



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

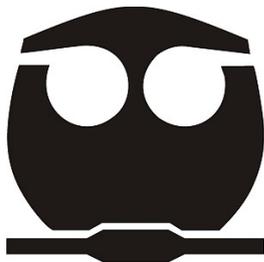
**“INDUCCIÓN DE RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL EN
RATONES UTILIZANDO EL ADYUVANTE PapMV y UN PÉPTIDO
DE LA PROTEÍNA E7 DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO
(VPH)”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A

ARTURO ANTONIO OLGUIN PELAYO



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO:

PRESIDENTE: Prof. Rodolfo Pastelin Palacios
VOCAL: Prof. Constantino III López Macías
SECRETARIO: Prof. Laura Cecilia Bonifaz Alfonso
1er. SUPLENTE: Prof. Gibran Pérez Montecinos
2° SUPLENTE: Prof. Sonia Mayra Pérez Tapia

El presente trabajo fue realizado en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Autoinmunes, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI

Dra. Laura Cecilia Bonifaz Alfonso
Asesor del tema

Q.F.B. Luz María Mora Velandia
Supervisor Técnico

Arturo Antonio Olguin Pelayo
Sustentante

DEDICATORIAS

A mis padres, por haberme dado todas las herramientas necesarias para volar firme y seguro a mi destino. He dado justo en el blanco.

A mis hermanas, por todo el apoyo y risas que hemos y seguiremos compartiendo. Viva la Revolución!!! Aja!!!

A todos mis tíos y primos, por todos los consejos y experiencias que me han dado. Eduardo, esto es para ti.

A todos mis amigos de la facultad por las reuniones geeks para estudiar, pero sobre todo las borracheras que compartimos.

Y por último, a México, en este año del bicentenario, que este trabajo sirva como ejemplo de todo el potencial que tenemos y miremos hacia el futuro aprendiendo de todos los errores cometidos en 200 años de independencia.

“Only a fool repeats the same actions expecting different outcomes every time”

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme todas las bases y herramientas necesarias para mi formación académica y personal; a toda su comunidad de profesores, trabajadores y alumnos.

Agradezco a la Facultad de Química, a todo el personal académico, a los laboratoristas y a todos los que hicieron mi estancia una experiencia inolvidable.

A la Dra. Laura Bonifaz por todas sus enseñanzas y consejos durante la elaboración de este trabajo; por inculcarme un razonamiento crítico y renovar mi interés por la ciencia.

Al Dr. Constantino Lopez y Cristina Gil por su gran apoyo en proporcionarme los ratones y el PapMV para la elaboración de este trabajo, así como sus consejos.

A Gibrán y Luzma por todos sus consejos, ayuda y sobre todo paciencia durante la elaboración de este trabajo.

A David, Gaby, Abraham, Aniela, Rosita, Marce, Alex y Paty todas los consejos, ayuda, grandes pláticas y sobre todo por las risas que compartimos durante mi estancia en el laboratorio.

A Alexis y Claudia por todo la ayuda y comprensión que me dieron para poder realizar este trabajo.

Al Sr. Ricardo y el Sr. Daniel por todo el apoyo que me brindaron en el bioterio, por todos los ratones que me dieron y sobre todo por la buena voluntad de ayudarme en la realización de este trabajo.

A mis sinodales por las correcciones hechas a este trabajo escrito.

ÍNDICE GENERAL

	Páginas
Abreviaturas	1
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES	
– El Virus del Papiloma Humano (VPH) y el cáncer cervicouterino	7
– Respuesta Inmune Antitumoral	14
– Adyuvantes en la Respuesta Inmune Antitumoral	23
– El Virus del Mosaico de la Papaya (PapMV)	26
– Vacunas actuales en contra de la infección por VPH	28
OBJETIVOS	33
HIPÓTESIS	33
MATERIAL Y MÉTODOS	
– Animales	34
– Células, virus y péptidos	34
– Técnica de cultivo y cosecha de células TC-1	34
– Esquema de inmunización	35
– Monitoreo y medición de tumores	36
– Preparación y obtención de células de bazo	37
– Ensayo de citotoxicidad <i>in vivo</i>	37
RESULTADOS	39
DISCUSIÓN	48
CONCLUSIONES	54
PERSPECTIVAS	54
REFERENCIAS	55

Abreviaturas

APC	Célula presentadora de antígeno (Antigen presenting cell)
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
CTL	Linfocito T citotóxico (Cytotoxic T lymphocyte)
DC	Célula dendrítica (Dendritic cell)
E6-AP	Proteína asociada a E6
IFN-γ	Interferón gamma
IL	Interleucina
MCA	Metilcolantreno
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad (Major Histocompatibility Complex)
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
PAMP	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (Pathogen-Associated Molecular Patterns)
PapMV	Virus del Mosaico de la Papaya (Papaya Mosaic Virus)
PRR	Receptores reconocedores de patrones (Pattern-recognition Receptors)
Th	Linfocito T Cooperador (T Helper)
TNF	Factor de necrosis tumoral (Tumor necrosis factor)
VLP	Partícula semejante a un virus (Virus Like Particle)
VPH	Virus del Papiloma Humano
WT	De Tipo Silvestre (Wild Type)

INTRODUCCIÓN

El cáncer es uno de los mayores problemas de salud tanto en México como en todo el mundo y en los últimos años se ha convertido en una de las principales causas de muerte en niños y adultos. De manera general, el cáncer se desarrolla como consecuencia de una proliferación incontrolada y dispersión de células transformadas (Tubiana, 2008).

El crecimiento de tumores malignos depende de varias condiciones, pero principalmente de la capacidad proliferativa de las células tumorales y de su habilidad para invadir otros tejidos (Tubiana, 2008). Existe la propuesta de que el crecimiento y dispersión de los tumores puede ser frenado por el sistema inmune, ya que se ha comprobado que el sistema inmune es capaz de reaccionar frente a muchos tumores e inducir una respuesta inmune (Dunn y cols, 2002; Swann y Smyth, 2007). Por lo tanto, se ha intentado desarrollar estrategias experimentales en las que se pueda inducir una respuesta inmune que pueda discriminar entre las células transformadas y su contraparte sana, de la misma manera que una vacuna en contra de un virus o bacteria induce una respuesta inmune específica que provee protección únicamente en contra del patógeno.

Las causas de la transformación celular son varias, una de las más importantes es la transformación celular causada por virus. Se ha visto que ciertas familias de virus son responsables de inducir tumores en sus huéspedes naturales (zur Hausen, 1991; Carrillo-Infante y cols., 2007). Ejemplos de éstos son el virus de

papiloma humano (VPH), íntimamente relacionado con el desarrollo de casi todos los cánceres cérvico-uterinos (zur Hausen, 1991; Alvarez y Dipaolo, 2007) y el virus de Epstein-Barr, el cuál ha sido asociado al desarrollo del linfoma de Burkitt (Bornkamm, 2009; Cordeiro y cols., 2008).

Cuando se da la infección de una célula que permite la replicación viral, generalmente se desarrolla una infección exitosa, liberación de numerosas partículas virales y la muerte eventual de la célula. En este caso, un evento de transformación que pudiera haber ocurrido pasará inadvertido. Solamente cuando la infección viral se da bajo circunstancias no permisivas, donde el proceso de replicación viral se ve interrumpido, puede tener relevancia un evento de transformación celular (zur Hausen, 1991; Carrillo-Infante y cols., 2007).

Para poder entender el proceso oncogénico, es necesario conocer los mecanismos moleculares de acción de las oncoproteínas virales de estos virus transformantes (Álvarez y Dipaolo, 2007; Carrillo-Infante y cols., 2007). La frecuencia con la que se da la transformación celular es muy baja ya que éste proceso es extremadamente ineficiente, debido a la baja probabilidad de que los genes virales que son esenciales para la transformación se integren intactos al ADN celular y en un estado en el que se dé su transcripción a niveles adecuados (zur Hausen, 1991).

En condiciones normales, para mantener una estabilidad genómica, las células con ADN dañado deben detener el ciclo celular para permitir la reparación de

las mutaciones antes de la replicación. Existen muchos reguladores moleculares de éste paso en el ciclo celular que se han descubierto, sin embargo, una gran parte del mecanismo sigue siendo desconocido. Dentro de los reguladores moleculares más importantes se encuentran p53 y Rb. En general, el factor de transcripción p53 regula la expresión de genes que controlan la división celular y la apoptosis (Sebastian y cols., 2010); Rb actúa como un mediador central de genes que participan en el ciclo celular, principalmente en la transición de la fase G1 a la S (Harrington y cols., 1998). Mediante la unión a estas proteínas celulares reguladoras, es como las proteínas oncogénicas virales logran inducir la transformación celular. Se ha demostrado que la pérdida de la función de la proteína de retinoblastoma (Rb) y p53 está asociada con el desarrollo de tumores. (Álvarez y Dipaolo, 2007; Werness y cols., 1993; Münger y cols., 2001; Dyson y cols., 1989)

Los eventos oncogénicos mediados por las oncoproteínas virales reflejan la capacidad de estos virus de estimular a una célula inactiva a entrar a ciclo celular. Debido a que este tipo de células no se encuentran normalmente en ciclo celular, el suministro de los sustratos necesarios para la replicación tanto del ADN celular como viral es mínimo y por lo tanto, la replicación se ve limitada. En particular, los niveles de desoxirribonucleótidos son regulados estrictamente durante el ciclo celular y solamente durante la fase S del ciclo, sus niveles se incrementan a cantidades considerables (zur Hausen, 1991; Carrillo-Infante y cols., 2007).

La capacidad del virus de estimular a la célula a entrar a la fase S, creando un ambiente ideal para la replicación de ADN, es vital para una reproducción eficiente del virus. En otras palabras, la inducción viral de la fase S es consecuencia de la acción de los oncogenes virales que provocan transformación. Por lo tanto, si el ciclo viral se ve interrumpido, debido a un tipo celular no permisivo o por consecuencia de una mutación del virus que bloquea su crecimiento, la alteración del control de crecimiento celular que estaba destinado a la preparación de la célula para la replicación del ADN viral puede dar paso a la transformación de la célula (zur Hausen, 1991; Carrillo-Infante y cols., 2007).

Cuando se tienen tumores derivados de infecciones virales, las células transformadas comúnmente expresan antígenos que pueden ser reconocidos por linfocitos T citotóxicos (CTLs) para una subsecuente destrucción y eliminación de la célula tumoral. Más adelante se describirá con detalle el mecanismo de inducción de una respuesta inmune antitumoral.

Basados en lo anterior; en el presente trabajo se aprovecharon las características de los tumores generados a causa de infecciones por el Virus del Papiloma Humano (VPH), para intentar inducir una respuesta inmune antitumoral efectiva en ratones libres de gérmenes.

Se inmunizaron ratones con una mezcla de un péptido de la proteína E7 del VPH y, virus del mosaico de la papaya (PapMV). Posteriormente se retó la inmunización mediante la administración de células tumorales que expresan la

proteína E7 del VPH. Finalmente, se buscó la presencia o ausencia de tumores para determinar si existió o no una respuesta inmune anti-tumoral protectora en los ratones.

Se observó protección antitumoral en más del 60% de los ratones tratados, lo cual sugiere que el PapMV puede ser utilizado como adyuvante en la inducción de una respuesta antitumoral.

ANTECEDENTES

El Virus de Papiloma Humano (VPH) y el cáncer cervicouterino

El cáncer cervical es el segundo cáncer más común en mujeres en todo el mundo, con aproximadamente 500,000 nuevos casos diagnosticados cada año y alrededor de 275,000 muertes anualmente (Koutsky, 1997).

En México, una mujer muere cada 12 minutos a causa del cáncer cervical y desde 1990 las estadísticas han mostrado que este número sigue en aumento (Arrossi y cols., 2003). La preponderancia de los datos indica que el virus de papiloma humano (VPH) es el principal agente etiológico para el carcinoma escamoso y el adenocarcinoma del cáncer cervical. Existen más de 100 tipos diferentes de VPH, pero un conjunto de 15 tipos de VPHs son considerados de alto riesgo (VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 54, 56, 58, 59, 61 y 66). Todos éstos están asociados con displasias genitales y, cáncer cervical (Clifford y cols., 2003; Calleja-Macías y cols., 2005). Sin embargo, las dos cepas de VPH más importantes en el mundo son el VPH-16 y el 18, los cuales están asociados con el 70 % de los tumores cervicales (Álvarez y DiPaolo, 2007).

Todos los VPHs son virus de ADN de doble cadena que se replican dentro del núcleo de células epiteliales escamosas. El genoma de VPH (8kb) consiste en una región regulatoria no codificante, una región de control larga, y dos regiones que contienen los genes de expresión temprana que codifican para

las proteínas de replicación viral, de transcripción y de regulación del ciclo celular. También cuenta con una región de genes de expresión tardía que codifican para proteínas de la cápside (Pirisi y cols., 1987).

