

Péptidos sintéticos en el desarrollo de métodos alternativos de diagnóstico y control de virus del papiloma humano

Synthetic peptides in the development of alternative methods of diagnosis and control of human papillomavirus

[DOI:10.54104/saywa.v4n5.1590](https://doi.org/10.54104/saywa.v4n5.1590)

Germán Antonio García Contreras

Docente Universidad Antonio Nariño.

germgarcia@uan.edu.co

Resumen

El desarrollo de nuevos métodos y/o dispositivos para el diagnóstico de enfermedades, agentes tóxicos, contaminantes, entre otros analitos de interés ambiental, clínico y biotecnológico ha sido tema de amplios estudios que priorizan entre las diferentes interacciones que se pueden dar entre el analito y la molécula encargada del reconocimiento también conocido como bioreceptor. En esta revisión se presentan algunas estrategias se han venido desarrollando durante los últimos 20 años para la detección temprana de la infección del virus del papiloma humano.

Actualmente, el VPH es una de las infecciones de transmisión sexual más comunes, si bien la mayoría de las infecciones son transitorias y no causan enfermedades, algunas infecciones pueden persistir y producir cáncer de cuello uterino. Los bioreceptores más ampliamente utilizados para el diseño de nuevos métodos de diagnóstico generalmente son péptidos sintéticos derivados de las proteínas L1 del virus del papiloma humano. El desarrollo de un bioreceptor eficiente, económico, sensible y específico para anticuerpos generados por el VPH es fundamental para el desarrollo de estas nuevas herramientas de diagnóstico.

“

Palabras clave:

VPH, bioreceptor, diagnóstico, SPPS, cáncer de cuello uterino.

Keywords:

HPV, bioreceptor, diagnosis, SPPS, cervical cancer.

Abstract

The development of new methods and/or devices for the diagnosis of diseases, toxic agents, contaminants, and other analytes of environmental, clinical, and biotechnological interest has been the subject of extensive studies. These studies prioritize the various interactions that can occur between the analyte and the molecule responsible for recognition, also known as the bioreceptor. This review presents some strategies that have been developed over the past 20 years for the early detection of human papillomavirus (HPV) infection.

Currently, HPV is one of the most common sexually transmitted infections. While the

majority of infections are transient and do not cause diseases, some infections can persist and lead to cervical cancer. The most widely used bioreceptors for designing new diagnostic methods are typically synthetic peptides derived from the L1 proteins of the human papillomavirus. The development of an efficient, cost-effective, sensitive, and specific bioreceptor for antibodies generated by HPV is crucial for the advancement of these new diagnostic tools.

Introducción

El interés que presenta en la actualidad el desarrollo de metodologías para la detección y cuantificación fiable, rápida y continua de analitos a partir de moléculas de origen biológico ha permitido desarrollar dispositivos y métodos de diagnóstico para monitorear analitos de interés clínico, farmacéutico, ambiental, biotecnológico, entre otros (Mehrotra, 2016).

Durante los últimos años ha surgido la necesidad de realizar análisis y/o diagnósticos, en tiempo real y de manera continua en diferentes contextos de investigación por lo que la innovación, el desarrollo de metodologías e instrumentos se ha encaminado en mejorar los ya existentes en términos de

sensibilidad, eficiencia, costos y portabilidad (Torres y Méndez, 2004; Evtugyn, 2014; Turner, 2013).

Durante los últimos 50 años se ha desarrollado una amplia variedad de test y dispositivos, todos estos basados en el uso de bioreceptores encargados de mediar el reconocimiento como alternativa a metodologías convencionales y por lo general costosas (Bobade, Kalorey & Warke, 2016). Estas nuevas herramientas de diagnóstico, han presentado un amplio desarrollo en el campo clínico para el diagnóstico, tratamiento y control de enfermedades (Wang, 2001).

Los péptidos han sido usados como bioreceptores en diferentes campos de investigación debido a su alta selectividad, actividad biológica, especificidad y afinidad por ciertos analitos (Howl, 2005) y su uso se ha incrementado gracias al desarrollo de la química combinatoria en fase sólida, esencialmente en el clásico procedimiento desarrollado por Merrifield (1964).

Dentro de este contexto, los péptidos sintéticos derivados de proteínas o secuencias peptídicas propias del patógeno de interés, constituyen herramientas importantes en el diseño de bioreceptores ya que pueden ser reconocidos por anticuerpos generados en el paciente por la presencia del patógeno.

