



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CARRERA DE BIOLOGÍA

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
BIOMEDICINA

Estudio inmunogénico de partículas tipo virales de la proteína L1 del Virus de Papiloma Humano tipo 16 (HPV-16) y de su quimera con epítopes vacunales de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 generadas en plantas de *Nicotiana benthamiana*.

Tesis

Que para optar por el grado de:

Maestra en Ciencias Biológicas

P R E S E N T A

Biol. Christian Azucena Don López

Tutor principal de tesis: Dra. María de Lourdes Mora García,
F.E.S Zaragoza, UNAM

Comité tutor: Dra. Leticia Rocha Zavaleta,
Instituto de Investigaciones Biomédicas,
Dr. Alberto Monroy García,
CMNSXXI, IMSS

MÉXICO, D. F. Abril 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CARRERA DE BIOLOGÍA

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
BIOMEDICINA

Estudio inmunogénico de partículas tipo virales de la proteína L1 del Virus de Papiloma Humano tipo 16 (HPV-16) y de su quimera con epítopes vacunales de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 generadas en plantas de *Nicotiana benthamiana*.

Tesis

Que para optar por el grado de:

Maestra en Ciencias Biológicas

P R E S E N T A

Biol. Christian Azucena Don López

Tutor principal de tesis: Dra. María de Lourdes Mora García,
F.E.S Zaragoza, UNAM

Comité tutor: Dra. Leticia Rocha Zavaleta,
Instituto de Investigaciones Biomédicas,
Dr. Alberto Monroy García,
CMNSXXI, IMSS

MÉXICO, D. F. Mayo 2013

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 11 de marzo de 2013, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO(A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del (la) alumno (a) **DON LÓPEZ CHRISTIAN AZUCENA** con número de cuenta **405079922** con la tesis titulada "**Estudio inmunogénico de partículas tipo virales de la proteína L1 del Virus de Papiloma Humano tipo 16 (HPV-16) y de su quimera con epítopes vacunales de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 generadas en plantas de *Nicotiana benthamiana***", realizada bajo la dirección del (la) **DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA**:

Presidente: DR. VIANNEY FRANCISCO ORTIZ NAVARRETE
Vocal: DR. BENNY WEISS STEIDER
Secretario: DR. ALBERTO MONROY GARCÍA
Suplente: M EN C. ROSALVA RANGEL CORONA
Suplente: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA
Emergente: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 9 de abril de 2013.

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

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

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por enriquecer mi formación profesional

Al laboratorio de Inmunobiología de la UMIEZ, F.E.S. Zaragoza, UNAM y al laboratorio de Inmunología y Cáncer de la UIMEO, H Oncología CMN SXXI, IMSS donde fue realizado este trabajo con el apoyo financiero de los proyectos CONACYT No.82827 y FIS/IMSS/PROT/876, además de la Beca CONACYT con número CVU/Becario 385009/254402.

A los miembros del comité tutor:

- Dr. Alberto Monroy García del Laboratorio de Inmunología y Cáncer de la UIMEO, H Oncología CMN SXXI IMSS.
- Dra. Leticia Rocha Zavaleta del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Por sus valiosos comentarios y sugerencias que enriquecieron aún más este trabajo.

Agradecimientos personales

A Dios por mandarme vida, salud, felicidad y logros personales y profesionales, agradezco hoy y siempre todas tus bendiciones padre del cielo.

A la Dra. María de Lourdes Mora García por todo su apoyo, comentarios y sugerencias durante el desarrollo de la tesis.

Al Dr. Jorge Hernández Montes por su valioso apoyo, por sus comentarios, críticas y sugerencias, por ser el miembro del comité tutorial que no aparece en los papeles pero enriquece mi trabajo, conocimiento y crecimiento profesional como si estuviera en ellos.

A mis padres por su apoyo incondicional, por sus consejos, por sus palabras de aliento y su cariño que siempre me dan ánimo para continuar.

A mi hermano por esos buenos momentos de plática, de convivencia y de juego que hacen que todo se olvide aunque sea por un momento.

A mi esposo por todo tu cariño y amor, por tus consejos, por tus sugerencias, por estar a mi lado en todo momento, por ayudarme a levantar cuando he caído y porque siempre me haces ver las cosas desde otro punto de vista para seguir adelante. Además te agradezco el apoyo con el trabajo experimental y el análisis estadístico de los datos.

A mis compañeros de laboratorio Vianey, Luis, Toño, Sofia, Brenda, Carlos, Mary, Gilberto, Eva, Cesar, Fanny, Itzel y Victor por permitirme aprender con y de ustedes y hacer de la estancia en este laboratorio algo agradable y alentador para continuar en él.

... nos educan diciéndonos que es con esfuerzo que se consiguen cosas y que, junto esas cosas, llegará la felicidad. La verdad que yo creo que eso es una gran mentira. Una mentira socialmente aceptada, universalmente determinada, pero una mentira al fin. Yo no creo para nada en el esfuerzo como camino para hacer algo. Digo, no creo que haya que esforzarse, sino que hay que dedicarse, que no es lo mismo. La dedicación a algo, la apuesta de todo lo que soy al servicio de un proyecto, no es un esfuerzo. Yo no creo en el esfuerzo, en el sentido de forzarme a hacer lo que no quiero hacer. No creo en los logros que se consiguen desde el esfuerzo. Sí creo en la elección de un camino, sí creo en los rumbos que me fijo.

Jorge Bucay

Cuando una cosa está hecha, no mire hacia atrás.

Mire su próximo objetivo.

George Marshall

Índice

Resumen	10
Abstract	12
Abreviaturas de uso frecuente	14
1. Marco Teórico	
1.1. Cáncer Cérvico Uterino (CaCu).....	15
1.1.1. El CaCu y su relación con el HPV.....	16
1.2. Virus del Papiloma Humano.....	17
1.2.1. Tipos y clasificación del HPV.....	18
1.2.2. Estructura del HPV.....	19
1.2.3. Oncoproteínas E6 Y E7.....	21
1.3. Incidencia de la infección por HPV.....	22
1.4. Establecimiento de la infección por HPV.....	23
1.5. Mecanismos de evasión de la respuesta inmune innata y adquirida hacia HPV.....	26
1.6. Vacunas para HPV.....	28
1.6.1. Vacunas profilácticas para HPV.....	29
1.6.2. Vacunas terapéuticas para HPV.....	29
1.6.2.1. Vacunas peptídicas.....	29
1.6.2.2. Vacunas proteicas.....	31
1.6.3. Partículas Tipo Virales Quiméricas (cVLP).....	33
2. Justificación y Planteamiento del problema	37
3. Hipótesis	38
4. Objetivo general	38
4.1. Objetivos particulares	38
5. Material y Método	39
6. Resultados	45
7. Discusión y Análisis de Resultados	55
8. Conclusiones	60
9. Perspectivas	61
10. Bibliografía	62

Lista de Figuras y Cuadros

Tabla 1.1. Tipos de papiloma humano más estudiados según familia.....	18
Tabla 1.2. Clasificación de tipos de HPV según oncogenicidad cervical.....	19
Tabla 1.3. Genes de HPV y sus funciones.....	20
Figura. 1.1. Organización del DNA de HPV episomal e integrado.....	25
Figura. 5.1. Secuencia de la cVLP.....	39
Tabla 5.1. Secuencias de epítopes de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 contenidas en la cVLP.....	40
Tabla 5.2. Diseño del esquema de inmunizaciones e inoculación de células tumorales.....	41
Tabla 6.1. Número de ratones con crecimiento tumoral.....	45
Figura. 6.1. Efecto de la inmunización con cVLP y VLP-L1 antes del reto tumoral.....	46
Figura. 6.2. Ratones C57BL/6 inmunizados con cVLP y VLP-L1 antes del reto tumoral muestran mayor supervivencia.....	46
Figura. 6.3. Efecto terapéutico de la inmunización con cVLP en etapas tempranas del desarrollo tumoral (grupo durante).....	47
Figura. 6.4. La inmunización con cVLP incrementa la supervivencia al inmunizar durante el reto tumoral.....	48
Figura. 6.5. La inmunización con cVLP muestra un efecto terapéutico en tumores ya establecidos (grupo después).....	49
Figura. 6.6. Ratones inmunizados con cVLP sin adyuvante de Freund muestran mayor supervivencia.....	49
Figura. 6.7. El efecto profiláctico (grupo antes) y terapéutico (Durante y Después) de la cVLP permite un menor peso tumoral en los ratones tratados.....	50
Figura. 6.8. Detección de anticuerpos en sueros de ratones inmunizados con cVLP correlaciona con un mejor efecto profiláctico y terapéutico.....	51
Figura. 6.9. Mayor detección de Interleucina 10 en sueros de ratones inmunizados con cVLP que mostraron mayor crecimiento tumoral.....	52
Figura. 6.10. Estabilización de moléculas H-2D ^b con epítopes de E6 y E7 contenidos en la cVLP.....	53
Figura. 6.11. Estabilización de moléculas H-2K ^b con epítopes de E6 y E7 contenidos en la cVLP.....	54

Resumen

Actualmente se cuenta con dos vacunas a base de partículas tipo virales constituidas por la proteína L1 y aprobadas para prevenir la infección por los principales tipos de HPV (-16 y -18) asociados con Cáncer Cérvico uterino (CaCu) y lesiones neoplásicas de alto grado en cuello uterino, vagina y vulva. Sin embargo, éstas no ofrecen un efecto terapéutico para eliminar células tumorales o células con infección persistente, debido a que las proteínas oncogénicas E6 y E7 expresadas en estas células son necesarias para mantener su estado proliferativo. Por esta razón, una vacuna a base de VLP constituidas por la proteína L1 y epítopes antigénicos de las proteínas E6 y E7, designada para proveer efecto profiláctico y terapéutico resulta ideal. Nuestro grupo de trabajo generó una novedosa partícula quimérica tipo viral (cVLP) constituida por la proteína L1 de HPV-16 unida en su extremo carboxilo terminal a 8 epítopes de las proteínas E6 y E7 de HPV-16, la cual fue producida en plantas de *Nicotiana benthamiana*. Asimismo, en un modelo de ratón de la cepa C57BL/6 (H-2Db) demostramos que estas cVLPs inducen anticuerpos con actividad neutralizante además de linfocitos T citotóxicos que reconocen a células tumorales que expresan a las oncoproteínas E6/E7 de HPV-16. Por lo antes mencionado, en el presente estudio analizamos la actividad protectora y terapéutica de estas cVLPs contra el crecimiento tumoral. Con este fin, grupos de 5 ratones hembra de la cepa C57BL/6 de 6-8 semanas de edad fueron tratados de la siguiente manera: para analizar la protección antitumoral, los ratones fueron inmunizados con tres dosis de 10 µg de VLPs constituidas por la proteína L1 de HPV-16 (VLP-L1), cVLPs ó cVLPs más adyuvante de Freund. La primera dosis se aplicó al inicio del experimento y los refuerzos al día 12 y 24. Al día 36 y 46, 1×10^5 células tumorales TC-1 (transformadas con las proteínas E6 y E7 de HPV-16) fueron inyectadas vía s.c. en el lomo de los animales pre-inmunizados. Para el análisis terapéutico, realizamos dos procedimientos: en el primero, las células tumorales TC-1 fueron inyectadas al día 0 y 5 días después se dio la primera dosis de VLPs, seguida de una segunda dosis de células TC-1 al día 10 y finalmente dos inmunizaciones con VLPs en los días 12 y 24; en el segundo, las células tumorales TC-1 fueron inyectadas a los ratones en los días 0 y 10, y una vez que los tumores fueron palpables, 3 dosis de las VLPs fueron dadas bajo el mismo esquema. Los grupos control consistieron de ratones tratados con células TC-1+PBS y PBS. Se encontró que la inmunización con cVLPs en ausencia o presencia de adyuvante protegió a los ratones contra el crecimiento tumoral, mientras que la inmunización con VLP-L1 no fue protectora. Una importante actividad terapéutica fue observada cuando los ratones fueron inmunizados con cVLPs al mismo tiempo que se indujo el tumor, la inmunización con cVLPs y cVLP más adyuvante produce una reducción del tumor de 30% y 50% respectivamente. De manera interesante, cuando las cVLPs fueron aplicadas sin adyuvante después del reto tumoral, los ratones mostraron una regresión tumoral del 50%, mientras que la inmunización con cVLPs en presencia de adyuvante favoreció el crecimiento tumoral. El efecto protector y terapéutico de las cVLPs se asoció con una menor carga tumoral, producción de anticuerpos específicos a cVLPs y mayor supervivencia en los ratones. En contraste, altos niveles de IL-10 fueron encontrados en ratones con mayor crecimiento tumoral y peor supervivencia. En cuanto a la producción de anticuerpos se encontraron los valores más altos en los grupos

inmunizados antes del reto tumoral en comparación con los inmunizados durante, y para el caso de los ratones inmunizados después del reto tumoral sólo se evaluó la producción de anticuerpos al inmunizar con cVLPs solas para lo cual se obtuvo el valor más alto de absorbancia comparado con el de grupos inmunizados antes y durante el reto tumoral. Por otra parte, el péptido KLPHLCTEL derivado de la proteína E6 de HPV-16 contenido en la cVLP, mostró la mayor afinidad a las moléculas H-2Db y H-2Kb del MHC clase I, sugiriendo que este epítipo pueda proveer protección antitumoral en este modelo animal. Finalmente, nosotros consideramos que las cVLPs utilizadas en este modelo animal, pueden ser potencialmente la base para el desarrollo de vacunas terapéuticas de alta eficacia contra la infección por HPV.

Abstract

There are two HPV L1-based virus-like particle vaccines currently licensed to prevent the infection of the main types of HPV(-16 and -18) associated with cervical cancer (CeCa) and high-grade cervical, vulval and vaginal neoplastic injuries. However, these vaccines have not demonstrated relevant therapeutic properties to eliminate cells with persistent infection or transformed cells, due to the fact that the oncogenic E6 and E7 proteins are expressed in these cells and are necessary to maintain the proliferative status of HPV-infected tumor cells. For this reason an HPV L1-based VLP vaccine that includes E6 and E7 antigenic epitopes designed to provide prophylactic and therapeutic activity against those antigens could prove to be ideal. We have previously generated a novel HPV 16 L1-based chimeric virus like particle (cVLP) that was produced in plants of *Nicotiana benthamiana* and that contains a string of T-cell epitopes from HPV 16 E6 and E7 fused to its C-terminus. In a previous study we demonstrated in a C57BL/6 (H-2Db) mice model that these cVLPs were able to induce antibodies with neutralizing ability and cytotoxic T-lymphocytes that recognize tumor cells expressing HPV-16 E6/E7 oncoproteins. In the present study we analyzed the protective and therapeutic activity of these cVLPs against tumor growth. For this purpose, groups of 5 (six-eight week-old) female mice were immunized intraperitoneally as follows: for tumor prevention, mice were immunized with three doses of 10 µg of HPV-16 L1 VLPs (VLP-L1), cVLPs or cVLPs plus Freund's adjuvant, the first one was applied at day 0 and the another two booster immunizations at 12 and 24 days. On day 36 and 46; 1×10^5 viable TC-1 tumor cells (E6/E7-transformed) in PBS were injected s.c. into these pre-immunized mice. For therapeutic analysis we performed two procedures: in the first one, TC-1 cells were inoculated and 5 days after with a dose of VLPs, 5 days after another inoculation of TC-1 cells was applied, in addition two booster immunizations were applied on days 12 and 24; in the second one, TC-1 cells were injected at days 0 and 10 and once palpable tumors appeared, three doses of VLPs were applied under the same schedule. Mice inoculated with TC-1 plus PBS and with only PBS were used as control groups. It was found that before tumor challenge, immunization with cVLPs in the absent or presence of adjuvant were able to provide protection against tumor growth, while immunization with VLP-L1 was not protective. An important therapeutic activity was obtained when mice were immunized with cVLPs simultaneously to the tumor challenge, immunization with cVLPs and cVLP plus adjuvant produced a tumor reduction of 30% and 50% respectively. Interestingly, when cVLPs without adjuvant were inoculated in mice after tumor challenge, an important tumor regression of 50% was observed, however the immunization of cVLP in the presence of the adjuvant favored tumor growth. The protective and therapeutic activity of cVLPs was associated with a less tumor burden, higher VLP specific antibody production and a better survival in mice. In contrast, higher levels of IL-10 were found in mice bearing the major tumor burden and worst survival. In the antibodies production the higher values were obtained in groups immunized before tumor challenge in comparison with groups immunized during, for groups immunized after tumor challenge was evaluate the production of antibodies in groups immunized with cVLPs only, in this we find the higher value of absorbance compared with groups immunized before and during tumor challenge. On the other hand, the KLPHLCTEL peptide derived

from HPV-16 E6 protein, contained in these cVLPs, showed the highest affinity to H-2Db and H-2Kb MHC class I molecules, suggesting that this epitope could provide tumor protection in this animal model. Finally, we consider that cVLPs used in this animal model, may potentially be the basis for developing HPV therapeutic vaccines with high efficacy.

Abreviaturas de uso frecuente

CaCu	Cáncer Cérvico uterino	Cervical Cáncer
HPV	Virus de Papiloma Humano	Human Papillomavirus
CIN	Neoplasia Intraepitelial Cervical	Cervical Intraepithelial Neoplasia
AIN	Neoplasia Intraepitelial Anal	Anal Intraepithelial Neoplasia
VIN	Neoplasia Intraepitelial Vulvar	Vulvar Intraepithelial Neoplasia
VIN	Neoplasia Intraepitelial Vaginal	Vaginal Intraepithelial Neoplasia
DNA	Acido Desoxirribonucleico	Deoxyribonucleic acid
mRNA	Acido Ribonucleico Mensajero	Messenger Ribonucleic acid
URR	Región Reguladora Corriente Arriba	Upstream Regulatory Region
ORFs	Marcos de Lectura Abiertos	Open Reading Frames
HLA	Antígeno Leucocitario Humano	Human Leukocyte Antigen
VLP	Partículas Semejantes a Virus	Virus Like Particles
cVLP	Partículas Quiméricas Semejantes a Virus	Chimeric Virus Like Particles
TLR	Receptor Tipo Toll	Toll Like Receptor
TCR	Receptor de Células T	T Cell Receptor
APC	Células Presentadoras de Antígeno	Antigen Presenting Cells
CTL	Linfocito T Citotóxico	Cytotoxic T Lymphocyte
PMBC	Células Mononucleares de Sangre Periférica	Peripheral Mononuclear Blood Cell

1. Marco Teórico

1.1 Cáncer Cérvico uterino (CaCu)

El Cáncer Cérvico uterino (CaCu) es un problema de salud pública; es la segunda causa de muerte alrededor del mundo en la población femenina (Dona *et al.*, 2007). La incidencia mundial de CaCu es enorme, con más de 500 000 nuevos casos diagnosticados cada año, resultando en 250 000 muertes. La frecuencia de infección por virus de papiloma humano HPV (por sus siglas en inglés Human Papillomavirus) es significativa con más de 300 millones de nuevos casos, incluyendo 30 millones de nuevos casos de lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (por sus siglas en inglés LSIL) y 10 millones de nuevos casos de lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (por sus siglas en inglés HSIL) diagnosticados anualmente (Parkin *et al.*, 1993; Yugawa *et al.*, 2009).

La tasa de ocurrencia en países desarrollados ha mostrado una tendencia a disminuir año con año, por los efectos del diagnóstico temprano usando el Papanicolaou. Sin embargo, este tipo de cáncer continua siendo de las primeras causas de muerte en países subdesarrollados donde los programas de raspado cervical no están bien establecidos. (Greenstone *et al.*, 1998; Yugawa *et al.*, 2009).

En el año 2001, el 11.7% de todas las neoplasias en las mujeres correspondieron a CaCu, y se reportaron 369,500 casos nuevos en países en vías de desarrollo, a diferencia de los países desarrollados en los cuales 96,100 casos fueron diagnosticados en el mismo año. Estudios realizados en Estados Unidos han informado que 75% de la población que presenta esta patología, comprendida entre las edades de 15 y 50 años, está infectada con el HPV genital, cifra de la cual 60% corresponde a infección transitoria, 10% a infección persistente, 4% a leves signos citológicos y 1% a lesiones clínicas. (Hidalgo 2006; Ferlay *et al.*, 2008).

Las tasas más altas de incidencia de cáncer cervical se originan en África, Centro y Sur América y Asia. La población femenina originaria de Latinoamérica es considerada como de alto riesgo debido a que cada año se reportan 68,000 casos nuevos. Estudios comparativos de las tasas de mortalidad por esta patología, señalan que las más altas corresponden a Chile y México y las más bajas a Cuba, Puerto Rico y Argentina (Ferlay *et al.*, 2008).

En México y a nivel mundial el CaCu es ahora la segunda causa de muerte por neoplasias en mujeres mayores de 25 años, pero en 2001, el CaCu ocupó en México el primer lugar entre los tumores malignos en la población femenina, con un total de 4 512 defunciones y una tasa de mortalidad de 18.3 por cada 100 000 mujeres. Por otra parte, 24.4% del total de casos nuevos de neoplasias malignas registradas durante ese año, correspondieron a CaCu. De esa cifra, 47% de los casos se presentaron en mujeres de 35 a 54 años de edad. En el año 2008 se registraron 10186 casos con una tasa de 15.5 por 100 000 mujeres y una mortalidad de 5061 casos con una tasa de 12.8 por 100 000 (Greenstone *et al.*, 1998; Tirado *et al.*, 2005; Ferlay *et al.*, 2008).

La experiencia de países desarrollados ha permitido demostrar que la mejor opción para disminuir la mortalidad por CaCu es la detección y el tratamiento oportuno de lesiones precursoras y lesiones malignas por medio de programas de detección oportuna. A pesar de que en México desde 1974 existe un programa Nacional de Detección Oportuna del Cáncer, mediante la prueba de Papanicolaou, el CaCu sigue teniendo una alta incidencia para las mujeres mexicanas, ya que en nuestro país ha sido difícil establecer y mantener un programa de tamizaje efectivo, como los programas de los países desarrollados, que sí han logrado disminuir sus tasas de mortalidad (Hidalgo 2006; López *et al.*, 2006; Llanes *et al.*, 2011).

