



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FES Zaragoza

ANÁLISIS DE LA RESPUESTA DE CÉLULAS T DE
PACIENTES CON LESIONES CERVICALES
ESCAMOSAS INTRAEPITELIALES TEMPRANAS
HACIA ANTÍGENOS DE LA PROTEÍNA L1 DE
HPV Y ANTÍGENOS COMUNES EN
VACUNACIÓN.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

JORGE HERNÁNDEZ MONTES

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA
(FES ZARAGOZA, UNAM)

COMITÉ TUTOR: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA (IIB, UNAM)
DR. ALBERTO MONROY GARCÍA (CMNSXXI, IMSS)

MÉXICO, D.F.

ENERO, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 8 de octubre de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del (la) alumno (a) **HERNÁNDEZ MONTES JORGE** con número de cuenta **83268591** con la tesis titulada "**Análisis de la respuesta de células T de pacientes con lesiones cervicales escamosas intraepiteliales tempranas hacia antígenos de la proteína L1 de HPV y antígenos comunes en vacunación**". realizada bajo la dirección del (la) **DRA. MARIA DE LOURDES MORA GARCÍA**:

Presidente: DR. BENNY WEISS STEIDER
Vocal: DR. VIANNEY FRANCISCO ORTIZ NAVARRETE
Secretario: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA
Suplente: DRA. REBECA LÓPEZ MARURE
Suplente: DR. ALBERTO MONROY GARCÍA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 10 de diciembre de 2012.

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

Agradezco el apoyo recibido de parte del Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM para la realización de esta Tesis.

Asimismo, agradezco el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyectos 82827 y 84071); de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (Proyecto PAPIIT-IN212506), y del Instituto Mexicano del Seguro Social (FIS/IMSS/PROT/876).

El Trabajo experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Inmunobiología de la FES Zaragoza, bajo la tutoría principal de la Dra. Ma. De Lourdes Mora García y con la Dirección tutorial del Dr. Alberto MonroyGarcía y de la Dra. Leticia Rocha Zavaleta.

Agradecimientos.

Agradezco la tutoría de los Doctores María de Lourdes Mora García, Alberto Monroy García y Leticia Rocha Zavaleta, así como la asesoría inestimable de los Doctores Benny Weiss Steider, Vianney F. Ortíz Navarrete y Rebeca López Marure, tanto para la realización de esta tesis, como a lo largo de mi formación profesional.

También fue sumamente provechosa para mí la orientación recibida por parte de los Doctores José Sullivan López González, Marcela Lizano Soberón e Isabel Soto Cruz durante la presentación del examen de candidatura.

Para la realización del trabajo experimental conté con el apoyo del Dr. Fernando Cruz Talonia, la Dra. Laura C. Bonifaz Alfonso, la M. en C. Martha Patricia Rojo Aguilar, la Dra. A. Karina Chávez Rueda y la Dra. Ma. Victoria Legorreta Haquet. Algunos ensayos fueron realizados en conjunto con la Bióloga Ma. Del Carmen Zaragoza Ortega. El apoyo técnico fue provisto por el Señor Ernesto J. Rivera. Agradezco igualmente a todos los que me ayudaron en diferentes maneras, y cuyos nombres formarían una larga lista.

Reconozco el valioso soporte que representa para mí la interacción con todos los integrantes del equipo del Laboratorio de Inmunobiología de la FES Zaragoza. Les agradezco y les deseo el mejor de los éxitos.

A Elsa, Sofía Belén, Elodia y Jorge, muchas gracias por todo.

A Sofía Belén.

Porque tu presencia me muestra
mucho de esa sabiduría que no se aprende,
sino que emana propiamente del ser.

Contenido

Resumen	8
Abstract	9
Marco Teórico	10
Características generales de los virus del papiloma humano.....	10
El ciclo de replicación de los HPV.....	11
La asociación de la infección por HPV con el desarrollo de cáncer cervical.....	16
La respuesta inmune hacia los virus.....	19
La respuesta inmune hacia el HPV.....	24
La respuesta inmune humoral contra el HPV.....	24
La respuesta inmune celular contra el HPV.....	27
La regulación negativa de la respuesta inmune contra el HPV.....	30
Propósito y justificación	33
Hipótesis	34
Objetivos	35
Materiales y Métodos	37
Resultados	43
Linfocitos T de pacientes con lesiones escamosas intraepiteliales tempranas (LSIL) tuvieron una respuesta significativamente menor hacia antígenos de vacunas comunes que linfocitos de donadoras normales.....	43
Anticuerpos séricos contra antígenos de la vacuna Infanrix Hexa® se hallaron tanto en pacientes con LSIL como en donadores normales.....	45
Los LSP de pacientes con LSIL y de donadoras normales presentaron niveles similares de linfocitos T CD4+FoxP3+.....	45
La fitohemaglutinina les indujo alta producción de IFN γ y alta expresión de CD69 a linfocitos T CD8+ de pacientes con LSIL.....	47

Los linfocitos T de pacientes con LSIL HPV-16+ y -18+ proliferaron fuertemente en presencia de células dendríticas.....	49
La proliferación de linfocitos T inducida por la incubación con Cervarix fue detectada mediante la determinación de células individualmente, en donadoras normales pero no en pacientes con infección por HPV.....	51
Los Linfocitos T de pacientes con LSIL producen niveles más bajos de IL-2 que los de donadoras normales.....	51
Los sueros de pacientes con LSIL presentan una menor concentración de receptor soluble para IL-2 (shIL-2R) con respecto a donadoras normales sin HPV y pacientes con CaCu.....	54
Determinación de células T CD8+ específicas hacia péptidos derivados de la proteína L1 de los HPV-16 y -18.....	56
Discusión.....	60
Conclusiones.....	67
Bibliografía.....	68
Anexo: Artículo publicado.....	80

Resumen.

La mayoría de las infecciones por el virus de papiloma humano (HPV) se resuelven sin intervención clínica, pero una minoría evoluciona hacia lesiones crónicas de distintos grados, incluyendo cáncer cervical-uterino. En la mayoría de los casos el sistema inmune media la eliminación de la infección; sin embargo, en un considerable número de casos la evasión de la respuesta inmune, por medio de mecanismos no comprendidos totalmente, conduce a la persistencia del virus y al desarrollo de lesiones cervicales tempranas.

En el presente trabajo evaluamos la respuesta *in vitro* de leucocitos de sangre periférica (LSP) de pacientes con lesiones cervicales escamosas intraepiteliales tempranas (LSIL) hacia antígenos de la proteína L1 de HPV y antígenos comunes en vacunación. Encontramos que tanto los LSP de pacientes con LSIL como de un grupo normal presentaron una baja proliferación en respuesta a la incubación con proteínas solubles de L1 de HPV-16 y -18, pero las células de donadoras con infección por HPV-16 y -18 proliferaron cuando los antígenos fueron presentados por medio de células dendríticas. Por otra parte, observamos que los LSP de las pacientes con LSIL mostraron una tasa de proliferación significativamente menor en comparación con la de donadoras sanas cuando fueron incubados en presencia de una mezcla de antígenos de virus de poliomielitis, y hepatitis B, *C. tetani*, *C. diphtheriae* y *B. pertussis*, aun cuando encontramos concentraciones semejantes de anticuerpos contra esos antígenos en los sueros de ambos grupos. Evaluando posibles causas de la limitada respuesta en los LSP de las pacientes con LSIL, no encontramos diferencia ni en la frecuencia de células reguladoras (marcadores CD4+CD25+FoxP3+), ni en los niveles de citocinas del perfil Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10) en plasma o en medios condicionados por LSP activados, en comparación con el grupo normal.

Sin embargo, detectamos una menor producción de IL-2, y la presencia de una mayor proporción de células CD8+IFN γ + como respuesta a un estímulo policlonal, en los LSP de pacientes con LSIL en comparación con los LSP de donadores normales.

Por tanto, sugerimos que la respuesta hacia antígenos de HPV se presenta en una baja frecuencia tanto en LSP de donadoras normales como en pacientes con LSIL, y requiere de fuertes estímulos para ser reactivada *ex vivo*. Además, observamos un estado de inmunodeficiencia en la respuesta de células T en pacientes con LSIL que por alguna razón desconocida están presentes, pero son incapaces de montar una respuesta cuando son retados con sus antígenos, probablemente debido a una deficiencia en la producción de IL-2 *in situ*.

Abstract

Most infections with human papilloma virus (HPV) are resolved without clinical intervention, but a minority develops into chronic injuries of varying degrees, including cervical-uterine cancer. In most cases the immune system carries the elimination of infection, but in a significant number of cases the evasion of the immune response, by mechanisms that are not fully understood, leads to viral persistence and development of early cervical lesions.

In this study we evaluated the *in vitro* response of peripheral blood leukocytes (PBL) of patients with low grade squamous intraepithelial cervical lesions (LSIL) to antigens from HPV L1 protein and from common vaccines. We found that PBL of patients with LSIL and a normal group had a low proliferation in response to incubation with soluble L1 proteins from HPV-16 and -18, but cells from patients infected with these viral types proliferated significantly when the antigens were presented by dendritic cells. Moreover, the PBL of LSIL patients showed a significantly lower proliferation rate in comparison with that of healthy donors when were incubated in presence of a mixture of antigens from polio virus, hepatitis B virus, C. tetani, C. diphtheriae and B. pertussis, though in sera of both groups were found similar concentrations of antibodies against these antigens. In evaluating possible causes of the limited response in PBL from patients with LSIL, we found no difference neither on the frequency of regulatory cells (CD4+CD25+FoxP3+), nor on the levels of cytokines Th2 (IL-4, IL -5 and IL-10) in blood or media conditioned by activated PBL, compared with the normal group.

However, we detected a lower production of IL-2, and the presence of a greater proportion of CD8+IFN γ + in response to polyclonal stimulation, in PBL from patients with LSIL compared to PBL from normal donors.

Our results suggest that the response to HPV antigens is presented as a low frequency of PBL both in normal donors and patients with LSIL, and requires a strong stimulation to be reactivated *ex vivo*. Furthermore, a state of immunodeficiency is observed in T cell response in patients with LSIL, where specific cells are present but for some reason are unable to mount a response when are challenged with antigen, probably due to a deficiency in the production of IL-2 *in situ*.

Marco Teórico

Características generales de los virus del papiloma humano.

Los virus del papiloma conforman un grupo diverso y se hallan en más de veinte especies de mamíferos, así como en aves y en reptiles. Infechan la piel y las mucosas, y en los humanos causan un amplio espectro de lesiones que abarcan desde las verrugas comunes hasta tumores malignos, siendo la salud de las mujeres más afectada que la de los hombres.

La clasificación taxonómica los incluyó durante mucho tiempo dentro de la familia de los papovavirus (*Papovaviridae*), junto con los virus polioma; sin embargo, como resultado de estudios funcionales y estructurales se concluyó que la relación entre estos dos tipos de virus es más superficial que natural, y por tanto, constituyen familias separadas. De este modo, el Consejo Internacional de Taxonomía de los Virus (ICTV, por sus siglas en inglés) reconoce oficialmente a la familia de los virus de papiloma (*Papillomaviridae*) (ICTV *Virus taxonomy*, 2008).

El genoma de los virus del papiloma humano (HPV, por sus siglas en inglés: *human papillomavirus*) está constituido por ADN de doble cadena, de aproximadamente 8 kilobases de extensión, que adopta una forma circular (de Villiers EM et al, 2004); está contenido dentro de una cápside de 55 nm de diámetro, sin envoltura, que contiene 360 copias de la proteína viral L1 y probablemente 12 copias de la proteína viral L2, formando un icosaedro (Chen XS et al, 2000). Las 360 copias de la proteína L1 se conforman en 72 capsómeros (pentámeros) que son los principales componentes de la estructura (Trus BL et al, 1997), en tanto que la proteína L2, con una proporción 1 a 30 con respecto a la L1, ocupa principalmente una posición interna (Kirnbauer R et al, 1993) (Figura 1).

No obstante su tamaño pequeño, la biología molecular del genoma de los HPV es compleja. Consta de una región de control transcripcional (URR, del inglés *Upstream regulatory región*, o LCR: *Long control region*) y de ocho marcos de lectura abierta donde se codifican otras tantas proteínas, las cuales se clasifican como tardías (L, del inglés *late*) y

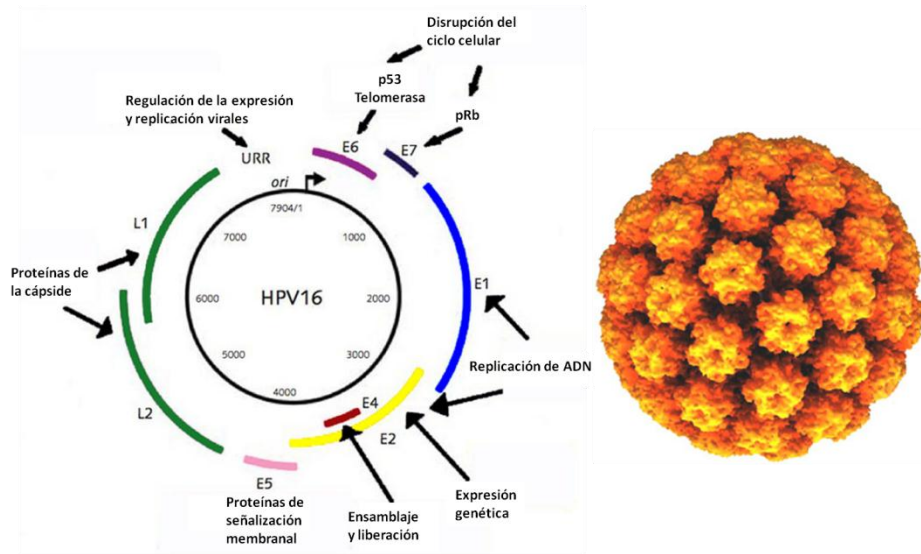


Figura 1. Esquema representativo del genoma circular del HPV-16, mostrando el sitio de origen de replicación (*ori*), la región de control transcripcional (URR) así como los marcos de lectura abierta donde son codificadas las proteínas de expresión temprana (E) y tardía (L), así como sus funciones generales. También se representa a la estructura de la cápside viral, compuesta por 72 pentámeros de la proteína L1, formando un icosaedro. Tomado y modificado del sitio de internet www.microbiologybytes.com.

tempranas (E, del inglés *early*) dependiendo de la fase del ciclo de replicación viral en que se expresan. Brevemente, tres oncogenes: E5, E6 y E7 modulan el proceso de transformación; dos proteínas reguladoras: E1 y E2 modulan la transcripción y la replicación; la proteína E4 facilita la salida de los viriones recién formados, y dos proteínas estructurales: L1 y L2, componen la cápside viral, como se mencionó anteriormente (Revisado por Munger K y Howley PM, 2002) (Figura 1).

El ciclo de replicación de los HPV

El ciclo de replicación de los HPV presenta un estricto requerimiento de células epiteliales en proliferación, lo cual es una consecuencia de millones de años de co-evolución entre ambas especies (Revisado por Doorbar, 2004). La infección inicial requiere del acceso de las partículas infecciosas a las células en la capa basal del epitelio, lo cual a su vez, probablemente requiere de abrasiones en el epitelio estratificado, aun cuando tales abrasiones no sean evidentes; además, se sugiere que para que una lesión sea mantenida, el virus debe infectar células epiteliales troncales (Egawa K,

2003). La formación de lesiones cervicales por parte de virus de alto riesgo infectantes de las mucosas, puede también facilitarse por la infección de células de la unión escamo-columnar, localizada en el punto donde el epitelio plano y el epitelio cilíndrico convergen; dichas células subsecuentemente irán a formar parte de la capa basal del epitelio estratificado de la zona de transformación (Figura 2). Existe controversia acerca de la naturaleza de los receptores superficiales que facilitan la unión inicial del virus a la célula, aunque la mayoría de los estudios al respecto sugieren una dependencia de la presencia de la molécula heparán-sulfato como el ligando responsable de la unión inicial del virión a las células (Joyce JG et al, 1999; Giroglou T et al, 200). Igualmente, aunque con argumentos menos consistentes, se ha propuesto que la proteína laminina-5, residente de la matriz extracelular actúa como un receptor inicial en la unión del virión a la superficie celular (Culp TD et al, 2006). Recientemente, se ha sugerido que esta unión inicial induce un cambio en la conformación de la cápside que expone al extremo amino-terminal de la L2 a la actividad de la proteasa furina o la estrechamente relacionada pro-proteína convertasa 5/6, exponiendo entonces sitios de unión a un segundo receptor de la superficie celular de identidad desconocida y que participa en la internalización del virión (Richards RM et al, 2006). La molécula α -6-integrina se encuentra entre los candidatos que para actuar como un segundo receptor (Evander M et al, 1997), aunque las evidencias que sostienen este argumento resultan controversiales. Por otra parte, y como caso particular, se sugiere que el HPV tipo 31 puede infectar a las células epiteliales en ausencia de heparán-sulfato (Patterson NA et al, 2005).

Se considera que siguiendo a la infección y a la pérdida de la envoltura del virión dentro del ambiente reductor de la célula, el virus mantiene su genoma como un bajo número de episomas en las células basales del epitelio. El patrón de expresión genética del virus en estas células no está bien definido pero se piensa que las proteínas virales E1 y E2 se expresan con el fin de mantener el ADN viral como un episoma (Wilson VG et al, 2002) y de facilitar la correcta segregación de genomas durante la división celular (You J et al, 2004). Se estima que el genoma viral es mantenido en la capa basal en alrededor de 10 a 200 copias por célula, y que las proteínas virales tempranas (E6, E7, E1 y E2) se expresan en un bajo nivel (De Geest K et al, 1993). Actualmente, es incierta la importancia de la participación de las proteínas oncogénicas E6 y E7 en la proliferación

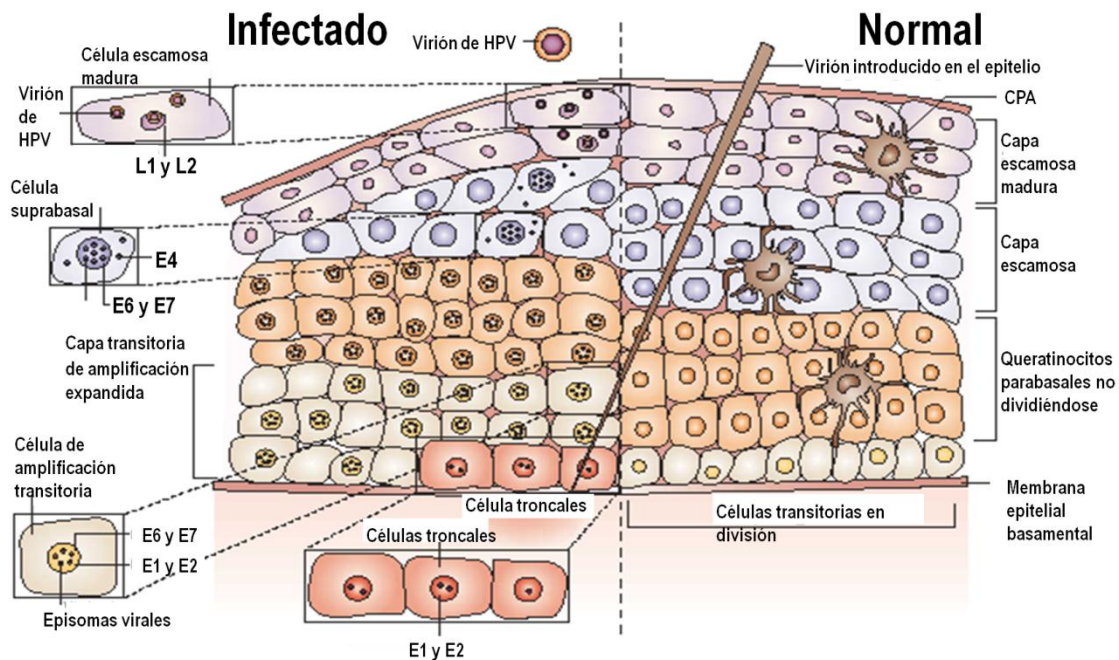


Figura 2. Representación del ciclo de replicación del virus del papiloma humano en el tracto genital femenino. Se considera que una infección productiva requiere de la infección de células troncales basales y culmina con la liberación de los nuevos viriones en las capas de células escamosas maduras, alterando con este proceso la arquitectura tisular en comparación con el tejido normal, por efecto de la acción de las proteínas virales. Estos procesos son detallados en el texto. (Modificado de Frazer I, 2004).

de las células basales, y se ha sugerido que la expresión de E1 (y posiblemente también E2) pueda ser suficiente para el mantenimiento basal de los episomas virales (Zhang P et al, 1999) (Figura 2).

En el epitelio sin infección, las células basales salen del ciclo celular poco antes de migrar hacia las capas de células suprabasales y de dirigirse hacia un proceso de diferenciación terminal. Los cambios incluyen el entrecruzamiento físico de filamentos intermedios de queratina, la formación de cubiertas córneas, y la secreción de lípidos, los cuales en conjunto llevan a la superficie epitelial a formar una barrera física contra el ambiente (Madison KC, 2003). En cambio, durante la infección por los virus de papiloma, la proteína E7 (y presumiblemente también la E6) se expresa en estas células, las restricciones sobre la progresión del ciclo celular son suprimidas y la diferenciación terminal normal es retardada (Sherman L et al, 1997). Se considera que las proteínas E6 y E7 trabajan en conjunto para

lograr tales efectos, y en las lesiones causadas por tipos de HPV de alto riesgo oncogénico (tales como los HPV-16 y -18) las dos proteínas se expresan a partir de un ARNm bi-cistrónico (Stacey SN et al, 2000) codificado desde el promotor viral temprano (p97). Tanto la E6 como la E7 tienen funciones que estimulan la progresión del ciclo celular y ambas pueden asociarse con reguladores del mismo (Munger K et al, 2001) (Figura 2).

La asociación de la proteína E7 con miembros de la familia de proteínas *pocket* que interactúan físicamente con otras proteínas para regular su actividad, está bien caracterizada. Por ejemplo, la pRb es un regulador negativo del ciclo celular que normalmente previene la entrada a la fase S del ciclo celular asociándose con los miembros de la familia de factores de transcripción E2F. La unión de E7 con pRb desplaza a E2F independientemente de la presencia de factores de proliferación externos, y conduce a la expresión de proteínas necesarias para la replicación del ADN. Además, la E7 puede también asociarse con otras proteínas involucradas en la proliferación celular (Munger K et al, 2001).

Por su parte, la proteína viral E6 complementa el papel de la E7, y se cree que previene la inducción de la apoptosis en respuesta a la entrada a la fase S, forzada por E7. Aunque la asociación de E6 con p53, y la inactivación de la supresión y la apoptosis mediadas por p53 han sido bien documentadas, E6 puede también asociarse con otras proteínas pro-apoptóticas, incluyendo Bak (Thomas M y Banks L, 1998) y Bax (Li B y Dou QP, 2000). Como consecuencia, la presencia de E6 se considera como un factor de predisposición en el desarrollo de cáncer asociado a HPV, conduciendo a la acumulación de errores en el ADN de la célula hospedera carente de los mecanismos de verificación correspondientes.

Se cree que además de las proteínas E6 y E7, las otras proteínas virales tempranas (E1, E2, E4 y E5) se expresan previamente al establecimiento de la amplificación del genoma con el fin de asegurar el mantenimiento del episoma viral en un bajo número de copias.

Para la producción de viriones infecciosos, los HPV deben amplificar sus genomas y empaarlos en partículas infecciosas. En ciertos grupos de virus, esto ocurre en las capas epiteliales medias o superiores, posteriormente a un incremento en la actividad del promotor tardío

(dependiente de la diferenciación). El promotor tardío se ubica dentro del marco de lectura abierta de E7 y se cree que su regulación positiva conduce a un incremento en la expresión de proteínas involucradas en la replicación viral (E1, E2, E4 y E5) sin afectar directamente la expresión de las proteínas E6 y E7, necesarias para la entrada a la fase S del ciclo. La amplificación de los genomas virales comienza en un sub-grupo de células del compartimento en proliferación y requiere de la expresión de todos los productos genéticos virales tempranos (Middleton K et al, 2003).

Los mecanismos moleculares que conducen a la activación del promotor tardío y a la regulación positiva de la expresión de E1/E2 no son bien entendidos, así como tampoco la participación de E4 y de E5, siendo probable que este promotor esté constitutivamente activo en todas las etapas del ciclo productivo. Los modelos actuales sugieren que un modesto incremento en la activación del promotor durante la diferenciación puede conducir a un incremento en la cantidad de E1 y E2 (y también de E4 y de E5), y a un subsecuente aumento en el número de copias de los genomas. Los genomas replicados recientemente pueden servir como patrones para la posterior expresión de E1 y de E2, lo cual puede facilitar la amplificación adicional de genomas virales y a su vez, una mayor expresión de las proteínas E1 y E2, necesarias para la replicación (Middleton K et al, 2003).

El ADN de los virus del papiloma codifica dos proteínas estructurales que son expresadas en las capas superiores de los tejidos infectados una vez que la amplificación genómica se ha completado (Ozbun MA y Meyers C, 1998), particularmente en un subgrupo de células que expresan a la proteína E4 (Doorbar J et al, 1997). La principal proteína de la cápside (L1) es expresada después que la L2, lo que conduce al ensamblaje de las partículas infecciosas en las capas superficiales del epitelio (Florin L et al, 2002) (Figura 2). Para tener éxito, el virus debe escapar eventualmente de las células infectadas y sobrevivir extracelularmente previamente a una reinfección. Los virus del papiloma no son líticos, y no son liberados sino hasta que las células infectadas alcanzan la superficie epitelial, son resistentes a la desecación (Roden RB et al, 1997) y su viabilidad extracelular puede ser reforzada si ellos son liberados de la superficie epitelial dentro de una escama córnea (Bryan JT y Brown DR, 2001). La retención intracelular de antígenos de los virus del papiloma hasta que la célula alcanza las capas

epiteliales más superficiales puede comprometer a la detección inmune del virus, particularmente porque el virus también tiene mecanismos moleculares que limitan la presentación de epítopes virales al sistema inmune en las capas inferiores (Ashrafi GH et al, 2002; Marchetti B et al, 2002; Matthews K et al, 2003). Aunque la expresión de proteínas virales puede inhibir la expresión de marcadores de diferenciación previniendo la formación de escamas córneas normales (Doorbar J et al, 1997), se ha sugerido que la proteína viral E4 puede contribuir directamente al egreso del virus de las capas epiteliales superiores disturbando la integridad de la queratina (Doorbar J et al 1991), y afectando el ensamblaje de la cubierta córnea (Bryan JT y Brown DR, 2000).

La asociación de la infección por HPV con el desarrollo de cáncer cervical.

La infección del cérvix con HPV, particularmente con los tipos 16 y 18, se asocia causalmente al desarrollo de cáncer cervical, transcurriendo previamente por estadios *in situ* (NIC: neoplasia intraepitelial cervical). Sin embargo, en individuos inmunocompetentes la infección es normalmente asintomática y eventualmente eliminada. Aun en casos donde la infección ha conducido a una displasia, las lesiones frecuentemente regresan, especialmente en los casos de displasias moderadas y en individuos jóvenes. Por otra parte, la persistencia viral se asocia con la progresión de las lesiones (desde NIC1 a NIC3 de acuerdo al grado de severidad), lo cual favorece el desarrollo del cáncer.

Los virus de papiloma cuyo genoma ha sido completamente secuenciado, y cuyo gene para L1 presenta una secuencia diferente en por lo menos un 10% con cualquiera otro conocido, son tradicionalmente descritos como tipos. En el hospedero más intensamente estudiado: el humano, se han descrito cerca de 100 tipos con base en la caracterización de genomas completos, y se presume que puedan existir un gran número más, con base en la detección de *amplicones* subgenómicos. Muchos de estos tipos de HPV son ubicuos y están globalmente distribuidos. Los virus de papiloma causan tumores benignos (verrugas y papilomas) en sus hospederos naturales y ocasionalmente en especies relacionadas. Los papilomas son inducidos en la piel y en epitelios mucosos, frecuentemente en sitios específicos del cuerpo. Sin embargo,

algunas proliferaciones papilomatosas inducidas por tipos específicos de virus de papiloma portan un alto riesgo para la progresión hacia una lesión maligna (Revisado en Clifford GM et al, 2003; Munoz N et al, 2003; Matsukura T y Sugase M, 2001; zur Hausen H, 2002).

El término "subtipo" se usó en la década de 1980 para identificar muestras purificadas de tipos de HPV con patrones de restricción divergentes. Subsecuentemente, este término fue redefinido para referirse a una muestra purificada cuya secuencia de L1 es de 2 a 10% diferente de cualquier otro tipo conocido. Asimismo, las "variantes" de un tipo difieren por cerca del 2% del aislado originalmente, el cual es referido en este contexto como un "prototipo" o "genoma de referencia", mientras que las nuevas variantes pueden ser designadas por abreviaciones arbitrarias. Tales variantes mostraron la máxima divergencia cuando fueron muestreadas de grupos étnicos que evolucionaron por un largo tiempo sin contacto, por ejemplo africanos e indios americanos. Hay indicios de que las variantes de un mismo tipo difieren biológica y etiológicamente (Xi LF et al, 1998, Villa LL et al, 2000). Tales diferencias pueden contribuir a las disparidades observadas en la incidencia de cáncer cervical en diferentes regiones del mundo.

La infección por HPV es muy común, aun cuando la mayoría de los individuos infectados elimina la evidencia del virus sin desarrollar manifestaciones clínicamente reconocibles. Por tanto, muy pocas mujeres infectadas por HPV progresan a cáncer cervical invasivo. Un factor bien establecido que explica parcialmente el riesgo diferencial para el desarrollo del cáncer es el tipo de HPV. Alrededor de 40 tipos de HPV infectan el tracto anogenital (Zur Hausen H, 1996). Con base en datos acumulados de 11 estudios caso-control de la asociación entre cáncer cervical e infección por HPV de varios países (Munoz N et al, 2003), 15 tipos de HPV se clasifican como de alto riesgo para el desarrollo de cáncer cervical (Figura 3), 3 se clasifican como de probable alto riesgo, 12 se clasifican como de bajo riesgo y 3 se consideran como de riesgo indeterminado. Además de la infección por HPV, se consideran como factores de riesgo: un número múltiple de parejas sexuales, el hábito de fumar, y el uso de anticonceptivos orales.