Tabla 1. Clasificación de VPH en función de su riesgo.

Riesgo oncogénico	Tipos virales
Alto	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82
Medio	26, 53 y 66
Bajo	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 y CP6108

Fuente: Valentino y Poronsky (2016).

Virus del Papiloma Humano

Según la OMS (Organización Mundial de la Salud), el cáncer de cuello uterino es el segundo cáncer más común entre las mujeres en el mundo. Cada año, cerca de 300.000 mujeres mueren a causa de este cáncer, y más del 85% de estas muertes se producen en países de bajos y medianos ingresos (Bruni et al., 2017; Palefsky, 2017). En la actualidad existe una vacuna profiláctica que utiliza partículas similares al virus (VLPs) para la inmunización, induciendo la circulación de anticuerpos neutralizantes contra los serotipos del VPH (6, 11, 16 y 18) (Stanley, 2006). Sin embargo, aún la incidencia y mortalidad de pacientes por cáncer de cuello uterino es importante y se ven incrementados por el diagnóstico tardío de la enfermedad y tratamientos poco accesibles (World Health Organization, 2007).

En la actualidad se han aislado y secuenciado totalmente más de 100 tipos de VPH, en función de las similitudes de su secuencia genética, por lo que se los denomina genotipos. Estos tipos parecen ser muy estables y son poco frecuentes los cambios en la secuencia genómica del virus debido a recombinación o mutaciones (World Health Organization, 2017).

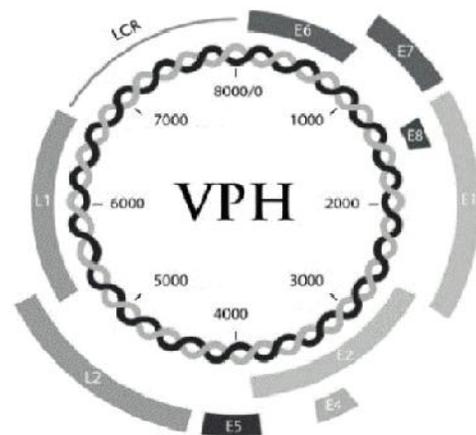
Los distintos tipos de VPH se pueden clasificar según su tropismo por los epitelios cutáneos o genitales. Existen unos 40 tipos genitales, que se subdividen a su vez, en función de su capacidad para producir cáncer de cuello uterino, en tipos de alto riesgo u oncogénicos, y tipos de bajo riesgo o no oncogénicos (Tabla 1).

Los VPH 16 y 18 son los dos tipos más frecuentes, son los responsables del 70% de los casos de cáncer de cuello uterino a nivel mundial y los ocho tipos más comunes (VPHs 16, 18, 33, 45, 31, 58, 52, y 35) son los responsables del 89% de los casos a nivel mundial (De Sanjosé, Brotons y Pavón, 2017).

Estructura del Virus del Papiloma Humano

El Virus del Papiloma Humano (VPH) forma parte de la familia *Papillomaviridae* (Bernhard et al., 2010), mide 55-60 nm de diámetro, contiene una sola molécula de ADN circular de doble cadena de aproximadamente 8000 pares de bases y tiene una estructura icosaédrica compuesta de 72 proteínas capsoméricas que encierran al genoma viral (Harden & Munger, 2017). Las regiones del genoma que codifican proteínas están localizadas en una de las dos cadenas de ADN y se llaman Marcos Abiertos de Lectura (MAL). El genoma del VPH se ha dividido en tres regiones, la región E (early o temprana E1, E2, E3, E4, E5, E6 y E7), la región L (late o tardía L1 y L2) y la región LCR (Long Control Región) que no codifica proteínas. La región L codifica las proteínas necesarias para la formación de la cápside viral (Harden & Munger, 2017).

Figura 1. Regiones del genoma del VPH.



Fuente: Beltrán-Lissabet (2014); Harden y Munger (2016).

Para 2016 se habían identificado 205 tipos diferentes de HPV, que se han sido categorizados en cinco géneros, incluidos los siguientes: 65 alfapapilomavirus, 51 beta-papilomavirus,

84 gama-papilomavirus, 4 mu-papilomavirus y un solo virus un-papilomavirus, los cuales se caracterizan por presentar una identidad similar de más del 60% en las proteínas L1 de la cápside (Van Doorslaer *et al.*, 2013).

