

## Prevención contra la infección causada por los Virus del Papiloma Humano 6 y 11: estrategias seguidas para el desarrollo de candidatos vacunales

**Adriana Otero-Blanca, Karen Marrero-Domínguez**

Unidad de Productos Biológicos, Vice-dirección de Investigación-Desarrollo e Innovación, Centro Nacional de Investigaciones Científicas.

Recibido: 9 de julio de 2017.

Aceptado: 30 de agosto de 2017.

**Palabras clave:** Virus del Papiloma Humano 6 y 11 (VPH 6/11); proteína L1; vacunas contra el VPH; candidatos vacunales; expresión heteróloga.

**Key words:** Human Papillomavirus 6 and 11 (HPV 6/11); L1 protein; HPV vaccines; vaccine candidate; heterologous expression

**RESUMEN.** La infección por el virus del papiloma humano (VPH) es la enfermedad de transmisión sexual más frecuente hoy día en todo el mundo. Los VPH de alto riesgo (VPH 16 y 18) están relacionados con el desarrollo de cáncer cervicouterino, una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial; mientras que los de bajo riesgo (VPH 6 y 11) son los causantes del 92 % de los casos de verrugas anogenitales, además de provocar papilomatosis respiratoria recurrente y otros tipos de cáncer menos frecuentes. Por estas razones ha sido necesaria la implementación de vacunas contra los tipos más frecuentes de VPH, tanto de alto como de bajo riesgo. Estas vacunas están compuestas por partículas semejantes a virus (PSV), formadas por la proteína L1 de la cápsida viral, pero sus precios elevados las hacen inaccesibles para países en desarrollo, donde la incidencia de la infección es mayor. Para lograr una mayor cobertura de la vacunación contra el VPH y lograr llevarla hasta las poblaciones de menores ingresos, se desarrollan diferentes estrategias para la obtención de PSV, estas incluyen la expresión de la proteína L1 en levaduras y bacterias, entre otros. En Cuba no existe suficiente información sobre la prevalencia e incidencia de la infección con VPH 6 y 11, sin embargo los pocos estudios disponibles sugieren una amplia distribución en la población tanto femenina como masculina desde edades tempranas, por lo que se hace necesaria la implementación de la vacuna contra VPH en el esquema nacional de vacunación. El objetivo de este trabajo es brindar elementos que sustentan el desarrollo de candidatos vacunales contra la infección de los VPH 6 y 11, así como las estrategias abordadas para ello.

**ABSTRACT.** Human papillomavirus (HPV) infection is the most common sexually transmitted disease in the world. High-risk HPVs (HPVs 16 and 18) are linked to the development of cervical cancer, one of the leading causes of mortality worldwide; while those at low risk (HPV 6 and 11) are the cause of 92 % of anogenital warts, in addition to cause recurrent respiratory papillomatosis and other less frequent types of cancer. For these reasons implementation of vaccines against the most frequent types of HPV, both high and low risk, has been necessary. These vaccines are composed of virus-like particles (VLP), formed by the L1 protein of the viral capsid, but their high prices make them inaccessible to developing countries where the incidence of infection is higher. To achieve a greater coverage of HPV vaccination and to bring it to low-income populations, different strategies are developed to obtain VLP, including the expression of L1 protein in yeast and bacteria, among others. In Cuba, there is insufficient information on the prevalence and incidence of HPV 6 and 11 infections; however, the few available studies suggest a wide distribution in both female and male population from an early age, therefore it is necessary to implement an HPV vaccine in the national vaccination scheme. The objective of this work is to provide elements that support the development of vaccine candidates against HPV 6 and 11 infections, as well as the strategies addressed for it.

### INTRODUCCIÓN

Las enfermedades de transmisión sexual constituyen un importante problema de salud a nivel mundial,<sup>1</sup> siendo la principal causa de enfermedades agudas, infertilidad, discapacidad y muerte. La infección por el virus del papiloma humano (VPH) es la enfermedad de transmisión sexual más frecuente hoy día en todo el mundo,<sup>2</sup> con una prevalencia en mujeres con resultados citológicos normales del 16,1 % a nivel mundial y del 11,7 % en América Latina y el

Caribe.<sup>3</sup> En Cuba, no se dispone de estudios de prevalencia a escala nacional, aunque los valores epidemiológicos deben ser similares a los de América Latina y el Caribe.<sup>4</sup>

Existen alrededor de 200 tipos de VPH diferenciados genótipicamente y han sido clasificados según su capacidad oncogénica en VPH de alto y bajo riesgo. Entre los VPH de alto riesgo se destacan los tipos 16, 18, 31, 45 y 58, que en conjunto, causan más del 90 % de los cánceres cervicales. Los principales representantes de los VPH de bajo riesgo son los VPH 6 y 11, agentes causales del 92 % de los casos de verrugas anogenitales.<sup>5</sup> La mayoría de las infecciones con el VPH son transitorias y asintomáticas. Solo la infección persistente del virus puede provocar la manifestación de los síntomas y su posible evolución.<sup>6</sup>

Los VPH 6 y 11 están también relacionados con la aparición de otros tipos de cánceres entre los que figuran el de ano, pene, vulva y vagina, además de los cánceres extra genitales de cabeza y cuello. Las tasas de incidencia de tales cánceres son bajas, por ejemplo, se ha estimado que la incidencia mundial de cáncer anal es de 1 por cada 100 000, registrándose 27 000 casos por año.<sup>7-9</sup> Las verrugas anogenitales son difíciles de tratar y por lo general son recurrentes. En casos esporádicos pueden progresar hasta volverse malignas (tumores de Buschke-Löwenstein).<sup>10</sup> Estos VPH también pueden causar una papilomatosis respiratoria recurrente (PRR), que se caracteriza por la formación de verrugas en la laringe u otras partes de las vías respiratorias. La PRR no tratada puede volverse extremadamente debilitante debido a la obstrucción de las vías respiratorias, causando incluso la muerte.<sup>11,12</sup> Por otra parte hay evidencias de que los tipos de VPH de bajo riesgo pueden estar presentes en lesiones de bajo grado, solo el VPH tipo 11 causa el 2,3 % de lesiones de bajo grado a nivel mundial.<sup>13,14</sup>

Aunque las verrugas anogenitales no representan un riesgo vital, el impacto psicológico para los pacientes que sufren los efectos de la infección por estos tipos de virus es a menudo bastante severo. Los tratamientos para esta enfermedad, al igual que para la PRR, consisten en eliminar todo el tejido infectado, lo que comúnmente resulta en ulceraciones dolorosas de lenta cicatrización y elevada recurrencia.<sup>15,16</sup> Además, ninguno de los tratamientos médicos existentes ha sido sistemáticamente exitoso contra la PRR, por lo que es inevitable la intervención quirúrgica.<sup>17</sup>

Por esta razón de las tres vacunas comerciales disponibles para prevenir la infección con el VPH, dos están dirigidas contra los genotipos 6 y 11. Estas vacunas presentan elevados precios, por lo que su implementación ha sido limitada en países en desarrollo, donde son más necesarias. Por tal motivo se han desarrollado candidatos vacunales de segunda generación en hospederos alternativos que pueden ser producidos localmente y a un menor costo. El objetivo de este trabajo es brindar los elementos que sustentan el desarrollo de candidatos vacunales de segunda generación contra la infección de los VPH 6 y 11, así como las estrategias abordadas para su desarrollo.