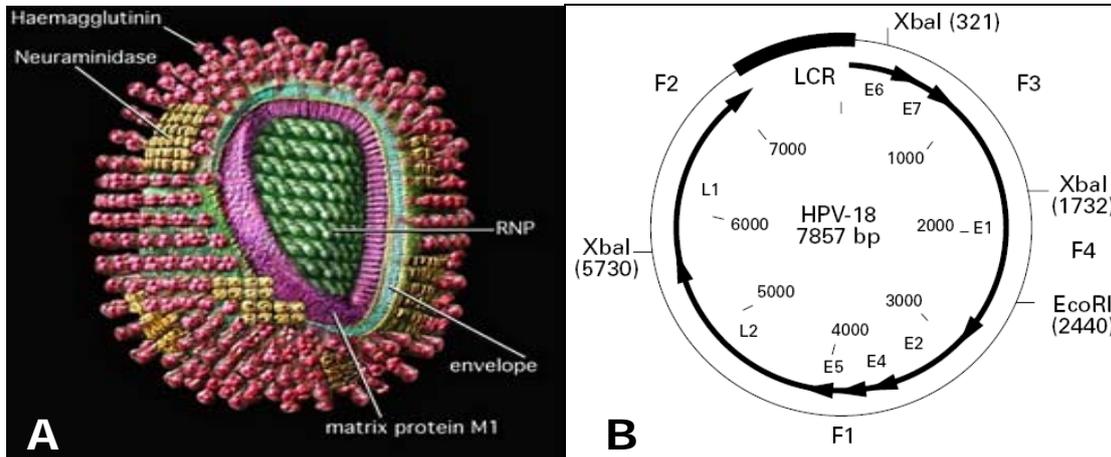


Figura 1. Virus del Papiloma Humano. (A) Estructura del VPH mostrando las proteínas de cápside y de matriz, así como lo cubierta y el genoma. (B) Una representación esquemática de los fragmentos sub-genómicos de VPH creados por restricción de la digestión por endonucleasa utilizando XbaI y EcoRI. En la figura se muestran las regiones de cada gen que integra el genoma del VPH. (Corden y cols., 1999)

Los genes E1 y E2 son responsables de codificar los factores de control de la replicación y transcripción viral (Chiang y cols., 1992; Kuo y cols., 1994). Un factor clave en la carcinogénesis viral es la integración aleatoria del ADN del VPH en el genoma del huésped que en ocasiones ocurre por consecuencia de un alto número de copias de ADN de VPH producto del proceso de infección. Esta integración frecuentemente ocurre en el locus de E1 o E1/E2 por lo tanto interrumpiendo el ciclo de replicación viral (Álvarez y DiPaolo, 2007; Hebner y Laimins, 2006). Como se mencionó en el apartado anterior es de esta manera que se puede presentar un evento de transformación celular. La consecuencia de mayor importancia de la integración del ADN de VPH al genoma del huésped es la expresión constitutiva de los genes de VPH E6 y E7 (Álvarez y

DiPaolo, 2007). Esta producción constante de E6 y E7 es necesaria y suficiente para mantener un fenotipo transformado (Pirisi y cols., 1987; Dürst y cols., 1987).

En los tipos de VPH -16 y 18, ambos genes (E6 y E7), son transcritos a partir de un solo promotor lo cual resulta en la síntesis de un ARN_m policistrónico que contiene los transcritos de E6 y E7 (Broker, 1987). Las proteínas derivadas de estos dos genes neutralizan a las proteínas reguladoras del ciclo celular, con lo cual la proliferación celular nunca se detiene.

Se ha observado que la proteína de E6 es capaz de interactuar con varios reguladores de la transcripción. Los tipos de VPH oncogénicos (16 y 18) utilizan la vía proteolítica dependiente de ubiquitina para degradar a p53, la cuál es una proteína reguladora supresora de tumores. La oncoproteína E6 se une a una proteína de 100 kD, denominada proteína asociada a E6 (E6-AP). El complejo E6-E6-AP interactúa específicamente con p53, lo cual resulta en una rápida degradación de p53 por la vía ubiquitina-dependiente (Werness y cols., 1993; Scheffner y cols., 1993).

La proteína E7 de los VPHs de alto riesgo, interactúa con pRb₁₀₇ y altera la regulación transcripcional mediada por E2F lo cual resulta en una sobreexpresión de genes requeridos en la transición G1/S y la síntesis de ADN. Esto permite que haya replicación viral en queratinocitos diferenciados que en otro caso sería retraída del ciclo celular (zur Hausen, 1996; Wheeler, 2008).

específicos contra E6 o E7. Éste es el principio de la estrategia seguida en este trabajo.

La relación entre cáncer cervicouterino e infección por VPH es muy estrecha. Así, existen evidencias directas de infección por VPH y desarrollo de tumores malignos. El cáncer cervicouterino es el más común, pero también se incluyen muchos cánceres epiteliales, cáncer anal, cáncer vulvar, y cáncer penil, así como cáncer bucal y de laringe (zur Hausen, 1996; Gillison y cols., 2008).

El cáncer cervical ha sido clasificado por décadas como una enfermedad de transmisión sexual, mucho antes de que su patogénesis fuera asociada a una infección por VPH. Muchos estudios sociales revelaban que este cáncer no se presentaba en mujeres vírgenes y era más común entre las prostitutas. En efecto, muchas de las amplias diferencias en la incidencia de cáncer cervical en poblaciones distintas, se deben a las prácticas sexuales de la gente de esa población y al acceso a programas de aplicación del Papanicolaou (Gillison y cols., 2008).

En ejemplos bien estudiados de cánceres atribuidos al VPH, los tumores se desarrollan en epitelios estratificados; sin embargo, el cáncer no se desarrolla sino hasta muchos años después de la infección inicial. La infección por VPH por sí sola es insuficiente para desarrollar cáncer. La mayoría de las infecciones por VPH desaparecen en uno o dos años aún sin tratamiento. Solamente una minoría de pacientes presenta la transformación a carcinoma de células escamosas (zur Hausen, 1991; zur Hausen, 1996).

Una infección persistente es necesaria para la progresión a un cáncer invasivo, y el mantenimiento del fenotipo transformado usualmente depende de la expresión continua de por lo menos alguno de los oncogenes virales. Por otro lado, la mayoría de las infecciones, aún cuando son causadas por los tipos de VPH de alto riesgo, tienen un resultado benigno, debido a que son infecciones limitadas o aún cuando fueron persistentes, no progresaron a cáncer (zur Hausen, 1991; zur Hausen, 1996).

El largo intervalo entre la infección inicial y el desarrollo de cáncer implica que, en adición a una infección persistente por el tipo apropiado de VPH, factores ambientales o del huésped pueden contribuir a la progresión del cáncer. El estado del sistema inmune es un parámetro del huésped muy importante. Las variaciones genéticas del huésped juegan además un papel importante en el desarrollo del cáncer cervical. Estas variaciones pueden incluir polimorfismos genéticos, variación en la expresión de genes, aberraciones cromosomales o cambios en el perfil de microARN (zur Hausen, 1991). Así se ha relacionado tanto una susceptibilidad genética como una función celular afectada del sistema inmune con un riesgo mayor de una infección persistente y cáncer.

Aún cuando la mayoría de los cánceres causados por el VPH dependen de la expresión continua de los oncogenes virales (E6 y E7), se mantiene una posibilidad de que la expresión génica viral no sea obligatoria en todas las etapas del cáncer. Se ha observado que en algunos tumores que contienen

DNA de VPH, la expresión de los oncogenes virales se ha visto suprimida selectivamente (zur Hausen, 1996; Wheeler, 2008).

La mayoría de los cánceres cervicales ocurren en la zona de transformación del cérvix, donde las células columnares del endocérvix forman una conjunción con el epitelio estratificado escamoso del exocérvix. Aproximadamente 85% de los cánceres cervicales son en células escamosas, el porcentaje restante son adenocarcinomas con un pequeño número de tumores de células neuroendocrinas (zur Hausen, 1996; Wheeler, 2008).

Las lesiones que están destinadas a convertirse en carcinomas de células escamosas normalmente sufren una serie de eventos celulares en un periodo de tiempo de varios años. La severidad de la lesión es determinada por el grado en el que el epitelio escamoso es reemplazado por células basales.

Algunos de los eventos celulares necesarios para el desarrollo de cáncer incluyen alteración de algunos genes celulares. Estas alteraciones, que son consecuencia de una expresión de genes virales a largo plazo, especialmente E6 y E7, incluyen una reducción en la expresión de genes supresores de tumores y genes proapoptóticos, o la sobreexpresión de proto-oncogenes y genes antiapoptóticos (zur Hausen, 1991; Wheeler, 2008).

Los cambios específicos son heterogéneos, aunque algunos ocurren con relativa frecuencia. Se ha reportado también el silenciamiento epigénético de varios genes en displasias de alto grado y cáncer. Comúnmente los tumores

presentan varias alteraciones citogenéticas, que implican pérdida o ganancia de la función de varios genes celulares. (Wheeler, 2008).

Respuesta inmune antitumoral

La respuesta inmune en general tiene como principal objetivo el eliminar cualquier agente extraño presente en el cuerpo que represente una amenaza al estado de salud. Comúnmente estos agentes extraños son microorganismos patógenos, pero también en algunas ocasiones se puede tratar de células propias que han sufrido una transformación, y que representan una amenaza seria para el cuerpo. En este caso, el sistema inmune puede montar una respuesta inmune antitumoral.

El mecanismo principal de la inmunidad tumoral es la destrucción de células transformadas por la acción de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (CTLs). Siempre ha existido un gran interés en los mecanismos por los cuales los tumores estimulan respuestas de células T CD8⁺ específicas dirigidas contra antígenos tumorales (Hainaut, 1993; Toes y cols., 1997). La mayoría de los tumores son derivados de transformaciones en células de diversas estirpes y no necesariamente del sistema inmune como las células presentadoras de antígeno profesionales (linfocitos B, MΦ y DC), por lo tanto, no expresan las moléculas co-estimuladoras ni moléculas del MHC de clase II necesarias para iniciar una respuesta inmune celular primaria.

Una posible explicación a esta cuestión sugiere que las células tumorales o sus antígenos son fagocitados por APCs, principalmente células dendríticas (DCs); los antígenos tumorales son procesados en el interior de las DCs y los péptidos derivados de esos antígenos son presentados en moléculas del MHC de clase I para poder ser reconocidos por linfocitos CD8⁺ (Heath y Carbone, 2001; Toes y cols, 1997).

Las DCs son células presentadoras de antígeno profesionales (APCs) pertenecientes a la inmunidad innata que expresan receptores de moléculas co-estimuladoras necesarias para interactuar con los adyuvantes y poder ser activadas. De esta manera, desatan la cascada de señales necesarias para la diferenciación de los linfocitos CD4⁺ a linfocitos T cooperadores (Th). Adicionalmente, las DCs poseen un proceso de presentación denominado “presentación cruzada” en donde presentan péptidos derivados de proteínas exógenas o de origen extra-celular, en moléculas de MHC de clase I para la diferenciación de linfocitos CD8⁺ a linfocitos T citotóxicos (CTLs) antitumorales (Heath y Carbone, 2001, Hainaut, 1993; Toes y cols., 1997). Este proceso de presentación cruzada, ha sido descrito ampliamente y es el mecanismo principal de activación de CTLs antitumorales (Heath y Carbone, 2001).

Un adyuvante por definición, es una sustancia que incrementa una respuesta inmune mediante la activación de células de inmunidad innata (DCs, NKs y macrófagos principalmente) a través de receptores reconocedores de patrones (PRRs = Pattern Recognition Receptors) y favoreciendo la activación de células de inmunidad adaptativa por el antígeno co-administrado (Kindt, 2007).

Una vez que se han generado los CTLs efectores, estos son capaces de reconocer y matar a las células tumorales sin requerir la presencia de moléculas co-estimuladoras.

Para desarrollar estrategias de inmunoterapias en contra de los tumores es necesario conocer características específicas del tumor y de la respuesta antitumoral del huésped. La idea de que el sistema inmune, que protege al huésped de microorganismos patógenos tan efectivamente, podría también reconocer y destruir células tumorales fue por primera vez propuesto hace más de un siglo por Sir Macfarlane Burnet y fue denominado como Inmunovigilancia (Burnet, 1957; Burnet, 1970).

Sin embargo, debido a que el sistema inmune no solo previene, pero también modifica tumores en desarrollo, tal vez el término de inmunovigilancia no sea el más apropiado para describir correctamente el proceso, ya que, en un principio se pensaba que estaba ideado solamente para proteger al huésped y actuar en las primeras etapas de la transformación celular. Es por eso, que se ha propuesto un nuevo término denominado Inmunoedición (Dunn y cols., 2002).

El concepto de inmunoedición de cáncer contempla 3 fases: eliminación, equilibrio y escape. La fase de eliminación abarca el concepto original de inmunovigilancia. Así, cuando el sistema inmune logra eliminar el tumor en desarrollo, esta fase representa todo el proceso de inmunoedición sin progresar a las siguientes fases.

En la fase de eliminación (fig. 3), una vez que los tumores alcanzan cierto tamaño, éstos comienzan a crecer invasivamente y necesitan de un suministro de sangre elevado que surge a consecuencia de la producción de proteínas angiogénicas y estromagénicas. Este crecimiento invasivo produce alteraciones en el tejido circundante lo cual provoca la secreción de señales inflamatorias que reclutan a células del sistema inmune innato (células NK, macrófagos, células dendríticas, células NKT y células T $\gamma\delta$) al sitio (Girardi y cols., 2001). Algunas estructuras de las células transformadas son reconocidas por las células NK, NKT y T $\gamma\delta$, las cuales secretan interferón gamma (IFN- γ) en respuesta al estímulo (Diefenbach y cols., 2001).

En una segunda etapa de la eliminación, el IFN- γ secretado, puede inducir muerte de células transformadas por mecanismos de antiproliferación y apoptosis (Bromberg y cols., 1996; Kumar y cols., 1997). Pero principalmente induce la secreción de varias quimiocinas por parte de las células tumorales y del tejido circundante. Estas quimiocinas, principalmente la proteína inducible por interferón 10 (IP-10), tienen capacidades angiostáticas potentes, y bloquean la formación de nuevos vasos sanguíneos dentro del tumor, lo cual lleva a más muerte de células tumorales (Sgadari y cols., 1996; Qin y Blankenstein, 2000).

Los restos o detritos celulares consecuencia de la muerte de las células tumorales son capturados por células dendríticas y procesados. Estas células dendríticas se dirigen hacia los nódulos linfáticos donde activan a linfocitos T

CD4⁺ cooperadores (Th) que expresan más IFN- γ con lo cual facilitan la activación también de CTLs. En la última etapa de la eliminación, los Th y los CTLs activados viajan hacia el sitio del tumor donde destruyen a las células transformadas remanentes.

