

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA**

**DETECCIÓN DE LA RESPUESTA ESPECÍFICA DE LOS LINFOCITOS T CITOTÓXICOS ANTI-  
HPV 16 EN PACIENTES CON CÁNCER CERVICOUTERINO HPV 16-POSITIVAS**

**Tesis que para obtener el grado de Doctor en Ciencias Médicas presenta  
VÍCTOR M. VALDESPINO GÓMEZ**

**En el Programa de Doctorado en Ciencias Médicas**

**2005**

**Tutora: DRA. CLARA GORODEZKY**

**Ciudad de México, MEXICO**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **Agradecimientos**

**Gracias al Dr. Jaime Berumen por su tutoría en la realización de la tesis doctoral y en su dedicación para la construcción del manuscrito del artículo.**

**Gracias a la Dra. Clara Gorodezky por su tutoría en la realización de la tesis doctoral y sus orientaciones para la construcción del manuscrito de la tesis.**

**Gracias al Dr. Vianney Ortiz por su asesoría en la realización de la tesis**

**Gracias a Fernando Cruz Talonia, Dimas Hernández, Edgar Román Basaure, médicos especialistas en Oncología, por su ayuda en el rubro clínico del proyecto**

**Gracias a la Dra. Carmen Sánchez por sus orientaciones en los preliminares del trabajo experimental**

**Gracias al Dr. Alejandro Ruiz Arguelles por el apoyo en los estudios de FACS**

**Gracias a mis compañeros del Departamento de Inmunogenética e Inmunología del Instituto de Referencia y Diagnósticos Epidemiológicos de la Secretaría de Salud: Carmen Alaez y particularmente a Monica Moreno y Alejandra Vazquez.**

**Gracias a mis compañeros del Laboratorio Interdisciplinario de la Escuela de Graduados de Sanidad del Ejercito Mexicano, Pilar Figueroa, Leonora Casas, Pedro Sánchez, Salvador Polo, Lucia Chayay Rosa Maria Ordoñez**

**Gracias a mis compañeros de Laboratorio de Inmunología del Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Alberto Díaz, Roberto Rosales, Rosana Pelayo y Benjamin Ortiz.**

**Gracias al Dr. Andreas M Kaufmann por revisar y enriquecer algunos puntos de la discusión del artículo**

**Gracias al Dr. Alejandro Madrigal por apoyarme en realizar una estancia en el Instituto Anthony Nolan de Londres, Inglaterra**

**Gracias a mi gran familia, especialmente a Margarita, mi querida esposa**

**Dedicatorias:**

**El logro de la tesis doctoral se la dedico a mis hijos, Víctor Edmundo, Bernardo Manuel, Patricia Margarita, Claudia Adriana y a mis nietas Yamiry Adriana y Ximena Margarita.**

**A mis grandes compañeros clínicos oncólogos**

**A mis grandes compañeros profesores**

**A mis innumerables alumnos.**

**“Cada uno de nosotros tenemos la suficiente capacidad para alcanzar nuestras metas  
anheladas”.**

**El trabajo experimental de la tesis doctoral se llevo a cabo en los siguientes laboratorios:**

**Laboratorio Interdisciplinario de la Escuela de Graduados de Sanidad, Universidad del Ejército Nacional**

**Laboratorio de Biología Celular y Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Inmunogenética e Inmunología del Instituto de Referencia y Diagnósticos Epidemiológicos de la Secretaría de Salud**

**Laboratorio de Inmunología del Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico**

**Este trabajo recibió tres apoyos financieros:**

**Beca crédito de CONACYT, número de registro: 91816**

**Beca-tiempo por el Instituto Mexicano del Seguro Social por dos años, mas apoyo económico.**

**Apoyo económico por la Universidad Autónoma Metropolitana.**

**Reconocimientos:**

**El artículo de la tesis doctoral fue publicado en la Revista Gynecology Oncology 2005, 96:92:102**

**Al artículo de la tesis doctoral le fue otorgado el Premio Nacional de Oncología 2004 en el área biomédica por la Sociedad Mexicana de Oncología A. C.**

## Indice

Hoja de presentación	1
Agradecimientos y dedicatorias	2
Laboratorios donde se realizó la tesis doctoral. Apoyos. Reconocimientos	4
Indice	5
<b>I. RESUMEN</b>	6
<b>I. ABSTRACT</b>	7
<b>II. INTRODUCCIÓN</b>	8
<b>II.1 Historia natural de la neoplasia intraepitelial cervical y del cáncer cervicouterino</b>	9
-Factores de riesgo identificados clínicamente o co-factores de progresión	10
-Susceptibilidad génica	11
-Infección persistente y carcinogénesis del virus de papiloma humano	12
-Éxito y fracaso del tamizaje y del tratamiento convencional del cáncer cervical invasor	13
<b>II.2 El cáncer cervicouterino como modelo viral de neoplasia</b>	15
<b>II.3 Respuesta inmunológica contra el cáncer cervicouterino</b>	18
-Las proteínas estructurales y no estructurales de los VPHs como blanco antigénico	22
-Interacción huésped-virus en la infección por VPH, carcinogénesis y progresión tumoral	24
<b>II.4 Mecanismos que emplean los VPH para evadir la respuesta inmunológica</b>	25
<b>II.5 Diseño de vacunas preventivas y terapéuticas</b>	28
-Primeros resultados exitosos de vacunación profiláctica	30
-Resultados preliminares de vacunación terapéutica	32
<b>II.6 Perspectivas de las vacunas profiláctica y terapéutica</b>	35
<b>III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS</b>	38
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
IV.1 Diseño del estudio. Población de estudio	39
<b>IV.2 Metodologías</b>	
IV.2.1 Generación de células dendríticas	41
IV.2.2 Transfección de células dendríticas	42
IV.2.3 Detección de la expresión de E6, E7, y NP	43
IV.2.4 Ensayos de microcitotoxicidad	45
IV.2.5 Análisis estadístico	46
<b>V. RESULTADOS</b>	47
<b>VI. DISCUSIÓN</b>	52
<b>VII. CONCLUSIONES</b>	56
<b>VIII. REFERENCIAS</b>	58
<b>IX. MATERIAL ANEXO AL TEXTO</b>	
Figura 1. Diseño experimental	40
Figura 2. Expresión de E6 y E7 por las células dendríticas	44
Figura 3. Gráfica de citotoxicidad de los linfocitos T CD8+ anti-VPH-16	50
Figura 4. Histogramas de la citotoxicidad de los linfocitos T CD8+ anti-VPH-16	51
TABLA 1. Valores de la respuesta de los LTC anti-VPH en pacientes con CC y controles	49
Indice de abreviaturas	67

## I. RESUMEN

La respuesta inmunológica de los linfocitos T CD8+ citotóxicos contra los antígenos del virus del papiloma humano en mujeres con cáncer cervicouterino ha sido estudiada incipientemente. El monitorear dicha respuesta es primordial para entender los principios que conlleven a las estrategias exitosas de inmunoterapia. El objetivo de este estudio fue investigar la respuesta de los linfocitos T CD8+ citotóxicos específicos contra las oncoproteínas E6 y E7 del VPH 16 en un grupo de pacientes con cáncer cervicouterino-VPH 16 positivo sin tratamiento oncológico.

