

ANTICUERPO ANTI-GALACTOSIL (ALFA1→3) GALACTOSA:

NIVELES EN EL MOCO CERVICAL DE PACIENTES CON CUELLO UTERINO SANO, INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO, Y NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL

DIMAS E. HERNÁNDEZ ¹, AARÓN COHEN ², MARÍA CORRENTI ³

¹UNIDAD DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA, ESCUELA VARGAS, UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA; ²SERVICIO DE GINECOLOGÍA, HOSPITAL VARGAS; ³INSTITUTO DE HEMATOLOGÍA-ONCOLOGÍA, MSDS, CARACAS, VENEZUELA
PREMIO "DR. ALEJANDRO CALVO LAIRET

RESUMEN

OBJETIVOS: Detectar la presencia de anti-galactosil en cuellos uterinos sanos y con infección por virus del papiloma humano y neoplasia intraepitelial cervical. **MÉTODOS:** En 96 pacientes con cuello uterino sano, se detectó en ellas presencia de anti-galactosil en moco cervical. En 60 pacientes se estudió la presencia de virus del papiloma humano con reacción en cadena de polimerasa e hibridización. Se utilizó en ambos grupos método de ELISA en cuantificación de anti-galactosil. Se empleó como antígeno la laminina extraída de línea celular Engelbreth-Holm-Swarm. **RESULTADOS:** En el primer grupo, se pudo detectar anti-galactosil en moco cervical de cuellos uterinos clínicamente sanos; los valores del anticuerpo se elevan a medida que aumentan los años de vida sexual activa y el número de parejas sexuales ($P = 0,05$). En el segundo grupo, 55 % mostró presencia de virus del papiloma humano, 45 % tuvo virus del papiloma humano de intermedio/alto riesgo oncogénico, 12 % virus del papiloma humano de bajo riesgo oncogénico, 43 % ambos subgrupos. Hubo niveles anti-galactosil más

elevados en el grupo virus del papiloma humano positivo que en el grupo virus del papiloma humano negativo ($P < 0,0001$); el subgrupo con neoplasia intraepitelial cervical e infección por virus del papiloma humano mostró niveles de anti-galactosil más altos al compararlo con el subgrupo con infección por virus del papiloma humano y citología normal ($P < 0,0001$). No hubo diferencias significativas en niveles de anti-galactosil en los diferentes subgrupos de virus del papiloma humano. **CONCLUSIONES:** Valores altos de anti-galactosil en pacientes con virus del papiloma humano y neoplasia intraepitelial cervical 1, sugieren la participación de la inmunidad humoral local en estas lesiones.

PALABRAS CLAVE: Anti-galactosil, virus del papiloma humano, neoplasia intraepitelial cervical.

SUMMARY

OBJECTIVE: Demonstrate the presence of anti-galactosil in healthy cervix, and cervix with human papiloma virus infection and cervical intraepithelial neoplasia. **METHODS:** Study 96 women with healthy cervix; anti-galactosil levels were detected in cervical mucus. The presence of human papiloma virus infection was evaluated by polymerase chain reaction and hybridization in 60 different women. In both groups, ELISA method was used in the quantification of anti-galactosil levels. Laminin, extracted from Engelbreth-Holm-Swarm cell

Recibido: 15/07/2002 Revisado: 11/08/2002
Aceptado para publicación: 10/09/2002

Correspondencia: Dr. Dimas E. Hernández
Apartado Postal 75196, El Marques, Caracas, 1070-A,
Venezuela. Fax: 212-5629928.
E-mail: dimas@CancerMD.com

line, was employed as an antigen. **RESULTS:** In the first group, the presence of anti-galactosil was demonstrated in cervical mucus from healthy cervix, and the levels were higher with the increase of years of sexual activity and number of sexual partners $P = 0.05$. In the second group, 55 % of patients showed human papiloma virus infection, 45 % had intermediate/high oncogenic risk human papiloma virus, 12 % had low oncogenic risk human papiloma virus, and the other 43 % had both groups. We found more human papiloma virus infection with the increase of sexual partners $P = 0.05$. There were significantly higher anti-galactosil levels in the human papiloma virus positive group with the human papiloma virus negative group $P < 0.0001$; also, when dividing the human papiloma virus positive group into one subgroup with normal cytology and another with cervical intraepithelial neoplasia 1, we found higher values in the latter group $P < 0.0001$. There was no significant difference in anti-galactosil levels in various human papiloma virus subgroups. **CONCLUSIONS:** The anti-galactosil levels can be measured in cervical mucus; high levels are found in patients with human papiloma virus infection and cervical intraepithelial neoplasia 1, suggests the participation of local humoral immunity in cervical lesions.

