (LT CD4+). Si esta interacción se da en presencia de la IL-4, la polarización de la respuesta del linfocito T (LT) se dirige hacia el fenotipo Th2, caracterizada por la activación de factores de transcripción *Stat6*, *GATA-3* y *c-Maf* y la producción de IL-4 e IL-5, necesarias para el control de helmintos y que promueve fenómenos alérgicos. Si por el contrario, citoquinas como la IL-12 (producida en especial por CDs) y otras citoquinas (IL-18 e IL-1 α) están presentes en el momento de la estimulación, el LT se polariza hacia un tipo de respuesta Th1 caracterizada por la activación de factores de transcripción como *Stat4*, *Erm* y *T-bet*, y la secreción de interferón gama (IFN- γ), esencial para la activación de la respuesta celular contra patógenos intracelulares (*Toxoplasma spp*, *Leishmania spp*, *Mycobacterium spp* etc) y virus como el VPH e importante en la patogénesis de algunos fenómenos auto-inmunes (ej., artritis reumatoide). Mientras que la transcripción de *T-bet* en una célula Th2 es suficiente para revertir su respuesta a Th1, la transcripción de *GATA-3* es suficiente para la reversión de un fenotipo Th1 a Th2. IL-4R, IL-12-R e IL-18R: receptores de superficie celular para las interleuquinas IL-4, IL-12 e IL-18.

CDs (todos factores que promueven la polarización de la respuesta celular hacia el tipo Th1, ver diagrama **Figura 3**), y ante la imposibilidad de detectar diferencias importantes en el tipo de respuesta celular luego de la estimulación de linfocitos de memoria directamente con VLPs (**tabla 1A**), decidimos investigar el tipo de respuesta evocada en estos linfocitos luego de ser reestimulados con CDs autólogas que han procesado y presentado VLPs. Para realizar estos experimentos fue indispensable la derivación de CDs de los individuos en estudio. La **Figura 4** muestra el resultado típico de la caracterización microscópica y por citometría de flujo de una

muestra de CDs obtenida a partir de monocitos de sangre periférica de individuos en estudio, cultivadas por siete días con IL-4 y GM-CSF como se describe en la sección de *materiales y métodos*. En esta figura se resume cómo mediante morfología y citometría de flujo fue posible obtener CDs con características de APCs profesionales, luego de su maduración con un ARN sintético Poly I:C (ver leyenda **Figura 4** y para más detalle artículo por Delgado y col).¹⁴

Debido a que algunos investigadores han descrito alteraciones en el proceso de maduración de CDs cuando

son puestas en contacto con VLPs,¹⁹ luego de la obtención de CDs autólogas, se evaluó por métodos fluorocitométricos el grado de maduración inducido en CDs inmaduras por VLPs VPH-16/L1. La expresión de diferentes moléculas (CD80, CD86, CD83, CD40, CD11c, CD1b y HLA-DR) sobre la superficie de CDs se utilizó para comparar el grado de maduración inducido en CDs inmaduras por VLPs y por sustancias como Poly I:C, LPS, TNF- α , y CpG, utilizados por lo

regular como inductores de maduración de estas células. La medición por citometría de flujo de las distintas moléculas sobre la superficie de CDs maduras con VLPs, comparado con el alcanzado con cada uno de los otros agentes inductores de maduración utilizados como control, demostró que las VLPs no indujeron una adecuada maduración de CDs inmaduras luego de 48 horas de tratamiento (datos no mostrados). Simultáneamente con el análisis citométrico de marcadores de maduración, se comparó la detección de citoquinas IL-