Se obtuvieron las células mononucleares de la sangre periférica de las pacientes con cáncer cervicouterino sin haber recibido tratamiento previo y de pacientes sanas. Los monocitos se diferenciaron *in vitro* mediante su cultivo con GM-CSF e IL-4 para llevarlos a células dendríticas. Estas células dendríticas fueron transfectadas transitoriamente con los oncogenes E6 o E7 del HPV 16, en el vector de expresión pcDNA3 y fueron usadas como células estimuladoras por un ciclo y células blanco de los linfocitos de sangre periférica en los ensayos *in vitro* de citotoxicidad mediante liberación de cromo. Las células dendríticas transfectadas derivadas de monocitos fueron cultivadas con TNF- $\alpha$  para obtener su maduración. Los transgenes E6 y E7 de HPV 16 fueron expresados y traducidos, corroborándose mediante RT-PCR y FACS intracelular respectivamente. Todas las pacientes con cáncer cervicouterino-VPH 16 positivo mostraron respuesta de linfocitos citotóxicos anti-E6 y E7 de VPH 16. En 11/12 pacientes y en 8/9 se demostró respuesta citotóxica contra E6 y E7 respectivamente, por encima del 30% en la proporción efector/célula blanco de 100:1. En ninguna de las pacientes con cáncer cervicouterino-VPH 16 negativo o en mujeres sanas de control la lisis celular fue mayor del 15%. Estos datos sugieren que la respuesta de los linfocitos T CD8+ citotóxicos pueden ser detectada en todas las pacientes con cáncer cervicouterino que no han recibido tratamiento. Nuestro método, empleando células dendríticas como células reestimuladoras y como células blanco puede mejorar el inmunomonitorio de las pacientes con cáncer cervicouterino.

## I. ABSTRACT

The specific CTL response against Human Papillomavirus antigens in women with cervical cancer has been poorly studied. Immunological monitoring of this response is central for understanding the principles that underlie successful immunotherapeutic strategies. The aim of the study was to investigate the HPV16 E6/E7 specific CTL immune response in a group of untreated HPV16-positive cervical cancer patients. Peripheral blood mononuclear cells from untreated cervical cancer patients and healthy controls were isolated prior to any therapy. Autologous monocyte-derived dendritic cells were obtained by means cultured cells supplemented with GM-CSF and IL-4 were transiently transfected with HPV16 E6 or E7 expression vectors and used for one round of *in vitro* restimulation or as target cells in chromium-release assays with restimulated peripheral blood lymphocytes. Transfected monocyte-derived dendritic cells were differentiated to exhibit a fully mature phenotype following the addition of TNF- $\alpha$ . HPV16 E6 and E7 transgenes were expressed and translated as measured by RT-PCR and intracellular flow cytometry, respectively. All HPV16-associated cervical cancer patients showed evidence of specific CTLs. Lytic activity for HPV16 E6 (11/12) and/or E7 (8/9) was above 30% at the 100:1 effector to target ratio. None of the HPV16 negative cervical cancer patients or healthy controls women were above 15% of lysis. These data suggest that HPV-specific cytolytic immune responses can be detected in all untreated cervical cancer patients. Our approach, using dendritic cells for restimulation and as target cells, may enhance immunomonitoring of cervical cancer patients.

## II. INTRODUCCIÓN

El cáncer cervicouterino (CC) es la segunda neoplasia maligna más frecuente en términos de tasas de incidencia y mortalidad en el mundo<sup>1</sup>. El cáncer cervicouterino invasor se mantiene con un gran problema de Salud Pública en las mujeres en todo el mundo. Cerca de 500,000 nuevos casos se registran anualmente y provocan la muerte a 250,000 mujeres; el 80% de estos, ocurren en países parcialmente desarrollados. En diferentes países de África Oriental, Latinoamérica y algunos países de Asia, las tasas de incidencia estandarizadas por edad se mantienen mayores de 40 por 100,000<sup>2</sup>. En México se registraron 19,589 casos nuevos en 1998, que significó el 34.2% del total de los tumores malignos del sexo femenino<sup>3</sup>, con tasa aproximada de incidencia ajustada a la edad (45-54 años) de 111.7 por 100,000<sup>2</sup>. Para el periodo de 1990 a 2000 se reportaron un total de 48,761 defunciones, iniciando en 1990 con 4,280 y terminando con 4,620 en el 2000 (5777 en 2002 reportadas por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer-IARC, Lyon), lo que representa en promedio 12 mujeres fallecidas cada 24 horas<sup>4</sup>. Comparando las tasas de mortalidad de las entidades federativas, se encontró mayor riesgo en Estados con menor desarrollo económico. Estos resultados muestran que la mortalidad por cáncer cervicouterino se encuentra relacionada con los factores presentes en la pobreza, como son la falta de escolaridad, el desempleo, el bajo nivel socioeconómico, la residencia en áreas rurales y la falta de acceso efectivo a los Servicios de Salud<sup>4</sup>.

En los países desarrollados los programas de cobertura masiva para detectar y tratar clínicamente lesiones preinvasoras cervicales en las mujeres han reducido las tasas de morbilidad y mortalidad del CC en un 30 a 80%<sup>5,6</sup>. Resultados similares podrían obtenerse en las mujeres de los países parcialmente desarrollados si se aplicara masivamente esta estrategia. En más de la mitad de los casos incidentes en los países en desarrollo el diagnóstico del CC se establece en etapas intermedias y avanzadas. Globalmente los índices de curación empleando los tratamientos convencionales son del 80% en las mujeres con CC en etapas iniciales, de 30-50% en etapas intermedias y porcentajes menores del 20% en etapas avanzadas<sup>7,8</sup>. Se requieren por lo tanto de nuevas estrategias terapéuticas adyuvantes para mejorar el control de la enfermedad<sup>6</sup>. En los últimos años hemos presenciado progresos sustanciales en el entendimiento del origen y la patogénesis del CC, la meta para los próximos, es la prevención y la erradicación de la mayoría de casos de cáncer del cérvix en el mundo<sup>6</sup>.

La capacidad de identificar lesiones premalignas cervicales por los programas de screening o tamizaje permiten la oportunidad de modificar la historia natural de estas lesiones. La falta de programas de tamizaje eficaces, de amplia cobertura encaminados a la detección y tratamiento

de lesiones preinvasoras antes que progresen a un cáncer invasor es el motivo más importante que explica la alta incidencia del CC en los países en desarrollo.

Los estudios epidemiológicos actuales sobre la historia natural del CC indican que el número de mujeres que pueden desarrollar lesiones precursoras es de dos a cinco veces mayor que las que desarrollan cáncer invasor. La tasa de mortalidad normalizada por edad en los países con alta incidencia de CC es de 10 por 100,000 mujeres o aún mayor<sup>1</sup>, en estos países la inversión para realizar tamizaje o screening del cáncer cervicouterino o sus lesiones precursoras es limitada. Dichas tasas de mortalidad se reducirían en al menos un 30% si las mujeres tuvieran acceso a la detección temprana y al tratamiento apropiado similar al que las mujeres reciben en los países desarrollados<sup>2,6</sup>.