### **CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL VPH**

El VPH es un virus sin envoltura que puede medir de 50-60 nm de diámetro. Tiene un genoma de ADN circular de doble cadena asociado a proteínas tipo histonas, que mide alrededor de 8 kb y codifica para ocho marcos abiertos de lectura. El genoma está dividido en tres regiones principales: una región que codifica para genes reguladores de la transcripción de los genes virales *e6* y *e7*; otra región de transcripción temprana que comprende seis marcos abiertos de lectura (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) los cuales codifican las proteínas no estructurales implicadas en la oncogénesis y replicación viral; por último la región de transcripción tardía, que codifica las proteínas estructurales L1 y L2.<sup>18,19</sup>

La cápsida viral tiene una estructura icosaédrica formada por 72 capsómeros (pentámeros) compuestos por la proteína principal de la cápsida L1 (55Da). Estos capsómeros se estabilizan por las interacciones disulfuro que se establecen intra e interpentámeros.<sup>20</sup> También está presente en la cápsida la proteína L2 (75Da) como un componente secundario y se encuentra en una relación entre 1:5 y 1:30 respecto a L1 en el virión.<sup>21</sup> La producción de la proteína L1 sola o con la proteína L2 en sistemas recombinantes resulta en la formación de partículas semejantes a virus (PSV), las cuales son muy similares morfológica y antigénicamente al virión, pero a diferencia de los virus nativos, las PSV no se replican ni infectan la célula hospedera, ya que carecen de material genético.<sup>22</sup> La inmunización con estas PSV induce la producción de anticuerpos neutralizantes protectores que reconocen epitopes conformacionales en la superficie de viriones nativos y PSVs.<sup>23</sup> Por esta razón han sido la base para el desarrollo de las vacunas disponibles contra el VPH.

### **ENFERMEDADES RELACIONADAS A LA INFECCIÓN CON EL VPH 6 Y 11 Y SU INCIDENCIA**

Uno de los principales criterios para incluir cualquier nueva vacuna en un programa nacional de vacunación, o desarrollar un candidato vacunal alternativo, es la evaluación cuidadosa de la carga de la enfermedad que estos productos pueden potencialmente prevenir. Evidentemente, la carga de la enfermedad contra la que se dirigen estos productos debe ser substancial para hacerlos una opción viable en las rigurosas evaluaciones de costo-efectividad.<sup>24</sup>

En el caso de las infecciones con los VPH6/11, los datos sobre la carga de las enfermedades relacionadas no siempre están disponibles, debido a que las lesiones tradicionales adscritas a estos son tumores benignos, de los cuales no existen registros sistemáticos comparables a los registros de cánceres que existen en cualquier país. Además, los datos sobre otras lesiones asociadas con los VPH6/11, así como los resultados de la detección de estos dos tipos virales en diferentes sitios mucosales, están dispersos en estudios individuales y el enfoque sistemático para resumir esta información solo se ha realizado en unos pocos estudios.

El VPH provoca lesiones cutáneas y/o mucosales hiperproliferativas. La mayoría de los VPH infectan la piel provocando lesiones cutáneas, no malignas (verrugas plantares o comunes).<sup>25</sup> Otros tipos infectan preferentemente las

mucosas oral o anogenital, lo cual puede provocar papilomatosis oral, verrugas anogenitales (VPH de bajo riesgo) o lesiones neoplásicas intraepiteliales que pueden progresar desde lesiones de bajo grado (neoplasia intraepitelial cervical 1, NIC 1) a lesiones de alto grado NIC 2 o 3 y convertirse incluso en cánceres invasivos, particularmente en el cuello uterino (VPH de alto riesgo).<sup>26,27</sup>

### **Verrugas anogenitales y PRR**

Los VPH 6 y 11 son causantes del 92 % de los casos de verrugas anogenitales tanto en hombres como en mujeres, siendo más frecuente el VPH 6.<sup>28</sup> La incidencia de este tipo de tumores varía con la edad de los pacientes, la región geográfica y el estatus sociodemográfico, pero en general se encuentra en un rango entre 0,2 y 9,2 por cada mil personas al año.<sup>29</sup>

Las verrugas anogenitales no están incluidas en los sistemas de vigilancia de la mayoría de los países, por lo que los datos de epidemiología a nivel mundial son limitados. Sin embargo, se ha estimado que estas representan al menos el 10 % del espectro total de las infecciones de las vías genitales por el VPH. Hay que tener en cuenta además que, en la mayoría de los casos, la infección por VPH es asintomática, por lo que los datos de incidencia pueden estar subestimando las cifras reales. No obstante se estima que más del 50 % de las personas sexualmente activas han sido infectadas por el VPH, o lo harán, por lo menos una vez en su vida.<sup>30,31</sup>

Otra enfermedad provocada por los VPH 6 y 11 es la PRR, con una incidencia estimada de 3 por 1 millón de personas por año en niños, y una prevalencia de 3 a 7 cada 100 000 personas para la enfermedad tanto pediátrica como de adultos.<sup>32</sup> La PRR se caracteriza por lesiones papilomatosas en la laringe y en ocasiones en la orofaringe o el tracto respiratorio bajo. El curso patológico de esta enfermedad puede variar desde la remisión espontánea, lesiones relativamente estables hasta casos donde puede verse amenazada la vida del paciente, debido a un número elevado de lesiones o el tamaño de estas, causando obstrucciones respiratorias severas.<sup>33</sup> Afecta sobre todo a los menores de 5 años pues en ocasiones, las mujeres con infección genital por el VPH transmiten el virus a sus hijos durante el parto.<sup>34</sup>

Vale destacar que estas cifras solo hacen referencia a la incidencia de las enfermedades provocadas por los VPH 6 y 11. Sin embargo, las lesiones clínicas solo son la punta del iceberg de la carga viral total debida a infecciones producidas por estos dos tipos de VPH. Esto se debe a que la gran mayoría de las infecciones por estos virus es latente y se elimina naturalmente en pocos meses, máximo un año, sin desarrollar síntomas clínicos detectables. Esta curación espontánea no hace que estas infecciones latentes sean menos importantes, puesto que mientras exista el reservorio del virus, este servirá como fuente de transmisión viral a individuos susceptibles, con la posibilidad de desarrollar cualquiera de las enfermedades ya mencionadas.<sup>24</sup> De ahí la importancia de desarrollar vacunas que prevengan la infección por estos tipos de virus y/o reduzcan la carga viral a niveles en los cuales no se manifiesten los síntomas.

### **VPH 6 Y 11 EN CUBA**

La prevalencia nacional de la infección con el VPH en Cuba no se conoce dado que no se ha implementado aún un pesquiasaje poblacional para esta infección viral.<sup>6</sup> El programa Nacional Cubano de Prevención y Diagnóstico Precoz del Cáncer Cervical comprende el pesquiasaje de todas las mujeres mayores de 25 años. Sin embargo, este programa no contempla la detección del VPH como rutina, ni su tipificación,<sup>35</sup> además no incluye a las adolescentes, que según varios estudios, constituyen una población que contribuye significativamente a la propagación del virus.<sup>36-38</sup> La mayoría de los estudios informados involucran un número reducido de pacientes de determinadas regiones del país en los que se ha realizado un diagnóstico clínico de la infección del VPH mediante técnicas citológicas o histológicas, las cuales presentan una sensibilidad y especificidad limitadas. Por ejemplo, un estudio realizado a 60 mujeres con diagnóstico previo de citología anormal, encontró que la correlación entre el diagnóstico positivo de la infección con el VPH según análisis colposcópico y la detección del ADN del virus mediante la reacción en cadena de la polimerasa fue del 64 % (16 de 25 muestras). Además, la infección por VPH se detectó en el 40 % (14 de 35) de las mujeres con colposcopia negativa y en el 60 % restante (21 de 35) no se detectó el ADN del VPH aun cuando sufría de colpitis y zonas ectópicas-atróficas.<sup>13</sup> Estos resultados evidencian las limitaciones de los estudios de prevalencia del VPH basados únicamente en las técnicas histológicas, requiriéndose realizar estudios moleculares.

Por otra parte, el programa de detección y prevención está dedicado al cáncer cervicouterino, pero no existe una vigilancia sobre los tipos de VPH de bajo riesgo, aunque estos se encuentran presentes muchas veces en las lesiones epiteliales y los carcinomas, además constituyen un factor de riesgo para el desarrollo de este último.<sup>6,13</sup> No obstante, la prevalencia e incidencia del VPH, incluidos los genotipos 6 y 11, se ha determinado en varias subpoblaciones. En 2005 Rodríguez y colaboradores<sup>39</sup> realizaron un estudio de prevalencia de las enfermedades de transmisión sexual más comunes en 60 mujeres entre 15 a 49 años de edad, infectadas con VIH respecto a un grupo control de 60 mujeres sin enfermedades ginecológicas activas. Mediante ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR de sus siglas en inglés) el VPH se detectó en el 55 % de las mujeres VIH+ y en el 21,7 % de las mujeres del grupo control; siendo los genotipos 16, 33 y 58 los más frecuentes en las pacientes VIH+, mientras que los genotipos 11, 33 y 51 fueron los más frecuentes en el grupo control.

