

# RESPUESTA SEROLÓGICA A LAS CÁPSIDES DE LOS PAPILOMAVIRUS ONCOGÉNICOS TIPOS 16, 18, 31, 33, 39, 58 Y 59 EN MUJERES COLOMBIANAS CON CÁNCER DE CÉRVIX

Alba Lucia Cómbita<sup>1</sup> Antoine Touzé<sup>2\*</sup>, Pierre Coursaget<sup>2\*\*</sup>, María Mercedes Bravo<sup>1</sup>

---

## ABSTRACT

---

**Introduction:** The carcinoma of the uterine cervix is the first cause of cancer mortality among young Colombian women. An etiological association between infection with high risk HPV and cervical cancer has been demonstrated. L1 proteins from HPV have the ability to assemble into virus-like particles (VLP). Numerous serologic studies using HPV16 or HPV18 VLP have shown that infection with genital HPV is followed by a serologic immune response to viral capsid proteins.

**Objectives:** To evaluate the sero-response to HPV 16, 18, 31, 33, 39, 58, and 59 VLP in women with invasive cancer from Colombia. Antibody responses were analyzed and compared in terms of presence of HPV DNA, age, disease severity, and survival.

**Materials and methods:** The presence of antibodies to VLP from 7 high risk types was investigated by ELISA in 147 patients with invasive cervical cancer and 147 age-matched cytologically normal and HPV-negative women.

**Results:** Anti VLP antibodies were detected in 82% of the invasive cervical cancer patients and 56% of the controls. Detection of antibodies against multiple HPV types is the rule; higher antibody levels were observed in younger cancer patients. In those followed serologically for one year, antibodies generally remained at the same level. However, in some patients an increase or decrease in antibody levels occurred simultaneously for multiple HPV types.

**Conclusions:** Our results confirm (i) the high rate of HPV infections in Colombia, both in cervical cancer patients and in the general population, and the particularly high rate of infections due to HPV 31 and 58; and (ii) the validity of anti-VLP antibodies as markers of present or past infections. The simultaneous appearance or disappearance of antibodies against multiple HPV VLP suggests that the antibodies detected by ELISA are not always type-specific.

**Key Words:** HPV, virus particles, cervical neoplasm, antibody.

---

\* Grupo de Inmunología, Instituto Nacional de Cancerología. Bogotá, Colombia.

\*\* Laboratoire de Virologie Moléculaire, Faculté de Sciences Pharmaceutiques. U de Tours. Tours, France.

---

Recibido el 14 de diciembre de 2002 y aceptado para publicación el 6 de enero de 2003.

Correspondencia: Laboratorio de Inmunología, Instituto Nacional de Cancerología, Calle 1 No 9-85, Bogotá-Colombia, Fax: 57 1 334 13 60. E-mail: [inmunologia@incancerologia.gov.co](mailto:inmunologia@incancerologia.gov.co)

## RESUMEN

**Introducción:** En Colombia, el carcinoma de cérvix es la primera causa de muerte por cáncer de la mujer en edad reproductiva. Se ha demostrado una asociación etiológica entre los virus del papiloma humano (HPV) de alto riesgo y esta neoplasia. La proteína L1 de los HPV tiene la propiedad de autoensamblarse en cápsides vacías (VLP). En varios estudios basados en VLP de HPV16 o HPV18 se ha observado que la infección por HPV genitales es seguida por una respuesta serológica a proteínas de la cápside.

**Objetivos:** Evaluar la respuesta serológica hacia las VLP de los tipos virales oncogénicos 16, 18, 31, 33, 39, 58 y 59 en mujeres colombianas con cáncer de cérvix, y en controles y compararlas con la presencia de ADN viral, la edad y el curso clínico.

**Materiales y métodos:** Se analizó la presencia de anticuerpos hacia las VLP de 7 tipos virales oncogénicos en 147 sueros de pacientes con cáncer de cérvix y en 147 sueros de mujeres con citología normal apareados por edad, mediante ELISA.