Los avances en la inmunología, genómica y proteómica han permitido entender las bases celulares y moleculares de muchas enfermedades<sup>9</sup>. El entender la carcinogénesis y la progresión tumoral a partir de la relación causal entre el virus de papiloma humano (VPH) y el CC, ha permitido iniciar nuevos paradigmas clínicos dirigidos a su prevención primaria y secundaria<sup>6,10</sup>.

## **II.1 Historia natural de la neoplasia intraepitelial cervical y del cáncer cervicouterino.**

El CC es el cáncer más frecuente en el mundo relacionado con infección. Estudios epidemiológicos clásicos demostraron el papel central del comportamiento sexual en el origen de las lesiones precursoras y el CC invasor sugiriendo que un agente infeccioso transmitido por vía genital causaba esta condición. A principio de los ochentas, los distintos VPH oncogénicos fueron aislados de biopsias de CC por diversos estudios moleculares, demostrándose que la expresión de los oncogenes virales E6 y E7 se relacionaba con la etiología del CC. En los noventas, diferentes estudios epidemiológicos de casos y controles, indicaron que las infecciones persistentes por VPH oncogénicos son el factor de riesgo más significativo o necesario, pero no suficiente (se requieren diferentes condiciones que en el huésped influyen el riesgo de progresión) para desarrollar CC<sup>1,6</sup>. Actualmente el conocer la interacción de los factores biológicos del huésped y del virus en la patogénesis del CC nos permiten entender globalmente la persistencia de la infección, su carcinogénesis y la progresión tumoral<sup>11,12</sup>. La lesión precursora directa del CC es la displasia severa ó lesión intraepitelial escamosa (LIE, diagnóstico basado en estudio citológico) de alto grado, o neoplasia intraepitelial cervical (NIC, diagnóstico basado generalmente en estudio histológico) tipo 3. La mayoría de las displasias leves/moderadas, LIE de bajo grado o NIC 1-2 evolucionan generalmente a la regresión, no

progresan porque la infección viral es eliminada por la respuesta inmunológica de la paciente. Uno a dos tercios de las LIE de alto grado o NIC 3, -conceptualizadas como lesiones preinvasoras- al no ser tratadas adecuadamente, progresaran a lesiones tumorales invasoras en un periodo de pocos años<sup>11,12</sup>.

Para entender la historia natural y la biología del CC es imperativo comprender la infección del epitelio cervical por el VPH y los factores fisiopatológicos concomitantes asociadas en el cérvix uterino .

- Factores de riesgo identificados clínicamente o co-factores de progresión.

La prevalencia de la infección por VPH en la mucosa del cérvix uterino en mujeres con actividad sexual es de 20 a 40%, aumenta en la segunda y tercera década de la vida y decrece marcadamente después de los 30<sup>5</sup>. Se ha observado que poblaciones que registran alta incidencia de CC mantienen elevada prevalencia de infección con VPHs. La infección persistente por VPH es condición necesaria para el desarrollo de la carcinogénesis cervical y se requieren otras condiciones denominadas factores de riesgo (denominación clínica) o co-factores de progresión (denominación biomédica) o factores que favorecen su desarrollo<sup>6,13,14</sup>.

Los factores de riesgo identificados corresponden a ciertos antecedentes ginecoobstétricos y aspectos socioculturales, como baja escolaridad, inicio de relaciones sexuales a temprana edad, elevado número de parejas (participación del hombre como vector, el cual se incrementa asociado a contactos sexuales frecuentes con prostitutas), alta paridad (5 o más partos), presentación del primer parto antes de los 18 años, tabaquismo, pobre higiene genital, procesos inflamatorios cervico-vaginal persistentes, infecciones sexuales intercurrentes, consumo prolongado de anticonceptivos orales<sup>7,8,13,14</sup>. El presentar todos o casi todos estos factores, aunados a la no-participación en programas de tamizaje para el CC se asocian a la no detección oportuna de NIC y al desarrollo de CC. Las infecciones de transmisión sexual provocadas por *Chlamydia trachomatis*, virus del herpes simple tipo 2<sup>15</sup>, y virus de la inmunodeficiencia humana, así como ciertas deficiencias nutricionales escasamente conocidas que también intervienen como co-factores en la etiología del cáncer cervical.

Los diferentes factores de riesgo clínicos en las pacientes para desarrollar el CC corresponden a microtraumatismos celulares o procesos inflamatorios crónicos que participan en la carcinogénesis como co-factores moleculares de promoción tumoral simultáneamente o poco después de que la infección de los VPH oncogénicos ha provocado la iniciación<sup>8,10</sup>. Los diferentes señalamientos moleculares en donde participan estos co-factores moleculares en la carcinogénesis, se conocen muy parcialmente.

Los factores como la edad, en la cual se practica la primera relación sexual y el número de parejas sexuales (6 o más parejas) son indicadores de riesgo de infección por VPH, más que factores de riesgo directos para desarrollar CC. La monogamia, el inicio de actividad sexual tardíamente, la adecuada higiene personal y el uso de métodos anticonceptivos de barrera (condón) ayudan a la prevención primaria del carcinoma cervicouterino <sup>14</sup>. La infección por VPH es transmitida comúnmente por contacto sexual y puede provocar una lesión escamosa intraepitelial temporal, la mayoría de estas lesiones son controladas entre los 6 a 12 meses después, probablemente por la participación eficiente de la respuesta inmunológica local. Sin embargo en un pequeño porcentaje de mujeres, la infección por VPHs de alto riesgo persiste y progresa a NIC 1, NIC 2, NIC 3, carcinoma in situ, y sin tratamiento quirúrgico, a carcinoma invasor de células escamosas o adenocarcinoma.

Los conocimientos actuales sobre la historia natural del CC indican que el número de mujeres que cursan con lesiones preinvasoras cervicales es de dos a cinco veces mayor que las que desarrollan cáncer invasor <sup>5</sup>.

#### -Susceptibilidad genética

La infección persistente de VPH de alto riesgo en las mujeres que progresan a cáncer invasor puede depender que el sistema inmunológico responda contra los antígenos virales que son presentados por los alelos del HLA. Las variaciones génicas relacionadas con el polimorfismo natural-HLA (antígeno leucocitario humano) de las mujeres, ha sido investigado en relación a la susceptibilidad para la infección persistente por VPH y para la progresión a carcinoma cervical. Actualmente los diferentes estudios sugieren que la mujeres con los alelos del HLA como los -DRB1\*1301, -DQA1\*0501(determinación por PCR-SSP) se asocian a protección o a menor susceptibilidad que la mayoría de las mujeres, para ser infectadas persistentemente por VPH y desarrollar CC <sup>11</sup>, en cambio el -DQB1\*0402, -DQA1\*3011 como recientemente se identifico, corresponde a alelos positivos a la asociación de CC. Debido a que los genes polimórficos del HLA participan en la respuesta inmunológica y que probablemente diferentes alelos confieran escasos niveles de riesgo para CC, se requieren estudios futuros en poblaciones numerosas que exploren dichas asociaciones. Las mujeres que no desarrollan CC a pesar de exposiciones repetitivas a la infección por VPH (p.e. prostitutas), o mujeres de familias con elevada susceptibilidad para el CC (p.e. presentación en hermanas, madre/hijas) son poblaciones interesantes para estudiar su polimorfismo HLA asociado al CC<sup>12</sup>.