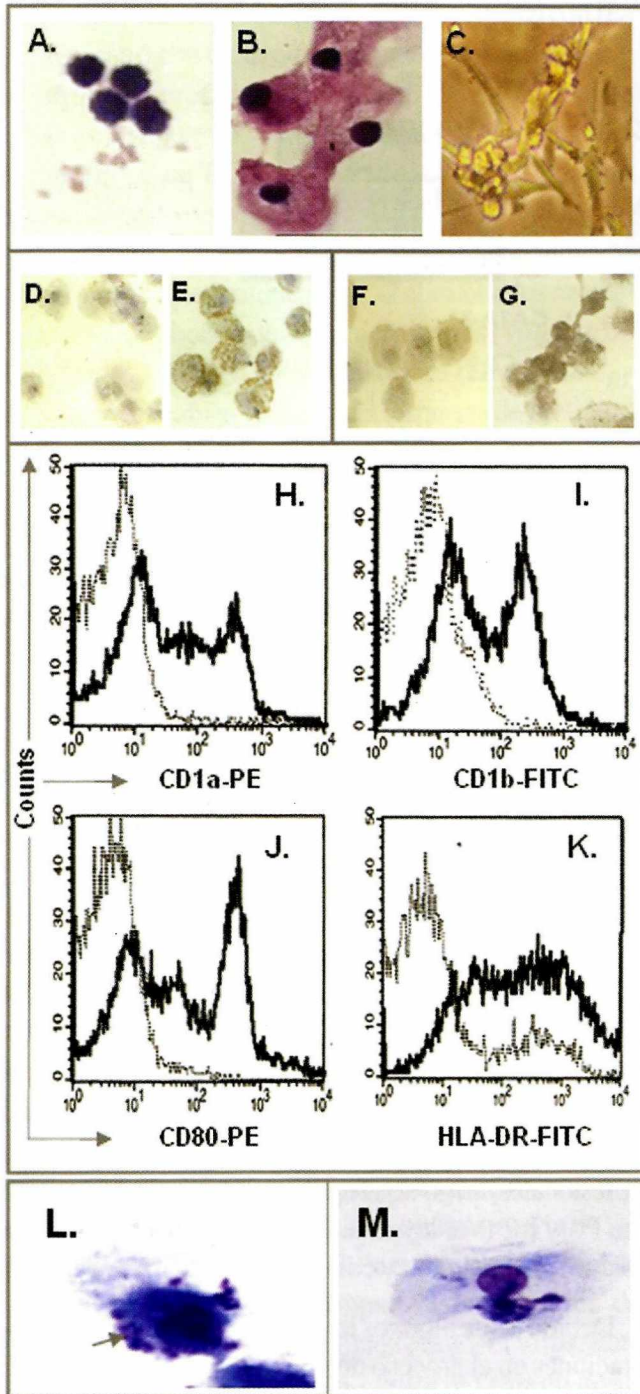


Tabla 2. Comparación de la producción de citoquinas por CDs inmaduras (iCDs) incubadas con VLPs y CDs inmaduras luego de tratamiento con Poly I:C y LPS.

Inductor Maduración	Citoquina (pg/ml)		
	IL-6	IL-12	TNF- α
iCDs	15	0	0
Poly i-c	784	62	69
LPS	1517	13	521
VLPs	74	6	0

Figura 4. Caracterización de CDs humanas por microscopía de luz y citometría de flujo. Análisis microscópico y fluorocitométrico de CDs derivadas de monocitos de sangre periférica. Las fotografías (A-G y L/M) e histogramas (H-K) son resultados representativos de numerosos experimentos de derivación de CDs en monocitos, hechos en nuestro laboratorio siguiendo el protocolo descrito en materiales y métodos. (A) Aspecto de monocitos de sangre periférica inmediatamente después de su aislamiento por adherencia a plástico y (B) morfología de CDs inmaduras luego de siete días de incubación de monocitos en IL-4 y GM-CSF. (C) Microscopía de luz de CDs 48 horas después del tratamiento de CDs inmaduras con RNA sintético (Poly I:C). Inmunohistoquímica de CDs inmaduras (D y F) y maduras con Poly I:C (E y G) teñidos con anticuerpos anti-clase I (D/E) y anti-clase II (anti DR) (F/G). Los histogramas H-K muestran la expresión sobre la superficie de las moléculas: CD1a (H), CD1b (I), CD80 (J) y HLA-DR (K) detectadas por citometría de flujo. Las líneas continuas representan la expresión de la proteína en CDs maduras. Los trazos de puntos corresponden a la expresión basal en monocitos. Fotografía (L) que demuestra la capacidad de CDs inmaduras para fagocitar patógenos (promastigotes de *Leishmania (Viannia) panamensis* teñidos con Giemsa (señalados con flechas). Las CDs maduras (M) pierden su capacidad fagocítica como ha sido descrito por otros autores (composición fotográfica tomada del artículo por Delgado y col¹⁴ reproducida con permiso de los autores).

6, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e IL-12 en los sobrenadantes de DCs sin estimular y estimuladas con VLPs, Poly I:C y LPS. Los resultados presentados en la **tabla 2** (niveles de una muestra típica) demuestran que las VLPs indujeron la producción de bajos niveles de estas tres citoquinas, cuando se compara con los niveles inducidos por Poly I:C y LPS utilizados como control positivo en estos experimentos.

La presentación de antígenos virales por CDs maduras con un ARN sintético permite detectar linfocitos de memoria productores de IFN-g específicos contra el virus en la mayoría de individuos con vida sexual activa.

La poca capacidad de las VLPs para inducir maduración de CDs, nos llevó entonces a utilizar Poly I:C como inductor de maduración de CDs utilizadas para presentar las VLPs a las TCLs generadas en este estudio, debido a que en investigaciones previas de nuestro grupo¹⁴ hemos demostrado la capacidad del Poly I:C para madurar CDs en APCs profesionales que presentan eficientemente antígenos de otros patógenos. Para realizar estos experimentos una parte de la línea celular de cada paciente generada, como se explicó en los experimentos presentados en la **Figura 1A**, fue estimulada con CDs maduras con Poly I:C y pulsadas con VLPs como fuente de antígeno. Los resultados del estudio comparativo de la reestimulación de estas líneas celulares por CDs maduras con Poly I:C y pulsadas con VLPs se presentan en la **tabla 1B**. Estos resultados permitieron demostrar en primer lugar la detección casi universal de precursores en linfocitos de sangre periférica de células de memoria, específicas contra el virus en mujeres sanas (17/18 TCLs derivadas de mujeres sanas respondieron con IE \geq 2 cuando fueron estimuladas con CDs pulsadas con VLPs). Estos hallazgos además de demostrar la capacidad de CDs para estimular la respuesta de linfocitos de memoria, permitió evidenciar la presencia de estos linfocitos en seis mujeres sanas, no detectados cuando estas células fueron estimuladas directamente con VLPs (comparar IE a VLPs de TCLs de las voluntarias sanas: HF1, HF4, HF5, HF9, HF11, HF14 y HF17 en **tablas 1A y 1B**). Además de lo anterior, el uso de CDs como APCs permitió evidenciar

una frecuencia dos veces mayor de individuos cuyos linfocitos produjeron IFN- γ en respuesta al virus comparado al número de individuos respondedores en ausencia de CDs (13/44 individuos produjeron IFN- γ cuando sus TCLs fueron estimuladas sin CDs comparado con 27/44 cuando estas fueron estimuladas con CDs, ver niveles de IFN- γ detectados en **tablas 1A y 1B** respectivamente).

CDs aisladas de pacientes con NIC suprimen la proliferación de linfocitos de memoria específicos contra el virus.

Resultado interesante de estos experimentos fue que el uso de CDs para estimular linfocitos de memoria, específicos contra VLPs de pacientes con NIC, permitió evidenciar una supresión de la respuesta a VLPs en 7/10 pacientes. Este fenotipo supresor de CDs que deprime la proliferación de linfocitos de memoria, específicos contra L1, en especial en el grupo de las pacientes, parece ser independiente del antígeno ya que la respuesta al mitógeno PHA (un estimulador no específico de linfocitos T utilizado para monitorear la viabilidad de los linfocitos estimulados) se deprimió en 9/10 pacientes, cuando los linfocitos fueron estimulados con CDs pulsadas con el mitógeno (comparar valores de IE a VLPs y PHA de pacientes con NIC en **tablas 1A y 1B**). Aunque fue evidente la depresión de la proliferación inducida por las CDs a las líneas celulares específicas contra L1 en el grupo de pacientes, está fuera del alcance de este trabajo hallar una explicación de las bases moleculares y celulares de este fenómeno y su explicación es motivo de investigación por nuestro grupo en este momento.

No se pudo identificar una epítotope peptídica Th linear en la proteína L1.