La evidencia que soporta esta fase de eliminación es vasta, sin embargo, a continuación se mencionan algunos puntos que soportan esta teoría. Una de las evidencias más sólidas de esto son los estudios histopatológicos en donde se demuestra que varios tumores se encuentran rodeados de infiltrados de células mononucleares compuestos de linfocitos T, células NK y macrófagos (Conti y cols., 2007; Boon y cols., 1994; Whiteside, 1994).

La primera evidencia experimental de que los tumores pueden inducir respuesta inmune protectora vino de estudios realizados en los 50's en donde se inducía un sarcoma en ratones pintando su piel con el carcinógeno metilcolantreno (MCA). Una vez desarrollado el sarcoma, éste era removido quirúrgicamente y trasplantado a otro ratón singénico completamente sano. El tumor crecía en el ratón al que le fue trasplantado, pero en contraste, si el tumor era trasplantado de regreso al huésped original, el tumor no crecía. Además, si se extraían linfocitos CD8⁺ del huésped original y eran transferidos a ratones libres de tumor, se creaba una inmunidad protectora hacia el tumor (Klein, 1968; Melief, 1992).

La siguiente fase de la inmunoección es el equilibrio (fig. 3), en donde el sistema inmune del huésped y cualquier variante de célula tumoral que haya

sobrevivido al proceso de eliminación, entran en equilibrio dinámico. En este proceso, los linfocitos y el IFN- γ ejercen una potente presión selectiva sobre las células tumorales, que es suficiente para contenerlas pero no para eliminarlas. En esta etapa se crea una superficie de células tumorales que son genéticamente inestables y en constante mutación. Durante este periodo de selección Darwineana muchas de las variantes originales del tumor son eliminadas, pero también surgen otras variantes de las células tumorales que poseen diferentes mutaciones que les permiten resistir el ataque inmunológico. Es muy probable que el equilibrio sea la etapa de mayor duración, y puede ocurrir durante varios años (Dunn y cols., 2002). Debido a que es posible que muy pocas células tumorales mantengan el estado de equilibrio, existen pocas evidencias experimentales que lo soportan (Koebel y cols., 2007).

En la fase de escape (fig. 3), las variantes del tumor que adquirieron resistencia a los ataques inmunológicos de detección o eliminación en la fase de equilibrio, comienzan nuevamente a expandirse de manera incontrolada (Dunn y cols., 2002). Esto resulta en la manifestación clínica de la enfermedad maligna que, si no es tratada, concluye con la muerte del huésped.

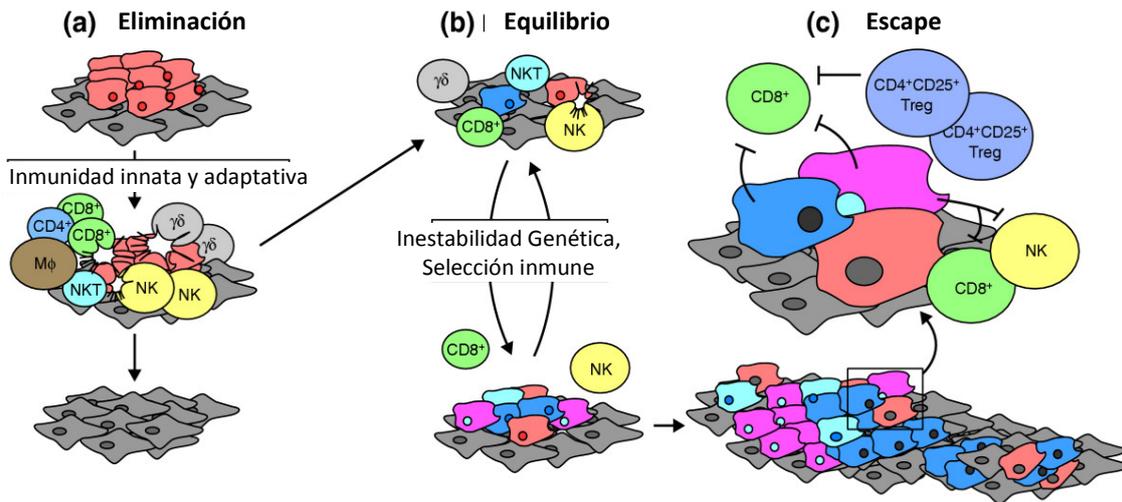


Figura 3. La inmunoedición de cáncer involucra 3 procesos. (a). Eliminación, que corresponde al concepto de inmunovigilancia. (b) Equilibrio, en donde el sistema inmune del huésped y cualquier célula transformada que haya sobrevivido al proceso de eliminación, entran en equilibrio dinámico. En esta fase también se promueve la generación de variantes tumorales con capacidades crecientes de sobrevivir al ataque inmune. (c) Escape, que representa el proceso en donde el tumor inmunológicamente esculpido y seleccionado, se expande de manera incontrolada en el huésped. (Jayshree y cols., 2009)

Existen varios mecanismos que le permiten a los tumores escapar a la acción del sistema inmune, entre ellos se encuentran los siguientes: La mayoría de los tumores expresan una cantidad muy pequeña de antígenos que pueden ser reconocidos como extraños y por tanto estos tumores tienden a no ser inmunogénicos. Sin embargo, los tumores que son inducidos por virus oncogénicos, como lo es el del cáncer cervicouterino causado por el VPH, al expresar proteínas derivadas del virus incrementan la capacidad de las células transformadas de ser reconocidas por el sistema inmune. (zur Hausen, 1996; Wheeler, 2008).

Los mecanismos por los cuáles los tumores escapan a la respuesta antitumoral son variados aunque cada tipo de tumor posee mecanismos específicos y aún entre carcinomas del mismo tipo, los mecanismos de evasión utilizados pueden variar en gran medida. Uno de los mecanismos más comunes consiste en que

la expresión del MHC de clase I, se ve reducida o eliminada, lo que provoca que estas células tumorales no puedan ser reconocidas por los CTLs (Costello y cols., 1999; Garrido y cols., 1997).

Otro mecanismo común consiste en la pérdida de la expresión de los antígenos tumorales que provocaban una respuesta inmune. Esta pérdida de los antígenos es muy común en los tumores de crecimiento rápido, ya que debido a la alta velocidad de mitosis y su inestabilidad genética se pueden crear varias mutaciones o deleciones en los genes que codificaban a los antígenos tumorales (Costello y cols., 1999; Garrido y cols., 1997).

Un mecanismo de evasión común es la síntesis de citocinas inmunosupresoras (ej. IL-10 and TGF- β) por parte de las células tumorales que puedan frenar alguna respuesta antitumoral que se haya desarrollado (Costello y cols., 1999; Garrido y cols., 1997).

En el caso particular del cáncer cervical existe evidencia que sugiere que las células tumorales sufren una serie de cambios que les ayudan a evadir al sistema inmune. Los cambios más frecuentes involucran la sub-expresión de los alelos del HLA de clase I, que son normalmente expresados en queratinocitos, en contraste con los de clase II (Patel y Chiplunkar., 2009; Tindle, 2002).

La sub-expresión de uno o más alelos de clase I ocurre en la mayoría de los tumores. Se ha reportado que esta disminución de la expresión es mucho

mayor en metástasis comparado con el tumor primario. Pacientes que son HLA-B7 positivos y que tienen tumores que sub-expresan este alelo tienen un peor pronóstico, y la pérdida selectiva de los productos del alelo HLA-B7/40 se ve asociada a una metástasis a los nódulos linfáticos.

Existen muchos mecanismos que pueden provocar la sub-expresión de los alelos de clase I. Algunos involucran la delección o mutación del alelo directamente, mientras que otros afectan el sistema de procesamiento del MHC de clase I, principalmente mediante la sub-expresión del transportador Tap I. La región del antígeno de HLA está localizada en el brazo corto del cromosoma 6, que se encuentra dentro de la región 6p21-22 que ha sido reportada como un sitio frecuente de anomalías citogenéticas en cáncer cervical. Por lo tanto, es muy probable que muchos de los rearrreglos citogenéticos en esta región reflejen alteraciones en los alelos de clase I (Tindle, 2002).

En adición a estos cambios en los alelos de clase I, muchos tumores primarios expresan aberrantemente moléculas de HLA de clase II, tal vez en respuesta a citocinas inflamatorias producidas por el infiltrado de linfocitos presente (Tindle, 2002).

Por todo lo anterior, para poder eliminar el tumor del huésped, es necesario crear una respuesta inmune lo suficientemente fuerte para identificar y destruir a las células tumorales, lo suficientemente rápida y efectiva para no ser vencida por la proliferación acelerada de las células transformadas, y lo suficientemente grande para minimizar los efectos de los mecanismos de evasión utilizados por

el tumor. Esta respuesta inmune eficiente puede ser lograda mediante la administración de un adyuvante.

Adyuvantes en la respuesta antitumoral

Los adyuvantes promueven la expresión de moléculas co-estimuladoras y de citocinas en las APCs. Además prolongan la expresión de los complejos péptido – MHC en la superficie de estas células (Heath y Carbone., 2001). Estos cambios en las APCs logran una adecuada interacción entre las APCs y los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en los ganglios linfáticos que es donde se inicia una respuesta inmune.

Idealmente, un adyuvante debería disparar ambos brazos del sistema inmune, la respuesta humoral y la celular (Th y CTLs). Sin embargo en el caso de caso de cáncer quizá la activación de la respuesta celular sea de vital importancia. En las distintas vacunas en donde se pretende evitar la infección, la inducción de respuestas inmunes humorales ha llevado al desarrollo de adyuvantes con la habilidad de aumentar las respuestas mediadas por anticuerpos. El reto actual en vacunas es la inducción de respuesta celular de larga duración que podría ser requerida para neutralizar los mecanismos de evasión de patógenos y el crecimiento de células tumorales (Leclerc y cols., 2007).

En un principio, se había intentado aumentar la respuesta inmune antitumoral basándose en el uso de estimulación inmune no específica. Recientemente, se

ha introducido el uso de vacunas compuestas por células tumorales no viables o antígenos tumorales combinados con distintos tipos de adyuvantes, con el fin de aumentar la respuesta inmune específica en contra del tumor que se está desarrollando. La identificación de péptidos que son reconocidos por CTLs tumor-específicos y la clonación de genes que codifican a antígenos tumorales reconocidos también por CTLs ha proporcionado varios candidatos para vacunas antitumorales (Lollini y cols., 2005; Wang, 1999; Wang, 1997).

Existen principalmente dos distintos acercamientos para incrementar la respuesta inmune en contra de los tumores. Uno, es mediante la utilización de adyuvantes sintéticos y el otro es mediante el uso de citocinas que aumentan la activación de células T tumor-específicas, particularmente CTLs (Lollini y cols., 2005; Wang, 1999).

Está demostrado que por sí solas las células tumorales no son inmunogénicas pero pueden ser modificadas para lograr la inducción de CTLs, esto enfatiza la necesidad de adyuvantes capaces de lograr una respuesta anti-tumoral efectiva. Utilizando animales, en donde se administraron células tumorales transfectadas con genes que codifican para CD86, se demostró la presencia de CTLs específicos capaces de lisar células tumorales no modificadas, lo cual creó una inmunidad antitumoral protectora. Se ha demostrado la eficacia de la expresión de moléculas co-estimuladoras de la familia B7 (CD80 y CD86) en las células que interaccionan con los linfocitos T para aumentar la respuesta inmune antitumoral. Estos experimentos mostraron los mismos resultados *in vitro* (Komata y cols., 1997; Wang y cols., 1996).

Sin embargo, existe una gran desventaja, la cual es la posible inducción de autoinmunidad. Tanto las APCs como las células tumorales se encuentran constantemente presentando péptidos en MHC de clase I, estos péptidos son derivados de proteínas tumorales o de proteínas normales que pueden estar presentes también en células no transformadas. Normalmente no se dispara una respuesta inmune en contra de estos péptidos, debido a la falta de moléculas co-estimuladoras que activen a los linfocitos CD8⁺ inmaduros, pero si las células tumorales o las APCs expresan B7, estos serían activados y se convertirían en CTLs específicos en contra de todos los péptidos propios presentados por MHC de clase I.

Algunas citocinas han sido utilizadas para el tratamiento de tumores ya establecidos, y todos los pacientes han presentado eventos adversos. Se ha utilizado interleucina – 2 (IL-2) en pruebas clínicas en pacientes con melanoma, cáncer renal y cáncer de colon y se observó síndrome de choque séptico y edema pulmonar en algunos de los pacientes. De igual manera, se ha utilizado también factor de necrosis tumoral (TNF), IL-12 e IL-6 en otros tipos de cáncer y se ha observado, síndrome de choque séptico, función hepática anormal, fiebre, hipotensión y toxicidad al sistema nervioso central (Kobayashi y cols., 2008; Gollob y cols., 2001).

Existen muchos otros casos en donde se utilizan citocinas para el tratamiento o prevención de tumores, sin embargo, todas ellas presentan la misma desventaja de crear una respuesta exagerada que puede terminar en

autoinmunidad en muchos casos o en efectos adversos como los mencionados anteriormente. El problema de usar citocinas recae en el hecho de que además de activar y potenciar la respuesta inmune, tienen efectos en otro tipo de células, los cuáles pueden no ser benignos en algunos casos.

Como se mencionó, el otro acercamiento ha sido a través de adyuvantes derivados de virus y bacterias. Y en este rubro, se ha visto mayor efectividad y reducción de efectos secundarios. A continuación se presenta la descripción de un adyuvante que posee características ejemplares que cumplen con todo lo descrito anteriormente y que presenta grandes ventajas comparado con los otros adyuvantes arriba discutidos. Este adyuvante es un ejemplo de este tipo de acercamiento al tratamiento y prevención de tumores.