La influencia de la susceptibilidad génica de las pacientes para la infección persistente por VPH o para desarrollar de CC en el contexto de sus haplotipos específicos de HLA ha sido difícil de identificar, y parece tener limitada importancia.

- Infección persistente y carcinogénesis del virus de papiloma humano.

Aunque el modelo de carcinogénesis cervical es uno de los más estudiados en Oncología<sup>10</sup>, diferentes eventos específicos y la secuencia molecular de otros, no han sido aun determinados.

Diferentes características biológicas globales de los VPHs son importantes en la infección persistente y en la carcinogénesis, entre las cuales destacan: las variantes de los diferentes genotipos de VPH oncogénicos, la influencia de su carga viral y el grado de integración viral al ácido desoxirribonucleico (DNA) de las células en la infección, todas estas han sido parcialmente exploradas debido a limitaciones metodológicas, y son actualmente motivo de investigación. La información disponible en variantes de VPH 16 y VPH 18, sugieren que las variantes virales no europeas se asocian a un riesgo mayor de carcinogénesis<sup>16,17</sup>. Berumen y col. han reportado alta prevalencia de variantes Asiático-Americanas de VPH 16 en las mujeres mexicanas<sup>18</sup>. La mayor carga viral usandola como marcador en estudios de casos y controles inicialmente ha demostrado asociación con mayor riesgo para desarrollar CC<sup>19,20</sup>. La medición de la carga viral con los métodos previamente utilizados presenta limitaciones, y recientemente se puede determinar mediante la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de tiempo real o PCR-cinética, lo cual mejora su especificidad y con ello probablemente su correlación clínica. Aunque los VPH son típicamente encontrados en forma episomal en las lesiones cervicales iniciales, su integración al genoma del queratinocito ha sido asociada a la oncogénesis y a la progresión a CC. Los ensayos experimentales han tenido limitaciones para determinarla, sin embargo la reciente detección de secuencias VPH integradas por ligación a la PCR (DIPS-PCR) parecen distinguir entre la formas virales episomal e integrada, y con ello explorar su correlación clínica<sup>12,21</sup>.

En la patogénesis del CC participan tres principales procesos, dos de ellos directamente relacionados con la participación del VPH de alto riesgo. El primero es debido al efecto de las oncoproteínas virales E6 y E7, el segundo al efecto de la integración del DNA viral en las regiones cromosómicas asociadas a la regulación de diferentes protooncogenes y genes supresores tumorales. En el tercero, participan los co-factores moleculares de los factores de riesgo clínico, que sumados a los 2 procesos previos propician mayor inestabilidad genómica, inmortalización y transformación celular. El desarrollo del CC requiere de la aparición secuencial de múltiples y progresivas alteraciones genéticas<sup>22</sup>.

Concomitantemente a la transformación tumoral del queratinocito, otras múltiples alteraciones genéticas participan e inciden en la respuesta de los mecanismos naturales involucrados en la respuesta inmunológica antitumoral local (se comentan adelante).

- Éxito y fracaso del tamizaje y del tratamiento convencional del cáncer cervical invasor.

En países desarrollados con adecuados programas de tamizaje para CC, los estudios citológicos y el tratamiento de lesiones precursoras son una de las principales cargas de atención en el mantenimiento de la Salud Pública en las mujeres a partir de la 3ª. década de la vida. En estos, la incidencia de lesiones invasoras es importantemente baja y el costo estimado de vida salvada por año en estas mujeres es de varios miles de dólares <sup>23</sup>.

Aproximadamente el 40% de los adultos activos sexualmente son infectados por VPH <sup>5</sup>. Más del 90% de las infecciones cervicales por VPH se resuelven espontáneamente, e incluso en ausencia de programas de tamizaje específico, el CC se desarrolla solo en una minoría de mujeres. El tamizaje parece solo beneficiar a una pequeña fracción de mujeres, sin embargo este beneficio es invaluable.

Los procedimientos de tamizaje comúnmente están basados en el estudio citológico cervicovaginal (Papanicolaou) o la exploración colposcópica. La incidencia del cáncer cervicouterino podría reducirse hasta un 90% si los procedimientos de tamizaje fueran eficientes y se lograra una cobertura amplia en la población en riesgo. Las mujeres con lesiones preinvasoras pueden ser detectadas y tratadas exitosamente, lo cual tiene el potencial de prevenir el desarrollo del cáncer invasor, tanto como reducir su incidencia, morbilidad y mortalidad.

La prueba de Papanicolaou es específica para la detección de las lesiones de alto grado y de cáncer, sin embargo su sensibilidad es moderada, en un meta-análisis reciente se comprobó que su sensibilidad global fué de 51% y su especificidad de 98% <sup>24</sup>. El tamizaje mediante visualización amplificada del cérvix o colposcopia es un procedimiento que permite identificar las lesiones preinvasoras cervicales; en este método se aplica una solución diluida de ácido acético al cuello uterino antes de proceder al examen visual. Las células anormales adquieren un aspecto blanquecino temporal al ponerse en contacto con esta solución, siendo estas zonas las convenientes para muestreo histopatológico; su sensibilidad es similar y su especificidad es discretamente menor al del estudio citológico. Las lesiones cervicales aceto-blancas se asocian frecuentemente a infecciones de VPH oncogénicos <sup>25</sup>.

Con el uso de la colposcopia los procedimientos quirúrgicos hospitalarios para el tratamiento de las lesiones cervicales preinvasoras han sido sustituidos por procedimientos que se llevan a cabo en consultorio (ambulatorios), convirtiéndose en ágiles, accesibles y mejor aceptados por las

pacientes. El criterio de tratamiento más comúnmente aceptado es tratar sólo las lesiones precancerosas de grado alto (NIC II y III) frecuentemente mediante resección con asa electroquirúrgica y solo vigilar periódicamente las lesiones de bajo grado (NIC I). La estrategia del "examen colposcópico y tratamiento inmediato" en sospecha de lesiones precancerosas parece promisorio, pero sigue siendo polémico por la probabilidad de que una proporción de las pacientes sean sobretratadas.