1.1.1 El CaCu y su relación con el HPV

La primera evidencia de la relación del HPV con el cáncer humano se obtuvo en los años 70's por estudios sobre cáncer de piel en pacientes con epidermodisplasia verruciformis, lesiones causadas por tipos inusuales de HPV. En 20% de las pacientes con estas lesiones progresan a cáncer de piel, usualmente en áreas expuestas al sol. Estos mismos virus han sido encontrados asociados a cánceres de piel en individuos inmunosuprimidos y pacientes con trasplante renal (Walboomers *et al.*, 1999; Bosch and Muñoz 2002; Longwort and Laimins 2004; Howley 2006).

A mediados de los 70's la infección por HPV se consideraba algo trivial, hasta que se descubrió que el HPV causaba verrugas genitales, proliferaciones epiteliales benignas en superficies de mucosa interna y superficies cutáneas. Tiempo después, en 1976 Meisels and Fortin publicaron un reporte en el cual mostraban la célula "halo" en citologías vaginales, esta célula era un coilocito, (la célula patognomónica de la infección por HPV). Por otra parte también observaron que las displasias de cérvix de grado bajo y medio tenían características histológicas de una infección por HPV (Meisels *et al.*, 1976; Meisels *et al.*, 1977).

Desde entonces Lutz Gissmann en el laboratorio de Zur Hausen en Erlangen, clonó a partir de verrugas genitales, "condiloma acuminado", un nuevo DNA de HPV clasificado como HPV-6. Usando la secuencia de DNA de éste, Lutz Gissmann clona parcialmente usando verrugas genitales otro nuevo HPV, el HPV-11. El DNA de HPV-11 fue usado por miembros del laboratorio de Zur Hausen y en 1983 reportaron la clonación de un nuevo HPV de biopsias de carcinoma cervical, el HPV-16. Este descubrimiento fue seguido un año más tarde por otro nuevo HPV en CaCu; el HPV-18 (Gissmann *et al.*, 1980; Gissmann *et al.*, 1982; Durst *et al.*, 1983; Boshart *et al.*, 1984).

Con estos experimentos y los subsecuentes se logró descubrir que el HPV puede originar alteraciones epiteliales del cuello uterino, mismas que ahora se conocen como neoplasias epiteliales cervicales de las cuales existen 3 grados, siendo la neoplasia de tercer grado la antecesora del CaCu. Los HPV se clasifican como de alto y bajo riesgo dependiendo de la probabilidad de provocar lesiones cancerígenas (Llanes *et al.*, 2011).

El HPV causa un amplio rango de lesiones epiteliales, infecta el tejido epitelial cutáneo y mucoso del tracto anogenital, las manos, o los pies, ocasiona verrugas genitales y actualmente

está bien demostrado que es el agente sexualmente transmitido que se asocia a lesiones precancerosas. Etiológicamente el HPV es el principal factor asociado a CaCu, siendo el HPV tipo 16 el más frecuente encontrado en estos tumores seguido por el HPV-18 los cuales causan 50% y 20% de los casos respectivamente. Se estima que al menos la mitad de las mujeres en el mundo se ha infectado por HPV en algún momento en su vida. Por otra parte la infección por el HPV no sólo se asocia con el CaCu, sino que también causa otros carcinomas anogenitales, incluyendo el cáncer de pene, vagina, vulva y ano. Recientemente se le ha implicado como posible agente causal de cánceres no anogenitales, como algunos carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (Greenstone *et al.*, 1998, Longworth *et al.*, 2004, García 2007; Jagu *et al.*, 2010).

Los tipos de HPV -16, -18, -31, -33, -35 y -39 han sido los principales tipos virales encontrados en carcinomas invasivos, o bien en displasias y carcinomas *in situ*, las cuales pueden progresar a lesiones malignas. Actualmente se ha visto que más del 95% de los CaCu humanos albergan por lo menos a un HPV de alto riesgo, usualmente integrado dentro del cromosoma del hospedero (Walboomers *et al.*, 1999; Bosch and Muñoz 2002; Longworth and Laimins 2004; Howley 2006)

1.2 Virus del Papiloma Humano (HPV)

Existen cinco géneros de HPV que infectan al humano: gamma, mu, nu, alfa y beta (Tabla 1.1). Los HPV gamma, mu y nu generalmente causan papilomas cutáneos y verrugas que no progresan a cáncer; mientras que alfa y beta son los dos géneros de HPV de más importancia por ser los más frecuentemente detectados. Los HPV del genero beta están típicamente relacionados con infecciones cutáneas no aparentes en humanos, mientras que los HPV del genero alfa infectan las mucosas genitales y son los que se encuentran relacionados con el desarrollo de cáncer, aunque también incluyen a los virus cutáneos que sólo en raras ocasiones se asocian con desarrollo de cáncer. Hasta ahora más de 100 tipos diferentes de HPV que infectan el epitelio cervical han sido identificados, cada uno de estos tipos está relacionado con infección en sitios específicos del epitelio y cerca de una tercera parte de éstos infectan las células epiteliales en el tracto genital y están asociados con lesiones que pueden progresar a cáncer (Singer *et al.*, 1995; Harwood and Proby 2002; Pfister 2003; De Villiers *et al.*, 2004; Longworth *et al.*, 2004; Muñoz *et al.*, 2006).

LOS TIPOS VIRALES DE PAPILOMA MÁS ESTUDIADOS Y SUS PROPIEDADES CLÍNICAS				
FAMILIA: PAPILOMAVIRIDAE				
GÉNERO	ESPECIE	TIPO (S)	PROPIEDADES	
Virus del papiloma-Alfa	4	VPH -2, -27, -57	Verrugas comunes de la piel, frecuentemente en verrugas genitales en niños.	
	5	VPH -26, -51, -69, -82	Lesiones benignas en mucosas, así como malignas de alto riesgo.	
	6	VPH -53, -30, -56, -66	Lesiones benignas en mucosas, así como malignas de alto riesgo.	
	7	VPH -18, -39, -45, -59, -68, -70	Lesiones malignas de alto riesgo en mucosas. VPH -18 más frecuente en adenocarcinomas que en carcinomas escamosos del cervix.	
	8	VPH -7, -40, 43	Lesiones cutáneas y mucosas de bajo riesgo.	
	9	VPH -16, -31, -33, -35, -52, -58, -67	Lesiones malignas de alto riesgo en mucosas. VPH -16 mas frecuente en carcinoma de cervix que en adenocarcinoma, y es el tipo viral más frecuente en las lesiones del cervix	
	10	VPH -6, -11, -13, -44, -74	Lesiones benignas en mucosa. VPH -6 y -11 en verrugas genitales de hombres y mujeres, condyloma acuminata del cervix, papilomas laríngeos. Algunas de estas lesiones pueden progresar a la malignidad.	
	Virus del papiloma-Beta	1	VPH -5, -8 (por citar solo dos tipos de un género más amplio)	Lesiones cutáneas benignas y malignas en pacientes EV e inmunosuprimidos.
	Virus del papiloma-Gama	1	VPH -4, -65 (por citar solo dos)	Lesiones cutáneas benignas
	Virus del papiloma-Mu	1, 2	VPH -1, -63	Lesiones cutáneas como verrugas de los pies.
Virus del papiloma-Un	1	VPH -41 (no relacionado con ningún otro tipo de VPH)	Lesiones cutáneas.	

Tabla 1. 1 Tomada y modificada de López *et al.*, 2006.

1.2.1 Tipos y clasificación del HPV

Los HPV que infectan epitelio escamoso cutáneo y de mucosas son divididos en virus de alto y bajo riesgo según su patogenicidad. Los virus de alto riesgo como HPV -16, -18, -31, -33, y -45, están asociados con el desarrollo de cánceres anogenitales, incluyendo aquellos que afectan el área del cervix, mientras que las infecciones por HPV de bajo riesgo como HPV -6 y -11 inducen enfermedad hiperproliferativa benigna, y la enfermedad viral sexualmente transmitida más frecuente, condiloma acuminado o verrugas genitales. Entre los HPV de alto riesgo, el HPV-16 es el que prevalece entre la población y es responsable de aproximadamente el 50% de los CaCu, aunque existen muchos otros, como lo muestra la Tabla 1.2 (Singer *et al.*, 1995; Zur Hausen *et al.*, 2002; Longworth *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 2008).

Clasificación de riesgo	Tipo de HPV
Alto riesgo	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82
Probable alto riesgo	26, 53, 66
Bajo riesgo	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, CP6108
Riesgo no determinado	34, 57, 83

Tabla 1.2 Clasificación de tipos de HPV según oncogenicidad cervical (García 2007).

Los restantes HPV que infectan mucosas genitales son clasificados como intermedio o bajo riesgo dependiendo de la frecuencia con la cual son encontrados en lesiones malignas. Los HPV de bajo riesgo como HPV -6 y-11, están asociados con CaCu sólo en raras ocasiones, pero aún así son medicamente importantes por que causan verrugas genitales, las cuales son la mayor enfermedad de transmisión sexual en muchos países y pueden afectar entre 1-2% de los adultos jóvenes (Persson *et al.*, 1996; Doorbar 2006).

1.2.2 Estructura del HPV

El HPV pertenece al género *papillomavirus* de la familia *papilomaoviridae*, tiene un diámetro de 55 nm, una estructura icosaédrica no envuelta y ADN circular de doble cadena. Aunque el genoma viral puede variar ligeramente en tamaño entre los diferentes tipos de HPV, típicamente contiene alrededor de 8000 pares de bases, y codifica ocho o nueve marcos de lectura abierta u ORFs (Open Reading Frames), los cuales son una serie de bases nitrogenadas que se pueden leer en diferente secuencia, lo que conduce a la traducción de diferentes proteínas, según el marco de lectura en función (Modis *et al.*, 2002; Dias *et al.*, 2005; Brown *et al.*, 2008).

La cápside del virus está conformada por dos proteínas, la proteína L1 es el elemento estructural mayor de la cual los viriones infecciosos contienen 360 copias que están organizadas dentro de 72 capsómeros. L2 es el componente menor de los viriones y se piensa que una sola molécula de L2 puede estar presente en el centro de los capsómeros pentavalentes como vértice del virión. La proteína mayor de la cápside es expresada después de L2 para completar el ensamble de partículas infecciosas en la capa superior del epitelio (Trus *et al.*, 1997; Modis *et al.*, 2002; Doorbar 2005).

El genoma viral tiene la capacidad de codificar para estas dos proteínas llamadas proteínas tardías, y además codifica para otras seis proteínas denominadas proteínas tempranas (Tabla 1.3), las cuales son necesarias para la replicación del ADN viral (E1), la transcripción (E2), desestabilización de citoqueratina para liberar las partículas virales (E4) y la transformación (E5, E6 y E7) (Serra 1993; Muñoz *et al.*, 2006).

Tabla 1.3 Genes de HPV y sus funciones

Genes	Funciones
E1	Replicación de ADN, actividad de helicasa, enlace de ATP, ATPasa.
E2	Regulación de la transcripción y papel auxiliar en la replicación de ADN. Es requerido para mantener el genoma en infecciones persistentes.
E3	Ninguna todavía asignada.
E4	Proteína citoplasmática abundante en verrugas genitales. Rompe filamentos de queratina.
E5	Transformación. Previene disminución de receptores activados.
E6*	Transformación. Se enlaza a E6AP y promueve la ubiquitinación y degradación de p53. También se enlaza a otras proteínas celulares incluyendo paxilina e IRF3. Activa la transcripción de telomerasa celular.
E7*	Transformación. Se enlaza e inactiva a pRB. Interfiere con la duplicación del centrosoma llevando a aneuploidia.
E8	Ninguna todavía asignada.
L1	Proteína mayor de la cápside.
L2	Proteína menor de la cápside.

*E6 y E7 son los genes virales expresados en tumores positivos a HPV (Howley 2006).

Las primeras proteínas virales expresadas son los factores de replicación E1 y E2. Estas proteínas forman un complejo que se enlaza a secuencias en el origen viral de replicación y actúa reclutando polimerasas celulares y proteínas accesorias para mediar la replicación. Las funciones de E4 y E5 aún no son completamente entendidas; sin embargo, se ha propuesto que ambas pueden estar involucradas en la regulación de las funciones virales tardías. Las proteínas E6 y E7 de HPV de alto riesgo actúan como oncoproteínas. La proteína E6 se enlaza a la proteína supresora de tumor p53 como parte de un complejo trimérico con la ubiquitina ligasa celular. E7 se une al retinoblastoma que forma parte de una familia de supresores de tumor, o bien con otras proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular (Longwort and Laimins 2004).

1.2.3 Oncoproteínas E6 Y E7

Estas dos proteínas son importantes para inducir y mantener el estado de transformación celular y son co-expresadas en la mayoría de los tumores cervicales provocados por HPV. E6 y E7 de forma independiente son capaces de inmortalizar diferentes tipos de células humanas en cultivo, pero la transformación eficiente de las células se logra cuando son co-expresadas (Hawley *et al.*, 1989; Zur Hausen 2002). Por otra parte, son reconocidas como “antígenos específicos de tumor” y son considerados principales blancos para la inmunoterapia o vacunación terapéutica contra los tumores asociados a HPV (Franconi *et al.*, 2002; Dona *et al.*, 2007;).

En el CaCu y en líneas celulares derivadas de tumores cervicales, el DNA de HPV esta usualmente integrado en el genoma del hospedero, y solo una porción de los genes virales (E6 y E7), son consistentemente expresados, éstos codifican oncoproteínas que juntas son suficientes para la inmortalización de células epiteliales escamosas humanas y queratinocitos; debido a que son capaces de impactar múltiples vías reguladoras en la célula huésped con el fin de facilitar que se lleve a cabo el ciclo de vida del virus completo. (Heck *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 2008).

Las propiedades transformantes del HPV son debidas a los complejos formados por las proteínas E6 y E7 con proteínas del hospedero. La proteína E6 de HPV de alto riesgo forma complejos específicos con p53, y dirige a dicha proteína a su degradación por proteosoma. Esto reduce significativamente el nivel de estado de reposo de p53 dentro de la célula infectada permitiendo la abrogación de la apoptosis mediada por p53, la cual es una proteína celular con actividad supresora de tumor. Mientras que la proteína E7 puede formar complejos con la proteína del retinoblastoma (pRB) supresora de tumor, incrementando de esta manera la proliferación celular por rompimiento del complejo pRB-E2F para conducir a la degradación de pRB por el proteosoma. La inactivación funcional de p53 y pRB a través de sus interacciones con E6 y E7, respectivamente, se cree son pasos importantes en la carcinogénesis cervical. Estas proteínas tienen la capacidad de enlazarse a otros blancos celulares con una reducida afinidad o al menos con una consecuencia diferente en términos de oncogénesis. Estudios demuestran que pRB y p53 se encuentran mutadas en líneas celulares de CaCu negativas para HPV, pero están intactos en líneas celulares positivas a HPV (Heck *et al.*, 1992; Watson *et al.*, 2003; Black and Ogg 2003; López *et al.*, 2006; Brown *et al.*, 2008).

Con lo anterior podemos ver que estas proteínas actúan conjuntamente para lograr el potencial transformante característico, ya que se ha reportado que su acción por separado no resulta ser la misma que en conjunto. Al utilizar ratones transgénicos para E6 y E7 se observó que los que solo expresaban E7 desarrollaban múltiples tumores malignos mientras que los que expresaban E6 mostraban tumores de piel altamente agresivos y metastásicos. Esto ha sugerido que en el desarrollo del cáncer inducido por HPV, las funciones de la proteína E6 pueden contribuir en

etapas tardías de la oncogénesis mientras que las de E7 son relevantes en las etapas tempranas (Watson *et al.*, 2003).

1.3 Incidencia de la infección por HPV

La infección genital por HPV es predominante pero no exclusivamente, una infección sexualmente transmitida, ya que la penetración anal o vaginal no es un prerrequisito para la infección. El virus puede también ser transmitido por el contacto piel con piel vía contacto íntimo de genitales o de otras superficies mucosas. Estas infecciones son muy comunes y se estima que más del 50% de hombres y mujeres sexualmente activos pueden adquirir uno o más tipos de HPV genital (de alto o bajo riesgo) durante el curso de sus vidas. Frecuentemente el periodo de adquisición es al inicio de la actividad sexual y el riesgo incrementa con el número de parejas sexuales (Baseman and Koutsky 2005; Stanley 2010).

Es difícil estimar la prevalencia de la infección genital por HPV, pero estudios recientes sugieren que las verrugas genitales visibles están presentes en aproximadamente 1% de los adultos sexualmente activos en los Estados Unidos y que al menos 15% tienen una infección subclínica, ya que se ha encontrado en estos pacientes DNA de HPV a pesar de no tener signos de la infección. Con esto podemos ver que la infección genital por HPV es extremadamente común. Las tasas más altas de infección genital por HPV son encontradas en adultos de entre 18 y 28 años de edad. Además los factores de riesgo para la infección son difíciles de evaluar debido a la alta frecuencia de infecciones subclínicas, pero es claro que el mayor factor de riesgo para adquirir una infección genital por HPV involucra el comportamiento sexual, particularmente múltiples parejas sexuales. Otro posible factor de riesgo para la adquisición de una infección genital por HPV incluye el uso de anticonceptivos orales, embarazo y deficiencia de la inmunidad mediada por células (Koutsky 1997; Baseman and Koutsky 2005; Kanodia *et al.*, 2007).

El HPV es altamente infeccioso con un periodo de incubación en el rango de 3-4 semanas, meses o años, la duración de este periodo de latencia probablemente esté relacionado más con la dosis de virus recibida que con la carcinogenicidad. Eventualmente por razones que aún no son comprendidas la replicación viral comienza, el DNA viral puede ser detectado y la infección del virus es dispersada. Esta fase de replicación activa también persiste por un periodo de tiempo variable, pero eventualmente la vasta mayoría de los individuos infectados montan una respuesta inmune efectiva que hace que lleguen a ser negativos a la detección de DNA de HPV con la subsecuente remisión de la enfermedad. La inmunidad efectiva consiste de una respuesta celular hacia proteínas tempranas, principalmente E2 y E6 necesarias para la regresión de la lesión, acompañada o seguida por la seroconversión o anticuerpos contra la proteína mayor de la cápside L1. La mayoría de los individuos desarrollan una respuesta inmune efectiva contra el virus y lo eliminan en un tiempo promedio de 4-6 meses a 1-2 años. Una minoría variablemente estimada entre el 10-20% no eliminan efectivamente el virus, y permanecen positivos a DNA de HPV con una infección viral persistentemente activa y son

estos individuos quienes están en riesgo de progresar a lesiones precancerosas de alto grado en el cérvix (Moscicki *et al.*, 2006; Stanley 2010).

1.4 Establecimiento de la infección por HPV

La infección por HPV es exclusivamente intraepitelial por lo cual requiere que las partículas virales entren al epitelio basal y accedan a las células en división mediante una micro abrasión en el epitelio estratificado. Actualmente hay controversia acerca de la naturaleza precisa del receptor que requiere el virus para entrar a la célula, pero se piensa que los proteoglicanos de heparán sulfato pueden jugar un papel importante en el enlace inicial y/o la entrada del virus. Al igual que otros virus, se ha visto que la infección por HPV requiere la presencia de receptores secundarios para que haya una infección eficiente y se ha sugerido la participación de la $\alpha 6$ integrina (Joyce *et al.*, 1999; Mc Millan *et al.*, 1999; Bossis *et al.*, 2005; Doorbar 2005; Patterson *et al.*, 2005; Kanodia *et al.*, 2007).

El ciclo de vida del HPV está ligado al programa de diferenciación de la célula hospedero, el queratinocito, con la producción de viriones maduros restringida a las células suprabasales diferenciadas. Las células de la capa basal son células madre que están en constante división y proveen un reservorio de células para las regiones suprabasales (Joyce *et al.*, 1999; Conger *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 1999; Longwort and Laimins 2004; Fang *et al.*, 2006).

La infección de estas células permite la activación de una cascada de expresión de genes virales que resulta en la expresión de bajo número de copias y amplifica en una primera ronda aproximadamente 20 a 100 copias extracromosomales del DNA viral por célula, número que se mantiene estable en una fase episomal de mantenimiento con una mínima expresión de genes virales en el compartimento de proliferación de las células basales indiferenciadas a lo largo del curso de la infección. Conforme las células basales infectadas con HPV se dividen, el DNA es repartido entre las células hijas, una de las cuales se separa y migra hacia el estrato granuloso y se diferencia. En el epitelio no infectado las células salen de ciclo celular y dejan la capa basal migrando a través de las capas suprabasales donde sufren un proceso de diferenciación terminal. Esta diferenciación incluye cambios como el entrecruzamiento físico de filamentos intermedios de queratina, la formación de envoltura cornificada y la secreción de lípidos, los cuales junto con la superficie epitelial forman una barrera física contra el ambiente, aunado a esto, otro de los cambios importantes es la pérdida de núcleo en las capas suprabasales. Las células infectadas dejan la capa basal y entran nuevamente a ciclo celular por la acción de la proteína E7 (y presumiblemente también E6), la cual permite la retención del núcleo a través de todas las capas del epitelio infectado (Joyce *et al.*, 1999; Conger *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 1999; Longwort and Laimins 2004; Doorbar 2005; Fang 2006; Stanley 2010).

La expresión de genes virales llega a ser máxima en las células diferenciadas no ciclantes de la capa superior del epitelio llegando hasta a 1000 copias de DNA por célula, esta replicación es seguida por la síntesis de la cápside viral, ensamble y descamación que se encuentran confinadas al epitelio superficial de diferenciación. Esta estrategia de replicación es

estrechamente controlada por la expresión de genes tempranos y asegura que en células en división la totalidad de las propiedades oncogénicas de las proteínas E6/E7 de HPV de alto riesgo no afloren en su totalidad. Sin embargo, si la infección viral llega a ser persistente la probabilidad de accidentes moleculares que desregulen el control de expresión de oncogenes en células mitóticamente activas puede incrementarse y la progresión neoplásica comienza (Fang *et al.*, 2006; Stanley 2010).