KEY WORDS: Anti-galactosil, human papiloma virus, cervical intraepithelial neoplasia.

INTRODUCCIÓN

El anticuerpo (Ac) antigalactosil (α 1 $\rightarrow$ 3) galactosa (antiGAL) es un Ac natural que representa el 1 % de toda la IgG circulante. Este Ac interactúa específicamente con residuos galactosil (α 1 $\rightarrow$ 3) galactosil (β 1 $\rightarrow$ 4) glucosa N-acetil-R⁽¹⁾. AntiGAL es único entre los Ac naturales debido a sus altas concentraciones en suero (30-100 μ g/mL) y la presencia en todos los humanos⁽²⁾. Otras especies de mamíferos que producen el Ac son los monos del viejo mundo; en cambio, en el resto de los mamíferos no encontramos este Ac ya que sus células expresan el epitopo α -galactosil⁽³⁾. Niveles elevados de antiGAL se han reportado en el suero de pacientes con la enfermedad de Chagas⁽⁴⁾, leishmaniasis cutánea⁽⁵⁾, cáncer de mama⁽⁶⁾ y cáncer de cuello uterino⁽⁷⁾. El antiGAL

también juega papel en los mecanismos de vigilancia antitumoral; ya que es capaz de bloquear la capacidad de metastatizar de diversas líneas de células tumorales. Nosotros hemos reportado previamente⁽⁷⁾, niveles elevados de antiGAL en el suero de 42 % de los pacientes con neoplasia intraepitelial cervical 3 (NIC), y más recientemente en el 22 % al 30 % de pacientes con NIC 1 a NIC 3⁽⁸⁾. Esta reactividad serológica puede estar relacionada con la expresión de epítomos α -galactosil en algún momento de la evolución en la historia natural de la infección por el virus del papiloma humano (VPH), sugiriendo una respuesta natural en contra del virus. Otras investigaciones han mostrado la presencia anormal de epítomos α -galactosil en las células del cuello uterino con cambios coilocíticos⁽⁹⁾.

Los objetivos generales de esta investigación son: desarrollar un método para poder detectar la presencia de antiGAL en el moco cervical de mujeres con cuello uterino clínicamente sano y detectar antiGAL en el moco cervical de mujeres con/sin la infección por el VPH.

MÉTODOS

Pacientes

Esta investigación fue previamente aprobada por el Comité de Ética del Hospital Vargas. En la primera fase, evaluamos 96 pacientes femeninas provenientes de la consulta de ginecología del Hospital Vargas con un cuello uterino clínicamente sano, incluyendo un estudio colposcópico y citológico normal. Los criterios de inclusión fueron: edad comprendida entre los 18 y 35 años, hallarse entre los días 8 y 21 del ciclo menstrual y no haber tenido relaciones sexuales los tres días previos a la toma de la muestra. Se eligió este grupo etario para evitar la inclusión de pacientes con trastornos menstruales relacionados con la menarquía y al climaterio. En relación con los días del ciclo menstrual, las características del moco cervical en cuanto a cantidad y calidad

son más adecuadas para la recolección y análisis de las muestras en ese intervalo de tiempo. Con respecto a las relaciones sexuales previas, hay estudios que demuestran la presencia de Ac antiGAL en el semen humano. Los criterios de exclusión fueron: ser usuaria actual de un dispositivo intrauterino; presentar evidencia clínica o citológico de candidiasis, vaginosis bacteriana o tricomoniasis, así como cualquier otra enfermedad de transmisión sexual; sangrado uterino, cervical o vaginal; antecedente de leishmaniasis, enfermedad de Chagas o enfermedades auto inmunes. En este grupo se evaluó la presencia de Ac antiGAL en el moco cervical y se correlacionaron dichos valores con: edad de comienzo de la actividad sexual, años de vida sexual activa y número de parejas sexuales. En la segunda fase de la investigación, se incluyeron 60 pacientes femeninas, y se siguieron los mismos criterios de inclusión y de exclusión, excepto que 10 de ellas tenían NIC 1. En todas ellas se cuantificó el valor de antiGAL en el moco cervical, y se estudió la presencia de VPH por la PCR e hibridización. Los valores de antiGAL se correlacionaron: a. Con la presencia del VPH o sin ella y estos últimos también con: edad de comienzo de las primeras relaciones sexuales, años de vida sexual activa y número de parejas sexuales; b. con VPH de bajo, intermedio o alto riesgo oncogénico.