Un estudio descriptivo de cohorte para determinar la relación de las verrugas anogenitales con lesiones precursoras de cáncer cervicouterino, reveló que de las muestras endocervicales de 100 pacientes con verrugas anogenitales, el 10 y

1 % presentaban NIC I y NIC II, respectivamente.<sup>37</sup> En la literatura se ha reportado que las verrugas ano-genitales pueden coexistir con VPH de alto riesgo oncogénico (multi-infección) y están asociadas, en un 20 a 30 % de los casos, a lesiones cervicales o anales.<sup>40</sup>

Un estudio en 30 pacientes masculinos seropositivos al VIH-1 que presentaban lesiones condilomatosas identificó el ADN de VPH mediante PCR y genotipificación en el 100 % de las muestras, siendo los genotipos 6 y 11 los más frecuentes, presentes en el 63,3 % y el 53,3 % de los casos, respectivamente. Encontraron además que existe relación entre la infección con uno o varios tipos del VPH y el conteo de linfocitos CD4+ en pacientes VIH1+.<sup>41</sup>

Estos resultados son evidencia de que es necesario emplear otros métodos de diagnóstico confirmatorio, más sensibles que la citología, que detecten proteínas o el ADN del VPH. Es necesario establecer la línea base de la prevalencia de la infección por el VPH en Cuba, de manera que se pueda evaluar el posible impacto de una potencial introducción de algunas de las vacunas disponibles contra el VPH. Para ello se deben buscar nuevas técnicas que sean factibles de aplicar a estudios poblacionales desde el punto de vista económico y que aporten nuevos datos con respecto a la prevalencia de la infección con los diferentes genotipos de VPH en las mujeres cubanas.

Los métodos de diagnóstico comerciales resultan costosos para países en desarrollo, lo que requiere la búsqueda de protocolos alternativos más sencillos y baratos. Una opción podría ser la inmunotinción con Estreptavidina-Biotina, propuesto por Torres y colaboradores en 2014<sup>42</sup> que permite la detección de la proteína L1 del VPH tipo 16 con una sensibilidad del 98,57 % y especificidad del 91,67 %, con valores predictivos negativo y positivo por encima del 90 %. Dicho método probó ser sensible, sencillo y no requiere de una compleja infraestructura para detectar VPH 16 en muestras cervicales. Además, esta técnica permite obtener información rápidamente, evita el uso de métodos invasivos y se puede ampliar para detectar otros genotipos del virus empleando los anticuerpos apropiados.

### **PREVENCIÓN: VACUNAS**

El tratamiento de las lesiones provocadas por los VPH 6 y 11 puede ser altamente costoso,<sup>43</sup> es por eso que su prevención a través de la vacunación es una alternativa muy ventajosa. Aunque la mayoría de las vacunas antivirales se basan en el uso de viriones atenuados para inducir anticuerpos anti-viriones, es difícil producir cantidades suficientes de viriones del VPH en cultivos celulares para ser empleados como vacunas. Además, al contener ADN oncogénico, el uso de viriones atenuados de VPH ha sido calificado como una estrategia demasiado riesgosa para el desarrollo de una vacuna contra el VPH.<sup>44</sup> Es por esto que las PSV han despertado especial interés, pues las PSV purificadas pueden ser utilizadas como antígenos, y resultan ser altamente inmunogénicas cuando son presentadas al sistema inmunitario. Al mismo tiempo, al no contener material genético, no pueden causar infección en el huésped.<sup>22</sup>

Actualmente existen tres vacunas basadas en PSV aprobadas que se han licenciado en numerosos países:

1. Cervarix, manufacturada por GlaxoSmithKline [Rixensart, Belgium], es una vacuna bivalente contra la infección de los tipos 16 y 18 del VPH.
2. Gardasil, manufacturada por Merck [West Point, PA, USA], que cuenta con dos variantes:
  - La tetravalente contra los tipos 6 y 11 del VPH además del VPH 16 y 18, la cual brinda una protección tipo-específica del 70 % contra el cáncer cervicouterino y de hasta el 90 % contra las verrugas anogenitales y otras enfermedades provocadas por la infección con el VPH 6 u 11.<sup>45</sup>
  - La novalente que suma a la anterior los tipos 31, 33, 45, 52 y 58, que aumentan la protección contra el cáncer cervicouterino hasta un 90 %.<sup>46</sup>

Estas vacunas tienen como inconvenientes que, en primer lugar, deben ser administradas mediante tres inyecciones intramusculares en un período de 6 meses a adolescentes, que son una población difícil pues no acuden con frecuencia a los centros de salud;<sup>47</sup> además cada dosis cuesta alrededor de 140 USD, sin incluir el costo de administrar las inyecciones o el cargo del doctor, por lo tanto, el costo total de la serie (3 inyecciones en un período de 6 meses) podría alcanzar la suma de 500 USD o más, lo que hace inaccesible la vacuna para países en vías de desarrollo, en los cuales se reportan la mayoría de las enfermedades asociadas al VPH.<sup>48,49</sup> Además, la cobertura no es completa incluso en muchos de los países que ya tienen incorporados estas vacunas en su sistema de salud, debido a la existencia de grupos étnicos minoritarios y muchas personas sin seguros médicos que no tienen acceso a las vacunas.<sup>50</sup>

No se ha reportado que estas vacunas tengan alguna actividad terapéutica contra infecciones ya establecidas, pero sí han tenido un impacto sustancial en la reducción de la incidencia de la infección con el VPH, así como de las enfermedades asociadas a este.<sup>45</sup> Por otra parte, actualmente no es posible establecer cuál de las tres vacunas es más efectiva puesto que no se han realizado estudios comparativos, sin embargo todas son seguras.<sup>51</sup>

### **Impacto de la vacunación sobre las verrugas anogenitales**

Aunque tardará décadas en hacerse evidente una reducción de los niveles de cánceres asociados al VPH a partir de la introducción de la vacunación contra este, los recientes informes son alentadores. En marzo de 2016, los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos reportaron un estudio que comparaba las tasas de infección por VPH antes (2003-06) y después (2009-12) de la introducción de la vacuna en niñas que recibieron al menos una dosis de la vacuna tetravalente. La prevalencia de VPH de los tipos 6, 11, 16 y 18 disminuyó en un 64 % en las niñas sexualmente activas y mujeres de 14 a 19 años, mientras que en mujeres de 20-24 años disminuyó en un 34 %.<sup>52</sup> Anteriormente, un estudio australiano había demostrado una disminución significativa en el diagnóstico de

verrugas genitales en mujeres menores de 21 años de 11,5 % antes del inicio de la vacunación, a 0,85 % 4 años después. De igual modo para las mujeres entre 21 y 30 años la incidencia se redujo de 11,3 % a 3,1 %. En hombres menores de 21 años y entre 21 y 30 años también disminuyó la incidencia de 12,1 % a 2,2 % y de 18,2 % a 8,9 % respectivamente,<sup>53</sup> lo que revela la posible existencia de inmunidad de grupo.

Se han publicado numerosos estudios sobre el impacto a nivel de población de la vacunación con las vacunas bivalente y tetravalente en las verrugas anogenitales.<sup>54</sup> Ningún estudio ha examinado todavía el impacto de la vacuna nanovalente, que fue recientemente aprobada en los Estados Unidos. La eficacia de la vacuna en los ensayos previos a la autorización, el modelado y los estudios ecológicos de tendencia temporal, han demostrado un impacto significativo a corto plazo de la vacuna tetravalente. En las niñas de 15 a 19 años, un meta-análisis publicado previamente indicaba que las verrugas genitales disminuyeron significativamente en un 31 %.<sup>55</sup> Otro estudio reportó que en países que usan la vacuna tetravalente en las niñas de 15-19 años, la incidencia de las verrugas anogenitales disminuyó significativamente en un 31 % y el análisis estratificado reveló reducciones más sustanciales en las poblaciones con alta (61 %) vs baja (14 %) cobertura de vacunación.<sup>56</sup> El monitoreo a largo plazo revelará si este impacto continúa bajo los programas de la vacuna nanovalente, y si los actuales descensos en la incidencia de las verrugas anogenitales se reflejan en una disminución de la PRR. Todos estos resultados evidencian la efectividad de las vacunas en la protección contra la infección por VPH y sus síntomas clínicos.