El Virus del Mosaico de la Papaya (PapMV)

En años recientes, intentos por usar vacunas para tratar tumores han sido usualmente decepcionantes. Las vacunas basadas en antígenos tumorales son, en principio, el acercamiento ideal para la inmunoterapia mediada por células T. Sin embargo, este tipo de vacunas son difíciles de desarrollar ya que no es evidente que tan compartidos son los epítomos relevantes de los antígenos tumorales, además como se mencionó estos antígenos no son inmunogénicos y por lo tanto se requiere del uso de adyuvantes. En adición, los péptidos de los antígenos tumorales solamente son presentados por alelos particulares del MHC (Wang, 1999; Wang, 1997).

Recientemente el uso de vacunas contra tumores se ha utilizado únicamente cuando la carga tumoral es baja, después de una cirugía o de una quimioterapia. La mayoría de las vacunas desarrolladas han utilizado el tumor de pacientes individuales que ha sido removido quirúrgicamente como fuente de antígenos. Estas vacunas son preparadas mediante la mezcla de células tumorales irradiadas con adyuvantes bacterianos como el Bacilo de Calmette-Guérin (BCG) o *Corynebacterium parvum*, los cuales aumentan la inmunogenicidad. Sin embargo, este tipo de vacunas ha tenido resultados variables.

El virus del mosaico de la papaya (PapMV) es un miembro de la familia de los potexovirus, que posee una estructura flexible con forma de varilla compuesta de 1,400 subunidades de proteína de cápside viral envolviendo a una cadena de RNA positiva. Se ha logrado crear una partícula parecida al virus (VLP) de PapMV, mediante la sobreexpresión y auto-ensamblaje en *Escherichia coli* (Tremblay y cols., 2006). Esta VLP es muy similar a la estructura del virus silvestre (WT) y puede acarrear epítomos distintos, como pueden ser péptidos de interés.

El PapMV es reconocido por el sistema inmune como un patrón molecular asociado a patógenos (PAMP) y como un antígeno en ratones (Pamptígeno). Una sola inmunización de PapMV sin la adición de un adyuvante induce eficientemente respuestas celulares y de anticuerpos específicos de larga duración (Acosta y cols., 2007)

El PapMV además de acarrear péptidos de interés en su cubierta proteica, posee características de adyuvante. Se ha demostrado que el PapMV por sí solo, es capaz de inducir respuestas inmunes mediadas por CTLs, memoria inmune y respuestas equitativamente balanceadas de Th1 y Th2 en la ausencia de otro adyuvante (Lacasse y cols., 2008).

Lo anterior fue demostrado por *Lacasse et al* en 2008, en donde se inmunizaron vía i.v. ratones de la cepa C57BL/6 con PapMV y con PapMV-péptido sintético de p33 (correspondiente a un epítipo H-2b-restringido para CTL de la superficie de una glicoproteína del Virus de Coriomeningitis Linfocítica). Pasado un tiempo, se aislaron las células dendríticas de bazo de ambos grupos y se midió la expresión de moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80 y CD86) en las células extraídas. Se encontró que tanto los ratones administrados con el PapMV solamente y los administrados con PapMV-péptido sintético de p33, indujeron similarmente la expresión de CD40, CD80 y CD86, lo que sugiere que la presencia de un péptido no interviene en la activación de las células dendríticas (Lacasse y cols., 2008).

Se ha demostrado también que el PapMV favorece la presentación cruzada de los péptidos insertados. El procesamiento es proteosoma independiente y las células presentadoras de antígeno incubadas con el PapMV inducen eficientemente la expansión de células T antígeno-específicas (Leclerc y cols., 2007).

Con lo mencionado anteriormente, el PapMV representa una excelente elección para el desarrollo de nuevas vacunas ya que se pueden insertar varios péptidos en la cubierta proteica y poder así vacunar en contra de varios blancos de una sola vez. Y con las características de adyuvante demostradas, podemos asegurar que se inducirá una respuesta inmune en contra de los péptidos que nos interese.

En el presente trabajo se propone la utilización de este nuevo adyuvante combinado con un péptido de la proteína E7 del VPH presente en las células tumorales del cáncer cérvico-uterino. Nuestros resultados hasta el momento han mostrado que la utilización de esta vacuna induce protección en un modelo murino.

Vacunas actuales en contra de la infección por VPH

Actualmente existen varias vacunas disponibles comercialmente que previenen la infección por VPH. En este apartado se describirán las vacunas actuales y se compararán las ventajas y desventajas que presenta cada una frente a la propuesta de vacuna que en este trabajo se presenta.

Algunos tipos de papilomavirus infectan a especies de animales, y estos mismos animales fueron utilizados como modelo para desarrollar las vacunas profilácticas actualmente disponibles (Ault, 2003). Uno de los modelos utilizados fue el de conejo cola de algodón. El producto del gen L1, la proteína de cápside del VPH, fue el candidato elegido para el desarrollo de la vacuna.

Los primeros estudios revelaron que tan solo unos cuantos miligramos de la proteína de cápside protegían a los conejos de la infección por VPH (Ault, 2008).

El siguiente paso fue el ensamblaje de la proteína de cápside a una VLP. La VLP utilizada se asemeja al virion en su estructura tridimensional, lo cual resulta importante para la generación de respuesta inmune por parte del huésped.

Los primeros estudios clínicos de vacunas basadas en VLPs de VPH utilizaban formulaciones monovalentes experimentales. Estos estudios mostraban que las vacunas de VLPs eran altamente inmunogénicas y aceptadas por el cuerpo (Ault, 2008).

El primer estudio de eficacia fue una vacuna monovalente en contra de VPH 16, y este estudio demostró 100% de eficacia en contra de todos los grados de neoplasia intraepitelial cervical (NIC). Estudios subsecuentes de eficacia involucraron el uso de formulaciones multivalentes (Ault, 2008).

Existen dos compañías que elaboran dos versiones de la vacuna contra VPH. Una versión es una vacuna cuadrivalente que contiene VLPs de VPH 6, 11, 16 y 18. Esta versión es elaborada por Merck & Co. y su nombre comercial es Gardasil. Esta versión de la vacuna fue aprobada por la FDA en junio de 2006 (Ault, 2008).

La segunda versión es una vacuna bivalente, y es elaborada por Glaxo Smith Kline. Esta versión contiene VLPs de VPH 16 y 18. Es conocida comercialmente como Cervarix. Esta vacuna bivalente es ampliamente disponible en muchos países (Ault, 2008).

En 2007, muchas publicaciones reportaron la eficacia de estas vacunas multivalentes. Se realizaron pruebas para ambas vacunas. En un estudio, se encontró que la vacuna cuadrivalente tenía un 98% de eficacia en la prevención de NIC y 100% de eficacia en contra de verrugas genitales (Garland y cols., 2007). Estas pruebas también mostraron que la vacuna cuadrivalente protegía en contra de displasia vulvar y vaginal, así como de adenocarcinoma *in situ* del cérvix. El estudio de la vacuna bivalente reveló que esta tenía un 90% de eficacia en la prevención de NIC.

Un grupo de investigadores que realizó un meta análisis de las nueve pruebas clínicas publicadas de las vacunas en contra de VPH concluyeron que la vacunación profiláctica en contra de VPH es altamente efectiva en la prevención de la infección por los tipos de VPH específicos contenidos en la vacuna y también en la prevención de enfermedad cervical precancerosa (Rambout y cols., 2007).

Es claro que estas vacunas presentan grandes ventajas en cuanto a la prevención de la infección por VPH, sin embargo, debido a la estrecha relación que existe entre la infección de VPH y el desarrollo de cáncer cérvico-uterino, los laboratorios que elaboran estas vacunas, las anuncian y venden como

vacunas en contra del cáncer cérvico-uterino, lo cual en cierta manera no es correcto ya que, como se mencionó en apartados anteriores, la mayoría de las infecciones, aún cuando son causadas por los tipos de VPH de alto riesgo, tienen un resultado benigno.

Sin embargo, esta vacuna tiene un límite de edad de aplicación de 45 años, y no garantiza la misma efectividad en mujeres que han tenido un contacto previo con el virus o que se encuentran infectadas con VPH (Ault, 2008).

OBJETIVOS

- Objetivo general
 - Inducir una respuesta inmune antitumoral en ratones mediante la administración de una mezcla de péptido de la proteína E7 del VPH y el adyuvante PapMV.

- Objetivos particulares
 - Comparar la eficiencia del PapMV como adyuvante frente a un adyuvante conocido como lo es el PolilC- α CD40.
 - Comprobar la existencia de linfocitos T citotóxicos en los ratones que presenten una respuesta antitumoral.

HIPÓTESIS

La administración de PapMV y pE7 en ratones resultará en una respuesta antitumoral que evitará el crecimiento del tumor.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales.

Ratones hembras de 6 a 8 semanas de edad, SPF (Libres de patógenos específicos), de la cepa C57BL/6 fueron comprados a **Harlan Mexico**, S.A. de C.V.

Células, virus y péptidos.

Se utilizaron células de la línea TC-1 (ATCC No. CRL-2785). Esta línea es derivada de células epiteliales de pulmón de ratones C57BL/6. Estas células fueron inmortalizadas con el vector anfotrófico retroviral LXS_N16E6E7 y transformadas subsecuentemente con el plásmido pVEJB que expresa el oncogén humano activado c-Ha-ras. Estas células son positivas para la expresión de la proteína E7 de VPH-16. Estas células son utilizadas para probar la eficacia de varias vacunas específicas a E6/E7 y estrategias de inmunoterapias. El PapMV fue obtenido del Dr. Denis Leclerc del Centro de Investigación en Infectología, Pabellón Central Hospitalario de la Universidad Laval (CHUL) en Quebec, Canadá. El péptido proveniente de la proteína E7 del VPH, fue sintetizado en la Universidad Rockefeller de Nueva York y posee la siguiente secuencia: RAHYNIVTF.

Técnica de cultivo y cosecha de células TC-1.

Las células TC-1 son almacenadas en un tanque de nitrógeno líquido, guardadas en tubos con solución crioprotectora que consiste en DMSO al 10% en suero fetal bovino (SFB). Para cultivar estas células, se descongelaron y

fueron colocadas en una caja de cultivo con medio RPMI suplementado e incubadas a 37°C. Al día siguiente el medio fue renovado para eliminar restos de solución crioprotectora. Las células fueron incubadas por 3 días monitoreando su crecimiento en el microscopio cada día. Para cosechar las células se quitó el medio RPMI y se colocaron de 3 a 5 mL de EDTA 10 mM. En seguida se incubaron las células por 5 a 7 minutos con el fin de despegarlas de la caja. Se eliminó el EDTA mediante 3 lavados con RPMI y centrifugaciones. Terminados los lavados se realiza una última centrifugación por 8 minutos a 1500 rpm. El botón celular fue resuspendido en RPMI y se contaron las células cosechadas utilizando la técnica de Neubauer.

Esquema de inmunización.

Todos los ratones fueron inmunizados vía subcutánea, aplicando la inyección en el cojinete plantar de cada uno de los miembros superiores e inferiores. El volumen de administración total fue de 100 µL, el cual fue distribuido en los 4 miembros del ratón. Para el grupo control, los ratones fueron administrados con PBS. Para los siguientes grupos se tomaron en cuenta las siguientes dosis disueltas en PBS:

Estímulo	Dosis
PapMV	10 µg/ratón
PolilC	25 µg/ratón
αCD40	50 µg/ratón
pE7	30 µg/ratón
PBS	c.b.p 100 µL

Los grupos experimentales fueron los siguientes:

Grupo	Estímulo	No. de Ratones
1 (Control)	PBS	7
2	PapMV	8
3	PapMV + pE7	12
4	PolilC + α CD40	7
5	PolilC + α CD40 + pE7	9
6	pE7	8

Quince días después de la primera inmunización, se administró un refuerzo de pE7 vía i.p. utilizando la misma dosis de la primera inmunización. Este refuerzo solamente fue aplicado a los grupos que recibieron pE7 en la primera inmunización. Siete días posteriores a la aplicación del refuerzo, se administraron vía subcutánea en el costado superior a la extremidad inferior izquierda, 25 000 células tumorales TC-1 a cada ratón con el fin de retar la inmunización. A los diez días del desafío se evalúa el crecimiento tumoral en cada grupo, realizando un monitoreo por 31 días.

Monitoreo y medición de tumores.

Después del reto con células TC-1, se realizó un monitoreo de todos los grupos, examinando la presencia de tumores. En caso de encontrarlos, se siguió el desarrollo y crecimiento del tumor mediante la medición del área tumoral en los casos positivos.

El proceso de búsqueda de tumores consistió en una palpación previa del área de administración de células TC-1. En el caso de encontrar alguna

protuberancia, se procedía a la medición del área tumoral con un vernier. El monitoreo se realizó cada tercer día a partir de la administración de las células TC-1 y duró 31 días.

Preparación y obtención de células de bazo.

Se sacrificaron ratones no tratados, por dislocación cervical y se les extrajo el bazo. El bazo se perfundió con HBSS (Hank's Buffered Salt Solution) sin Ca^{2+} , Mg^{2+} y colagenasa 400 unidades/mL y se disgregó en la misma solución. Una vez disgregado se incubó a 37°C por 30 minutos. En los últimos minutos de la incubación se agregó EDTA 0.5 M. Se eliminaron los eritrocitos contaminantes mediante lisis usando una solución amortiguadora ACK (NH_4ClO , KHCO_3 , Na_2EDTA), 1 mL por 1 minuto, parando la reacción con exceso de PBS con Suero fetal bovino al 2%. Posteriormente, la suspensión celular se filtró para eliminar impurezas, y se pasó a tubos falcon de 25 mL para obtener el paquete celular por centrifugación (1500 rpm por 8 min).

Ensayo de citotoxicidad *in vivo*.