**Resultados:** Se detectaron anticuerpos anti-VLP en 82% de pacientes y en 56% de controles. La detección de anticuerpos contra múltiples tipos de HPV fue la regla; en pacientes jóvenes con cáncer de cérvix se observaron altos niveles de anticuerpos. En los casos con seguimiento serológico durante un año, en general, los anticuerpos se mantuvieron en el mismo nivel; sin embargo, en algunos hubo elevación o disminución simultánea de los anticuerpos contra varios tipos virales.

**Conclusiones:** Nuestros resultados confirman (i) la alta tasa de infecciones por HPV en Colombia, tanto en pacientes con cáncer como entre población general, y las particularmente altas tasas de infección por los tipos virales 31 y 58, (ii) la validez de los anticuerpos anti-VLP como marcadores de infecciones en curso o pasadas. La aparición o desaparición simultánea de anticuerpos contra VLP de varios tipos virales sugiere que los anticuerpos detectados en ELISA no son siempre tipos específicos.

**Palabras clave:** HPV, partículas semejantes a virus, cáncer de cérvix, anticuerpos.

## INTRODUCCIÓN

El carcinoma cervical se diagnostica anualmente en aproximadamente 500.000 mujeres en todo el mundo y causa al menos 200.000 muertes por año.<sup>(1,2)</sup> La mayoría de casos ocurre en países en desarrollo, en los que a menudo esta neoplasia es la más frecuente entre las mujeres y puede representar hasta el 25% de los cánceres femeninos.<sup>(3)</sup>

La asociación etiológica entre la infección por virus del papiloma humano y el cáncer de cérvix es ampliamente aceptada: más del 99% de los cánceres cervicales diagnosticados en el mundo contienen genes de los tipos virales oncogénicos (principalmente, de los tipos 16, 18, 31 y 45), el HPV16 es el tipo más frecuente, pues se encuentra en el 50% de los cánceres cervicales; los tipos 18, 31 y 45 se encuentran en 25% a 30% de los tumores.<sup>(4,5)</sup>

Los papilomavirus codifican una proteína principal de la cápside (L1) que tiene la capacidad intrínseca de auto ensamblarse, en ausencia de otros productos virales, formando cápsides virales vacías conocidas como VLP (*virus-like particles*).<sup>(6,7)</sup> Estas VLP, formadas a partir de proteínas recombinantes L1, son morfológicamente indistinguibles de los viriones auténticos y contienen las építopes conformacionales inmunodominantes presentes en éstos.<sup>(8)</sup>

En varios estudios serológicos, usando principalmente VLP de HPV16<sup>(9-13)</sup>, se ha demostrado que la infección con papilomavirus genitales es seguida por una respuesta inmune humoral a las proteínas de la cápside viral y que los anticuerpos anti-VLP pueden ser indicadores de infecciones pasadas y presentes. En estudios de seguimiento con VLP de HPV 16 y 18 se ha demostrado que la seroconversión ocurre entre 6 y 18 meses después de la detección de ADN viral y es poco frecuente en pacientes con presencia transitoria de ADN viral.<sup>(11,13-15)</sup> Los anticuerpos anti-VLP se asocian con detección persistente del ADN y permanecen detectables en el suero por varios años.

El propósito de este estudio fue analizar la respuesta serológica hacia los tipos de HPV oncogénicos más frecuentes en mujeres colombianas con cáncer cervical invasivo y controles normales, con el fin de establecer si existe una asociación entre la presencia de anticuerpos hacia las cápsides virales de los HPV oncogénicos y esta neoplasia. En las mujeres con cáncer, las respuestas de anticuerpos fueron analizadas y comparadas en

términos de presencia del ADN viral, edad, estadio de la enfermedad y supervivencia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### PACIENTES Y CONTROLES

Entre agosto de 1995 y octubre de 1997 se obtuvieron muestras de suero y cepillado cervical de 147 mujeres con diagnóstico de cáncer de cérvix en estadios FIGO IIB y IIIB antes de iniciar el tratamiento. Todas las pacientes recibieron tratamiento de radioterapia en el Instituto Nacional de Cancerología. De 62 pacientes se obtuvieron muestras, 2 y 12 meses después del tratamiento. Se incluyó también en el estudio un grupo de 147 mujeres que asistieron a toma de citología a la Liga Colombiana de Lucha Contra el Cáncer, cuyo resultado fue negativo para neoplasia y en las que no se detectó presencia de ADN de HPV.