### **Variabilidad genética del gen *II* de los VPH 6 y 11**

Un aspecto a tener en cuenta durante el desarrollo de las vacunas contra VPH es la presencia de variantes del gen *II* de cada tipo de VPH y las diferencias en los haplotipos en la respuesta inmune. Se han realizado estudios a nivel internacional enfocados en la variabilidad genética de los VPH, particularmente de aquellos genotipos incluidos en las vacunas comercialmente disponibles. Algunos de estos estudios analizan la variabilidad en el genoma completo del VPH, en estos casos se encuentra una amplia variabilidad genética y aparece un elevado número de variantes filogenéticas o subtipos. Otros estudios se han enfocado en la variabilidad del gen *II*, que es el gen que codifica para la proteína que conforma las vacunas existentes. En estos casos se ha encontrado un bajo porcentaje de variabilidad tanto para el VPH 6 (1,6 %) como para el VPH 11 (1,3 %), menor en ambos casos que los porcentajes reportados para el VPH16 (2,3 %) y el VPH 18 (2,1 %).<sup>57-59</sup> Por otra parte, el análisis puntual de las modificaciones encontradas en las diferentes variantes de VPH 6 y 11, ha mostrado que estas se encuentran en regiones de la proteína que se ubican hacia el interior de la cápsida y por tanto no interfieren en la interacción PSV-anticuerpos, por lo que no deben influir en la efectividad de la vacuna.<sup>60,61</sup> En Cuba no se dispone de abundantes datos respecto a los tipos 6 y 11 del VPH. Su incidencia y prevalencia se ha abordado en algunos estudios, pero estos se han limitado a detectar la presencia o no del virus, ninguno ha abordado la variabilidad genética que puede existir dentro de cada uno de estos genotipos. No obstante, esto no limitaría el desarrollo de vacuna contra variantes propias, dado que los polimorfismos detectados no parecen influir en la respuesta inmune protectora, lo que ha sido corroborado por la efectividad de las actuales vacunas en las diferentes regiones del mundo donde se han aplicado.

### **PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE LA PROTEÍNA L1 DE LOS VPH 6 y 11**

Para la vacuna Cervarix, cada tipo de PSV se produce en un sustrato de células Hi-5 derivadas de *Trichoplusia ni* empleando un vector de baculovirus. En tanto, las vacunas producidas por MERCK están formadas por PSV formadas a partir de las proteínas L1 producidas en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.<sup>62</sup>

El desarrollo de nuevas vacunas continúa con el objetivo de hacerlas más asequibles y con una mayor cobertura de cepas, así como para uso terapéutico. Para ello es necesario identificar sistemas de expresión más baratos. Cada sistema de expresión presenta sus ventajas y desventajas. Los sistemas que emplean hospederos eucarióticos como *S. cerevisiae*, células de insecto o de plantas, tienen como ventaja que cuentan con la maquinaria de modificación postranscripcional para modificar la proteína, lo que garantiza un mejor plegamiento de esta y así la formación de PSV estructuralmente correctas. No obstante, estos sistemas encarecen la producción a gran escala y son más difíciles de manejar. Sin embargo, las bacterias, principalmente *Escherichia coli*, también se emplean muy a menudo para la expresión de proteínas foráneas puesto que requieren fuentes de carbono más baratas para su crecimiento, multiplican su biomasa rápidamente, su transformación con ADN foráneo es rápido y sencillo; además el proceso de escalado de la producción es relativamente simple.<sup>63,64</sup> El problema de estos sistemas es que no proporcionan un procesamiento postraduccional adecuado para las proteínas heterólogas, las cuales se pueden obtener insolubles, lo que dificulta su purificación y por tanto la formación de las PSV.

#### **Bacterias: *E. coli***

Uno de los primeros reportes de la expresión recombinante de la proteína L1 data de 1987 cuando Banks y colaboradores expresaron el gen *II* de VPH 6 en *E. coli*. En ese estudio el gen *II* truncado fue clonado en el vector pUR288 y expresado en la cepa *E. coli* 4.4. La proteína obtenida contenía los aminoácidos del 39 al 501 y estaba fusionada por el extremo amino a la Glutación S-transferasa (GST), sin embargo en los análisis de *Western blot* se podía observar productos de degradación de la proteína.<sup>65</sup>

En 2001 Chen y colaboradores expresaron el gen *II* del VPH 11 proveniente de una lesión de faringe, en *E. coli* XA90 empleando el vector pGEX-2T, donde la proteína L1 se obtuvo fusionada por el extremo amino a GST, puesto que la proteína L1 sin fusionar era degradada. Con la fusión de la proteína L1 a GST aumentó el rendimiento de la

proteína soluble y por tanto se facilitó su purificación.<sup>66</sup> No obstante, esta estrategia requiere la remoción de la GST, una vez purificada la proteína, lo que encarece el proceso de obtención de la proteína con fines vacunales.

Una de las estrategias más exitosas empleando a *E. coli* como hospedero, resulta la seguida por investigadores de la Universidad de Xiamen (China), donde se han abordado diversas estrategias para la obtención de PSV a partir de la proteína L1 de varios VPH producida en *E. coli*. En el caso de los VPH 6 y 11 se obtuvieron PSV con las cuales se conformó un candidato vacunal bivalente que se encuentra próximo a un ensayo clínico de fase dos.<sup>67</sup> Particularmente para el VPH 6, los autores ensamblan las PSV a partir de una L1 truncada con tres aminoácidos menos en el extremo amino. Para ello clonaron el gen truncado en el vector de expresión PTrxFus y luego lo expresaron en la cepa *E. coli* GI698, obteniendo una concentración de L1 de 0,7 mg/mL con una pureza superior al 98 %.<sup>68</sup> En este sistema de expresión, el gen *l1* se encuentra regulado por el promotor  $P_L$  del fago  $\lambda$ , el cual, a su vez se encuentra regulado por el represor cI de este mismo fago; este sistema es inducible con la adición de triptófano al medio de cultivo.<sup>69</sup>

En el caso del VPH 11, obtuvieron la proteína L1 también truncada (cuatro aminoácidos del amino terminal) en la cepa *E. coli* ER2566, empleando el vector pTO-T7. Con este sistema y optimizando el proceso de purificación, lograron obtener 0,3 mg/mL de la proteína L1 de VPH 11 con una pureza del 98 %.<sup>70</sup> En este caso, el sistema empleado también se basa en la fortaleza del promotor T7 y la procesabilidad de la ARN polimerasa T7. No obstante, el vector pTO-T7 tiene la particularidad de que la secuencia omega del Virus del Mosaico del Tabaco está ligada al promotor T7, esta secuencia es un potenciador traduccional, lo que contribuye al aumento de los niveles de producción de las proteínas diana.<sup>71,72</sup>

Recientemente el mismo grupo de investigación reportó la expresión del gen *l1* del VPH 6 en el mismo sistema empleado para el VPH 11: el vector pTO-T7 en la cepa *E. coli* ER2566. En este caso la proteína L1 del VPH 6 tiene 5 aminoácidos truncados en el extremo amino, y se obtuvo la proteína con una pureza superior al 95 %. En este estudio, los autores conforman una vacuna bivalente con PSV compuestas por L1 de los VPH 6 y 11 obtenidas a partir del sistema anteriormente descrito, y demuestran que esta vacuna bivalente VPH 6/11 confiere un título de neutralización y un perfil de producción de anticuerpos en monos comparable con la vacuna tetravalente Gardasil.<sup>73</sup>

Estos dos últimos ejemplos demuestran la potencialidad de la bacteria *E. coli* como hospedero para la obtención de PSV con fines vacunales.