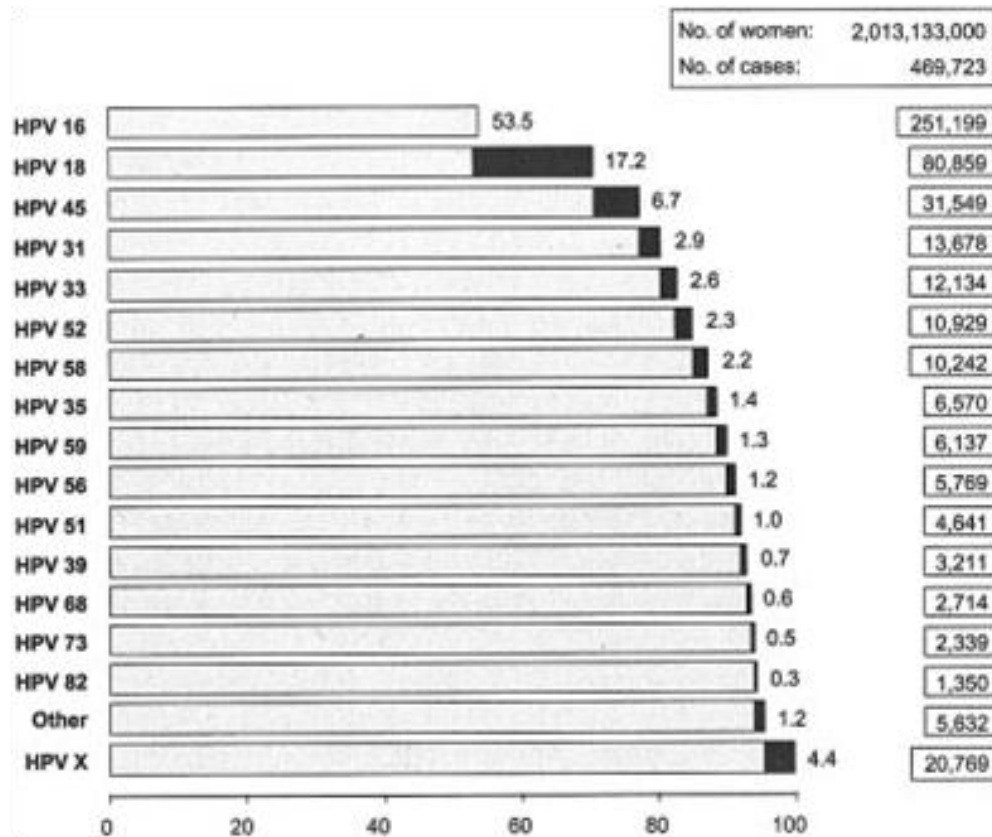


Figura 3. Porcentajes acumulados y números de casos de cáncer cervical atribuidos a los genotipos de HPV más frecuentes. Los datos provienen del análisis de estudios internacionales que incluyeron 25 países distribuidos en África (Norte y Sur), Asia, América (Norte, Centro y Sur), y Europa. (Muñoz N et al, 2004)

Las estimaciones de la prevalencia de la infección de HPV entre mujeres alrededor del mundo oscilan entre 2% y 44% de la población (Bosch FX y Sanjosé S, 2003). La amplia variación en los estimados se explica en gran medida por diferencias en el intervalo de edades de las poblaciones estudiadas y en la sensibilidad de los métodos basados en ADN usados para la detección de la infección por HPV. En general, los estudios basados en ADN, combinados con la medición de anticuerpos tipo-específicos contra antígenos de la cápside de los HPV, han mostrado que la mayoría (>50%) de mujeres jóvenes activas sexualmente, han sido infectadas por uno o más tipos de HPV genitales en algún punto en el tiempo.

La mayoría de las mujeres infectadas con un tipo específico de HPV no muestra evidencia del mismo sino de 6 a 12 meses más tarde (Franco EL et al, 1999; Ho GY et al 1998); mientras ciertos estudios han sugerido que la

infección con tipos oncogénicos y no oncogénicos muestra una duración similar (Richardson H et al, 2003), otros muestran una mayor duración para los tipos oncogénicos (Franco EL et al, 1999, Ho GY et al, 1998). Sin embargo, parece que el HPV-16 tiene un tiempo de eliminación particularmente más largo con respecto a otros tipos de HPV (Liaw KL et al, 2001; Richardson H et al, 2003). Tanto los tipos de HPV oncogénicos como los no-oncogénicos causan lesiones cervicales intraepiteliales escamosas de bajo grado (LSIL, por sus siglas en inglés: *low-grade squamous intraepithelial lesions*), mientras que la mayoría de las lesiones que son clasificadas como de alto grado (HSIL, por sus siglas en inglés: *high-grade squamous intraepithelial lesions*), carcinoma *in situ*, o carcinoma invasor son positivas para tipos oncogénicos de HPV. Aproximadamente el 70% de los cánceres cervicales invasivos son causados por HPV-16 (54%) ó HPV-18 (17%) (Munoz N et al, 2003) y alrededor del 90% de las verrugas genitales son causadas por HPV-6 ó HPV-11 (Greer CE et al, 1995). Las HSIL son las lesiones precursoras del cáncer invasivo, ya sea como paso subsecuente de las LSIL, o bien como eventos tempranos directos, causados por los tipos de HPV oncogénicos. Por tanto, la incidencia de cáncer cervical ha decrecido en áreas en las cuales han sido empleados programas para la detección de lesiones precancerosas. Mundialmente, el cáncer cervical es el segundo cáncer más común en mujeres, y casi el 80% de todos los casos ocurren en los países en vías de desarrollo (Jones SB, 1999). Se estima que en el año 2000, ocurrieron 470,000 nuevos casos en el mundo; la mayor tasa de mortalidad debida a cáncer cervical ocurre en los países menos desarrollados (Pecorelli S et al, 2003). Las infecciones por HPV también han sido halladas como causa de otros carcinomas anogenitales incluyendo el de pene (Rubin MA et al, 2001), vaginal (Dailling JR et al, 2002), vulvar (Trimble CL et al, 1996), y cánceres anales (Clark MA et al, 2004). Recientemente, el HPV también ha sido implicado como un posible agente etiológico en cánceres no anogenitales, tales como carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (Gillison ML y Lowy DR, 2004).

La respuesta inmune hacia los virus.

La defensa del hospedero resulta de la colaboración entre la inmunidad innata (fagocitos, proteínas solubles y barreras epiteliales) y la inmunidad adaptativa (anticuerpos, células efectoras y citotóxicas). El sistema inmune

innato detecta a los patógenos y actúa como primera línea de defensa, eliminando a la mayoría de las intrusiones; no tiene memoria específica, pero es responsable de activar a la inmunidad adaptativa. La respuesta adaptativa a su vez, activa mecanismos efectores humorales y celulares exquisitamente específicos hacia los antígenos foráneos así como células de memoria de larga vida (Figura 4).

En el inicio de una infección, la muerte o el daño celular liberan moléculas intra-celulares que son reconocidas, junto con moléculas propias de los patógenos, mediante receptores presentes en los elementos efectores celulares del sistema inmune innato con limitada diversidad y cuya activación se manifiesta como inflamación (Trinchieri G & Sher A, 2007). Al mismo tiempo, las células locales del parénquima y los fagocitos activados secretan citocinas inflamatorias y otras moléculas de defensa. Como resultado de esta respuesta inicial, las células dendríticas, las únicas células presentadoras de antígenos (APC, por sus siglas en inglés: *antigen presenting cells*) que pueden activar a los linfocitos T *naive*, son a su vez activadas para dar inicio a la respuesta inmune adaptativa (Shortman K y Liu Y-J, 2002).

La inmunidad adaptativa, en contraste, es casi infinitamente flexible y está basada en receptores de linfocitos T y B generados durante la ontogenia por medio de re-arreglos genéticos. La respuesta inmune innata genera señales que identifican a la naturaleza del antígeno y determinan el tipo apropiado de respuesta efectora inducida a los linfocitos después de la unión del antígeno (Bohem T, 2011).

La inmunidad humoral, a cargo de las células B y efectuada por los anticuerpos, favorece la eliminación de partículas virales libres de los fluidos corporales y puede prevenir la reinfección viral (McHeyzer-Williams M, et al 2012); en tanto, las respuestas inmunes efectuadas celularmente son esenciales para la eliminación de células infectadas por virus y la generación de memoria inmune.

Los linfocitos T juegan un papel central en la respuesta inmune adaptativa al participar de manera determinante tanto en la inmunidad celular como en la inmunidad humoral. Reconocen antígenos en forma de péptidos pequeños, unidos a las proteínas codificadas en el Complejo

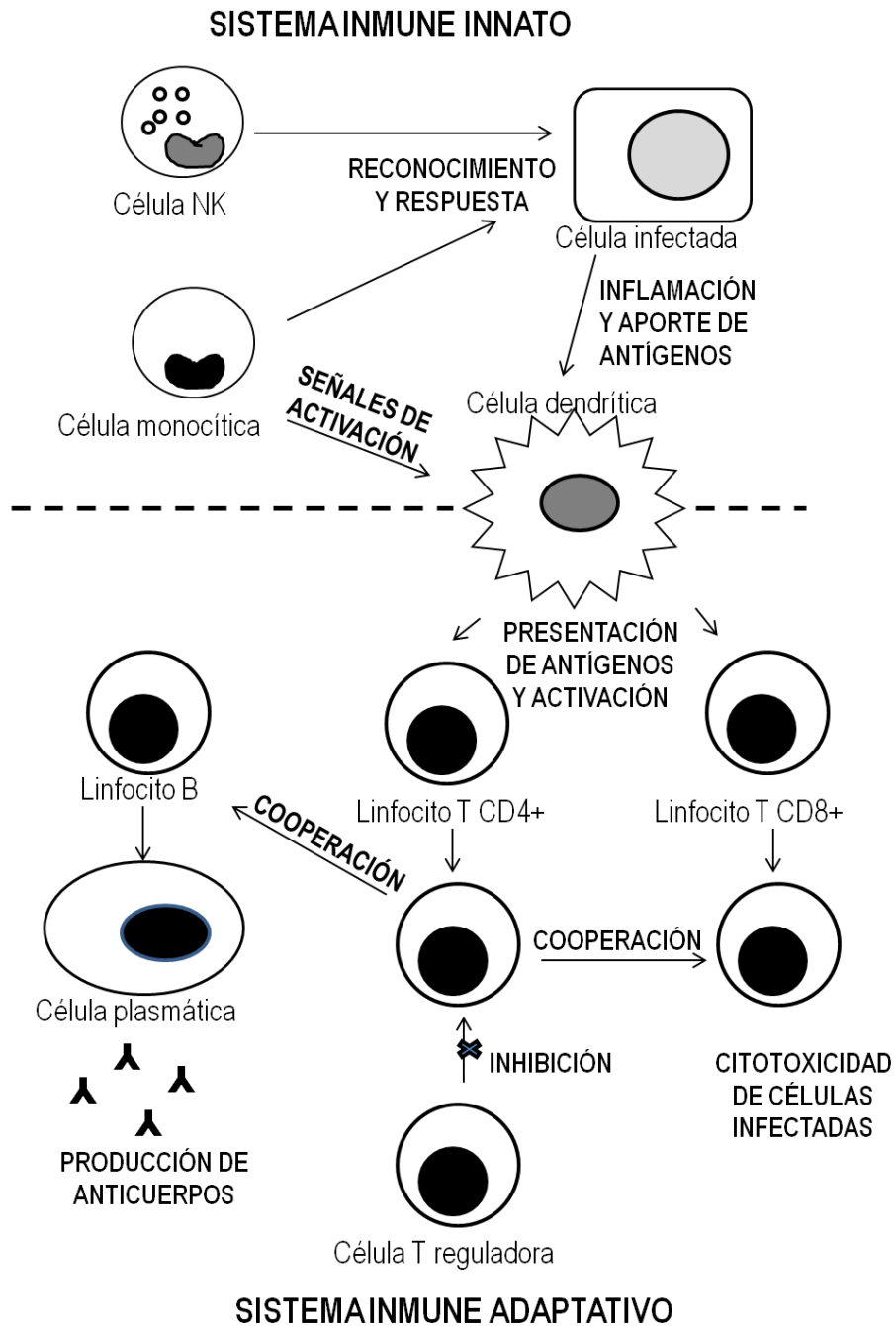


Figura 4. Representación esquemática de los compartimentos innato y adaptativo del sistema inmune celular, con las células presentadoras de antígenos como elementos de comunicación entre ambos. Se ilustran células relevantes en la respuesta inmune antiviral, así como sus funciones generales.

principal de histocompatibilidad (MHC por sus siglas en inglés: *Major Histocompatibility Complex*) y presentados como complejos asociados a la membrana en la superficie celular (Vyas JM et al, 2008). Hay dos subgrupos principales, identificados por los marcadores superficiales CD4 o CD8.

Las células T CD4+ reconocen antígenos exógenos, tomados del medio extracelular, fragmentados en el endosoma y presentados por moléculas MHC clase II (MHC-II); las células T CD8+ reconocen antígenos endógenos, que casi siempre derivan de la síntesis de proteínas intracelulares fragmentadas en el proteosoma hasta péptidos cortos y que son presentados por moléculas MHC clase I (MHC-I).

La interacción entre la célula T y la APC es muy compleja, dado que los linfocitos *naive* antígeno-específicos difícilmente son activados por antígeno únicamente. Por lo tanto, deben presentarse varias otras interacciones ligando/receptor en un orden regulado antes de que la célula T se active y comience a proliferar hacia células T efectoras "armadas". La activación de las células T CD4+ resulta en la secreción de una variedad de citocinas que ayudan y regulan a otras células. El patrón de expresión de citocinas define a los dos principales subtipos de células T CD4+ conocidas como células Th1 y Th2 (Kalinsky P & Moser M, 2005), así como a un subgrupo de células reguladoras (Figura 5).

Las células Th1 secretan interferón- γ (IFN- γ), Interleucina-2 e Interleucina-12 entre otros productos y crean un medio en el cual macrófagos, células asesinas naturales, y linfocitos T CD8+ citotóxicos son activados, generando inmunidad celular.

Las células Th2 secretan Interleucina-4 (IL-4) e Interleucina-10 (IL-10) y otras citocinas y ayudan a los linfocitos B activados por antígeno a diferenciarse hacia células plasmáticas y a secretar anticuerpos, las moléculas efectoras de las respuestas humorales. También refuerzan la actividad de células del sistema inmune innato, como los macrófagos.

Una tercera categoría de células T, células T reguladoras (Tregs) con el fenotipo CD4+CD25+, expresan como "rúbrica" al factor de

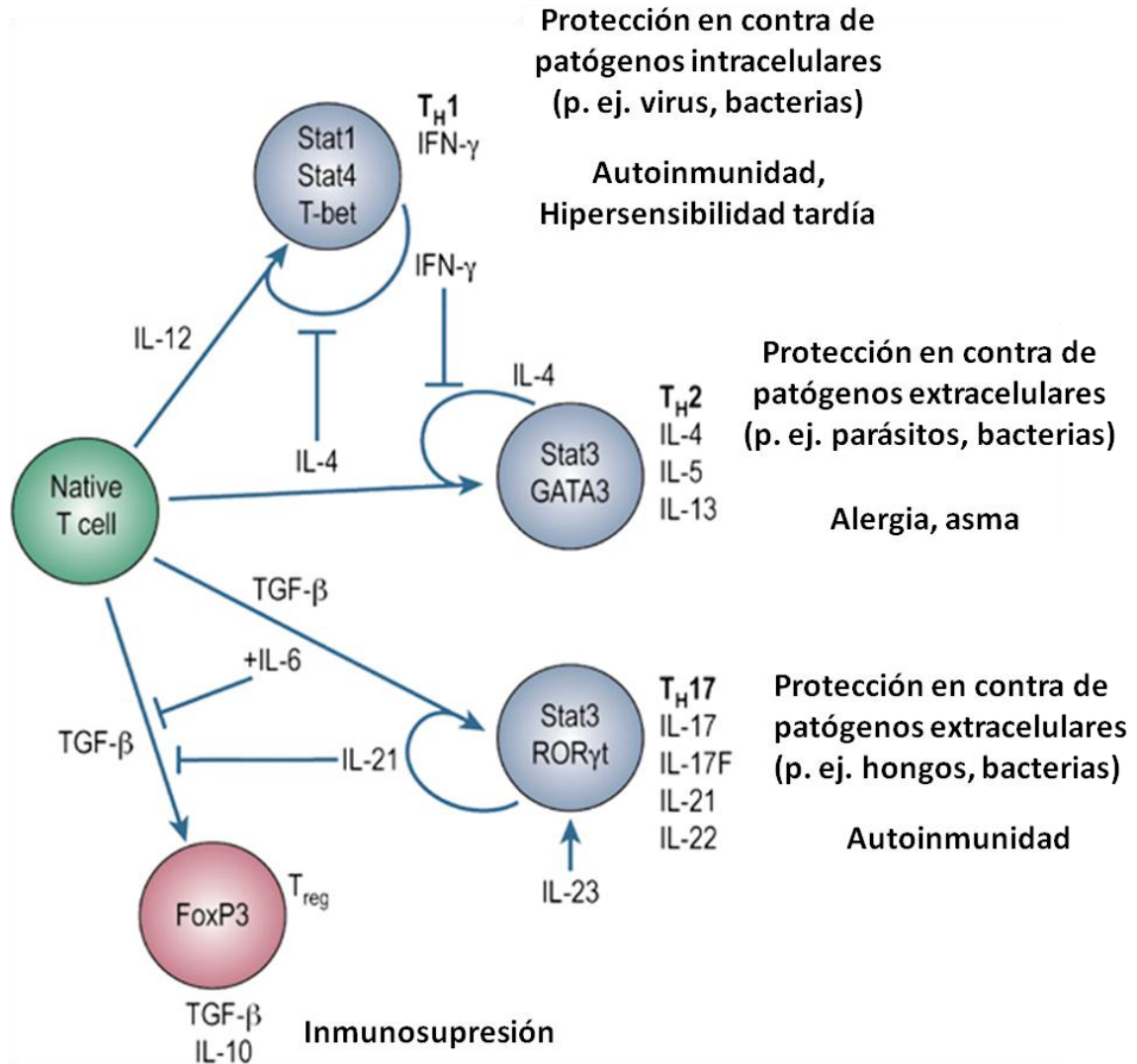


Figura 5. Representación de los diferentes fenotipos que pueden adquirir los linfocitos T CD4 después de ser activados por las células presentadoras de antígenos, de acuerdo con la secreción de citocinas, así como sus funciones. Tomado y modificado del sitio de internet www.hetalternatief.org.

transcripción FoxP3 y usualmente secretan IL-10 y Factor de proliferación transformante beta (TGF- β , por sus siglas en inglés *Transforming growth factor*). Se cree que las células con este fenotipo reconocen antígenos propios y funcionan para prevenir autoinmunidad; sin embargo, también regulan las respuestas hacia los antígenos exógenos, y se consideran implicados en infecciones virales crónicas e inmunopatológicas, así como en la evasión tumoral de la respuesta inmune (Vignali DAA et al, 2008).

La respuesta inmune hacia el HPV

Existen evidencias de que la resolución de una infección por el virus de papiloma humano involucra a la respuesta inmune; por ejemplo, la inmunosupresión de pacientes recipientes de trasplantes o de pacientes infectados con HIV se asocia con una persistente displasia y con un mayor riesgo para la progresión a la transformación celular maligna (Sillman FH et al, 1997, Ferenczy A et al, 2003). En dicha resolución probablemente se refleja la acción concertada de componentes inmunes innatos y adaptativos antígeno-específicos actuando localmente en la mucosa anogenital para mantener la homeostasis tisular. Sin embargo, los detalles precisos de este proceso, en el contexto de la historia natural de la carcinogénesis asociada al HPV no son completamente comprendidos.

Las infecciones por HPV no son sistémicas, restringiéndose al sitio inicial de la infección. Por tanto, la primera línea de defensa debe presentarse en las mucosas por medio del sistema inmune innato. En estudios al respecto, se observó que la regresión de verrugas genitales se asocia con un incremento en la infiltración de macrófagos, células asesinas naturales (NK por sus siglas en inglés: *natural killer*) y células T CD4⁺ (Coleman N et al, 1994). Pacientes respondedores al tratamiento de las verrugas con IFN- γ e IFN-2 α mostraron un marcado incremento en células inflamatorias tipo Th1 infiltradas, macrófagos y células NK, cuyas células CD4⁺ tuvieron una respuesta de proliferación hacia la proteína L1 del HPV-11. Sólo 15% de los pacientes respondedores tuvieron lesiones con linfocitos infiltrados que proliferaron en respuesta a la proteína E7 del HPV 11, independientemente de que las respuestas de proliferación fueran detectadas en la sangre periférica. En los pacientes no respondedores se observó la ausencia de células de Langerhans, con menor infiltración de células T y concentraciones reducidas de IL-1, GM-CSF y TNF α . También mostraron altos niveles de expresión de E7.

La respuesta inmune humoral contra el HPV.

La respuesta inmune humoral en contra de los virus de papiloma patógenos se dirige principalmente hacia la cápside, cuyo componente principal es la proteína L1, que se ensambla en 72 pentámeros para formar

un virión. Esta respuesta reconoce predominantemente determinantes conformacionales expuestos sólo cuando la proteína L1 se configura correctamente, como ocurre en el virus nativo (Kirnbauer R et al, 1992). Por tanto, los anticuerpos neutralizantes inmuno-dominantes generalmente son dirigidos en contra de epítopes conformacionales de L1 que son tipo-específicos (Christensen ND y Kreider JW, 1990; Christensen ND y Kreider JW, 1991; Christensen ND et al 1990; Ghim S et al, 1991; Kirnbauer R et al, 1994; Roden RBS et al, 1995) aunque se ha observado una limitada reactividad cruzada entre tipos relacionados estrechamente tales como el HPV-16 y el -33, el HPV-18 y el -45, y el HPV-6 y el -11 (Christensen ND et al, 1996; Combita AL et al 2002; Giroglou T et al, 2001; Roden RBS et al, 1996, White WI et al, 1998).

La unión del anticuerpo a la cápside viral puede ser medida mediante ELISA usando partículas tipo-virus (VLP por sus siglas en inglés: *virus-like particles*) como substrato (Christensen ND et al, 1994). Las VLP se corresponden con una cápside correctamente conformada por la proteína L1 vacía (sin ADN), que morfológicamente es idéntica a un virión de HPV nativo, conteniendo los principales epítopes neutralizantes (Hagensee ME et al, 1994; Christensen ND et al, 1996).

La capacidad para la neutralización viral puede ser ensayada *in vivo* usando viriones purificados y células "blanco" susceptibles (Christensen ND y Kreider JW, 1990), o *in vitro* usando pseudoviriones codificando un gene reportero expresable en una célula "blanco" susceptible (Roden RB et al 1996).

La detección de la respuesta humoral hacia la cápside de los virus de papiloma ha permitido determinar que aparece más lentamente que aquellas hacia la mayoría de las infecciones por virus patógenos (Carter JJ et al, 2000). Los títulos de anticuerpos que siguen a la infección natural son bajos, y es difícil estandarizar los ensayos para su detección (Ferguson M et al, 2005). Para los virus de papiloma mejor estudiados (HPV-6, -11, -16 y -18), los tiempos promedio de seroconversión exceden a los seis meses, y parece que de un 30% a un 50% de individuos con evidencia de infección genital persistente por HPV nunca adquieren anticuerpos (Carter JJ et al 2000). Después de la eliminación de la infección viral, los títulos de anticuerpos hacia la cápside caen. Sin embargo, aproximadamente el 50% de individuos seropositivos para HPV-16 y negativos para ADN de HPV-16 mantendrán anticuerpos entre 5 a 7 años (Wang SS et al 2004). La

desaparición de anticuerpos después de la infección no está bien documentada para otros tipos de virus. Donde las infecciones persisten, los anticuerpos también parecen persistir, y los pacientes con cáncer derivado de infecciones por HPV genital de alto riesgo pueden tener títulos de anticuerpos hacia la cápside medibles muchos años después de la infección que ocasionó el cáncer, aunque la seropositividad para el tipo de HPV correspondiente en pacientes con cáncer está generalmente reportada entre 30% y 50% (Carter JJ et al, 2000). Por otra parte, anticuerpos hacia los virus de papiloma cutáneos comunes (HPV-1 y -2) son encontrados entre 30% y 50% de niños con verrugas, y con una frecuencia similar en grupos de adolescentes no seleccionados (Carter JJ et al, 1993; Cubie HA et al, 1998). Los anticuerpos hacia la cápside de los virus de papiloma causantes de cáncer en la piel de pacientes inmunosuprimidos (HPV-5 y -8) sin embargo, parecen ser raros en la población sana (Favre M et al, 1998). Por tanto, la concentración de anticuerpos hacia la cápside es probablemente una medida de la infección persistente por HPV, aunque muchos individuos con infección no tienen anticuerpos, y la intensidad en la que los anticuerpos son producidos puede ser determinada por el sitio de la infección, la carga viral o la inflamación local.

En contraste, se ha reportado que los anticuerpos que se presentan a continuación de una infección natural con HPV-16 son protectores contra una infección subsecuente con tipos de HPV específicos y relacionados (Ho GY et al 2002). Se desconoce si anticuerpos inducidos naturalmente hacia otros tipos de HPV confieren una protección similar. Por tanto, las respuestas inmunes específicas hacia la cápside son de limitada utilidad diagnóstica y parece que no están relacionadas con el proceso de eliminación viral.

La proteína L2, constituyente menor de la cápside, es inmunogénica durante la infección natural (Viladiu P et al, 1997; Kanda T et al, 1995), aunque es difícil detectar anticuerpos hacia la proteína L2 después de la infección natural, quizá porque está ubicada dentro del virión y los epítopes relevantes se exponen únicamente después de que el virión se unió a la superficie celular (Day PM et al, 2008).

Por otra parte, las respuestas inmunes humorales en contra de las 6 proteínas no estructurales del virus de papiloma, expresadas comúnmente

durante la infección (E1, E2, E4, E5, E6, E7) han sido medidas usando proteínas de fusión recombinantes o péptidos lineales. La respuesta más consistente es vista en pacientes con cáncer cervical asociado con la infección por HPV-16, quienes muestran anticuerpos hacia la proteína E7 (Jochmus-Kudelka et al, 1998).

La respuesta inmune celular contra el HPV.

La activación de los linfocitos T CD4+ y CD8+ depende de la presentación de antígenos por parte de las células presentadoras de antígenos profesionales, como lo son las células dendríticas, las cuales además de incorporar a los antígenos deben ser activadas por las señales de daño que se producen en el sitio afectado y que las dirigen a los órganos linfoides secundarios para encontrar a los linfocitos *naive* (Figura 6). De este modo, está plenamente demostrado que la inmunización con proteínas derivadas del HPV induce una fuerte respuesta con capacidad protectora, tanto en modelos animales como en humanos; sin embargo, no es tan clara la naturaleza de la respuesta inmune inducida durante la infección natural. La población de los linfocitos T específicos que controlan la infección o en su caso la transformación celular decae debido a la homeostasis, y sólo permanece un pequeño porcentaje de células cuya función es preservar el reconocimiento antigénico en forma de memoria. Se asume que esta población pueda ser reactivada *in vitro* fácilmente, ante la re-exposición a su antígeno específico, lo cual representa un reflejo de la respuesta inmune que desarrolló el donador hacia el HPV. De esta forma, las células inmunes son obtenidas y cultivadas en presencia de moléculas que representan al antígeno relevante que será evaluado para entonces medir su activación mediante alguna respuesta típica de estas células, por ejemplo la secreción de citocinas, la actividad citotóxica o la presencia de receptor específico mediante polímeros tetrámeros o pentámeros de moléculas del MHC (denominadas HLA en humanos: *Human leukocyte antigens*) asociados con péptidos específicos.