Métodos de diagnóstico

El enfoque utilizado para el diagnóstico de esta enfermedad es, generalmente, invasivo y cubre solo una parte de la población, especialmente en los países en desarrollo; el acceso limitado a exámenes de detección implica que la enfermedad se identifica en fases avanzadas. El tratamiento del cáncer de cuello uterino en la última etapa puede ser poco efectivo y costoso, lo que resulta en una tasa de mortalidad más alta asociada a esta enfermedad (World Health Organization, 2014).

La detección temprana del VPH es de gran importancia en la prevención del cáncer cervical. La prueba de Papanicolaou (Pap-test) es ampliamente utilizada en la detección microscópica de anormalidades en las células del epitelio cervical (Snodgrass & Naugler, 2014). Dada la moderada sensibilidad de la prueba de Papanicolaou (con rangos entre 51-90%), se presentan falsos positivos creando la necesidad de realizar nuevos exámenes que permitan confirmar el resultado (Waxman & Zsemlye, 2008), este procedimiento resulta incómodo para las pacientes. Cabe resaltar que la aplicación de este método de diagnóstico ha permitido la reducción del número de muertes en países desarrollados, pero ha sido insuficiente en países en desarrollo, donde la cobertura es limitada, lo que ha generado que para estos países la tasa de muertes asociadas a cáncer cervical sea alta (Molijn *et al.*, 2005).

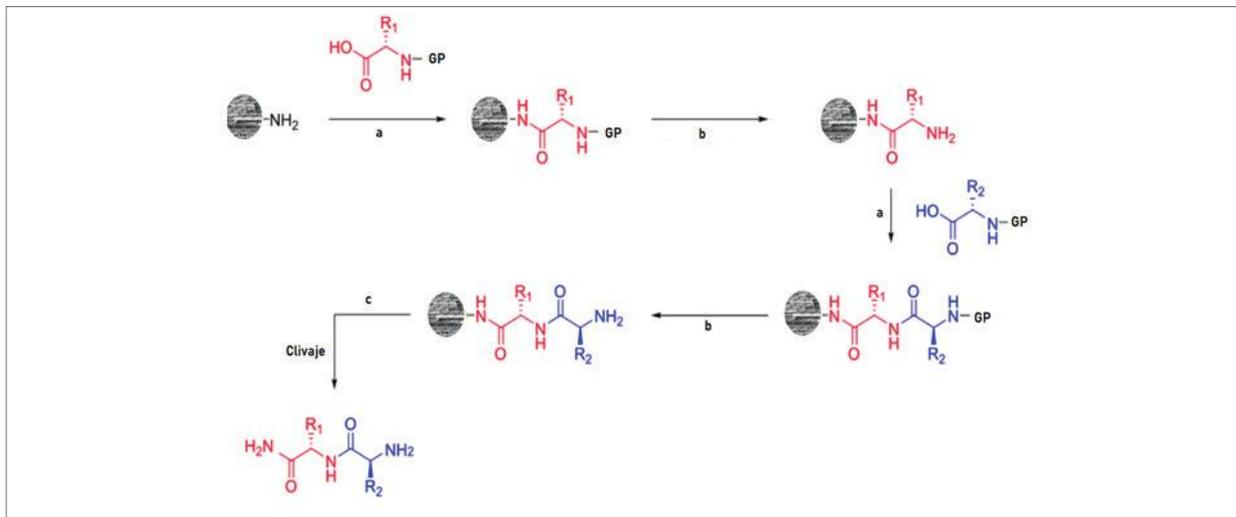
En 2014, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos, (FDA) aprobó una prueba de VPH basada en PCR que detecta los tipos y genotipos de VPH 16

y 18, así como otros 12 tipos de VPH de alto riesgo, para la detección primaria en cáncer de cuello uterino en muestras obtenidas por frotis y biopsias vaginales, presentando mayor sensibilidad que la prueba de Papanicolaou (Snodgrass & Naugler, 2014).

La detección sanguínea del ADN del VPH parece ser más un marcador de pronóstico que un marcador de diagnóstico, debido a que la presencia del virema del VPH ha sido detectada solo en estados avanzados de las transformaciones neoplásicas

Estas técnicas están basadas en la hibridación de sondas marcadas a moléculas de ADN del virus, permitiendo la localización e incluso la geno-tipificación del virus, en estos métodos la sensibilidad es limitada, se necesitan procesos laboriosos y de elevado costo, haciéndolos no viables como herramienta de “screening” a gran escala y de poco acceso para la mayor parte de la población mundial. La detección sanguínea del ADN del VPH parece ser más un marcador de pronóstico que un marcador de diagnóstico, debido a que la presencia del virema del VPH ha sido detectada solo en estados avanzados de las transformaciones neoplásicas, con un intervalo de detección de los casos del 12 al 65%, dependiendo el método utilizado (Gnanamony *et al.*, 2010), además, estas pruebas no son lo suficientemente sensibles o específicos para usarse en el diagnóstico clínico de rutina.