Por la elevada asociación de NICs con la presencia de VPH oncogénicos, se han establecido otras pruebas de tamizaje que identifican estos virus por medio de metodologías de biología molecular. Las técnicas para detectar los VPHs son la PCR y la captura de híbridos (Hybrid Capture II de Digene Corporation), que permiten identificar tipos virales de alto y bajo riesgo; el uso de esta última metodología como tamizaje ha sido aprobada por la FDA de Estados Unidos. Ambas metodologías son similarmente sensibles y menos específicas que el Papanicolaou para el diagnóstico de LIEs o NICs.

Una de las grandes utilidades de combinar los estudios de determinación molecular de VPH y citología cervicovaginal es aumentar el valor predictivo negativo para NIC; cuando ambos resultan negativos, estas mujeres no requerirán tamizaje a corto/mediano plazo y podrían revisarse hasta después de 5 años.

Las mujeres en riesgo de contraer CC necesitan información completa y precisa para comprender los distintos procedimientos de prevención y detección oportuna. Los programas de prevención del CC deben además de ocuparse regionalmente de abordar temas sobre las barreras culturales, emocionales y otros obstáculos que influyen para que las mujeres puedan utilizar adecuadamente los servicios de tamizaje<sup>24,26</sup>. Al respecto, en un estudio de mujeres mexicanas los principales obstáculos encontrados para asistir a los programas de tamizaje fueron: la falta de información sobre el cáncer cervicouterino o sobre las pruebas de Papanicolaou, la idea de que el cáncer es una enfermedad incurable, las dificultades que sienten en la relación con el personal de atención de salud, la oposición de sus parejas sexuales para ser exploradas y su negativa personal a someterse a un tacto vaginal<sup>27</sup>. Para que un programa de prevención de CC sea eficaz, debe estar integrado por un conjunto de servicios de educación, de tamizaje y de tratamiento de lesiones preinvasoras, con cobertura de la mayoría de las mujeres en riesgo. Si cualquiera de estos aspectos no se aplican conjuntamente, difícilmente se alcanzarán efectos positivos significativos<sup>24</sup>.

El diagnóstico y tratamiento ambulatorio de las pacientes con lesiones preinvasoras de CC se ha incrementado importantemente en los últimos años empleando colposcopia y técnicas de criocirugía, o resección con láser o asa electroquirúrgica. En múltiples ciudades del país, los

grupos médicos especializados del Sector Salud y de atención privada realizan diariamente cientos de estos procedimientos.

Sin embargo cuando la lesión preinvasora de alto grado o NIC 3 no es tratada, rompe la membrana basal, penetra en el estroma cervical e infiltra los vasos linfáticos y venosos. Progresivamente invade el segmento distal del útero, vagina, los tejidos parametriales, ligamentos uterosacros, extendiéndose hasta la pared pélvica y órganos vecinos y puede enviar metástasis a los diferentes ganglios pélvicos y para-aórticos. El CC sigue usualmente un relativo patrón ordenado de progresión metastásica de los ganglios pélvicos, a los ganglios para-aórticos y a sitios distantes. Aunque las metástasis hematógenas son poco frecuentes, los pulmones, los ganglios extrapélvicos, el hígado y los huesos son los sitios mas afectados<sup>7,8</sup>.

En el diagnóstico y tratamiento de las pacientes con cáncer cervicouterino invasor se han presentado cambios puntuales en los últimos años. Destacan el mejoramiento en la estratificación de la etapas clínicas iniciales; progresos importantes han sido la subetapificación de la etapa clínica I en: IA1, IA2, IB1 y IB2, en la cual cada etapa clínica o extensión del tumor se relaciona con esquemas terapéuticos e índices pronósticos específicos. En la etapa IA, el diagnóstico se establece midiendo la invasión microscópica del estroma en milímetros, y en la IB midiendo el volumen tumoral en centímetros. Otro avance importante ha sido la identificación de tipos histopatológicos de CC de peor pronóstico (carcinoma de células pequeñas, neuroendocrino y de células claras)<sup>7,8,28</sup>. En general las pacientes con cánceres invasores tempranos (etapas IA2, IB1, y algunos IIA con pequeño volumen tumoral) son tratados con histerectomía radical o radioterapia, y los pacientes con tumores localmente avanzados (etapas IB2 a IVA) empleando radioterapia. En los últimos años las pacientes con CC avanzado han sido tratadas con radioterapia combinada con quimioterapia con lo cual se mejoran parcialmente los índices de respuesta terapéutica<sup>29,30</sup>.

## **II.2 El cáncer cervicouterino como modelo viral de neoplasia, cuya iniciación y transformación tumoral se relaciona con la infección persistente de los VPH oncogénicos.**

La causa subyacente primaria del CC es la infección persistente del epitelio cervical por los VPH oncogénicos por muchos años.

Los principales pasos para desarrollarse el cáncer cervical incluyen la infección por VPH, la persistencia de la infección, la progresión a pre-cáncer, la carcinogénesis, la transformación tumoral, y la invasión local, regional y a distancia<sup>6,12</sup>. Frecuentemente en la infección genital por VPHs, la paciente se mantiene asintomática por muchos años. La prevalencia de la infección genital por VPH en mujeres y hombres con actividad sexual es del 20 al 40%. La infección persistente por los VPHs oncogénicos se asocia a la etapa de *iniciación* tumoral y los diferentes co-factores moleculares locales (relacionados con los factores de riesgo clínicos para CC) participan en la etapa de *promoción* tumoral. Ambas condiciones, aunadas a una deficiente respuesta inmunológica local conllevan a la carcinogénesis cervical y a la progresión tumoral<sup>6,7,8,12</sup>.

Los VPHs son virus no encapsulados de doble cadena de DNA con tamaño de 8000 nucleótidos y contienen 8 genes o marcos de lectura abiertos denominados E1, E2, E4, E5, E6, E7 (genes tempranos “E”, no estructurales) y L1 y L2 (genes tardíos “L”, estructurales). Por la homología de su DNA se han identificado más de 100 tipos; cada uno de ellos puede presentar subtipos y variantes, cuya variación genómica es de 5 a 10 % y de 0.1 a 5% respectivamente. Ensayos *in vivo* e *in vitro* han demostrado que las proteínas E6 y E7 de los VPHs de alto riesgo oncogénico (16, 18 y otros menos frecuentes como 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 54, 56, 58, 59, 66, 68 y 69) son capaces de inmortalizar y transformar las células epiteliales.

Como hemos mencionado en la infección cervical por los VPHs, tres condiciones biológicas pueden influir para provocar infección persistente y carcinogénesis: el tipo de variante viral, la influencia de su carga viral y el grado de integración viral al DNA de las células; la participación precisa de cada una de estas condiciones es solo parcialmente conocida, y actualmente es motivo de análisis<sup>18,19,31</sup>.