## Levaduras

### *Schizosaccharomyces pombe*

En 1995 Sasagawa y colaboradores produjeron la proteína L1 de HPV 6 coexpresada con la proteína L2 en la levadura *S. pombe*. Para ello obtuvieron ambos genes mediante PCR y los clonaron en vectores de expresión de levaduras pREP, bajo un promotor regulado por tiamina. Las proteínas producidas fueron capaces de formar PSV cuya estructura era muy similar a la de viriones nativos, según los análisis de microscopía electrónica.<sup>74</sup>

### *S. cerevisiae*

M. Neepfer y colaboradores expresaron en 1996 las proteínas L1 de VPH 6 y 11 en *S. cerevisiae* empleando el plásmido pGal110. El gen *l1* de VPH 6 se expresó exitosamente y se obtuvieron altos niveles de la proteína, sin embargo no se lograba la expresión correcta a partir del gen nativo de VPH 11, pues se producían truncaciones del ARN mensajero. Para poder obtener la proteína L1 de HPV 11 intacta se fusionó el gen de VPH 11 con el gen *l1* de VPH 6. Los autores sustituyeron 55 nucleótidos del gen nativo sin alterar la secuencia aminoacídica y de esta manera lograron expresar completamente la proteína, aumentando además hasta siete veces el nivel de producción de PSV, las cuales poseían epitopos conformacionales capaces de interactuar con anticuerpos neutralizantes específicos para VPH 11.<sup>75</sup> Esta estrategia se empleó para la obtención de las PSV que componen las vacunas tetra y nanovalentes manufacturadas por MERK.

En 2002 Buonamassa y colaboradores obtuvieron una cepa diploide de *S. cerevisiae* que expresa las proteínas L1 y L2 de los VPH 6 y 16. Las cuatro proteínas son capaces de ensamblarse en PSV. Análisis de *Western blot* con anticuerpos monoclonales específicos anti-VPH 6 y anti-VPH 16 confirmaron la producción de las proteínas L1, asimismo la presencia de la L2 se corroboró con antisuero tipo-específico. Por otra parte, experimentos de inmunoprecipitación demostraron la formación de enlaces disulfuro entre las dos L1. La cepa diploide (*S. cerevisiae* AB/JSC-4L) fue obtenida mediante la transformación inicial con plásmidos integrativos portadores de los genes *l2*, cada uno en una cepa haploide: *S. cerevisiae* AB110 o JSC310. Luego se realizó una segunda transformación con plásmidos episomales codificadores de las proteínas L1. Por último se obtuvo la cepa diploide por conjugación de las dos cepas anteriores. En el caso particular del gen *l1* del VPH 6, este fue clonado bajo el control del promotor alcohol-deshidrogenasa-2-gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa (ADH2/GAP), el cual es regulado por glucosa.<sup>76</sup>

Uno de los mayores obstáculos de las nuevas formulaciones de vacunas es el costo requerido para su desarrollo clínico, caracterización y manufactura. El empleo de *S. cerevisiae* como hospedero para la obtención de un candidato vacunal de segunda generación solo estaría justificado por la ventaja que implicaría obtener un biosimilar de las vacunas con la disminución correspondiente del costo.

### Plantas

Varios han sido los intentos de expresar el gen *II* en modelos vegetales dado que las vacunas parenterales tienen un elevado costo de producción y distribución, mientras que plantas transgénicas que expresen los inmunógenos recombinantes de la vacuna, constituyen una alternativa atractiva y potencialmente menos costosa. Se ha reportado la expresión de *II* en *Nicotiana tabacum* y *Arabidopsis thaliana*, entre otras.

En 2003 Warzecha y colaboradores informaron la obtención de PSV a partir de plantas, específicamente de papa (*Solanum tuberosum* cv. Desiree). Para ello modificaron la secuencia nucleotídica del gen *II* del VPH 11 para optimizar la expresión en plantas dicotiledóneas, de esta manera obtuvieron un gen con un 80 % de homología en la secuencia nucleotídica con el gen nativo y 100 % de homología en la secuencia aminoacídica. Para mejorar la expresión del gen, se truncó el extremo carboxilo, que codifica para una secuencia de localización nuclear, la cual no es necesaria para la formación de PSV y afecta la viabilidad de la planta. Las PSV obtenidas en esta investigación demostraron una conformación específica a través de diferentes ensayos inmunológicos en presencia de anticuerpos conformacionalmente dependientes, específicos para el VPH 11. Además, indujeron una respuesta inmune en ratones luego de la administración de las PSV, presentes en el tubérculo, por vía oral dependiendo de la coadministración de un adyuvante, puesto que la dosis efectiva por gramos de tubérculo administrado era muy baja para inducir una respuesta por sí sola.<sup>77-79</sup>

Kohl y colaboradores informaron en 2007 la producción de la proteína L1 del VPH 11 en *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana tabacum*. En este caso también se eliminó la región que codifica para la señal de localización nuclear en el extremo carboxilo de la proteína. La proteína purificada a partir de estas plantas fue capaz de ensamblarse en PSV pleomórficas.<sup>80</sup>

Los resultados anteriores sugieren que la expresión de la proteína L1 en células superiores requiere la eliminación de la señal de localización nuclear, modificación que contribuye a la disminución de la concentración de ADN contaminante en las PSV obtenidas.

### Células de insectos

La proteína L1 del VPH 11 fue obtenida por Rose y colaboradores, a partir de células de insecto *Spodoptera frugiperda* Sf-9 cotransfectadas con el vector recombinante pVL11L1 y AcNPV (del inglés *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus). La máxima acumulación de L1 tuvo lugar 72 horas después de la infección. Durante la purificación, la parte predominante de L1 producida en este sistema se encontró en la fracción insoluble, solo aproximadamente el 25-30 % estaba presente en la fracción soluble. Se obtuvieron PSV autoensambladas *in vitro*, capaces de reaccionar con antisueros específicos contra epítopos lineales y conformacionales del VPH 11, lo que corroboró la similitud de las PSV con los viriones nativos, observada en pruebas de microscopía electrónica.<sup>81</sup> Un protocolo muy similar fue empleado por Christensen y colaboradores en 1994 para la obtención de PSV de HPV 6 en las mismas células de insecto.<sup>82</sup>

La utilización de baculovirus como vectores para la expresión de proteínas recombinantes ha demostrado ser seguro, fácil de manejar y sencillo para escalar.<sup>83</sup> No obstante, solo algunos tipos del VPH se expresan eficientemente en este sistema. Sin embargo existe una variante de este, denominado MultiBac, el cual permite la expresión sincronizada de proteínas heterólogas a partir de dos casetes de expresión regulados por los promotores virales tardíos p10 y polh.<sup>84</sup>

En 2009 Senger y colaboradores<sup>85</sup> lograron aumentar ocho veces el rendimiento de la proteína L1 del VPH 11 empleando el sistema MultiBac en la línea de insectos Sf-9, mediante la clonación de un gen *II* optimizado. Además se postuló que el rendimiento de PSV del VPH 11 no era influenciado exclusivamente por la producción de la proteína L1, sino que existía un factor negativo dominante en el sistema convencional de baculovirus que afectaba el rendimiento de PSV en este sistema. Este factor negativo se identificó como V-CATH, una proteasa de cisteína involucrada en la destrucción de tejidos *in vivo*. En el sistema MultiBac el gen que codifica para esta proteasa se encuentra inactivado,<sup>86</sup> lo que contribuye a un aumento de la producción de la proteína L1 y un mayor rendimiento de PSV.