Las células de bazo obtenidas fueron contadas y se separaron en partes iguales. Una parte fue marcada por incubación de 15 minutos a 37°C con carboxifluoresceína de alta intensidad 5 μM ($\text{CFSE}^{\text{high}}$), y la otra mitad con carboxifluoresceína de baja intensidad 0.5 μM (CFSE^{low}). Las células marcadas con $\text{CFSE}^{\text{high}}$, fueron cargadas con el péptido pE7 a 1 $\mu\text{g/mL}$ incubadas por 20 minutos a 37°C y las células marcadas con CFSE^{low} no se les adicionó nada y sirvieron como un control interno. Ese mismo día fueron administrados vía i.v., a los ratones que no desarrollaron tumor durante el experimento principal, con

una mezcla de 2.5×10^6 células marcadas con CFSE^{high} - pE7 y 2.5×10^6 células marcadas con CFSE^{low} sin péptido. También fue administrado un grupo control (compuesto de ratones que desarrollaron tumor pero que sobrevivieron hasta el momento de este ensayo) con la misma mezcla de células. Doce horas después de la administración de las células, los ratones fueron sacrificados y se les extrajo las células de bazo. Las células extraídas fueron analizadas en el citómetro de flujo para evaluar la cantidad de células de CFSE^{high} y CFSE^{low} remanentes.

RESULTADOS

Se realizó un primer experimento para evaluar la efectividad de varios adyuvantes y en base a los resultados de este experimento, se escogió al PapMV como el adyuvante a utilizar y se buscó reproducibilidad de los resultados encontrados. En este primer experimento se evaluó una porina proveniente de *Salmonella typhi* y el PapMV, comparados con un control positivo de Polil:C + α CD40.

En el primer experimento se encontró que la porina no fue capaz de inducir una respuesta inmune antitumoral. Como se puede observar en la gráfica, todos los ratones inmunizados con la porina + pE7 desarrollaron tumor al día 17 (fig. 4).

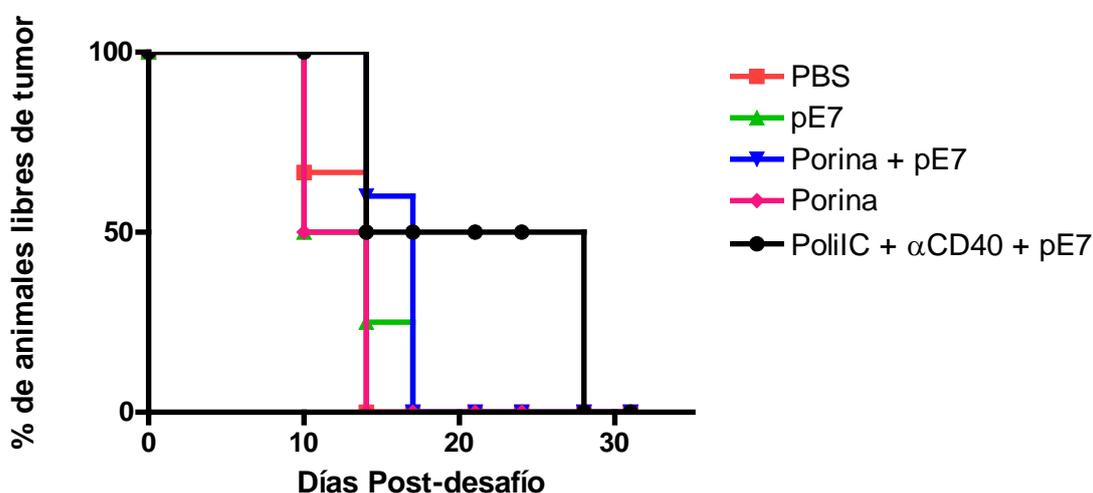


Figura 4. La porina administrada con el pE7 no indujo una protección antitumoral de larga duración en los ratones inmunizados. En el gráfico se muestra el porcentaje de animales libres de tumor de cada grupo después del desafío con células tumorales, durante 31 días de monitoreo. El control positivo de PolilC + α CD40 + pE7 tampoco fue capaz de inducir una protección antitumoral que durase los 31 días de monitoreo.

En comparación, el PapMV sí fue capaz de inducir una protección antitumoral durante los 31 días de monitoreo en el 60 % de los ratones (fig. 5), lo que nos sugiere que el PapMV indujo una respuesta inmune mediada por CTLs que eliminaron a las células tumorales TC-1 y fueron responsables de la protección observada.

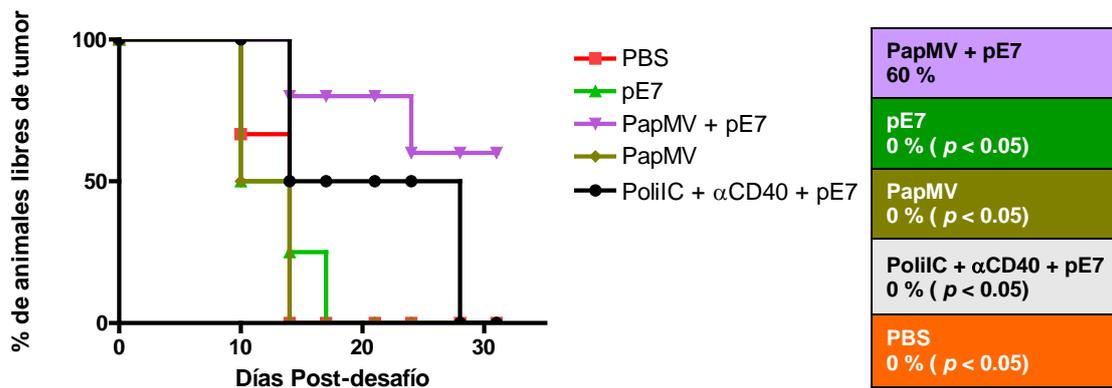


Figura 5. El PapMV administrado junto con el pE7 fue capaz de inducir una protección antitumoral en los ratones inmunizados. En el gráfico se comparan los porcentajes de animales libres de tumor de cada grupo y se puede observar claramente que el PapMV en combinación con el pE7 fue superior a los demás grupos. Se realizó la prueba estadística de Wilcoxon para cada grupo comparándolo contra el grupo de PapMV + pE7 y se encontró una diferencia significativa en todos los grupos.

Adicionalmente, el grupo inmunizado con porina + pE7 tuvo un área tumoral promedio mucho mayor a la desarrollada por el 40% de los ratones inmunizados con PapMV + pE7 que llegaron a desarrollar tumor (fig. 6). Este fenómeno será explicado en la discusión de los resultados con más detalle. Se observó una diferencia significativa entre el área tumoral de los ratones inmunizados con PapMV + pE7 con respecto al grupo control negativo de PBS; sin embargo, se comparó el grupo control positivo inmunizado con PolilC+

α CD40 + pE7 con el grupo de PapMv + pE7 y no se encontró diferencia significativa con respecto al área tumoral desarrollada.(fig. 7).

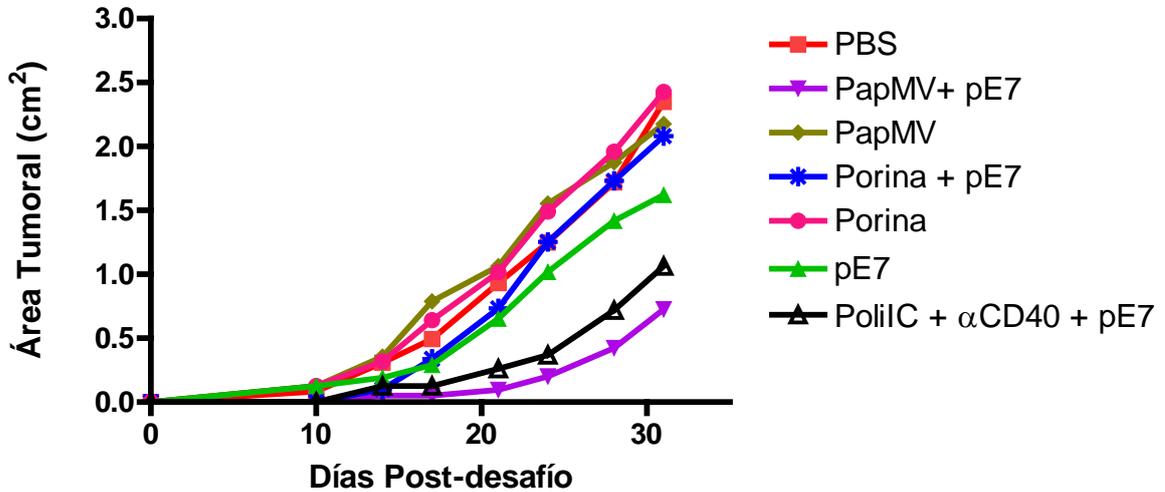


Figura 6. El área tumoral de los ratones inmunizados con PapMV + pE7 que llegaron a desarrollar tumor fue menor al área tumoral de los demás grupos. En el gráfico se muestra el desarrollo del tumor de cada grupo a lo largo de los 31 días de monitoreo posteriores al desafío con células TC-1.

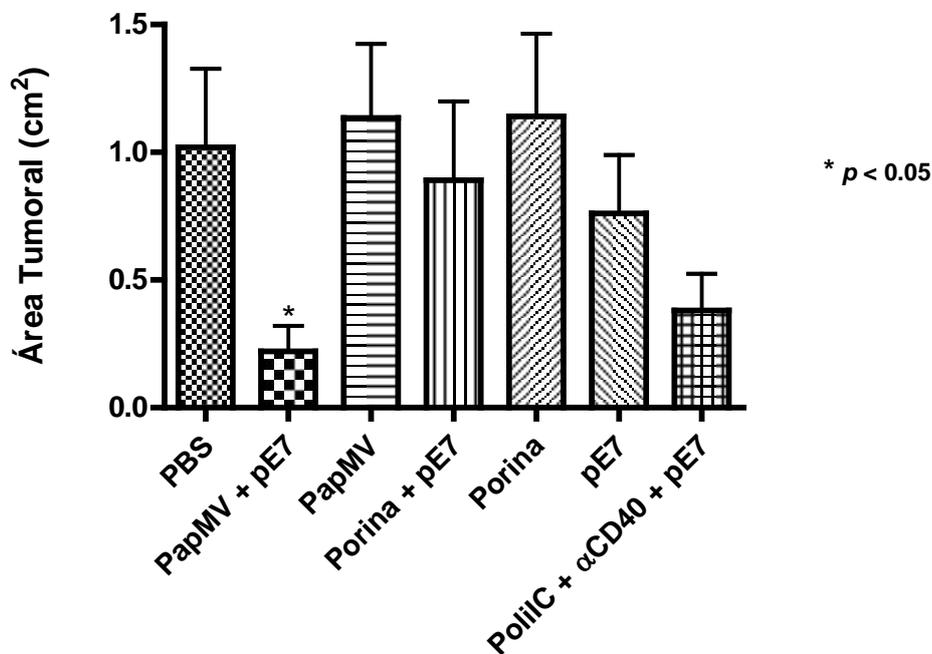


Figura 7. El grupo inmunizado con PapMV + pE7 mostró una diferencia significativa con respecto al control negativo de PBS. Sin embargo, no existió una diferencia significativa del área tumoral entre el control positivo inmunizado con PolilC + α CD40 + pE7 y el grupo de PapMV + pE7.

Los resultados obtenidos en el primer experimento comparativo entre PapMV y la porina de *S. typhi* nos encaminaron a tomar un rumbo de acción dirigido únicamente a la obtención de una reproducibilidad adecuada de los resultados obtenidos con el PapMV.

En experimentos adicionales utilizando solamente el PapMV como adyuvante, los resultados mostraron de nueva cuenta que el PapMV induce una respuesta protectora antitumoral en un porcentaje similar al observado en el primer experimento (fig. 8).

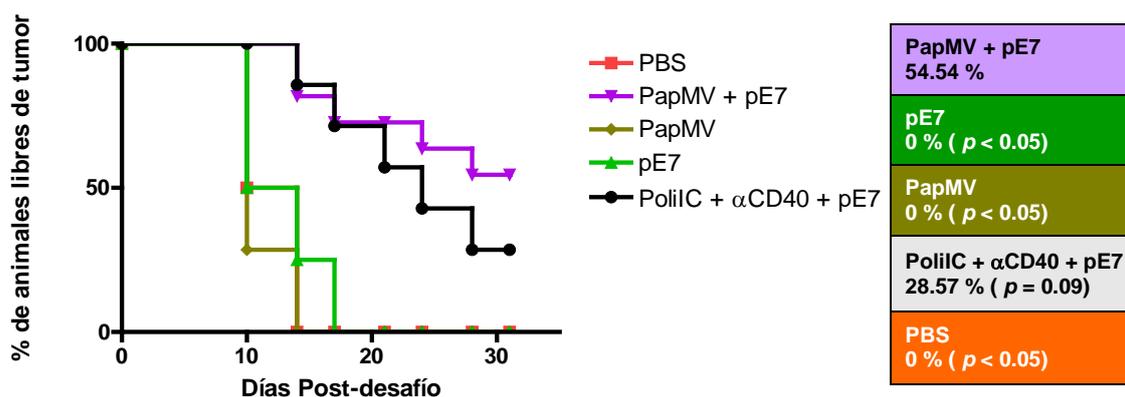


Figura 8. Se obtuvo un mayor porcentaje de ratones libres de tumor en el grupo inmunizado con PapMV + pE7 comparado con los demás grupos. Después de realizar la prueba estadística de Wilcoxon, se encontraron diferencias significativas entre el grupo de PapMV + pE7 y los demás grupos excepto con el control positivo de PolilC + αCD40 + pE7.