Recolección de las muestras

La toma de la muestra de moco cervical se realizó mediante la técnica del hisopado del endocervix, posteriormente el hisopo se colocó en 0,8 mL de solución PBS (*phosphate buffer saline*) en un tubo de ensayo. Se incubó la muestra a 4°C durante 24 horas, luego se retiró el hisopo, previo escurrimiento del material obtenido en él. Posteriormente, se procedió a congelar la muestra a -70°C para su procesamiento posterior.

Determinación del Ac antiGAL

Se empleó el método de ELISA (Ensayo inmunoabsorbente unido a enzimas) como se ha descrito previamente ⁽⁷⁾. La laminina de ratón, extraída de la línea de célula tumoral Engelbreth-Holm-Swarm, se utilizó como antígeno y la seroalbúmina bovina se empleó como control para la inmunorreactividad inespecífica. La densidad óptica se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 405-NM.

Determinación del VPH por PCR e hibridización

Se empleó el método descrito previamente por Correnti y col. ⁽¹⁰⁾. En resumen, la mezcla para la PCR incluyó los oligonucleótidos cebadores para el VPH (MY09 y MY11). Se procedió a la reacción utilizando 35 ciclos de amplificación y se incluyó como control positivo el ADN purificado de células HeLa, las cuales están infectadas por el VPH 18. Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 3 % en tampón Tris borato EDTA 1X, la visualización de las bandas de ADN se realizó mediante la tensión con bromuro de etidio y exposición a la luz ultravioleta. La tipificación viral se realizó utilizando el sistema <<Sharp signal>> desarrollado por *Digene Diagnostic*. Esta metodología emplea una mezcla de sondas de ARN de riesgo oncogénico intermedio/alto que incluye los siguientes tipos: 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52 y 56; y una mezcla de sondas de bajo riesgo oncogénico: 6, 11, 42, 43 y 44. La detección se realizó empleando un Ac anti-híbrido ADN/ARN marcado con fosfatasa alcalina. La lectura se realizó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 405-NM.

Análisis estadístico

Se usó el programa estadístico SPSS (Chicago, IL) y el InStat (*GraphPad Software*, SanDiego, CA) para analizar los datos. En el

estudio de la relación existente entre los niveles de antiGAL con respecto a: edad de comienzo de la actividad sexual, años de vida sexual activa y número de parejas sexuales; se utilizaron la media aritmética, los porcentajes y la desviación estándar como medidas de descripción estadística. Para el análisis estadístico, se empleó el análisis multivariado con la regresión logarítmica múltiple, ANOVA y regresión lineal. Se consideró una $P \leq 0,05$ como criterio de significancia estadística. Para el análisis de la relación existente entre la infección por el VPH con: edad de comienzo de la actividad sexual, años de vida sexual activa y número de parejas sexuales; se utilizaron los métodos estadísticos y los criterios de significancia descritos previamente. Con referencia a la relación entre los niveles de antiGAL y la infección por el VPH, nosotros evaluamos la hipótesis nula que los niveles de antiGAL $\alpha 1 \rightarrow 3$ en el moco cervical no eran diferentes entre los pacientes con VPH o sin él, ni entre los diferentes subgrupos. Se utilizaron la media aritmética, los porcentajes y la desviación estándar para la descripción estadística. Debido a que los valores mostraron una distribución no paramétrica, se usó el método de Mann-Whitney para comparar dos grupos independientes, el análisis de la varianza de Kruskal-Wallis para la comparación de más de dos grupos, y el método de múltiples comparaciones de distribuciones no paramétricas para comparar pacientes de diferentes subgrupos. Valores de $P \leq 0,01$ de una cola se consideraron con criterio de significancia.