Los sueros fueron almacenados a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Para los cepillados cervicales, las células fueron removidas del aplicador de algodón por agitación en el medio de transporte (5 ml de PBS, 0,005% de Timersal); luego se centrifugaron a 3.000 g por 10 minutos. El precipitado celular fue resuspendido en 1 ml de TRIS-HCL 10 mM pH 8,3 y almacenado a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### DETECCIÓN Y TIPIFICACIÓN DE ADN DE HPV EN CEPILLADOS CERVICALES

10  $\mu\text{l}$  de cada suspensión celular de los cepillados cervicales fueron amplificados por PCR; se emplearon los iniciadores genéricos GP5+ y GP6+, siguiendo la metodología descrita por Roda Husmann.<sup>(16)</sup> Las líneas celulares SiHa y HeLa fueron empleadas como controles positivos. La tipificación se realizó por hibridación en formato de ensayo inmunoenzimático, siguiendo la metodología descrita por Jacobs.<sup>(17)</sup>

### PRODUCCIÓN DE VLP

La producción de VLP de los HPV tipos 16, 18, 31, 33, 39, 58 y 59 se realizó mediante la expresión de los genes L1 de cada tipo viral en el sistema de baculovirus / células de insecto. Las secuencias codificantes de cada gen fueron amplificadas mediante PCR a partir de biopsias cervicales de pacientes con carcinoma invasivo

de cérvix; posteriormente, los productos fueron clonados en el vector pCR2.1 (TOPO TA Cloning, INVITROGEN) y luego subclonados en el vector pBlueBacIII (INVITROGEN), corriente abajo del promotor de la polihedrina. El vector resultante se cootransfectó en células de insecto con el virus DNA AcMNPV linearizado. Para los tipos virales 33, 58 y 59 se hizo el subclonaje en el vector pFastBacI y se transformaron células competentes *Escherichia coli* D10Hbac. Los Baculovirus recombinantes se generaron y seleccionaron según las recomendaciones del fabricante. Éstos se emplearon para infectar células Sf21 y las VLP se purificaron por ultracentrifugación en gradientes de CsCl. La presencia de VLP en cada preparación se verificó por microscopía electrónica (Ver Figura 1).

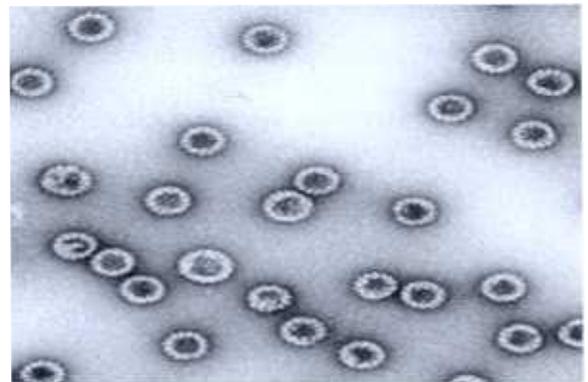


Figura 1. Microfotografía electrónica de VLP de HPV3

### ELISA EMPLEANDO LAS VLP

Se acoplaron en placas de 96 pozos 0,2  $\mu\text{g}$ /pozo a 0,8  $\mu\text{g}$ /pozo de las VLP, o 0,2  $\mu\text{g}$  de albúmina bovina sérica, diluidos en tampón fosfato-salino pH 7,2 (PBS); las placas se incubaron toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . Cada suero fue analizado en duplicado y simultáneamente con cada uno los siete tipos de VLP y con albúmina bovina sérica en la misma placa. Los sitios libres de la placa se bloquearon con 200  $\mu\text{L}$  de suero fetal bovino al 1% en PBS durante 2 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . Luego 100  $\mu\text{L}$  de cada suero fueron colocados (diluidos 1/20 en PBS 5X con suero fetal bovino al 10%) y se incubaron una hora a  $45^{\circ}\text{C}$ . Después de cuatro lavados con PBS-Tween se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de conjugado anti-IgG humana peroxidasa, todo se incubó una hora a  $45^{\circ}\text{C}$ , después se lavó 5 veces, y la reacción se reveló por adición de