Respuestas hacia las proteínas E2, E6, E7 y L1 se han encontrado tanto en sangre periférica de donadores sanos como de pacientes con diversos grados de lesión, aunque estas respuestas reflejan por lo general

una baja frecuencia de células respondedoras y debido a ello puede requerirse de fuertes estímulos para reactivar y detectar a estas clonas (Davidson EJ et al, 2003; Shepherd PS et al, 1996). Aunque al parecer existe una mayor frecuencia de clonas específicas infiltradas en el cérvix y en nódulos linfáticos, existen pocos estudios al respecto debido a las dificultades

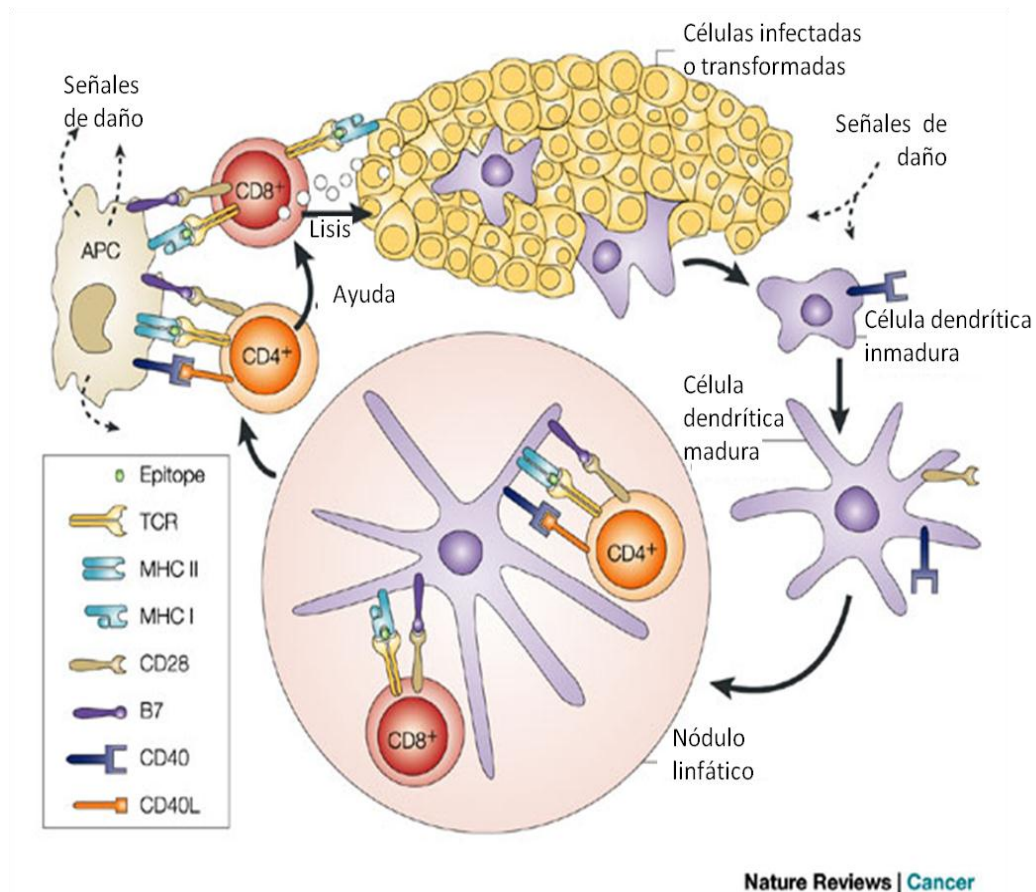


Figura 6. En esta figura se muestra cómo las células dendríticas toman muestras de proteínas de las células afectadas, las procesan hasta péptidos y en presencia de señales de daño expresan señales co-estimulatorias y migran hacia los nódulos linfáticos. Allí, presentan los péptidos asociados a las moléculas de histocompatibilidad clase I y clase II a los linfocitos T CD4+ y CD8+ (*crosspriming*) los cuales devienen células efectoras. Las células T CD4+ expresan la molécula CD40L con la cual recíprocamente estimulan a las células dendríticas que expresan CD40. Los linfocitos T adquieren moléculas de "homing" por lo cual se dirigen a los tejidos para atacar específicamente a las células portadoras de antígenos. Los linfocitos T CD8+ participan en la muerte de las células infectadas o transformadas y los linfocitos T CD4+ cooperan en el aumento de la producción de citocinas tal como la IL-2. En el proceso, son generadas clonas de linfocitos T de memoria. (Tomado y modificado de Tindle WR, 2002)

técnicas asociadas con la obtención de dichas células (Passmore JA et al, 2006; Evans EML et al, 1997). Por otra parte, adultos sanos y pacientes con NIC asociada con HPV-16 mostraron reacciones positivas a pruebas cutáneas, como una medida de inmunidad celular a péptidos de E2, E6 y E7 (van den HM et al, 2008).

Se considera que la respuesta inmune celular está dirigida principalmente hacia las proteínas de expresión temprana, principalmente la E6 y la E7 debido a que estas proteínas se expresan en las células infectadas y se requieren en las lesiones malignas para mantener el estado transformado de la célula. Linfocitos T anti E7 se han detectado por diversos métodos: proliferación de células T cooperadoras (De Grujil TD et al, 1998; Kadish AS et al, 1997), linfocitos T citotóxicos (Bontkes HJ et al, 2000), secreción de interferón gamma (van der Burg SH et al, 2001), y mediante tetrámeros de moléculas HLA (Youde SJ et al, 2000), hallándose estas respuestas principalmente en pacientes con lesiones persistentes, incluido cáncer, y en bajos niveles sistémicos. Aun cuando la respuesta celular mediada por linfocitos T CD8+ específicos hacia epítopes de E7 es hallada en pacientes con cáncer cervical, es claramente incapaz de eliminar la patología (Oerke S et al, 2005).

En diversos estudios los linfocitos T CD8+ anti-E6 han sido encontrados de manera diferencial, presentes en donadores sanos pero ausentes en pacientes con infecciones avanzadas y en cáncer cervical, en tanto que la respuesta anti-E2 y anti-E6 se presentan sobre todo en donadoras sanas. Por ejemplo, en un estudio longitudinal la respuesta de CTL de mujeres con infección por HPV-16 y lesiones escamosas intraepiteliales mostró respuestas diferenciales hacia la proteína E6 asociadas con la persistencia viral (Nakagawa M et al, 2000). La ausencia de esta respuesta ha sido también detectada en pacientes con carcinoma (Bontkes HJ et al 2000). Puesto que la presencia de una respuesta de células T se encuentra frecuentemente en sujetos sanos, se sugiere que juega un papel protector en contra de la infección persistente por HPV y el desarrollo de patologías malignas asociado (Welters MJ et al, 2003).

En contraste con la distribución aparentemente diferencial en las respuestas hacia las proteínas virales tempranas, la respuesta de células T

anti-L1 se presenta en un espectro más amplio de distribución, pues ha sido comúnmente hallada tanto en pacientes con lesiones avanzadas como en donadoras sanas, lo cual sugiere que el procesamiento de las proteínas virales tempranas y tardías es diferente, probablemente debido a la asequibilidad de las proteínas durante el curso de la infección natural, siendo la principal proteína de la cápside de los viriones (L1) la forma más asequible para las células presentadoras de antígenos al inicio de la infección. De acuerdo con ello, respuestas de células T CD4+ y CD8+ fueron detectadas con mayor frecuencia en el compartimento cervical en comparación con la sangre periférica (Passmore JA et al, 2006). Aunque se ha propuesto que la respuesta anti-L1 carece de correlación con la enfermedad (van Poelgeest MIE et al, 2006), ésta fue detectada en un mayor porcentaje en pacientes con cáncer de vulva en comparación con donadores normales (Davidson EJ et al, 2003). En contraste, ha sido reportado que la detección de la proteína L1 mediante análisis histológicos, correlaciona con un buen pronóstico para la involución de las lesiones asociadas a la infección por HPV (Griesser H et al, 2009).

La regulación negativa de la respuesta inmune contra el HPV.

La evasión de la respuesta inmune por parte de las células infectadas se asocia con el desarrollo de patologías neoplásicas. Esta evasión puede verse favorecida por los mecanismos reguladores del sistema inmune. Por ejemplo, la tendencia de las células T para secretar citocinas del perfil Th2 (IL-10, IL-4) con una consecuente inhibición de la actividad de las células citotóxicas (Bais AG et al, 2005). Por otra parte, se sabe que la respuesta específica de células T contra células tumorales y virus puede ser severamente restringida por las células T CD4+ reguladoras expresando (Fox)-P3 (CD4+CD25+FoxP3+). La presencia de varios tumores sólidos se asocia con frecuencias incrementadas de células T reguladoras circulantes (Zou W, 2006), incluyendo al cáncer cervical (Visser J et al, 2007; Molling JW et al, 2007).

Por otra parte, como ya se mencionó, el ciclo de replicación del HPV presenta características que complican su reconocimiento por parte del sistema inmune. En primer lugar, durante las distintas etapas del ciclo participan diferentes proteínas virales, frecuentemente con una baja

expresión, y localizadas en el núcleo celular (Stoler MH et al, 1992). En segundo lugar, la replicación del HPV carece de una fase de lisis celular, puesto que los viriones, que son formados en la fase final de la diferenciación del epitelio cervical, son liberados en células que están ya programadas para sufrir una "muerte natural", y su salida se facilita por medio de la modificación del cito-esqueleto, más que por la ruptura de las células (Rudolf MP et al, 1999). Estas características, entre otras, le confieren un "bajo perfil" de expresión y tienen como consecuencia la ausencia de inflamación así como de una liberación sistémica de viriones, lo cual minimiza la liberación de señales de "alarma" que activen y recluten a los elementos efectoros del sistema inmune. Además, es probable que durante la infección natural por el HPV, los antígenos virales sean presentados en condiciones poco favorables en ausencia de un proceso inflamatorio que induzca las señales secundarias co-estimuladoras; la presentación de antígenos bajo estas condiciones puede conducir a la inhibición más que a la activación de la respuesta inmune. Por ejemplo, se ha demostrado que implantes celulares que expresan a la proteína E7 no son rechazados entre ratones singénicos a menos que se induzca un estado de inflamación durante las primeras fases de la presentación de antígenos, lo cual sugiere que la expresión de E7 por sí misma se asocia con una presentación antigénica ineficiente que induce un estado de tolerancia inmunológica (Doan T et al, 1999).

Por otro lado, ninguno de los genes del HPV codifica proteínas cuya función principal sea la evasión de la respuesta inmune y la capacidad del virus reside en el "bajo perfil" de su ciclo de replicación; sin embargo, se ha adjudicado a las proteínas virales no estructurales E6 y E7, además de la reconocida función de regular el ciclo de proliferación de sus células huéspedes, otras actividades implicadas en la evasión de la respuesta inmune.

Entre esas funciones se han descrito: la capacidad de la proteína E7 del HPV-16 para bloquear la señalización intracelular generada por los interferones tipo I (Barnard P et al, 2000), así como la activación del promotor de interferón beta (Park JS et al, 2000); la capacidad de E6 y E7 para inhibir la producción de la quimiocina MCP-1, atrayente de monocitos, células T y células NK (Kleine-Lowinski K et al, 2003); la inhibición de la producción de IL-8, citocina inicialmente descrita como quimio-atrayente para granulocitos y

que ahora se conoce que también atrae a células T (Huang SM y Mc Cance DJ, 2002); y la inhibición de IL-18, un potente inductor de interferón gamma (interferones tipo II) (Cho YS et al, 2001; Lee SJ et al, 2001). En conjunto, estas actividades sugieren que las proteínas E6 y E7 son capaces de ejercer un mecanismo de evasión de la respuesta inmune al impedir la infiltración y la activación de células T, de macrófagos, de células asesinas naturales (NK), y de las células dendríticas. Sin embargo, aun no se ha establecido con certeza la relevancia que estos mecanismos tienen in vivo, además de que existen otras moléculas, como el Factor de necrosis tumoral (TNF, del inglés: *Tumor necrosis factor*), que también cumplen con la función de concertar la respuesta inmune en contra de las infecciones virales.

Otra consecuencia de la capacidad del HPV para replicarse causando un mínimo de daño celular, es la limitación en la cantidad de proteínas virales que quedan accesibles a las células dendríticas por medio de la fagocitosis de células dañadas. La importancia de las células dendríticas en la respuesta inmune en el tejido cervical infectado se refleja indirectamente en la disminución de su número, la cual es más pronunciada conforme la lesión persiste o avanza (Jiménez-Flores R et al, 2006), aunque queda todavía por evaluar si esta disminución sea causa o efecto de la persistencia de las lesiones. Asimismo, además de las actividades inhibitorias y supresoras de quimiocinas y citocinas de las proteínas E6 y E7 indicadas anteriormente, se ha descrito una disminución en la expresión de moléculas de adherencia (*cadherina-E*) en células que expresan a la E6 (Matthews K et al, 2003), lo cual puede interferir con el contacto entre los queratinocitos y las Células de Langerhans; además, también ha sido reportada una disminución en la expresión del factor quimiotáctico MIP-3 alfa (Guess JC McCance DJ, 2005), un potente atrayente de células presentadoras de antígenos, lo cual puede representar un posible mecanismo para evitar el reclutamiento de estas células, cuando las ubicadas originalmente han migrado.

Propósito y justificación.

El cáncer cervical uterino (CaCu) es la segunda causa de mortalidad en el Mundo debida a padecimientos oncológicos en mujeres, y tiene la mayor tasa de incidencia entre la población femenina de los países en vías de desarrollo; en México, representa la principal causa de muerte por tumores malignos en mujeres, con un 14.4% del total (INEGI, 2002).

La Organización Mundial de la Salud reconoce que el desarrollo de CaCu se asocia estrechamente con la infección por el virus de papiloma humano (HPV) y que la infección por este virus representa la enfermedad por transmisión sexual más difundida; asimismo, en más del 95% de muestras analizadas puede ser encontrado ADN de alguno de los tipos de HPV considerados de alto riesgo (principalmente los tipos 16 y 18).

Se ha evaluado la capacidad del sistema inmune para limitar el desarrollo del CaCu, y respuestas específicas contra antígenos de HPV han sido inducidas o detectadas experimentalmente *in vitro* o en modelos animales. Este conocimiento ha conducido a la propuesta de desarrollar vacunas profilácticas y terapéuticas contra el virus.

Actualmente, dos fórmulas empleadas en la vacunación profiláctica están disponibles comercialmente; sin embargo, el desarrollo de alternativas terapéuticas no ha tenido éxito. La optimización de las opciones profilácticas y el desarrollo de opciones terapéuticas pueden ser impulsados por una mejor comprensión de la respuesta inmune durante la infección natural por el HPV. Además, los tipos de HPV presentan ligeras diferencias en sus características genotípicas en las diferentes zonas geográficas, pero que pueden generar diferencias en la respuesta inmune.

Por tanto, en este trabajo evaluamos la respuesta inmune de linfocitos T de pacientes con lesiones cervicales tempranas hacia proteínas de la cápside (L1) de los HPV-16 y -18, considerando que estas proteínas representan una fuente de antígenos importante durante estos estadios de la enfermedad.

Hipótesis.

En la sangre periférica de pacientes con lesiones cervicales escamosas intraepiteliales tempranas existen linfocitos T específicos hacia la proteína L1 del HPV, en una proporción mayor en comparación con donadoras sanas. Asimismo, tanto los leucocitos de las pacientes con lesiones tempranas asociadas con HPV como de donadoras normales tendrán una respuesta semejante al ser estimulados *in vitro* con antígenos empleados comúnmente en vacunación, como un indicativo de memoria inmune.

Objetivos.

Objetivo General.

Analizar *ex vivo* la respuesta de linfocitos T específicos hacia antígenos derivados de la proteína L1 de HPV y antígenos usados comúnmente en vacunación, en pacientes con lesiones tempranas asociadas con infección por HPV.

Objetivos Particulares.

- 1) Obtener leucocitos de sangre periférica y muestras de tejido cervical de pacientes con lesiones tempranas asociadas con HPV y controles normales.
- 2) Determinar el tipo de infección por HPV de las lesiones cervicales de las pacientes.
- 3) Determinar la respuesta de proliferación de leucocitos de sangre periférica de pacientes con LSIL y controles normales en presencia de antígenos de la proteína L1 de HPV y antígenos usados comúnmente en vacunación.
- 4) Determinar la presencia de anticuerpos específicos hacia la proteína L1 de HPV y antígenos usados comúnmente en vacunación, en sueros de pacientes con LSIL y controles normales.
- 5) Determinar la concentración de citocinas Th1 y Th2 en sueros de pacientes con LSIL y controles normales.
- 6) Determinar la concentración de citocinas Th1 y Th2 en medios condicionados por leucocitos de sangre periférica activados de pacientes con LSIL y controles normales.

7) Determinar la presencia de células T reguladoras (CD4+CD25+FoxP3+) y de células CD8+IFN γ + en leucocitos de sangre periférica de pacientes con LSIL y controles normales.

8) Evaluar la frecuencia de células CD8+ con reconocimiento específico por péptidos derivados de las proteínas L1 de los HPV-16 y -18.

Materiales y métodos.

Donadoras y muestras biológicas.

Pacientes atendidas en la Clínica de Displasias de la Fundación Cruz-Talonia y en la Clínica de Displasias del Hospital General de México fueron estudiadas, bajo consentimiento informado. El material biológico fue manipulado de acuerdo con las directrices institucionales de experimentación y seguridad. La población de estudio fue seleccionada de mujeres referidas a colposcopia debido a una citología anormal, y mujeres sin una historia de anomalías citológicas que fueron atendidas para una auscultación ginecológica rutinaria. A todas las mujeres se les realizaron análisis citológicos e histopatológicos de muestras bajo colposcopia. El diagnóstico citológico fue clasificado de acuerdo con el Sistema Bethesda (Solomon D, 1989). Biopsias de tejido con lesiones evidenciadas por tinción aceto-blanca, o tejido normal alrededor de la zona de transformación fueron obtenidas bajo colposcopia, colocadas en un tubo conteniendo solución amortiguadora de fosfatos estéril, y procesadas el mismo día para la obtención del ADN. También se obtuvieron muestras de sangre de las pacientes y de las donadoras controles con citología normal, y además de un grupo de mujeres jóvenes quienes fueron vacunadas con tres dosis de Gardasil® (Merck S&D, USA).

Detección de ADN de HPV mediante PCR.

Todos los reactivos usados para la purificación y amplificación de ADN se compraron de Invitrogen, USA. Las biopsias cervicales se trataron con proteinasa K. El ADN se extrajo con una mezcla de fenol/cloroformo y se precipitó con etanol. El ADN de HPV fue amplificado usando los oligonucleótidos MY09 (5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC- 3') y MY11 (5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3'), los cuales amplifican un fragmento conservado de 450 pb del gene de L1 (Manos MM et al 1989). El ADN genómico (100 ng) fue desnaturalizado mediante incubación a 95°C por 30 s, la unión de los oligonucleótidos se realizó a 45°C por 30 s y la polimerización a 72°C por 60 s. El ciclo se repitió 30 veces. La amplificación

específica de HPV-6, -11, -16, -18, -31, -33, -39, -45, -52 y -58 se realizó usando un lote de oligonucleótidos para la PCR de E7 descritos previamente (Walboomers et al, 1999). El ADN genómico (100 ng) se desnaturalizó mediante incubación a 95°C por 60 s. La unión de los oligonucleótidos se llevó a cabo a 45°C por 2 min y la polimerización a 72°C por 90 s. El ciclo se repitió 40 veces. Para asegurar la integridad del ADN, el gene de β -actina fue amplificado para todas las muestras.

Ensayos de proliferación de linfocitos.

a) Mediante incorporación de timidina tritiada.

El suero de muestras sanguíneas se separó de la fracción celular mediante centrifugación. Las muestras de suero se inactivaron mediante incubación a 57°C por 30 minutos y entonces se crio-preservaron a -70°C hasta su uso. La fracción celular se mezcló 1:1 v/v con solución amortiguadora de fosfatos (SAF), se cargó sobre un gradiente de Histopaque con 1.077 de densidad (Sigma-Aldrich, USA) y se centrifugó para enriquecer la fase conteniendo a los leucocitos de sangre periférica (LSP). Entonces, 5×10^5 LSP se sembraron en placas de 96 pozos (Corning, USA) en 200 μ L de IMDM (invitrogen, USA) suplementado con 10% de suero autólogo (IMDM-10S), en presencia de 1 μ L de Infanrix Hexa® (antígenos de virus de poliomielitis, y hepatitis B, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae* y *Bordetella pertussis*, GSK Biomedicals, Bélgica) ó 1 μ L de Cervarix® (proteína L1 de HPV16/18, GlaxoSmithKleen, Bélgica) durante 5 días. Entonces, se adicionaron 0.5 μ Ci de timidina tritiada (Dupont NEN, USA) por pozo y se incubó por 16 horas más. Finalmente, los LSP se cosecharon y se determinó la incorporación de timidina tritiada. El índice de proliferación corresponde con el cociente de:

$\text{cpm obtenidas de los LSP con el antígeno} / \text{cpm de los LSP control para cada muestra.}$

b) Mediante marcaje con carboxifluoresceína y citometría de flujo.

Leucocitos de sangre periférica se obtuvieron de forma semejante al apartado anterior, y se marcaron con carboxifluoresceína 2 μ M en SAF, a temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente, se pusieron en cultivo en 200 μ L de IMDM (invitrogen, USA) suplementado con 10% de suero autólogo (IMDM-10S), en presencia de 1 μ L de Cervarix® (proteína L1

de HPV16/18, GlaxoSmithKleen, Bélgica) durante 5 días. Transcurrido este tiempo, las células fueron cosechadas y marcadas con 1 μ L de anti-CD4/PE (R&D Systems, USA) y 1 μ L de anti-CD8/APC (R&D Systems, USA) a 4°C durante 30 min. El decremento en la marca de carboxifluoresceína se ensayó mediante citometría de flujo.

Detección de anticuerpos séricos mediante ELISA.

Anticuerpos séricos de pacientes con LSIL y de donadores sanos fueron probados mediante *ELISA*. Para este propósito, inmuno-placas (Costar-Corning, USA) se cubrieron con 50 μ L/pozo de Infanrix-Hexa® ó de Cervarix® diluidas 1:20 en SAF e incubadas a 4°C toda la noche. Después de lavar las placas, los posibles sitios de unión inespecífica fueron bloqueados con albúmina sérica bovina (Research Organics, USA) al 2% por 2 hr a 37°C. Entonces se adicionaron 50 μ L de suero sanguíneo diluido 1:500 a cada pozo y se incubaron por 2 hr a 37°C. Posteriormente, se adicionaron 50 μ L/pozo de IgG de cabra anti-IgG humana conjugada con fosfatasa alcalina (Invitrogen, USA) diluida 1:5000 y se incubaron por 1 hr a 37°C. Finalmente se adicionó a los pozos substrato de fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich, USA) diluida en una solución de dietanolamina al 10% (masa/volumen) (Sigma-Aldrich, USA). La absorbancia fue leída a 405 nm en un lector de placas para ELISA (Molecular Devices, USA). Los valores finales se obtuvieron después de substrar la absorbancia de la reactividad no-específica obtenida en los pozos con solución salina a la reactividad obtenida en los pozos con antígeno.

Determinación de células CD4+CD25+FoxP3+ mediante citometría de flujo.

5x10⁵ LSP se incubaron con 1 μ L de anti-CD4/PerCP (R&D Systems, USA) y 1 μ L de anti-CD25/PE (R&D Systems, USA) a 4°C durante 30 min, se lavaron dos veces y subsecuentemente se fijaron y permeabilizaron (*Cytofix/CytoPerm* y *Perm/Wash* BD Biosciences); finalmente, se marcaron con anti-FoxP3/APC (eBioscience, USA) e isotipos correspondientes. Después de tres lavados finales, las células se resuspendieron con paraformaldehído al 2% en SAF y se determinó el porcentaje de células CD4+CD25+FoxP3+ mediante citometría de flujo en un equipo FACS ARIAL (BD, USA).

Purificación y maduración de células dendríticas derivadas de monocitos.

Los LSP se fraccionaron por adherencia a platos de plástico durante 2 hr a 37°C. La fracción adherente se cultivó por 4 días en medio IMDM-10S suplementado con 30 ng/mL de rhGM-CSF (R&D Systems, USA) y 20 ng/mL de rhIL-4 (R&D Systems, USA). Posteriormente, las células se cosecharon y se incubaron durante una hora con 5 μ L/mL de Cervarix® a 37°C. Finalmente las células se mantuvieron en cultivo por dos días más en IMDM-10S en presencia de Cervarix® o de péptidos sintéticos, con rhGM-CSF, rhIL-4 y 20 μ g/mL de poli-I:C (Sigma-Aldrich, USA) para inducir su maduración.

Ensayo para la proliferación de linfocitos inducida por células dendríticas.

Los LSP fueron incubados con 2 μ M de carboxifluoresceína (Sigma-Aldrich) durante 15 min a temperatura ambiente. Después de tres lavados con IMDM-10S, 5×10^5 células fueron incubadas en 200 μ L de IMDM-10S durante 5 días con 1 μ L de Cervarix®. Alternativamente, los LSP fueron incubados con células dendríticas autólogas derivadas de monocitos y células dendríticas “cargadas” con Cervarix®. Después de 5 días las células fueron cosechadas y marcadas con 1 μ L de anti-CD4/PE (R&D Systems, USA) y 1 μ L de anti-CD8/APC (R&D Systems, USA) a 4°C durante 30 min. El decremento en la marca de carboxifluoresceína fue ensayado mediante citometría de flujo.

Determinación de células CD8+IFN γ + inducidas con fitohemaglutinina.

5×10^5 LSP fueron sembrados en placas de 96 pozos (Corning, USA) en 200 μ L de IMDM-10S, en la presencia de fitohemaglutinina (invitrogen, USA) diluida 1:100 como concentración final, e incubados durante 5 días. Después de este tiempo, las células fueron cosechadas y marcadas con 1 μ L de CD8/APC y 1 μ L de anti-IFN γ /FITC (R&D Systems, USA), durante 30 min a 4°C, y finalmente, el porcentaje de células CD8+IFN γ + se evaluó en un citómetro FACSAriaII (BD, USA).

Cuantificación de citocinas.

5×10^5 LSP fueron incubados en 200 μL de IMDM con 2.5 μL de esferas acopladas a anti-CD3/CD28 (*Dynabeads CD3/CD28 Human T-Activator*, Invitrogen, USA). Después de 4 días el medio condicionado por las células fue colectado y almacenado a -70°C . La concentración de citocinas en esos medios fue determinada por medio de citometría de flujo mediante un *kit* para la determinación de citocinas Th1/Th2, de acuerdo con las instrucciones del proveedor (*Cytometric Bead Array: Human Th1/Th2 cytokine kit*, BD Biosciences, USA). Los niveles de citocinas en el plasma sanguíneo fueron determinados con el mismo *kit*, a partir de muestras sanguíneas después de la separación de la fracción celular, y también de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

Obtención de péptidos sintéticos derivados de las proteínas L1 de los HPV-16 y -18 con afinidad por el antígeno de histocompatibilidad HLA-A2.

El alelo de histocompatibilidad HLA-A2 se presenta con una frecuencia aproximada al 50% en la población mexicana (Weckman AN et al 1997 y De Leo C et al, 1997). Con la finalidad de obtener péptidos con afinidad por esta molécula, las secuencias de las proteínas L1 de los HPV-16 y -18 fueron introducidas en de un programa conteniendo un algoritmo de predicción de la afinidad de péptidos por las moléculas codificadas por el Complejo Principal de Histocompatibilidad, disponible en la internet y desarrollado por la *Bioinformatics and Molecular Analysis Section (BIMAS), Computational Bioscience and Engineering Lab (NIH, USA)* (http://thr.cit.nih.gov/molbio/hla_bind). Posteriormente, la síntesis de péptidos a partir de las secuencias con los índices de afinidad más altos fue solicitada (Invitrogen, USA).

Evaluación de la afinidad de péptidos sintéticos por la molécula HLA-A2, y obtención de complejos tetrameros.

1.5×10^5 células de la línea T2, de origen linfoide y con defectos en el procesamiento endógeno de antígenos y por tanto, con expresión superficial de moléculas HLA-A2 "vacías" (Anderson KS et al, 1993) fueron

incubadas en medio de cultivo RPMI suplementado con 3% de SFB en presencia de cada uno de los péptidos sintéticos de la L1 a una concentración 200 μ M. Transcurrido el tiempo del cultivo, las células fueron cosechadas, lavadas con solución salina y marcadas por 30 minutos a 4°C con el anticuerpo W6/32, específico hacia las moléculas HLA-I. Posteriormente, las células fueron lavadas e incubadas 15 min a 4°C en presencia de una IgG de cabra, anti-IgG de ratón marcada con isotiocianato de fluoresceína. Finalmente, la intensidad de fluorescencia fue determinada por medio de citometría de flujo, incluyendo un control de células incubadas en ausencia de péptido y un control de células incubadas con el péptido de influenza GILGFVFTL. Con esta información, y de acuerdo con el proveedor (Pro immune, U.K.) complejos tetrámeros de HLA-A*0201 con los péptidos ILEDWNFGL (HPV-16), ILEDWNFGV y SLVDYTRF (HPV-18), además de GILGFVFTL (influenza) fueron sintetizados.

Detección de linfocitos T CD8+ con reconocimiento específico hacia péptidos derivados de la proteína L1 de los HPV-16 y-18.

Para este propósito fueron generadas células dendríticas derivadas de monocitos, como se describió anteriormente. Durante el proceso de maduración fueron adicionados los péptidos correspondientes. Una vez obtenidas las células dendríticas cargadas con péptidos, fueron lavadas y puestas en co-cultivo con LSP autólogos de pacientes con LSIL. Transcurrido el tiempo de cultivo, las células fueron recuperadas y marcadas por 20 min a temperatura ambiente con el tetrámero correspondiente y posteriormente con anti-CD8/APC durante 15 min a 4°C, al igual que LSP no estimulados. Finalmente, el porcentaje de células CD8+Tetrámero+ fue determinado para cada muestra mediante citometría de flujo.

Análisis estadístico.

Todas las muestras fueron ensayadas por triplicado y los datos numéricos fueron expresados como un promedio de los valores obtenidos. La prueba “t” de Student fue usada para comparar la media de los grupos pertinentes. Todas las pruebas fueron de dos colas y una $P < 0.05$ fue considerada estadísticamente significativa.

Resultados.

Linfocitos T de pacientes con lesiones cervicales escamosas intraepiteliales tempranas (LSIL) tuvieron una respuesta significativamente menor a antígenos de vacunas que donadoras normales.

Después del diagnóstico clínico y molecular, las donadoras de la Clínica de Displasias de la Fundación Cruz-Talonia fueron divididas en dos grupos: El grupo LSIL (*Low-grade squamous intraepithelial lesions*, n=20; edad promedio: 26.65 años en el intervalo 18-35 años), y el grupo de donadoras normales (n=20; edad promedio: 37.93 años, en el intervalo 22-46 años). El análisis por PCR indicó que cinco muestras fueron positivas para la presencia de ADN de HPV. La genotipificación de las muestras positivas demostró la presencia de una infección individual por los tipos de HPV-6, -11, -16, -18, ó -58.