Figura 2. SPPS de Merrifield; Reactivos y condiciones: a) diciclohexilcarbodiimida, diclorometano; b) ácido trifluoroacético, diisopropilamina; c) ácido fluorhídrico.



Fuente: elaboración propia.

Desarrollar nuevas pruebas de diagnóstico (no invasivas, económicas y accesibles para las personas) es una alternativa para que los pacientes sean diagnosticados en etapas tempranas de la enfermedad. Dentro de este contexto, la SPPS basada en secuencias peptídicas de la cápside del virus del papiloma humano para ser usados como bioreceptores en biosensores son una alternativa como herramientas de diagnóstico que comparados con los métodos convencionales tienen ventajas potenciales, tales como (i) un procedimiento no invasivo, (ii) mayor velocidad del análisis, (iii) la posibilidad de miniaturización, (iv) mayor cobertura y versatilidad para su aplicación en regiones rurales, y (v) reducción costos (Rasooly y Jacobson, 2006).

Es importante resaltar que la proteína L1 del VPH es considerada de gran interés para el desarrollo de métodos diagnósticos de la infección causada por el VPH debido a que es la más abundante del virus y está altamente conservada entre los diferentes serotipos de VPH, con homología en la secuencia de aminoácidos cercanas al 80% (Buck, Day & Trus, 2013).

Síntesis de péptidos en fase sólida

En 1963, Bruce Merrifield reportó la síntesis de la braquidina⁸ utilizando una estrategia novedosa que permitía obtener péptidos por medio de la unión de un aminoácido a un soporte sólido e ir extendiendo la cadena peptídica hasta el aminoácido terminal. Los excesos de reactivos y subproductos eran eliminados por procesos de filtración y lavados sucesivos obteniendo péptidos sintéticos de alta pureza y con alto rendimiento, este proceso fue conocido como síntesis de péptidos en fase sólida, SPPS (de las siglas en inglés, Solid Phase Peptide Synthesis) (Mitchell, 2008).

Los grupos funcionales se protegían y se desprotegían de la manera usual, usando diciclohexilcarbodiimida (DCC) para acoplar aminoácidos, ácido trifluoroacético (TFA) para desproteger, diisopropilamina para neutralizar y finalmente se separaban los péptidos de la resina usando ácido fluorhídrico. Por esta importante contribución Merrifield obtuvo el Premio Nobel en Química en 1984 (Merrifield, 1964).

En los soportes hidrofóbicos, las cadenas peptídicas en crecimiento tienden a formar puentes de hidrogeno entre sí, lo que influye en el plegamiento de las mismas por lo que el grupo amino terminal quede menos expuesto razón por la cual el rendimiento y la velocidad de reacción disminuyen, este inconveniente fue superado gracias a los aportes de Tentagel y Sheppard (Merrifield, 1964), quienes desarrollaron las resinas hidrofílicas, las cuales, al igual que las cadenas peptídicas pueden ser solvadas por solventes polares apróticos, evitando los inconvenientes mencionados. Un requerimiento adicional consiste en que el sustrato se una al soporte a través de un grupo ligante (linker) que facilite la separación del producto final de la resina mediante la ruptura selectiva de la unión producto-ligante sin afectar las uniones peptídicas, así que los linkers determinan orientan el procedimiento que se debe seguir para liberar el producto (proceso conocido como clivaje) como el grupo funcional terminal (Torres y Méndez, 2004).

La SPPS mediante la estrategia Fmoc/tBu (SPPS-Fmoc/tBu) es la metodología más utilizada para la obtención de péptidos sintéticos mediante síntesis manual y surgió como alternativa, en 1970, a la metodología propuesta por Merrifield ya que en esta las condiciones de clivaje eran muy fuertes debido al uso de ácido fluorhídrico. En SPPS-Fmoc/tBu se utilizan condiciones menos fuertes y un sistema de protección ortogonal; las cadenas laterales de los aminoácidos están protegidas por grupos ácido-lábiles, mientras que los grupos alfa-aminas están protegidos por el grupo Fmoc que es lábil a bases (Vergel Galeano *et al.*, 2014).