La infección de las células basales permite la activación de una cascada de genes virales que resulta en la replicación del genoma viral. Sin embargo, la expresión de genes virales es estrictamente regulada y limitada a genes tempranos específicos. Los primeros genes virales en ser expresados son los factores de replicación E1 y E2 los cuales forman un complejo que se enlaza al origen de replicación y actúan reclutando polimerasas celulares y proteínas accesorias que median la replicación del DNA. Tres proteínas de HPV (E5, E6 y E7) poseen actividad estimuladora de la proliferación. E5 estimula el crecimiento celular formando complejos con EGFR (epidermal-growth-factor receptor), el PDGF-R (platelet derived growth-factor- β receptor) y el CSF 1-R (colony-stimulating factor-1 receptor). Este fenómeno se ha visto que evita la apoptosis dada por el daño al DNA. E6 y E7 son independientemente capaces de inmortalizar células humanas y tejidos en cultivo, pero la eficiencia es incrementada cuando éstas son expresadas simultáneamente. La expresión de estas dos proteínas juntas resulta en el bloqueo de la salida de ciclo celular de la célula y en el aumento de la proliferación de las células infectadas conteniendo cientos de copias del genoma de HPV por célula (Kanodia *et al.*, 2007).

El genoma de HPV es encontrado de forma episomal en las células huésped en etapas tempranas de la infección (Fig. 1.1A), pero frecuentemente es encontrado integrado dentro de los cromosomas en células de CaCu (Fig. 1.1B). El tiempo de integración viral parece corresponder al desarrollo de CIN (Cervical Intraepithelial Neoplasia) de alto grado como consecuencia del alto nivel de expresión de E6 y E7. De hecho E6 y E7 son invariablemente expresadas en células de CaCu positivas a HPV, y juegan un papel importante en carcinogénesis así como para mantener el fenotipo transformado. Estas proteínas tienen varias actividades biológicas en adición a la inactivación de los mayores supresores de tumor, p53 y pRB respectivamente (Yugawa *et al.*, 2009).

En displasias cervicales de alto grado la expresión de E4 y la amplificación del genoma viral no ocurre. En cambio la expresión de E6 y E7 tiene lugar en las capas epiteliales superiores, donde estas proteínas interfieren con la regulación del ciclo celular y la formación del huso mitótico, permitiendo aberraciones como anisonucleosis e hiper cromasias. E6 y E7 son encontradas expresadas constitutivamente en CaCu así como en líneas celulares, como HeLa (HPV-18), SiHa y CaSki (HPV-16) y por consiguiente presentan antígenos tumorales específicos mediante moléculas HLA-A2 (Human Leucocyte Antigen), es decir moléculas del MHC clase I (Mayor Histocompatibility Complex). Epítopes restringidos de aquellas proteínas,

péptidos acarreados por moléculas del MHC clase I han mostrado estimular inmunidad celular en modelos animales y humanos (Cid 2009).

La infección del tracto genital por HPV puede inicialmente resultar en una lesión de bajo grado o CIN 1. Estas lesiones exhiben patrones de diferenciación medianamente alterados y muchas de ellas son eliminadas por el sistema inmune en menos de un año. El mecanismo por el cual la respuesta inmune celular elimina las infecciones causadas por HPV aún no es claramente entendido. Sin embargo algunas de estas lesiones, no son eliminadas por el sistema inmune y pueden persistir por períodos tan largos como décadas. La persistencia de infección por HPV de alto riesgo, es un factor que incrementa la susceptibilidad de desarrollar enfermedades genitales como el carcinoma celular escamoso o menos comúnmente, adenocarcinoma de cérvix (Longworth *et al.*, 2004).

Muchos tipos de HPV sólo producen lesiones productivas seguidas a la infección y no están relacionadas con los cánceres humanos. En este tipo de lesiones los productos de la expresión de genes virales son cuidadosamente regulados, produciendo las proteínas virales en tiempos definidos y en niveles regulados, además de la migración de células infectadas hacia la superficie epitelial. La infección productiva puede ser dividida en distintas fases, con las diferentes proteínas virales jugando papeles específicos. Los eventos que permiten la síntesis de virus en las capas superiores del epitelio, son comunes entre HPV de bajo y alto riesgo (Doorbar 2006).

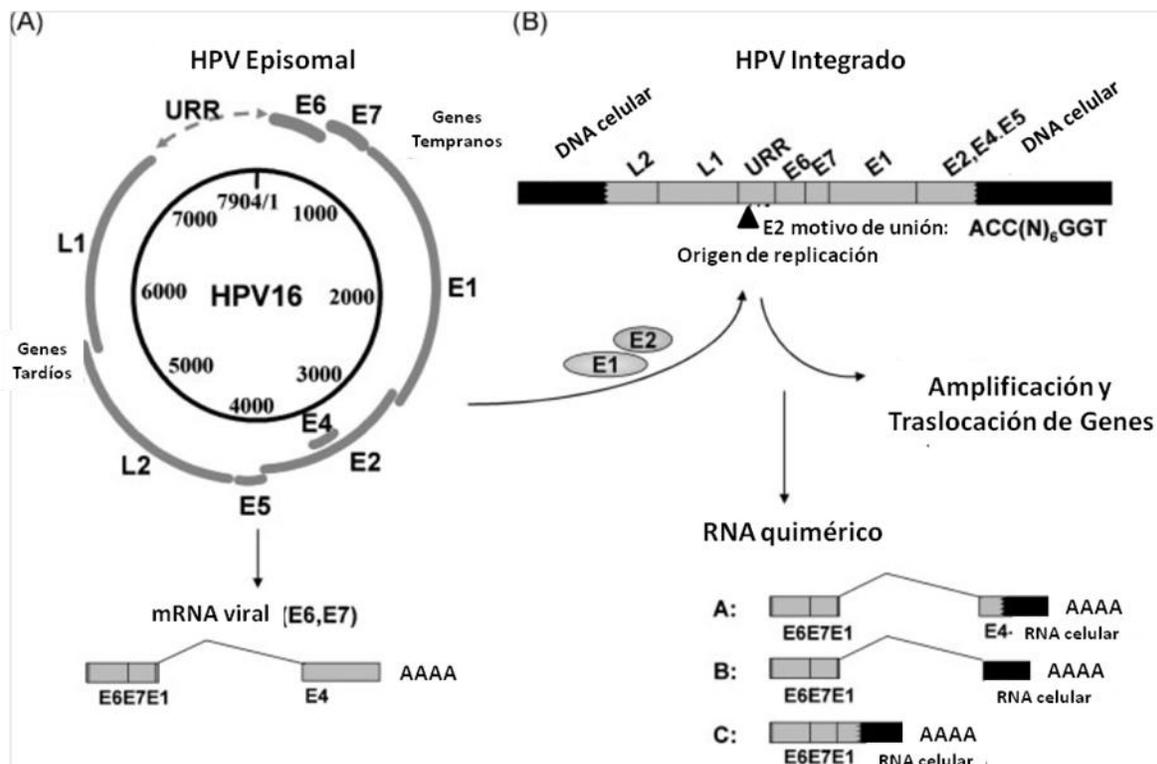


Fig. 1.1 Organización del DNA de HPV episomal e integrado. (A) El genoma de HPV es DNA circular de doble cadena de aproximadamente 8000 pares de bases, contiene una región URR (Upstream

Regulatory Region) y ocho ORFs (Open Reading Frames) de seis genes tempranos (E1, E2, E4, E5, E6, E7) y dos genes tardíos (L1, L2). Los genes tempranos tienen un papel importante en la replicación y los genes tardíos codifican las proteínas de la cápside viral. (B) El DNA de HPV es frecuentemente integrado en los cromosomas del hospedero en células de cáncer cervical y muestran características consistentes, como la interrupción del ORF de E2 y la retención de los ORFs de E6/E7 y la URR conteniendo el promotor temprano para la transcripción de E6/E7. Se muestran tres mRNAs típicos del DNA de HPV integrado. (Tomada y modificada de Yugawa *et al.*, 2009).

1.5 Mecanismos de evasión de la respuesta inmune innata y adquirida hacia HPV

La persistencia de la infección por HPV es la consecuencia de la falla del sistema inmune del hospedero para eliminar las células infectadas. Esto puede ser por el hecho de que el ciclo de vida del HPV no es citolítico y por lo tanto no hay inflamación ni señales de daño para alertar al sistema inmune (Stanley 2010). La naturaleza no citolítica de HPV limita la producción de antígenos que son procesados y presentados al sistema inmune adaptativo. Además el virus codifica proteínas que no son secretadas, la mayoría de éstas son proteínas E, y son expresadas en bajos niveles y principalmente en el núcleo de células infectadas. Por otro lado la producción de proteínas de la cápside altamente inmunogénicas está limitada a la capa superior del epitelio la cual se descama con regularidad por lo que una mínima cantidad de viriones son expuestos al sistema inmune, siendo de esta manera prácticamente invisibles para el hospedero (Kanodia *et al.*, 2007).

Muchos mecanismos pueden ser necesarios para el desarrollo de CaCu invasivo, uno de ellos es la incapacidad del sistema inmune para efectivamente erradicar células cancerígenas positivas a E7. Sin embargo, el análisis de células T de pacientes sugiere que la respuesta inmune celular hacia E7 de HPV 16 puede ser impedida, potencialmente por un decremento en la expresión de la cadena ζ , molécula clave en la señalización del receptor de células T (TCR) (Höhn *et al.*, 2000).

La respuesta de interferón ante la infección por HPV, es un mecanismo de defensa antiviral clave, sin embargo es activamente suprimido por las proteínas E6 y E7 de HPV de alto riesgo las cuales inhiben la vía de señalización de los genes de respuesta a interferón. La proteína E7 disminuye TLR9 y el HPV completamente evade la respuesta inmune innata retardando la activación de la inmunidad adaptativa (Kanodia *et al.*, 2007; Stanley 2010).

Otro de los mecanismos usados por las lesiones precancerosas asociadas a HPV para evadir la respuesta inmune es el hecho de que la propagación de este virus no cause lisis de las células infectadas lo cual impide que exista una respuesta inflamatoria. Incluso existen reportes de un ambiente inmunosupresor asociado con las lesiones precancerosas que ha sido atribuido a la capacidad de las proteínas virales, en particular E7, de inducir tolerancia (Giannini *et al.*, 1998; Cid 2009).

Las células dendríticas infiltran las capas epiteliales (células de Langerhans) y migran del epitelio a los nodos linfáticos cargadas con proteína E7 proveniente de células tumorales que han muerto por apoptosis. Sin embargo éstas pueden no ser capaces de madurar y pueden inducir tolerancia más que respuesta citotóxica, debido a que su maduración requiere de una señal co-estimuladora dada por la unión de CD28 con B7 y la expresión de esta última es inducida por la secreción de citocinas pro-inflamatorias las cuales están ausentes durante la infección por HPV. Además la continua expresión de E7 en lesiones CIN durante años puede favorecer su presentación como autoantígeno, lo cual facilita la tolerancia hacia esta proteína (Tindle 2002; Black *et al.*, 2003;).

A pesar de la habilidad de HPV para escapar a la inmunovigilancia, la infección por HPV frecuentemente provoca una respuesta inmune humoral y celular discretas. Estudios serológicos basados en VLP (Virus Like Particles) indican que en 50 % de los casos la infección con HPV causa respuesta humoral (IgG) contra regiones antigénicas específicas (epítopes conformacionales) de la proteína mayor de la cápside (L1), lo cual correlaciona con la presencia de DNA viral en los raspados cervicales. En el 50% restante la infección desaparece sin dejar una respuesta de anticuerpos detectable. Anticuerpos neutralizantes son encontrados durante la regresión de las lesiones inducidas por HPV. Una respuesta de anticuerpos contra E7 es observada en un alto porcentaje de casos de CIN y CaCu (Konya *et al.*, 2001; Carter *et al.*, 2000; Baay *et al.*, 1999; Ravaggi *et al.*, 2006; Kanodia *et al.*, 2007).

No obstante, un gran número de estudios indican que la respuesta celular contra HPV es relevante para la erradicación de infecciones establecidas ya que:

- 1) La regresión espontánea de lesiones CIN es acompañada por una respuesta inmune mediada por células T CD4+ que infiltran el epitelio infectado. (Gabrilovich *et al.*, 2001).
- 2) En pacientes con CIN persistentemente infectados con HPV-16 hay un incremento en la frecuencia de células T reguladoras CD4+CD25^{hi}, y las lesiones son altamente infiltradas con células T CD4+FoxP3+, las cuales están normalmente ausentes en el epitelio cervical. Esto sugiere que al menos parte de los linfocitos que se encuentran infiltrados en neoplasias pueden actuar suprimiendo la respuesta inmune anti-tumor (Molling *et al.*, 2007; Van der Burg *et al.*, 2007).
- 3) Pacientes con AIN y VIN (Anal Intraepithelial Neoplasia and Vulvar) tratados con Imiquimod, un agente que estimula TLR-7 sobre las APC (Antigen Presenting Cells) e induce una respuesta inmune mediada por células Th1, muestran una respuesta específica de células T CD4+ hacia HPV-16 correlacionando con la remisión de las lesiones (Stanley 2002; Van Poelgeest *et al.*, 2005; Schofer *et al.*, 2006; Le Poole *et al.*, 2008).

1.6 Vacunas para HPV

La biología de la asociación del HPV con el CaCu provee varios estados en los cuales la vacunación puede ser efectiva: la prevención de la infección, terapia para infecciones recientemente establecidas (condiloma acuminado y displasias de bajo grado), y terapia para enfermedades malignas (Tindle 2002).

La seroconversión durante la infección genital natural resulta en anticuerpos neutralizantes indetectables hacia la proteína mayor de la cápside L1 pero su respuesta es lenta con un tiempo de 8-9 meses para la seroconversión después de la primera detección de DNA de HPV-16, la concentración de anticuerpos es baja y solo 50-70% de las mujeres con infección incidente por HPV seroconvierten. Sin embargo, anticuerpos anti L1 persisten en muchas mujeres por al menos 10 años y estos bajos niveles de anticuerpos protegen contra la enfermedad. Se sabe que los anticuerpos neutralizantes anti L1 eran capaces de proteger contra altas dosis virales en modelos animales como perros, vacas y conejos de infección por papilomavirus, y apoyan la idea de que una vacuna profiláctica para HPV podría ser efectiva (Stanley 2010).

En 1991 Zhou *et al* reportaron que habían logrado sintetizar partículas semejantes a virus a las que denominaron VLPs (Virus Like Particles) esto fue posible gracias a la expresión de los genes de HPV-16 (L1 y L2) en células eucariotas (células animales o levaduras). La expresión de proteína nativa soluble L1 vía vectores procariotas fue generalmente no exitosa; sin embargo en los 90's se mostró que si la proteína L1 era expresada vía sistemas de expresión eucariota, el ensamble de ésta ocurría produciendo cápsulas virales vacías. Subsecuentemente otros científicos refinaron el ensamble de VLPs y demostraron que el gen de L1 era suficiente para producir VLPs de HPV, las cuales al ser inyectadas intramuscularmente a humanos voluntarios, producían altos títulos de anticuerpos neutralizantes y una respuesta de células T específicas. Además los anticuerpos neutralizantes generados mediante inmunización con VLP L1 protegían a animales contra la infección viral y el desarrollo de papilomas (Zhou *et al.*, 1991; Faridi *et al.*, 2011; Da Silva *et al.*, 2007; Stanley 2010).

En años recientes se ha puesto mucha atención en la posibilidad de vacunar contra el HPV como una manera importante de prevenir las lesiones cervicales precancerosas y el cáncer. Hoy en día se ha comprobado en diversas pruebas clínicas que las vacunas profilácticas para HPV son efectivas para evitar la infección. Dichas vacunas están constituidas de VLPs de la proteína L1 de los HPV más frecuentemente encontrados en lesiones precancerosas y cáncer (HPV-16 y -18). Una de las ventajas de las VLPs es que no contienen DNA viral por ello no están asociadas con el desarrollo de la infección a pesar de que su estructura es morfológicamente semejante al virus nativo. Las VLPs son altamente inmunogénicas, son estructuras no replicativas que mimetizan al virus, en morfología e inmunogenicidad. Los reportes de estudios clínicos en Fase IIB realizados con las vacunas, muestran una efectividad de 100% para proteger contra infecciones persistentes por HPV de alto riesgo, por un máximo de 5 años en mujeres vírgenes que han sido vacunadas con las partículas (Tindle 2002; Da Silva *et al.*, 2007).

1.6.1 Vacunas profilácticas para HPV

En la búsqueda de la vacuna contra el HPV, se han estado investigando vacunas profilácticas y también terapéuticas. Estos dos tipos de vacunas requieren de diferentes enfoques para la elección de los antígenos virales y para la selección de las vías de administración. A pesar de los esfuerzos, a la fecha, sólo las vacunas profilácticas han demostrado su eficacia (García 2007).

Hoy en día se cuenta con dos vacunas contra el HPV aprobadas en el mundo y efectivas para la prevención del CaCu, éstas son de uso profiláctico y están constituidas de VLPs de la proteína L1 de HPV. Una de ellas es Cervarix® una vacuna bivalente (HPV-16 y -18) de GlaxoSmithKline Biologicals (GSK) disponible desde el 2007 y la otra es Gardasil®, una vacuna tetravalente (HPV-16,-18, -6 -11) de MSD Merck disponible desde 2006 (Tindle 2002; García 2007).

La vacuna bivalente (Glaxo, Cervarix®) está dirigida contra HPV-16 y HPV-18, los tipos más frecuentes asociados a CaCu. La vacuna tetravalente (Merck, Gardasil®) está dirigida también contra HPV-16 y HPV-18 pero incluye VLPs contra HPV-6 y HPV-11, que son los tipos de virus más frecuentemente asociados a verrugas genitales. Esta vacuna es producida por la fermentación en levaduras recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* (CANADE 3C-5 cepa 1895), en éstas la proteína L1 del HPV se autoensambla para formar las VLPs, las cuales se purifican y se adsorben en el adyuvante de aluminio (sulfato hidroxifosfato de aluminio amorfo). Cada dosis de 0.5 ml contiene aproximadamente 20 µg de VLP de L1 del tipo 6, 40 µg de VLP de L1 del tipo 11, 40 µg de VLP de L1 del tipo 16 y 20 µg de VLP de L1 del tipo 18 (García 2007).

Ambas vacunas han demostrado en pruebas clínicas ser altamente eficaces para evitar el desarrollo de CIN de alto grado (Cervical Intraepithelial Neoplasia 2/3) causadas por HPV- 16 y -18 en mujeres de entre 15-26 años de edad que no han tenido contacto con estos tipos de HPV, y que recibieron un esquema de 3 inmunizaciones (0, 1 o 2 y 6 meses) con las vacunas. Pruebas adicionales han sido realizadas para la vacuna tetravalente, en las cuales ha mostrado una alta eficacia (>96%) para prevenir neoplasias intraepiteliales vulvares y vaginales (VIN y VIN) así como para las verrugas genitales externas causadas por HPV-6 y -11. En hombres entre 16 - 23 años de edad la vacuna tetravalente ha mostrado tener >90% de eficacia contra verrugas genitales externas causadas por HPV-6 y -11 en hombres heterosexuales y un 73% de eficacia contra AIN (Anal Intraepithelial Neoplasia) en hombres homosexuales (Tindle 2002; Stanley 2010).

1.6.2 Vacunas terapéuticas para HPV

1.6.2.1 Vacunas peptídicas

Las vacunas peptídicas son simples, bien toleradas y fáciles de producir. El bajo costo asociado con una buena manufactura durante la producción de las vacunas basadas en péptidos

permitieron que muchos investigadores en el pasado iniciaran estudios clínicos usando epítopes de proteínas E6 y E7 afines a moléculas HLA-A2.

Un estudio clínico Fase I hecho por Steller *et al.* exploró la eficacia de un lipopéptido derivado de E7 (HPV-16 E7 86-93 TLGIVCPI) con afinidad por moléculas HLA-A *0201 unido después a un péptido no específico para pan-HLA DR, PADRE, el cual acarrea un epítope no específico para células T cooperadoras. Veinte pacientes con cáncer refractario cervical o vaginal fueron seleccionadas, y recibieron cuatro dosis subcutáneas de la vacuna a intervalos de tres semanas. La respuesta de CTL (Citotoxic T Lymphocytes) específicos para E7 86-93 fue detectada en un ensayo de secreción de IFN γ , en 5 pacientes después de 2 dosis y en 2 pacientes después de las 4 inmunizaciones. Sin embargo no se observaron respuestas clínicas en estas pacientes. Se propone a este péptido para su uso en el tratamiento de pacientes con lesiones no invasivas (Steller *et al.*, 1998).

Un año después se realizó un estudio clínico en el que se vacunó con péptidos de E7 de HPV-16 a pacientes con CaCu positivo para HPV-16 refractario a los tratamientos convencionales. Las pacientes que recibieron la vacuna fueron positivas para HLA-A*0201. La inmunización fue diseñada a dosis escalada, en ésta las pacientes recibieron 100, 300 o 1000 μ g de cada péptido respectivamente. La vacuna consistió de 2 péptidos de E7 y un péptido para células Th emulsificado con adyuvante Montanide ISA 51. Fueron incluidas en el estudio 19 pacientes y no se observaron efectos adversos. Dos pacientes mostraron estabilización de la enfermedad un año después de la vacunación; 15 pacientes mostraron progresión de la enfermedad, de las cuales una murió durante el tratamiento dado su enfermedad progresiva; y dos pacientes mostraron regresión del tumor después de la quimioterapia que siguió a la vacunación. Se presentó un conteo relativamente bajo de linfocitos antes y después de la vacunación en 11/19 pacientes indicando un inmunocompromiso en estas pacientes. Este estudio muestra que la vacunación con el péptido de E7 de HPV 16 es factible, aún en un grupo de pacientes con enfermedad terminal. Esto indica que es posible vacunar a pacientes con enfermedad menos avanzada, cuyo sistema inmune está menos comprometido por la enfermedad progresiva (van Driel *et al.*, 1999).