Con el fin de ensayar la presencia de células reactivas hacia antígenos bien conocidos, leucocitos de sangre periférica (LSP) de pacientes con LSIL, de mujeres vacunadas con Gardasil® (proteínas L1 de los HPV-6, -11, -16 y -18), y de controles normales se incubaron con Cervarix®, una vacuna que contiene antígenos de las proteínas L1 de HPV-16 y HPV-18. En México, la administración de Cervarix® está restringida básicamente a la práctica privada; por tanto, las mujeres incluidas en este estudio no habían sido vacunadas con esta fórmula. Como se muestra en la Figura 1A, las células de mujeres vacunadas con Gardasil® proliferaron en promedio 8.48 veces con respecto a los controles, en respuesta a los antígenos virales contenidos en Cervarix®. Interesantemente, las células de las mujeres con LSIL infectadas con HPV mostraron una respuesta negativa, incluso por debajo a la detectada en los controles normales. Para demostrar que la respuesta de proliferación en este ensayo fue dirigida en contra de un antígeno conocido, los LSP fueron también incubados con Infanrix Hexa®, una vacuna administrada como parte de la campaña nacional de vacunación. Como era esperado, las células de los controles normales y de las mujeres vacunadas con Gardasil® fueron capaces de proliferar en presencia de los antígenos contenidos en Infanrix® (IP=25.33±4.4 y 26.75±6.0, respectivamente). En contraste, los LSP de las

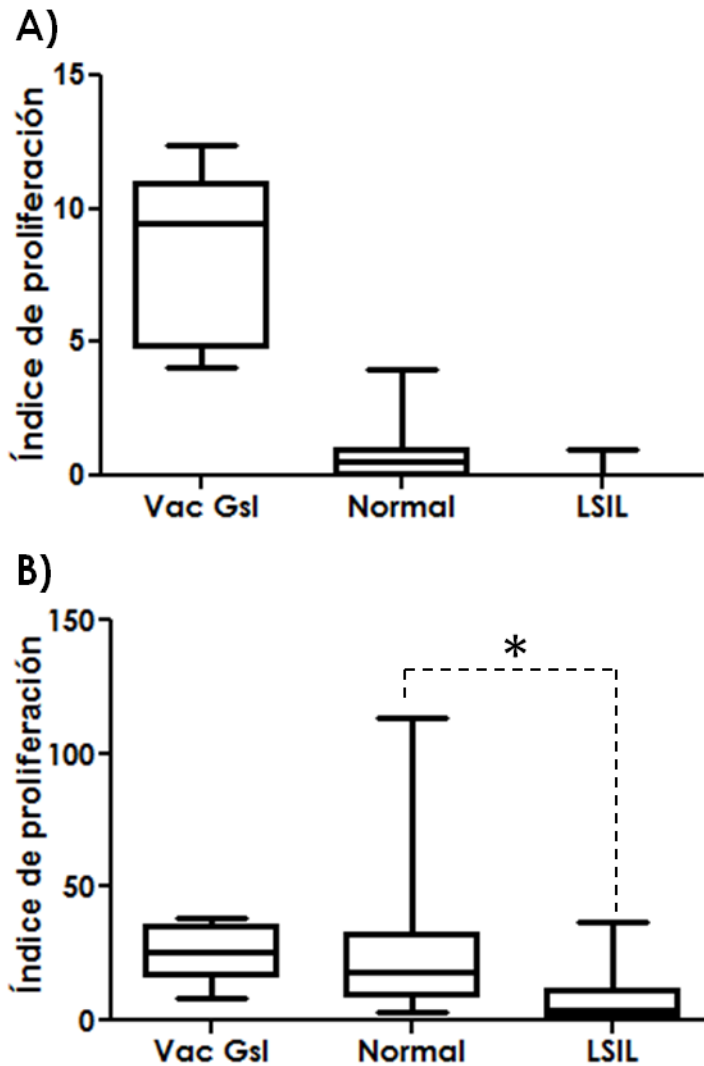


Figura 1. Respuesta de proliferación de LSP de pacientes con LSIL y donadoras normales hacia antígenos definidos. A) LSP de pacientes con LSIL (LSIL, n=20), donadoras normales (Normal, n=20), y mujeres previamente vacunadas con Gardasil® (Vac Gsl, n=5) se incubaron con **Cervarix®**, una vacuna recombinante que contiene antígenos de la cápside de HPV-16 y HPV-18. Después de 5 días, la proliferación fue determinada mediante la incorporación de timidina tritiada. **B)** LSP de pacientes con LSIL (LSIL, n=20), donadoras normales (Normal, n=20), y mujeres vacunadas con Gardasil® (Gsl, n=5), se incubaron con antígenos de **Infanrix Hexa®**, una vacuna que contiene antígenos de virus de poliomielitis y hepatitis B, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae* y *Bordetella pertussis*, y que es administrada durante la infancia. Después de 5 días la proliferación se determinó por medio de la incorporación de timidina tritiada. Se obtuvo una diferencia estadística significativa entre los grupos Normal y LSIL (* $p < 0.005$). Índice de proliferación: cpm en LSP con antígeno / cpm en LSP control.

pacientes con LSIL mostraron una respuesta a la vacuna que fue significativamente menor que la detectada en las donadoras normales ($IP=7.75\pm 2.2$) (Figura 1B). Estos resultados sugieren la existencia de una deficiencia en la respuesta de las células T de pacientes con LSIL.

Anticuerpos séricos contra antígenos de la vacuna Infanrix Hexa® se hallaron tanto en pacientes con LSIL como en donadores normales.

Nuestros resultados mostraron una disminución en la respuesta de las células T en los pacientes con LSIL. Por tanto, para determinar si la respuesta de anticuerpos estaba también disminuida, evaluamos la presencia de anticuerpos contra Infanrix® en sueros de pacientes con LSIL y controles normales por medio de ELISA, usando a esa vacuna como fuente de antígenos "blanco". Detectamos niveles de anticuerpos similares en las muestras de sueros de pacientes con LSIL y donadoras normales sin infección por HPV (2.35 ± 0.66 y 1.96 ± 0.76 , respectivamente) (Figura 2). Estos resultados sugieren que la diferencia en la respuesta de células T entre pacientes con LSIL y controles normales no se asocia con una función reducida de los linfocitos B. Por otra parte, cuando fue medida la concentración de anticuerpos capaces de reconocer a los componentes de la fórmula Cervarix (D.O.= 0.662 ± 0.13), los encontramos en los sueros de niñas vacunadas con Gardasil, pero no en los sueros de los grupos LSIL y Normal.

Los LSP de pacientes con LSIL y de donadores normales presentaron niveles similares de linfocitos CD4+FoxP3+.

Con la finalidad de evaluar si la respuesta disminuida de células T está asociada con la presencia de células T reguladoras, evaluamos mediante citometría de flujo los niveles de células T CD4+FoxP3+. No encontramos una diferencia significativa en la proporción de células CD4+FoxP3+ en LSP de pacientes con LSIL ($3.96\% \pm 1.00$) y controles normales ($3.51\% \pm 1.18$) (Figura 3). Estos resultados sugieren que la actividad de las células T reguladoras no apunta hacia el deficiente reconocimiento de antígenos por parte de los LSP en pacientes con LSIL.

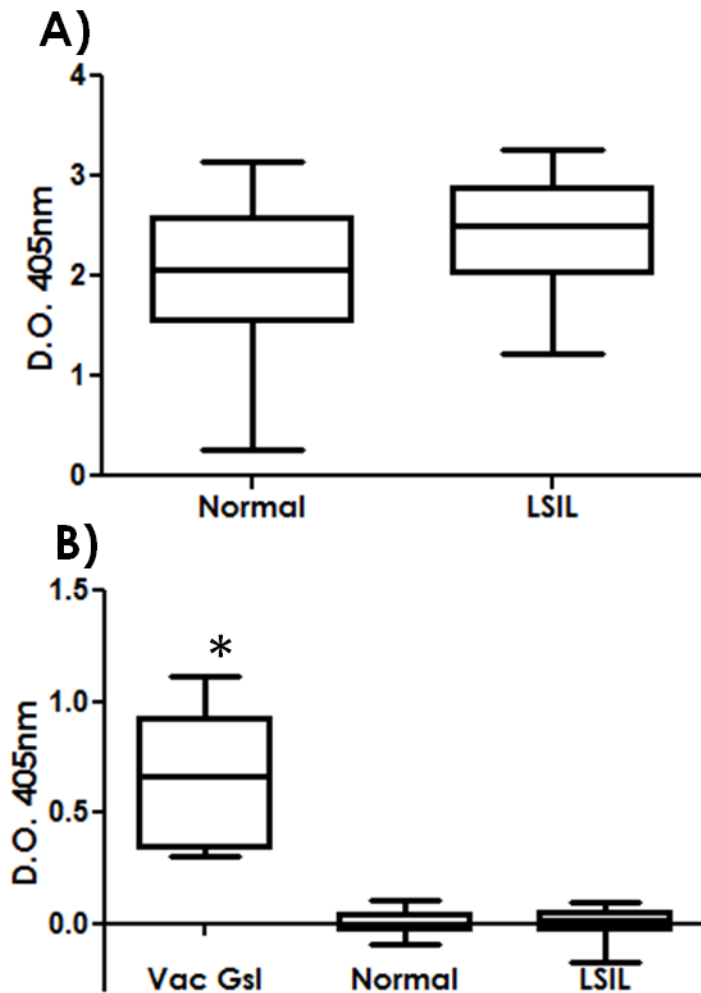


Figura 2. Respuesta sero-reactiva de donadoras normales y pacientes con LSIL hacia antígenos de Infanrix Hexa® y Cervarix®. La presencia de anticuerpos IgG específicos contra antígenos contenidos en A) la vacuna Infanrix Hexa® (antígenos de virus de poliomielitis y hepatitis B, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae* y *Bordetella pertussis*) y B) la vacuna Cervarix® (antígenos de la proteína L1 de las cápsides de los HPV-16 y HPV-18), en sueros de pacientes con LSIL (LSIL), donadoras normales (Normal) y mujeres jóvenes vacunadas con Gardasil® (Vac Gsl), se determinó mediante ELISA. Los antígenos fueron diluidos 1:20 para cubrir la placa y las muestras de suero 1:500 para ensayar su reactividad. Cuando se probó Infanrix Hexa, no se encontró una diferencia estadística significativa entre los grupos. En la respuesta hacia Cervarix® se encontró una diferencia estadística significativa para el grupo Vac Gsl con respecto a LSIL y a Normal (* $p < 0.005$). No se encontró una diferencia estadística significativa entre los grupos LSIL y Normal. D.O.: densidad óptica.

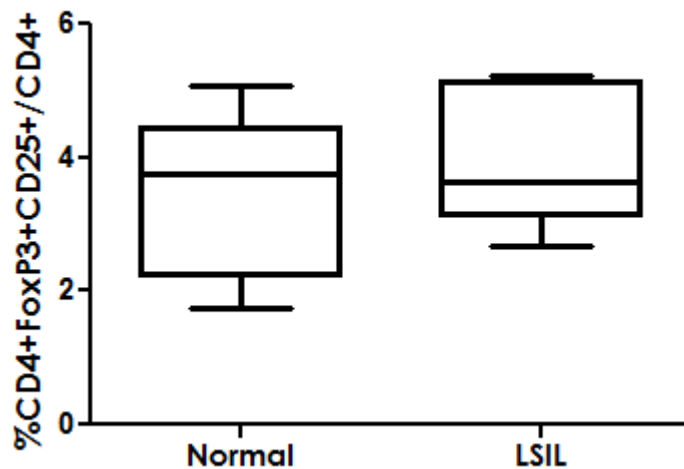


Figura 3. Caracterización de la presencia de células con fenotipo regulador en LSP de pacientes con LSIL y donadoras normales. Leucocitos de sangre periférica purificados de donadoras sanas (Normal) y de pacientes con LSIL (LSIL) fueron analizados sin previa estimulación, para la expresión superficial de CD4 y de CD25, y para la expresión intracelular de FoxP3. La proporción CD4+CD25+FoxP3+/CD4+ se determinó para cada muestra. No se encontró una diferencia estadística significativa entre los grupos.

La fitohemaglutinina les indujo alta producción de IFN γ y alta expresión de CD69 a linfocitos T CD8+ de pacientes con LSIL.

Nuestros resultados indican que la ausencia de respuesta en pacientes con LSIL no se debe a la regulación por parte de las células T reguladoras. Por tanto, a continuación investigamos si linfocitos T CD8+IFN γ +, los cuales son conocidos por jugar un papel activo durante las respuestas virales, podían ser activados en dichos pacientes. Cuando la proporción de células T CD8+IFN γ + se determinó mediante citometría de flujo no encontramos una diferencia significativa con respecto de los controles al estimular los LSP con Cervarix® o Infanrix®; sin embargo, cuando los LSP se estimularon con fitohemaglutinina, observamos una tendencia hacia una mayor proporción de células T CD8+IFN γ + en LSP de pacientes con LSIL, con respecto al porcentaje de células con este fenotipo detectadas en donadoras normales (Figura 4). Estos resultados sugieren la presencia de altos niveles de linfocitos T citotóxicos CD8+IFN γ + inducibles en pacientes con LSIL. Una tendencia semejante, aunque con una menor diferencia entre los grupos, fue observada cuando se midió la expresión del marcador de activación CD69 (Figura 5).

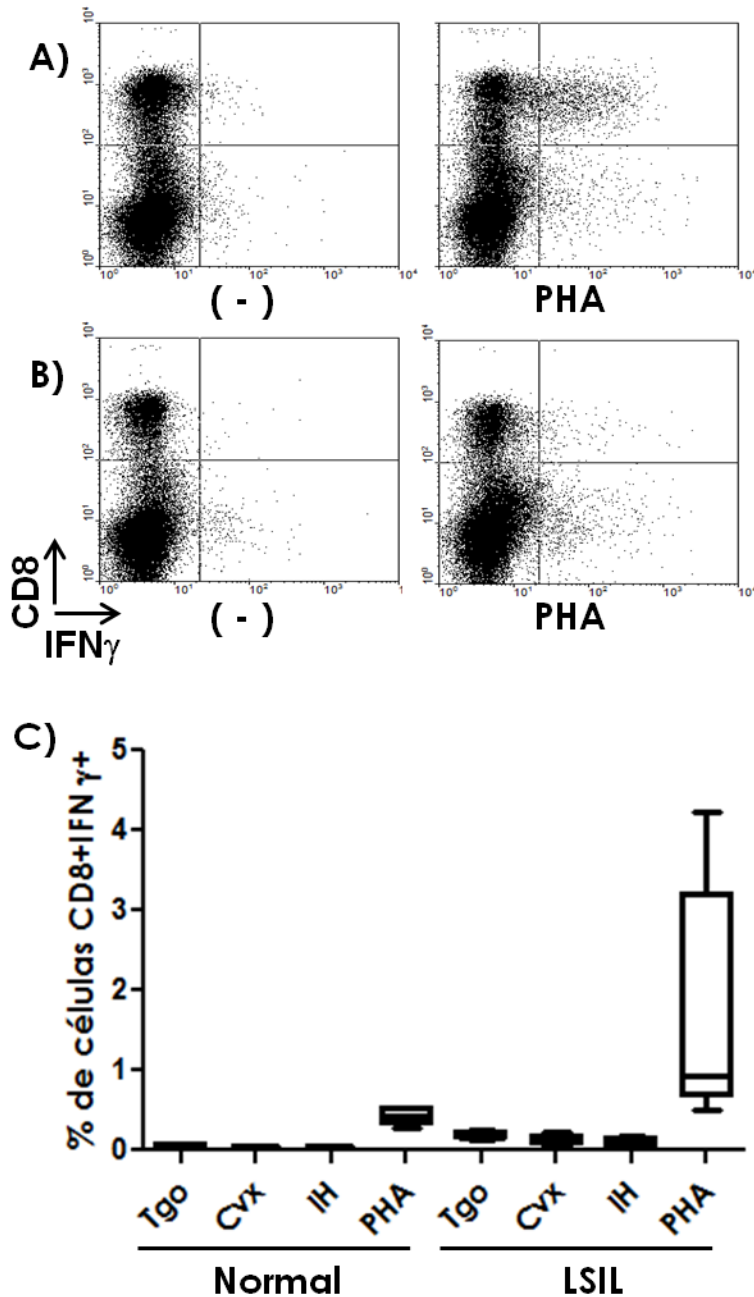


Figura 4. Proliferación de células CD8+IFN γ + de pacientes con LSIL y donadoras normales después de la estimulación con fitohemaglutinina. LSP de pacientes con LSIL (LSIL) y donadoras normales (Normal) se cultivaron durante 3 días en presencia de Cervarix® (Cvx), Infanrix Hexa® (IH) y fitohemaglutinina (PHA) y entonces se analizaron para determinar la expresión superficial de CD8 y la expresión intracelular de IFN γ , mediante citometría de flujo. A) muestra un *plot* representativo obtenido de LSP de una paciente incubados en presencia (PHA) y en ausencia de fitohemaglutinina (-), como un control. B) muestra un gráfico representativo obtenido de LSP de un donador normal incubados en presencia (PHA) y en ausencia de fitohemaglutinina (-). Los gráficos en C) muestran la distribución de los porcentajes de células CD8+IFN γ + para cada grupo de muestras. Tgo: Testigo control.

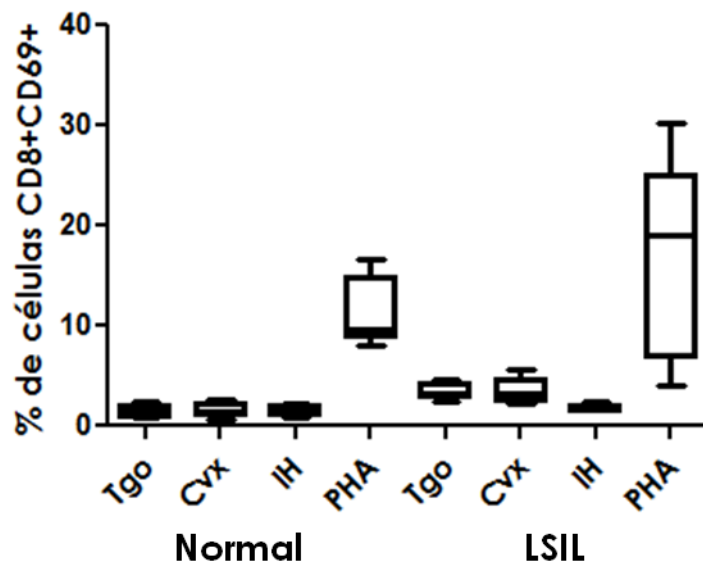


Figura 5. Expresión superficial de la molécula CD69 en LSP de pacientes con LSIL y donadoras normales después de la estimulación con fitohemaglutinina. LSP de pacientes con LSIL (LSIL) y donadoras normales (Normal) se cultivaron durante 3 días en presencia de Cervarix®, (Cvx) Infanrix Hexa® (IH) y fitohemaglutinina (PHA) y entonces se analizaron para determinar la expresión superficial de CD69, mediante citometría de flujo. Los gráficos muestran la distribución de los porcentajes de células CD8+CD69+ para cada grupo de muestras. Tgo: Testigo control.

Los linfocitos T de pacientes con LSIL HPV-16+ y -18+ proliferaron fuertemente en presencia de células dendríticas.

Nuestros resultados sugirieron que subpoblaciones de linfocitos T CD8+ citotóxicos susceptibles de producir IFN γ + están presentes en pacientes con LSIL. Sin embargo, es sabido que la activación de células T CD8+ depende de la presentación de antígenos específicos por parte de células dendríticas, a su vez, activadas. Por tanto, a continuación evaluamos si linfocitos de pacientes con LSIL podían ser activados a proliferar como una respuesta hacia antígenos virales bien determinados presentados por células dendríticas autólogas. Leucocitos de sangre periférica de dos pacientes con LSIL, fueron co-cultivados con células dendríticas o células dendríticas previamente "cargadas" con Cervarix®. La primera paciente presentaba una infección por HPV-16; la segunda presentaba una infección por HPV-18, como fue demostrado por PCR. Se determinó la proliferación de linfocitos T CD4+ y CD8+ y las células de las pacientes no fueron capaces de proliferar en la presencia de los antígenos de HPV

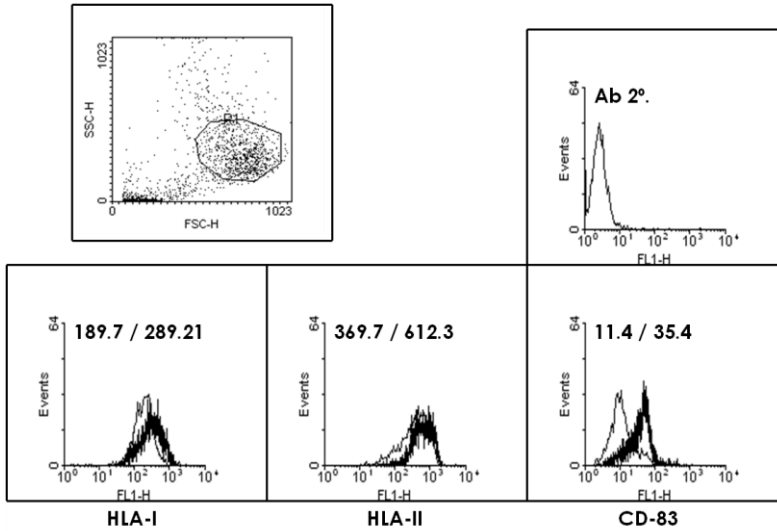


Figura 6. Obtención y maduración de células dendríticas provenientes de monocitos. Células dendríticas se obtuvieron a partir de la diferenciación de LSP adherentes con rhGM-CSF y rhIL-4, y posteriormente se incubaron con poli I:C para inducir su maduración. La expresión superficial de las proteínas de histocompatibilidad clase I (HLA-I), y clase II (HLA-II) y CD83 se determinaron mediante citometría de flujo en presencia (línea gruesa) y en ausencia (línea delgada) de poli I:C. Ab 2°: Anticuerpo secundario marcado con fluoresceína.

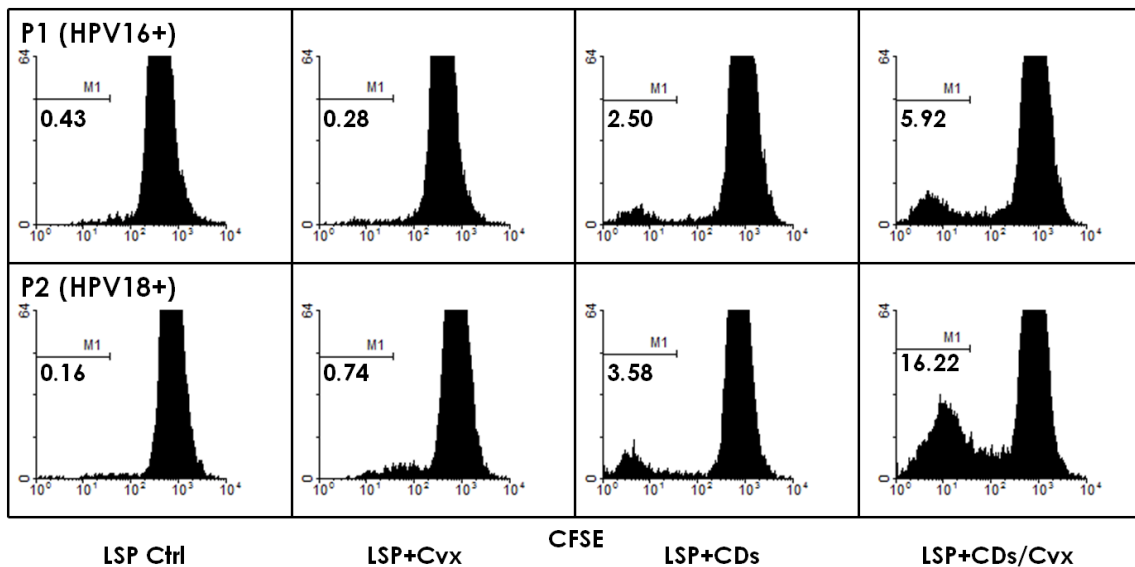


Figura 7. Proliferación de LSP de pacientes con LSIL en respuesta hacia antígenos de HPV presentados por células dendríticas. LSP de dos pacientes con LSIL, una infectada con HPV-16 (P1) y la otra con HPV-18 (P2) se marcaron con carboxifluoresceína (CFSE), e incubaron con Cervarix® que contiene antígenos de la cápsida de HPV-16 y HPV-18, en ausencia de estímulos, como un control (LSP Ctrl); en presencia de Cervarix® soluble (LSP+Cvx); con células dendríticas autólogas, como control (LSP+CDs); con células dendríticas autólogas previamente "cargadas" con Cervarix® (LSP+CDs/Cvx). El porcentaje en el decremento de la marca de CFSE, como un indicador de la proliferación, se muestra bajo la barra (M1) de cada histograma.

adicionados en forma soluble. El co-cultivo con células dendríticas indujo un modesto incremento en la proliferación de linfocitos T (Figuras 6 y 7). Sin embargo, su activación con células dendríticas pre-cargadas indujo un fuerte incremento en la proliferación tanto de células T CD4+ como CD8+ en ambas pacientes (Figura 8). Estos resultados indican que los linfocitos T CD4+ como los CD8+ de pacientes con LSIL son capaces de reconocer y proliferar en respuesta hacia antígenos de HPV, pero dependen de la presentación de antígenos por parte de células dendríticas.

La proliferación de linfocitos T inducida por la incubación con Cervarix fue detectada mediante la determinación de células individualmente, en donadoras normales pero no en pacientes con infección por HPV.

LSP de cuatro donadoras normales, dos pacientes con LSIL y una paciente con NIC-2 (HPV-16) fueron marcados con carboxifluoresceína e incubados con Cervarix (proteínas L1 de HPV-16 y -18), o fitohemaglutinina, como control. En los LSP de las cuatro donadoras normales se presentaron pequeños porcentajes de células que proliferaron en presencia de Cervarix y que mostraron diferencias con respecto al testigo (0.10, 0.13, 0.26, y 0.29%) y que pueden ser observadas en los gráficos correspondientes, obtenidos a partir de la citometría de flujo; en contraste, no se observó una diferencia en la proliferación con respecto a los testigos en los LSP de ninguna paciente, aun cuando los controles de células estimuladas con fitohemaglutinina proliferaron consistentemente (Figura 9).

Los linfocitos T de pacientes con LSIL producen niveles más bajos de IL-2 que los de donadoras normales.

Nuestros resultados han mostrado que células T CD4+ y CD8+ de pacientes con LSIL pueden ser activadas específicamente por células dendríticas presentando un antígeno viral bien determinado. Puesto que la presentación antigénica y la actividad celular efectora son reguladas por citocinas, evaluamos los niveles de IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF α e IFN γ en sueros de pacientes con LSIL y controles normales. No fueron halladas diferencias entre las pacientes y las donadoras normales en la concentración de

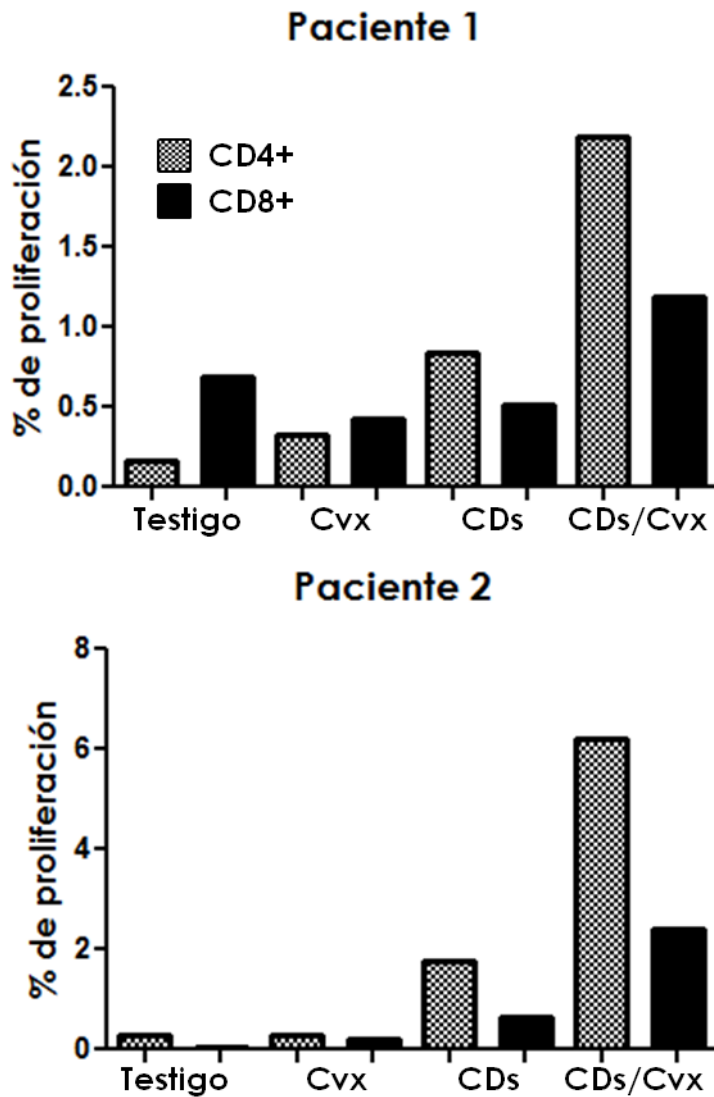


Figura 8. Proliferación de linfocitos T CD4+ y CD8+ de pacientes con LSIL en respuesta hacia antígenos de HPV presentados por células monocíticas y células dendríticas. LSP de dos pacientes con LSIL, una infectada con HPV-16 (P1) y la otra con HPV-18 (P2) se incubaron en presencia de Cervarix® que contiene antígenos de la cápsida de HPV-16 y HPV-18, para evaluar la inducción a la proliferación. LSP de los pacientes P1 y P2 marcados con carboxifluoresceína (CFSE) se incubaron: en ausencia de estímulos, como un control (LSP Ctrl); en presencia de Cervarix® soluble (LSP+Cvx); con células dendríticas autólogas, como control (LSP+CDs); con células dendríticas autólogas previamente "cargadas" con Cervarix® (LSP+CDs/Cvx). Las barras muestran el porcentaje de células que proliferaron en respuesta a cada estímulo.