100 µL de una solución de OPD y peróxido de hidrógeno al 0,03%. Después de 30 minutos se frenó la reacción mediante adición de 100µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N y se midió la densidad óptica (D.O.) a 492 nm. Para calcular la D.O. neta para cada suero, el promedio de D.O. de los pozos con albúmina (ruido de fondo) se restó del promedio de los pozos con VLP. Cada suero fue considerado como positivo o negativo empleando un punto de corte de 0,185 previamente determinado con base en los valores de D.O. de un grupo de 35 niños.

### ABSORCIÓN DE ANTICUERPOS

Los sueros se diluyeron 1/20 en PBS pH 7,4 con 10% de suero fetal bovino y 0,1% de Tween 20; para algunos ensayos fueron preabsorbidos durante 1 hora a 37°C con VLP (0,2 mg/ml), según se indica (Tabla 4). Los sueros absorbidos fueron evaluados en ELISA.

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se empleó el programa SPSS. Se usó la prueba  $\chi^2$  para el análisis de proporciones entre grupos. Se hizo un análisis de supervivencia de los pacientes según la presencia anticuerpos. Usando el método de Kaplan-Meyer, y las diferencias entre grupos se analizaron con el test Log-rank.

## RESULTADOS

Se analizó la respuesta serológica hacia las cápsides de los 7 tipos virales en 147 sueros de pacientes con diagnóstico de cáncer de cérvix, estadios IIB y IIIB, y en 147 controles; es decir, sueros de mujeres que asistieron a toma de citología de rutina en la Liga Colombiana de Lucha Contra el Cáncer, cuyo resultado citológico fue normal y que resultaron negativas para presencia de HPV. Los resultados encontrados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Seroreactividad hacia VLP de siete tipos virales en 147 casos de cáncer cervical invasivo y 147 controles

Tipo de HPV	Anticuerpos anti VLPs		OR (95% IC)	P
	Controles n (%)	Cáncer de Cérvix n (%)		
16	26 (17,7)	81 (55,1)	5,7 (3,3-9,6)	<10 <sup>-6</sup>
18	20 (20,4)	62 (42,2)	2,8 (1,7-4,8)	<10 <sup>-5</sup>
31	18 (12,2)	43 (29,3)	3,0 (1,6-5,4)	<10 <sup>-4</sup>
33	13 (8,8)	25 (17,0)	2,1 (1,0-4,3)	0.037
39	27 (18,4)	47 (32,0)	2,1 (1,2-3,6)	0.007
58	31 (20,1)	51 (34,7)	2,0 (1,2-3,3)	0.009
59	14 (9,5)	33 (22,4)	2,7 (1,4-5,4)	0.002
Cualquiera	83 (56,5)	120 (81,6)	3,4 (2,0-5,8)	<10 <sup>-6</sup>

En el grupo de control, las mayores frecuencias de anticuerpos se presentaron con los tipos virales 16 (17,7%), 18 (20,4%), 39 (18,4%) y 58 (20,1%), y las menores frecuencias de anticuerpos se presentaron con los tipos virales 33 (8,8%) y 59 (9,5%). La seroreactividad para todos los tipos virales fue mayor en los casos de cáncer que en los controles, y las frecuencias variaron entre el 17% para HPV33 y el 55%

para HPV16. Para todos los tipos virales se encontró asociación significativa entre presencia de anticuerpos hacia cápsides virales y cáncer, en comparación con los controles (Tabla 1). En el grupo de control, 56% de las mujeres presentaron anticuerpos hacia al menos un tipo viral, mientras que en el grupo de cáncer lo hicieron 82% ( $p < 10^{-6}$ , OR 3,4 IC 95%: 2,0-5,8).