Los estudios utilizando péptidos para la vacunación continuaron y es así como en el año 2000, en un estudio que incluyó a 18 mujeres con CIN o VIN de alto grado (II/III) determinado colposcópicamente y por biopsia, positivas para HPV 16 y para HLA-A2, diez de ellas fueron tratadas con dosis escaladas de una vacuna que consistía de un péptido de 9 aminoácidos correspondientes a la secuencia 12-20 del gen de E7 emulsificado con adyuvante incompleto de Freund. Al resto de las pacientes, iniciando con el décimo primer paciente se les inoculó también un péptido pero esta vez de 8 aminoácidos 86-93 ligado a un epítope para células Th con una cola lipídica unida covalentemente. Las pacientes recibieron 4 inmunizaciones de dosis incrementadas de la vacuna cada 3 semanas, seguidas por colposcopias repetidas y remoción del tejido displásico 3 semanas después de la cuarta inmunización. Solo 3 de las 18 pacientes mostraron regresión de sus displasias, pero se observó un incrementado número de células

dendríticas infiltradas en 6 de 6 pacientes evaluadas. En 12 de 18 pacientes se observó mediante raspado cervical que fueron capaces de eliminar el virus después de la cuarta vacuna, pero todas las biopsias fueron positivas al analizarlas por hibridación *in situ* con RNA. Seis pacientes mostraron regresión de la lesión al evaluar por colposcopia y 3 tuvieron una regresión completa de la lesión. Los datos establecen que la vacuna de péptidos de HPV-16 puede tener importantes efectos clínicos y biológicos, además sugiere que pueden ser explorados futuros refinamientos de la estrategia de vacunación para reforzar la inmunidad antígeno específica (Muderspach *et al.*, 2000).

La inmunización con péptidos de E6 y E7 de HPV emulsionados con adyuvante incompleto de Freund induce protección contra el reto con células tumorales que expresan E6 y E7 en ratones. Péptidos purificados derivados de diferentes virus animales han demostrado que inducen CTL de alta afinidad y protegen ratones contra virus infecciosos (Muderspach *et al.*, 2000).

En conjunto, estos estudios demostraron que la vacunación con péptidos aún a altas dosis es bien tolerada; aunque la respuesta inmune inducida fue insuficiente para inducir una respuesta clínica satisfactoria. Una posible explicación para ello puede ser que en la mayoría de los estudios se seleccionan pacientes con cáncer avanzado de alto grado, cuya respuesta inmune se ve comprometida. No obstante, nuevas estrategias de vacunas peptídicas combinando avances en ingeniería de péptidos, adyuvantes y sistemas de liberación pueden resultar en una eficiente respuesta antitumoral (Cid 2009).

Sin embargo el mayor obstáculo en el desarrollo de vacunas basadas en péptidos ha sido ver que cuando los péptidos óptimos se administran solos, éstos son extremadamente ineficientes para inducir una respuesta de CTL. El adyuvante incompleto de Freund ha sido usado clínicamente por muchos años, pero éste sigue siendo un adyuvante no específico y frecuentemente induce una respuesta inflamatoria local (Steller *et al.*, 1998).

1.6.2.2 Vacunas proteicas

Una de las ventajas de las vacunas basadas en proteínas es que ellas contienen numerosos epítopes para CTL y de esta manera no se requiere un haplotipo de HLA determinante.

Durante los últimos años se han desarrollado y probado en estudios preclínicos y clínicos un gran número de vacunas para CaCu usando proteínas modificadas E6 y E7 de HPV- 16. Una de ellas fue la proteína de fusión llamada HspE7, proteína E7 de HPV 16 fusionada a la Hsp 65 (heat shock protein) de bacillus Calmette-Guerin (BCG), un potente activador de células dendríticas e inductor de respuesta inmune celular. En una prueba clínica Fase II, 22 pacientes con lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado persistentes, positivas para HPV-16, las pacientes recibieron 3 dosis de vacuna HspE7 (500 µg/dosis) a intervalos de un mes. Catorce de las veintidós pacientes tenían verrugas determinadas por examinación física al inicio del experimento, 10 de 14 mostraron una reducción de las mismas a las 24 semanas, 3 de las 14 pacientes tuvieron una resolución completa de las verrugas, en las pacientes restantes se

observó un incremento en el tamaño de sus verrugas. Las verrugas mejoran sustancialmente pero no desaparecen totalmente dentro de los primeros seis meses (Goldstone *et al.*, 2002).

Otra de las vacunas usadas para realizar pruebas clínicas es la proteína de fusión HspE7 generada en San Diego - Stressgen. La HspE7 combina la proteína viral E7 con una proteína de shock térmico para buscar a células dendríticas. Las células dendríticas después presentan E7 a células T induciendo que estas reconozcan y ataquen células cancerígenas que contienen E7. En resumen, de los resultados de la prueba clínica Fase II presentados por la sociedad de ginecología oncológica del colegio de medicina de New York reportó que 22 (71%) de 31 pacientes con lesiones CIN asociadas con HPV-16 respondieron después de recibir tres inyecciones de 500 mg de HspE7 después de 60 días. Con base en estos resultados Stressgen tenía planeado realizar una prueba Fase III en el 2006 pero ésta no se realizó debido a que se reformuló la versión de la HspE7 combinándola con bajas concentraciones de un adyuvante lo cual mostró resultados más prometedores que la formulación original (Mc Neil 2006).

Una proteína de fusión recombinante conteniendo E6 y E7 de HPV 16 también fue evaluada en una prueba clínica Fase I con 42 voluntarias sanas quienes recibieron 3 dosis vía intramuscular de la proteína E6E7 en combinación con el adyuvante ISCOMATRIX. Todos los sujetos vacunados tuvieron respuesta de anticuerpos anti E6E7 y se demostró una respuesta de células T en 80% de los casos (Cid 2009).

Otro estudio evaluó la inmunogenicidad en ratones de diferentes formulaciones de vacunas usando las proteínas recombinantes E6E7 de HPV-16 o las proteínas de fusión E7GST. Cuando se co-administraban dichas proteínas con el adyuvante ISCOMATRIX éstas inducían consistentemente CTL específicos para E7, protección anti tumor *in vivo* y respuesta de anticuerpos. ISCOMATRIX ha sido desarrollado para usarlo en la formulación de nuevas vacunas y se ha evaluado su seguridad y toxicidad en pruebas clínicas en humanos, los hallazgos demuestran el potencial de este adyuvante para estimular la respuesta inmune humoral y celular para antígenos procesados endógenamente y es un adyuvante ideal cuando se desea respuesta de CTL específicos (Stewart *et al.*, 2004)

TA-CIN es también utilizada como vacuna, ésta es una proteína recombinante de fusión hecha de L2, E6 y E7 de HPV-16 producida en *E. coli*. Esta vacuna probó ser eficaz en modelos de ratón ya que fue capaz de prevenir el desarrollo de tumores con células positivas para HPV-16. Con el fin de evaluar la seguridad e inmunogenicidad de TA-CIN, se realizó una prueba clínica Fase I incluyendo 40 mujeres sanas quienes recibieron 3 dosis escaladas de proteína (26, 128 y 533 µg) por vía intramuscular, sin adyuvante a intervalos de 4 semanas. La respuesta de anticuerpos se observó en todas las dosis. Una respuesta específica celular y de anticuerpos hacia E6 y E7 fue inducida en 8 sujetos vacunados con la dosis más alta (Cid 2009).

Un estudio más utilizando TA-CIN tuvo como objetivo determinar la efectividad clínica de un régimen de vacunación de primer dosis y refuerzo contra virus de papiloma humano en una prueba clínica Fase II. Para esto se vacunaron tres pacientes con neoplasia intraepitelial

anogenital con tres dosis cada una de la proteína de fusión recombinante E6/E7/L2 (TA-CIN) de HPV-16 seguida por una dosis de virus vaccinia recombinante que codifica para E6/E7 de HPV-16 y -18. La respuesta clínica fue evaluada por una serie de fotografías, sintomatología, y biopsias antes y después de la vacunación. En otro estudio, 29 mujeres fueron vacunadas; 27 con neoplasia intraepitelial vulvar y 2 con neoplasia intraepitelial vaginal grado 3. Se observó respuesta clínica en 5 mujeres con una remisión completa y 4 remisiones parciales (Fiander *et al.*, 2006).

Una de las combinaciones candidata para una vacuna preventiva y terapéutica para HPV es la proteína de fusión que comprende L2, E6 y E7 de HPV-16. Ya que se ha visto es capaz de generar anticuerpos neutralizantes contra L1 y L2 y respuesta en sangre periférica antígeno específica, esto después de la triple vacunación a intervalos de un mes con L1E7E6 de HPV-16. En los estudios realizados se encontró que la vacunación de voluntarios sanos indujo anticuerpos neutralizantes contra L2, éstos detectados un mes después de la última vacunación, además de que la respuesta proliferativa de voluntarios sanos también mostró un aumento significativo cuando se incrementó la dosis de vacuna. Sin embargo los pacientes con neoplasia intraepitelial anogenital respondieron menos efectivamente que los voluntarios sanos en cuanto a la generación de anticuerpos neutralizantes y la respuesta proliferativa (Gambhira *et al.*, 2006).

1.6.3 Partículas Tipo Virales Quiméricas (cVLP)

La producción de VLP consistentes de proteínas de la cápside L1 y L2 abrió la posibilidad de usar estas VLP como vacuna preventiva contra infecciones por HPV. Dichas vacunas profilácticas son efectivas para generar anticuerpos neutralizantes en superficies mucosas que previenen el desarrollo de lesiones precancerosas causadas por HPV-16 y -18. Sin embargo, las mujeres que ya están infectadas con HPV oncogénico están en riesgo de desarrollar cáncer y las vacunas profilácticas actuales son ineficaces en estos casos. Esto hace necesario el desarrollo de vacunas terapéuticas encaminadas a inducir respuesta inmune celular contra antígenos de proteínas de expresión temprana como E6 y E7, los cuales a diferencia de las proteínas de la cápside, son expresados constitutivamente en lesiones precancerosas y tumores. Estudios clínicos recientes indican que las vacunas profilácticas actuales no tienen efectos terapéuticos, ya que las vacunas terapéuticas necesitan estimular una respuesta mediada por células hacia proteínas tempranas de HPV. Por consiguiente fue necesario producir VLP que consistieran de la fusión de proteínas L1 y/o L2 con proteínas transformantes E6 y/o E7, las cuales son constitutivamente expresadas en todas las células de CaCu y constituyen un blanco óptimo para la inmunoterapia. Este tipo de partículas son denominadas partículas tipo virales quiméricas (cVLP) (Tindle 2002; Cid 2009).

Las proteínas contenidas en las cVLP contienen regiones antigénicas que son presentadas por moléculas HLA-A2 y han mostrado ser inmunogénicas en ratones y humanos. Sin embargo el inmunizar con E7 en varias formas (péptidos, proteínas, vectores recombinantes o DNA) para

tratar el CaCu necesita una revisión exhaustiva de cómo E6 y E7 evaden la respuesta del sistema inmune (Cid 2009).

Las VLP quiméricas son indistinguibles de las VLP parentales en su morfología y en su habilidad para aglutinar eritrocitos y elicitar altos títulos de anticuerpos neutralizantes. En 1998, Greenstone y colaboradores reportaron que cVLP que consistían de las proteínas L1 y L2 del HPV-16 y proteína E7 del mismo tipo viral, tenían la capacidad de inducir inmunidad antitumoral específica contra el polipéptido introducido. Tras una única vacunación con 10µg de las cVLP se obtuvo una protección completa en el reto tumoral evaluada en ratones C57BL/6 usando la línea celular TC-1, la cual expresa la proteína E7 de HPV-16, pero no las proteínas estructurales del virión. La inyección de VLP quiméricas L1y VLP quiméricas L2, pero no las VLP L1 y VLP L2, protegieron los ratones del reto tumoral, aún en la ausencia de adyuvante (Greenstone *et al.*, 1998).

Posteriormente en 2001 Rudolf y colaboradores reportaron que cVLP de L1/L2-E7, similares a las reportadas por Greenstone, podían activar a células dendríticas inmaduras humanas, ya que se observó que las células dendríticas de sangre periférica eran capaces de atrapar las cVLP. Además la incubación de células dendríticas inmaduras con cVLP por 48 horas induce un incremento en la expresión de las moléculas de superficie CD80 y CD83 así como en la secreción de IL-12. Estos resultados claramente demuestra que las dendríticas inmaduras son totalmente activadas por las cVLP de HPV-16 y subsecuentemente son capaces de inducir epítopes procesados endógenamente específicos para una respuesta de células T *in vitro*. Estos hallazgos pueden explicar la alta inmunogenicidad y eficiencia de las cVLP como vacunas (Rudolf *et al.*, 2001).

En 2001 Kaufmann, reportó el diseño de la cVLP compuesta de L1-E7 1-55 de HPV-16. Estas cVLP en lugar de contener la proteína E7 completa, fusionaba los primeros 55 aminoácidos de ésta al extremo C-terminal de L1. Las cVLP fueron hechas en baculovirus recombinantes para después purificarlas. Se pudo ver que estas cVLP eran capaces de activar linfocitos T citotóxicos de sangre periférica humana, ya que la incubación directa de linfocitos de sangre periférica con cVLP resultaba en la inducción de proliferación y crecimiento de linfocitos T. Para aumentar la presentación de antígenos se cargaron células dendríticas con cVLP usadas para activar células T vírgenes y se observó crecimiento principalmente de células CD3+ (95%) con predominio de células T CD4+ y en menor cantidad células T CD8+. El análisis de la especificidad de células T fue probada por un ensayo de liberación de interferón. Se detectó una frecuencia de 0.5-0.7% de células T que respondieron a la cVLP en los cultivos y alrededor de 0.1% de células T que respondieron a los péptidos. Las células encontradas tenían actividad citolítica hacia líneas autólogas de células B linfoblásticas, pseudoinfectadas con cVLP y hacia células cargadas con péptidos HLA- A*0201 específicos. Los linfocitos encontrados también lisaron la línea celular CaSki positiva para HPV-16 y HLA-A*0201 mientras que la línea celular SiHa negativa para HLA-A*0201 no fue lisada, lo cual indica que los linfocitos T reconocían epítopes de E7 y L1 restringidos a MHC. Con esto se concluye que las cVLP muestran ser una

prometedora vacuna terapéutica en pacientes con lesiones intraepiteliales cervicales o cáncer positivos para HPV-16 (Kaufmann *et al.*, 2001).

Jong y colaboradores, diseñaron una vacuna basada en una única proteína constituida por L2/E6E7 de HPV-16, denominada TA-CIN. Ésta fue exitosa en modelo murino previniendo el desarrollo de células tumorales positivas para HPV-16 (Jong *et al.*, 2002).

Para el año 2007 Kaufmann realiza una prueba clínica con 39 pacientes mono infectadas con CIN grado 2 y 3 a las cuales se les aplicaron dos dosis de cVLP (75 o 250 µg). La duración del estudio fue de 24 semanas con 2 visitas adicionales a las 12 y 24 semanas. La vacuna mostró ser segura con solo algunos efectos adversos menores atribuibles a la vacunación. Se detectaron altos títulos de anticuerpos contra L1 de HPV-16 y bajos títulos de anticuerpos contra E7 de HPV-16 así como respuesta inmune celular contra ambas proteínas. La respuesta fue equivalente con ambas concentraciones de vacuna. Se observó una regresión a CIN grado 1 o a un estado normal en 39 % de las pacientes que recibieron vacuna y en 25% de las pacientes que recibieron placebo. Cincuenta y seis por ciento de las pacientes que mostraron una respuesta también mostraron ser negativas para DNA de HPV-16 al final del estudio. En este estudio se demostró la seguridad de la vacuna y una tendencia no significativa de la eficacia clínica de la misma (Kaufmann *et al.*, 2007).

En años recientes, la tecnología basada en plantas ha sido usada para la producción de reactivos importantes biomédicamente, incluyendo antígenos para la elaboración de vacunas. Los antígenos derivados de plantas son capaces de producir una respuesta inmune, mostrando muchas ventajas sobre las tecnologías tradicionales para la elaboración de vacunas, incluyendo eficacia, incrementada seguridad, versatilidad, estabilidad y economía. (Franconi *et al.*, 2002). Empleando la tecnología en plantas, el Dr. Miguel Ángel Gómez Lim del CINVESTAV Irapuato generó una partícula quimérica tipo viral (cVLP) constituida de la proteína L1 y epítopes de las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16, la cual fue producida en plantas de jitomate. Nuestro grupo de trabajo determinó la inmunogenicidad de dicha partícula en un modelo de ratón C57BL/6. La administración intraperitoneal de tres dosis de 5µg cada una de cVLP emulsionada con adyuvante de Freund en ratones de la cepa C57BL/6 fue capaz de generar anticuerpos neutralizantes contra la cVLP y linfocitos T citotóxicos contra los epítopes incluidos en la cVLP, la inmunización con estas partículas mostró un efecto terapéutico ante el reto tumoral con células TC-1 transfectadas con las proteínas E6 y E7 de HPV-16, ya que logró disminuir el crecimiento tumoral hasta en un 50 %, además de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes, lo cual sugirió que estas partículas pueden tener un potencial profiláctico y terapéutico al emplearse como vacuna (Paz de la Rosa *et al.*, 2009; Toledo 2010; Tapia 2010).

Recientemente nuestro grupo de trabajo colaboró con el Dr. Gómez Lim en el diseño de una nueva cVLP conteniendo la proteína L1 de HPV-16 y péptidos antigénicos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 con especificidad para alelos HLA clase I de histocompatibilidad de alta frecuencia en la población Mexicana (Monroy *et al.*, 2007). La nueva cVLP fue producida en

plantas de *Nicotiana benthamiana* , debido a que a través de este sistema se obtuvo una mayor eficiencia en la producción de las proteínas que constituyen a la partícula, empleando una versión del gen L1 optimizada para expresarse en plantas (Ma Clean *et al.*, 2007). Nuestro grupo de trabajo ha analizado previamente la capacidad de esta cVLP para generar anticuerpos con capacidad neutralizante de manera comparable a la VLP compuesta únicamente por la proteína L1 de HPV-16, al inmunizar con tres dosis de 5 µg de cVLP en presencia de adyuvante de Freund (Osorio 2011; Castellanos 2010). No obstante se desconoce si ésta cVLP es capaz de inducir protección inmune ante el reto tumoral, por tanto, en este trabajo se evaluó la capacidad de esta cVLP para proteger a ratones de la cepa C57BL/6 bajo el esquema de inmunización antes, durante y después del reto tumoral.

2. Justificación y Planteamiento del problema

El CaCu representa la segunda neoplasia más frecuente en México y constituye una de las principales causas de muerte por cáncer en el país. El HPV es considerado como el principal agente etiológico asociado al desarrollo del CaCu, su presencia es cercana al 100% de todos los tumores de CaCu. Por lo tanto, la vacunación efectiva contra el HPV ofrece una oportunidad para reducir la morbilidad y la mortalidad asociadas con este virus. En los últimos años, la generación de VLPs constituidas por L1 y L2 de los principales tipos de HPV (HPV-16 y -18) que infectan el tracto genitourinario, han sido hasta ahora la base para las vacunas profilácticas más eficaces contra la infección por HPV. En la actualidad varios países han aprobado dos vacunas preventivas para su utilización, con la finalidad de limitar la infección por HPV. Sin embargo, las vacunas preventivas no ejercen efectos terapéuticos sobre infecciones pre-existentes y lesiones asociadas al HPV. Por consiguiente, actualmente se están desarrollando vacunas terapéuticas con la finalidad de generar una respuesta inmune mediada por linfocitos T citotóxicos contra células infectadas por HPV y células tumorales. La capacidad de las VLPs para acarrear epítopes, como los derivados de las proteínas oncogénicas E6 y E7 presentes en lesiones pre-malignas y malignas, sin alterar su estructura de manera notable, ha favorecido la generación de partículas quiméricas tipo virales.

En este sentido, nuestro grupo de trabajo en colaboración con el grupo de investigación del CINVESTAV de Irapuato desarrolló una nueva partícula quimérica tipo viral constituida por la proteína L1 de HPV-16 fusionada con 8 péptidos antigénicos derivados de las oncoproteínas E6 y E7 del HPV-16 que tienen especificidad para alelos HLA clase I (HLA-A2, y -B35) de alta frecuencia en la población Mexicana. Empleando la biotecnología de expresión de proteínas en plantas, esta partícula fue producida en plantas de *Nicotiana benthamiana*, y recientemente se evaluó la capacidad de inducir anticuerpos con actividad neutralizante en ratones de las cepas C57BL/6 y Balb/c inmunizados con esta cVLP (Osorio 2011) así como de linfocitos T citotóxicos capaces de lisar células tumorales (Castellanos 2010). No obstante se desconoce si ésta cVLP además de inducir anticuerpos, es capaz de proteger a los ratones ante el reto tumoral, por tanto, en este trabajo se evaluó la capacidad protectora y terapéutica de esta cVLP contra el crecimiento tumoral en la cepa de ratones C57BL/6 bajo el esquema de inmunización antes, durante y después del reto tumoral. Los resultados de este proyecto serán importantes para evaluar el potencial terapéutico de estas partículas contra la infección por HPV-16, lo que será de gran ayuda para proponer nuevas estrategias de inmunoterapia contra el CaCu.

3. Hipótesis:

La inmunización de ratones de la cepa C57BL/6 con la partícula quimérica tipo viral constituida de la proteína L1 y epítopes de las proteínas oncogénicas E6 y E7 de HPV-16 (cVLP) proveerá protección y efecto terapéutico en los ratones ante el reto tumoral.

4. Objetivo general:

Analizar la inmunogenicidad de partículas tipo virales de la proteína L1 (VLP-L1) y partículas quiméricas tipo virales de la proteína L1 con epítopes de las proteínas oncogénicas E6 y E7 de HPV-16 (cVLP) generadas en plantas de *Nicotiana benthamiana*.

4.1. Objetivos particulares:

- 1) Evaluar la capacidad de las cVLP y VLP-L1 para proteger ante crecimiento tumoral en ratones C57BL/6.
- 2) Evaluar la capacidad terapéutica de las cVLP y VLP-L1 en un modelo tumoral de ratón C57BL/6.
- 3) Analizar la capacidad de las cVLP y VLP-L1 para inducir anticuerpos específicos en el modelo tumoral.