Los viriones infectan las células basales del epitelio estratificado de la mucosa cervical (forma episomal) presentando replicación de tipo no-citolítica. Tanto en esta capa de células como en las parabasales los VPHs expresan las proteínas tempranas E1, E2, E5, E6 y E7 confinadas al núcleo y en escasa cantidad (esto potencialmente limita la presentación antigénica efectiva, comparativamente en otras condiciones en las cuales el virus se replica activamente). Las células infectadas siguen expandiéndose verticalmente diferenciándose terminalmente a células escamosas en donde las proteínas E4, L1 y L2 son expresadas en abundante cantidad (sitio anatómicamente superficial donde las células inmunocompetentes tienen acceso limitado). Es en este estrato celular donde el DNA de los VPHs oncogénicos se integra en el genoma de la célula huésped y las oncoproteínas E6 y E7 predisponen que las células infectadas se transformen en displásicas (promueven la proliferación, evitan la apoptosis, retardan la

diferenciación celular y producen el engrosamiento atípico del epitelio) y que se desarrollen las lesiones preinvasoras cervicales.

Tres principales procesos participan en la patogénesis del CC, dos de ellos directamente relacionados con los VPHs de alto riesgo. El primero es debido al efecto de las oncoproteínas virales E6 y E7 sobre los genes supresores tumorales p53 y Rb, el segundo al efecto de la integración del DNA viral en las regiones cromosómicas asociadas a la regulación de diferentes protooncogenes y genes supresores tumorales. En el tercero, participan los co-factores moleculares relacionados con los factores de riesgo clínicos, que sumados a los 2 procesos anteriores propician mayor inestabilidad genómica, y conducen a la inmortalización y transformación celular<sup>31</sup>. El desarrollo del CC requiere de la aparición secuencial de múltiples y progresivas alteraciones genómicas.

La zona de transformación cervical es un anillo de tejido (sitio donde frecuentemente se desarrollan áreas de metaplasia escamosa) y guarda alta susceptibilidad para la carcinogénesis por VPH. Los VPH penetran a la mucosa cervical a través de microlesiones del epitelio y se introducen en las células basales. Los tres genes virales, E5, E6, y E7 se colocan inicialmente episomales (extracromosómicos) y luego se integran al DNA del queratinocito (lo cual permite la estabilización del RNAm viral). Los genes E6 y E7 tienen el papel más importante en la transformación maligna, sus proteínas son expresadas constitutivamente en lesiones preinvasoras como invasoras. Diferentes estudios revelaron que la oncoproteína E6 promueve la degradación de la proteína p53 (reguladora del ciclo celular, que reconoce el DNA dañado y lo repara, y cuando esto no es factible induce la apoptosis) y la E7 bloquea la función a la Rb (que también regula el ciclo celular, liberando la inhibición del factor de transcripción E2f sobre los diferentes genes de proteínas que favorecen la proliferación celular). Ambas provocan alteraciones en el crecimiento celular, particularmente en aquellas con anomalías en el DNA. Además, E6 funciona activando la telomerasa, bloquea la proteína pro-apoptótica-BAK, lo que conlleva a evitar la apoptosis y secundariamente aumenta la inestabilidad cromosomal; y E7 estimula la expresión de las ciclinas A y E, e inactiva los inhibidores de cinasas dependiente de ciclinas Waf1 y Kip1. E7 parece ser el oncogen predominante en provocar inestabilidad cromosómica y aneuploidía.

Los VPH oncogénicos se integran predominantemente en localizaciones cromosomales semi-específicas o sitios frágiles como 8q24 y 12q15, lo cual provoca la activación "cis" de diferentes proto-oncogenes. Poco tiempo después se detectan anomalías cromosomales como pérdida de la heterocigocidad por delección de uno o de los dos alelos en las regiones relacionadas con genes reparadores del DNA o genes supresores tumorales, localizados en 3p14-22, 4p16, 5p15,

6p21-22, 11q23, 17p13.3, 18q12-22, y 19q13<sup>31</sup>, acumulándose mas mutaciones, algunas de las cuales son significativas para desarrollar el fenotipo tumoral. Se han identificado diferentes alteraciones genómicas en clonas celulares de carcinoma cervicouterino, destacándose entre ellas, mutaciones en p53, y K-ras, sobreexpresiones de HER-2/neu, bcl-2, EGFR, metaloproteasas, VEGF, c.myc; y reducción o pérdida en la expresión de moléculas HLA-clase I, y de nm23. Muchas de estas alteraciones genéticas han sido asociadas a comportamientos biológicos diferentes en la evolución de la enfermedad de las pacientes con CC<sup>9</sup>.

Finalmente los queratinocitos transformados mantienen un fenotipo por el cual esquivan las señales locales celulares que suprimen su crecimiento, adquieren su propia señalización de crecimiento independiente de señales externas, evaden la apoptosis, desarrollan un ilimitado potencial de proliferación, generan su propia red de vasos sanguíneos para obtener los nutrientes y el oxígeno que necesitan (angiogénesis) y desarrollan mecanismos que permiten que las células tumorales se separen del tumor principal, penetren al torrente sanguíneo y linfático y alcancen tejidos distantes donde crecen como tumores secundarios o metástasis<sup>32</sup>. Concomitantemente a la transformación tumoral del queratinocito, otras múltiples alteraciones genéticas participan e inciden en los mecanismos naturales involucrados en el procesamiento y presentación de los antígenos por la célula.

Para entender globalmente la historia natural de la infección por el VPH y la biología del CC es imperativo conocer además las condiciones fisiopatológicas locales asociadas. Los diferentes factores de riesgo clínicos conocidos en las pacientes para desarrollar CC se traducen como microtraumatismos celulares o procesos inflamatorios irritativos crónicos que en la carcinogénesis participan como co-factores moleculares de *promoción* tumoral concomitantes a la infección por los VPH oncogénicos, la cual ha provocado la *iniciación* tumoral<sup>8</sup>. Las diferentes redes de señalamientos en el desarrollo de la inmortalización y carcinogénesis donde participan estos co-factores moleculares, se conocen muy parcialmente (p.e. modificando el balance oxidativo-antioxidativo celular que influye en la regulación transcripcional de múltiples genes)<sup>33,34</sup>.

### **II.3 Respuesta inmunológica contra el cáncer cervicouterino**

Los pasos fundamentales en la inmunodefensa contra las infecciones virales son el reconocimiento del antígeno, la amplificación de la respuesta adaptativa celular y la regulación de esta; cuando alguno de ellos falla se puede presentar la persistencia de la infección viral.

Aproximadamente el 40% de los adultos activos sexualmente son infectados por VPH<sup>5</sup>. Las respuestas inmunológicas innata y adaptativa contra el VPH son capaces de eliminar en más del 90% de estas infecciones, lo que protege consecuentemente del desarrollo de tumores relacionados con los VPHs oncogénicos<sup>11,35</sup>. Sin embargo en la infección viral del queratinocito se presentan diferentes condiciones fisiopatológicas que limitan teóricamente la respuesta inmunológica efectora local. La erradicación de la infección por VPHs en sujetos sanos, requiere desarrollar una activación efectiva tanto de respuesta innata como de la adaptativa. Así en los pacientes que cursan con inmunosupresión (p.ej. sujetos transplantados que toman medicamentos inmunosupresores) o inmunodeficientes (p.ej. infectados por HIV), el riesgo de infección persistente y secundariamente de transformación a malignidad se incrementa importantemente<sup>11,36</sup>, lo que sugiere que el sistema inmunológico juega un papel importante en la prevención de estos tumores<sup>36-40</sup>. La ignorancia inmunológica del huésped a la infección por VPH puede permitir el ciclo replicativo del virus, lo cual conduce a la infección persistente.