La presencia de anticuerpos hacia VLP en pacientes con cáncer se analizó en relación con edad, estadio tumoral, tipo histológico, tamaño tumoral, respuesta al tratamiento y presencia de ADN de HPV. Los resultados se presentan en la Tabla 2. Sólo la edad al momento del

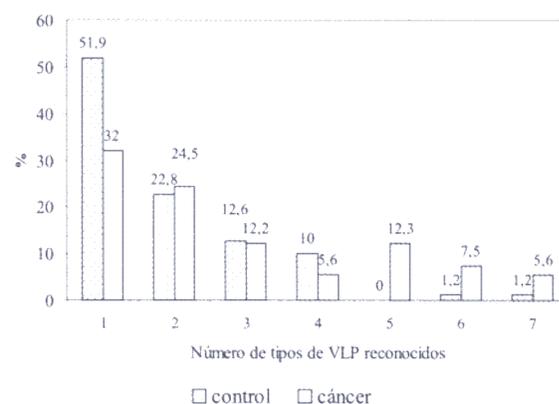
diagnóstico se relacionó con la presencia de anticuerpos anti-VLP. Un 93% de pacientes menores de 49 años presentaron anticuerpos; en mujeres de más edad, la frecuencia fue del 72% ( $p = 0,001$ ).

**Tabla 2. Características de las pacientes con cáncer cervical según estado de anticuerpos anti-VLP**

Característica	Acs anti VLP positivos n (%)	Acs anti VLP negativos n (%)	p
Edad al diagnóstico			
>49	56 (71,8)	22 (28,2)	0,001
<49	64 (92,8)	5 (7,2)	
Estadio FIGO			
IIB	53 (81,5)	12 (18,5)	
IIIB	67 (81,7)	15 (18,3)	
Tipo Histológico			
Adenocarcinoma	10 (76,9)	3 (23,1)	
Ca. de células escamosas	110 (82,1)	24 (17,9)	
Tamaño tumoral			
>5cm	63 (82,9)	13 (17,1)	
<5cm	57 (80,3)	14 (19,7)	
Respuesta a la radioterapia			
Parcial/No respuesta	26 (86,7)	4 (13,3)	
Completa	94 (80,3)	23 (19,7)	
DNA de HPV			
Negativo	16 (69,6)	7 (30,4)	0,1
Positivo	104 (83,9)	20 (16,1)	

Las pacientes con cáncer fueron seguidas en promedio 24 meses (rango 1-57). Después del tratamiento, 49 murieron. La supervivencia se analizó según la presencia o ausencia de anticuerpos contra VLP. No se observaron diferencias en la supervivencia según la presencia de anticuerpos anti-VLP, y cuando se consideró la presencia de títulos altos de anticuerpos (valores de D.O. superiores a tres veces el punto de corte) la supervivencia de las pacientes fue mejor en el grupo que tenía anticuerpos, excepto para HPV 58; esta diferencia fue significativa para HPV31 (LR test,  $p = 0,025$ ). Ver Tabla 3.

Un número importante de pacientes con cáncer (65%) y controles (39,8%) presentó anticuerpos hacia más de un tipo viral (ver figura 2). En particular se observó reactividad hacia más de cuatro tipos virales, con mayor frecuencia en cáncer (23,3%) que en los controles (4,8%) ( $p < 0,001$ ).



**Figura 2. Serorreactividades únicas y múltiples hacia papilomavirus humanos en 147 pacientes con cáncer y 147 controles**

Tabla 3. Análisis de supervivencia según nivel de anticuerpos anti-VLP

Anticuerpos anti VLP	N	Supervivencia a 60 meses	P*
HPV16			
Positivos	23	73,9	
Negativos	124	65,3	0,41
HPV18			
Positivos	20	80	
Negativos	127	64,5	0,14
HPV31			
Positivos	17	88,4	
Negativos	130	63,8	
HPV33			
Positivos	11	81,8	
Negativos	136	66,4	0,69
HPV39			
Positivos	11	81,8	
Negativos	136	65,4	0,19
HPV58			
Positivos	17	64,7	
Negativos	130	66,9	
HPV59			
Positivos	13	84,6	
Negativos	134	64,9	0,08