5. Material y Método

- Partículas tipo virales

Las partículas tipo virales constituidas por la proteína L1 de HPV-16 (VLP-L1) y las partículas quiméricas tipo virales constituidas de la proteína L1 y epítopes de las proteínas oncogénicas E6 y E7 de HPV-16 (cVLP) utilizadas en este estudio, se produjeron y purificaron en el Laboratorio de Plantas Tropicales y Salud Humana del CINVESTAV Irapuato y fueron cuantificadas en nuestro laboratorio mediante la técnica de ELISA para analizar su inmunogenicidad en ratones de la cepa C57BL/6 y Balb/c (Osorio 2011). Este lote de cVLP sirvió para realizar varios de los trabajos hechos por nuestro grupo, cuidando su correcto almacenaje y uso (en refrigeración a -4°C y trabajadas en condiciones de esterilidad) para evitar la degradación de las partículas.

La secuencia quimérica unida a la proteína L1 que conforma a la cVLP, consta de 5 epítopes de la proteína E6 y 3 de la proteína E7 de HPV-16 (Tabla 5.1). Estos epítopes fueron definidos por nuestro grupo de trabajo y que de acuerdo a un programa de predicción por algoritmos (bimas.dcrtnih.gov/molbio/hla_bind/) tienen una mayor probabilidad de ser presentados por los alelos HLA-A2 y HLA-B35 (Monroy *et al.*, 2007), así como las moléculas H2-Kd y H2-Db de ratón.

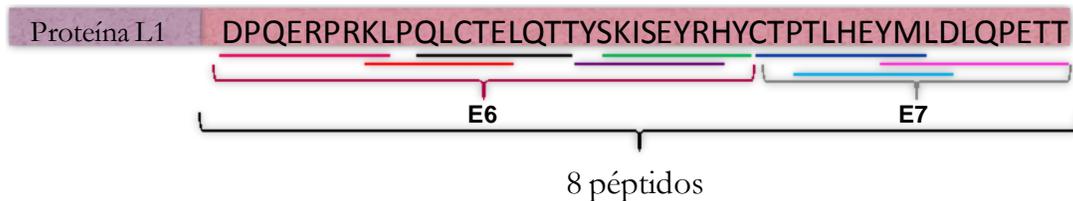


Fig. 5.1 Secuencia de la cVLP, las líneas de color señalan cada uno de los péptidos de E6 o E7 integrados en la secuencia.

PROTEÍNA	POSICIÓN	SECUENCIA	Afinidad a moléculas del MHC Clase I en humano (HLA) o ratón (H-2)
E6 HPV-16	11-19	DPQERPRKL	H-2Kd
E6 HPV-16	18-26	KLPHLCTEL	HLA-A2, H-2Db, H-2Kd
E6 HPV-16	77-85	YSKISEYRH	HLA-B35
E6 HPV-16	79-87	KISEYRHYC	HLA-A2
E6 HPV-16	21-29	QLCTELQTT	H-2Db, H-2Kd
E7 HPV-16	5-13	TPTLHEYML	HLA-A2, H-2Kd
E7 HPV-16	7-15	TLHEYMLDL	H-2Db, H-2Kd
E7 HPV-16	11-20	YMLDLQPETT	HLA-A2

Tabla 5.1. Secuencias de épitopes de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 contenidas en la cVLP.

- Células

Se utilizaron células tumorales TC-1 las cuales son células derivadas de un carcinoma de pulmón de ratón C57BL/6 transfectadas con los genes de E6 y E7 de HPV-16, los cuales son expresados de manera permanente junto con el oncogen *ras* (Lin *et al.*, 1996). Estas fueron cultivadas en medio de cultivo RPMI (GibcoBRL, Life Technologies) suplementado con suero fetal de bovino (GibcoBRL, Life Technologies) al 10%, y mantenidas en condiciones de esterilidad en una incubadora (Forma Scientific) a 37°C con 5 % de CO₂ y humedad saturante.

- Ratones

Para la inmunización e inducción de tumores se usaron grupos de cinco ratones hembra cada uno, de la cepa C57BL/6 (Haplotipo H-2D^b) de 6-8 semanas de edad. Los grupos de ratones se mantuvieron en condiciones estándar de bioterio, con alimento y agua *ad libitum*, conforme a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Diario Oficial de la Federación, 22 de agosto 2001, que hace referencia a las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

- Análisis de la capacidad protectora y terapéutica de las cVLP y VLP-L1 ante el reto tumoral.
- Inmunización de ratones

De acuerdo al esquema de inmunización (Tabla 5.2), los ratones C57BL/6 recibieron un total de 3 inmunizaciones de cVLP ó VLP en intervalos de 10 a 12 días entre cada inmunización. La primer inmunización consistió de una dosis de 10µg de cVLP ó VLP contenida en 50µL de PBS emulsionada en proporción 1:1 con adyuvante completo de Freund y las 2

inmunizaciones subsecuentes contenían 10µg de cVLP ó VLP contenida en 50µL de PBS emulsionada en proporción 1:1 con adyuvante incompleto de Freund.

- Reto tumoral

Para evaluar la capacidad protectora de las VLPs ante el reto tumoral, los ratones C57BL/6 fueron inmunizados ya sea con cVLP o VLP-L1 antes de recibir 1 X 10⁵ células tumorales TC-1 mediante inoculación subcutánea a nivel dorsal. Mientras que para evaluar la capacidad terapéutica de las partículas, éstas fueron inoculadas de manera simultánea a la inoculación de las células tumorales; ó 10 días después de la inoculación de las células tumorales, una vez que el tumor era palpable. En todos los casos, después de 10 días de la primera inoculación de células tumorales se inocularon nuevamente 1 X 10⁵ células TC-1. Los 2 grupos restantes fueron los grupos control, uno de los cuales solo recibió 2 inoculaciones de células tumorales (TC-1) y el otro grupo no recibió tratamiento alguno (NEG.).

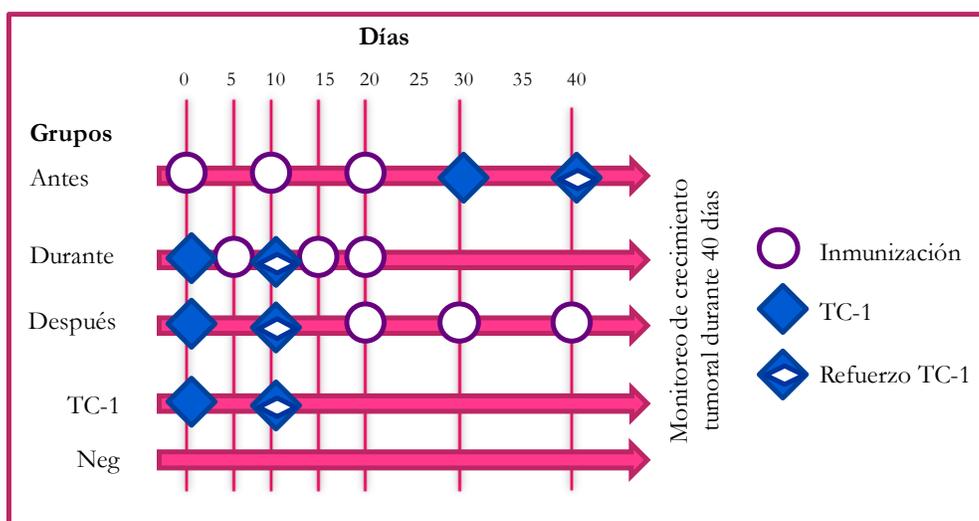


Tabla 5.2. Diseño del esquema de inmunizaciones e inoculación de células tumorales en el modelo tumoral de ratones C57BL/6.

Después de inocular las células tumorales, se monitorea el crecimiento tumoral en los grupos experimentales mediante mediciones cada tercer día. El volumen del tumor fue calculado tras medir el largo y ancho del tumor con ayuda de un vernier y aplicando la siguiente fórmula: $V = (R1 + R2^2)/2$, donde R1 y R2 fueron los valores obtenidos a partir de la medición perpendicular del tumor (Toledo 2010).

- Obtención de material biológico

Transcurridos 40 días de monitoreo de crecimiento tumoral se procedió a sacrificar a los ratones de cada uno de los grupos esto con el fin de extraer la sangre de dichos ratones lo cual se hizo cortando la vena axilar bajo anestesia, posteriormente la sangre obtenida fue centrifugada a 8000rpm durante 10 minutos para finalmente obtener el suero el cual fue

almacenado a -70°C para su uso posterior en los ensayos de detección de anticuerpos (ELISA).

Por último en caso de que el ratón presentara crecimiento tumoral se procedía a hacer la disección del tumor así como al pesado del mismo.

- Detección de anticuerpos

La detección de anticuerpos se realizó mediante la técnica de ELISA de la manera siguiente, las cVLP fueron disueltas en PBS a una concentración de $1\mu\text{g}/\text{ml}$. Enseguida se colocaron $100\mu\text{l}$ de las VLP-L1 y cVLP disueltas por triplicado para cada muestra en placas de 96 pozos fondo plano y se incubó una hora a 37°C , pasado este tiempo se incubó durante toda la noche en refrigeración a 4°C . Al día siguiente se realizaron 2 lavados con $300\mu\text{l}/\text{pozo}$ de TBS-Tween 20 al 0.1% y se cubrieron posteriormente con $200\mu\text{l}$ de solución bloqueadora compuesta por TBS-Tween 20 al 0.1% y 2% de albumina sérica bovina (BSA al 2%) y se incubó la placa durante 2 horas a 37°C . Transcurrido este tiempo los pozos fueron lavados 4 veces con $300\mu\text{l}$ de TBS-Tween 20 al 0.1% y enseguida se añadieron $100\mu\text{l}$ de anticuerpo primario (suero de los ratones usados en el reto tumoral) a una dilución de 1:100 diluido en BSA al 2% y se incubó por dos horas a 37°C . Después se lavó la placa 6 veces con $300\mu\text{l}/\text{pozo}$ de TBS-Tween 20 al 0.1% y se agregó el anticuerpo secundario. Para revelar la cantidad de anticuerpos presentes en los sueros de ratón que reconocieron las VLP-L1 ó cVLPs se utilizó el anticuerpo secundario goat anti-mouse acoplado a fosfatasa alcalina, diluido 1:5000 en BSA al 2% y se colocaron $100\mu\text{l}$ en cada pozo para dejar incubar por dos horas a 37°C . Pasadas las dos horas se lavó 8 veces con $300\mu\text{l}/\text{pozo}$ de TBS-Tween 20 al 0.1% y se adicionaron $100\mu\text{l}$ de una solución de 0.03gramos de sustrato de fosfatasa alcalina (Sigma USA), por cada 5ml de solución de Dietanolamina y se incubó una hora más a 37°C . La reactividad enzimática de la fosfatasa se determinó por la formación de un producto de color, el cual se detectó con un lector de placas de ELISA (Molecular Devices) a una longitud de onda de 405 nm.

- Detección de IL-10 en suero

La detección de IL-10 se realizó con ayuda de un Kit (Mouse IL-10 ELISA Development, Peprotech, USA) de acuerdo al siguiente procedimiento:

Preparación de la placa

El anticuerpo de captura se diluyó con PBS a una concentración de $2\mu\text{g}/\text{ml}$. Inmediatamente después, se agregaron $100\mu\text{L}$ de la dilución a cada pozo de una placa de 96 pozos fondo plano, se cubrió con aluminio y se incubó la placa toda la noche a temperatura ambiente.

Protocolo de ELISA

Al día siguiente se retiró el líquido y se lavó 4 veces la placa usando 300µL de solución de lavado (PBS al 1% de BSA + 0.05% Tween-20) por pozo, después del último lavado se retiró el líquido y se adicionaron 300µL de solución de bloqueo (PBS al 1% de BSA) y se incubó por una hora a temperatura ambiente.

Transcurrido ese tiempo se retiró el líquido para hacer 4 lavados con la solución de lavado. Se diluyó el estándar de IL-10 desde 3ng/ml hasta 0ng/ml en diluyente (PBS al 0.1% de BSA + 0.05% de Tween-20) y se añadieron 100µL de la dilución o de las muestras (diluidas 1:100 en diluyente) a cada pozo por triplicado, se incubó la placa por 2 horas a temperatura ambiente.

Pasadas las dos horas se lavó cuatro veces con buffer de lavado y se diluyó el anticuerpo de detección en diluyente a una concentración de 0.5µg/ml, se añadieron 100µL de la dilución por pozo para dejar incubar la placa por 2 horas a temperatura ambiente.

Se realizaron 4 lavados para después adicionar 100µL de Avidina-HRP a una concentración de 1:2000 en diluyente e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Finalmente, se realizaron 4 lavados más y se procedió a adicionar 100µL de la solución de sustrato a cada pozo y se incubó la placa a temperatura ambiente para permitir el desarrollo de color. El desarrollo de color fue monitoreado con ayuda de un lector de placas de ELISA a 405nm con una corrección de longitud de onda a 650nm.

- Estabilización de moléculas H-2D^b y H-2K^b con péptidos sintéticos.

En una placa de 96 pozos fondo “U” se colocaron 200,000 células RMA-S por pozo; esta línea celular es derivada de un linfoma RBL-5 de ratón con una deficiencia en TAP 2 lo cual provoca que se presenten más del 90% de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (H2-D^b y H2-K^b) de manera inestable en su membrana celular (Townsend *et al.*, 1989). La adición de péptidos específicos de manera exógena permite la estabilización de estas moléculas de acuerdo a su afinidad, por lo que estas células fueron incubadas durante 2 horas en presencia de diferentes concentraciones (0, 25, 50 o 100 µg/ml) de cada uno de los 8 péptidos presentes en la cVLP y un péptido control positivo (RAHYNIVTF) afín a la molécula H-2 D^b.

Después de la incubación con péptido se procedió a analizar la estabilización de moléculas H-2D^b y H-2K^b, para lo cual se agregaron 100 µL de sobrenadante de cultivo de hibridoma Y3 y se incubó durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente se centrifugó para retirar el sobrenadante y se añadió un anticuerpo secundario anti-mouse IgG (Fab)-FITC (Sigma) con el cual se incubaron las células por 15 minutos a 4°C. Al término de la incubación se volvió a centrifugar y retirar sobrenadante para añadir 200µL de PBS al 2% de SFB y 200µL de paraformaldehído

al 4%, por último se analizaron las células teñidas por citometría de flujo en un FACS Aria II (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany).

- Análisis estadístico

Los datos de volumen tumoral obtenidos durante el experimento fueron analizados con una prueba de ANDEVA seguida por una prueba de Tukey, se comparó cada uno de los grupos tratados con cVLP con y sin adyuvante de Freund y VLP-L1 con adyuvante de Freund realizados antes, durante y después de la inoculación de células tumorales contra el grupo control TC-1. La significancia fue determinada como $P < 0.05$.

6. Resultados

- Evaluación de la capacidad protectora de las cVLP y VLP-L1 ante el crecimiento tumoral en ratones C57BL/6.

Con la finalidad de analizar la capacidad de las partículas quiméricas tipo virales para proteger ante el crecimiento tumoral, éstas fueron aplicadas solas (con PBS) o en emulsión con adyuvante de Freund de acuerdo al esquema descrito (Tabla 5.2). Asimismo, se empleó un grupo de ratones control al cual se aplicaron VLP-L1 con adyuvante de Freund.

La inmunización antes del reto tumoral con las partículas cVLP solas o emulsionadas con adyuvante de Freund, fue capaz de brindar protección a 3 de 5 y 4 de 5 ratones respectivamente (Tabla 6.1), observándose un crecimiento tumoral promedio de 0.6cm^3 y 0.25cm^3 respectivamente. En contraste, en los grupos control de ratones inoculados únicamente con las células tumorales TC-1 ó en aquellos que previamente recibieron inmunización con la VLP-L1 y posteriormente fueron inoculados con células tumorales TC-1, en todos los casos (5 de 5 ratones) se observó crecimiento tumoral significativo. El tamaño tumoral promedio observado al final del experimento en estos grupos fue de 4 y 4.5cm^3 respectivamente (Fig. 6.1). Es importante mencionar que en estos grupos de tratamiento, la sobrevivencia a 37 días después de la inoculación de las células tumorales fue mayor a 80% (Figura 6.2).

	Grupo	Inmunogeno		Ratones sin tumor (%)
Inmunización	Antes	cVLP	Reto Tumoral	3/5 (60)
		cVLP+F		4/5 (80)
		VLP-L1+F		0/5 (0)
	Durante	cVLP		1/5 (20)
		cVLP+F		2/5 (40)
		VLP-L1+F		1/5 (20)
	Después	cVLP		1/5 (20)
		cVLP+F		0/5 (0)
		VLP-L1+F		0/5 (0)
	Control	TC-1		0/5 (0)

Tabla 6.1. Número de ratones con crecimiento tumoral de acuerdo al tratamiento con cVLP o VLP-L1 (VLP) recibido antes, durante o después del reto tumoral con células TC-1.

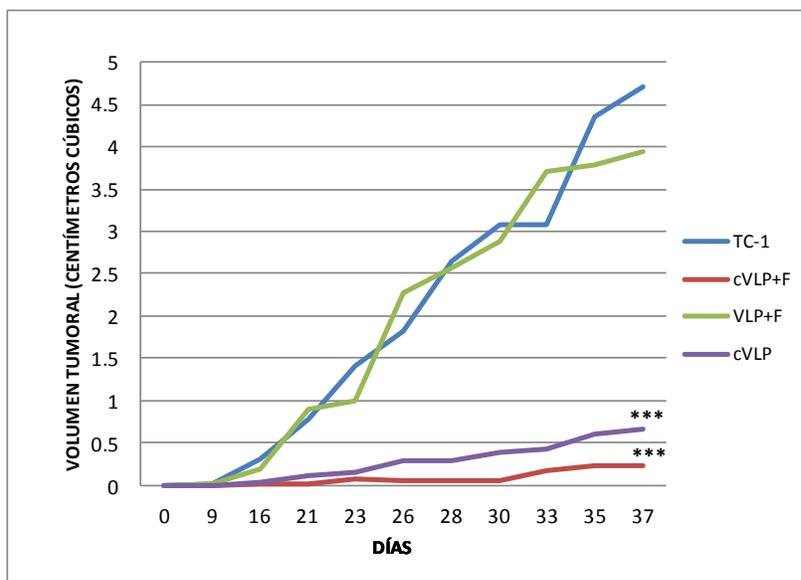


Fig. 6.1. Efecto protector de la inmunización con cVLP y VLP-L1 antes del reto tumoral. TC-1, grupo control que recibió solo células tumorales; cVLP + F, ratones inmunizados con cVLP+ adyuvante de Freund; VLP+F, ratones inmunizados con VLP-L1 + adyuvante de Freund; cVLP, ratones inmunizados con cVLP. cVLP + F y cVLP vs TC-1 *** P<0.001 (Prueba de ANDEVA seguida por una prueba de Tukey).

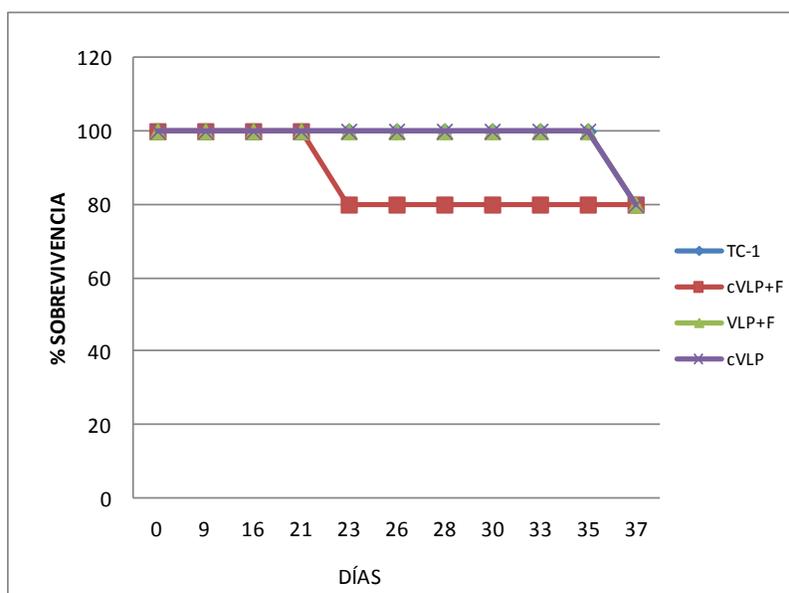


Fig. 6.2. Ratones C57BL/6 inmunizados con cVLP y VLP-L1 antes del reto tumoral muestran mayor sobrevivencia. TC-1, grupo control que recibió solo células tumorales; cVLP + F, ratones inmunizados con cVLP+ adyuvante de Freund; VLP+F, ratones inmunizados con VLP-L1 + adyuvante de Freund; cVLP, ratones inmunizados con cVLP.

- Evaluación de la capacidad terapéutica de cVLP y VLP-L1 en un modelo tumoral de ratón C57BL/6.

La inmunización durante el reto tumoral con las partículas cVLP solas o emulsionadas con adyuvante de Freund, fue capaz de brindar protección a 1 de 5 y 2 de 5 ratones respectivamente (Tabla 6.1). En este caso, el crecimiento tumoral promedio observado al final del experimento fue de 2.5 y 3.5 cm³ respectivamente. Mientras que el grupo control TC-1, en donde se observó crecimiento tumoral en todos los animales, se vio un crecimiento tumoral promedio de 4.5 cm³. El crecimiento tumoral de los ratones inmunizados con VLP-L1 fue muy similar al observado en ratones inmunizados con cVLP sin adyuvante de Freund. Cabe mencionar que el crecimiento tumoral en los ratones inmunizados con cVLP o cVLP+ adyuvante de Freund fue significativamente menor al observado en el grupo control TC-1 ($P < 0.05$ y $P < 0.01$ respectivamente) (Fig. 6.3).

Al analizar la sobrevivencia de los animales inmunizados con VLP-L1 + adyuvante de Freund mostró una sobrevivencia del 40% al final del experimento, mientras que en los grupos inmunizados con cVLP ó cVLP+ adyuvante de Freund la sobrevivencia fue de 80% después de 35 días de evaluación (Fig. 6.4).