La estrategia SPPS-Fmoc/tBu se realiza en un soporte sólido funcionalizado que permite la adición secuencial de varios aminoácidos hasta que se completa el péptido diana. La reacción de acoplamiento se lleva a cabo mediante la preactivación del Fmoc-aminoácido, formando

un éster reactivo. La reacción de acoplamiento es posible si el grupo alfa-amino del aminoácido unido a un soporte sólido está disponible para la reacción. Luego, la eliminación del grupo Fmoc se lleva a cabo con una base débil tal como piperidina; recientemente, se ha reportado el uso de la 4-metilpiperidina obteniendo rendimientos y pureza similares a los obtenidos con el uso de la piperidina (Vergel Galeano *et al.*, 2014).

Síntesis de péptidos sintéticos derivados de la secuencia peptídica de la proteína I1 del VPH

El diseño de bioreceptores para la detección de la infección por VPH, empleando péptidos sintéticos que puedan interactuar con anticuerpos generados como respuesta a la infección por VPH, es un campo de investigación de amplio interés ya que el modelo tiene aplicaciones en diferentes contextos de investigación.

La cribación de péptidos con sueros de pacientes infectados con el virus del papiloma humano para identificar interacciones con anticuerpos mediante ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas, ELISA (de sus siglas en inglés, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ha sido una de las primeras aproximaciones para el desarrollo de una prueba diagnóstica para la detección temprana de la infección por VPH (Lang Kuhs *et al.*, 2016). Sin embargo, el desarrollo de un test inmunológico para la detección de VPH es difícil debido a que más de 35 tipos de HPV infectan el tracto genital, lo que complica la detección y distinción de los virus HPV asociados al cáncer, además, la falta de disponibilidad de antígenos víricos puros ya que los virus del papiloma humano no se pueden cultivar en sistemas

de cultivo de tejidos. La mayor parte de estos estudios han utilizado péptidos derivados de las proteínas E2, E4, E6, E7, L1 y L2 del VPH 16 y VPH 18 encontrando una mayor respuesta en sueros de pacientes con cáncer y/o neoplasia cervical (CIN) que en mujeres sanas (Sethi *et al.*, 1998; Wideroff *et al.*, 1999).

Hasta el momento no se ha desarrollado una prueba de detección o control clínicamente útil para el cáncer de cuello uterino, NIC o infección por VPH, por lo que el diseño de nuevos inmunorreactivos para un ensayo de diagnóstico tendría un gran potencial de desarrollo. Algunos investigadores han optado por combinar o imitar secuencias peptídicas relacionadas con epítopes naturales para identificar características específicas de los anticuerpos presentes en los sueros de pacientes infectados con cáncer de cuello uterino, CIN y VPH-16, este estudio permitió identificar dos secuencias peptídicas (SPINN-TKPHEAR y MKIPNNKFLPV) que fueron reconocidas específicamente por varios sueros positivos para VPH-16, apuntando a esta región como un posible epítope inmunogénico de la proteína L1 (Santamaría *et al.*, 2001), lo que sugiere que una combinación de varios epítopes específicos de la enfermedad, generados por el cribado de bibliotecas de péptidos con sueros de pacientes, puede conducir a un ensayo de diagnóstico para la detección de VPH infección y lesiones cervicales precancerosas (Rocha-Zavaleta *et al.*, 2004).

En 2004 se reportó el uso de un nonapéptido sintético (IHSMNSTIL) derivado de la secuencia de la proteína L1 del virus del papiloma humano para evaluar la detección de anticuerpos séricos por ELISA en sueros de pacientes a los que se les había diagnosticado lesiones intraepiteliales de bajo y alto riesgo, generalmente asociadas a VPH-6, VPH-11 y VPH-16, VPH-18, respectivamente, y pacientes con cáncer de cuello uterino basados en evidencia experi-

mental que confirmaba que la infección genital por VPH frecuentemente induce respuestas inmunitarias mediadas por anticuerpos, principalmente dirigidas contra las proteínas de la cápside (Jeong, Woo & Kim, 2009), en donde la proteína L1 se encuentran en una significativa mayor proporción respecto de las proteínas L2 y representan aproximadamente el 80% de la proteína viral total, otros autores han confirmado la importancia de estas proteínas a anticuerpos específicos por lo que se considera que son una fuente de epítopes que pueden contribuir con el desarrollo de péptidos bioreceptores para lograr el desarrollo de una prueba diagnóstica eficiente.