RESULTADOS

La edad promedio del total de pacientes fue 26 años (rango, 18-35). Con referencia a la primera parte de la investigación, observamos que se puede detectar la presencia de Ac antiGAL en el moco cervical de pacientes con cuello uterino clínicamente sano. El Cuadro 1

nos muestra que la mayoría de las pacientes (66 %) tenían niveles de Ac antiGAL inferiores a 250 y solamente el 34 % de ellas tuvieron valores superiores. Como se puede ver en el Cuadro 2, el 85 % de nuestras pacientes iniciaron su actividad sexual antes de los 20 años; además, encontramos que el 36 % de estas mujeres tuvieron niveles de antiGAL mayores de 250. A pesar de la tendencia a valores mayores de antiGAL con un inicio temprano de actividad sexual, esta diferencia no fue significativa. Al analizar el Cuadro 3, encontramos que el 66 % de las pacientes tenía entre 7 y 18 años de vida sexual activa, y de ellas, el 32 % tenía valores de antiGAL mayores de 250. Se encontró una $P = 0,05$ a favor de niveles mayores de antiGAL a medida que aumenta el número de años de vida sexual activa. En el Cuadro 4 vemos que el 63 % de las mujeres tenían entre 2 y 3 parejas sexuales, y de este grupo, el 35 % presentó niveles de antiGAL mayores de 250. Se observó una tendencia a tener niveles más altos de antiGAL a medida que aumenta el número de parejas sexuales ($P = 0,05$).

Cuadro 1. Niveles de antiGAL en el moco cervical de 96 pacientes femeninas con cuello uterino clínicamente sano

Lectura (DO)	Pacientes
1 - 250	63
215 - 500	22
501 - 750	9
751 - 1 000	2
Total	96

DO: Densidad Óptica, 405 NM.

Cuadro 2. Niveles de antiGAL en el moco cervical de 96 pacientes femeninas con cuello uterino clínicamente sano, de acuerdo a la edad de comienzo de las primeras relaciones sexuales.

Lectura (DO)	Edad de comienzo de las primeras relaciones sexuales (años)			
	16	16-20	21-25	>25
1 -250	18	35	8	2
251 – 500	7	13	2	0
501 – 750	1	8	0	0
751 - 1000	1	0	1	0
Pacientes	27	56	11	2

DO: Densidad óptica, 405 NM.

Cuadro 3. Niveles de antiGAL en el moco cervical de 96 pacientes femeninas con cuello uterino clínicamente sano, de acuerdo al número de años de vida sexual activa.

Lectura (DO)	Años de vida sexual activa			
	1-6	7-12	13-18	>18
1 – 250	16	24	19	4
251 – 500	4	7	9	2
501 – 750	3	0	2	4
751 - 1000	0	1	1	0
Pacientes	23	32	31	10

DO: Densidad óptica, 405 NM.

Cuadro 4. Niveles de antiGAL en el moco cervical de 96 pacientes femeninas con cuello uterino sano, de acuerdo al número de parejas sexuales.

Lectura (DO)	Número de parejas sexuales				
	1	2	3	4	>4
1 – 250	23	26	13	1	0
251 – 500	4	10	6	2	0
501 – 750	1	2	1	3	2
751 - 1000	0	2	0	0	0
Pacientes	28	40	20	6	2

DO: Densidad óptica, 405 NM.

En la segunda parte del estudio, evaluamos la presencia de VPH en 60 pacientes. En este grupo hubo 33 (55 %) que mostraron la presencia de VPH a través de las técnicas de la PCR e hibridización. Se encontró, que el 45 % de estas 33 pacientes tenían VPH de intermedio/alto riesgo oncogénico, 12 % tenían VPH de bajo riesgo oncogénico y el 43 % restante simultáneamente ambos subgrupos. En el grupo con la infección por el VPH hubo 23 pacientes (70 %) con citología normal y 10 (30 %) con NIC 1. Al estudiar la edad de comienzo de las relaciones sexuales (Cuadro 5) y los años de vida sexual activa (Cuadro 6) en el grupo VPH positivo, observamos que el 90 % de las pacientes tuvo un inicio de la actividad sexual antes de los 20 años y un 82 % tenía más de 7 años de vida sexual activa. En el grupo VPH negativo, 81 % de las pacientes comenzaron su actividad sexual antes de los 20 años y el 74 % tenía más de 7 años de vida sexual activa. A pesar de una tendencia a favor del grupo VPH positivo, esta no tuvo significancia estadística. Al analizar el número de parejas sexuales (Cuadro 7) en el grupo VPH positivo, encontramos que el 81 % de las mujeres tenía 2 o más parejas sexuales; en cambio, solamente el 59 % en el grupo VPH negativo las tenía; esta diferencia fue marginalmente significativa ($P = 0,05$).