Posteriormente, X. Xu y colaboradores obtuvieron PSV tanto de VPH 6 como de VPH 11 expresando los genes *II* optimizados para su expresión en células de insecto. En el caso del VPH 6, la optimización de secuencia consistió en el cambio de 493 nucleótidos en la secuencia del gen, sin que se afectara la secuencia aminoacídica de la proteína. Para la optimización del gen *II* de HPV 11 fue necesario modificar 601 nucleótidos, en este caso la secuencia aminoacídica tampoco se vio afectada. Los genes optimizados fueron clonados en el vector pFastBac I, luego los vectores obtenidos fueron empleados para transfectar células Sf-9. Con este sistema de expresión los niveles de producción de la L1 de VPH 6 y 11 fueron incrementados en comparación con la expresión de los genes salvajes en el mismo sistema. Luego de la purificación se obtuvieron 8,5mg/L de PSV de VPH 6 y 10 mg/L de PSV de VPH 11.<sup>87</sup>

### Células de mamíferos

El empleo de células de mamíferos como sistema de expresión facilita la producción de la proteína L1 y el ensamblaje de las PSV puesto que este sistema es más semejante al entorno natural donde se propaga el virus. Sin embargo, el rendimiento de L1 en estos sistemas son relativamente bajos, por lo que es necesario hacer una optimización de codones del gen *II* del VPH 11 salvaje. Así Mossadegh y colaboradores, informaron la obtención de la proteína L1 mediante la transfección transiente de un gen *II* optimizado, cuya expresión estaba dirigida por el

promotor inmediato temprano del Citomegalovirus Humano, en células de riñón de monos verdes africanos (Cos-1), células de riñón de embrión humano (293T) y células de ovario de hámster chino (CHO-09). En estos sistemas, el rendimiento de la L1 fue 100 veces mayor con el gen optimizado que con el gen salvaje. La proteína L1 se observó predominantemente en el área perinuclear, posiblemente unida a la membrana nuclear, y otra fracción considerable se localizó unida a los microtúbulos del citoesqueleto celular. Las PSV se formaron de manera espontánea en el núcleo celular, aunque en menor grado que la L1 del HPV16 en el mismo sistema de expresión, lo cual puede deberse a limitaciones en la importación de la proteína L1 al núcleo.<sup>88</sup>

Diversas estrategias se han planteado para la búsqueda de sistemas de expresión más eficaces en la producción de la proteína L1 de los VPH 6 y 11, teniendo como principales criterios a evaluar el rendimiento, la inmunogenicidad, la facilidad y bajo costo de las estrategias de purificación.<sup>89</sup> En el caso de nuestro país, una de las estrategias más apropiadas a seguir sería emplear *E. coli* o la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* como plataformas para la obtención de candidatos vacunales bivalentes dadas las ventajas que presentan estos hospederos y considerando que existen instituciones de países en vías de desarrollo que se encuentran evaluando este tipo de candidatos en estudios preclínicos o clínico.<sup>90,91</sup>

## CONCLUSIONES

Aunque los VPH 6 y 11 son de bajo riesgo oncogénico, es necesario implementar más estudios epidemiológicos enfocados en estos tipos de VPH, que arrojen luz sobre su incidencia y prevalencia en Cuba, ya que estos genotipos causan enfermedades de gran impacto psicológico, cuyo tratamiento es costoso y además constituyen un factor de riesgo para el desarrollo de carcinomas. Por este motivo es de gran importancia incluir estos tipos de VPH en cualquier estrategia vacunal, para lo cual se puede aprovechar cualquiera de las secuencias de referencia que existen para cada uno de estos genotipos, pues la variación existente dentro de cada tipo no influye en la interacción de las PSV con el sistema inmune y por tanto no interfieren en la efectividad de la vacuna. Con el propósito de disminuir los costos de producción de las vacunas se buscan nuevas estrategias para la obtención de las PSV. Una de las más ventajosas es la obtención de PSV a partir de *E. coli*, donde la proteína L1 de los VPH 6 y 11 se puede obtener empleando genes deletados, lo cual favorece la solubilidad y el rendimiento de la proteína. Otra plataforma ventajosa podrían ser las levaduras, donde es necesario emplear un gen con una secuencia nucleotídica optimizada, así como la eliminación del extremo carboxilo de la proteína, el cual corresponde a la señal de localización nuclear.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Mesenburg MA, Muniz LC, Silveira MF. Assessment of sexual risk behaviors and perception of vulnerability to sexually transmitted diseases/acquired immunodeficiency syndrome in women, 1999–2012: a population based survey in a medium-sized Brazilian city. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2014; 18(4):414-20.
2. Sánchez-Torices M, Corrales-Millan R, Hijona-Elosegui J. Oropharyngeal perinatal colonization by human papillomavirus. *Acta Otorrinolaringológica Española*. 2015.
3. Organization WH. Weekly epidemiological record 2014 [Consultado: 1 de junio de 2016]. Disponible en: [http://www.who.int/immunization/policy/position\\_papers/PP\\_HP\\_V\\_Spanish\\_Oct2014.pdf](http://www.who.int/immunization/policy/position_papers/PP_HP_V_Spanish_Oct2014.pdf).
4. Soto Y, Kourí V, Limia C, Torres G, Goicolea B, López L, *et al.* Epidemiología Molecular de las Infecciones por Papilomavirus Humano en Mujeres Cubanas entre 15 y 59 años. 8th Cuban Congress on Microbiology and Parasitology, 5th National Congress on Tropical Medicine and 5th International Symposium on HIV/aids infection in Cuba La Habana, October 14-16, 2014. 2014.
5. Mongelos P, Mendoza LP, Rodríguez-Riveros I, Castro A, Gimenez G, Araujo P, *et al.* Distribution of human papillomavirus (HPV) genotypes and bacterial vaginosis presence in cervical samples from Paraguayan indigenous. *International Journal of Infectious Diseases*. 2015; 39:44-9.
6. Sanabria Negrín JG. Virus del papiloma humano. *Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río*. 2009; 13(4):168-87.
7. Stanley M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecologic oncology*. 2010; 117(2):S5-S10.
8. Lee JT, Goldberg SM, Madoff RD, Tawadros PS. Immune status does not predict high-risk HPV in anal condyloma. *Journal of Surgical Research*. 2016; 201(1):166-9.
9. De Martel C, Ferlay J, Franceschi S, Vignat J, Bray F, Forman D, *et al.* Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *The lancet oncology*. 2012; 13(6):607-15.
10. Jaimes-Torres Á, Maldonado-Barrón R, Alderete-Vázquez G, Melín-Herrera O, Sánchez-Valdivieso E. Cáncer germinal de testículo asociado a tumor de Buschke-Löwenstein. *Revista Mexicana de Urología*. 2014; 74(6):371-4.
11. Pachar-Lucio JV, Rodríguez-Pachar G, Barraza-Langshaw M, Trejos-Justiniani D. Asfixia por papilomatosis respiratoria recurrente. *Revista Española de Medicina Legal*. 2016; 42(1):37-40.
12. Gruber M, Mills N, Blair D, Van Der Meer G, Mahadevan M. Safety of paediatric day-stay laryngeal surgery for recurrent respiratory papillomatosis. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 2016; 82:116-9.