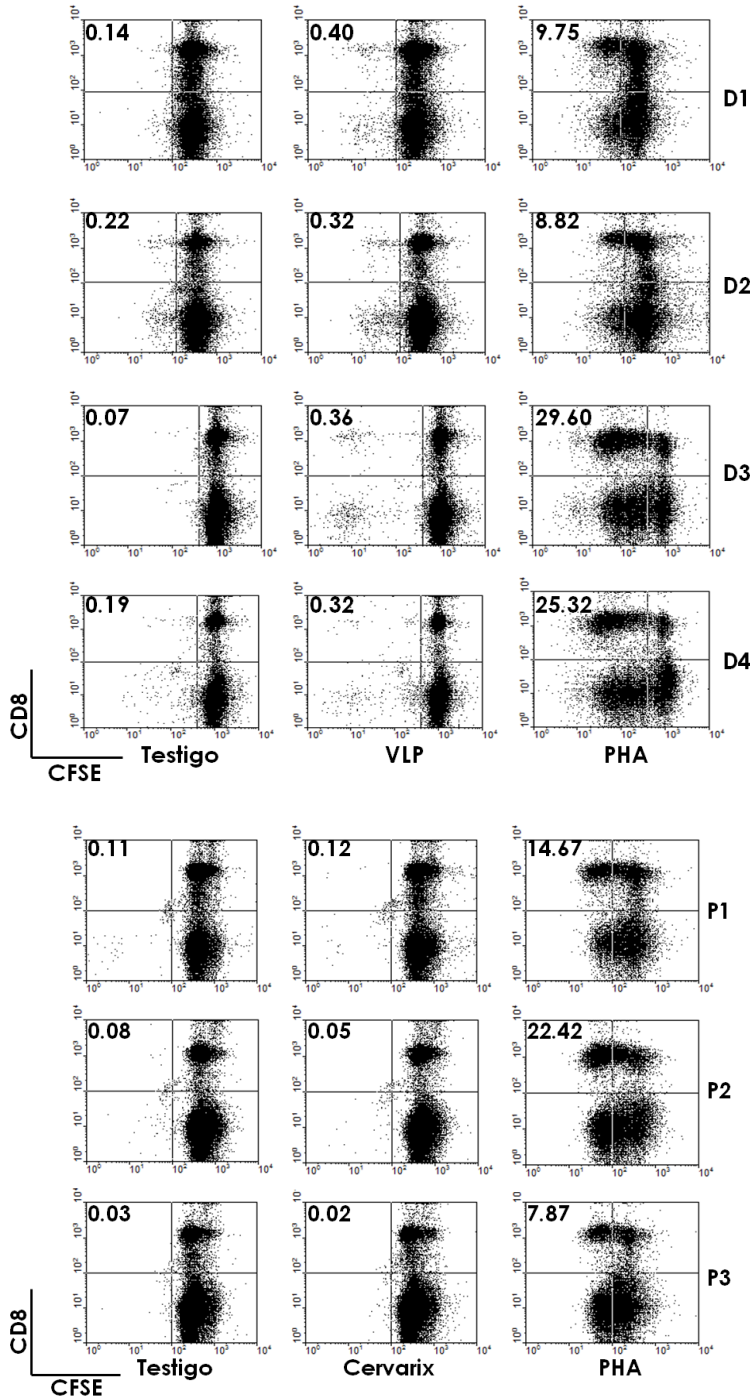


Figura 9. Proliferación de linfocitos CD8+ de pacientes con infección por HPV y donadoras normales en respuesta hacia antígenos de HPV, determinada mediante citometría de flujo. LSP de donadoras normales (D1-4), pacientes con LSIL (P1,2) y una paciente con NIC-2 y HPV-16 (P3) se marcaron con carboxifluoresceína e incubaron en presencia de Cervarix®, de fitohemaglutinina (PHA) o en ausencia de estímulo, como control (Testigo). Transcurrido el tiempo de incubación, las células se cosecharon y se determinaron el porcentaje de células CD8+ y la disminución de carboxifluoresceína, como indicativo de proliferación.

	IL-2	IL-4	IL-5	IL-10	TNF α	IFN γ
Normal	4.6 \pm 0.3	-5.8 \pm 1.4	-10.8 \pm 0.3	-6.3 \pm 0.4	-7.7 \pm 0.3	8.5 \pm 5.2
LSIL	4.7 \pm 0.3	-5.2 \pm 0.9	-10.7 \pm 0.3	-6.3 \pm 0.3	-7.5 \pm 0.3	9.0 \pm 4.2

Tabla 1. Determinación de la concentración de citocinas en sueros de pacientes con LSIL y donadoras normales sin HPV. Las concentraciones de citocinas Th1 (IL-2, IFN γ , TNF α) y Th2 (IL-4, IL-5, IL-10) en pg/mL, se determinaron en sueros de pacientes con LSIL (LSIL) y de donadoras normales (Normal), por medio de citometría de flujo (Cytometric Bead Array). No se encontraron diferencias estadísticas significativas para la producción de citocinas entre los dos grupos. En varios casos se presentaron concentraciones tan bajas que la interpolación en las curvas de referencia de los valores de fluorescencia obtenidos arrojaron valores negativos.

ninguna de las citocinas circulantes que se evaluaron (Tabla 1). Por tanto, decidimos explorar la producción de estas citocinas por LSP de pacientes con LSIL y LSP de controles normales después de inducir su activación por medio de un agonista de CD3/CD28. Observamos que LSP de pacientes con LSIL y de controles normales produjeron y secretaron niveles similares de citocinas del perfil Th2 (IL-4, IL-5, IL-10) (Figura 10). Por otra parte, al evaluar la producción de citocinas del perfil Th1 encontramos niveles semejantes de TNF α e IFN γ en ambos grupos. Sin embargo, la producción de IL-2 fue reducida significativamente en pacientes con LSIL (Figura 11). Estos resultados parecen indicar que la producción y secreción de una de las principales moléculas reguladoras de la activación de células T, la IL-2, está sumamente comprometida en pacientes con LSIL.

Los sueros de pacientes con LSIL presentan una menor concentración de receptor soluble para IL-2 (shIL-2R) con respecto a donadoras normales sin HPV y pacientes con CaCu.

Con la finalidad de evaluar si la deficiencia de IL-2 pudiera estar relacionada con la concentración del receptor soluble para IL-2 (shIL-2R) evaluamos en los sueros de las pacientes y las donadoras normales, así

como en un grupo de sueros de pacientes con CaCu (n=8) la presencia de esta molécula. Como se muestra en la Figura 12, tal como ha sido reportado previamente (Hildesheim et al, 1997), el grupo de sueros de pacientes con CaCu presentó la mayor concentración promedio con una diferencia significativa con respecto a los otros dos grupos (0.7587 ± 0.123 ng/100 μ L); sin embargo, la menor concentración promedio de shIL-2R correspondió con el grupo LSIL (0.0998 ± 0.026 ng/100 μ L), con una diferencia significativa con respecto al grupo normal (0.3049 ± 0.076 ng/100 μ L).

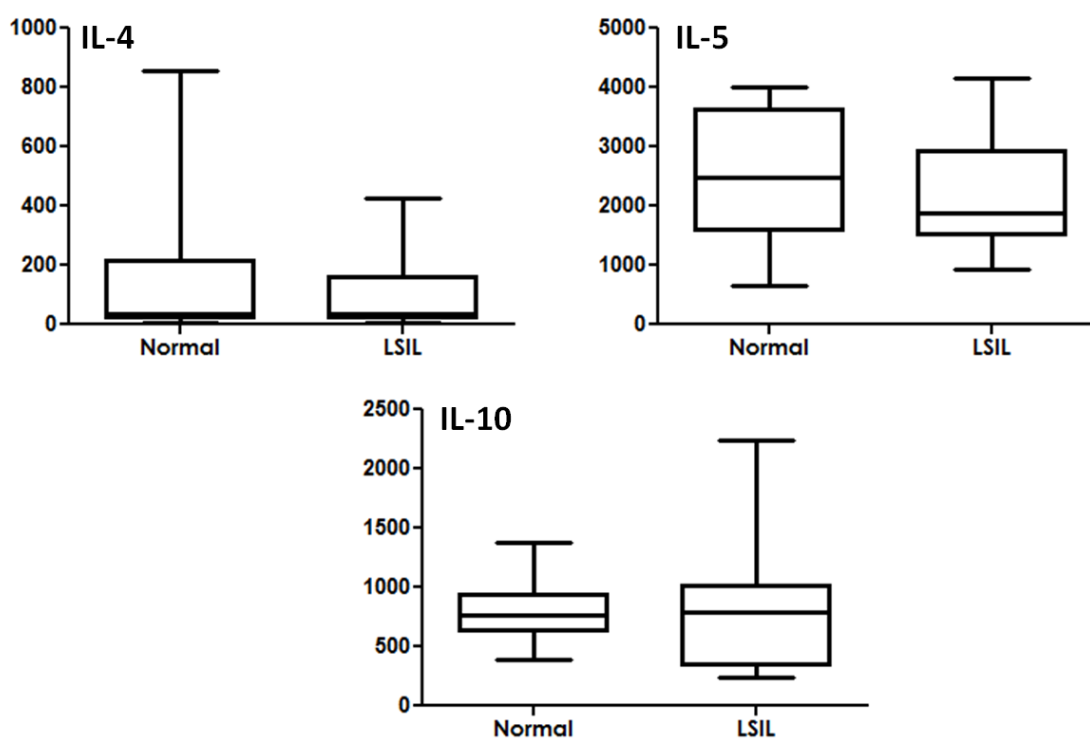


Figura 10. Producción de citocinas Th2 después de la estimulación del receptor antigénico de células T en LSP de pacientes con LSIL y donadoras normales sin HPV. LSP de pacientes con LSIL (LSIL) y de donadoras normales (Normal) se estimularon en cultivo con esferas activadoras recubiertas con anti-CD3/CD28. Después de 5 días en cultivo se ensayaron por medio de citometría de flujo (Cytometric Bead Array) las concentraciones de las citocinas Th2: IL-4, IL-5, e IL-10. No se encontró una diferencia estadística significativa para la producción de citocinas entre los dos grupos.

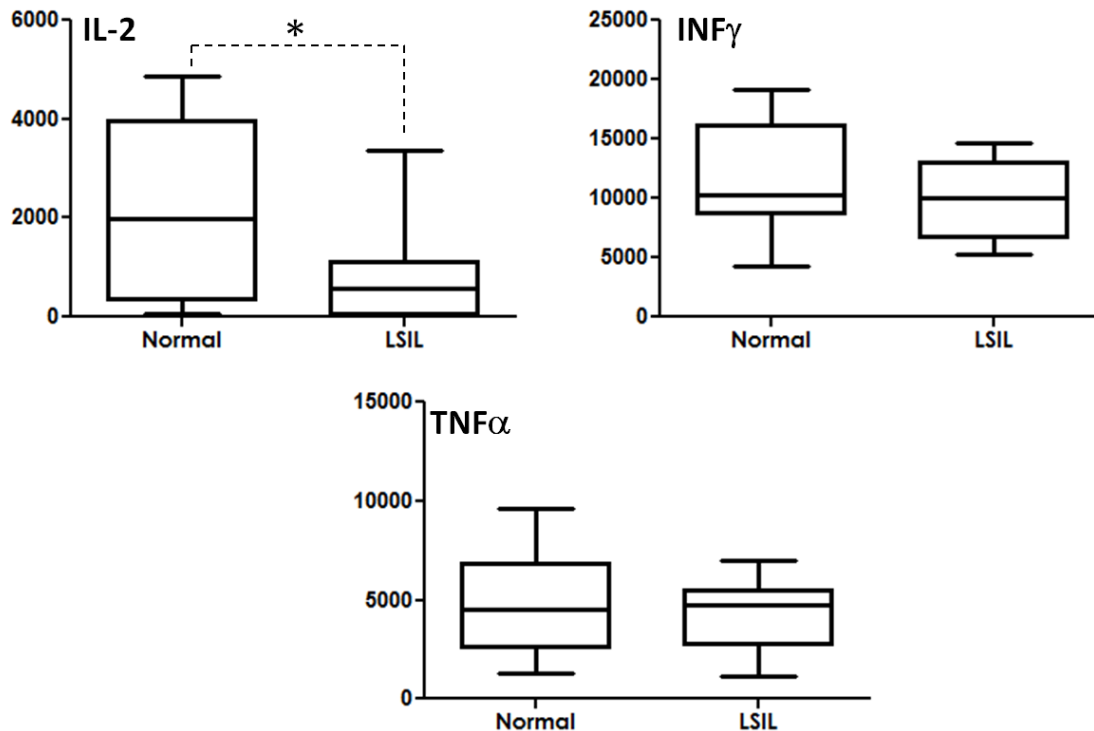


Figura 11. Producción de citocinas Th1 después de la estimulación del receptor antigénico de células T en LSP de pacientes con LSIL y donadoras normales sin HPV. LSP de pacientes con LSIL (LSIL) y de donadoras normales (Normal) se estimularon en cultivo con esferas activadoras recubiertas con anti-CD3/CD28. Después de 5 días en cultivo se ensayaron por medio de citometría de flujo (Cytometric Bead Array) las concentraciones de las citocinas Th1: IL-2, TNF α , e INF γ . Se encontró una diferencia estadística significativa para la producción de IL-2 (* $p < 0.05$) entre los dos grupos.

Determinación de células T CD8+ específicas hacia péptidos derivados de la proteína L1 de los HPV-16 y -18.

Para este propósito, fueron incluidas muestras de 15 pacientes provenientes de la Clínica de Displasias del Hospital General de México, con diagnóstico de LSIL (edad promedio: 30.33 años, en el intervalo de 21-42 años). El análisis de ADN a partir de biopsias de tejido para genotipificar HPV dio como resultado una muestra positiva para cada uno de los tipos de HPV-6, -11, -33, -51 y -53. Con la finalidad de evaluar la presencia de células T CD8+ específicas hacia péptidos derivados de la proteína L1 de

los HPV-16 y -18 en los LSP de las pacientes con LSIL, en primer lugar fueron sintetizados péptidos de la L1 con alta afinidad teórica por las proteínas de histocompatibilidad HLA-A2, de acuerdo con un programa de algoritmos de predicción. Posteriormente, la afinidad fue evaluada experimentalmente por medio de su capacidad para estabilizar moléculas HLA-A2 “vacías” en la superficie de la línea celular T2. De acuerdo con estos resultados y las consideraciones del proveedor correspondiente fue solicitada la síntesis de tres complejos tetrámeros de moléculas HLA-A2 asociados con péptidos con las secuencias ILEDWNFGL (HPV-16), ILEDWNFGV (HPV-18) o SLVDYTRFV (HPV-18) (Figura 13). Posteriormente, fue determinado el porcentaje de células CD8+ marcadas por los tetrámeros en LSP de 15 pacientes con LSIL incubados en presencia de células dendríticas “cargadas” con los péptidos. Únicamente encontramos en la muestra de una paciente un porcentaje de células positivas al tetrámero, significativamente diferente a las células control: 0.09% a 1.16% para el péptido SLVDYTRFV de HPV-18 (Tabla 2 y Figura 14). En la genotipificación de esta muestra no fue encontrado ADN de HPV. Este resultado nuevamente nos indica que la respuesta de células T hacia antígenos derivados de HPV se presenta en una baja frecuencia.

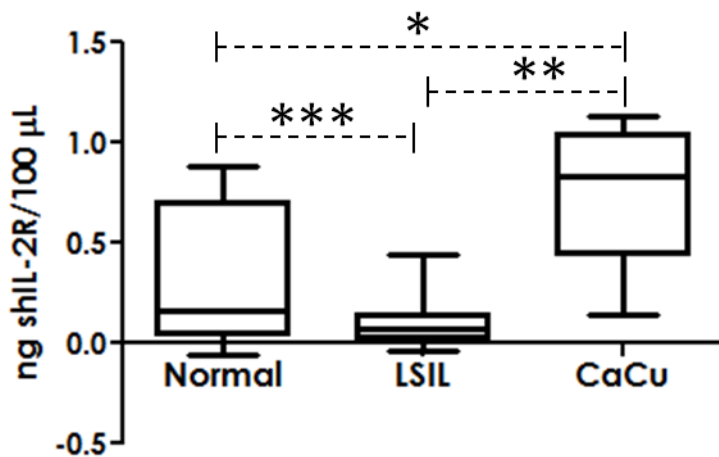


Figura 12. Determinación de la concentración de receptor soluble para IL-2 (shIL-2R) en sueros de pacientes con LSIL y donadoras normales sin HPV. Las concentraciones de receptor soluble para IL-2 se determinaron en sueros de pacientes con LSIL (LSIL) y de donadoras normales (Normal) y pacientes con cáncer cervical uterino (CaCu), por medio de ELISA. Se encontró una diferencia estadística significativa para el grupo CaCu con respecto a los grupos Normal (* $p < 0.005$) y LSIL (** $p < 0.0005$), así como entre los grupos Normal y LSIL (***) $p < 0.05$

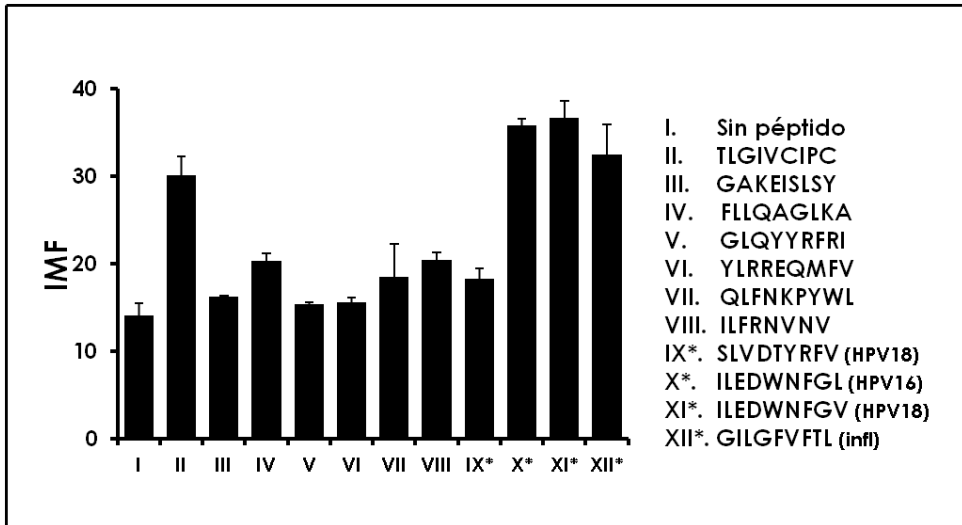


Figura 13. Evaluación de la afinidad de péptidos derivados de las proteínas L1 de HPV-16 y HPV-18 hacia la proteína HLA-A2. Células T2 se incubaron con péptidos sintéticos derivados de las proteínas L1 de los HPV-16 y -18 y se determinó la estabilización de las moléculas HLA-A2 mediante citometría de flujo. Como control negativo se midió la fluorescencia en células sin péptido y como control positivo se midió en células T2 incubadas con un péptido derivado del virus de la influenza (infl). IMF: Intensidad media de fluorescencia (* péptidos seleccionados para la síntesis de tetrámeros).

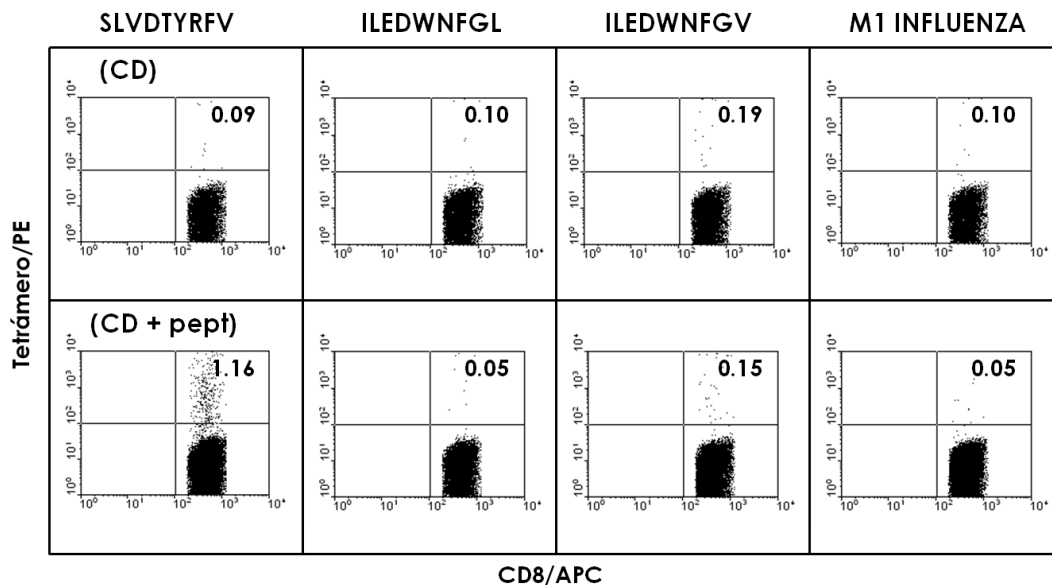


Figura 14. Marcaje de LSP de una paciente con LSIL con tetrámeros de HLA-A2 asociados a los péptidos ILEDWNFGL, ILEDWNFGV y SLVDTYRFV, derivados de las proteínas L1 de los HPV-16 y -18. LSP de una paciente con LSIL y tipo de HPV indeterminado incubados con células dendríticas autólogas y sin estímulo se marcaron con tetrámeros de HLA-A2/péptido y anti-CD8. Mediante citometría de flujo se determinó el porcentaje de células CD8+Tetramero+, el cual se indica en el cuadrante superior derecho para cada gráfico.

Paciente	SLDVTYRFV		ILEDWNFGL		ILEDWNFGV		GILGFTVF	
	-CD	+CD	-CD	+CD	-CD	+CD	-CD	+CD
P1	ND	0.01	ND	0.06	ND	0.35	ND	0.01
P2	ND	0.01	ND	0.01	ND	0.01	ND	0.07
P3	0.07	0.20	0.06	0.10	0.07	0.04	0.03	0.05
P4	0.18	0.03	0.06	0.07	0.33	0.31	0.17	0.07
P5	0.16	0.23	0.08	0.06	0.07	0.10	0.05	0.08
P6	0.09	1.16	0.10	0.05	0.19	0.15	0.10	0.05
P7	0.02	0.06	0.05	0.04	0.15	0.13	0.02	0.06
P8	0.16	0.18	0.06	0.05	0.20	0.22	0.03	0.04
P9	ND	ND	0.01	0.13	0.00	0.06	ND	ND
P10	ND	ND	0.01	0.26	ND	0.29	ND	ND
P11	ND	ND	0.03	0.01	0.01	0.02	ND	ND
P12	ND	ND	0.01	0.00	0.09	0.00	ND	ND
P13	ND	ND	0.00	0.01	0.00	0.01	ND	ND
P14	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	ND	ND
P15	0.01	0.03	0.01	0.01	0.01	0.02	ND	ND

Tabla 2. Determinación de la presencia de linfocitos T CD8+ con reconocimiento específico de péptidos derivados de las proteínas L1 de los HPV-16 y -18. LSP de pacientes con LSIL incubados con células dendríticas autólogas "cargadas" con péptidos (+CD) y LSP sin estímulo (-CD) se marcaron con complejos tetrámeros de moléculas HLA-A2/péptidos (PE), y anti-CD8 (APC). Posteriormente, se determinó el porcentaje de células CD8+Tetrámero+ mediante citometría de flujo.

Discusión.

Se espera que la mayoría de las lesiones tempranas causadas por la infección con HPV regresen espontáneamente (Moscicki et al 2006), lo cual se asocia normalmente con el desarrollo de una respuesta celular eficiente hacia antígenos virales (Stanley M et al 2006); en tanto, la progresión de lesiones precursoras (LSIL y HSIL) hacia cáncer cervical se asocia con una infección persistente por tipos de HPV oncogénicos, junto con anormalidades locales y sistémicas que pueden conducir al impedimento de la función de las respuestas de células T. De acuerdo con ello, en el presente trabajo hemos mostrado que pacientes con LSIL exhiben una baja frecuencia de células T específicas hacia antígenos de HPV, y probablemente en un bajo estado de activación. Además, los linfocitos de sangre periférica (LSP) de pacientes con LSIL proliferaron escasamente en respuesta hacia antígenos definidos incluidos en los esquemas de vacunación, aun cuando detectamos anticuerpos hacia esos antígenos tanto en pacientes con LSIL como en controles normales, sugiriendo un impedimento específico de la respuesta de las células T. A partir de los resultados obtenidos, resaltan los siguientes puntos:

- a) La respuesta de células T hacia antígenos de la proteína L1 de HPV se presenta en una baja frecuencia, y posiblemente con un limitado estado de activación.

Por distintos medios se detectan linfocitos T específicos hacia antígenos de proteínas estructurales y no estructurales de los HPV en la sangre de individuos infectados. En este trabajo nos planteamos evaluar la respuesta de células T hacia antígenos de la proteína L1 de HPV-16 y -18 en la sangre periférica de pacientes con lesiones tempranas causadas por los HPV, en comparación con donadoras normales. Nos encontramos con la limitante de que los tipos de HPV-16 y -18, los más comunes en los estados avanzados en la enfermedad, se encuentran en baja frecuencia en los estados tempranos: de 20 pacientes incluidas en este estudio, únicamente una presentó ADN para HPV-16 y una para HPV-18. De cualquier modo, asumimos que se ha reportado previamente que linfocitos T específicos hacia HPV-16 pueden ser reactivados *in vitro* a partir de LSP en un alto porcentaje de pacientes con infección por HPV-16, e incluso de donadores

sanos, como un reflejo de infecciones previamente resueltas (Welters MJ et al, 2003). A pesar de ello, no pudimos detectar por medio de la incorporación de timidina tritiada un grado de proliferación significativamente diferente con respecto a los testigos, ni en LSP de pacientes con LSIL ni en donadoras normales, aun cuando el ensayo mostró la proliferación de LSP de mujeres jóvenes vacunadas con Gardasil. Esta diferencia sugiere que la respuesta hacia antígenos de HPV tanto en individuos sanos como en pacientes con lesiones tempranas se presenta en una baja frecuencia y probablemente la detección de células de memoria requiere de ensayos donde las células son evaluadas individualmente, como lo es el caso del ELISPOT (Welters MJ et al, 2003; van Poelgeest MIE et al, 2006). De acuerdo con ello, y aun cuando será necesario aumentar el número de muestras, mediante citometría de flujo encontramos pequeños porcentajes de células CD8+ que proliferaron en respuesta al estímulo de proteínas de la cápside de los HPV-16 y -18, en los LSP de donadoras normales, pero no en LSP de pacientes con infección por HPV, incluyendo una cuya biopsia resultó ser positiva para HPV-16; por tanto, es probable que además de la baja frecuencia de la respuesta inmune natural hacia el HPV, se presente adicionalmente alguna deficiencia en las pacientes con LSIL. La baja frecuencia de linfocitos T específicos hacia antígenos de HPV ha sido demostrada también con tetrámeros de HLA-A2 asociados con el péptido 11-20 de la proteína E7 de HPV-16 (Youde SJ et al, 2000), aun cuando experimentalmente dicho péptido es sumamente antigénico. Cuando evaluamos la presencia de células específicas hacia péptidos derivados de la proteína L1 de los HPV-16 y -18 por medio de tetrámeros de HLA-A2, únicamente encontramos respuesta hacia uno de tres péptidos, en una de quince muestras analizadas, lo cual confirma la baja frecuencia de células respondedoras en los LSP de las pacientes con lesiones tempranas; sin embargo, cabe mencionar que los reportes referentes a las respuestas de células T hacia péptidos de L1 no destacan secuencias claramente inmunodominantes, y más bien se observan respuestas hacia péptidos con secuencias distribuidas ampliamente en la proteína.

Las células respondedoras se presentan en una baja frecuencia, y probablemente también en un estado de activación limitado. En ese sentido, encontramos que linfocitos T de pacientes con LSIL asociada con HPV-16 y -18 no proliferaron en presencia de antígenos virales solubles, pero proliferaron significativamente cuando los antígenos fueron presentados

por células dendríticas. Coincidentemente, en cáncer cervical observaron que la estimulación de linfocitos infiltrantes de tumor y de nódulos linfáticos con su antígeno cognado en presencia de ligandos de receptores tipo-Toll usados comúnmente reforzó significativamente la función de las células T efectoras (de Vos Van Steenwijk PJ et al, 2010). En cáncer vulvar se observó también la necesidad de un adecuado procesamiento y presentación de antígenos para demostrar la presencia de linfocitos específicos hacia la proteína L1 en baja frecuencia, puesto que se requirió de la estimulación *in vitro* de las células efectoras con células dendríticas (Davidson EJ et al, 2003). Por tanto, es posible que ocurra la presencia de células T específicas pero con un estado de activación limitado debido a la carencia de una estimulación apropiada, desde los estadios tempranos de infección con HPV hasta los estadios malignos.

Los mecanismos que conducen a este estado de activación parcial para los linfocitos T deben ser todavía más estudiados para ser resueltos, pero pueden estar asociados con la limitada presentación de antígenos en ausencia de inflamación que ocurre en los estadios tempranos de la infección con HPV (Joffre O et al 2009). En este sentido, varias líneas de evidencia muestran que la falla en la presentación de antígenos por las células dendríticas puede contribuir al desarrollo de tumores (Maecker B. et al, 2006; Ratta M et al, 2002; Beckebaum S, et al., 2004).

- b) Linfocitos T de pacientes con LSIL muestran una menor proliferación en respuesta hacia antígenos comunes en vacunación y una menor producción de IL-2 al ser estimulados, que linfocitos T de donadoras normales.