La vigorosa respuesta de linfocitos de memoria específicos contra VLPs VPH-16/L1 observada en la mayoría de individuos estudiados, sugiere la existencia de epítotope(s) Th en la proteína L1, que presentadas en el contexto de moléculas HLA-DR β 1* estimulan eficientemente los linfocitos T CD4. Para la identificación de esta(s) epítotope(s) decidimos utilizar un ensayo de unión *in vitro*, diseñado para la identificación de secuencias peptídicas en la proteína L1 que se unen con alta afinidad a moléculas HLA-DR β 1* purificadas, un

Tabla 3. Perfil de unión de péptidos de la proteína L1 a cuatro alelos HLA-DRβ1*.

Péptido	Secuencia	HLA-DRβ1			
		0101	0401	0701	1101
18279	MQVTFIYILVITCYENDVNV	-22	-5	23	93
18280	YHIFFQMSLWLPSEATVYLP	25	7	42	86
18281	PVPVSKVVSTDEYVARTNIY	12	10	25	74
18282	YHAGTSRLLAVGHPYFPIKK	78	-3	43	2
18283	PNNNKILVPKVSGLQYRVFR	30	7	45	9
18284	IHLDPNKFPGPDTSFYNP	-24	6	49	30
18285	TQRLVWACVGVVGRGQPLGY	48	30	-0	-6
18286	VGISGHPLLNLDDTENASAY	9	66	61	58
18287	YAANAGVDNRECISMDYKQT	23	11	52	39
18288	QLCLIGCKPPIGEHWGKGSFY	68	25	-20	-6
18289	CTNAVAVNPGDCPPLELINTVY	18	41	21	52
18290	IQDGDVMVHTGFGAMDFTTLQY	8	54	14	57
18291	ANKSEVPLDICTSICKYDPY	2	5	23	30
18292	IKMVSEPYGDSLFFYLRRREQ	-26	7	-30	-19
18293	MFVRHLFNRAGTVGENVPDDY	90	81	50	81
18294	LYIKGSGSTANLASSNYFPT	56	27	14	37
18295	PSGSMVTSDAQIFNKPYWLQ	3	-1	25	43
18296	RAQGHNNGICWGNQLFVTVVY	-1	0	-30	-7
18297	DTRRSTNMSLCAAISTSETTY	65	41	30	54
18298	YKNTNFKEYLRHGEEYDLQF	12	-6	23	54
18299	IFQLCKITLTADVMTYIHSM	13	20	-5	-21
18300	NSTILEDWNFGLQPPPGGTTY	11	33	7	25
18301	EDTYRFVTQAIACQKHTPPA	86	92	40	63
18302	PKEDDPLKKYTFWEVNLKEK	4	31	54	78
18303	FSADLDQFPLGRKFLLQAGLY	90	87	-70	-6
18304	KAKPKFTLGKRKATPTTSSTY	6	0	65	54
18305	KATPTTSSTTTAKRKRKLY	-6	-10	14	8

Los valores de unión superiores o iguales a 50 % se consideran positivos para la unión del péptido al respectivo alelo y se resaltan en negrilla.

ensayo que en nuestras manos y las de otros investigadores ha demostrado utilidad para la identificación de epítopes Th en proteínas de otros patógenos^{14,15,20}. Como se muestra en la **tabla 3**, mediante el uso de ensayos de unión *in vitro* de 27 péptidos que comprenden la totalidad de la secuencia de amino-ácidos de la proteína L1 a los alelos HLA-DRβ1*-0101, -0401, -0701 y -1101, fue posible identificar un péptido de 20 aminoácidos (péptido 18293 en **tabla 3**) [MFVRHLFNRAGTVGENVPDDY] en esta proteína, el cual se une a los cuatro alelos HLA-DRβ1* exami-

nados para la unión, motivo por el cual fue seleccionado como péptido candidato a ser el responsable de inducir la respuesta de linfocitos T de memoria observada en nuestros experimentos. La alta capacidad de unión del péptido 18293 a cuatro alelos ampliamente expresados en los 44 individuos estudiados (ver HLA-DRβ1* en **tabla 1**) nos permitió evaluar la posibilidad de que este péptido representase un epítope universal que fuese responsable de la proliferación y producción de citoquinas por linfocitos de memoria, en respuesta a VLPs evidenciada en nuestros resultados. No obstante

la universalidad del péptido 18293 y la expresión de los haplotipos HLA a los cuales este péptido se une en la mayoría de los 44 individuos del estudio (ver columna HLA-DRβ1* en **tabla 1**), los resultados de los experimentos realizados y no mostrados, nos permiten concluir que este péptido no es el responsable de la respuesta a VLPs de linfocitos de memoria detectada en los 34/44 individuos estudiados.