La primera línea de defensa en las mucosas contra la infección viral es la respuesta inmunológica innata (RII); en esta participan, citocinas, células centinelas locales, el sistema del complemento y linfocitos citotóxicos no-específicos llamados asesinos naturales (NK). Poco después la RII interactúa con la respuesta inmunológica adaptativa (RIA) y se inicia la respuesta celular específica a través de linfocitos B y T. Un gran eslabón para ambos tipos de respuestas es la participación de las células presentadoras profesionales de antígenos, especialmente las células dendríticas y el patrón de citocinas liberadas. Los linfocitos B de la paciente producen anticuerpos (que se unen a los viriones en la sangre y en las mucosas, disminuyendo potencialmente el número de células que podrían ser infectadas) en particular contra proteínas de la cápside L1 del VPH<sup>35,41</sup>. Los anticuerpos neutralizan, opsonizan a los virus y mediados por el complemento o por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, lisan las partículas virales o las células infectadas por virus. Sin embargo aunque los linfocitos B guardan un papel importante en la prevención de la infección, tienen efecto limitado contra la infección establecida y en la regresión de las infecciones por VPH.

Es evidente que la respuesta inmunológica celular y especialmente la de los linfocitos T es el mecanismo efector antiviral más importante tanto en la eliminación de las células infectadas como de las células transformadas (reconocen y matan a las células que presentan antígenos virales y secretan citocinas anti-virales)<sup>42</sup>. Los linfocitos T exploran continuamente la superficie de todas las células y destruyen a aquellas que presentan marcadores antigénicos extraños. Los linfocitos T desarrollan por lo menos dos fases para responder contra los VPH: la fase de reconocimiento, en la cual identifican los antígenos virales y la fase efectora, en la cual los

linfocitos T CD4<sup>+</sup> liberan citocinas antivirales, organizan la respuesta inflamatoria, ayudan a inducir anticuerpos y linfocitos T CD8<sup>+</sup> y probablemente maten células; y los linfocitos T CD8<sup>+</sup> matan a las células infectadas por virus, liberan citocinas antivirales, reclutan células de la respuesta inflamatoria y eliminan los productos virales de células vecinas infectadas<sup>43,44</sup>.

Las células de los vertebrados han elaborado el mecanismo de degradar y mostrar las proteínas propias y extrañas en su superficie. Localmente las células dendríticas (DC) muestrean y presentan muy eficientemente las proteínas de las células cercanas; una vez dentro de las DCs estas proteínas son procesadas en fragmentos peptídicos. En presencia de señales inflamatorias de “peligro” provocadas por necrosis tumoral, trauma celular, co- infección u otras señales de citocinas pro-inflamatorias, las DCs expresan en su superficie moléculas co-estimuladoras pertenecientes a B7, y viajan del cérvix a los ganglios linfáticos regionales donde los péptidos tumorales son procesados y presentados en la superficie celular unidos a las moléculas clase I o clase II del MHC para interactuar con los receptores específicos de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> o CD4<sup>+</sup> respectivamente. Así las DCs transmiten a los linfocitos T un estímulo de activación convirtiéndolos en “células efectoras”, denominándose ahora linfocitos citotóxicos CD8<sup>+</sup> y linfocitos ayudadores CD4<sup>+</sup>. Las células efectoras adquieren también moléculas de reconocimiento del sitio en el cual (“homing”) las DC tomaron el antígeno tumoral asociado (ATA) y regresan a dichos tejidos donde específicamente atacan a las células que presentan dichos ATAs. Los LTC específicos destruyen a los queratinocitos infectados, y los linfocitos T ayudadores CD4<sup>+</sup> secretan citocinas pro-inflamatorias (como la IL-2) para potenciar el efecto de los LTCs y estimular la respuesta IgG2a de los linfocitos B (este isotipo de anticuerpo activa la cascada de complemento, se une a los receptores Fc de los macrófagos o de los linfocitos NK que permite iniciar la citotoxicidad dependiente de anticuerpos). Al mismo tiempo las DC reclutan y secretan mediadores que aumentan el ambiente inflamatorio y promueven la respuesta antiviral de los linfocitos T. Algunos linfocitos T efectoras después de haber lisado (por medio de gránulos de perforina y granzima) o inducido el suicidio (vía Fas) a las células dianas, se retiran y estimulan su reproducción, convirtiéndose en células de memoria, que podrán reactivarse nuevamente cuando se encuentren con el mismo antígeno. Múltiples estudios han demostrado la importancia de la respuesta antitumoral mediada por linfocitos T contra las proteínas oncogénicas E6 y E7 del VPH 16<sup>45-49</sup>.

Diferentes razones conducen a que en la infección por los VPH se genere una respuesta inmunológica poco vigorosa<sup>44,50</sup>. Los VPHs son inmunógenos naturales débiles debido a que su patrón de composición molecular no es reconocido por los receptores de las células de la respuesta innata (receptores similares a Toll como T1r3 y T1r9); por estar constituidos por DNA

de doble cadena (a diferencia de virus constituidos de doble cadena de RNA, que son inmunógenos potentes), son poco inmunógenos, no contienen señales intramoleculares de peligro virales (p.ej. CpG en su DNA ó RNA de doble cadena), y su expresión se presenta en escasa cantidad (comparado con la expresión de proteínas inmunogénicas de otros virus), provocando respuesta inmune innata local mínima. En estas condiciones la infección por los VPHs en células epiteliales, no genera un ambiente de citocinas de tipo pro-inflamatorio sino de tipo anti-inflamatorio, predominando inmunomoduladores negativos como IL-10 y TGF- $\beta$ . La infección por VPHs en los queratinocitos o en las lesiones preinvasoras epiteliales son limitadas a las células superficiales y no penetran por debajo de la membrana basal. Los VPH mantienen un ciclo de vida sin salir del queratinocito infectado, inducen proliferación celular más que histólisis, no provocan lisis celular, por ello no inducen una respuesta inflamatoria potente; no se liberan citocinas ni mediadores solubles del complemento y con esto se impide la activación y el sinergismo entre las RII y las RIA. Además de que en general los queratinocitos y particularmente las células epiteliales escamosas diferenciadas tienen limitada capacidad natural de procesar y presentar antígenos. Además la infección por VPHs no provoca fase virémica y por lo tanto cursa sin presentación sistémica del antígeno<sup>7,29</sup>, ya que su replicación esta inserta en el programa de diferenciación del queratinocito. Además los VPH no infectan las células presentadoras profesionales de los antígenos (CPPA), no provocan lisis en los queratinocitos, lo que impide que las CPPA fagociten a los viriones y presenten los antígenos virales a los linfocitos B y T. Por ello no se genera una respuesta sistémica inmune. Dadas todas estas condiciones, el aparato inmunocompetente puede tener limitada oportunidad de identificar y combatir eficientemente, y la respuesta inmunológica natural contra la infección por VPHs se torna débil comparada contra la generada en la mayoría de otras infecciones virales. Por lo tanto en la infección por VPHs se desencadena una respuesta inmunológica innata limitada en su hospedero que a su vez bloquea la generación de señales que inicien la respuesta adaptativa específica global, por lo que frecuentemente el huésped queda inmunológicamente ignorante de la infección.