El desarrollo de métodos de diagnóstico que contribuyan a la detección de la infección causada por el VPH depende en buena medida del bioreceptor.

Los resultados del estudio sugieren que el péptido sintético IHSMNSTIL tiene mayor afinidad por los anticuerpos de los pacientes con VPH de alto riesgo y con cáncer de cuello uterino, por lo que, este péptido puede usarse para el diseño de una prueba que permita diferenciar infecciones de VPH según su riesgo, sin embargo, algunos investigadores afirman que los anticuerpos reconocidos por este bioreceptor son de larga duración y pueden ser un marcador de una enfermedad pasada (Liu *et al.*, 2016).

El enfoque para el desarrollo de una prueba diagnóstica, en la actualidad se centra en la importancia que tienen las proteínas L1 y específicamente en las regiones de la cápside

expuestas, es decir, las responsables de la interacción con anticuerpos generados contra el virus del papiloma humano. El ensayo de ELISA puede detectar anticuerpos generados contra infecciones por VPH potencialmente oncogénicas y/o persistentes, algunos investigadores han informado que las mujeres que son seropositivas para VPH-16 presentan un mayor riesgo de desarrollar carcinoma cervical que las mujeres seronegativas (Urquiza et al., 2005). La seropositividad ocurre con mayor frecuencia en pacientes que han progresado a lesiones de alto grado que pueden producir cáncer, que en pacientes con lesiones leves o riesgo bajo. Por ende, la respuesta de anticuerpos es significativamente mayor, sin embargo, otros estudios serológicos han demostrado que entre el 20 y el 50% de las mujeres que padecen lesiones asociadas al VPH, no presentan niveles detectables de anticuerpos lo cual dificulta el diagnóstico de esta enfermedad.

En 2005 se reportaron dos péptidos (PNNNKILVPKVSGLQYRVFR y LYIKGSGSTANLASSNYFPT) derivados de la proteína L1 del VPH-16 que fueron probados contra 148 sueros de pacientes con lesiones de bajo y alto riesgo comparados con sueros de pacientes que tenían una citología normal, estos péptidos mostraron una sensibilidad y especificidad muy alta (más del 90%) para discriminar entre el carcinoma asociado al VPH y los sueros de los pacientes con carcinoma positivo y negativo, convirtiendo a estos dos péptidos en herramientas excelentes para la detección rápida de poblaciones femeninas a gran escala con riesgo de desarrollar carcinoma cervical (Urquiza et al., 2005).

Conclusiones

El desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico que contribuyan a la detección rápida, eficiente, confiable y económica de la infección

causada por el VPH, depende en buena medida del bioreceptor, la gran mayoría de estudios realizados sugiere que el bioreceptor deberá estar relacionado con las proteínas L1 de la cápside del virus del VPH debido a que varias secuencias peptídicas extraídas de las regiones expuestas de la cápside son responsables de la respuesta inmune.

Es necesario realizar estudios de interacción antígeno-bioreceptor con las secuencias peptídicas reportadas en la actualidad con el fin de identificar epitopes más pequeños que garanticen: (i) la interacción antígeno-anticuerpo; (ii) que se encuentren asociados a síntesis viables; y (iii) que puedan determinar el grado de la lesión causada por el virus del papiloma humano.

El diseño de nuevos métodos de diagnóstico no invasivos para la detección de la infección causada por el VPH, resulta una herramienta fundamental que puede ayudar la detección temprana de lesiones epiteliales en mujeres asintomáticas y/o sintomáticas, contribuyendo como método de prevención de cáncer de cuello uterino y permitiendo el acceso al diagnóstico para una mayor parte de la población.

Referencias bibliográficas

- Mehrotra, P. (2016). Biosensors and their applications - A review. *J Oral Biol Craniofacial Res.*, 6 (2), pp. 153-159. [Doi:10.1016/j.jobcr.2015.12.002](https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.12.002).
- Torres, E., Méndez, A. (2014). Biosensores enzimáticos. *Revista Digital Universitaria*, 15, pp. 1-8.
- Evtugyn, G. (2014). *Biosensors: Essentials*. Kazan, Russia: Springer.
- Turner, A.P.F. (2013). Biosensors: sense and sensibility. *Chem Soc Rev.*, 42 (8), pp. 3184-3196. [Doi:10.1039/c3cs35528d](https://doi.org/10.1039/c3cs35528d).