\* Log-rank test

En 62 pacientes se analizaron las variaciones de los niveles de anticuerpos anti-VLP en el tiempo. Se tenían muestras de antes de tratamiento y de 2 y 12 meses después del tratamiento. Se consideró un incremento de los niveles de anticuerpos cuando entre una muestra y otra se aumentó al doble la D.O. o cuando hubo seroconversión, y una disminución cuando el valor de la D.O. se redujo a la mitad o cuando la D.O. fue inferior al punto de corte. No se observaron cambios en los niveles de anticuerpos en 40% a 70% de las pacientes, dependiendo del tipo viral; se observó un incremento de los niveles de anticuerpos con el tiempo en 15% a 39% de las pacientes, dependiendo del tipo viral, y con los tipos virales 16 y 33 se observaron las frecuencias más altas de incremento de los niveles de anticuerpos (39% y 35%, respectivamente). Se observó disminución

en los niveles de anticuerpos en 12% a 27% de pacientes.

En algunas pacientes se observó elevación o disminución simultánea de anticuerpos para varios tipos virales, sugiriendo la posible presencia de reactividades cruzadas entre diferentes tipos de VLP. Para lograr una mejor caracterización de las reactividades cruzadas se hicieron estudios de preabsorción con algunos sueros que habían presentado reactividad hacia múltiples cápsides. Se encontró que la mayoría de respuestas observadas eran tipos específicas, ya que la absorción con VLP heterotípicas tuvo efectos muy discretos. Sin embargo, se observó evidencia de reactividad cruzada, dado que VLP heterotípicas indujeron absorción parcial o completa de anticuerpos anti-VLP de los tipos HPV 31, 33, 59 y 59. Ver Tabla 4.

Tabla 4. Resultados de ELISA con pre-absorción de los sueros

Suero	Antígeno de absorción	Seroreactividad en ELISA (DO) obtenida con VLP tipo						
		16	18	31	33	39	58	59
A82	PBS	0.075	0.113	0.428	0.059	0.029	1.188	0.000
	VLP16	0.076	0.157	0.486	0.095	0.000	1.289	0.002
	VLP31	0.060	0.141	0.075	0.091	0.012	1.149	0.000
	VLP58	0.088	0.167	0.468	0.095	0.002	0.077	0.003
A110	PBS	0.626	0.401	0.837	0.100	0.181	0.266	0.496
	VLP16	0.055	0.091	0.640	0.148	0.053	0.132	0.084
	VLP18	0.567	0.092	0.639	0.150	0.024	0.057	0.112
	VLP31	0.486	0.122	0.099	0.117	0.101	0.128	0.090
	VLP58	0.495	0.139	0.593	0.029	0.113	0.088	0.106
	VLP59	0.481	0.070	0.505	0.055	0.045	0.089	0.066

## DISCUSIÓN

Se encontró un incremento estadísticamente significativo de la seroprevalencia hacia todos los tipos virales en pacientes colombianas con carcinoma de cérvix, en comparación con un grupo de control de población general (82% vs. 56%). Este hallazgo confirma y amplía observaciones previas de una importante asociación entre cáncer de cérvix y anticuerpos anti-VLPs.<sup>(11,18-20)</sup>

La alta tasa de detección de anticuerpos anti-VLP en controles sin evidencia de infección actual por HPV (56%) confirma, de una parte, la alta prevalencia de tipos virales oncogénicos en la población colombiana y, de otra parte, que los anticuerpos anti-VLP son marcadores de infecciones pasadas y reflejan la exposición a HPV en algún momento de la vida.

Se observaron diferencias de seroprevalencia según la edad, pero no en relación con el tipo histológico o la severidad de la enfermedad. En general, en las pacientes con cáncer los niveles de anticuerpos permanecieron estables; sin embargo, en algunas pacientes se presentó elevación o disminución simultánea de los anticuerpos hacia varios tipos virales, lo que podría corresponder a infección reciente y simultánea con varios tipos virales o, más probablemente, a la existencia de reacción cruzada entre tipos. Los resultados de los ensayos de absorción apoyan la segunda explicación.