Cuadro 5. Infección por el VPH en 60 pacientes femeninas, de acuerdo a la edad de comienzo de las primeras relaciones sexuales

Edad de comienzo de las primeras relaciones sexuales	Pacientes	
	VPH +	VPH - sexuales
<16	13	8
16 – 20	17	14
21 – 25	3	4
>25	0	1
Pacientes	33	27

Cuadro 6. Infección por el VPH en 60 pacientes femeninas, de acuerdo al número de años de vida sexual activa

Número de años de vida sexual activa	Pacientes	
	VPH +	VPH -
1 – 6	6	7
7 – 12	16	9
13 – 18	7	10
>18	4	1
Pacientes	33	27

Cuadro 7. Infección por el VPH en 60 pacientes femeninas, de acuerdo al número de parejas sexuales

Parejas sexuales	Pacientes	
	VPH +	VPH -
1	6	11
2	15	10
3	8	5
4	3	1
>4	1	0
Pacientes	33	27

Cuando analizamos el Cuadro 8, observamos que los niveles más altos de antiGAL correspondieron a las pacientes con la infección por el VPH y NIC 1. La Figura 1 muestra una diferencia significativa en el promedio de los niveles de antiGAL entre el grupo VPH positivo y negativo ($P < 0,0001$); además, cuando dividimos el grupo con la infección por el VPH en un subgrupo con citología normal y otro con NIC 1, encontramos una diferencia significativa en los valores detectados ($P < 0,0001$). No observamos ninguna diferencia cuando comparamos la media de los niveles de antiGAL del grupo VPH negativo con la media del subgrupo VPH positivo con citología normal ($P > 0,01$). También estudiamos los valores de

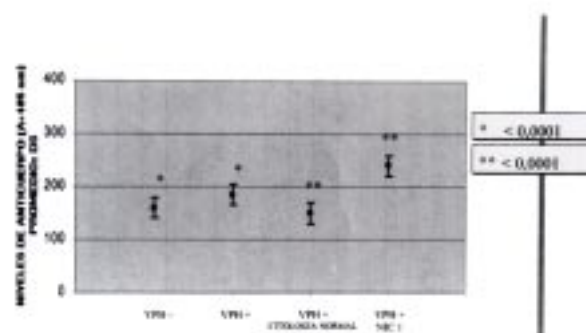
Cuadro 8. Niveles de antiGAL en el moco cervical de 60 pacientes femeninas, de acuerdo a la infección por el VPH.

Grupo (DO)	N	%	Niveles de anticuerpos (Promedio $\pm$ DS)
VPH –	27	45	156 $\pm$ 11
VPH + *	33	55	196 $\pm$ 10
VPH + **	23	38	151 $\pm$ 21
VPH + ** (NIC I)	10	17	243 $\pm$ 18

Nota: n: número de pacientes, %: porcentaje del total de pacientes, DO: densidad óptica, 405 NM; DS: desviación *standard*.

* $P < 0,0001$

** $P < 0,0001$

**Figura 1.** Niveles del anticuerpo contra epitopos (α 1→3) galactosil en el moco cervical de pacientes con la infección por el virus de papiloma humano (VPH) o sin ella. El grupo con VPH fue dividido en un subgrupo con citología normal y con neoplasia intraepitelial cervical (NIC) 1. Un asterisco muestra la significancia estadística entre el grupo VPH + y VPH –, el doble asterisco la significancia estadística entre los subgrupos VPH +.

antiGAL en el grupo infectado por el VPH, de acuerdo a la presencia del subgrupo de VPH de bajo, e intermedio/alto riesgo oncogénico. No encontramos ninguna diferencia entre los diferentes subgrupos de VPH ($P > 0,01$).