Se observó nuevamente que el área tumoral de los ratones inmunizados con PapMV-pE7 que llegaron a desarrollar tumor, es significativamente menor a los demás grupos, lo cual sugiere que se logró inducir una respuesta inmune antitumoral, sin embargo, no fue lo suficientemente efectiva para eliminar completamente las células tumorales presentes en el ratón (fig. 9).

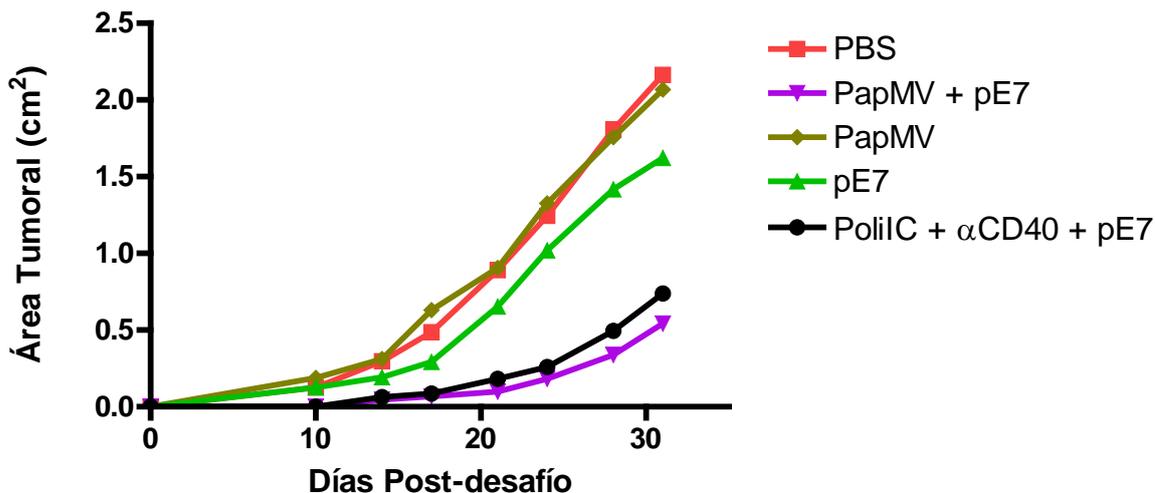


Figura 9. El área tumoral desarrollada por el 45.46 % de los ratones inmunizados con PapMV +pE7 fue menor en comparación al resto de los grupos. En el gráfico se muestra el desarrollo del tumor de cada grupo a lo largo de los 31 días de monitoreo posteriores al desafío con células TC-1.

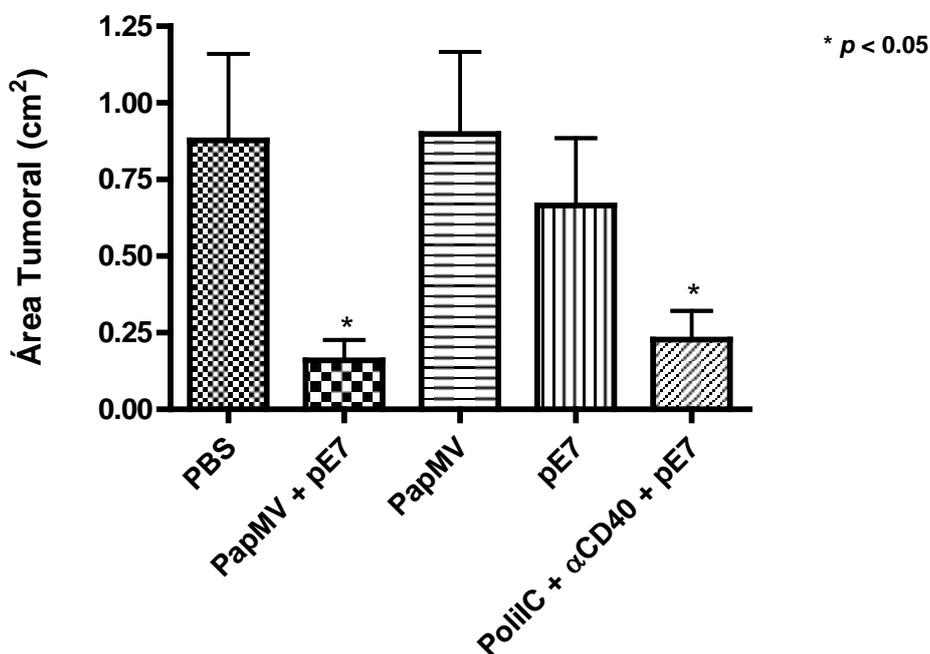


Figura 10. El grupo inmunizado con PapMV + pE7 y el control positivo demostraron una diferencia significativa con respecto al control negativo de PBS. No existió diferencia significativa entre los grupos de PapMV + pE7 y el control positivo de PolIIC + αCD40 + pE7.

En resumen, los resultados obtenidos a lo largo de todo el trabajo son los siguientes:

La inmunización con PapMV-pE7 induce una respuesta protectora antitumoral. Se observó al finalizar el experimento que el 54.54 % de los ratones inmunizados con PapMV-pE7 no desarrollaron tumor (fig. 8). Estos resultados sugieren que la inmunización con PapMV-pE7 genera CTLs tumor-específicos, los cuales debieron eliminar en su totalidad la población de células TC-1 administradas al ratón para así, poder evitar el crecimiento del tumor. Con estos resultados, se procedió a evaluar la presencia de CTLs específicos en los ratones que exhibieron protección antitumoral mediante un ensayo de citotoxicidad *in vivo*.

Los resultados de este ensayo no muestran la presencia de CTLs específicos en los ratones protegidos (fig. 11). En los ratones inmunizados con PapMV-pE7 que mostraron protección (fig. 11 d y e), se alcanza a observar una ligera disminución de las células teñidas con CFSE^{high}, sin embargo, no se observaron diferencias significativas, por lo que no podemos confirmar la presencia de linfocitos citotóxicos específicos contra pE7 con estos resultados obtenidos.

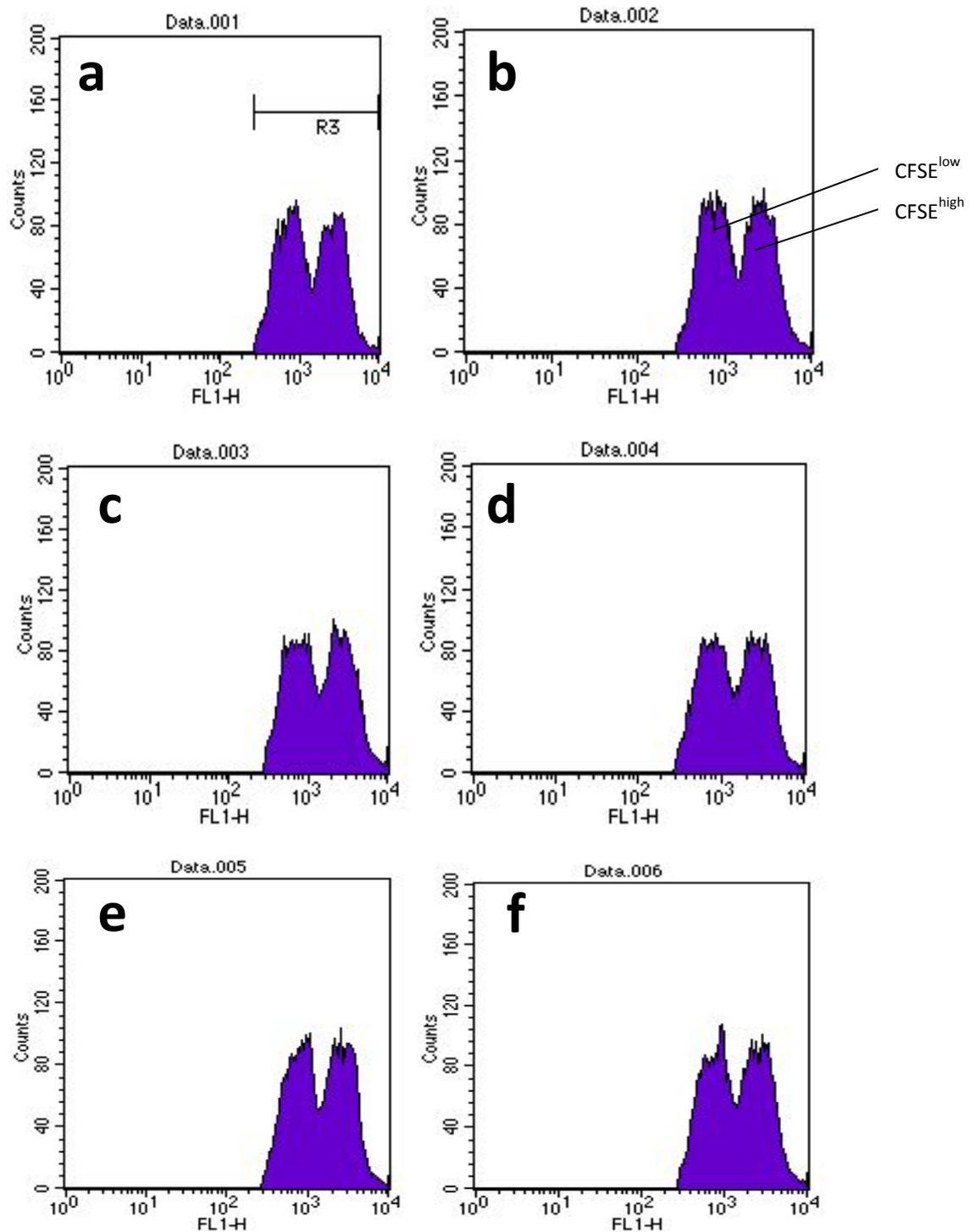


Figura 11. No se detectó la presencia de CTLs pE7-específicos en los ratones inmunizados con PapMV + pE7 que exhibieron una protección antitumoral. En las gráficas se muestran las dos poblaciones celulares teñidas; del lado izquierdo se encuentra la población teñida con CFSE low y del lado derecho se encuentran las células cargadas con pE7 y teñidas con CFSE^{high}. **a.** Control negativo administrado con PBS. **b y c.** Ratones que no exhibieron protección antitumoral finalizado el experimento. **d, e y f.** Ratones inmunizados con PapMV-pE7 que exhibieron protección antitumoral finalizado el experimento.

La inmunización con PapMV-pE7 exhibió una mayor protección que la inmunización con PolilC- α CD40 – pE7. Se observó protección antitumoral en un 28.57% de los ratones inmunizados con PolilC- α CD40 – pE7, mientras que los ratones inmunizados con PapMV-pE7 mostraron un porcentaje mayor de protección (fig. 12). Sin embargo, después de realizar la prueba de Wilcoxon para datos pareados, se determinó que no existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos para estos 2 grupos.

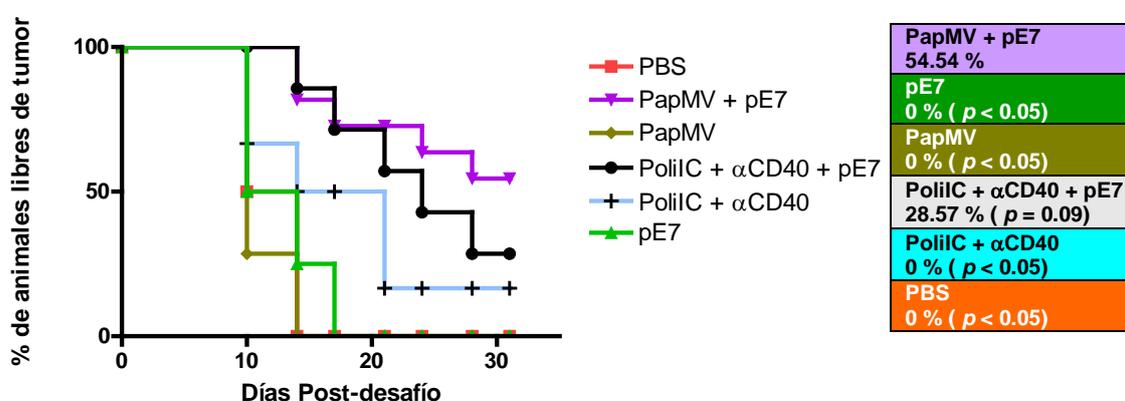


Figura 12. Los ratones inmunizados con PapMV + pE7 tuvieron un porcentaje mayor de protección antitumoral comparados con los demás grupos. No se encontró diferencia significativa entre el grupo inmunizado con PapMV + pE7 y el control positivo. En el gráfico se muestra el porcentaje de animales libres de tumor de cada grupo después del desafío con células TC-1.

El crecimiento del tumor se ve frenado por la inmunización con PapMV-pE7. En comparación con los demás grupos, el área tumoral promedio del grupo inmunizado con PapMV-pE7 fue la menor, lo cual sugiere que sí se desarrolló una respuesta efectora de CTLs en contra del tumor, pero ésta no fue suficiente para eliminar en su totalidad a las células TC-1 y por lo tanto hubo desarrollo de tumor, pero en una menor proporción comparado con los grupos en los que no hubo respuesta alguna (fig.13).