Junto con la deficiencia en la proliferación de células T en respuesta hacia antígenos empleados comúnmente en vacunación, observamos una menor producción de IL-2 con respecto a los controles normales, cuando esas células fueron activadas por medio de su receptor de antígenos. Tratando de encontrar una posible respuesta hacia esta deficiencia, evaluamos la presencia de células con fenotipo regulador en los LSP de pacientes con LSIL, puesto que la respuesta de las células T hacia células canceradas y virus está fuertemente regulada por las células T CD4+ reguladoras (Tregs) expresando el factor de transcripción *fork-head*

box (Fox)-P3 (CD4+FoxP3+); además se han reportado frecuencias aumentadas de células Tregs circulantes en varios tumores sólidos (Zou W 2007), incluyendo cáncer cervical (Visser et al 2007, Molling et al 2007). Aquí hallamos que los números de células T reguladoras CD4+FoxP3+ no están aumentados en las pacientes con LSIL. Esta observación está de acuerdo con un reporte previo que mostró una frecuencia de células CD4+ Tregs similar entre mujeres con CIN0 y pacientes con CIN1/2 (Molling et al 2007) y con otro reporte, donde los niveles más altos de expresión de FoxP3 asociado a mucosas correspondió al grupo CIN2/3 (Scott et al 2009). En conjunto, estos resultados pueden sugerir que las células CD4+ Tregs no están involucradas en la supresión inmune durante estadios tempranos en el desarrollo del cáncer. Sin embargo, es conocido que la proliferación de las células Tregs es impulsada por la producción de IL-2 (Zorn et al 2006), y que las respuestas de las células Tregs y Th se desarrollan en una forma y orden paralelos con la finalidad de regular la magnitud de la reacción inmune (Taylor et al 2006). Probablemente, la reducción significativa en la producción y secreción de IL-2 en las pacientes con LSIL, puede contribuir a la ausencia de expansión de células Tregs observada en este estadio de la enfermedad.

Las células T productoras de IFN γ juegan un papel crucial en la eliminación de las células tumorales (Shankaran V et al 2001). Se ha demostrado que aunque se detectan células CD4+ y CD8+ específicas contra HPV activadas en los linfocitos infiltrantes del tumor (TIL, del inglés: *Tumour infiltrating lymphocytes*) y células de nódulos linfáticos que drenan al tumor de la mayoría de los pacientes con cáncer cervical, sólo se presentan unas pocas células productoras de IFN γ en estas pacientes, sugiriendo que las células T son funcionalmente inactivas (de Vos van Steenwijk et al 2010). En nuestro trabajo, encontramos que la estimulación con PHA de LSP de pacientes con LSIL resulta en una proporción significativamente mayor de células CD8+IFN γ + comparado con aquellas obtenidas en donadoras sanas, lo cual sugiere la existencia de subpoblaciones de células respondedoras con un estado de activación limitado en los estadios tempranos de lesiones cervicales pre-malignas. Coincidentemente, Lee y colegas (Lee et al 2006) hallaron que linfocitos T CD8+ de pacientes con LSIL o ASCUS estimulados con enterotoxina B de *Staphylococcus* tuvieron una deficiencia en la producción de IL-2 pero no de IFN γ , sugiriendo que la habilidad efectora de las células CD8+ no es

afectada, aunque esta población no puede ser expandida. Al respecto, queda por resolver si la expansión en el porcentaje de células CD8+ IFN γ + observada en los LSP de pacientes con LSIL estimuladas con mitógenos corresponde con clonas específicas hacia antígenos del HPV.

Se considera que una respuesta inmune efectiva contra el HPV está basada en la reacción tipo Th1, la cual involucra citocinas tales como IL-2, IL-12, TNF α e IFN γ . Se ha observado que la eliminación del virus es precedida por la expresión de citocinas tipo Th1 en ausencia de citocinas tipo Th2 (Scott M et al 1999), y dada la naturaleza antagónica de las funciones Th1 y Th2, se asume que las células infectadas son protegidas de la respuesta inmune cuando el patrón Th2 está presente, con un papel significativo para la IL-10 (Azar K et al 2004). Sin embargo, en estadios más avanzados, incluyendo el cáncer cervical, es posible detectar una gran producción de citocinas de ambos perfiles, cuestionando el papel del perfil Th2 en el desarrollo del cáncer cervical (Tjong MY et al 2007). De acuerdo con ello, no encontramos diferencias en la secreción de citocinas del perfil Th2 entre LSP de pacientes con LSIL y donadoras normales, cuando el receptor de antígenos de las células T fue estimulado. Por otra parte, nuestras observaciones de que la secreción de IL-2 inducida por la estimulación del receptor de antígenos de las células T fue significativamente menor en LSP de pacientes con LSIL en comparación con aquellos de donadores normales, son consistentes con la noción de que el perfil Th1 es necesario para la resolución de la infección, ya que la deficiencia en la producción de IL-2 se refleja más allá del nivel local, en la periferia. Sin embargo, tampoco encontramos diferencias en la producción de IFN γ ni TNF α entre los LSP de pacientes con LSIL y donadoras normales.

Se ha observado previamente una producción disminuida de IL-2 por LSP de sujetos infectados por HPV, estimulados *in vitro* tanto con antígenos específicos de HPV y antígenos no relacionados, así como estímulos policlonales (Clerici et al 1997, Lee et al 2004, Tsukui et al 1996). Además, se ha demostrado que células T CD8+ de pacientes con LSIL tuvieron una deficiencia en la producción de IL-2 cuando fueron estimulados con enterotoxina B de *Staphylococcus* (Lee et al 2004). En todos los casos, una característica común fue la relación directa entre la intensidad en la deficiencia en la producción de IL-2 y el grado de progreso de la lesión.

Una explicación propuesta para esta deficiencia es que el sistema inmune quede exhausto como resultado de la inflamación debida al HPV y otros patógenos que se asocian con LSIL y HSIL (Lee et al 2004). Otras posibles causas de la inhibición de la proliferación y la producción de IL-2 sin interferencia en la función efectora de los linfocitos T pueden estar asociadas con procesos metabólicos, por ejemplo rutas asociadas con grupos tiol, involucrando a IL-2 (Hadzic et al 2005). Sin embargo, los eventos precisos que conducen a esta deficiencia no se han determinado totalmente.

Los resultados anteriores sugieren un papel clave para IL-2 en la resolución de la infección y la eliminación de tumores. Acorde con ello, la concentración de IL-2 disminuye en los estadios avanzados de la enfermedad, cuando la producción de otras citocinas muestra un nuevo incremento en la mayoría de los estadios avanzados, probablemente como resultado de una inflamación exacerbada (Bais et al 2007). Se sabe que el establecimiento adecuado de una memoria CD8+ depende en gran medida de la función cooperadora de las células T CD4+, y la IL-2 ha sido propuesta como una señal requerida durante la activación inicial para una expansión secundaria de células T CD8+ (Williams et al 2006), particularmente en el caso de infecciones crónicas (Bachmann et al 2007). Por tanto, la activación parcial de células T CD8+ detectadas en la sangre de pacientes con LSIL podría ser explicada por la deficiencia en la producción de IL-2 observada en esos leucocitos. Además la actividad cooperadora de las células T CD4+ necesita de una eficiente activación por parte de las células dendríticas para activar eficientemente a las células T CD8+ (Feau et al 2011) las cuales a su vez, son conocidas productoras de IL-2 (Granucci et al 2001).

Se ha sugerido que mientras disminuye la producción de IL-2 por parte de los linfocitos T, aumenta la concentración del receptor soluble de la interleucina 2 (shIL-2R) en el plasma sanguíneo. Esta molécula es producida por las células mononucleares del sistema inmune incluyendo a los linfocitos T y refleja un estado generalizado de activación de la respuesta inmune. Resulta evidente que los estadios avanzados de la enfermedad se asocian con altas concentraciones de shIL-2R (Hildesheim A et al, 1997; Ung A et al 1999). Sin embargo, la correlación entre el avance de la enfermedad y el aumento en la concentración del shIL-2R resulta controversial. Mientras se

ha sugerido la existencia de una correlación positiva entre el avance de la enfermedad y la concentración del receptor soluble (Hildesheim A et al, 1997), otro estudio sugiere que una alta concentración de sIL-2R se asocia con un alto riesgo de padecer LSIL pero no con HSIL, además de que no resulta claro si el aumento en la concentración de sIL-2R en los estadios tempranos de la enfermedad es debida a una respuesta dirigida específicamente hacia la erradicación del HPV (Ung A et al, 1999). Nuestros resultados muestran, en contraste, una menor concentración de sIL-2R en los plasmas sanguíneos de pacientes con LSIL, con una diferencia significativa con respecto a las donadoras normales, lo cual puede reflejar la deficiencia sistémica observada en la respuesta de células T, que no se limita a la respuesta hacia el HPV.

Por tanto, en este trabajo presentamos evidencia de que pacientes con LSIL muestran una deficiencia en la respuesta de células T, la cual no está asociada con un incremento en células T reguladoras o un incremento en citocinas inhibitorias tipo Th2. También mostramos que LSP de pacientes con LSIL pueden ser activados *in vitro* para reconocer HPV, siempre y cuando los antígenos les sean presentados por células dendríticas autólogas, y que pueden ser obtenidas cantidades significativas de células CD8+IFN γ + de pacientes con LSIL después de una estimulación con un mitógeno. El hecho de que LSP de esas pacientes fueran pobres productoras de IL-2 sugiere que una deficiencia *in situ* de IL-2 puede ser un mecanismo por el cual las células infectadas escapan a la vigilancia inmunológica y por tanto, establecen las condiciones para la subsecuente expansión de clones malignos.

Conclusiones.

1. La estimulación exvivo de leucocitos de sangre periférica con antígenos de la proteína L1 de HPV-16 y -18 induce una reducida respuesta de proliferación tanto en donadoras normales como en pacientes con lesiones cervicales intraepiteliales tempranas, lo cual sugiere que la respuesta inmune natural hacia los HPV genera una limitada memoria inmunológica.
2. Las células T asociadas con la respuesta inmune natural hacia antígenos de la proteína L1 en pacientes con lesiones cervicales intraepiteliales tempranas, además de presentarse en una baja frecuencia requieren de fuertes estímulos para ser reactivadas exvivo, por lo que pueden estar presentes pero ser incapaces de montar una respuesta.
3. Los linfocitos T efectores en pacientes con lesiones cervicales intraepiteliales tempranas presentan una menor proliferación y una menor producción de IL-2 cuando son activadas vía su receptor antigénico en comparación con linfocitos de donadoras normales. Esta deficiencia no se asocia con una mayor presencia de linfocitos T reguladores ni una mayor producción de citocinas del perfil Th2.

Bibliografía

Anderson KS, Alexander J, Wei M, Cresswell P (1993). Intracellular transport of class I MHC molecules in antigen processing mutant cell lines. *J Immunol* 171:3407-3419.

Ashrafi GH, Tsirimonaki E, Marchetti B, O'Brien PM, Sibbet GJ, Andrew L, Campo MS (2002). Down-regulation of MHC class I by bovine papillomavirus E5 oncoproteins. *Oncogene* 21:248-259.

Azar KK, Tani M, Yasuda H, Sakai A, Inoue MI, Sasagawa T (2004). Increased secretion patterns of Interleukin-10 and Tumor Necrosis Factor-Alpha in cervical squamous intraepithelial lesions. *Hum Pathol* 35:1376-1384.

Bachmann MF, Wolint P, Walton S, Schwarz K, Oxenius (2007). A differential role of IL-2R signaling for CD8+ T cell responses in acute and chronic viral infections. *Eur J Immunol* 37:1502-1512.

Bais AG, Beckmann I, Ewing PC, Eijkemans MJC, Meijer CJLM, Snijders PJF, Helmerhorst TJM (2007). Cytokine release in HR-HPV(+) women without and with cervical dysplasia (CIN II and III) or carcinoma, compared with HR-HPV(-) controls. *Mediators of Inflamm* 2007:24147.

Bais AG, Beckmann I, Lindemans J, Ewing PC, Meijer CJLM, Snijders PJF, Helmerhorst TJM (2005). A shift to a peripheral Th2-type cytokine pattern during the carcinogenesis of cervical cancer becomes manifest in CIN III lesions. *J Clin Pathol* 58:1096-1100.

Barnard P, Payne E, McMillan NA (2000). The human papillomavirus E7 protein is able to inhibit the antiviral and antigrowth functions of interferon-alpha. *Virology* 277:411-419

Beckebaum S, Zhang X, Chen X, Yu Z, Frilling A, Dworacki G, Grosse-Wilde H, Broelsch CE, Gerken G, Cicinnati VR (2004). Increased levels of interleukin-10 in serum from patients with hepatocellular carcinoma correlate with profound numerical deficiencies and immature phenotype of circulating dendritic cell subsets. *Clin Cancer Res* 10:7260-7269.

Boehm T (2011). Design principles of adaptive immune systems. *Nat Rev Immunol* 11:307-317.

Bontkes HJ, de Gruijl TD, van den Muysenberg AJ, Verheijen RH, Stukart MJ, Meijer CJ, Scheper RJ, Stacey SN, Duggan-Keen MF, Stern PL, Man S, Borysiewicz LK, Walboomers JM (2000). Human papillomavirus type 16 E6/E7-specific cytotoxic T lymphocytes in women with cervical neoplasia. *Int J Cancer* 88:92-98.

Bosch FX, de Sanjose S (2003). Chapter 1: human papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr* 31:3-13.

Bryan JT, Brown DR (2000). Association of the human papillomavirus type 11 E1(E4) protein with cornified cell envelopes derived from infected genital epithelium. *Virology* 277:262-269.

Bryan JT, Brown DR (2001). Transmission of human papillomavirus type 11 infection by desquamated cornified cells. *Virology* 281:35-42.

Carter JJ, Hagensee M, Taflin MC, Lee SK, Koutsky LA, Galloway DA (1993). HPV-1 capsids expressed *in vitro* detect human serum antibodies associated with foot warts. *Virology* 195:456–462.

Carter JJ, Koutsky LA, Hughes JP, Lee SK, Kuypers J, Kiviat N, Galloway DA (2000). Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. *J Infect Dis* 181:1911-1919.

Carter JJ, Madeleine MM, Shera K, Schwartz SM, Cushing-Haugen KL, Wipf GC, Porter P, Daling JR, McDougall JK, Galloway DA (2001). Human papillomavirus 16 and 18 L1 serology compared across anogenital cancer sites. *Cancer Res* 61:1934-1940.

Clark MA, Hartley A, Geh JI (2004). Cancer of the anal canal. *Lancet Oncol* 5:149-157.

Clerici M, Merola M, Ferrario E, Trabattoni D, Villa ML, Stefanon B, Venzon DJ, Shearer GM, De Palo G, Clerici E (1997). Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst* 89:245–250.

Clifford GM, Smith JS, Franceschi S (2003). Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a metaanalysis. *Br J Cancer* 89:101-105.

Coleman N, Birley HDL, Renton AM, Hanna NF, Ryaik BK, Byrne M, Taylor Robinson D, Stanley MA (1994). Immunological events in regressing genital warts. *Am J Clin Pathol* 102:768-774.

Combita AL, Touze A, Bousarghin L, Christensen ND, Coursaget P (2002). Identification of two cross-neutralizing linear epitopes within the L1 major capsid protein of human papillomaviruses. *J Virol* 76:6480–6486.

Christensen ND, Dillner J, Eklund C, Carter JJ, Wipf GC, Reed CA, Cladel NM, Galloway DA (1996). Surface conformational and linear epitopes on HPV-16 and HPV-18 L1 virus-like particles as defined by monoclonal antibodies. *Virology* 223:174–184.

Christensen ND, Kirnbauer R, Schiller JT, Ghim SJ, Schlegel R, Jenson AB, Kreider JW (1994). Human papillomavirus types 6 and 11 have antigenically distinct strongly immunogenic conformationally dependent neutralizing epitopes. *Virology* 205: 329-335.

Christensen ND, Kreider JW (1990). Antibody-mediated neutralization *in vivo* of infectious papillomaviruses. *J Virol* 64:3151–3156

Christensen ND, Kreider JW (1991). Neutralization of CRPV infectivity by monoclonal antibodies that identify conformational epitopes on intact virions. *Virus Res* 21:169–179.

Christensen ND, Kreider JW, Cladel NM, Patrick SD, Welsh PA (1990). Monoclonal antibody mediated neutralization of infectious human papillomavirus type 11. *J Virol* 64:5678–5681.

Cubie HA, Plumstead M, Zhang W, de JO, Duncan LA, Stanley MA (1998). Presence of antibodies to human papillomavirus virus-like particles (VLPs) in 11-13-year-old schoolgirls. *J Med Virol* 56:210-216.

Culp TD, Budgeon LR, Marinkovich MP, Meneguzzi G, Christensen ND (2006). Keratinocyte-secreted laminin 5 can function as a transient receptor for human papillomaviruses by binding virions and transferring them to adjacent cells. *J Virol* 80:8940–850.

Chen XS, Casini G, Harrison SC, Garcea RL (2000). Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol Cell* 5:557-562.

Cho YS, Kang JW, Cho M, Cho CW, Lee S, Choe YK, Kim Y, Choi I, Park SN, Kim S, Dinarello CA, Yoon Y (2001). Down modulation of IL-18 expression by human papillomavirus type 16 E6 oncogene via binding to IL-18. *FEBS Lett* 501:139-145.

Daling JR, Madeleine MM, Schwartz SM, Shera KA, Carter JJ, McKnight B, Porter PL, Galloway DA, Mc Dougall JK, Tamimi H (2002). A population-based study of squamous cell vaginal cancer: HPV and cofactors. *Gynecol Oncol* 84:263-270.

Davidson EJ, Sehr P, Faulkner RL, Parish JL, Gaston K, Moore RA, Pawlita M, Kitchener HC, Stern PL (2003). Human papillomavirus type 16 E2- and L1-specific serological and T-cell responses in women with vulval intraepithelial neoplasia. *J Gen Virol* 84:2089-2097

Day PM, Gambhira R, Roden RB, Lowy DR, Schiller JT (2008). Mechanisms of human papillomavirus type 16 neutralization by L2 cross-neutralizing and L1 type specific antibodies. *J Virol* 82:4638-4646.

De Geest K, Turyk ME, Hosken MI, Hudson JB, Laimins LA, Wilbanks GD (1993). Growth and differentiation of human papillomavirus type 31b positive human cervical cell lines. *Gynecol Oncol* 49:303-310.

De Grujil TD, Bontkes HJ, Walboomers JMM, Stukart MJ, Doekhie FS, Remmink AJ, Helmerhorst TJ, Verheijen RH, Duggan-Keen MF, Stern PL, Meijer CJ, Scheper RJ (1988). Differential T helper cell responses to human papillomavirus type 16 E7 related to viral clearance or persistence in patients with cervical neoplasia: a longitudinal study. *Cancer Res* 58:1700-1706.

De Leo C, Catelan N, López M, González N, Weckmann,AL, Melin-Aldana H, Vargas-Alarcón G, Bordes J, Alarcón-Segovia D, Granados J, Ramírez E, Lisker (1997). HLA Class I and Class II alleles and in mexican mestizos from serological typing of 50 families. *Human Biology* 69:809-818.

de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology* 324:17-27.

de Vos Van Steenwijk PJ, Heusinkveld M, Ramwadhoebe TH, Löwik MJ, van der Hulst JM, Goedemans R, Piersma SJ, Kenter GG, van der Burg SH (2010). An Unexpectedly Large Polyclonal Repertoire of HPV-Specific T Cells Is Poised for Action in Patients with Cervical Cancer. *Cancer Res* 70:2707-2717.

Doan T, Herd K, Street M, Bryson G, Fernando G, Lambert P, Tindle R (1999). Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein expressed in peripheral epithelium tolerizes E7-directed cytotoxic T-lymphocyte precursors restricted through human (and mouse) major histocompatibility complex class I alleles. *J Virol* 73:6166-6170.

Doorbar J (2005). The papillomavirus life cycle. *J of Clin Virology* 32S:S7-S15.

Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C, Crawford L (1991). Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 352: 824-827.

Doorbar J, Foo C, Coleman N, Medcalf E, Hartley O, Prospero T, Napthine S, Sterling J, Winter G, Griffin H (1997). Characterisation of events during the late stages of HPV16 infection in vivo using high affinity synthetic fabs to E4. *Virology* 238:40-52.

Egawa K (2003). Do human papillomaviruses target epidermal stem cells? *Dermatology* 207:251-254.

Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K, McMillan NA (1997). Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol* 71: 2449–2456.

Evans EML, Man S, Evans AS, Borysiewicz LK (1997). Infiltration of cervical cancer tissue with human papillomavirus-specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res* 57:2943–2950

Favre M, Orth G, Majewski S, Baloul S, Pura A, Jablonska S (1998). Psoriasis: a possible reservoir for human papillomavirus type 5, the virus associated with skin carcinomas of epidermodysplasia verruciformis. *J Invest Dermatol* 110:311–317.

Feau S, Arens R, Togher S, Schoenberger SP (2011). Autocrine IL-2 is required for secondary population expansion of CD8+ memory T cells. *Nature Immunol* 12:908–914.

Ferenczy A, Coutlee F, Franco E, Hankins C (2003). Human papillomavirus and HIV coinfection and the risk of neoplasias of the lower genital tract: a review of recent developments. *CMAJ* 169:431-434.

Ferguson M, Heath A, Johnes S, Pagliusi S, Dillner J (2005). Results of the first WHO international collaborative study on the standardization of the detection of antibodies to human papillomaviruses. *Int J Cancer*. 118:1508-1514.

Florin L, Sapp C, Streeck RE, Sapp M (2002). Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. *J Virol* 76:10009–10014.

Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM, Rousseau MC, Désy M, Rohan TE (1999). Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis* 180:1415–1423.

Frazer IH (2004). Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev Immunol* 4:46-54.

Ghim S, Christensen ND, Kreider JW, Jenson AB (1991). Comparison of neutralization of BPV-1 infection of C127 cells and bovine fetal skin xenografts. *Int J Cancer* 49:285–289.

Gillison ML, Lowy DR (2004). A causal role for human papillomavirus in head and neck cancer. *Lancet* 363:1488-1489.

Giroglou T, Florin L, Schafer F, Streeck RE, Sapp M (2001). Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol* 75:1565-1570.

Giroglou T, Sapp M, Lane C, Fligge C, Christensen ND, Streeck RE, Rose RC (2001). Immunological analyses of human papillomavirus capsids. *Vaccine* 19:1783–1793.

Granucci FC, Vizzardelli C, Pavelka N, Feau S, Persico M, Virzi E, Rescigno M, Moro G, Ricciardi-Castagnoli P (2001). Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nat Immunol* 2:882–888.

Greer CE, Wheeler CM, Ladner MB, Beutner K, Coyne MY, Liang H, Langenberg A, Yen TS, Ralston R (1995). Human papillomavirus (HPV) type distribution and serological response to HPV type 6 virus-like particles in patients with genital warts. *J Clin Microbiol* 33:2058-2063.

Griesser H, Sander H, Walczak C, Hilfrich RA (2009). HPV Vaccine protein L1 predicts disease outcome of high-risk HPV+ early squamous dysplastic lesions. *Am J Clin Pathol* 132:840-845.

Guess JC, McCance DJ (2005). Decreased migration of Langerhans precursor-like cells in response to human keratinocytes expressing human papillomavirus type 16 E6/E7 is related to reduced macrophage inflammatory protein-3alpha production. *J Virol* 79:14852-14862.

Hadzic T, Li L, Cheng N, Walsh SA, Spitz DR, Knudson CM (2005). The role of low molecular weight thiols in T lymphocyte proliferation and IL-2 secretion. *J Immunol* 175:7965–7972.

Hagensee ME, Olson NH, Baker TS, Galloway DA (1994). Threedimensional structure of vaccinia virus-produced human papillomavirus type 1 capsids. *J Virol* 68:4503–4505.

Hildesheim A, Schiffman MH, Tsukui T, Swanson CA, Lucci J 3rd, Scott DR, Glass AG, Rush BB, Lorincz AT, Corrigan A, Burk RD, Helgesen K, Houghten RA, Sherman ME, Kurman RJ, Berzofsky JA, Kramer TR (1997). Immune activation in cervical neoplasia: cross-sectional levels and disease association between plasma soluble interleukin 2 receptor. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 6:807-813.

Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD (1998). Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 338:423-428.

Ho GY, Studentsov Y, Hall CB, Bierman R, Beardsley L, Lempa M, and Burk RD (2002). Risk factors for subsequent cervicovaginal human papillomavirus (HPV) infection and the protective role of antibodies to HPV-16 virus-like particles. *J Infect Dis* 186:737–742

Huang SM, McCance DJ (2002). Down regulation of the interleukin-8 promoter by human papillomavirus type 16 E6 and E7 through effects on CREB binding protein/p300 and P/CAF. *J Virol* 76: 8710-8721.

ICTV virus taxonomy (2008). En: www.ICTVonline.org

Jiménez-Flores R, Méndez-Cruz R, Jorge Ojeda-Ortiz J, Muñoz-Molina R, Balderas-Carrillo O, Diaz-Soberanes ML, Lebecque S, Saeland S, Daneri-Navarro A, Garcia-Carranca A, Ullrich SE, Flores-Romo L (2006). High-risk human papilloma virus infection decreases the frequency of dendritic Langerhans' cells in the human female genital tract. *Immunology* 117:220-228.

Jochmus-Kudielka I, Schneider A, Braun R, Kimmig R, Koldovsky U, Schneeweis KE, Seedorf K, Gissmann L (1989). Antibodies against the human papillomavirus type 16 early proteins in human sera: correlation of anti-E7 reactivity with cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 81:1698–1704.

Jones SB (1999). Cancer in the developing world: a call to action. *BMJ* 319:505-508.

Joyce JG, Tung JS, Przysiecki CT, Cook JC, Lehman ED, Sands JA, et al (1999). The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J Biol Chem* 274:5810–22.

Kadish AS, Ho GYF, Burk RD, Wang YX, Romney SL, Ledwidge R, Angeletti RH (1997). Lymphoproliferative responses to human papillomavirus (HPV) type 16 proteins E6 and E7: outcome of HPV infection and associated neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 89:1285–1293.

Kalinski P, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML (1999). T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today* 20:561–567.

Kalinsky P, Moser M (2005). Consensual immunity: success-driven development of T-helper-1 and T-helper-2 responses. *Nat Rev Immunol* 5: 251–260.

Kanda T, Teshima H, Katase K, Umezawa S, Watabe H, Takahashi H, Onda T, Yoshiike K (1995). Occurrence of the antibody against human papillomavirus type 16 virion protein L2 in patients with cervical cancer and dysplasia. *Intervirol* 38:187–191

Kimbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR, Schiller JT (1992). Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:12180–12184.

Kimbauer R, Hubbert NL, Wheeler CM, Becker TM, Lowy DR, Schiller JT (1994). A virus-like particle enzyme-linked immunosorbent assay detects serum antibodies in a majority of women infected with human papillomavirus type 16. *J Natl Cancer Inst* 86:494–499.

Kimbauer R, Taub J, Greenstone H, Roden R, Durst M, Gissmann L, Lowy DR, Schiller JT (1993). Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J Virol* 67:6929–6936.

Kleine-Lowinski K, Rheinwald JG, Fichorova RN, Anderson DJ, Basile J, Munger K, Daly CM, Rosl F, Rollins BJ (2003). Selective suppression of monocyte chemoattractant protein-1 expression by human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins in human cervical epithelial and epidermal cells. *Int J Cancer* 107:407–415.

Lee B-N, Follen M, Shen D-Y, Malpica A, Adler-Storthz K, Shearer WT, Reuben JM (2004). Depressed type 1 cytokine synthesis by superantigen-activated CD4-T cells of women with human papillomavirus-related high-grade squamous intraepithelial lesions. *Clin Diagn Lab Immunol* 11:239–244.

Lee SJ, Cho YS, Cho MC, Shim JH, Lee KA, Ko KK, Choe YK, Park SN, Hoshino T, Kim S, Dinarello CA, Yoon DY (2001). Both E6 and E7 oncoproteins of human papillomavirus 16 inhibit IL-18-induced IFN-gamma production in human peripheral blood mononuclear and NK cells. *J Immunol* 167:497–504.

Li B, Dou QP (2000). Bax degradation by the ubiquitin/proteasome-dependent pathway: involvement in tumor survival and progression. *Proc Natl Acad Sci* 97:3850–3855.

Liaw KL, Hildesheim A, Burk RD, Gravitt P, Wacholder S, Manos MM, Scott DR, Sherman ME, Kurman RJ, Glass AG, Anderson SM, Schiffman M (2001). A prospective study of human papillomavirus (HPV) type 16 DNA detection by polymerase chain reaction and its association with acquisition and persistence of other HPV types. *J Infect Dis* 183:8-15.

Madison KC (2003). Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis. *J Invest Dermatol* 121:231-241

Maecker B, Mougiakakos D, Zimmermann M, Behrens M, Hollander S, Schrauder A, Schrappe M, Welte K, Klein C (2006). Dendritic cell deficiencies in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients. *Leukemia*, 20:645-649.

Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM (1989). Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* 7:209-214.

Marchetti B, Ashrafi GH, Tsirimonaki E, O'Brien PM, Campo MS (2002). The bovine papillomavirus oncoprotein E5 retains MHC class I molecules in the Golgi apparatus and prevents their transport to the cell surface. *Oncogene* 21:7808-7816.

Matthews K, Leong CM, Baxter L, Inglis E, Yun K, Bäckström BT, Doorbar J, Hibma M (2003). Depletion of Langerhans cells in human papillomavirus type 16-infected skin is associated with E6-mediated down regulation of E-cadherin. *J Virol* 77:8378-8385.

Matsukura T, Sugase M (2001). Relationships between 80 human papillomavirus genotypes and different grades of cervical intraepithelial neoplasia: association and causality. *Virology* 283:139-147.

McHeyzer-Williams M, Okitsu S, Wang N, Louise McHeyzer-Williams L (2012). Molecular programming of B cell memory) *Nat Rev Immunol* 12:24-34

Middleton K, Peh W, Southern SA, Griffin HM, Sotlar K, Nakahara T, El-Sherif A, Morris L, Seth R, Hibma M, Jenkins D, Lambert P, Coleman N, Doorbar J (2003). Organisation of the human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for the selection of diagnostic markers. *J Virol* 77:10186-10201.