En 45% de las muestras positivas para anticuerpos hacia VLP se observó reactividad hacia varios tipos virales; esto ocurrió con mayor frecuencia en mujeres con cáncer que en controles. En particular, en el grupo de cáncer la frecuencia de mujeres con anticuerpos hacia más de 4 tipos de HPV fue 5 veces mayor que la

observada en las del grupo de control, lo que parece indicar que las pacientes con cáncer tuvieron una mayor exposición a múltiples tipos de HPV que las normales y un mayor riesgo de infección, probablemente asociado a su estilo de vida, dado que, como se mencionó antes, la detección de anticuerpos contra VLP se ha asociado con el número de compañeros sexuales en el tiempo de vida.<sup>(21, 22)</sup>

Nuestros hallazgos sugieren que la infección previa no reduce el riesgo de infección posterior por otro tipo viral; sin embargo, no sabemos si los anticuerpos anti-VLP detectados son neutralizantes o no. Se cree que los anticuerpos anti-VLP no juegan un papel en la eliminación de las infecciones y no está claro si existe interferencia en infecciones secuenciales por diferentes tipos. Está ampliamente demostrado en modelos animales que la inmunización con VLP genera anticuerpos neutralizantes que proveen protección contra el reto posterior con el mismo tipo viral.<sup>(23,24)</sup> Sin embargo, estas VLP no inducen regresión de lesiones establecidas en modelos animales<sup>(25)</sup>, lo que explica por qué se detectan estos anticuerpos en mujeres con infección persistente.

Este estudio, al igual que otros, muestra que la detección de anticuerpos anti-VLP como marcadores de exposición acumulada a HPV podría ser útil como biomarcador de punto final para estimar la prevalencia entre la población y para estudiar variaciones geográficas y tendencias de la infección con el tiempo. Nuestros resultados resaltan la necesidad de una vacuna multivalente, dado que la infección simultánea con diferentes tipos se observa de manera frecuente en pacientes con cáncer de cérvix y no hay evidencia de protección cruzada entre tipos relacionados.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Edwin Hoyos (Liga Colombiana de Lucha Contra el Cáncer) por su colaboración en la obtención de muestras de pacientes sin neoplasia. María Mercedes Bravo realizó una estadía en la Universidad de Tours, financiada a través del convenio de cooperación científica entre Francia y Colombia ECOS NORD/ICFES/ICETEX/COLCIENCIAS.

Este trabajo fue financiado por COLCIENCIAS (código 2101-04-10255) y por el Instituto Nacional de Cancerología a través del proyecto de inversión "Uso de sondas frías en el estudio de la relación entre HPV y cáncer de cuello uterino".