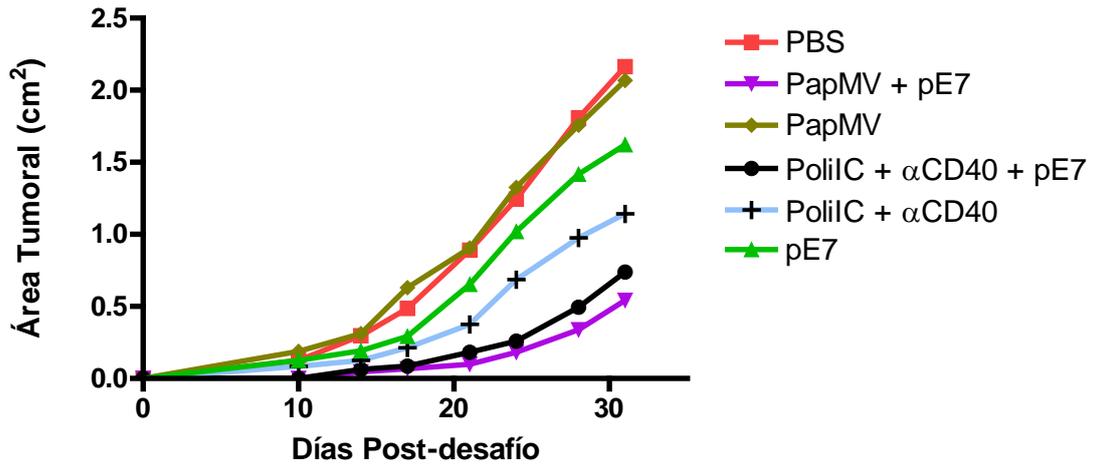


Figura 13. El área tumoral desarrollada en el grupo de PapMV + pE7 fue menor en comparación con los demás grupos- En el gráfico se muestra el desarrollo del tumor a lo largo de los 31 días posteriores al desafío con células TC-1.

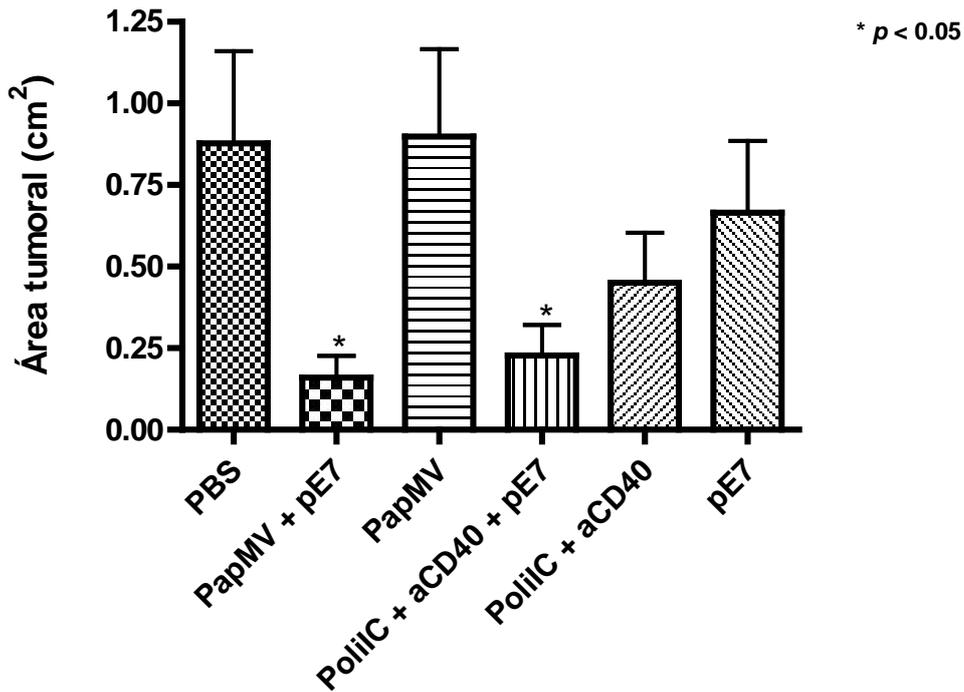


Figura 14. Se encontró diferencia significativa en el área tumoral desarrollada por el grupo inmunizado con PapMV + pE7 y el control negativo de PBS. También se encontró diferencia significativa entre el grupo control positivo de PolIIC + αCD40 + pE7 y el control negativo de PBS. No hubo diferencia significativa entre el PapMV + pE7 y el control positivo.

DISCUSIÓN

El contar con una opción de vacunación o tratamiento para el cáncer cervicouterino, una de las principales causas de muerte de mujeres en nuestro país, constituiría una gran herramienta terapéutica y de prevención para el beneficio de la población.

En este trabajo, se demostró que se obtiene una protección antitumoral en ratones, a partir de una inmunización con un péptido proveniente de la proteína E7 del VPH (pE7) y un adyuvante tipo VLP derivado del Virus del Mosaico de la Papaya (PapMV). Se observó protección antitumoral en aproximadamente 55% de los ratones inmunizados con PapMV y pE7, y en el 45% restante, el área tumoral fue de menor tamaño comparado con los tumores desarrollados por ratones control.

Se evaluó la capacidad adyuvante del PapMV comparándolo contra una porina de *Salmonella typhi* y una mezcla de anti-CD40 y Poli I:C. El PapMV demostró ser superior a estos dos adyuvantes ya que a partir del día 17 de monitoreo el porcentaje de animales libres de tumor era de 0% en ratones administrados con porina + pE7, 50% en ratones administrados con PoliIC + α CD40 + pE7 y 76% en ratones administrados con PapMV + pE7. En el día 31 de monitoreo se observó 0% de animales libres de tumor administrados con porina, 0% en ratones administrados con PoliIC + α CD40 y 55% en ratones administrados con PapMV. A partir de esta evidencia experimental, demostramos que el PapMV tiene propiedades de adyuvante superiores y ofrece protección en

contra de tumores provocados por VPH, sin embargo, estadísticamente hablando, no podemos asegurar que el PapMV es superior al PolilC + α CD40

Es importante resaltar que existe evidencia experimental que respalda el hecho de que los linfocitos citotóxicos son los principales responsables de la respuesta inmune antitumoral observada en tumores provocados por infecciones con VPH (Feltkamp y cols., 1995; Melief, 1992). También se ha demostrado que el PapMV, utilizado como adyuvante, es capaz de provocar una respuesta inmune antiviral por medio de la activación de CDs, cuando es administrado junto con un péptido proveniente de una proteína viral (Lacasse y cols., 2008). A partir de estas evidencias experimentales, en el presente trabajo se puede suponer que la protección antitumoral observada es consecuencia de la proliferación de CTLs péptido-específicos. Sin embargo, todos los ensayos que se han realizado en este trabajo no demuestran fehacientemente la presencia de citotoxicidad en los ratones protegidos (fig. 11). Es posible que los niveles de CTLs péptido-específicos sean muy bajos, y no son detectables con los ensayos utilizados hasta el momento.

Como se mencionó anteriormente, solamente se observó una protección antitumoral en el 55% de los ratones inmunizados con PapMV, por lo tanto, se debe determinar el porqué no se obtuvo un 100% de protección antitumoral. En este trabajo, se administró una mezcla de PapMV y pE7 en PBS; sabemos que para que se pueda dar una respuesta inmune, es necesario que la APC se encuentre activada y presentando el péptido en alguno de los MHC. Analizando la técnica de administración, no podemos asegurar con certeza que las APCs

captan al péptido y al adyuvante al mismo tiempo, por lo que pudieran ser solamente activadas por el PapMV pero no presentar al pE7, o viceversa, tomar el pE7 pero no ser activadas por el PapMV. Como se mencionó en los antecedentes, es posible fusionar un péptido al C-terminal de la cubierta proteica (CP) del PapMV (Leclerc y cols., 2007). Si pudiéramos administrar el péptido fusionado a la CP, podríamos asegurar que el 100% de las APC que entran en contacto con el PapMV son activadas y además presentan el péptido de interés. En este caso, se debe diseñar un experimento en donde se administre el pE7 fusionado al PapMV y se mida el porcentaje de ratones libres de tumor. Es altamente probable la obtención de un porcentaje significativamente mayor de protección antitumoral en los ratones inmunizados, comparado con los resultados obtenidos en este trabajo.

En aproximadamente 42% de los ratones inmunizados con PapMV se detectó la presencia de tumor, sin embargo, el área tumoral promedio fue significativamente menor a los demás grupos. Esto sugiere que sí se desarrolló una respuesta inmune antitumoral, pero ésta no fue lo suficientemente efectiva, para eliminar el 100% de las células tumorales administradas, por lo que las células que sobrevivieron al ataque inicial de los CTLs fueron capaces de desarrollar un tumor pequeño, a diferencia de los otros grupos en donde las células tumorales no enfrentaron ningún obstáculo y pudieron desarrollar un tumor de mayor tamaño. Este fenómeno se asemeja a la transición de la etapa de eliminación a la de equilibrio de la inmunoección. A partir de esta evidencia experimental se puede suponer también, que en un principio, las células tumorales lograron establecer el tumor y desarrollarlo hasta que la respuesta

inmune desarrollada alcanzó niveles suficientes para establecer una fase de equilibrio con el tumor, limitando su crecimiento y manteniéndolo de un tamaño mucho menor a aquellos ratones que no fueron inmunizados, donde no existía ninguna restricción de crecimiento para el tumor. Este problema puede deberse a lo discutido anteriormente donde las células presentadoras de antígeno no entran en contacto con el PapMV y el pE7 en un 100%.

Como una alternativa experimental que nos pudiera otorgar un resultado distinto, se tomó en cuenta el hecho de que solamente se utilizó un péptido que es sabido, induce una respuesta de CTLs, en lugar de utilizar adicionalmente un péptido que estimule una respuesta de Th. Esto sería importante si se considera que un linfocito T CD4 activado por una CD madura puede diferenciarse a Th antígeno-específico adquiriendo varias funciones, entre las cuales se encuentra el activar a otras CDs para que puedan interactuar con los linfocitos T CD8 y activarlos. Es decir, si utilizáramos un péptido que indujera una respuesta de Th, en adición al ya utilizado, podríamos observar un porcentaje de protección mayor en los ratones inmunizados. Actualmente, se está realizando un experimento que incluye estos dos péptidos para poder determinar si el efecto de la activación de Th es descartable o significativo.

Durante el análisis de los resultados, surgió la interrogante de la importancia del sitio de administración de la inmunización y la cantidad de antígeno administrado, y si alguna de estas variantes tienen que ver con la intensidad de la respuesta desarrollada. De acuerdo con el trabajo de Ochsenbein (Ochsenbein y cols., 2000), tanto el sitio de administración como la dosis de

antígeno administrada son dos factores cruciales en el desarrollo de una respuesta inmune efectiva. Como se mencionó en la metodología, nuestra administración fue realizada vía subcutánea en el cojinete plantar de los 4 miembros de los ratones, ya que la cercanía de algunos ganglios linfáticos a los miembros de los ratones nos aseguraría que el antígeno llegó a estos sitios produciendo una respuesta inmune. Actualmente, se están realizando experimentos para determinar si la vía de administración influye en el desarrollo de una respuesta de mayor o menor potencia. Estos experimentos consisten en probar diferentes dosis de antígeno así como diferentes vías y zonas de administración comparadas con un control positivo que reciba la misma dosis y vía de administración que sabemos tiene un efecto protector antitumoral en los ratones. El hecho de tener un porcentaje mayor de protección o detectar cantidades cuantificables de CTLs tumor-específicos, en alguno de los ratones que fue administrado de forma diferente, nos indicaría la vía de administración y cantidad de antígeno ideal para obtener una protección mayor.

Finalmente, como se mencionó en los antecedentes, las vacunas comerciales actuales tiene ciertas limitaciones de aplicación por lo tanto en este trabajo proponemos una alternativa a estas personas excluidas de la aplicación de la vacuna.

La vacuna comercial induce principalmente una respuesta de tipo humoral para la neutralización del virus y evitar la infección de las células blanco. La alternativa que se presenta en este trabajo induce una respuesta celular mediada por CTLs, los cuáles se enfocan en la destrucción de células

infectadas por el VPH y de células tumorales que fueron transformadas a causa de la infección por VPH y por consecuencia presentan antígenos virales.

Nuestra propuesta puede ser utilizada cuando la persona ya se encuentra infectada por VPH y tiene el riesgo de desarrollar cáncer cervical. La evidencia experimental encontrada en este trabajo, puede significar el establecimiento de una base importante para el desarrollo de una vacuna que represente en un futuro, una opción de prevención y tratamiento del cáncer cervicouterino, el cual, actualmente es una de las principales causas de muerte para las mujeres en el mundo.

CONCLUSIONES

- Se logró inducir una respuesta inmune antitumoral protectora en aproximadamente 55% de los ratones inmunizados con PapMV y pE7, y en el 45% restante, el área tumoral fue de menor tamaño comparado con los tumores desarrollados por ratones no inmunizados.
- Se logró demostrar que el PapMV es un adyuvante que tiene un gran potencial para el desarrollo de vacunas anti-tumorales.

PERSPECTIVAS:

- Con la obtención de todos estos resultados, se espera tomar el siguiente paso, que es fusionar el péptido utilizado en este experimento al PapMV y esperar, como se mencionó en la discusión, un mayor porcentaje de efectividad hasta lograr el 100%.
- No se ha detectado aún la presencia de los CTLs responsables de la protección antitumoral observada en los ratones, sin embargo, debemos desarrollar técnicas diferentes que nos permitan lograrlo.