- Bobade, S., Kalorey, D.R. y Warke, S. (2016). Biosensor Devices: A review on their biological applications. *Biosci Biotechnol Res Commun.*,9 (1), pp. 132-137.
- Wang, J. (2001). Glucose Biosensors: 40 Years of Advances and Challenges. *Eleetroanalysis*. 1312, pp. 983-988.
- Howl, J. (2005). *Peptide Synthesis and Applications*. Humana Press Inc. [Doi:10.1007/978-1-62703-544-6](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-544-6).
- Merrifield, R.B. (1964). Solid Phase Peptide Synthesis. II. The Synthesis of Bradykinin. *J Am Chem Soc.*, 86 (2), pp. 304-305. [Doi:10.1021/ja01056a056](https://doi.org/10.1021/ja01056a056).
- Bruni, L., Barrionuevo-Rosas, L., Albero, G., Serrano, B., Mena, M., Gómez, D., Muñoz, J. y Bosch, F.X. (2017). *Human Papillomavirus and Related Diseases Report*. Recuperado de: [<http://www.hpvcentre.net/statistics/reports/XWX.pdf>].
- Palefsky, J. (2017). Human papillomavirus infection and its role in the pathogenesis of anal cancer. *Semin Colon Rectal Surg.*, 28 (2), pp. 57-62. [Doi:10.1053/j.scrs.2017.04.001](https://doi.org/10.1053/j.scrs.2017.04.001).
- Stanley, M. (2006). Immune responses to human papilloma virus. *Vaccine*. Mar 30; 24 Suppl 1:S16-22. [Doi: 10.1016/j.vaccine.2005.09.002](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.09.002).
- World Health Organization (2017) Guide to cancer early diagnosis. Ginebra: WHO. Recuperado de: [<https://apps.who.int/iris/handle/10665/254500>].
- World Health Organization (2007). *Human Papillomaviruses*. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol 90 HPV. Recuperado de: [<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol90/mono90-6.pdf>]<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100B/mono100B-11.pdf>].
- Valentino, K. y Poronsky, C.B. (2016). Human Papillomavirus Infection and Vaccination. *J Pediatr Nursing-Nursing Care Child Fam.*, 31(2), pp. E155-E166. [Doi:10.1016/j.pedn.2015.10.005](https://doi.org/10.1016/j.pedn.2015.10.005).
- De Sanjosé, S., Brotons, M. y Pavón, M.A. (2017). The natural history of human papillomavirus infection. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. [Doi:10.1016/j.bpobgyn.2017.08.015](https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2017.08.015).
- Bernard, H., Burk, D., Chen, Z., Doorslaer, K., Hausen, V. y Villiers, M. (2010). Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*. 6(1), pp. 247-253. [Doi:10.1111/j.1743-6109.2008.01122.x](https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2008.01122.x). [Endothelial](https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2008.01122.x).
- Harden, M.E. y Munger, K. (2017). Human papillomavirus molecular biology. *Mutat Res - Rev Mutat Res*, 772, pp. 3-12. [Doi:10.1016/j.mrrev.2016.07.002](https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.07.002).
- Beltrán-Lissabet, J.F. (2014). Aspectos generales sobre la estructura y función de las proteínas codificadas por el virus del Papiloma Humano. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 45 (2), pp. 108-118.
- Harden, M.E. y Munger, K. (2016). Human papillomavirus molecular biology. *Mutat. Res.: Rev. Mutat. Res.* [<http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.07.002>].
- Van Doorslaer, K., Tan, Q., Xirasagar, S. et al. (2013). The Papillomavirus Episteme: A central resource for papillomavirus sequence data and analysis. *Nucleic Acids Res.*, 41(D1), pp. 571-578. [Doi:10.1093/nar/gks984](https://doi.org/10.1093/nar/gks984).
- World Health Organization (2014). *Comprehensive Cervical Cancer Control: A guide to essential practice*. WHO Libr. Snodgrass, R. y Naugler, C. (2014). Use of the Papanicolaou Test in Women Under 25 Years of Age in Southern Alberta. *J Obstet Gynaecol Canada*. 36(4), pp. 320-323. [Doi:10.1016/S1701-2163\(15\)30607-1](https://doi.org/10.1016/S1701-2163(15)30607-1).