Molling JW, de Grujil TD, Glim J, Moreno M, Rozendaal L, Meijer CJLM, van den Eertwegh AJM, Scheper RJ, von Blomberg ME, Bontkes HJ (2007). CD4+CD25hi regulatory T-cell frequency correlates with persistence of human papillomavirus type 16 and T helper cell responses in patients with cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 121:1749-1755

Moscicki AB, Schiffman M, Kjaer S, Villa LL (2006): Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine*, 24(Suppl 3):S42-S51.

Munger K, Basile JR, Duensing S, Eichten A, Gonzalez SL, Grace M, Zachny VL (2001). Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* 20:7888-7898.

Munger, K. Howley PM (2002). Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res* 89:213-228.

Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJF, Meijer CJLM (2003). Epidemiological classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 348:518-527.

Muñoz N, Bosch FX, Castellsagué X, Díaz M, De Sanjosé S, Hammouda D, Shah KV, Meijer CJLM (2004). Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int J Cancer* 111: 278–285

Nakagawa M, Stites DP, Patel S, Farhat S, Scott M, Hills NK, Palefsky JM, Moscicki AB (2000). Persistence of human papillomavirus type 16 infection is associated with lack of cytotoxic T lymphocyte response to the E6 antigens. *J Infect Dis* 182:595–598.

Niedergang F, Didierlaurent A, Kraehenbuhl JP, Sirard JC (2004). Dendritic cells: the host Achille's heel for mucosal pathogens? *Trends Microbiol* 12:79-88.

Oerke S, Hohn H, Zehbe I, Pilch H, Schicketanz KH, Hitzler WE, Neukirch C, Freitag K, Mæurer MJ (2005). Naturally processed and HLA-B8-presented HPV16 E7 epitope recognized by T cells from patients with cervical cancer. *Int J Cancer* 114:766–778.

Ozbun MA, Meyers C (1998). Temporal usage of multiple promoters during the life cycle of human papillomavirus type 31b. *J Virol* 72:2715-2722.

Park JS, Kim EJ, Kwon HJ, Hwang ES, Namkoong SE, Um SJ (2000). Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein. Implication for the E7-mediated immune evasion mechanism in cervical carcinogenesis. *J Biol Chem* 275:6764-6769

Passmore JA, Milner M, Denny L, Sampson C, Marais DJ, Allan B, Gumbi PP, Hitzeroth II, Rybicki EP, Williamson AL (2006). Comparison of cervical and blood T-cell responses to human papillomavirus-16 in women with human papillomavirus associated cervical intraepithelial neoplasia. *Immunology* 119:507-514.

Patterson NA, Smith JL, Ozbun MA. Human papillomavirus type 31b infection of human keratinocytes does not require heparan sulfate (2005). *J Virol* 79:6838–6847.

Pecorelli S, Favalli G, Zigliani L, Odicino F (2003). Cancer in women. *Int J Gynaecol Obstet* 82:369-379.

Ratta M, Fagnoni F, Curti A, Vescovini R, Sansoni P, Oliviero B, Fogli M, Ferri E, Della Cuna GR, Tura S, Baccarani M, Lemoli RM (2002). Dendritic cells are functionally defective in multiple myeloma: the role of interleukin-6. *Blood* 100:230-237.

Richards RM, Lowy DR, Schiller JT, Day PM (2006). Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:1522–7.

Richardson H, Kelsall G, Tellier P, Voyer H, Abrahamowicz M, Ferenczy A, Coutlée F, Franco EL (2003). The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12:485-490.

Roden RBS, Hubbert NL, Kimbauer R, Breitburd F, Lowy DR, Schiller JT (1995). Papillomavirus L1 capsids agglutinate mouse erythrocytes through a proteinaceous receptor. *J Virol* 69:5147–5151.

- Roden RBS, Hubbert NL, Kirnbauer R, Christensen ND, Lowy DR, Schiller JT (1996). Assessment of the serological relatedness of genital human papillomaviruses by hemagglutination inhibition. *J Virol* 70:3298–3301
- Roden RB, Greenstone HL, Kirnbauer R, Booy FP, Jessie J, Lowy DR, Schiller JT (1996). *In vitro* generation and type-specific neutralization of a human papillomavirus type 16 virion pseudotype. *J Virol* 70:5875–5883.
- Roden RB, Lowy DR, Schiller JT (1997). Papillomavirus is resistant to desiccation. *J Infect Dis* 176:1076-1079.
- Rubin MA, Kleter B, Zhou M, Ayala G, Cubilla AL, Quint WG, Pirog EC (2001). Detection and typing of human papillomavirus DNA in penile carcinoma: evidence for multiple independent pathways of penile carcinogenesis. *Am J Pathol* 159:1211–1218.
- Rudolf MP, Nieland JD, DaSilva DM, Velders MP, Muller M, Greenstone HL, Schiller JT, Kast WM (1999). Induction of HPV16 capsid protein-specific human T cell responses by virus-like particles. *Biol Chem* 380:335-340.
- Scott M, Stites DP, Moscicki AB (1999). Th1 cytokine patterns in cervical Human Papillomavirus infection. *Clinical and Diagnostic Lab Immunol* 6:751–755.
- Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD (2001). IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410:1107–1111.
- Shepherd PS, Rowe AJ, Cridland JC, Coletart T, Wilson P, Luxton JC (1996). Proliferative T cell responses to human papillomavirus type 16 L1 peptides in patients with cervical dysplasia. *J Gen Virol* 77:593-602.
- Sherman L, Jackman A, Itzhaki H, Stoppler MC, Koval D, Schlegel R (1997). Inhibition of serum- and calcium-induced differentiation of human keratinocytes by HPV16 E6 oncoprotein: role of p53 inactivation. *Virology* 237:296-306.
- Shortman K & Liu Y-J (2002). Mouse and human dendritic cells subtypes. *Nat Rev Immunol* 2:151-161.
- Sillman FH, Sentovich S, Shaffer D (1997). Ano-genital neoplasia in renal transplant patients. *Ann Transplant* 2:59-66.
- Solomon D (1989): The 1988 Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytological diagnosis. *JAMA* 262:931–934.
- Stacey SN, Jordan D, Williamson AJ, Brown M, Coote JH, Arrand JR (2000). Leaky scanning is the predominant mechanism for translation of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein from E6/E7 bicistronic mRNA. *J Virol* 74:7284-7297.
- Stanley M, Lowy DR, Frazer I (2006). Chapter 12: Prophylactic HPV vaccines: underlying mechanisms. *Vaccine*, 24(Suppl 3):S106–S113.

Stoler MH, Rhodes CR, Whitbeck A, Wolinsky SM, Chow LT, Broker TR (1992). Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias. *Hum Pathol* 23:117-128.

Thomas M, Banks L (1998). Inhibition of bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. *Oncogene* 17:2943-2954.

Tindle RW (2002). Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nat Rev Cancer* 2:59-64.

Tjong MY, van der Vange N, ter Schegget JS, Burger MP, ten Kate FW, Out TA (2001). Cytokines in cervicovaginal washing fluid from patients with cervical neoplasia. *Cytokine* 14:357-360.

Trimble CL, Hildesheim A, Brinton LA, Shah KV, Kurman RJ (1996). Heterogeneous etiology of squamous carcinoma of the vulva. *Obstet Gynecol* 87:59-64.

Trinchieri G, Sher A (2007). Cooperation of toll-like receptors signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol* 7:179-190.

Trus BL, Roden RB, Greenstone HL, Vrhel M, Schiller JT, Booy FP (1997). Novel structural features of bovine papillomavirus capsid revealed by a three-dimensional reconstruction to 9 Å resolution. *Nat Struct Biol* 4:413-420.

Tsukui T, Hildesheim A, Schiffman MH, Lucci J III, Contois D, Lawler P, Rush BB, Lorincz AT, Corrigan A, Burk RD, Qu W, Marshall MA, Mann D, Carrington M, Clerici M, Shearer GM, Carbone DP, Scott DR, Houghten RA, Berzofsky JA (1996). Interleukin 2 production *in vitro* by peripheral lymphocytes in response to human papillomavirus-derived peptides: correlation with cervical pathology. *Cancer Res* 56:3967-3974.

Ung A, Kramer TR, Schiffman M, Herrero R, Bratti MC, Burk RD, Swanson CA, Sherman ME, Hutchinson ML, Alfaro M, Morales J, Balmaceda I, Hildesheim A (1999). Soluble Interleukin 2 Receptor Levels and Cervical Neoplasia: Results from a Population-based Case-Control Study in Costa Rica *Cancer Epidemiol, Biomarkers Prev* 8: 249-253.

van den HM, Van Poelgeest MI, Van der Hulst JM, de JJ, Drijfhout JW, Fleuren GJ, Valentijn AR, Wafelman AR, Slappendel GM, Melief CJ, Offringa R, Van der Burg SH, Kenter GG. Skin reactions to human papillomavirus (HPV) 16 specific antigens intradermally injected in healthy subjects and patients with cervical neoplasia. *Int J Cancer* 2008; 123:146-152.

van der Burg SH, Rensing ME, Kwappenberg KM, de Jong A, Straathof K, de Jong J, Geluk A, van Meijgaarden KE, Franken KL, Ottenhoff TH, Fleuren GJ, Kenter G, Meliej CJ, Offringa R (2001). Natural T-helper immunity against human papillomavirus type 16 (HPV16) E7-derived peptide epitopes in patients with HPV16-positive cervical lesions: identification of 3 human leukocyte antigen class II-restricted epitopes. *Int J Cancer* 91:612-618.

van Poelgeest MIE, Nijhuis ER, Kwappenberg KMC, Hamming IE, Drijfhout, JW, Fleuren GJ, van der Zee AGJ, Melief CJM, Kenter GG, Nijman HW, Offringa R, van der Burg SH (2006). Distinct regulation and impact of type 1 T-cell immunity against HPV16 L1, E2 and E6 antigens during HPV16-induced cervical infection and neoplasia. *Int J Cancer* 18:675-683.

Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ (2008). How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 8:523-532.

Viladiu P, Bosch FX, Castellsague X, Munoz N, Escriba JM, Hamsikova E, Hofmannova V, Guerrero I, Izquierdo A, Navarro C, Moreo P, Izarzugaza I, Ascunce N, Gili M, Munoz MT, Tafur L, Shah KV, Vonka V (1997). Human papillomavirus DNA and antibodies to human papillomaviruses 16 E2, L2, and E7 peptides as predictors of survival in patients with squamous cell cervical cancer. *J Clin Oncol* 15:610-619.

Villa LL, Slichero L, Rahal P, Caballero O, Ferenczy A, Rohan T, Franco EL (2000). Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol* 81:2959-2968.

Visser J, Nijman HW, Hoogenboom BN, Jager P, van Baarle D, Schuurin E, Abdulahad W, Miedema F, van der Zee AG, Daemen T (2007). Frequencies and role of regulatory T cells in patients with (pre)malignant cervical neoplasia. *Clin Exp Immunol* 50:199-209.

Vyas JM, Van der Veen AG, Ploegh HL (2008). The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat rev Immunol* 8:607-618.

Walboomers JM, Jacobs M, Manos MM, Bosch FX, Kumer JA, Shah KV, Snijders PJF, Peto J, Meijer CJLM, Muñoz N (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189:12-19.

Wang SS, Schiffman M, Herrero R, Carreon J, Hildesheim A, Rodriguez AC, Bratti MC, Sherman ME, Morales J, Guillen D, Alfaro M, Clayman B, Burk RD, Viscidi RP (2004). Determinants of human papillomavirus 16 serological conversion and persistence in a population-based cohort of 10 000 women in Costa Rica. *Br J Cancer* 91:1269-1274.

Weckman AN, Vargas-Alarcón G, López M, González N, De Leo C, Castelan N, Bordes J, Alarcón-Segovia D, Granados J, Ramírez E, Lisker R (1997). Frequencies of HLA-A and HLA-B alleles in a México city mestizo sample. *Am J of Human Biology* 9:1-5.

Welters MJ, de Jong A, van den Eeden SJ, van der Hulst JM, Kwappenberg KM, Hassane S, Franken KL, Drijfhout JW, Fleuren GJ, Kenter GG, Melief CJM, Offringa R, van der Burg SH (2003). Frequent display of human papillomavirus type 16 E6-specific memory T-helper cells in the healthy population as witness of previous viral encounter. *Cancer Res* 63:636-644.

White WI, Wilson SD, Bonnez W, Rose RC, Koenig S, Suzich JA (1998). *In vitro* infection and type-restricted antibody-mediated neutralization of authentic human papillomavirus type 16. *J Virol* 72:959-964.

Williams MA, Tyznik AJ, Bevan MJ (2006). Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory. *Nature* 441:890-893.

Williams OM, Hart KW, Wang EC, Gelder CM (2002). Analysis of CD4(+) T-cell responses to human papillomavirus (HPV) type 11 L1 in healthy adults reveals a high degree of responsiveness and cross-reactivity with other HPV types. *J Virol* 76:7418-7429.

Wilson VG, West M, Woytek K, Rangasamy D (2002). Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus Genes* 24:275-290.

Xi LF, Critchlow CW, Wheeler CM, Koutsky LA, Galloway DA, Kuypers J, Hughes JP, Hawes SE, Surawicz C, Goldbaum G, Holmes KK, Kiviat NB (1998). Risk of anal carcinoma *in situ* in relation to human papillomavirus type 16 variants. *Cancer Res* 58:3839–3844.

You J, Croyle JL, Nishimura A, Ozato K, Howley PM (2004). Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. *Cell* 117:349–360.

Youde SJ, Dunbar PR, Evans EM, Fiander AN, Borysiewicz LK, Cerundolo V, Man S (2000). Use of fluorogenic histocompatibility leukocyte antigen-A*0201/HPV 16 E7 peptide complexes to isolate rare human cytotoxic T-lymphocyte-recognizing endogenous human papillomavirus antigens. *Cancer Res* 60:365–371.

Zhang P, Nouri M, Brandsma JL, Iftner T, Steinberg BM (1999). Induction of E6/E7 expression in cottontail rabbit papillomavirus latency following UV activation. *Virology* 263:388–394.

Zou W (2006). Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nature Rev Immunol* 6:295–307.

zur Hausen H (1996). Roots and perspectives of contemporary papillomavirus research. *J Cancer Res Clin Oncol* 122:3–13.

zur Hausen H (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2:342–350.

Anexo.

Artículo publicado:

Jorge Hernández-Montes, Leticia Rocha-Zavaleta, Alberto Monroy-García, Benny Weiss-Steider, María del Carmen Zaragoza-Ortega, Fernando Cruz-Talonia, Omar Cruz y Cruz, Laura Bonifaz-Alfonso, Adraiana Karina Chávez-Rueda, Martha Patricia Rojo-Aguilar, María Victoria Legorreta-Haquet, María de Lourdes Mora García.

Peripheral blood lymphocytes from low-grade squamous intraepithelial lesions patients recognize vaccine antigens in the presence of activated dendritic cells, and produce high levels of CD8+IFN γ + T and low levels of IL-2 when induced to proliferate.

Infectious Agents and Cancer 2012, 7:12.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Peripheral blood lymphocytes from low-grade squamous intraepithelial lesions patients recognize vaccine antigens in the presence of activated dendritic cells, and produced high levels of CD8 + IFN γ + T cells and low levels of IL-2 when induced to proliferate

Jorge Hernández-Montes¹, Leticia Rocha-Zavaleta², Alberto Monroy-García^{1,6}, Benny Weiss-Steider¹, María del Carmen Zaragoza-Ortega¹, Fernando Cruz-Talonia³, Omar Cruz y Cruz³, Laura Bonifaz-Alfonso⁴, Adriana Karina Chávez-Rueda⁵, Martha Patricia Rojo-Aguilar⁴, María Victoria Legorreta-Haquet⁵ and María de Lourdes Mora-García^{1*}

Abstract

Background: Most infections with human papillomavirus (HPV) are resolved without clinical intervention, but a minority evolves into chronic lesions of distinct grades, including cervical-uterine cancer. It is known that in most cases the immune system mediates elimination of HPV infection. However, the mechanism of immune evasion leading to HPV persistence and development of early cervical lesions is not fully understood. The aim of the present work was to evaluate the potential of peripheral blood leukocytes (PBL) from low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) patients to be activated *ex-vivo* by vaccine antigens, the participation of cytotoxic lymphocytes and regulatory T cells, and to determine the secretion of Th1 and Th2 cytokines mediated by stimulation of T cell receptors.

Results: We found that PBL from LSIL patients showed a significantly lower proliferation rate to vaccine antigens as compared to that of healthy donors, even though there was not a difference in the presence of antibodies to those antigens in sera from both groups. We did not find differences in either the frequency of CD4 + CD25 + FoxP3+ in PBL, or the levels of IL-4, IL-5 and IL-10 in plasma or conditioned media from PBL incubated with TcR agonists *in vitro*, between the two groups. However, we detected a lower production of IL-2 and a higher proportion of CD8 + IFN γ + cells in PBL from LSIL patients as compared with PBL from normal donors. We also observed that PBL from patients infected by HPV-16 and -18 were not able to proliferate in the presence of soluble HPV antigens added to the culture; however, a high level of proliferation was attained when these antigens were presented by activated dendritic cells.

* Correspondence: mogl@servidor.unam.mx

¹Laboratorio de Inmunobiología, Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, FES-Zaragoza, UNAM, México, Laboratorio 3, PB, UMEZ, Campus II, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, Batalla 5 de mayo s/n, Col. E. de Oriente, Esquina Fuerte de Loreto, Iztapalapa, CP 09230 México, DF, Mexico

Full list of author information is available at the end of the article



© 2012 Hernández-Montes et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Conclusions: Our results suggest that the immunodeficiency reported in LSIL patients could be due to the inability of specific cytotoxic T lymphocytes that for some unknown reason are present but unable to mount a response when challenged with their antigens, probably related to an *in situ* IL-2 production deficiency.

Keywords: Peripheral blood lymphocytes, HPV, LSIL, IL-2 deficiency

Background

Evasion of the immune response by malignant cells is associated with the development of neoplastic diseases. Several mechanisms have been described that negatively regulate the immune system against foreign antigens. Among these mechanisms a bias in the secretion of cytokines produced by T cells towards the Th2 profile (IL-10, IL-4) as well as the inhibition of cytotoxic T cells (CTLs) has been proposed [1]. It has also been suggested that an increased activity of regulatory T cells may prevent an effective immune response against transformed cells and associated pathogens [2,3].

Cervical cancer (CeCa) is strongly associated to Human Papillomavirus (HPV) infection, and the progression of the disease depends on continuous viral replication and the eventual integration of the viral genome into the host genome [4]. The presence of specific T lymphocytes to HPV antigens in healthy subjects and in patients with different degrees of illness has been described [5]. The biological significance of these responses in healthy individuals has been interpreted as the mark left by successful virus elimination [6]; however, the presence of this response in patients with CeCa might indicate a poor ability of the lymphocytes to eliminate the virus. Specific T cell responses to various HPV proteins have been found, indicating that viral antigen recognition is a constant during the different phases of viral infection [5]. The presence of CD8+ IFN γ + lymphocytes is a normal occurrence since the early stages of viral infection [7]. However, in a number of cases their activity is unable to eradicate infected cells, which may contribute to the development of malignancy.

It is known that activation of CD8+ effector T cells requires the collaboration of CD4+ T cells, in particular for the generation of memory clones. In turn, the initial activation of naive CD4+ and CD8+ T cells depends on specific antigen presentation by activated dendritic cells. Antigen presentation and cellular effector activity during an antiviral response are regulated by cytokines such as IL-2, IL-12 and IFN γ . However, the instructive mechanisms that define the outcome of the antigen-presenting cells to T lymphocytes have not been fully elucidated [8]. In the case of HPV, the nature of antigen presentation and the resulting effector response is hampered by the fact that HPV does not have an active lytic phase, thus limiting the inflammatory process, which seems to be an important requirement for activation of antigen-presenting cells [9].

The purpose of this study was to evaluate the capability of T lymphocytes from Low-grade Squamous Intraepithelial

Lesions (LSIL) patients to be activated by vaccine antigens. The participation of dendritic cells, CD8+ IFN γ cells and Treg cells during T cell activation was also determined. In addition, the production of Th1- and Th2-type interleukins by T cells stimulated by a CD3/CD28 agonist was quantified in an attempt to identify host factors associated with the deficient anti-HPV response known to be present in LSIL patients.

Materials and methods

Subjects and biological samples

Patients attending the Clinic of Dysplasias of the Cruz-Talonia Foundation were studied. Informed consent was obtained from all women included in this work. Human material was handled according to institutional experimentation and safety guidelines. The study population was selected from women referred for colposcopy due to abnormal cytology (n = 20), and women without a history of cervical abnormalities who attended the clinic for routine gynecological examination (n = 20). All women underwent cytological and histopathological analysis of colposcopy-directed samples. Cytology diagnosis was classified according to the Bethesda system [10]. Colposcopy-directed biopsies were obtained from acetowhite or normal tissue around the transformation zone. Tissue samples were placed in tubes containing sterile, contaminant-free phosphate-buffered saline and processed the same day for DNA isolation. Blood samples were obtained from either 20 LSIL patients, or 20 normal donors with normal cytology as control and a group of 5 young healthy women who were previously vaccinated with three doses of Gardasil[®] (Merck S&D, USA).

HPV DNA detection by PCR

All reagents used for the isolation and amplification of DNA were purchased from Invitrogen, USA. Cervical biopsies were treated with proteinase K. DNA was extracted with phenol/chloroform and precipitated with ethanol. HPV DNA was amplified using the general primers MY09 (5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3') and MY11 (5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3'), which amplify a conserved 450-bp fragment from the L1 gene [11]. Genomic DNA (100 ng) was denatured by heating to 95 °C for 30 s. Annealing of primers was performed at 45 °C for 30 s and extension at 72 °C for 60 s. The cycle was repeated 30 times. Specific amplification of HPV-6, -11, -16, -18, -31, -33, -39, -45, -52, and -58 was

achieved by using a set of primers for E7 specific PCR previously described in [12]. Genomic DNA (100 ng) was denatured by heating to 95 °C for 60 s. Annealing of primers was performed at 45 °C for 2 min and extension at 72 °C for 90 s. The cycle was repeated 40 times. To ensure DNA integrity, the β -actin gene was amplified for all samples.

Lymphocytes proliferation assay

Serum from blood samples was separated from the cellular fraction by centrifugation. Serum samples were heat-inactivated by incubation at 57 °C for 30 min and then cryo-preserved at -70 °C until use. The cellular fraction was mixed 1:1 v/v with PBS, loaded onto a 1.077 Histo-paque gradient (Sigma-Aldrich, USA) and centrifuged to isolate the layer containing the peripheral blood leukocytes (PBL). 5×10^5 PBL were seeded in 96-microwell plates (Corning, USA) in 200 μ L of IMDM (Invitrogen, USA) supplemented with 10% of autologous serum (IMDM10S), either with medium alone, in the presence of 1 μ L of Infanrix Hexa[®] (GSK Biomedicals, Belgium) corresponding to 6×10^{-2} IU of diphtheria, 8×10^{-2} IU of tetanus, 50 ng of pertussis, 20 ng of hepatitis B, and 0.16 IU of polio antigens, or in the presence of 1 μ L of Cervarix[®] (GlaxoSmithKleen, Belgium) corresponding to 40 ng of each HPV-16/-18 L1 proteins, for 5 days. Thus, the assay consisted of three sets of samples: a) LSIL, b) normal, and c) young women vaccinated with Gardasil[®]. Each set of samples was challenged with Cervarix[®] or Infanrix[®]. We used as a control a culture in the absence of antigen. Then, 0.5 μ Ci of tritiated thymidine (Dupont NEN, USA) was added per well and incubated for another 16 hours. Finally the PBL cells were harvested and the incorporation of tritiated thymidine determined. The proliferation index corresponded to the ratio of: the cpm of cells incubated with antigen/cpm of control cells for each sample.

Enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA)

Serum antibodies from patients with LSIL and from healthy donors were tested in ELISA. For this purpose, immuno-plates (Costar-Corning, USA) were coated with 50 μ L/well of Infanrix Hexa[®] or with 50 μ L/well of Cervarix[®] diluted 1:20 in PBS and incubated at 4 °C overnight. Plates were washed and non-specific binding sites were blocked with 2% BSA (Research Organics, USA) for 2 hr at 37 °C. Then 50 μ L of blood serum diluted 1:500 were added to the plate and incubated for 2 hr at 37 °C. 50 μ L of alkaline phosphatase-conjugated goat-anti human IgG (Invitrogen, USA) diluted 1:5000 were added and incubated for 1 hr at 37 °C. Alkaline phosphatase substrate (Sigma-Aldrich, USA) diluted in a 10% (w/v) diethanolamine solution (Sigma-Aldrich, USA) was finally added to the plates. The absorbance was read at

405 nm in an ELISA plate reader (Molecular Devices, USA). The final values were obtained after subtracting the non-specific absorbance reactivity obtained in wells with saline to the reactivity obtained in wells with antigen.

Determination of CD4 + CD25 + FoxP3+ cells by flow cytometry

5×10^5 PBL were incubated with 1 μ L of antiCD4/PerCP (R&D Systems, USA) and 1 μ L of antiCD25/PE (R&D Systems, USA) at 4 °C for 30 min, washed twice and subsequently permeabilized and labeled with antiFoxP3/APC (eBioscience, USA) and isotypes involved. After three final washes, the cells were fixed with 2% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, USA) and the percentage of CD4 + CD25 + FoxP3+ cells was determined by flow cytometry (FacsAriaII, BD, USA).

Isolation and maturation of monocytic-derived dendritic cells

PBL were fractionated by adherence to plastic dishes during 2 hr at 37 °C. The adherent fraction was then cultured for 4 days in IMDM-10S supplemented with 30 ng/ml of rhGM-CSF (R&D Systems, USA) and 20 ng/mL of rhIL-4 (R&D Systems, USA). The cells were then harvested, washed and incubated for one hour with 5 μ L/mL of Cervarix[®] at 37 °C. Finally the cells were kept in culture for two days more in IMDM-10S with rhGM-CSF, rhIL-4 and 20 μ g/mL of poly I:C (Sigma-Aldrich, USA), to induce their maturation, either in the presence or in the absence of 1 μ L of Cervarix[®].

Lymphocytes proliferation induced by dendritic cells assay

PBL from two patients (one positive for HPV-16 and other for HPV-18) were induced to proliferate in the presence of L1 from HPV-16 and -18 processed and presented by either a) monocytic cells or b) dendritic cells. For this purpose: a) PBL were incubated with 2 μ M of carboxyfluorescein (CFSE) (Sigma-Aldrich, USA) during 15 min at room temperature (RT). After three washes with IMDM10S, 5×10^5 cells were incubated in 200 μ L of IMDM10S during 5 days either with 1 μ L of Cervarix[®], or in absence of antigen, as a control. b) PBL were labeled with CFSE during 15 min, RT, washed three times and then either incubated with autologous monocytic-derived dendritic cells loaded during maturation with 1 μ L of Cervarix[®], or with autologous dendritic cells used as a control. After 5 days the cells were harvested and stained with 1 μ L of CD4/PE antibodies (R&D Systems, USA) and 1 μ L of CD8/APC antibodies (R&D Systems, USA) at 4 °C during 30 min. The decrease in the carboxyfluorescein label was assessed by flow cytometry, and used as an indicator of proliferation.

Determination of CD8 + IFN γ + cells induced with PHA

5×10^5 PBL were seeded in 96-microwell plates (Corning, USA) in 200 μ L of IMDM10S, in the presence of phytohemagglutinin (PHA) (Invitrogen, USA) dilute 1:100 as the final concentration, or in absence of PHA as a control, for 5 days. After this time, the cells were harvested and stained with 1 μ L of CD8/APC and 1 μ L of IFN γ /FITC (R&D Systems, USA), for 30 min at 4 °C, and finally evaluated in a FACSAria II cytometer (BD, USA). The percentage of CD8 + IFN γ + cells was determined for each sample based on the total cell number recovered in the culture.

Quantification of cytokines

5×10^5 PBL were incubated in 200 μ L of IMDM-10S with 2.5 μ L of antiCD3/CD28 beads (Dynabeads CD3/CD28 Human T-Activator, Invitrogen, USA). After 4 days, the conditioned medium was collected and stored at -70 °C. The concentration of cytokines was determined by flow cytometry according to manufacturer's instructions (Cytometric Bead Array: Human Th1/Th2 cytokine kit, BD Biosciences, USA). Plasma cytokines levels were determined with the same Th1/Th2 cytokine kit from peripheral blood samples, after separation of the cellular fraction, also according to manufacturer's instructions.

Statistical analysis

All samples were tested in triplicate and the numerical data are expressed as an average of the values obtained. The non-parametrical Man-Whitney *U* test was used to compare the mean of the pertinent groups. A *P* < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Lymphocytes from LSIL patients had a significantly lower response to vaccine antigens than normal donors

After clinical and molecular diagnosis, subjects were divided into two groups: the LSIL group (*n* = 20; mean age: 26.65 years, range: 18–35 years), and the normal donor group (*n* = 20; mean age: 37.93 years, range: 22–46 years). HPV analysis showed that five LSIL samples were positive for the presence of HPV DNA. Genotyping of these positive samples demonstrated the presence of individual infection by HPV types 6, 11, 16, 18 and 58. These samples were included in the set of 20 that formed the group named LSIL in the assays. In order to assess the presence of cells reactive to well known antigens, PBL from LSIL patients, women vaccinated with Gardasil[®], and normal controls were incubated with Infanrix Hexa[®], a vaccine that is administrated in Mexico as a part of the national vaccination campaign. As expected, cells from normal controls and women vaccinated with Gardasil[®] were able to proliferate in the presence of the antigens contained in Infanrix[®]. In contrast, PBL from LSIL patients showed a

response to the vaccine that was significantly lower than the detected in normal donors (Figure 1). To demonstrate that the response was directed against an already known antigen, PBL were also incubated with Cervarix[®], a vaccine that contains antigens from HPV16 and HPV18. In Mexico, administration of Cervarix[®] is basically restricted to private practice; therefore women included in this work have not been vaccinated with this vaccine. As shown in figure 1, cells from women vaccinated with Gardasil[®] proliferated as a response to the viral antigens contained in Cervarix[®]. Interestingly, cells from both HPV-infected and non-infected LSIL women showed a negative response, that was similar to that detected in normal controls. These results suggest the existence of a deficiency on the response of T cells from patients with LSIL.