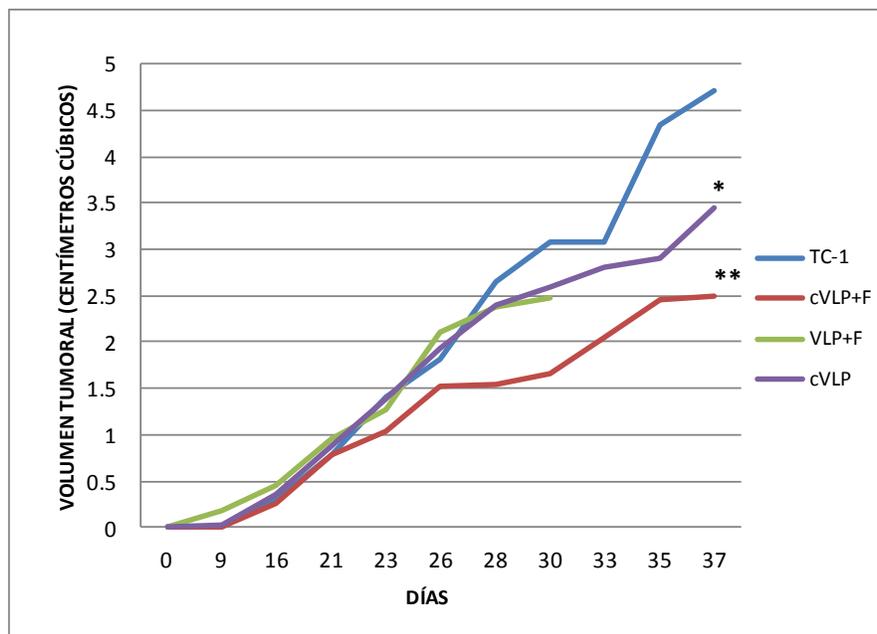


Fig. 6.3. Efecto terapéutico de la inmunización con cVLP en etapas tempranas del desarrollo tumoral (grupo durante). TC-1, grupo control que recibió solo células tumorales; cVLP + F, ratones inmunizados con cVLP+ adyuvante de Freund; VLP+F, ratones inmunizados con VLP-L1 + adyuvante de Freund; cVLP, ratones inmunizados con cVLP. cVLP + F y cVLP vs TC-1 ** $P < 0.01$ y * $P < 0.05$ respectivamente (Prueba de ANDEVA seguida por una prueba de Tukey).

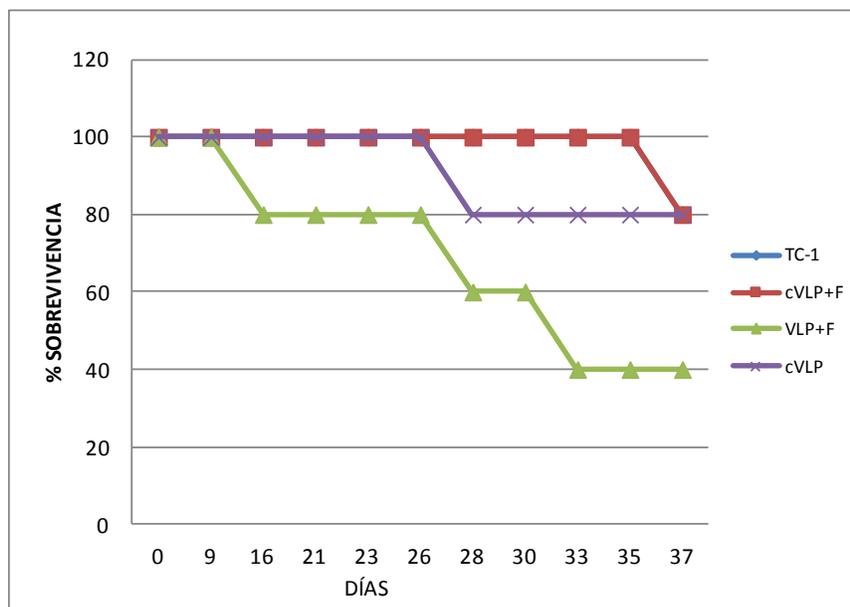


Fig. 6.4. La inmunización con cVLP incrementa la sobrevivencia al inmunizar durante el reto tumoral. TC-1, grupo control que recibió solo células tumorales; cVLP + F, ratones inmunizados con cVLP+ adyuvante de Freund; VLP+F, ratones inmunizados con VLP-L1 + adyuvante de Freund; cVLP, ratones inmunizados con cVLP.

Por otra parte, la inmunización con la partícula cVLP después del reto tumoral fue capaz de brindar protección en sólo 1 de 5 ratones, mientras que la inmunización con cVLP+ adyuvante de Freund y VLP-L1 no produjo protección alguna (Tabla 6.1). En este caso, el crecimiento tumoral promedio observado al final del experimento fue de 4.5 y 4.5 cm³ en los ratones del grupo control TC-1 y del grupo inmunizado con VLP-L1 + adyuvante de Freund respectivamente. De manera interesante, el grupo inmunizado con cVLP sin adyuvante, mostró el menor crecimiento tumoral promedio con un volumen de 2cm³, mientras que en aquellos que recibieron cVLP+ adyuvante Freund, el crecimiento tumoral superó de manera significativa al observado en el grupo control de TC-1 con un volumen total promedio de 6cm³ (Fig. 6.5). Este grupo de tratamiento fue el que registró el menor porcentaje de sobrevivencia (20%) después de 37 días, seguido por el grupo tratado con VLP-L1 (40%). En este caso, los ratones tratados con cVLP solas mantuvieron una sobrevivencia de 80% al final del experimento (Fig. 6.6).

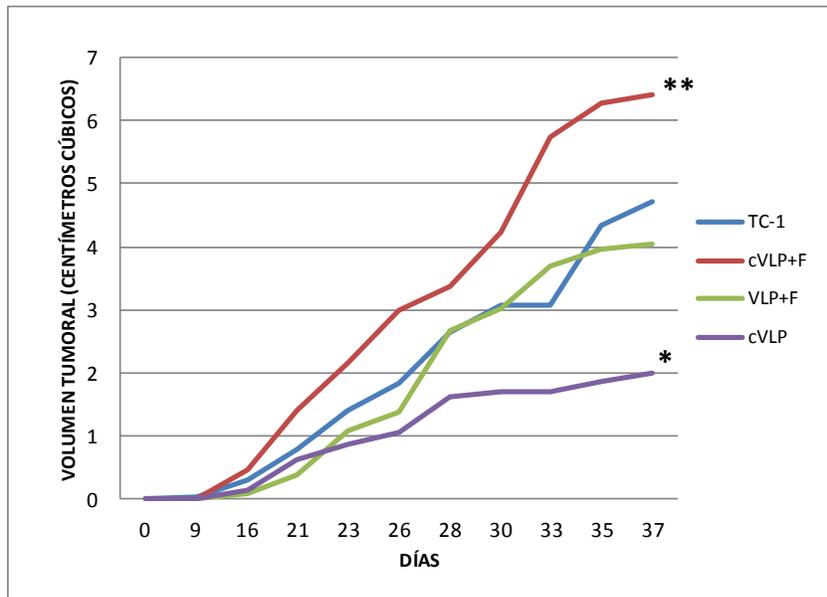


Fig. 6.5. La inmunización con cVLP muestra un efecto terapéutico en tumores ya establecidos (grupo después). TC-1, grupo control que recibió solo células tumorales; cVLP + F, ratones inmunizados con cVLP+ adyuvante de Freund; VLP+F, ratones inmunizados con VLP-L1 + adyuvante de Freund; cVLP, ratones inmunizados con cVLP. cVLP + F y cVLP vs TC-1 ** P<0.01 y *P<0.05 respectivamente (Prueba de ANDEVA seguida por una prueba de Tukey).

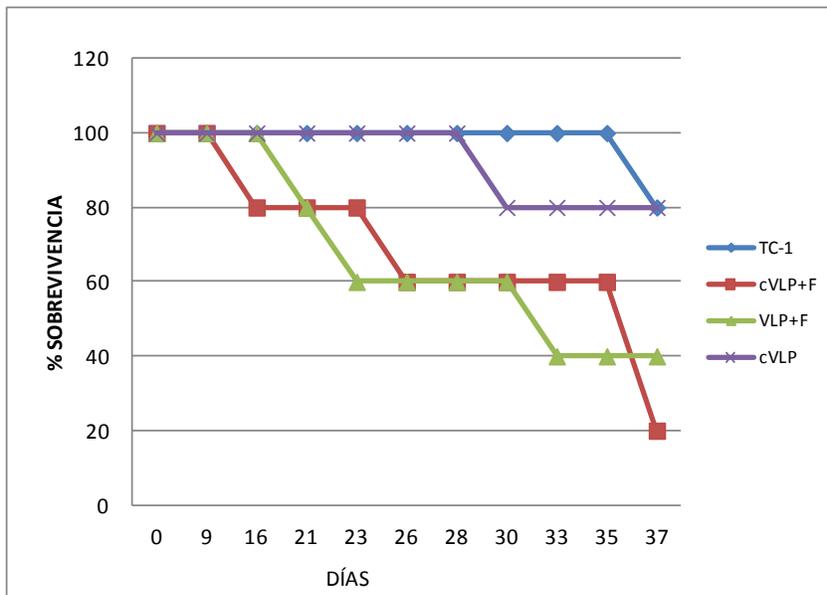


Fig. 6.6. Ratones inmunizados con cVLP sin adyuvante de Freund muestran mayor sobrevivencia. TC-1, grupo control que recibió solo células tumorales; cVLP + F, ratones inmunizados con cVLP+ adyuvante de Freund; VLP+F, ratones inmunizados con VLP-L1 + adyuvante de Freund; cVLP, ratones inmunizados con cVLP.

- Peso tumoral

Con la finalidad de comparar el peso de los tumores desarrollados por los ratones de cada grupo de tratamientos para determinar el papel de las cVLP y VLP-L1 en la protección contra crecimiento tumoral, así como su capacidad terapéutica, se procedió a disectar el tumor de los ratones en los diferentes casos al finalizar los experimentos. De manera interesante se observó que los grupos de ratones que recibieron tratamiento con cVLP ó cVLP+ adyuvante de Freund antes del reto tumoral mostraron un peso promedio de $1.2 \pm 0.1g$ y $0.5 \pm 0.4g$ respectivamente, el cual fue significativamente menor al de los ratones control TC-1 cuyo peso promedio fue de $5 \pm 0.8g$. En contraste, los ratones que recibieron tratamiento con VLP-L1 + adyuvante de Freund mostraron un peso promedio de $3.8 \pm 0.1g$ (Fig. 6.7). En el caso de los ratones que fueron tratados con las VLPs durante el reto tumoral, se obtuvo un peso tumoral muy similar entre los diferentes tratamientos, el peso observado con cVLP y cVLP+ adyuvante de Freund fue de $4.2 \pm 0.7g$ y $3.9 \pm 0.6g$ respectivamente, mientras que el tratamiento con VLP-L1 + adyuvante de Freund produjo un peso de $3.1 \pm 1g$, en ninguno de los casos se observó una reducción significativa del peso tumoral respecto al grupo control TC-1 (Fig. 6.7). Por otro lado, los ratones que recibieron tratamiento con VLPs después del reto tumoral, mostraron un peso tumoral muy similar al del grupo control TC-1, los ratones que recibieron VLP-L1 + adyuvante de Freund mostraron un peso tumoral promedio de $3.9 \pm 0.7g$, mientras que aquellos que fueron tratados con cVLP el peso promedio fue de $4.6 \pm 0.8g$. Es importante destacar que el grupo de ratones que recibió inmunización con cVLP+ adyuvante de Freund desarrolló tumores con peso promedio de $6 \pm 0.5g$, lo cual también correspondió al grupo de ratones que mostró el mayor crecimiento tumoral y la menor sobrevivencia (Figs. 6.5-6.7).

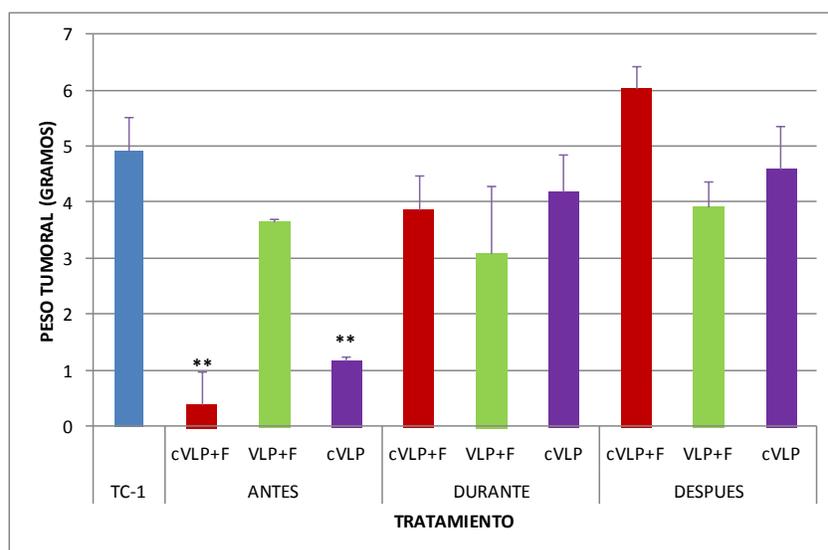


Fig. 6.7. El efecto profiláctico (grupo antes) y terapéutico (Durante y Después) de la cVLP permite un menor peso tumoral en los ratones tratados. TC-1, grupo de ratones control que sólo recibió células tumorales; cVLP + F, ratones inmunizados con cVLP+ adyuvante de Freund; VLP+F, ratones inmunizados con VLP-L1 + adyuvante de Freund; cVLP, ratones inmunizados con cVLP. ** P<0.01 (Prueba de ANDEVA seguida por una prueba de Tukey).

- Detección de anticuerpos en sueros de ratones inmunizados con cVLP y VLP-L1 antes, durante y después del reto tumoral.

Transcurridos los 40 días de monitoreo de crecimiento tumoral se procedió a sacrificar a los ratones mediante exanguinación axilar, la sangre obtenida fue utilizada para determinar la presencia de anticuerpos IgA, IgM e IgG anti VLPs. Las mayores cantidades de anticuerpos específicos hacia las VLPs fueron detectadas en los grupos de ratones inmunizados antes del reto tumoral, particularmente aquellos que recibieron inmunizaciones con VLPs en presencia de adyuvante de Freund, como fue el caso de VLP-L1 + Adyuvante de Freund cuya densidad óptica (D.O) observada fue de 6.7 y de cVLP+ adyuvante de Freund con D.O de 0.85; mientras que los ratones inmunizados con las cVLPs solas indujeron una menor producción de anticuerpos, con una D.O de 0.3 (Fig. 6.8). Cabe mencionar que el suero obtenido del grupo de ratones control TC-1 y del grupo de ratones sin inmunizar (NEG.) no presentaron anticuerpos específicos a las VLPs utilizadas en los tratamientos. En el caso de los ratones que fueron inmunizados con las VLPs de manera simultánea al reto tumoral, de igual manera mostraron cantidades importantes de anticuerpos específicos a las VLPs cuando éstas fueron inoculadas en presencia de adyuvante de Freund, obteniéndose 0.45 y 0.55 de O.D en los ratones inmunizados con cVLP+ adyuvante de Freund y VLP-L1 + adyuvante de Freund respectivamente; mientras que la cVLP sin adyuvante indujo una menor cantidad de anticuerpos, 0.1 de D.O (Fig. 6.8). En el grupo de ratones inmunizados después del reto tumoral únicamente se pudo determinar anticuerpos en el grupo de ratones inmunizados con cVLP sin adyuvante, encontrándose 0.4 de D.O, en los grupos inmunizados con VLP-L1 + Freund y cVLP + Freund no se pudo realizar la determinación por que las muestras fueron extraviadas (Fig. 6.8).

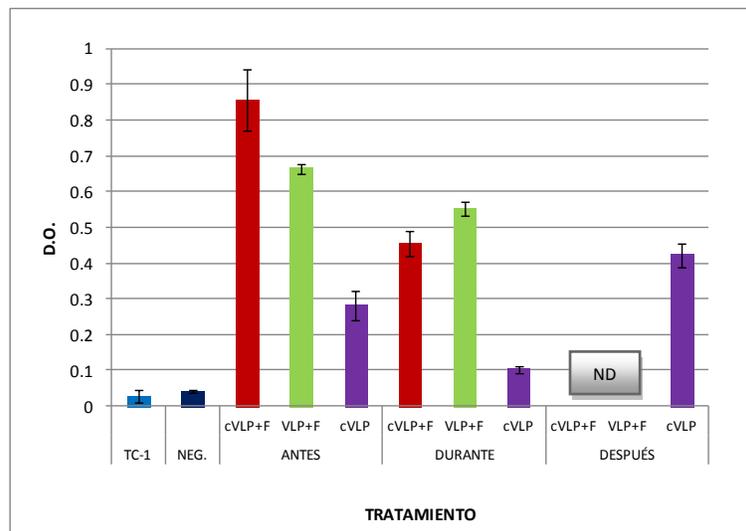


Fig. 6.8. Detección de anticuerpos en sueros de ratones inmunizados con cVLP correlaciona con un mejor efecto profiláctico y terapéutico. TC-1, grupo control con solo células tumorales; NEG., grupo control sin tratamiento; cVLP + F, ratones inmunizados con cVLP+ adyuvante de Freund; VLP+F, ratones inmunizados con VLP-L1 + adyuvante de Freund; cVLP, ratones inmunizados con cVLP.

- Análisis de la producción de IL-10 en sueros de ratones inmunizados con cVLP y VLP-L1 antes, durante y después del reto tumoral.

Con la finalidad de analizar si un mayor crecimiento tumoral se relacionaba con un incremento en la producción de Interleucina 10 (IL-10), conocida citocina inmunosupresora, se procedió a realizar la detección de dicha citocina en el suero de los ratones utilizados en el experimento de reto tumoral. Para lo cual se encontró como se esperaba, que en aquellos grupos con mayor crecimiento tumoral había una mayor concentración de la citocina en suero.

En el grupo con menor crecimiento tumoral, que correspondió al inmunizado antes de la inoculación de células tumorales, la inmunización con cVLP+ adyuvante de Freund mantuvo la concentración sérica basal de IL-10 semejante a la detectada en el grupo NEG. No obstante, el grupo de ratones inmunizados con cVLP sin adyuvante al igual que los ratones inmunizados con VLP-L1 + adyuvante de Freund mostraron cantidades importantes de IL-10 en suero con 505 y 1125pg/ml respectivamente, mientras que en los ratones control TC-1, la cantidad detectada fue de 568pg/ml (Fig. 6.9). En el grupo de ratones inmunizados durante el reto tumoral, únicamente se detectó IL-10 sérica en los ratones inmunizados con VLP más adyuvante de Freund con aproximadamente 100pg/ml. Sin embargo, en los ratones que fueron inmunizados después del reto tumoral, los ratones inmunizados con VLPs más adyuvante fueron quienes presentaron altas cantidades de IL-10 en suero, en este caso el grupo de ratones inmunizados con cVLP+ adyuvante de Freund tuvieron 1358pg/ml, mientras que en el grupo de ratones inmunizados con VLP-L1 + adyuvante de Freund el contenido de IL-10 fue de 1125pg/ml. Los ratones inmunizados con cVLP sin adyuvante mostraron cantidades de IL-10 similares al grupo NEG (Fig. 6.9).

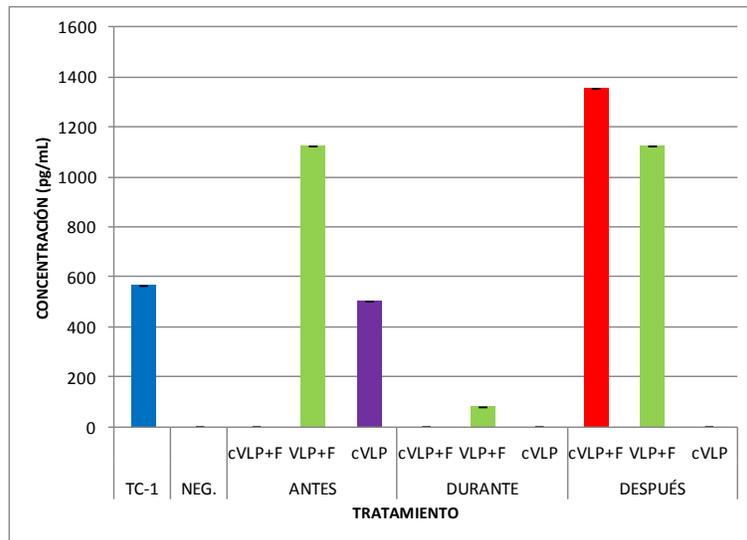


Fig. 6.9. Mayor detección de Interleucina 10 en sueros de ratones inmunizados con cVLP que mostraron mayor crecimiento tumoral. TC-1, grupo control con solo células tumorales; NEG., grupo control sin tratamiento; cVLP + F, ratones inmunizados con cVLP+ adyuvante de Freund; VLP+F, ratones inmunizados con VLP-L1 + adyuvante de Freund; cVLP, ratones inmunizados con cVLP.

Estabilización de moléculas H2-D^b y H2-K^b con epítopes de E6 y E7 contenidos en la cVLP.

En estudios hechos en ratones, se ha demostrado que la inmunogenicidad de epítopes derivados de proteínas oncogénicas E6 y E7 de HPV-16, va directamente asociada con la afinidad que éstos tienen hacia las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (Feltkamp *et al.*, 1993), lo que ha permitido que estos epítopes sean incluidos en diversas vacunas terapéuticas para eliminar tumores inducidos en ratones empleando con células tumorales que expresan a dichas oncoproteínas (Greenstone *et al.*, 1998; Peng *et al.*, 1998; Schäfer *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2000; Bian *et al.*, 2008; Wick *et al.*, 2011; Barrios *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2012). Puesto que la partícula cVLP utilizada en el presente estudio contiene epítopes de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 con afinidad hacia alelos HLA-A y B de mayor frecuencia en la población Mexicana, se decidió analizar si éstos al tener afinidad para los alelos H-2D^b y H-2K^b de la cepa de ratón C57BL/6, utilizada en el presente estudio, podrían ser candidatos de conferir el efecto inmunogénico observado en la reducción de crecimiento y tamaño tumoral de los ratones inmunizados con la cVLP. Para el análisis de afinidad de los péptidos a las moléculas H-2D^b y H-2K^b, se emplearon dos epítopes inmunodominantes conocidos por su alta afinidad de unión a dichas moléculas, el péptido RAHYNIVTF de la proteína E7 de HPV-16 y el péptido ICWGNQLFV de la proteína L1 de HPV-16. Como puede apreciarse, el péptido contenido en la proteína de fusión que constituye a la cVLP y que mostró mayor afinidad a las moléculas H-2D^b y H-2K^b fue el péptido KLPHLCTEL de la proteína E6 de HPV-16 (Fig. 6.10 y 6.11).