Implicaciones de nuestros resultados para el desarrollo de vacunas anti-VLPs.

Las vacunas basadas en VLPs VPH-16/L1 evaluadas en ensayos clínicos en fase II, han probado ser efectivas para prevenir la infección por VPH-16. Aunque la respuesta inmune protectora en estos ensayos parece ser mediada por anticuerpos, la participación de la respuesta de linfocitos T en la protección no ha sido demostrada con claridad. En el presente estudio presentamos evidencias de que los linfocitos de memoria contra el virus se encuentran presentes en sangre periférica de la mayoría de individuos con vida sexual activa y que nunca han sido vacunados con VLPs. Si la respuesta inmune celular contra el virus juega un papel importante en la inmunidad a la infección por VPH-16 inducida por vacunas construidas de VLPs VPH-16/L1, nuestros resultados permiten sugerir que la estimulación por la vacuna de los precursores de memoria detectados por nuestros estudios, quizás sea en gran parte responsable de la inmunidad protectora observada en 100% de los individuos vacunados con este tipo de vacunas. Nuestros resultados demuestran además que la epítope o epítopes en L1 a las cuales responden estas células de memoria, permanece(n) sin identificarse. Es claro que cualquiera que sea(n) la(s) epítope(s) en L1 que estimulan estas células a proliferar y a producir IFN- γ evidenciados en nuestros estudios, la restricción genética de esta respuesta al parecer no es muy restringida, a juzgar por lo universal de la respuesta a esta proteína evidenciada en nuestros estudios (34/44 individuos respondieron).

Conclusiones

Hemos demostrado la presencia en sangre periférica de linfocitos de memoria, específicos para la proteína

L1 del VPH-16, tanto en individuos sanos como en pacientes con NIC. Para evidenciar la respuesta de estos precursores fue necesario el cultivo de linfocitos de sangre periférica en IL-2. El uso de CDs como APCs en nuestros estudios, representó una importante ventaja experimental para detectar la respuesta de estas células de memoria que al parecer están en bajo número en la sangre y necesitan expansión *in vitro* con IL-2 para que pueda demostrarse su respuesta (proliferación celular y vigorosa producción de IFN- γ). Aunque no hubo claras diferencias en la producción de IFN- γ por las células de memoria en los individuos de los cuatro grupos estudiados, el uso de CDs como APCs permitió evidenciar un fenotipo supresor de las CDs obtenidas de pacientes con NIC. Por último, aunque se detectó una clara respuesta celular en la mayoría de individuos estudiados, no pudo identificarse una epítope lineal responsable de la estimulación de estas células, a pesar de que los ensayos de unión de péptidos de L1 a alelos HLA DRβ1* permitieron la identificación de un candidato a epítope universal. De acuerdo con nuestros resultados, consideramos que la respuesta de las células de memoria que responden a L1 y que han sido observadas en nuestros experimentos, contribuye de manera importante a la adquisición de memoria inmunológica alcanzada en la población, luego de la vacunación con VLPs obtenida por otros investigadores.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido posible gracias al apoyo financiero del Gobierno Nacional (Ministerio de la Protección Social) al macroproyecto: **Desarrollo de Nuevos Métodos Inmuno-profilácticos y de Diagnóstico Mediante el uso de Moléculas Químicamente Sintetizadas**, adelantado por la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC). También lo ha sido gracias a una importante alianza estratégica entre el grupo de Inmunología de la FIDIC y el de la Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud (FUCS). Los autores agradecen de manera especial el apoyo institucional y financiero de la FUCS a este trabajo, apoyo liderado por el Departamento de Investigaciones de la FUCS, en especial por la Dra. Marcela Gómez. Al Doctor Darío Cadena por su paciente revisión del manuscrito y por

sus valiosos comentarios. A Patricia Isaza y Adriana Pinzón en el laboratorio de Inmunología de la FUCS por su incondicional colaboración.