13. Soto Y, MunE M, Morales E, Goicolea A, Mora J, Sanchez L, *et al.* Human Papillomavirus infections in Cuban women with cervical intraepithelial neoplasia. *Sexually transmitted diseases*. 2007; 34(12):974-6.
14. Jelen MM, Chen Z, Kocjan BJ, Hošnjak L, Burt FJ, Chan PK, *et al.* Global Genomic Diversity of Human Papillomavirus 11 Based on 433 Isolates and 78 Complete Genome Sequences. *Journal of virology*. 2016; 90(11):5503-13.
15. Gross G, Deutsche S. Condylomata acuminata and other HPV-associated manifestations of the genitals and urethra. Guideline of the German STD Society (DSTG). *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete*. 2001; 52(5):405.
16. Moore RA, Edwards JE, Hopwood J, Hicks D. Imiquimod for the treatment of genital warts: a quantitative systematic review. *BMC Infectious Diseases*. 2001; 1(1):1.
17. Williams OM, Hart KW, Wang EC, Gelder CM. Analysis of CD4+ T-cell responses to human papillomavirus (HPV) type 11 L1 in healthy adults reveals a high degree of responsiveness and cross-reactivity with other HPV types. *Journal of virology*. 2002; 76(15):7418-29.
18. Jawanjal P, Salhan S, Dhawan I, Rath G. Comparative analysis of p53 and p21 proteins in normal cervix and HPV associated precancerous and cancerous lesions of cervix. *Journal of the Anatomical Society of India*. 2015; 64(1):3-11.
19. Godínez J, Nicolás-Párraga S, Pimenoff V, Mengual-Chuliá B, Muñoz N, Bosch F, *et al.* Phylogenetically related, clinically different: human papillomaviruses 6 and 11 variants distribution in genital warts and in laryngeal papillomatosis. *Clinical Microbiology and Infection*. 2014; 20(6):O406-O13.
20. Fernandes JV, Araújo J, Fernandes T. Biology and natural history of human papillomavirus infection. *Open Access J Clin Trials*. 2013; 5:1-12.
21. Li M, Cripe TP, Estes PA, Lyon MK, Rose RC, Garcea RL. Expression of the human papillomavirus type 11 L1 capsid protein in *Escherichia coli*: characterization of protein domains involved in DNA binding and capsid assembly. *J Virol*. 1997; 71(4):2988-95.
22. Kushnir N, Streatfield SJ, Yusibov V. Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine*. 2012; 31(1):58-83.
23. Lowe RS, Brown DR, Bryan JT, Cook JC, George HA, Hofmann KJ, *et al.* Human papillomavirus type 11 (HPV-11) neutralizing antibodies in the serum and genital mucosal secretions of African green monkeys immunized with HPV-11 virus-like particles expressed in yeast. *Journal of Infectious Diseases*. 1997; 176(5):1141-5.
24. Syrjänen KJ. Annual disease burden due to human papillomavirus 16 and 18 infections in Finland. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 2009; 41(sup108):2-32.
25. de Oliveira CM, Aguiar LS, Genta MLDN, Alves VAF, Levi JE. HPV-11 associated metastatic cervical cancer. *Gynecologic oncology case reports*. 2012; 2(1):18-9.
26. Zelada-Valdés A, Fando-Calzada RA. La pandemia subvalorada del siglo XXI: el virus del papiloma humano. Su repercusión en la patogenia del cáncer cervicouterino. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 2013; 44(2).
27. Rose RC, White WI, Li M, Suzich JA, Lane C, Garcea RL. Human papillomavirus type 11 recombinant L1 capsomeres induce virus-neutralizing antibodies. *Journal of virology*. 1998; 72(7):6151-4.
28. Danielewski JA, Garland SM, McCloskey J, Hillman RJ, Tabrizi SN. Human papillomavirus type 6 and 11 genetic variants found in 71 oral and anogenital epithelial samples from Australia. *PloS one*. 2013; 8(5):e63892.
29. Yu-Jin Koo Y-SK, Kyung-Jin Min, Jin-Hwa Hong, Jae-Kwan Lee. High-risk human papillomavirus infection in the prediction of poor treatment response and disease recurrence in patients with vulvovaginal condyloma. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. 2015.
30. Anderson LA. Prophylactic human papillomavirus vaccines: past, present and future. *Pathology*. 2012; 44(1):1-6.
31. González Martínez G, Núñez Troconis J. Tratamiento de las verrugas genitales: una actualización. *Revista chilena de obstetricia y ginecología*. 2015; 80(1):76-83.
32. Ahmed P, Ulonnam C, Undie N. Case Report: Recurrent Respiratory Papillomatosis: A Report of two cases and review of literature. *Nigerian Journal of Paediatrics*. 2014; 41(1):70-3.
33. SYRJÄNEN S. Current concepts on human papillomavirus infections in children. *Apmis*. 2010; 118(6-7):494-509.
34. Sinal SH, Woods CR, editors. Human papillomavirus infections of the genital and respiratory tracts in young children. *Seminars in pediatric infectious diseases*; 2005: Elsevier.
35. Soto Y, Torres G, Kourí V, Limia CM, Goicolea A, Capó V, *et al.* Molecular Epidemiology of Human Papillomavirus Infections in Cervical Samples From Cuban Women Older Than 30 Years. *Journal of lower genital tract disease*. 2014; 18(3):210-7.
36. Ceccato Junior B, Ceccato López A, Fiorini Nascimento L, Magalhães Novaes L, Hugo Melo V. Prevalência de infecção cervical por papilomavírus humano e neoplasia intraepitelial cervical em mulheres HIV-positivas e negativas. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2015; 37(4):178-85.
37. Ferrá Torres TM, del Río Ysla MB, Carrazana Hernández G, Bermejo Bencomo W, Pérez Jiménez AY.

- Relación de las verrugas ano-genitales con lesiones precursoras del cáncer cérvicouterino. *MediCiego*. 2008; 14(supl. 1).
38. Puente Perpiñán M, Haber Reyes MdP, de los Reyes Losada A, Palacios S, Ricci S. Adolescentes e infección por virus del papiloma humano. *Medisan*. 2014; 18(6):769-75.
  39. Rodríguez M, Llop A, Capo V, Kouri V, Resik S, Rojas L, *et al*. Human immunodeficiency virus and other sexually transmitted diseases in Cuban women. *Clinical microbiology and infection*. 2005; 11(9):764-7.
  40. Bouscarat F, Dupin N, Janier M, Drobacheff C, Milpied B, Vexiau-Robert D, editors. *Verrues génitales (condylomes) externes*. Annales de Dermatologie et de Vénérologie; 2006: Elsevier Masson.
  41. Blanco-González OA, Soto-Brito Y, Blanco-González B, Acosta-Tabares S, de Paz VC, Toledo ME. Detección y tipificación de papilomavirus humano en lesiones condilomatosas anogenitales de hombres cubanos seropositivos al VIH-1. *Rev Biomed*. 2011; 22:21-30.
  42. Torres López G, Soto Brito Y, Capó de Paz V, López Fuentes LX, de la Torre Jiménez AI, Goicolea Maiza A, *et al*. Normalización de un método inmunoquímico para detectar Papilomavirus humano tipo 16 en lesiones cérvico-uterinas. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 2014; 66(3):433-46.
  43. Reyes-López A, Pérez Bolde-Villarreal C, Pastor-Martínez V. Uso de recursos y costos asociados al diagnóstico y tratamiento de las verrugas genitales en instituciones públicas de salud en México. *Revista Mexicana de Urología*. 2015; 75(2):72-81.
  44. Castellsagué X, Bosch FX. Vacunas frente al virus del papiloma humano, para la prevención del cáncer de cuello uterino. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*. 2007; 53(2):101-9.
  45. Schiller JT, Müller M. Next generation prophylactic human papillomavirus vaccines. *The Lancet Oncology*. 2015; 16(5):e217-e25.
  46. Serrano B, Alemany L, Tous S, Bruni L, Clifford GM, Weiss T, *et al*. Potential impact of a nine-valent vaccine in human papillomavirus related cervical disease. *Infect Agent Cancer*. 2012; 7(1):38.
  47. Hopkins TG, Wood N. Female human papillomavirus (HPV) vaccination: global uptake and the impact of attitudes. *Vaccine*. 2013; 31(13):1673-9.
  48. Lancet T. GAVI injects new life into HPV vaccine rollout. *The Lancet*. 2013; 381(9879):1688.
  49. Society AC. How much do the HPV vaccines cost? Are they covered by health insurance plans? [Consultado: 7 de julio de 2016]. Disponible en: <http://www.cancer.org/cancer/cancercauses/othercarcinogens/infectiousagents/hpv/humanpapillomavirusandhpv-vaccinesfaq/hpv-faq-vaccine-cost>.
  50. Batista Ferrer H, Audrey S, Trotter C, Hickman M. An appraisal of theoretical approaches to examining behaviours in relation to Human Papillomavirus (HPV) vaccination of young women. *Preventive Medicine*. 2015; 81:122-31.
  51. Angioli R, Lopez S, Aloisi A, Terranova C, De Cicco C, Scaletta G, *et al*. Ten years of HPV vaccines: State of art and controversies. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2016; 102:65-72.
  52. Markowitz LE, Liu G, Hariri S, Steinau M, Dunne EF, Unger ER. Prevalence of HPV after introduction of the vaccination program in the United States. *Pediatrics*. 2016: peds. 2015-1968.
  53. Ali H, Donovan B, Wand H, Read TR, Regan DG, Grulich AE, *et al*. Genital warts in young Australians five years into national human papillomavirus vaccination programme: national surveillance data. *Bmj*. 2013; 346:f2032.
  54. Wangu Z, Hsu KK. Impact of HPV vaccination on anogenital warts and respiratory papillomatosis. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2016; 12(6):1357-62.
  55. Chesson HW, Ekwueme DU, Saraiya M, Dunne EF, Markowitz LE. Estimates of the timing of reductions in genital warts and high grade cervical intraepithelial neoplasia after onset of human papillomavirus (HPV) vaccination in the United States. *Vaccine*. 2013; 31(37):3899-905.
  56. Drolet M, Bénard É, Boily M-C, Ali H, Baandrup L, Bauer H, *et al*. Population-level impact and herd effects following human papillomavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet infectious diseases*. 2015; 15(5):565-80.
  57. Burk RD, Chen Z, Harari A, Smith BC, Kocjan BJ, Maver PJ, *et al*. Classification and nomenclature system for human Alphapapillomavirus variants: general features, nucleotide landmarks and assignment of HPV6 and HPV11 isolates to variant lineages. *Acta dermatovenerologica Alpina, Panonica, et Adriatica*. 2011; 20(3):113.
  58. Jelen MM, Chen Z, Kocjan BJ, Burt FJ, Chan PK, Chouhy D, *et al*. Global genomic diversity of human papillomavirus 6 based on 724 isolates and 190 complete genome sequences. *Journal of virology*. 2014; 88(13):7307-16.
  59. De Villiers E-M, Fauquet C, Broker TR, Bernard H-U, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004; 324(1):17-27.
  60. Hariharan I, Pillai MR. Genotypes of the human papillomavirus: Relevance to Indian field trials of the vaccine. *Indian J Med Res*. 2009.
  61. Ahmed AI, Bissett SL, Beddows S. Amino acid sequence diversity of the major human papillomavirus capsid protein: implications for current and next generation vaccines. *Infection, Genetics and Evolution*. 2013; 18:151-9.