## REFERENCIAS

1. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancer in 1990. *Int J Cancer* 1999;80:827-841.
2. Pisani P, Parkin DM, Bray F, Ferlay J. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999;83:18-29.
3. International Agency for Research on Cancer (IARC). Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans. Human papillomaviruses, vol. 64. Lyon IARC, 1995. France.
4. Bosch FX, Manos M, Muñoz N, Sherman M, Jansen A, Peto J et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:796-802.
5. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV et al. human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189:12-19.
6. Kirnbauer R, Taub J, Greenstone H, Roden R, Durst M, Gissmann L, Schiller JT. Efficient cell assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1/L2 into virus like particles. *J Virol* 1993;67:6929-6936.
7. Rose RC, Bonnez W, Reichmann RC, Garcea RL. Expression of human papillomavirus type 11 L1 protein in insect cells. In vivo and in vitro assembly of virus-like particles. *J Virol* 1993;67:1936-1944.
8. Schiller JT, Roden RB. Papillomavirus-like particles. *Papillomavirus Rep* 1994; 6:121-128.
9. Kirnbauer R, Hubbert NL, Wheeler CM, Becker TM, Lowy DR, Schiller JT. A virus-like particle enzyme-linked immunosorbent assay detects serum antibodies in a majority of women infected with human papillomavirus type-16. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:494-499.
10. Le Cann P, Touzé A, Enogat N, Leboulleux D, Mougín C, Legrand MC et al. Detection of antibodies against the human papillomavirus (HPV) type 16 virions by ELISA using recombinant HPV 16 L1 capsids produced by recombinant baculovirus. *J Clin Microbiol* 1995;33:1380-1382.
11. Wideroff L, Schiffman MH, Nonnenmacher B, Hubbert NL, Kirnbauer R, Greer CE et al. Evaluation of sero-reactivity to human papillomavirus type 16 virus-like particles in an incident case-control study of cervical neoplasia. *J Infect Dis* 1995; 172:1425-1430.
12. Dillner J, Kallings I, Brihmer C, Sikström B, Koskela P, Lehtinen M et al. Seropositivities to human papillomavirus type 16, 18 or 33 capsids and to Chlamydia trachomatis are markers of sexual behaviour. *J Infect Dis* 1996;173:1394-1398.
13. Carter JJ, Koutsky LA, Wipf GC, Christensen ND, Lee SK, Kuypers J et al. The natural history of human papillomavirus type 16 capsid antibodies among a cohort of university women. *J Infect Dis* 1996;174:927-936.
14. Franco EL, Villa LL, Sobrinho JB, Prado JM, Rousseau MC, Désy M et al. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high risk area for cervical cancer. *J Infect Dis* 1999; 180:1415-1423.
15. De Gruijl TD, Bontkes HJ, Walboomers JMM, Schiller JT, Stukart MJ, Groot BS et al. Immunoglobulin G responses against human papillomavirus type 16 virus-like particles in a prospective nonintervention cohort study of women with cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:630-638.
16. De Roda AM; Walboomers J, Van den Brule AJC, Meyer CJ, Snidjers P. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 1995;76:1057-1062.

17. Jacobs MV, Hsman AM, Van der Brule AJC, Snijders PJK, Meijer CJ et al. Group-specific differentiation between high and low human papillomavirus serotypes by general primer-mediated PCR and two cocktails of oligonucleotides probes. *J Clin Microbiol* 1995;33:901-905.
18. Marais D, Rose RC, Lane C, Kay P, Nevin J, Denny L. Seroresponses to virus-like particles of human papillomavirus type 16, 18, 31, 33, and 45 virus-like particles in South African women with cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia. *J Med Virol* 2000;60:403-410.
19. Nonnenmacher B, Hubbert NL, Kirnbauer R, Shah KV, Munoz N, Bosch FX et al. Serologic response to human papillomavirus type 16 (HPV-16) virus-like particles in HPV-16 DNA-positive invasive cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia grade III patients and controls from Colombia and Spain. *J Infect Dis* 1995; 172:19-24.
20. Sun Y, Eluf-Neto J, Bosch FX, Munoz N, Walboomers JM, Meijer CJ et al. Serum antibodies to human papillomavirus 16 proteins in women from Brazil with invasive cervical carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8:935-940.
21. Wang ZH, Kjellberg L, Abdalla H, Wiklund F, Eklund C, Knekt P et al. Type specificity and significance of different isotopes of serum antibodies to human papillomavirus capsids. *J Infect Dis* 2000;181:456-462.
22. Ngelangel C, Muñoz N, Bosch FX, Limson GN, Festin MR, Deacon J et al. Causes of cervical cancer in the Philippines: a case-control study. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:43-49.
23. Suzich JA, Ghim SJ, Palmer-Hill FJ, White WI, Tamura JK, Bell JA et al. Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. *Proc Natl Acad Sci* 1995;92:11553-11557.
24. Breitburd F, Kirnbauer R, Hubbert NL, Nonnenmacher B, trin-Dinh-Desmaret C, Orth G et al. Immunization with virus-like particles from cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) can protect against experimental CRPV infection. *J Virol* 1995;69:3959-3963.
25. Kirnbauer R, Chandrachud LM, O'Neil BW, Wagner ER, Grindlay GJ, Armstrong A et al. Virus-like particles of bovine papillomavirus type 4 in prophylactic and therapeutic immunization. *Viol* 1996;219:37-44.