DISCUSIÓN

En los últimos años ha habido un gran avance en el conocimiento del papel que juega el Ac antiGAL en patología humana. Este Ac forma parte del mecanismo de inmunidad humoral contra especies de leishmania y tripanosomas⁽⁴⁾; además, ejerce efecto en la depuración de glóbulos rojos senescentes⁽¹¹⁾, en la inactivación de retrovirus C⁽¹²⁾, como Ac con actividad similar a la TSH en tiroiditis auto inmune⁽¹³⁾ y en el rechazo hiperagudo de xenotransplantes⁽¹⁴⁾. Recientemente ha sido reportado que aproximadamente un 40 % de pacientes con displasia severa del cuello uterino presentan niveles séricos elevados de antiGAL⁽⁷⁾, sin embargo, no se tiene claro como influye este Ac natural en la génesis y/o progresión de estas lesiones. Los mecanismos de inmunidad humoral local en la patología cervical son poco conocidos, y existen evidencias de la expresión de epitopes galactosil ($\alpha 1 \rightarrow 3$) galactosa en las células cervicales con cambios coilocíticos⁽⁹⁾. Con estos hallazgos cobra importancia la posibilidad de detectar Ac antiGAL en el moco cervical para de esta manera tratar de evaluar cambios en su concentración, dependiendo se trate de un cuello sano o con otra patología. Pocos investigadores han estudiado la producción de antiGAL a nivel de las secreciones corporales humanas. En un solo estudio se ha evaluado este anticuerpo en los fluidos vaginales, sin embargo, no se especificó el método empleado para la recolección de las muestras⁽¹⁵⁾. Nosotros describimos por primera vez un método que permite la detección del Ac antiGAL en el moco cervical de mujeres con

cuello uterino clínicamente sano tomando en consideración: la edad de la paciente, fecha del ciclo menstrual y la ausencia de actividad sexual en días previos a la toma de la muestra. Inicialmente se intentó tomar la muestra con una pequeña jeringa, sin embargo, resultó más efectivo el uso del hisopo en PBS incubado a 4° C durante 24 horas. Este método sencillo fue realizado bajo las mismas condiciones experimentales y por el mismo investigador, de esta manera se evitó al máximo el error atribuible al muestreo. Observamos con estos resultados iniciales, que es posible detectar Ac antiGAL en el moco cervical bajo las condiciones experimentales descritas; además, hubo una tendencia a valores más elevados de antiGAL en las pacientes mientras más temprano se inició la actividad sexual, mayor número de años de vida sexual activa y mayor número de parejas sexuales. Esto posiblemente se explique por el hecho de que estos factores favorecen un mayor número de agentes bacterianos en el cuello uterino, así como infecciones virales subclínicas (Ej.: VPH) y traumatismos constantes. Todas estas condiciones podrían permitir la expresión de epitopes galactosil ($\alpha 1 \rightarrow 3$) galactosa y de esta manera promover la producción local de antiGAL por parte de los linfocitos B.

La infección por el VPH es la ETS más frecuente en la actualidad y ejerce un papel predominante en la génesis del carcinoma de cuello uterino; sin embargo, los mecanismos de defensa del huésped ante esta infección, no están completamente definidos. Hay estudios que reportan participación tanto de la inmunidad celular como la humoral en el control de la infección⁽¹⁶⁾. En nuestro trabajo encontramos que más de la mitad de las pacientes estudiadas tenían la infección por el VPH, y de este grupo, en el 88 % había VPH de intermedio/alto riesgo oncogénico. Esto nos sugiere que estas pacientes tienen un riesgo elevado de desarrollar carcinoma de cuello uterino por tener esta infección desde una edad muy temprana.

Además, observamos que el factor de riesgo más importante para adquirir la infección fue el número de parejas sexuales, y menos relevantes la edad de comienzo de la actividad sexual y los años de vida sexual activa. El antiGAL se detectó en el moco cervical de las pacientes, siendo los niveles más elevados en el grupo con la infección por el VPH y predominantemente en el subgrupo con NIC 1. Ha sido demostrada la expresión de epítopes galactosil ($\alpha 1 \rightarrow 3$) galactosa en las glicoproteínas de las envolturas de retrovirus animales, el virus de la coriomeningitis linfocítica, el virus de la encefalitis equina del este y el virus de la influenza ⁽¹⁷⁾. Existen evidencias, como en el virus de la influenza, que el epítipo galactosil ($\alpha 1 \rightarrow 3$) galactosa se expresa en el virus si se propaga en células caninas y bovinas, pero no si se propaga en células de pollo, apoyando la asociación entre la actividad $\alpha 1 \rightarrow 3$ GT en la célula huésped y la expresión del epítipo en el virus que se propaga ⁽¹⁸⁾. Los retrovirus animales son sensibles al suero normal humano y esta actividad depende de antiGAL, en cambio el VIH-1 y el HTLV-1 son insensibles ⁽¹⁹⁻²¹⁾. Ha sido demostrado recientemente, que el VIH es capaz de incorporar el epítipo galactosil ($\alpha 1 \rightarrow 3$) galactosa en su envoltura si se propaga a través de células modificadas que presentan actividad $\alpha 1 \rightarrow 3$ GT en el aparato de Golgi ⁽²²⁻²⁴⁾. Todas estas evidencias nos ayudan a interpretar la relación entre antiGAL en el moco cervical y la infección por el VPH.