REFERENCIAS

1. **Acosta Ramírez E., R. Pérez Flores, N. Majeau, R. Pastelin Palacios, C. Gil Cruz, M. Ramírez Saldaña, N. Manjarrez Orduño, L. Cervantes Barragán, L. Santos Argumedo, L. Flores Romo, I. Becker, A. Isibasi, D. Leclerc, C. López Macías.** 2007. Translating innate response into long-lasting antibody response by the intrinsic antigen-adjuvant properties of papaya mosaic virus. *Immunology*. **124**: 186-197.
2. **Álvarez Salas L.M. and J.A. DiPaolo.** 2007. Molecular Approaches to Cervical Cancer Therapy. *Current Drug Discovery Technologies*. **4**: 208-219.
3. **Arrossi S., R. Sankaranarayanan and D.M. Parkin.** 2003. Incidence and mortality of cervical cancer in Latin America. *Salud Pública de México*. **45**(Suplemento 3): 306-314.
4. **Ault K.A.** 2003. Virus-like particles as a potential vaccine for human papillomavirus. *Papillomavirus Rep*. **14**: 47-51.
5. **Ault K.A.** 2008. Human papillomavirus vaccines: an update for gynecologists. *Clinical Obstetrics and Gynecology*. **51**(3): 527-532.
6. **Boon T., J.C. Cerottini, B. van den Eynde, P. van der Bruggen and A. van Pel.** 1994. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annual review of immunology*. **112**: 337-365.
7. **Bornkamm G.W.** 2009. Epstein-Barr virus and the pathogenesis of Burkitt's lymphoma: more questions than answers. *International Journal of Cancer*. **124**(8): 1745-1755.
8. **Broker T.R.** 1987. Structure and genetic expression of papillomaviruses. *Obstetrics and gynecology clinics of North America*. **14**(2): 329-348.
9. **Bromberg J.F., C.M. Horvath, Z. Wen, R.D. Schrelber and J.E. Darnell.** 1996. Transcriptionally active Stat 1 is required for the antiproliferative effects of both interferon α and interferon γ . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **93**(15): 7673-7678.
10. **Burnet F.M.** 1957. Cancer- a biological approach. *British Medical Journal*. **1**: 841-847.
11. **Burnet F.M.** 1970. The concept of immunological surveillance. *Progress in experimental tumor research*. **13**: 1-27.
12. **Calleja-Macías I.E., L.L. Villa, J.C. Prado, M. Kalantari, B. Allan, A.L. Williamson, L.P. Cheng, Collins R.J. et al.** 2005. Worldwide genomic diversity of the highrisk human papillomavirus types 31, 35, 52 and 58,

- four close relatives of human papillomavirus type 16. *Journal of Virology*. **79**: 13630.
13. **Carrillo-Infante C., G. Abbadessa, L. Bagella and A. Giordano.** 2007. Viral infections as a cause of cancer (review). *International Journal of Oncology*. **30**(6): 1521-1528.
 14. **Chiang C.M., M. Ustay, A. Stenlund, T.F. Ho, T.R. Broker and L.T. Chow.** 1992. Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomaviral origins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **89**(13): 5799-5803.
 15. **Clifford G.M., J.S. Smith, M. Plummer, N. Muñoz and S. Franceschi.** 2003. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *British Journal of Cancer*. **88**(63).
 16. **Conti P, ML Castellani, D Kempuraj, V Salini, J Vecchiet, S Tetè, F Mastrangelo, A Perrella, MA De Lutiis, M Tagen and TC Theoharides.** 2007. Role of mast cells in tumor growth. *Ann Clin Lab Sci*. **37**(4): 315-22.
 17. **Cordeiro A., A.I. Machado, A. Borges, M.J. Alves and M.J. Frade.** 2008. Burkitt's lymphoma related to Epstein-Barr virus infection during pregnancy. *Archives of gynecology and obstetrics*. Epub ahead of print.
 18. **Corden, S.A., L.J. Sant-Cassia, A.J. Easton, et al.** 1999. The integration of HPV-18 DNA in cervical carcinoma. *Molecular Pathology*. **52**: 275-282.
 19. **Costello R.T., J.A. Gastaut and D. Olive.** 1999. Mechanisms of tumor escape from immunologic response. *La Revue de médecine interne*. **20**(7): 579-588.
 20. **Diefenbach A., E.R. Jensen, A.M. Jamieson and D.H. Raulet.** 2001. Rae I and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumor immunity. *Nature*. **413**: 165-171.
 21. **Dürst M., R.T. Dzarlieva-Petrusevska, P. Boukamp, N.E. Fusenig and L. Gissmann.** 1987. Molecular and cytogenetic analysis of immortalized human primary keratinocytes obtained after transfection with human papillomavirus type 16 DNA. *Oncogene*. **1**(3): 251-256.
 22. **Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D.** 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol*. **3**:991–998.
 23. **Dyson N., P.M. Howley, K. Müngen and E. Harlow.** 1989. The human papillomavirus -16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*. **243**: 934.

24. **Feltkamp M.C.W., G.R. Vreugdenhil, M.P.M. Vierboom, E. Ras, S.H. van der Burg, J. Ter Schegget, C.J.M. Melief & W.M. Kast.** 1995. Cytotoxic lymphocytes raised against a subdominant epitope offered as a synthetic peptide eradicate human papillomavirus type-16 induced tumors. *European Journal of Immunology*. **25**: 2638-2641.
25. **Garland S.M., M. Hernández-Avila et al.** 2007. A quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases. *The New England journal of medicine*. **356**: 1928-1943.
26. **Garrido F., F. Ruiz-Cabello, T. Cabrera et al.** 1997. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumors. *Immunology today*. **18**(2): 89-95.
27. **Gillison M.L., A.K. Chaturvedi and D.R. Lowy.** 2008. HPV prophylactic vaccines and the potential prevention of non cervical cancers in both men and women. *Cancer*. **113**(S10): 3036-3046.
28. **Girardi M., D.E. Oppenheim, C.R. Steele, J.M. Lewis, E. Glusac, R. Filler et al.** 2001. Regulation of cutaneous malignancy by $\gamma\delta$ T cells. *Science*. **294**:605-609.
29. **Gollob J.A., K.G. Veenstra, J.W. Mier and M.B. Atkins.** 2001. Agranulocytosis and hemolytic anemia in patients with renal cancer treated with interleukin – 12. *Journal of immunotherapy*. **24**(1): 91-98.
30. **Hainaut P.** 1993. Anti-tumor immune response. *Acta clinica belgica*. **48**(2) : 73-80.
31. **Harrington, E.A., J.L. Bruce, E. Harlow and E. Dyson.** 1998. pRb plays an essential role in cell cycle arrest induced by DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **95**: 11945-11950.
32. **Heath W.R. and F.R. Carbone.** 2001. Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nature Reviews- Immunology*. **1**: 126-135
33. **Hebner C.M. and L. A. Laimins.** 2006. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Reviews in medical virology*. **16**(2): 83-97.
34. **Jayshree, R.S., A. Srineevas, M. Tessy and S. Krishna.** 2009. Cell intrinsic and extrinsic factors in cervical carcinogenesis. *Indian Journal of Medical Research*. **130**: 286-295.
35. **Kindt, J.T., R.A. Goldsby, B.A. Osborne.** 2007. *Kuby Immunology*. Sexta edición. Ed. W.H. Freeman and Company. NY
36. **Klein G.** 1968. Tumor-specific Transplantation Antigens. *Cancer Research*. **28**: 625-635.

37. **Kobayashi M., H. Ikeda, A. Nukui, K. Susuki, Y. Sugaya, M. Yuzawa and T. Morita.** 2008. Clinical outcome and prognostic survival factors in patients with advanced renal cell carcinoma treated with very low-dose interleukin-2, interferon-alpha, and tegafur-uracil: a single-institution experience. *International Journal of clinical oncology*. **13**(3): 257-262.
38. **Koebel C.M., W. Vermi, J.B. Swann, N. Zerafa, S.J. Rodig, L.J. Old, M.J. Smyth & R.D. Schreiber.** 2007. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature*. **450**: 903-907.
39. **Komata T., R. Tanaka, K. Yamamoto, T. Oda, K. Ono, S. Yoshida and M. Takahashi.** 1997. B7-1(CD 80) transfected human glioma cells and interleukin -12 directly stimulate allogenic CD8⁺ T cells. *Journal of immunotherapy*. **20**(4): 256-264.
40. **Koutsky L.** 1997. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *American Journal of Medicine*. **102**(3).
41. **Koutsky L.A., K.A. Ault, C.M. Wheeler et al.** 2002. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *The New England journal of medicine*. **347**: 1645-1651.
42. **Kumar A., M. Commane, T.W. Flickinger, C.M. Horvath and G.R. Stark.** 1997. Defective TNF- α -induced apoptosis in STAT1-null cells due to low constitutive levels of caspases. *Science*. **278**(5343): 1630-1632.
43. **Kuo S.R., J.S. Liu, T.R. Broker and L.T. Chow.** 1994. Cell-free replication of the human papillomavirus DNA with homologous viral E1 and E2 proteins and human cell extracts. *Journal of Biological Chemistry*. **269**(39): 24058-24065.
44. **Lacasse P, J. Denis, R. Lapointe, D. Leclerc and A. Lamarre.** 2008. Novel Plant Virus-Based Vaccine Induces Protective Cytotoxic T-Lymphocyte-Mediated Antiviral Immunity through Dendritic Cell Maturation. *J. Virol*. **82**: 785-794.
45. **Leclerc D, D. Beauseigle, J. Denis, H. Morin, C. Pare, A. Lamarre, and R. Lapointe.** 2007. Proteasome-independent major histocompatibility complex class I cross-presentation mediated by papaya mosaic virus-like particles leads to expansion of specific human T cells. *J. Virol*. **81**: 1319–1326.
46. **Lollini P.L., G. Nicoletti, L. Landuzzi, C. De Giovanni and P. Nanni.** 2005. New target antigens for cancer immunoprevention. *Current cancer drug targets*. **5**(3): 221-228.
47. **Melief C.J.** 1992. Tumor eradication by adoptive transfer of cytotoxic T lymphocytes. *Advances in cancer research*. **58**: 143-175.

48. **Münger K., J.R. Basile, S. Duensing, A. Eichten, S.L. Gonzalez, M. Grace and V.L. Zacny.** 2001. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene*. **20**: 7888.
49. **Ochsenbein A.F., D.D. Pinschewer, B. Odermatt, A. Ciurea, H. Hengartner & R. M. Zinkernagel.** 2000. Correlation of T cell independence of antibody responses with antigen dose reaching secondary lymphoid organs. *Journal of Immunology*. **164**(12):6296-302.
50. **Patel S. and S. Chiplunkar.** 2009. Host immune responses to cervical cancer. *Current opinion in obstetrics & gynecology*. **21**(1): 54-59.
51. **Pirisi L., S. Yasumoto, M. Feller, J. Doniger and J.A. DiPaolo.** 1987. Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. *Journal of virology*. **61**(4): 1061-1066.
52. **Qin Z. and T. Blankenstein.** 2000. CD4⁺ T cell-mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN- γ receptor expression by nonhematopoietic cells. *Immunity*. **12**: 677-686.
53. **Rambout L., L. Hopkins, B. Hutton, D. Fergusson et al.** 2007. Prophylactic vaccination against human papillomavirus infection and disease in women : a systematic review of randomized controlled trials. *Canadian Medical Association Journal*. **177**: 469-479.
54. **Scheffner M., J.M. Huibregtse, R.D. Vierstra and P.M. Howley.** 1993. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*. **75**: 495.
55. **Sebastian S., A. Azzariti, N. Silvestris, L. Porcelli, A. Russo, A. Paradiso.** 2010. p53 as the main traffic controller of the cell signaling network. *Frontiers in Bioscience*. **15**: 1172-90.
56. **Sgadari C., A.L. Angiolillo and G. Tosato.** 1996. Inhibition of angiogenesis by Interleukin – 12 is mediated by the interferon-inducible protein 10. *Blood*. **87**(9): 3877-3882.
57. **Sheu BC, SM Hsu, HN Ho, RH Lin and SC Huang.** 1999. Tumor immunology--when a cancer cell meets the immune cells. *J Formos Med Assoc*. **98**(11):730-5.
58. **Swann B. and M.J. Smyth.** 2007. Immune surveillance of tumors. *The Journal of Clinical Investigation*. **117**(5): 1137-1146.
59. **Tindle R.W.** 2002. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nature reviews: cancer*. **2**(1): 59-65.
60. **Toes R.E., S.P. Shoenberger, E.I. van der Voort, W.M. Kast, R.C. Hoeben, C.J. Melief and R. Offringa.** 1997. Activation or frustration of anti-tumor responses by T-cell-based immune modulation. *Seminars in immunology*. **9**(5): 323-327.

61. **Tremblay, M.H., N. Majeau, M.E. Gagne, K. Lecours, H. Morin, J.B. Duvignaud, M. Bolduc, N. Chouinard, C. Pare, S. Gagne and D. Leclerc.** 2006. Effect of mutations K97A and E128A on RNA binding and self assembly of papaya mosaic potexvirus coat protein. *The Federation of European Biochemical Societies Journal*. **273**: 14-25.
62. **Tubiana M.** 2008. Généralités sur la cancérogenèse. *Comptes rendus biologies*. **331**(2) : 114-125.
63. **Wang R.F.** 1997. Tumor antigens discovery: perspectives for cancer therapy. *Molecular medicine*. **3**(11): 716-731.
64. **Wang R.F.** 1999. Human tumor antigens: implications for cancer vaccine development. *Journal of molecular medicine*. **77**(9): 640-655.
65. **Wang Y.C., L. Zhu, R. McHugh, S.D. Graham, C.D. Hillyer, D. Dillehay, K.W. Sell and P. Selvaraj.** 1996. Induction of autologous tumor-specific cytotoxic T-lymphocyte activity against a human renal carcinoma cell line by B7-1 (CD80) costimulation. *Journal of immunotherapy with emphasis on tumor immunology*. **19**(1): 1-8.
66. **Werness B.A., A.J. Levine, and P.M. Howley.** 1993. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*. **248**: 76.
67. **Wheeler C.M.** 2008. Natural history of human papillomavirus infections, cytologic and histologic abnormalities, and cancer. *Obstetrics and gynecology clinics of North America*. **35**(4): 519-536.
68. **Whiteside T.L.** 1994. Tumor-infiltrating lymphocytes in human solid tumors. *Immunology series*. **61**: 137-148.
69. **zur Hausen H.** 1991. Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology*. **184**: 9-13.
70. **zur Hausen H.** 1991. Viruses in human cancers. *Science*. **254**: 1167-1173.
71. **zur Hausen H.** 1996. Papillomavirus infections: a major cause of human cancers. *Biochimica et biophysica acta*. **1288**(2): F55-F78.