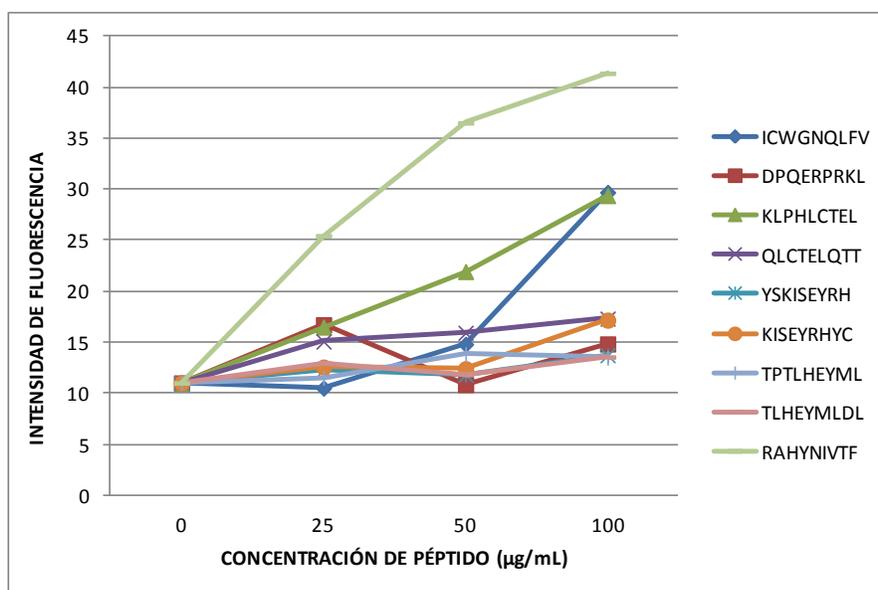


Fig. 6.10. Estabilización de moléculas H-2D^b con epítopes de E6 y E7 contenidos en la cVLP. Péptidos sintéticos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 contenidos en la cVLP (Tabla 5.1) fueron incubados con células RMA-S en concentraciones crecientes y su capacidad para estabilizar el alelo H-2Db fue evaluado mediante citometría de flujo empleando el anticuerpo B22.249.1 que reconoce a la molécula de manera conformacional. Los péptidos RAHYNIVTF de la proteína E7 de HPV-16 e ICWGNQLFV de la proteína L1 de HPV-16 fueron utilizados como controles positivos de afinidad.

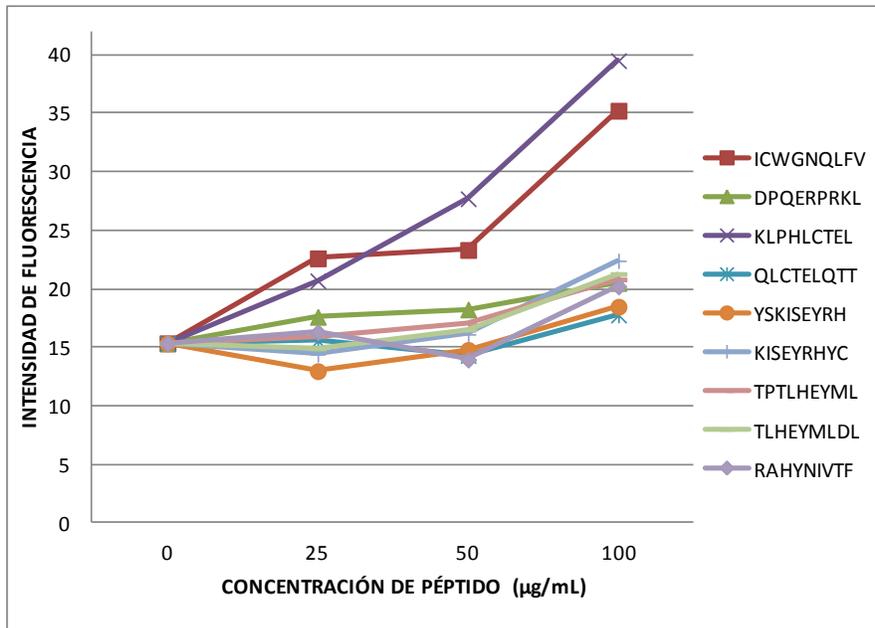


Fig. 6.11. Estabilización de moléculas H-2K^b con epítopes de E6 y E7 contenidos en la cVLP. Péptidos sintéticos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 contenidos en la cVLP (Tabla 5.1) fueron incubados con células RMA-S en concentraciones crecientes y su capacidad para estabilizar el alelo H-2K^b fue evaluado mediante citometría de flujo empujando el anticuerpo Y3 que reconoce a la molécula de manera conformacional. Los péptidos RAHYNIVTF de la proteína E7 de HPV-16 e ICWGNQLFV de la proteína L1 de HPV-16 fueron utilizados como controles positivos de afinidad.

7. Discusión y Análisis de Resultados

En la última década, la generación de VLPs, constituidas por las proteínas L1 y L2 de la cápside viral, abrió la posibilidad de usarlas como vacunas preventivas contra infecciones producidas por HPVs de alto riesgo como es el caso de HPV-16 y 18 que se asocian en un alto porcentaje (más del 70%) con el desarrollo de CaCu, debido a que estas partículas sintéticas son estructuras no infecciosas, no replicables, que mimetizan al virus natural y son efectivas en la inducción de anticuerpos específicos con actividad neutralizante que protegen eficientemente contra la infección natural por estos tipos virales (Joura *et al.*, 2007; Joura *et al.*, 2008). Sin embargo, las mujeres que mantienen una infección persistente por HPVs de alto riesgo, están en riesgo de desarrollar cáncer debido a que la presencia de las proteínas E6 y E7 de estos virus es necesaria para inducir transformación en las células infectadas. En consecuencia, resulta relevante producir vacunas terapéuticas que incluyan inmunógenos derivados de las proteínas E6 y E7 con la finalidad de estimular una respuesta inmune celular que garantice la eliminación de las células infectadas y las células tumorales que expresen a estas oncoproteínas. Por consiguiente ha sido necesario producir VLPs que además de contener a las proteínas L1y/o L2 de la cápside viral también contengan epítopes o determinantes antigénicos de las oncoproteínas E6 y E7 de los HPVs de alto riesgo, estas VLPs han sido denominadas cVLPs (Tindle 2002; Cid 2009).

Tomando en consideración lo anterior, el presente estudio tuvo como finalidad la de analizar la capacidad protectora y terapéutica de una novedosa cVLP generada por nuestro grupo de investigación en colaboración con el CINVESTAV Irapuato. Esta cVLP está constituida por varias unidades de una proteína de fusión compuesta por la proteína L1 de HPV-16 unida a 8 epítopes de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 que previamente hemos identificado para unirse a los alelos HLA-A2 y -B35, de alta frecuencia en la población Mexicana, que inducen activación y actividad citotóxica de linfocitos T de pacientes con CaCu que presentan dichos alelos de histocompatibilidad (Monroy *et al.*, 2007). La cVLP es sintetizada en plantas de *Nicotiana benthamiana* e inicialmente nuestro grupo de trabajo ha evaluado su inmunogenicidad en ratones de las cepas C57BL/6 y Balb/c para inducir altos títulos de anticuerpos con actividad neutralizante (Osorio 2011), además de proteger a los ratones ante el reto tumoral con células TC-1 al inmunizar con 5µg de cVLP en presencia de adyuvante de Freund (Castellanos 2010). Actualmente nuestro grupo de trabajo está interesado en conocer la inmunogenicidad de las partículas con el objetivo de evaluar su posible aplicación en humanos. Es por ello que en el presente trabajo, se empleó un modelo tumoral de ratones de la cepa C57BL/6 a los cuales se les aplicaron 3 dosis de 10µg de cVLP en presencia y ausencia de adyuvante de Freund. Como control experimental se empleó una VLP constituida únicamente por la proteína L1 de HPV-16 (VLP-L1) la cual fue emulsionada con adyuvante de Freund. La aplicación de las VLPs se realizó antes, durante y después de la inoculación de células tumorales TC-1, la cual corresponde a una línea celular parental a la cepa C57BL/6 transfectada con las proteínas E6 y E7 de HPV 16 y el oncogen *ras*.

Cabe mencionar que las VLPs inducen respuesta inmune de manera similar cuando son aplicadas en ausencia o presencia de adyuvantes, sin embargo, se ha visto que el empleo de éstos es importante para prolongar la respuesta inmune del hospedero (Suzich *et al.*, 1995; Jagu *et al.*, 2010). Aunque el adyuvante de Freund no está autorizado por la FDA para su aplicación en humanos, en nuestro modelo tumoral de ratón fue utilizado con la finalidad de conocer la inmunogenicidad de las cVLPs en ausencia y presencia de éste.

De los resultados obtenidos en el presente trabajo al aplicar las cVLPs en el modelo tumoral de ratones C57BL/6 se destacan los siguientes hallazgos: 1.- La aplicación de las cVLPs en presencia y ausencia de adyuvante de Freund antes del reto tumoral, fue capaz de brindar una importante protección contra el crecimiento tumoral en comparación con el grupo control TC-1 y con aquellos inmunizados con VLP-L1. 2.- La aplicación de las cVLPs en ausencia y presencia de adyuvante de Freund durante el reto tumoral mostró una actividad terapéutica del 30 y 50% aproximadamente. 3.- La aplicación de cVLPs sin adyuvante de Freund después del reto tumoral, mantuvo un efecto terapéutico cercano al 50%, mientras que la aplicación concomitante de cVLP con adyuvante favoreció el crecimiento tumoral. 4.- La actividad protectora y/o terapéutica de las cVLPs fue más eficiente cuando la inmunización de las partículas se realizó antes o durante el reto tumoral, lo cual se vio reflejado en una mayor sobrevivencia de los animales tratados, una menor carga tumoral y una menor supresión inmune reflejada por los niveles de IL-10 sérica.

Diversos estudios realizados en modelos murinos inmunizados con cVLPs han mostrado protección inmune contra el desarrollo de tumores, sobre todo cuando éstas se aplican antes del reto tumoral (Greenstone *et al.*, 1998; Van der Burg *et al.*, 2001; Paz de la Rosa *et al.*, 2009). En estos estudios, la dosis de antígeno utilizada, así como el número de inmunizaciones y el uso de adyuvante ha sido muy variable. Por ejemplo, Paz de la Rosa *et al.*, 2009 empleó 3 dosis de 5µg de cVLP con adyuvante de Freund; Greenstone *et al.*, 1998 empleó una sola dosis de 10µg cVLP L1L2E7 sin adyuvante; Van der Burg *et al.*, 2001 empleó una sola dosis de cVLP de 32 o 200µg con adyuvante y observa protección total con la dosis de 200µg. En nuestro caso particular el uso de 3 dosis de 10µg de cVLPs tanto en presencia como en ausencia de adyuvante de Freund fue casi completamente efectiva en proteger a los ratones ante el crecimiento tumoral cuando la inmunización se realizó antes del reto tumoral, obteniéndose más del 90% en la protección del crecimiento tumoral en comparación al grupo control, sugiriendo un importante potencial en la protección ante el desarrollo de tumores inducidos por la infección por HPV-16. En lo que respecta al crecimiento tumoral en grupos inmunizados con cVLP sin adyuvante durante el reto se encontró que este era significativamente menor que en el grupo TC-1, incluso se registraron 2 regresiones en los primeros días en el grupo inmunizado con cVLP más Freund (tamaño 1mm) y una regresión más en el grupo inmunizado con cVLP sola (tamaño 4mm). Por otro lado, es importante mencionar que la aplicación de las cVLPs con o sin adyuvante también fue capaz de inducir un importante efecto terapéutico en este modelo de ratón, reduciendo la carga tumoral hasta un 50% cuando los animales fueron inoculados en presencia de adyuvante (durante el reto

tumoral) o sin adyuvante (después del reto tumoral). Este mismo efecto lo hemos observado previamente al utilizar una cVLP diferente en su composición de epítopes de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 a la utilizada en el presente trabajo, de hecho la anterior cVLP contiene el epítopo RAHYNIVTF derivado de la proteína E7 de HPV-16, el cual tiene alta especificidad para el alelo H-2Db propio de la cepa de ratones C57BL/6 (Feltkamp *et al.*, 1993) y ha sido incluido en diversas vacunas evaluadas en modelo tumoral de ratón (Greenstone *et al.*, 1998; Peng *et al.*, 1998; Schäfer *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2000; Bian *et al.*, 2008; Wick *et al.*, 2011; Barrios *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2012). En consecuencia es posible que epítopes diferentes al péptido RAHYNIVTF, contenidos en la cVLP utilizada en el presente estudio, puedan conferir la inmunogenicidad y protección antitumoral observada en nuestros resultados. Un posible epítopo pudiera ser el péptido KLPHLCTEL de la proteína E6 de HPV-16 debido a su alta afinidad a las moléculas H-2Db y H-2Kb como se mostró en el análisis de estabilidad realizado al incubar células RMA-S con diferentes concentraciones de péptido realizado en este trabajo, no obstante será necesario designar estudios específicos de inmunogenicidad de este epítopo así como de reconocimiento específico por linfocitos T citotóxicos para corroborar su efectividad.

Por otra parte, al inmunizar con cVLP emulsionada con adyuvante de Freund después del reto no se encontraron diferencias significativas favorecedoras debido a que este grupo tuvo un crecimiento significativamente mayor al del grupo control, lo cual pudo deberse a la inducción de tolerancia, ya que se ha reportado que bajo ciertas condiciones la inmunización con péptidos lejos de favorecer una respuesta inmune que ayude a eliminar tumores, induce tolerancia permitiendo que el crecimiento de los tumores sea aún mayor, esto a pesar de que el péptido sea inoculado por la misma vía y en la misma dosis, en dicho reporte la única diferencia fue el uso o no de adyuvante de Freund (Toes *et al.*, 1996). En este caso los ratones después del reto tumoral pueden ya estar en un estado de inmunosupresión y el hecho de inmunizar con un antígeno acompañado de un adyuvante el cual puede producir efectos inflamatorios adversos, hace que la inmunosupresión sea aún mayor. En contraste con esto al utilizar la cVLP sin adyuvante se logró que el crecimiento fuera menor que el del grupo control, lo cual concuerda con lo reportado por Christensen quien dice que las VLPs pueden tener cierta ventaja en generar respuesta de linfocitos T citotóxicos en situaciones donde la exposición crónica a un antígeno en ausencia de co-estimulo resulta en la tolerancia y agotamiento de las células Th (Christensen *et al.*, 1994), que podría ser el caso de los ratones inmunizados después del reto tumoral, además este reporte apoyaría lo visto al inmunizar con cVLP+F ya que en estos ratones ya existía una exposición crónica a antígenos tumorales por lo que el hecho de introducir más antígeno acompañado de un adyuvante pudo haber provocado tolerancia y agotamiento de células T. Otra posible explicación a lo observado podría surgir del reporte hecho por Da Silva en el 2001 en el que se menciona que la presencia de anticuerpos neutralizantes previos a una segunda dosis de cVLP evita que haya una respuesta inmune adecuada capaz de proteger a los ratones ante el reto tumoral (Da Silva *et al.*, 2001), en nuestro experimento utilizamos tres dosis de cVLP lo cual pudo haber disminuido la eficiencia de las partículas tanto para su actividad profiláctica como terapéutica. Sin embargo hacen falta más estudios para conocer lo que sucedió realmente en estos ratones que permitió un mayor crecimiento tumoral.

Otro aspecto importante observado en este estudio fue la capacidad de estas partículas para inducir anticuerpos específicos aún en presencia del crecimiento tumoral. Aunque las mayores cantidades de anticuerpos fueron encontradas cuando se aplicaron las cVLPs en presencia o ausencia de adyuvante de Freund antes del reto tumoral, también se lograron detectar cantidades importantes de anticuerpos durante y aún después del reto tumoral. Será importante conocer si estos anticuerpos son capaces de reconocer de manera conformacional a las VLPs y tener actividad neutralizante, o si son dirigidos hacia epítopes lineales contenidos en la secuencia protéica de las cVLPs. En un estudio previo hemos encontrado que sueros de pacientes con lesiones de bajo grado e incluso con cáncer avanzado generan anticuerpos específicos a cVLPs con capacidad neutralizante, además de reconocer epítopes de las proteínas E6 y E7 contenidos en la porción quimérica de las cVLPs (Monroy *et al.*, 2011). Asimismo, recientemente se ha sugerido que la presencia de anticuerpos neutralizantes a VLPs en el huésped pueden bloquear la efectividad de cVLPs durante el tratamiento debido a que éstos bloquean la toma del antígeno por las células dendríticas para ser procesado e inducir una respuesta inmune eficiente (Toes *et al.*, 1996; Da Silva *et al.*, 2001), lo cual será importante analizar en estudios posteriores, para ver si ello interfiere en una mayor efectividad terapéutica de estas cVLPs.

Por otro lado, en nuestro estudio también se encontró que en los ratones que recibieron tratamiento con cVLPs más adyuvante durante o después de la inducción de tumores, mostraron el mayor crecimiento tumoral, asociado con cantidades incrementadas de IL-10. Se tiene bien conocido que el establecimiento de un tumor y su crecimiento está asociado con el fenómeno de tolerancia inmune, en donde la producción de factores inmunosupresores como IL-10 se encuentra incrementado y de manera inversa la producción de factores proinflamatorios tales como IL-12, TNF, IL-1, MDC, IL-8 (Christensen *et al.*, 1994; Moore *et al.*, 2001). Asimismo el reclutamiento de diversas células inmunosupresoras en el microambiente tumoral también puede condicionar a la supresión de la respuesta inmune antitumoral (Kaufmann *et al.*, 2001; Rudolf *et al.*, 2001; Kaufmann *et al.*, 2007), de tal suerte que la presencia del antígeno y de adyuvante pudieran favorecer el desarrollo de células supresoras que a su vez favorecen el crecimiento de tumor (Visser *et al.*, 2007; Molling *et al.*, 2007; Nakamura *et al.*, 2007; Piersma *et al.*, 2007; Welters *et al.*, 2008).

Con lo anterior podemos decir que la inmunización con 3 dosis de cVLP en presencia o ausencia de adyuvante de Freund resulta efectiva si es aplicada antes de un reto tumoral siendo capaz de inducir una respuesta inmune adecuada que impide el crecimiento de células tumorales. Sin embargo, será necesario realizar más estudios para determinar si una sola dosis más alta de cVLP es aún más efectiva para prevenir el desarrollo tumoral en etapas más avanzadas (grupos durante y después). El efecto protector de las cVLPs indica que estas podrían ser buenas candidatas para ser aplicadas como vacuna a mujeres jóvenes que no han tenido contacto con el virus y estas partículas a diferencia de las vacunas actuales contra HPV también podrían ser aplicadas a mujeres con lesiones precancerosas de bajo grado ya que de acuerdo con nuestros resultados, las cVLPs en los primeros días del desarrollo tumoral logran

revertir y disminuir el crecimiento tumoral. Otro beneficio de las cVLPs en comparación con las vacunas comerciales es el costo, ya que la producción de éstas resulta más eficiente y de menor costo que la producción de las vacunas actuales con lo que se facilitaría la accesibilidad en países subdesarrollados logrando así la vacunación de más mujeres con un menor presupuesto. A pesar de que hacen falta más estudios para seguir probando la efectividad y seguridad de esta cVLP, los resultados arrojados por este trabajo son alentadores para poder proponer estas partículas como posible vacuna con actividad profiláctica y terapéutica.

8. Conclusiones

De acuerdo a los resultados arrojados por este estudio podemos decir que:

- 1) Las cVLPs con y sin adyuvante muestran un efecto protector en aquellos ratones inmunizados antes del reto tumoral.
- 2) La cVLP mostró tener efecto terapéutico al reducir en un 50% el crecimiento tumoral en grupos inmunizados durante (cVLP con y sin adyuvante) y después (cVLP sin adyuvante) del reto tumoral.
- 3) Al inmunizar durante el reto tumoral las cVLPs tienen un efecto terapéutico observándose regresiones tumorales en los primeros días de iniciado el crecimiento tumoral.
- 4) El efecto protector de las cVLP se vio reflejado en una mayor sobrevivencia y un peso tumoral significativamente menor comparado con los grupos inmunizados durante y después del reto tumoral.
- 5) La inmunización con cVLP generó anticuerpos anti cVLP en todos los grupos, sobre todo en los grupos inmunizados con cVLP antes del reto tumoral, seguidos por los grupos durante y después.
- 6) En los grupos inmunizados después del reto tumoral los cuales mostraron el mayor crecimiento tumoral fue posible detectar una mayor concentración de IL-10 lo que podría explicar en parte la ineficiencia de la cVLP en este grupo.
- 7) El péptido KLPHLCTEL podría ser el epítipo que permite a la cVLP tener un efecto terapéutico.

9. Perspectivas

Con lo observado en el presente estudio se sugiere:

- Inmunizar con cVLP a dosis más altas y en una dosis única con el fin de ver si la protección y el efecto terapéutico incrementa. De esta manera se podrían evitar los efectos que tuvo al utilizarse en tumores bien establecidos, evitando así generar tolerancia hacia los antígenos.
- Evaluar la presencia de linfocitos T CD8+ infiltrados en el tumor para corroborar que un menor crecimiento tumoral se deba a una mayor infiltración de células T.
- Evaluar la actividad citotóxica de linfocitos T para ver si existen diferencias en la funcionalidad de los mismos, entre los grupos inmunizados con la cVLP antes, durante o después del reto tumoral.
- Hacer ensayos de citotoxicidad retando linfocitos de ratones inmunizados con la cVLP contra células RMA-S cargadas con cada uno de los péptidos contenidos dentro de la cVLP para conocer si existe una mayor respuesta contra el péptido KLPHLCTEL.
- Inmunizar ratones de la cepa C57BL/6 con cada uno de los péptidos de la cVLP para ver si el péptido KLPHLCTEL por si solo protege ante el reto tumoral.