El VPH infecta inicialmente la capa basal del epitelio cervical, se replica en el estrato espinoso y en la capa granular ocurre el ensamblaje del virus y las proteínas de la cápside ⁽¹⁶⁾. Posiblemente el VPH sea capaz de inducir desrepresión del gen que codifica la actividad $\alpha 1 \rightarrow 3$ GT y de esta manera se puedan comenzar a expresar epítopes galactosil ($\alpha 1 \rightarrow 3$) galactosa en la membrana del epitelio cervical provocando de esta manera la producción de IgG con actividad antiGAL por parte de los linfocitos B

que se encuentran infiltrando el tejido. Otra posibilidad, es que el VPH también sea capaz de adquirir, a través de su multiplicación en células que ya expresan actividad $\alpha 1 \rightarrow 3$ GT, epítopes galactosil ($\alpha 1 \rightarrow 3$) galactosa en su superficie, y de esta manera al liberarse el virus en el estrato córneo, éste sea capaz de desencadenar producción de IgG con actividad antiGAL por parte de los linfocitos B. Ambas hipótesis no son excluyentes sino que se complementan y pueden explicar la presencia de Ac antiGAL en el moco cervical de pacientes con la infección por el VPH con NIC I o sin ella. Aunque en niveles menores, también detectamos antiGAL en cuellos uterinos sanos sin VPH. Esto sugiere la participación de otros factores, posiblemente bacterianos ⁽²⁵⁾, y/o la infiltración de linfocitos B ya programados en la producción de antiGAL ⁽²⁾. No hubo diferencia en los niveles de antiGAL, dependiendo de la capacidad oncogénica del VPH, a pesar del predominio del grupo con intermedio/alto riesgo oncogénico. Esto nos sugiere que posiblemente la expresión del epítipo galactosil ($\alpha 1 \rightarrow 3$) galactosa en la célula transformada, sea el mayor desencadenante de la respuesta humoral, y que la capacidad oncogénica del VPH, sea independiente de la posibilidad de incorporar el epítipo galactosil ($\alpha 1 \rightarrow 3$) galactosa en su estructura.

Finalmente, podemos concluir que niveles elevados de antiGAL se encuentran en pacientes con la infección por el VPH y NIC, lo que sugiere la participación de la inmunidad humoral en las lesiones cervicales. Es necesario definir, si este Ac ejerce efectos citolíticos sobre las células infectadas, y su participación en la regresión y/o progresión de los NIC.

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Rafael Borges por su orientación en el análisis estadístico, al personal del Servicio de Ginecología del Hospital Vargas y del Laboratorio de Bioquímica del Instituto de

Biomedicina, y a todas las pacientes que participaron en el estudio.

FINANCIAMIENTO

Esta investigación fue financiada por el CONICIT proyecto S1-2699 y la Fundación Polar.