62. Kumar S, Biswas M, Jose T. HPV vaccine: Current status and future directions. *medical journal armed forces india*. 2015; 71(2):171-7.
63. Sahdev S, Khattar SK, Saini KS. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Molecular and cellular biochemistry*. 2008; 307(1-2):249-64.
64. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Recombinant protein expression in microbial systems*. 2014:7.
65. Banks L, Matlashewski G, Pim D, Churcher M, Roberts C, Crawford L. Expression of human papillomavirus type 6 and type 16 capsid proteins in bacteria and their antigenic characterization. *Journal of general virology*. 1987; 68(12):3081-9.
66. Chen XS, Casini G, Harrison SC, Garcea RL. Papillomavirus capsid protein expression in *Escherichia coli*: purification and assembly of HPV11 and HPV16 L1. *Journal of molecular biology*. 2001; 307(1):173-82.
67. Human papillomavirus 6/11 vaccine recombinant bivalent - Xiamen Innovax Mars 24th, 2016 [Consultado: 11 de Mayo de 2017]. Disponible en: <http://adisinsight.springer.com/drugs/800042287>.
68. Li S, Pan H, Liu B, Zhang J, Miao J, Xia N. Truncated L1 protein of human papillomavirus type 6. *Google Patents*; 2014.
69. Krakauer T. *Superantigen protocols*: Springer Science & Business Media; 2003.
70. Zhang J, Wang J, Yang C, Gu Y, Li S, Xia N. Truncated L1 protein of human papillomavirus type 11. *Google Patents*; 2008.
71. BioLabs NE, Inc. PROTEIN EXPRESSION & ANALYSIS Instruction Manual IMPACT™ Kit [Consultado: 1 de Junio de 2016]. Disponible en: <https://www.neb.com/~media/Catalog/All-Products/21A73B351DD24F94BC584FAED2A83A0F/Datacards%20or%20Manuals/manualE6901.pdf>.
72. Luo W, Zhang J, Yang H, Li S, Xie X, Pang S, *et al*. Construction and application of an *Escherichia coli* high effective expression vector with an enhancer. *Sheng wu gong cheng xue bao= Chinese journal of biotechnology*. 2000; 16(5):578-81.
73. Pan H, Li Z, Wang J, Song S, Wang D, Wei M, *et al*. Bacterially expressed human papillomavirus type 6 and 11 bivalent vaccine: Characterization, antigenicity and immunogenicity. *Vaccine*. 2017; 35(24):3222-31.
74. Sasagawa T, Pushko P, Steers G, Gschmeissner SE, Hajibagheri MN, Finch J, *et al*. Synthesis and assembly of virus-like particles of human papillomaviruses type 6 and Type 16 in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Virology*. 1995; 206(1):126-35.
75. Neeper MP, Hofmann KJ, Jansen KU. Expression of the major capsid protein of human papillomavirus type 11 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*. 1996; 180(1):1-6.
76. Buonamassa DT, Greer CE, Capo S, Yen TB, Galeotti CL, Bensi G. Yeast coexpression of human papillomavirus types 6 and 16 capsid proteins. *Virology*. 2002; 293(2):335-44.
77. Warzecha H, Mason HS, Lane C, Tryggvesson A, Rybicki E, Williamson A-L, *et al*. Oral immunogenicity of human papillomavirus-like particles expressed in potato. *J Virol*. 2003; 77(16):8702-11.
78. Gerber S, Lane C, Brown D, Lord E, DiLorenzo M, Clements J, *et al*. Human papillomavirus virus-like particles are efficient oral immunogens when coadministered with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin mutant R192G or CpG DNA. *Journal of virology*. 2001; 75(10):4752-60.
79. Paintsil J, Müller M, Picken M, Gissmann L, Zhou J. Carboxyl terminus of bovine papillomavirus type-1 L1 protein is not required for capsid formation. *Virology*. 1996; 223(1):238-44.
80. Kohl TO, Hitzeroth II, Christensen ND, Rybicki EP. Expression of HPV-11 L1 protein in transgenic *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum*. *BMC biotechnology*. 2007; 7(1):56.
81. Rose R, Bonnez W, Reichman R. Production of papillomavirus capsid protein and virus-like particles. *Google Patents*; 2011.
82. Christensen ND, Kirnbauer R, Schiller JT, Ghim S-J, Schlegel R, Jenson AB, *et al*. Human papillomavirus types 6 and 11 have antigenically distinct strongly immunogenic conformationally dependent neutralizing epitopes. *Virology*. 1994; 205(1):329-35.
83. Ikonou L, Schneider Y-J, Agathos S. Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. *Applied microbiology and biotechnology*. 2003; 62(1):1-20.
84. Bieniossek C, Richmond TJ, Berger I. MultiBac: Multigene Baculovirus-Based Eukaryotic Protein Complex Production. *Current protocols in protein science*. 2008:5.20. 1-5. 6.
85. Senger T, Schädlich L, Gissmann L, Müller M. Enhanced papillomavirus-like particle production in insect cells. *Virology*. 2009; 388(2):344-53.
86. Berger I, Fitzgerald DJ, Richmond TJ. Baculovirus expression system for heterologous multiprotein complexes. *Nature biotechnology*. 2004; 22(12):1583-7.
87. Xu X, Zhang T, Xu Y, Fan D. Virus-like particles of capsid proteins from human papillomavirus type 16/58/18/6/11 and the method for preparation and the uses thereof. *Google Patents*; 2014.
88. Mossadegh N, Gissmann L, Müller M, Zentgraf H, Alonso A, Tomakidi P. Codon optimization of the human papillomavirus 11 (HPV 11) L1 gene leads to increased gene expression and formation of virus-like particles in mammalian epithelial cells. *Virology*. 2004; 326(1):57-66.

89. Beltrán-Lissabet JF. Generalidades sobre las partículas similares al Virus del Papiloma Humano. Revista CENIC Ciencias Biológicas. 2014; 45(2):99-107.
90. Pimienta-Rodríguez ET, Marrero-Domínguez K, Fando-Calzada R. Candidatos vacunales profilácticos de segunda y tercera generación contra el virus del papiloma humano. Revista CENIC Ciencias Biológicas. 2017; 48(2):021-32.
91. Cook JC, Joyce JG, George HA, Schultz LD, Hurni WM, Jansen KU, *et al.* Purification of virus-like particles of recombinant human papillomavirus type 11 major capsid protein L1 from *Saccharomyces cerevisiae*. Protein expression and purification. 1999; 17(3):477-84.