10. Bibliografía

- Baay M, Duk J, Burger M, *et al.* 1999. Humoral immune response against proteins E6 and E7 in cervical carcinoma patients positive for human papilloma virus type 16 during treatment and follow-up. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 18: 126-132.
- Barrios K, Celis E. 2012. TriVax-HPV: an improved peptide-based therapeutic vaccination strategy against human papillomavirus-induced cancers. *Cancer Immunol Immunother.* 61: 1307-1317.
- Baseman J and Koutsky L. 2005. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol.* 32: 16–24.
- Bian T, Wang Y, Lu Z, *et al.* 2008. Human papillomavirus type 16 L1E7 chimeric capsomeres have prophylactic and therapeutic efficacy against papillomavirus in mice. *Mol Cancer Ther* 7:1329-1335.
- Black A and Ogg G. 2003. The role of p53 in the immunobiology of cutaneous squamous cell carcinoma. *Clin Exp Immunol.* 132: 379–384.
- Bosch F and Muñoz N. 2002. The viral etiology of cervical cancer. *Virus Res.* 89: 183-190.
- Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, *et al.* 1984. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO.* 3:1151-1157.
- Bossis I, Roden R, Gambhira R, *et al.* 2005. Interaction of tSNARE syntaxin 18 with the papillomavirus minor capsid protein mediates infection. *Virol.* 79: 6723–6731.
- Brown C, Kowalczyk A, Taylor E, *et al.* 2008. p53 represses human papillomavirus type 16 DNA replication via the viral E2 protein. *Virol.* 5: 1-9.
- Carter J, Koutsky L, Hughes J, *et al.* 2000. Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. *Infect Dis.* 181: 1911-1919.
- Castellanos A. 2010. Determinación de la respuesta inmune en modelo murino contra cVLPs del virus del papiloma humano 16 (VPH-16) expresadas en plantas. Tesis de Maestría. CINVESTAV Irapuato. 80p.
- Christensen N, Höpfl R, DiAngelo S, *et al.* 1994. Assembled baculovirus-expressed human papillomavirus type 11 L1 capsid protein virus-like particles are recognized by neutralizing monoclonal antibodies and induce high titres of neutralizing antibodies. *Gen Virol.* 75: 2271-2276.
- Cid A. 2009. Therapeutic Vaccines Against Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *The Open Virol.* 3: 67-83.
- Conger K, Liu J, Kuo S, *et al.* 1999. Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human DNA polymerase alpha/primase. *Biol. Chem.* 274: 2696–2705.
- Da Silva D, Pastrana D, Schiller J and Kast M. 2001. Effect of Preexisting Neutralizing antibodies on the Anti-tumor Immune Response Induced by Chimeric Human Papillomavirus Virus-like Particle Vaccines. *Virol.* 290: 350–360.
- Da Silva D, Fausch S, Verbeek S and Kast M. 2007. Uptake of Human Papillomavirus Virus-Like Particles by Dendritic Cells Is Mediated by Fc γ Receptors and Contributes to Acquisition of T Cell Immunity. *Immunol.* 178: 7587-7597.

- De Villiers E, Fauquet C, Broker T, *et al.* 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 324: 17-27.
- Dias D, Van Doren J, Schlottmann S, *et al.* 2005. Optimization and validation of a multiplexed luminex assay to quantify antibodies to neutralizing epitopes on human papillomaviruses 6, 11, 16, and 18. *Clin Diagn Lab Immunol*. 12: 959-969.
- Donà M, Giorgi C and Accardi L. 2007. Characterization of antibodies in single-chain format against the E7 oncoprotein of the Human papillomavirus type 16 and their improvement by mutagenesis. *BMC Cancer*. 7: 1-14.
- Doorbar J. 2005. The papillomavirus life cycle. *Clin Virol*. 32: 7-15.
- Doorbar J. 2006. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Science*. 110: 525-541.
- Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H. 1983. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci*. 80:3812-3815.
- Fang L, Budgeon L, Doorbar J, *et al.* 2006. The human papillomavirus type 11 E1^{E4} protein is not essential for viral genome amplification. *Virology*. 351: 271-279.
- Faridi R, Zahra A, Khan K and Idrees M. 2011. oncogenic potential of Human Papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer. *Virology*. 8: 1-8.
- Feltkamp M, Smits H, Vierboom M, *et al.* 1993. Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. *Eur J Immunol*. 23: 2242-2245.
- Ferlay J, Shin H, Bray F, *et al.* GLOBOCAN 2008, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC Cancer Base, n.º 10. (<http://globocan.iarc.fr/>. <Consultada 19 de septiembre de 2012>)).
- Fiander A, Tristram A, Davidson E, *et al.* 2006. Prime-boost vaccination strategy in women with high-grade, noncervical anogenital intraepithelial neoplasia: clinical results from a multicenter phase II trial. *Int J Gynecol Cancer*. 16: 1075-1081.
- Franconi R, Di Bonito P, Dibello F, *et al.* 2002. Plant-derived Human Papillomavirus 16 E7 Oncoprotein Induces Immune Response and Specific Tumor Protection. *Cancer Res*. 62: 3654-3658.
- Gabrilovich D, Velders M, Sotomayor E, Kast M. 2001. Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1⁺ myeloid cells. *Immunology*. 166: 5398-5406.
- Gambhira R, Gravitt P, Bossis I, *et al.* 2006. Serum Antibody that Neutralizes across Papillomavirus Papillomavirus Type 16 L2E7E6 Fusion Protein Induces Vaccination of Healthy Volunteers with Human species. *Cancer Res*. 66: 11120-11124.
- García P. 2007. Que hay en el horizonte sobre el virus de papiloma humano, vacunas y el control del cáncer cervical. *Rev Peru Med Exp Sal Púb*. 24: 272-279.
- Giannini S, Al-Saleh W, Piron H, *et al.* 1998. Cytokine in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix: implications for the generation of local immunosuppression. *Clin Exp Immunol*. 113: 183-189.
- Gissmann L, Diehl V, Schultz H, Zur Hausen H. 1982. Molecular cloning and characterization of human papilloma virus DNA derived from a laryngeal papilloma. *Virology*. 44: 393-400.

- Gissmann L, zur Hausen. 1980. Partial characterization of viral DNA from human genital warts (*Condylomata acuminata*). *Int J Cancer*. 25:605-609.
- Goldstone S, Palefsky J, Winnett M and Neefe J. 2002. Activity of HspE7, a novel immunotherapy, in patients with anogenital warts. *Dis Colon Rectum*. 45: 502-507.
- Greenstone H, Nieland J, De Visser K, *et al.* 1998. Chimeric papillomavirus virus-like particles elicit antitumor immunity against the E7 oncoprotein in an HPV16 tumor model. *Proc Natl Acad Sci*. 95: 1800–1805.
- Harwood C and Proby C. 2002. Human papillomaviruses and non-melanoma skin cancer. *Curr Opin Infect Dis*. 15: 101-114.
- Hawley P, Vousden K, Hubbert N, *et al.* 1989. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO*. 8: 3905-3910.
- Heck D, Yee C, Howley P, and Munger K. 1992. Efficiency of binding the retinoblastoma protein correlates with the transforming capacity of the E7 oncoproteins of the human papillomaviruses. *Proc Natl Acad Sci*. 89: 4442-4446.
- Hidalgo A. 2006. El cáncer cérvico-uterino, su impacto en México y el porqué no funciona el programa nacional de detección oportuna. *Rev Biomed*. 17:81-84.
- Höhn H, Pilch H, Günzel S, *et al.* 2000. Human Papillomavirus Type 33 E7 Peptides Presented by HLADR* 0402 to Tumor-Infiltrating T Cells in Cervical Cancer. *Virology*. 74: 6632–6636.
- Howley P. 2006. Warts, cancer and ubiquitylation: lessons from the papillomaviruses *Amer Clin and Climatol Assoc*. 117: 113-127.
- Jagu S, Kwak K, Garcea R, and Roden R. 2010. Vaccination with multimeric L2 fusion protein and L1 VLP or Capsomeres to broaden protection against HPV infection. *Vacc*. 28: 4478–4486.
- Jong A, O'Neill T, Khan A, *et al.* 2002. Enhancement of human papillomavirus (HPV) type 16 E6 and E7-specific T-cell immunity in healthy volunteers through vaccination with TA-CIN, an HPV16 L2E7E6 fusion protein vaccine. *Vacc*. 20: 3456-3464.
- Joura E, Kjaer S, Wheeler C, *et al.* 2008. HPV antibody levels and clinical efficacy following administration of a prophylactic quadrivalent HPV vaccine. *Vacc*. 26: 6844-51.
- Joura E, Leodolter S, Hernandez-Avila M, *et al.* 2007. Efficacy of a quadrivalent prophylactic human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like-particle vaccine against high grade vulval and vaginal lesions: a combined analysis of three randomised clinical trials. *Lancet*. 369: 1693–1702.
- Joyce J, Tung J, Przysiecki C, *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. *Biol Chem*. 274: 5810–5822.
- Kanodia S, Fahey L and Kast M. 2007. Mechanisms Used by Human papillomaviruses to Escape the Host Immune Response. *Curr Cancer Drug Targets*. 7: 79-89.
- Kaufmann A, Nieland J, Jochmus I, *et al.* 2007. Vaccination trial with HPV16 L1E7 chimeric virus-like particles in women suffering from high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN 2/3). *Cancer*. 121: 2794-2800.
- Kaufmann A, Nieland J, Schinz M, *et al.* 2001. HPV16 L1E7 chimeric virus-like particles induce specific HLA-restricted t cells in humans after *in vitro* vaccination. *Cancer*. 92: 285–293.

- Konya J and Dillner J. 2001. Immunity to oncogenic human papillomaviruses. *Adv Cancer Res.* 82: 205-238.
- Koutsky L. 1997. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med.* 102: 3-8.
- Le Poole I, Elmasri W, Denman C, *et al.* 2008. Langerhans cells and dendritic cells are cytotoxic towards HPV16 E6 and E7 expressing target cells. *Cancer Immunol Immunot.* 57: 789-797.
- Lin K, Guarnieri F, Staveley Kl, *et al.* 1996. Treatment of Established Tumors with a Novel Vaccine That Enhances Major Histocompatibility Class II Presentation of Tumor Antigen. *Cancer Res.* 56: 21-26.
- Liu W, Liu X, Zhao K, *et al.* 2000. Papillomavirus virus-like particles for the delivery of multiple cytotoxic T cell epitopes. *Virology.* 273: 374–382.
- Liu Y, Chiriva M, Grizzi F, *et al.* 2001. Rapid induction of cytotoxic T-cell response against cervical cancer cells by human papillomavirus type 16 E6 antigen gene delivery into human dendritic cells by an adeno-associated virus vector. *Cancer Gene Ther.* 8: 948-957.
- Llanes A, Torres I, Barrientos C, *et al.* 2011. EL CÁNCER CERVICO UTERINO, ENEMIGO NÚMERO UNO DE LA SALUD DE LA MUJER. *Rev elec Med Sal y Soc.* 1: 1-15.
- Longworth M, Laimins L. 2004. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol and Mol Biol Rev.* 68: 362-372.
- López A, Lizano M. 2006. Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. *Cancerol.* 1: 31-55.
- Ma Clean J, Koekemoer M, Olivier A, *et al.* 2007. Optimization of human papillomavirus type 16 (HPV-16) L1 expression in plants: comparison of the suitability of different HPV-16 L1 gene variants and different cell-compartment localization. *Gen Virol.* 88: 1460–1469.
- Mc Neil. 2006. Search for HPV Treatment Vaccine Heats Up, Researchers Optimistic. *Nat Cancer.* 98: 954-955.
- McMillan N, Payne E, Frazer I and Evander M. 1999. Expression of the $\alpha 6$ integrin confers papillomavirus binding upon receptor-negative B-cells. *Virology.* 261: 271-279.
- Meisels A, Fortin R. 1976. Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic Patterns. *Acta Cytol.* 20: 505-509.
- Meisels A, Fortin R, Roy M. 1977. Condylomatous lesions of the cervix. II. Cytologic, colposcopic and histopathologic study. *Acta Cytol.* 21:379-390.
- Modis Y, Trus B and Harrison S. 2002. Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO.* 21: 4754-4762.
- Molling J, de Gruijl T, Glim J, *et al.* 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.
- Monroy A, Gómez M, Weiss B, *et al.* 2011. A novel HPV 16 L1-based chimeric virus-like particle containing E6 and E7 seroreactive epitopes permits highly specific detection of antibodies in patients with CIN 1 and HPV-16 infection. *Virology.* 8: 59.

- Monroy A, Mora M, Hernandez J. 2007. Advances in cáncer research at UNAM Capitulo Uno. Ed. Manual moderno. ed. 1ra. 328p.
- Moore K, Malefyt R, Coffman R and O'Garra A. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 19: 683–765.
- Moscicki A, Schiffman M, Kjaer S and Villa L. 2006. Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vacc.* 24S3: S3/42–S3/51.
- Muderspach L, Wilczynski S, Roman L, *et al.* 2000. A Phase I Trial of a Human Papillomavirus (HPV) Peptide Vaccine for Women with High-Grade Cervical and Vulvar intraepithelial Neoplasia Who Are HPV 16 Positive. *Clin Cancer Res.* 6: 3406–3410.
- Muñoz N, Castellsagué X, Berrington de González A and Gissmann L. 2006. HPV in the etiology of human cáncer. *Vacc.* 24S3: 1-10.
- Nakamura T, Shima T, Saeki A, *et al.* 2007. Expression of ondoleamine 2,3-dioxygenase and the recruitment of Foxp3-expressing regulatory T cells in the development of progression of uterine cervical cancer. *Cancer Sci.* 13.
- Osorio A. 2011. Análisis de la generación de anticuerpos neutralizantes específicos en ratones inmunizados con partículas quiméricas semejantes al virus de papiloma humano (VLPq) tipo 16 obtenidas en plantas de tabaco. Tesis de Licenciatura. F.E.S Zaragoza, UNAM. 47p.
- Parkin D, Pisani P, Ferlay J. 1993. Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. *Int J Cancer.* 54: 594-606.
- Patterson N, Smith J, Ozburn M. 2005. Human papillomavirus type 31b infection of human keratinocytes does not require heparan sulfate. *Virol.* 79: 6838–6847
- Paz de la Rosa G, Monroy A, Mora M, *et al.* 2009. An HPV 16 L1-based chimeric human papilloma virus-like particles containing a string of epitopes produced in plants is able to elicit humoral and cytotoxic T-cell activity in mice. *Virol.* 6: 1- 11.
- Peng S, Frazer IH, Fernando GJ, Zhou J. 1998. Papillomavirus virus-like particles can deliver defined CTL epitopes to the MHC class I pathway. *Virol.* 240: 147–157.
- Persson G, Andersson K, Krantz I. 1996. Symptomatic genital papillomavirus infection in a community. Incidence and clinical picture. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 75: 287–290.
- Pfister H. 2003. Human papillomavirus and skin cancer. *Natl. Cancer. Inst. Monogr.* 31: 52-56.
- Piersma S, Jordanova E, van Poelgeest M, *et al.* 2007. High number of intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early cervical cancer. *Cancer Res.* 67: 354-361.
- Ravaggi A, Romani C, Pasinetti B, *et al.* 2006. Correlation between serological immune response analyzed by a new ELISA for HPV- 16/18 E7 oncoprotein and clinical characteristics of cervical cancer patients. *Arch Virol.* 151: 1899-1916.
- Rudolf M, Fausch S, Da Silva D, and Kast M. 2001. Human Dendritic Cells Are Activated by Chimeric Human Papillomavirus Type-16 Virus-Like Particles and Induce Epitope-Specific Human T Cell Responses In Vitro. *Immunol.* 166: 5917-5924.
- Schäfer K, Müller M, Faath S, *et al.* 1999. Immune response to human papillomavirus 16 L1E7 chimeric virus-like particles: induction of cytotoxic T cells and specific tumor protection. *Int J Cancer.* 81: 881–888.

- Schöfer H, Ophoven A, Henkeu, *et al.* 2006. Randomized, comparative trial on the sustained efficacy of topical imiquimod 5% cream versus conventional ablative methods in external anogenital warts. *Eur J Dermatol.* 16: 642-648.
- Serra E. 1993. Lesiones anogenitales por papilomavirus. Monografía comentada de D.A. Payne, P.F. Rockley, S.K. Tying. Diagnostic approaches to human papillomavirus-associated disease. *Curr Op in Dermatol.* 277-284.
- Sharma C, Dey B, Wahiduzzaman M, Singh N. 2012. Human papillomavirus 16 L1–E7 chimeric virus like particles show prophylactic and therapeutic efficacy in murine model of cervical cancer. *Vacc.* 30: 5417– 5424.
- Singer A, Ho L, Terry G and Kwie T. 1995. Association of human papillomavirus with cervical cancer and precancer. In A. Mindel (ed.), *Genital warts: human papillomavirus infection.* Edward Arnold London United Kingdom. 105–129.
- Stanley M. 2002. Imiquimod and the imidazoquinolones: mechanism of action and therapeutic potential. *Clin Exp Dermatol.* 27: 571-577.
- Stanley M. 2010. HPV - immune response to infection and vaccination. *Infect Agents and Cancer.* 5: 1-6.
- Steller M, Gurski K, Murakami M, *et al.* 1998. Cell-mediated Immunological Responses in Cervical and Vaginal Cancer Patients Immunized with a Lipidated Epitope of Human Papillomavirus Type 16 E7. *Clin Cancer Res.* 4: 2103-2110.
- Stewart T, Drane D, Malliaros J, *et al.* 2004. ISCOMATRIX™ adjuvant: an adjuvant suitable for use in anticancer vaccines. *Vacc.* 22: 3738–3743.
- Suzich J, Ghim S, Palmer-Hill F, *et al.* 1995. Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. *Proc Natl Acad Sci.* 92: 11553-11557.
- Tapia Y. 2010. Partículas semejantes al virus del papiloma humano tipo 16 obtenidas en plantas transgénicas de jitomate generan anticuerpos específicos en ratones inmunizados. Tesis de Licenciatura. F.E.S. Zaragoza, UNAM. 53p.
- Thomas J, Hubert W, Ruesch M and Laimins L. 1999. Human papillomavirus type 31 oncoproteins E6 and E7 are required for the maintenance of episomes during the viral life cycle in normal human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci.* 96: 8449–8454.
- Tindle R. 2002. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nat Rev Cancer.* 2: 1-7.
- Tirado L, Mohar A, López M, García A, *et al.* 2005. Factores de riesgo de cáncer cervicouterino invasor en mujeres mexicanas. *Salud Pública de México.* 4; 5: 342-350.
- Toes R, Offringa R, Blom R, *et al.* 1996. Peptide vaccination can lead to enhanced tumor growth through specific T-cell tolerance induction. *Proc Natl Acad Sci.* 93: 7855-7860.
- Toledo M. 2010. Análisis de la respuesta de linfocitos T CD8+ en ratones de la cepa C57BL/6 inmunizados con articulas tipo virales quiméricas (cVLP) generadas en plantas de jitomate. Tesis de Licenciatura. F.E.S Zaragoza, UNAM. 66p.
- Townsend A, Ohlén C, Foster L, *et al.* 1989. A mutant cell in which association of class I heavy and light chains is induced by viral peptides. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1: 299-308.
- Trus B, Roden R, Greenstone H, *et al.* 1997. Novel structural features of bovine papillomavirus capsid revealed by a three dimensional reconstruction to 9A resolution. *Nat Struct Biol.* 4: 413–420.

- Van der Burg S, Kwappenberg K, O'Neill T, *et al.* 2001. Pre-clinical safety and efficacy of TA-CIN, a recombinant HPV16 L2E6E7 fusion protein vaccine, in homologous and heterologous prime-boost regimens. *Vacc.* 19: 3652–3660.
- Van der Burg S, Piersma S, Jong A, Van der Hulst J, *et al.* 2007. Association of cervical cancer with the presence of CD4₊ regulatory T cells specific for human papillomavirus antigens. *PNAS.* 104: 12087–12092.
- Van Driel W, Rensing M, Kenter G, *et al.* 1999. Vaccination with HPV16 peptides of patients with advanced cervical carcinoma: clinical evaluation of a phase I-II trial. *Eur J Cancer.* 35: 946- 952.
- Van Poelgeest M, Nijhuis E, Kwappenberg K, *et al.* 2005. 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.* 118: 675–683.
- Visser J, Nijman H, Hoogenboom B, *et al.* 2007. Frequencies and role of regulatory T cells in patients with (pre)malignant cervical neoplasia. *Clin Exp Immunol.* 150: 199-209.
- Walboomers J, Jacobs M, Manos M, *et al.* 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Pathol.* 189: 12-19.
- Watson R, Thomas M, Banks L and Roberts S. 2003. Activity of the human papillomavirus E6 PDZ-binding motif correlates with an enhanced morphological transformation of immortalized human keratinocytes. *Cell Sci.* 116: 4925-4934.
- Welters M, Kenter G, Piersma S, *et al.* 2008. Induction of Tumor-Specific CD4⁺ and CD8⁺ T-Cell Immunity in Cervical Cancer Patients by a Human Papillomavirus Type 16 E6 and E7 Long Peptides Vaccine. *Clin Cancer Res.* 14: 178-187.
- Wick D, Webb J. 2011. A novel, broad spectrum therapeutic HPV vaccine targeting the E7 proteins of HPV16, 18, 31, 45 and 52 that elicits potent E7-specific CD8⁺T cell immunity and regression of large, established, E7-expressing TC-1 tumors. *Vacc.* 29: 7857-7866.
- Yugawa T, Kiyono T. 2009. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. *Rev Med Virol.* 19: 97–113.
- Zhou X, Stenzel D, Frazer I. 1991. Expression of vaccinia recombinant HPV 16L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. *Virol.* 185: 251-257.
- Zur Hausen H. 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2: 342–350.