REFERENCIAS

- Galili U, Rachmilewitz EA, Peleg A, Flechner I. A unique natural human IgG antibody with anti- α -galactosyl specificity. *J Exp Med* 1984;160:1519-1531.
- Galili U, Anaraki F, Thall A, Hill-Black C, Radic M. One percent of human circulating B lymphocytes are capable of producing the anti-GAL antibody. *Blood* 1993;82:2485-2493.
- Galili U, Shohet SB, Kobrin E, Stults CL, Macher BA. Man, apes, and old world monkeys differ from other mammals in the expression of α -Galactosyl epitopes on nucleated cells. *J Biol Chem* 1988;263:17755-17762.
- Avila JL, Rojas M, Towbin H. Serological activity against galactosyl- α (1-3)galactose in sera from patients with several kinetoplastid infections. *J Clin Microbiol* 1988;26:126-132.
- Avila JL, Rojas M, Rieber M. Antibodies to laminin in american cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 1984;43:402-406.
- Wilder J, Avila JL, Hernández DE, Pérez JR, Rojas R, Moreno L. Antigalactosyl α 1-3galactose (antiGal) and breast cancer. *J Tumor Marker Oncol* 1992;7:25-32.
- Tremont-Lukats IW, Arbona-Haddad EI, Avila JL, Hernández D, Rojas M, Martínez A. Immunoreactivity against Gal (α 1 $\rightarrow$ 2)Gal and Gal(α 1 $\rightarrow$ 3)Gal epitopes in sera from patients with cancer. *J Tumor Marker Oncol* 1995;10:55-63.
- Tremont-Lukats IW, Avila JL, Hernández D, Vásquez J, Teixeira G, Rojas M. Antibody levels against α -galactosyl epitopes in sera of patients with squamous intraepithelial lesions and early invasive cervical carcinoma. *Gynec Oncol* 1997;207:207-212.
- Tremont-Lukats IW, Avila JL, Tapia F, Hernández D, Cáceres-Dittmar G, Rojas M. Abnormal expression of galactosyl(α 1 $\rightarrow$ 3)galactose epitopes in squamous cells of the uterine cervix infected by human papillomavirus. *Pathobiology* 1996;64:239-246.
- Correnti M, Uribe M, Cavazza ME. Detección del virus papiloma humano mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e hibridización molecular en citologías de cuello uterino. En: Rincón Morales F, editor. *Ginecología'96*. Caracas: Artes Gráficas Eneché; 1996.p.127-133.
- Galili U, Flechner I, Knyszynski A, Danon D, Rachmilewitz EA. The natural anti- α -galactosyl IgG on human normal senescent red blood cells. *Br J Haematol* 1986;62:317-324.
- Takeuchi Y, Porter CD, Straham KM, Preece AF, Gustafsson K, Cosset F-L, et al. Sensitization of cells and retroviruses to human serum by (α 1 $\rightarrow$ 3) galactosyl transferase. *Nature* 1996;379:85-88.
- Winand RJ, Anaraki F, Etienne-Decerf J, Galili U. Xenogenic thyroid-stimulating hormone-like activity of the human natural anti-GAL antibody. *J Immunol* 1993;151:3923-3933.
- Dorling A, Lechler RI. Prospects for xenografting. *Curr Opin Immunol* 1994;6:765-769.
- Hamadeh RM, Galili U, Zhou P, Griffiss M. Anti- α -galactosyl immunoglobulin A (IgA), IgG and IgM in human secretions. *Clin Diag Lab Immunol* 1995;2:125-131.
- Alani R, Mûnger K. Human papilloma viruses and associated malignancies. *J Clin Oncol* 1998;16:330-337.
- Rother RP, Galili U. α -Gal epitopes on viral glycoproteins. En: Galili U, Avila JL, editores. α -Gal and anti-Gal. *Subcellular Biochemistry* 1999.p.143-172.
- Galili U, Repik PM, Anaraki F, Mozdzanowska K, Washko G, Gerhard W. Enhancement of antigen presentation of influenza virus hemagglutinin by the natural human anti-Gal antibody. *Vaccine* 1996;256:160-178.

19. Reed DJ, Lin X, Thomas TD, Birks CW, Tang J, Rother RP. Alteration of glycosylation renders HIV sensitive to inactivation by normal human serum. *J Immunol* 1997;159:4356-4361.
20. Bonapour B, Sernatinger J, Levy JA. The AIDS associated retrovirus is not sensitive to lysis or inactivation by human serum. *Virology* 1986;152:268-271.
21. Hoshino H, Tanaka H, Miwa M, Okada H. Human T-cell leukemia virus is not lysed by human serum. *Nature* 1984;310:324-325.
22. Marschang P, Sodroski J, Wurzner R, Dierich MP. Decay-accelerating factor (CD55) protects human immunodeficiency virus type 1 from inactivation by human complement. *Eur J Immunol* 1995;25:285-290.
23. Saifuddin M, Parker CJ, Peeples ME, Gorny MK, Zolla-Pazner S, Ghassemi M, et al. Role of the virion-associated glycosylphosphatidylinositol-linked proteins CD55 and CD59 in complement resistance of cell-derived and primary isolates of HIV-1. *J Exp Med* 1995;182:501-509.
24. Spear GT, Lurain NS, Parker CJ, Ghassemi M, Payne GH, Saifuddin M. Host cell-derived complement control proteins CD56 and CD59 are incorporated into the virions of two unrelated enveloped virus. *J Immunol* 1995;155:4376-4381.
25. Galili U, Mandrell RE, Hamadeh RM, Shohet SB, Griffiss JM. Interaction between human natural anti- α -galactosyl immunoglobulin G and bacteria of the human flora. *Infect Immun* 1988;56:1730-1737.