Serum antibodies to vaccine antigens are found in LSIL patients and normal donors

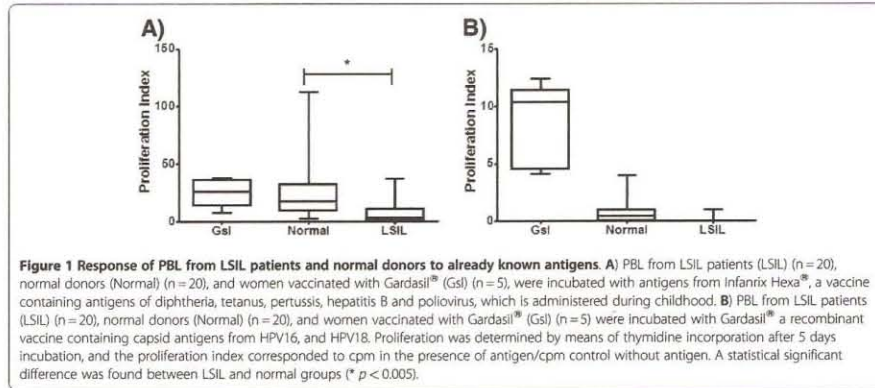
Our results showed a decreased T cell response in LSIL patients. Thus, to determine if the antibody response was also diminished, we evaluated the presence of antibodies to Infanrix[®] in sera from LSIL patients and normal controls by ELISA using Infanrix[®] as target antigens. We detected similar antibody levels in serum samples from LSIL patients and normal donors without HPV infection (2.35 ± 0.66 and 1.96 ± 0.76 , respectively) (Figure 2). These results suggest that the difference in T cell responses between LSIL patients and normal controls is not associated with a reduced function of B lymphocytes. Additionally, we tested the presence of antibodies specific to L1 from HPV-16 and -18 in the sera of LSIL patients and normal donors, and obtained a minimal response; in contrast, we found those specific antibodies in sera from young women vaccinated with Gardasil[®] (composed by L1 from HPV-6, -11, -16 and -18).

Similar levels of CD4 + CD25 + FoxP3+ lymphocytes were present in PBL from LSIL patients and normal donors

In order to evaluate if the diminished T cell response in LSIL patients is associated with the presence of Treg cells, we evaluated the levels of CD4 + CD25 + FoxP3+ cells. No significant difference was found in the proportion of CD4 + CD25 + FoxP3+ cells in PBL from LSIL patients (3.96 ± 1.00) and normal controls (3.51 ± 1.18) (Figure 3). These results suggest that Treg cells do not account for the deficient antigen recognition by PBL cells in LSIL patients.

PHA induces the production of IFN γ by CD8+ lymphocytes from LSIL patients

Our results indicate that the lack of lymphocyte response in LSIL patients is not due to negative regulation by Treg cells. Therefore, we next investigated whether CD8 + IFN γ + lymphocytes, which are known to play an active role during anti-viral responses, can be activated in these

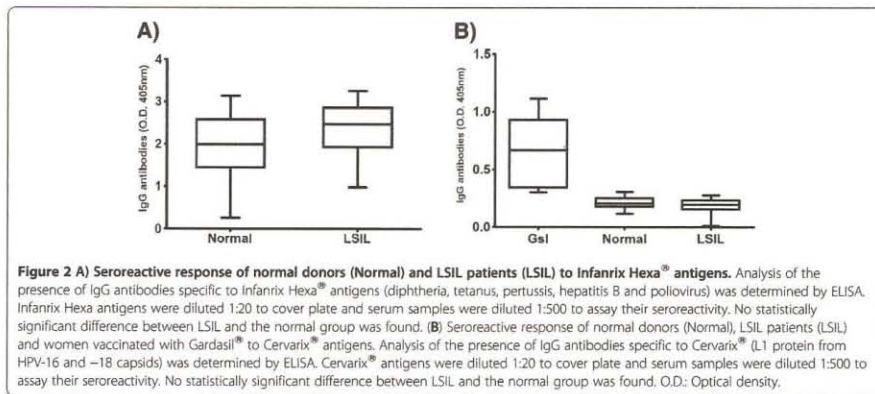


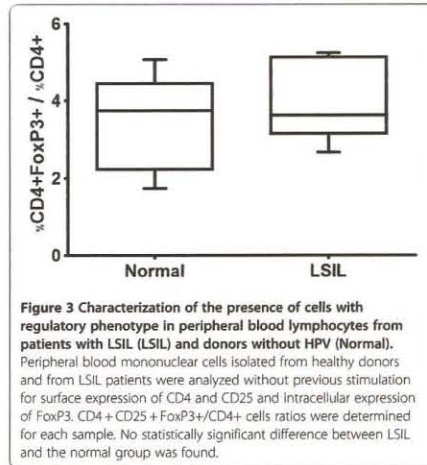
patients. PBL from LSIL patients and normal controls were stimulated with PHA. The proportion of CD8 + IFN γ + cells was determined by flow cytometry. We observed a high proportion of CD8 + IFN γ + cells in the PBL from LSIL patients, while almost no lymphocytes of this phenotype were detected in the normal donors (Figure 4). These results suggest the presence of inducible CD8 + IFN γ + cytotoxic lymphocytes in LSIL patients.

Lymphocytes from LSIL patients were strongly induced to proliferate in the presence of dendritic cells

Our results indicate that subpopulations of inducible CD8 + IFN γ + cytotoxic lymphocytes are present in LSIL patients. However, it is known that activation of CD8+ cells depends on specific antigen presentation by activated

dendritic cells. Therefore, we next evaluated whether lymphocytes from LSIL patients could be activated to proliferate as a response to already known viral antigens presented by autologous dendritic cells. PBL from two LSIL patients, were co-cultured with dendritic cells or dendritic cells previously "loaded" with Cervarix®. The first patient was infected by HPV18; the second one was infected by HPV16, as demonstrated by PCR. Proliferation of PBL was determined. As shown in Figure 5, PBL from the patients were able to proliferate in the presence of HPV antigens alone. Co-culture with dendritic cells induced a modest increment in PBL proliferation. However, activation by pre-loaded dendritic cells induced a dramatic increase in PBL proliferation in both patients. These results indicate that PBL from LSIL patients are able to recognize and proliferate





as a response to already known viral antigens, but the response completely depends on the presentation of antigens by activated dendritic cells.

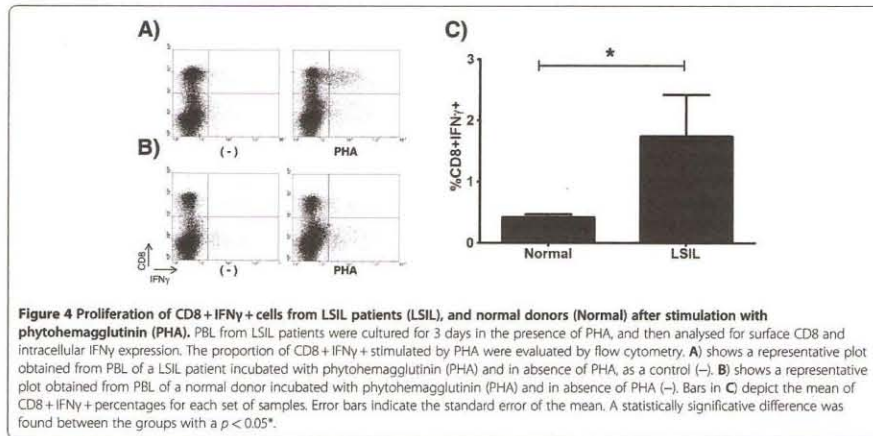
Lymphocytes from LSIL patients produce lower levels of IL-2 than those from normal donors

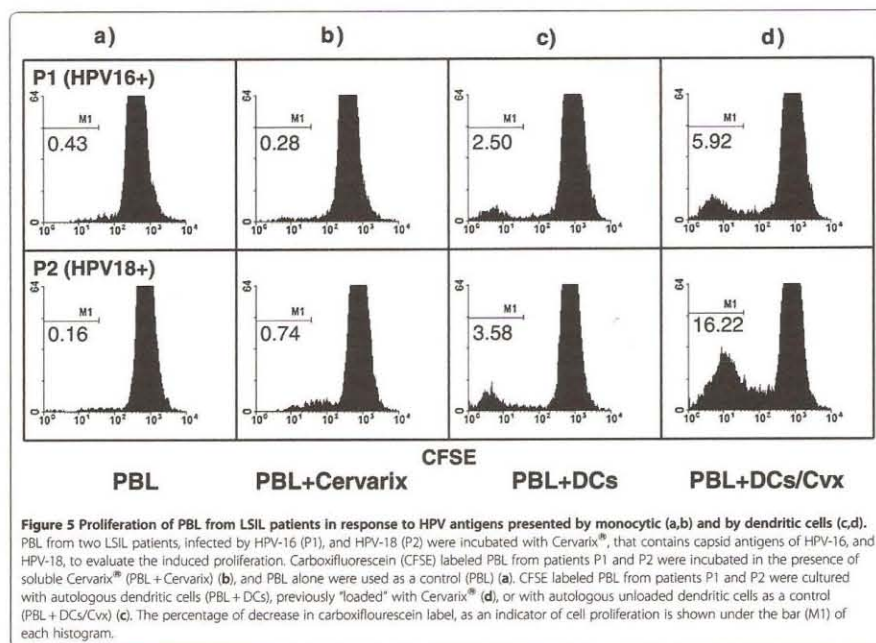
Our results have shown that PBL from LSIL patients can be specifically activated by dendritic cells presenting an already known viral antigen. Inasmuch as antigen presentation and

cellular effector activity during a viral infection are regulated by cytokines, we evaluated the levels of serum IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF α and IFN γ from LSIL patients and normal controls. No differences in concentration of any of the circulating cytokines tested were found between LSIL patients and normal controls (data not shown). Thus, we decided to explore the production of these cytokines by LSIL and normal control PBL after the induction of proliferation by an agonist of CD3/CD28. We observed that the PBL from LSIL patients and normal controls produced and secreted similar levels of IL-4, IL-5, IL-10, IFN γ , and TNF α . However, production of IL-2 was significantly reduced in LSIL patients (Figure 6). These results seem to indicate that production and secretion of the main regulator of T cell activation, IL-2, is highly compromised in LSIL patients.

Discussion

Progression of precursor lesions (LSIL and HSIL) towards cervical cancer has been associated with persistent infection by oncogenic HPV types, along with local and systemic immune abnormalities, which may lead to impaired function of the T cell response. Most LSIL are expected to undergo a spontaneous regression [13], which is normally associated with the development of an efficient cellular response to HPV antigens [14]. In the present work we have shown that LSIL patients exhibit a deficient T cell response, not only to HPV antigens, but also against various types of antigens, and that the lack of response is unrelated with a current HPV infection. Lymphocytes from LSIL patients showed significantly less proliferation as a response to already known vaccine antigens and to HPV-derived antigens, than those from





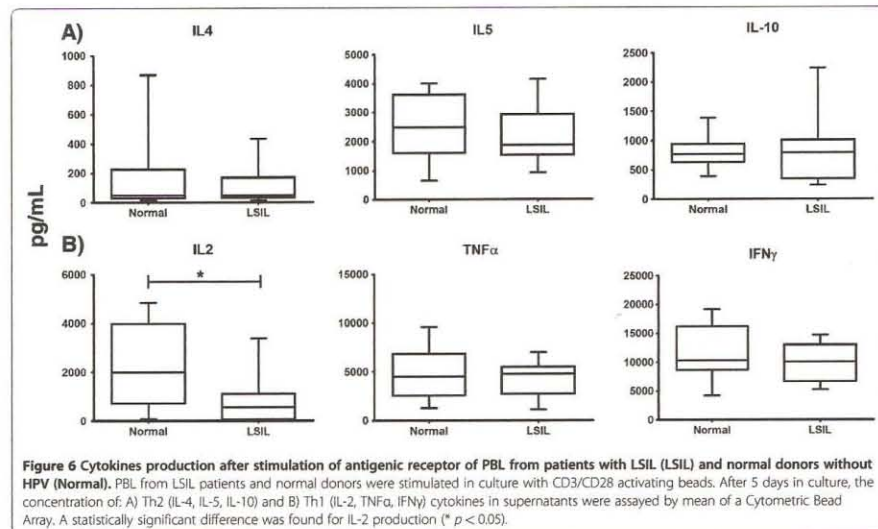
normal donors, even when the concentration of specific antibodies to these antigens were similar for both groups; nevertheless we consider worthwhile to increase the number of samples in the near future to generalize our results.

Specific T cell response to cancer cells and viruses is tightly regulated by regulatory CD4⁺ cells (Tregs) expressing fork-head box (Fox)-P3 (CD4 + CD25 + FoxP3⁺). Increased frequencies of circulating Tregs have been reported in various solid tumors [15], including cervical cancer [2,3]. Here we found that CD4 + CD25 + FoxP3⁺ regulatory cell numbers are not increased in LSIL patients. This observation is in agreement with a previous report showing a similar frequency of circulating CD4⁺ Tregs in women with CIN0 and patients with CIN1/2 [3] and with other report, where the higher levels of mucosal FoxP3 expression were shown in the CIN2/3 group [16]. Accordingly, we did not find a correlation between the lack of proliferation and IL-2 secretion with an increased presence of CD4 + CD25 + FoxP3⁺ cells in our samples.

IFN γ -producing T cells play a crucial role in the elimination of tumor cells [17]. It has been demonstrated that although HPV-specific activated CD4⁺ and CD8⁺

cells are detected in tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) and tumor-draining lymph node cells (TDLNC) of most cervical cancer patients, only a few IFN γ -producing cells are found in these patients, suggesting that the T cells are functionally inactive [18]. In our work, we found that stimulation of PBL from LSIL patients with PHA resulted in a significantly greater proportion of CD8⁺ IFN γ ⁺ cells compared with those obtained in healthy donors, which suggest the existence of subpopulations of responder cells with a limited state of activation in the earliest stages of pre-malignant cervical lesions. In order to determine whether these clones correspond to HPV-specific T cells a more thorough characterization of these populations to identify their antigenic specificity and their activation status is needed. Coincidentally, Lee and colleagues [19] found that CD8⁺ lymphocytes from LSIL or ASCUS patients stimulated with *Staphylococcus* enterotoxin B had a deficiency in the production of IL-2, but not of IFN γ , suggesting that the effector ability of CD8⁺ cell is not affected, although this population cannot be expanded.

We found that lymphocytes from HPV16- and HPV18-associated LSIL were not able to proliferate in the presence of soluble viral antigens derived from HPV-16 and



-18 L1 proteins, even when they did it against Infanrix[®] derived antigens. However, a strong T cell response was observed when the antigens were presented by dendritic cells. A similar observation was made in cervical cancer, where stimulation of TIL and TDLNC with their cognate antigen in the presence of commonly used Toll-like receptor ligands significantly enhanced the effector T-cell function. Therefore, it is possible the presence of specific T cells but with limited activation status due to lack of appropriate stimulation since the early stages of infection with HPV to malignant stages. The mechanisms leading to this state of partial activation by T lymphocytes remain to be resolved, but may be associated with the limited antigen presentation and absence of inflammation that occurs in the early stages of infection with HPV [9]. In this sense, several lines of evidence show that failure in the presentation of antigens by dendritic cells, may contribute to the development of tumors [20-22].

It has been considered that an effective immune response to HPV is based on a Th1-type reaction, which involves cytokines such as IL-2, IL-12, TNF α and IFN γ . It has been observed that the elimination of the virus is preceded by the expression of Th1 cytokines in the absence of Th2-type cytokines [23], and given the antagonistic nature of Th1 and Th2 functions, it is assumed that infected cells are protected from immune response when a Th2 pattern is present, with a significant role for IL-10

[24]. However, in more advanced stages, including cervical cancer, it is possible to detect a large production of cytokines of both profiles, questioning the role of Th2 profile in cervical cancer development [25]. We found that IL-2 secretion induced by stimulation of T cell antigen receptor was significantly lower in PBLs from LSIL patients in comparison with those of healthy donors. These results are consistent with the notion that Th1 profile is necessary for the resolution of infection, as IL-2 production shows a deficiency that is reflected beyond the local level, to the periphery. However, we did not find a difference in the production of IFN γ , IL-10, and TNF α between PBL from LSIL and normal donors. It has been previously reported a decreased production of IL-2 by PBL from HPV infected subjects, stimulated *in vitro* with both HPV specific and unrelated antigens, as well with polyclonal stimuli [19,26,27]. In addition, it has been demonstrated that CD8⁺ T cells from LSIL patients have a deficiency in the production of IL-2 when they are stimulated with *Staphylococcus enterotoxin B* [19]. In all these cases, a common feature was a direct relationship between the degree of the IL-2 deficiency and the lesion progress. One proposed explanation for this deficiency has been a depletion of the immune system as a result of inflammation due to HPV and other pathogens that associate with LSIL and HSIL [19]. Other possible causes of inhibition of proliferation and IL-2

production without impairing effector function in T lymphocytes could be associated with metabolic process, for example thiol-sensitive pathways, involving IL-2 [28]. However, the precise events that are lead to this deficiency have not been fully determined.

The above results suggest a key role for IL-2 in the resolution of the infection and elimination of tumors. IL-2 concentration decreases with advancing stages of the disease, when the production of other cytokines show a new increase in the most advanced stages, probably as a result of enhanced inflammation [29]. In this respect we have previously shown that the presence of IL-2 receptors on cancer cells could compete for the IL-2 present *in situ* depleting the concentration of this growth factor that is absolutely needed to activate cytotoxic cells [30]. It is known that an adequate memory CD8+ T cells setting is highly dependent on helper CD4+ T cell function, and IL-2 has been proposed as a signal required during priming for a secondary expansion of CD8+ T cells [31], particularly in the case of chronic infections [32]. Therefore, the restricted activation of CD8+ T cells detected in the blood of LSIL patients could be explained by the deficiency of IL-2 observed in these leukocytes. In addition, CD4+ helper activity needs dendritic cells for efficient priming of T CD8+ cells [33] which in turn are known to be producers of IL-2 [34].

In this work we present evidence that LSIL patients show a deficiency in the T cell response, which is not associated with an increase in T regulatory cells or an increase in Th2 inhibitory cytokines. We also showed that PBL from LSIL patients can be activated *in vitro* to recognize HPV, and significant amounts of CD8 + IFN γ + cells can be obtained from LSIL patients after mitogenic stimulation. However, LSIL patients are unable to mount a specific response when challenged with those antigens unless they are presented by autologous dendritic cells. The fact that PBL from those patients were poor producers of IL-2 suggests that a deficiency *in situ* of IL-2 could be a mechanism by which infected cells escape immune surveillance and thus create the conditions for the subsequent expansion of malignant clones.

Abbreviations

HPV: Human papillomavirus; PBL: Peripheral blood leukocytes; LSIL: Low-grade squamous intraepithelial lesions; HSIL: High-grade squamous intraepithelial lesions; CTL: Cytotoxic T lymphocytes; CeCa: Cervical cancer; Th: T helper lymphocyte; Tregs: T regulatory cells; DCs: Dendritic cells; CIN: Cervical intraepithelial neoplasia; TcR: T cell receptor; PHA: Phytohemagglutinin.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

The authors thank Cecilia Aguilar and Ernesto J. Rivera for expert technical support. We are indebted to CONACYT support to MLMG (82827), and FIS/IMSS/prod/G10/876, CONACYT (No. 84071) support to AMG, are gratefully acknowledged.

J. Hernández-Montes, is PhD student of the Postgraduate Program of Ciencias Biológicas, UNAM, Mexico City, Mexico. The PhD supervisor of this student was Dr. Ma. de Lourdes Mora-García.

Author details

¹Laboratorio de Inmunobiología, Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, FES-Zaragoza, UNAM, México, Laboratorio 3, PB, UIMEZ, Campus II, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, Batalla 5 de mayo s/n, Col. E. de Oriente, Esquina Fuerte de Loreto, Iztapalapa, CP 09230 México, DF, Mexico. ²Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Inst. de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Mexico. ³Clínica de Colposcopia, Fundación Cruz-Talonia, México, DF, Mexico. ⁴Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Autoinmunes, IMSS, CMN SXII, México, Mexico. ⁵Unidad de Investigación en Inmunología, Hospital de Pediatría, IMSS, CMN SXII, México, Mexico. ⁶Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, IMSS, CMN SXII, México, Mexico.

Authors' contributions

JHM conceived of the study and wrote the manuscript. LRZ performed the ELISA assays and writing of paper. AMG participated in proliferation assays and as well as in discussion of results. BWS participated in discussion of results and revision of the manuscript. FCT and OCC obtained tissue samples and participated in the determination of HPV infection. MCZO collected peripheral blood samples of the patients and normal donors. LCBA and PRA participated in dendritic cells generation and cytometry interpretation. AKCR and MVLH performed cytokines and Tregs determination. MLMG participated in the design and coordination of the study. All authors read and approved the final manuscript.

Received: 7 February 2012 Accepted: 29 May 2012

Published: 29 May 2012

References

1. Bais AG, Beckmann I, Lindemans J, Ewing PC, Meijer CJLM, Snijders PJF, Helmerhorst TJM: A shift to a peripheral Th2-type cytokine pattern during the carcinogenesis of cervical cancer becomes manifest in CIN II lesions. *J Clin Pathol* 2005, **58**:1096-1100.
2. Visser J, Nijman HW, Hoogenboom BN, Jager P, van Baarle D, Schuurung E, Abdulahad W, Miedema F, van der Zee AG, Daemen T: Frequencies and role of regulatory T cells in patients with (pre)malignant cervical neoplasia. *Clin Exp Immunol* 2007, **150**:199-209.
3. Molling JW, de Groot TD, Glim J, Moreno M, Rozendaal L, Meijer CJLM, van den Eertwegh AJM, Schep RJ, von Blomberg ME, Bontkes HJ: CD4+ CD25hi regulatory T-cell frequency correlates with persistence of human papillomavirus type 16 and T helper cell responses in patients with cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 2007, **121**:1749-1755.
4. Steenbergen RDM, de Wilde J, Witting SM, Brink AATP, Snijders PJF, Meijer CJLM: HPV-mediated transformation of the anogenital tract. *J Clin Virol* 2005, **32**:525-533.
5. van Poelgeest MI, Nijhuis ER, Kwappenberg KM, Hamming IE, Wouter DJ, Fleuren GJ, van der Zee AG, Mielief CJ, Kenter GS, Nijman HW, Offringa R, van der Burg SH: Distinct regulation and impact of type 1 T-cell immunity against HPV16 L1, E2 and E6 antigens during HPV16-induced cervical infection and neoplasia. *Int J Cancer* 2006, **118**:675-683.
6. Welters MJ, de Jong A, van den Eden SJ, van der Hulst JM, Kwappenberg KM, Hassane S, Franken KL, Drijfhout JW, Fleuren GJ, Kenter G, Mielief CJ, Offringa R, van der Burg SH: Frequent display of human papillomavirus type 16 E6-specific memory T-helper cells in the healthy population as witness of previous viral encounter. *Cancer Res* 2003, **63**:636-641.
7. Kobayashi A, Greenblatt RM, Anastos K, Minkoff H, Massad LS, Young M, Levine AM, Daragh TM, Weinberg V, Smith-McCune KK: Functional attributes of mucosal immunity in cervical intraepithelial neoplasia and effects of HIV infection. *Cancer Res* 2004, **64**:6766-6774.
8. Kallinski P, Moser M: Consensual immunity: success driven development of T-helper-1 and T-helper-2 responses. *Nature Rev Immunol* 2005, **5**:251-260.
9. Joffe O, Nolte MA, Sparri R, Reis E, Sousa C: Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunol Rev* 2009, **227**:234-247.
10. Solomon D: The 1988 Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytological diagnosis. *JAMA* 1989, **262**:931-934.

11. Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM: Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* 1989, **7**:209–214.
12. Walboomers JM, Jacobs M, Manos MM, Bosch FX, Kumer JA, Shah KV, Snijders PJF, Peto J, Meijer CJLM, Muñoz N: Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999, **189**:12–19.
13. Moscicki AB, Schiffman M, Kjaer S, Villa LL: Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine* 2006, **24**(Suppl 3):S42–S51.
14. Stanley M, Lowy DR, Frazer I: Chapter 12: Prophylactic HPV vaccines: underlying mechanisms. *Vaccine* 2006, **24**(Suppl 3):S106–S113.
15. Zou W: Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nature Rev Immunol* 2006, **6**:295–307.
16. Scott ME, Ma Y, Kuzmich L, Moscicki AB: Diminished IFN- γ and IL-10 and elevated Foxp3 mRNA expression in the cervix are associated with CIN 2 or 3. *Int J Cancer* 2009, **124**:1379–1383.
17. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD: IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 2001, **410**:1107–1111.
18. de Vos Van Steenwijk PJ, Heusinkveld M, Ramwadhoebe TH, Löwik MJ, van der Hulst JM, Goedemans R, Piersma SJ, Kenter GG, van der Burg SH: An Unexpectedly Large Polyclonal Repertoire of HPV-Specific T Cells Is Poised for Action in Patients with Cervical Cancer. *Cancer Res* 2010, **70**:2707–2717.
19. Lee B-N, Follen M, Shen D-Y, Malpica A, Adler-Storhiz K, Shearer WT, Reuben JM: Depressed type 1 cytokine synthesis by superantigen-activated CD4-T cells of women with human papillomavirus-related high-grade squamous intraepithelial lesions. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004, **11**: 239–244.
20. Maecker B, Mougiakakos D, Zimmermann M, Behrens M, Hollander S, Schrauder A, Schrappe M, Welte K, Klein C: Dendritic cell deficiencies in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients. *Leukemia* 2006, **20**: 645–649.
21. Ratta M, Fagnoni F, Curti A, Vescovinì R, Sansoni P, Oliviero B, Fogli M, Ferri E, Della Cuna GR, Tura S, Baccarani M, Lemoli RM: Dendritic cells are functionally defective in multiple myeloma: the role of interleukin-6. *Blood* 2002, **100**:230–237.
22. Beckebaum S, Zhang X, Chen X, Yu Z, Frilling A, Dworacki G, Grosse-Wilde H, Broelsch CE, Gerken G, Cicinatti VR: Increased levels of interleukin-10 in serum from patients with hepatocellular carcinoma correlate with profound numerical deficiencies and immature phenotype of circulating dendritic cell subsets. *Clin Cancer Res* 2004, **10**:7260–7269.
23. Scott M, Sittes DP, Moscicki AB: Th1 cytokine patterns in cervical Human Papillomavirus infection. *Clinical and Diagnostic Lab Immunol* 1999, **6**: 751–755.
24. Azar KK, Tani M, Yasuda H, Sakai A, Inoue M, Sasagawa T: Increased secretion patterns of Interleukin-10 and Tumor Necrosis Factor-Alpha in cervical squamous intraepithelial lesions. *Hum Pathol* 2004, **35**:1376–1384.
25. Tjong MY, van der Vange N, ter Schegget JS, Burger MP, ten Kate FW, Out TA: Cytokines in cervicovaginal washing fluid from patients with cervical neoplasia. *Cytokine* 2001, **14**:357–360.
26. Clerici M, Merola M, Ferrario E, Trabattini D, Villa ML, Stefanon B, Venzon DJ, Shearer GM, De Palo G, Clerici E: Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst* 1997, **89**:245–250.
27. Tsukui T, Hildesheim A, Schiffman MH, Lucci J III, Contois D, Lawler P, Rush BB, Lorincz AT, Corrigan A, Burk RD, Qu W, Marshall MA, Mann D, Carrington M, Clerici M, Shearer GM, Carbone DP, Scott DR, Houghton RA, Berzofsky JA: Interleukin 2 production in vitro by peripheral lymphocytes in response to human papillomavirus-derived peptides: correlation with cervical pathology. *Cancer Res* 1996, **56**:3967–3974.
28. Hadzic T, Li L, Cheng N, Walsh SA, Spitz DR, Knudson CM: The role of low molecular weight thiols in T lymphocyte proliferation and IL-2 secretion. *J Immunol* 2005, **175**:7965–7972.
29. Bals AG, Beckmann I, Ewing PC, Eijkemans MJC, Meijer CJLM, Snijders PJF, Helmerhorst TJM: Cytokine release in HR-HPV(+) women without and with cervical dysplasia (CIN II and III) or carcinoma, compared with HR-HPV(-) controls. *Mediators of Inflamm* 2007, **2007**: Article ID 24147.
30. Rangel-Corona R, Corona-Ortega T, Soto-Cruz L, López-Labrá A, Pablo-Arcos T, Torres-Guameres CF, Weiss-Steider B: Evidence that cervical cancer cells secrete IL-2, which becomes an autocrine growth factor. *Cytokine* 2010, **50**:273–277.
31. Williams MA, Tyznik AJ, Bevan MJ: Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory. *Nature* 2006, **441**:890–893.
32. Bachmann MF, Wolint P, Walton S, Schwarz K, Oxenius A: A differential role of IL-2R signaling for CD8+ T cell responses in acute and chronic viral infections. *Eur J Immunol* 2007, **37**:1502–1512.
33. Feau S, Arens R, Togher S, Schoenberger SP: Autocrine IL-2 is required for secondary population expansion of CD8+ memory T cells. *Nature Immunol* 2011, **12**:908–914.
34. Granucci FC, Vizzardelli C, Pavelka N, Feau S, Persico M, Virzi E, Rescigno M, Moro G, Ricciardi-Castagnoli P: Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nat Immunol* 2001, **2**: 882–888.

doi:10.1186/1750-9378-7-12
Cite this article as: Hernández-Montes et al.: Peripheral blood lymphocytes from low-grade squamous intraepithelial lesions patients recognize vaccine antigens in the presence of activated dendritic cells, and produced high levels of CD8+IFN γ + T cells and low levels of IL-2 when induced to proliferate. *Infectious Agents and Cancer* 2012, **7**:12.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