Referencias

- Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev. Cancer* 2002; 2 (5):342-50.
- Galloway DA. Papillomavirus vaccines in clinical trials. *Lancet Infect Dis* 2003; 3(8):469-75.
- Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, et al. Proof of Principle Study Investigators. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N Engl J Med* 2002; 347(21):1645-51.
- Jansen KU, Shaw AR. Human papillomavirus vaccines and prevention of cervical cancer. *Annu Rev Med* 2004; 55:319-31. Review.
- Pinto LA, Edwards J, Castle PE, et al. Cellular immune responses to human papillomavirus (VPH)-16 L1 in healthy volunteers immunized with recombinant VPH-16 L1 virus-like particles. *J Infect Dis* 2003; 188(2):327-38.
- Finnen RL, Erickson KD, Chen XS, Garcea RL. Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. *J Virol* 2003; 77(8):4818-26.
- Chen XS, Garcea RL, Goldberg I, Casini G, Harrison SC. Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol Cell* 2000; 5(3):557-67.
- Carter JJ, Wipf GC, Benki SF, Christensen ND, Galloway DA. Identification of a human papillomavirus type 16-specific epitope on the C-terminal arm of the major capsid protein L1. *J Virol* 2003; 77(21):11625-32.
- Viscidi RP, Ahdieh-Grant L, Schneider MF, et al. Serum immunoglobulin A response to human papillomavirus type 16 virus-like particles in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and high-risk HIV-negative women. *J. Infect. Dis* 2003; 188(12):1834-44.
- Vera-Bravo R, Ocampo M, Urquiza M, Garcia JE, et al. Human papillomavirus type 16 and 18 L1 protein peptide binding to VERO and HeLa cells inhibits their VLPs binding. *Int J Cancer* 2003; 107(3):416-24.
- Christensen ND, Reed CA, Cladel NM, Hall K, Leiserowitz GS. Monoclonal antibodies to VPH-6 L1 virus-like particles identify conformational and linear neutralizing epitops on VPH-11 in addition to type-specific epitopes on VPH-6. *Virology* 1996; 224(2):477-86.
- Molano M, Posso H, Weiderpass E. et al. VPH Study Group VPH Study. Prevalence and determinants of VPH infection among Colombian women with normal cytology. *Br J Cancer* 2002; 87(3):324-33.
- Combita AL, Bravo MM, Touze A, Orozco O, Coursaget P. Serologic response to human oncogenic papillomavirus types 16, 18, 31, 33, 39, 58 and 59 virus-like particles in colombian women with invasive cervical cancer. *Int J Cancer* 2002; 97(6):796-803.
- Delgado G, Parra-Lopez CA, Vargas LE, et al. Characterizing cellular immune response to kinetoplastid membrane protein-11 (KMP-11) during *Leishmania (Viannia) panamensis* infection using dendritic cells (DCs) as antigen presenting cells (APCs). *Parasite. Immunol* 2003; 25(4):199-20.
- Calvo-Calle JM, Hammer J, Sinigaglia F, Clavijo P, Moya-Castro ZR, Nardin EH. Binding of malaria T cell epitops to DR and DQ molecules in vitro correlates with immunogenicity in vivo: identification of a universal T cell epitopes in the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein. *J Immunol* 1997; 159(3):1362-73.
- Sprent J, Surh CD. T cell memory. *Annu. Rev Immunol* 2002; 20:551-79.
- Reece WH, Pinder M, Gothard PK, et al. A CD4(+) T-cell immune response to a conserved epitope in the circumsporozoite protein correlates with protection from natural *Plasmodium falciparum* infection and disease. *Nat. Med* 2004; 10(4):406-10.
- Stone KM, Karem KL, Sternberg MR, McQuillan GM, Poon AD, Unger ER, Reeves WC. Seroprevalence of human papillomavirus type 16 infection in the United States. *J Infect Dis* 2002; 186(10):1396-402.
- Lenz P, Day PM, Pang YY, Frye SA, Jensen PN, Lowy DR, Schiller JT. Papillomavirus-like particles induce acute activation of dendritic cells. *J Immunol* 2001; 166(9):5346-55.
- Vargas LE, Parra CA, Salazar LM, Guzman F, Pinto M, Patarroyo ME. MHC allele-specific binding of a malaria peptide makes it become promiscuous on fitting a glycine residue into pocket 6. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 307(1):148-56.