- Waxman, A.G. y Zsemlye, M.M. (2008). Preventing Cervical Cancer: The Pap Test and the HPV. *Vaccine*.92, pp. 1059-1082. [Doi:10.1016/j.mcna.2008.04.012](https://doi.org/10.1016/j.mcna.2008.04.012).
- Molijn, A., Kleter, B., Quint, W. y Doorn, L. Van. (2005). Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol.*, Mar;32 Suppl 1, pp. 43-51. [Doi:10.1016/j.jcv.2004.12.004](https://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.12.004).
- Gnanamony, M., Peedicayil, A., Subhashini, J. et al. (2010). Gynecologic Oncology Detection and quantitation of HPV 16 and 18 in plasma of Indian women with cervical cancer. *Gynecol Oncol.*, 116(3), pp. 447-451. [Doi:10.1016/j.ygyno.2009.10.081](https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2009.10.081).
- Rasooly, A. y Jacobson, J. (2006). Development of biosensors for cancer clinical testing. *Biosensor and bioelectronics*. 21, pp. 1851-1858. [Doi:10.1016/j.bios.2006.01.003](https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.01.003).
- Buck, C.B., Day, P.M. y Trus, B.L. (2013). The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology*.445 (1-2), pp. 169-174. [Doi:10.1016/j.virol.2013.05.038](https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.05.038).
- Mitchell, A.R. (2008). Studies in solid-phase peptide synthesis: A personal perspective. *Biopolymer*. 90(3), pp. 215-233. [Doi:10.1002/bip.20812](https://doi.org/10.1002/bip.20812).
- Vergel Galeano, C.F., Rivera-Monroy, Z.J., Rosas-Pérez, J.E., García-Castañeda, J.E. (2014). Efficient synthesis of peptides with 4-methylpiperidine as Fmoc removal reagent by solid phase synthesis. *J Mex Chem Soc.*, 58 (4), pp. 386-392.
- Lang Kuhs, K.A., Pawlita, M., Gibson, S.P. et al. (2016). Characterization of human papillomavirus antibodies in individuals with head and neck cancer. *Cancer Epidemiol.*, 42, pp. 46-52. [Doi:10.1016/j.canep.2016.03.003](https://doi.org/10.1016/j.canep.2016.03.003).
- Sethi, S., Müller, M., Schneider, A. et al. (1998). Serologic response to the E4, E6, and E7 proteins of human papillomavirus type 16 in pregnant women. *Am J Obstet Gynecol.*, 178, pp. 360-364.
- Wideroff, L., Schiffman, M., Haderer, P. et al. (1999). Seroreactivity to human papillomavirus types 16, 18, 31, and 45 virus-like particles in a case-control study of cervical squamous intraepithelial lesions. *J Infect Dis.*, 180 (5), pp. 1424-1428. Recuperado de: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10515799].
- Santamaría, H., Manoutcharian, K., Rocha, L. et al. (2001). Identification of peptide sequences specific for serum antibodies from human papillomavirus-infected patients using phage display libraries. *Clin Immunol.*, 101(3), pp. 296-302. [Doi:10.1006/clim.2001.5126](https://doi.org/10.1006/clim.2001.5126).
- Rocha-Zavaleta, L., Ambrosio, J.P., De Lourdes Mora-García, M. 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 (9), pp. 2643-2650. [Doi:10.1099/vir.0.80077-0](https://doi.org/10.1099/vir.0.80077-0).
- Jeong, N-H., Lee, N-W., Woo, M-K. y Kim, H-J. (2009). Serologic response to human papillomavirus type 16 virus-like particles in Korean women with cervical precancerous and cancerous lesions. *Arch Pharm Res.*, 32 (3), pp. 383-389. [Doi:10.1007/s12272-009-1311-1](https://doi.org/10.1007/s12272-009-1311-1).
- Liu, G., Markowitz, L.E., Hariri, S., Panicker, G. y Unger, E.R. (2016). Seroprevalence of 9 human papillomavirus types in the United States, 2005-2006. *J Infect Dis.*, 213(2), pp. 191-198. [Doi:10.1093/infdis/jiv403](https://doi.org/10.1093/infdis/jiv403).
- Urquiza, M., Guevara, T., Espejo, F., Bravo, M.M., Rivera, Z. y Patarroyo, M.E. (2005). Two L1-peptides are excellent tools for serological detection of HPV-associated cervical carcinoma lesions. [Doi:10.1016/j.bbrc.2005.04.115](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.04.115).