Experimentalmente se ha demostrado que la respuesta inmunológica natural contra la infección primaria de VPHs es lenta en aparecer<sup>12,41</sup>, aun cuando las proteínas virales se apliquen con adyuvantes inmunogénicos (p.e. adyuvante de Freund). Los anticuerpos específicos contra L1-VPH 16 se han identificado varios meses después de la primer infección viral y los correspondientes contra E7 solo se detectan frecuentemente en etapas de cáncer invasor. También la respuesta inmunológica celular sistémica parece presentarse tardíamente, aunque

su identificación ha sido difícil probablemente por la baja frecuencia de linfocitos T CD8+ citotóxicos de memoria anti-VPH circulantes.

En general las infecciones virales persistentes se asocian inicialmente a una respuesta deficiente de defensa celular intrínseca, luego a una respuesta inmunológica innata deficiente y finalmente a una respuesta adaptativa deficiente. Siendo la apoptosis un mecanismo de defensa celular intrínseca que limita la replicación viral, ya que muchas células mueren rápidamente después de una infección viral <sup>51</sup>, esta respuesta se encuentra probablemente bloqueada en los queratinocitos infectados por VPHs oncogénicos ya que la oncoproteína E6 inhibe la apoptosis. Además de que en general la respuesta inmune natural del huésped contra la infección por VPHs es débil, los VPHs oncogénicos pueden ser ignorados porque emplean adicionalmente otros mecanismos aún no identificados, para minimizar o evadir la respuesta innata y adaptativa.

-Las proteínas estructurales y no estructurales de los VPHs son el blanco antigénico de la respuesta inmunológica.

Siendo que en la neoplasia intraepitelial cervical y en el CC los VPH oncogénicos expresan constitutivamente sus proteínas virales y algunas de ellas son moderadamente inmunogénicas, en teoría, podrían ser el blanco antigénico para desarrollar o modular la respuesta inmunológica local o sistémica de la paciente.

En la década pasada se identificaron a las proteínas E6, E7, E2, L1 como ATA del CC. Las principales proteínas transformantes de los VPHs de alto riesgo son las proteínas tempranas E6 y E7. Estos ATAs se han reconocido en sus diferentes plataformas bioquímicas, desde su configuración genómica y proteómica hasta como péptidos inmunogénicos restringidos en el polimorfismo de los diferentes alelos de las moléculas clase I del antígeno de histocompatibilidad leucocitario humano (HLA). La mayoría de los epítopes identificados actualmente están restringidos al alelo HLA-A2+ (el antígeno de histocompatibilidad más frecuentemente identificado en las poblaciones caucásicas). La proteína E6 es una proteína multifuncional cuya función es de transactivador transcripcional, se une a una proteína asociada (E6Ap) que liga la ubiquitina al p53, promoviendo su degradación por el proteosoma; induce la immortalización de queratinocitos y fibroblastos en cultivos *in vitro*; E6 es una proteína básica nuclear y citoplasmática de 18 kDa, contiene 4 residuos de cisteína formando 2 dedos de zinc. La proteína E7 sola, o en cooperación con E6 y *ras* provoca immortalización y transformación de queratinocitos y fibroblastos en cultivos *in vitro*, induce la síntesis de DNA y la proliferación celular. Algunas regiones de la proteína E7 se unen al Rb hipofosforilado, e inhiben que este último bloquee el factor de transcripción E2f, lo cual permite la inducción de la transcripción de

los genes dependientes de E2f (entre ellos Cdk2 dependiente de ciclina A) y que las células progresen a la fase S. E7 es una proteína nuclear y citoplasmática de 10 kDa, parecida a la E1A de los adenovirus y a la Tag del SV40. La L1 es la principal proteína de la cápside viral, se oligomeriza en pentámeros y estos capsómeros se ensamblan en partículas semejantes a virus, las cuales son potentes inmunógenos.

Las proteínas E6 y E7 del VPH16 son expresadas constitutivamente en la etapa de carcinogenesis y progresión tumoral, y digeridas intracelularmente de manera “natural” por las enzimas del proteosoma, produciendo pequeños fragmentos peptídicos antigénicos o epítopes que son transportados al retículo endoplásmico, donde se combinan con las moléculas clase I o II del HLA. Los epítopes virales restringidos al alelo HLA-A\*0201 que evocan respuesta de los linfocitos T CD8+ citotóxicos (LCTs) *in vivo* en humanos de la proteína E6 corresponden al péptido 29-38-TIHDIIIECV y de la proteína E7 a los correspondientes 11-20-YMLDLQPETT; 82-90-LLMGTLGIV; y 86-93-TLGIVCPI<sup>52</sup>. Una vez identificada la secuencia de estos oligopéptidos, pueden ser sintetizados artificialmente por métodos automatizados en fase sólida.

La identificación y secuenciación molecular de los estos oligopéptidos tumorales inmunogénicos requiere emplear técnicas experimentales complejas como la elusión de los complejos péptido-HLA-A2+ de las células presentadoras de antígenos, cromatografía líquida de alta presión y espectrometría de masas. Diferentes diseños experimentales de vacunación profiláctica o terapéutica en animales de laboratorio con estos oligopéptidos, han demostrado respuesta antitumoral local y sistémica significativa en animales *in vivo*, tanto como respuesta antitumoral de los linfocitos T específicos en humanos *in vitro*<sup>46,48,49,53</sup>. En la mayoría de los protocolos de inmunoterapia contra NIC y CC se han empleado estos oligopéptidos tumorales como vacunas terapéuticas. Algunos otros oligopéptidos de las proteínas no estructurales E6 y E7 recientemente identificados con estas técnicas u otras igualmente complejas como el análisis serológico de bibliotecas de expresión de tumores humanos (SEREX) se encuentran en valoración para comprobar su inmunogenicidad y su capacidad de provocar respuesta de prevención y protección antitumoral.

Los LCT CD8+ anti-VPHs se pueden identificar y medir basados en dos de sus atributos: su capacidad para expandirse por estimulación *in vitro* de células presentadoras profesionales de antígenos (CPPA) cargadas con la proteína o el epítope que reconocen, y su capacidad de lisar a las células blanco presentadoras del ATA. Los LCT específicos antivirales se pueden identificar por diferentes inmunométodos, como el de microcitotoxicidad, marcando las células blanco con isótopos radiactivos, empleando tetrámeros de HLA unidos a epítopes específicos para identificar

los linfocitos T específicos, midiendo la secreción de citocinas de los linfocitos T por ELISPOT o por su expresión intracelular por medio de FACS.

La modulación positiva de la respuesta inmunológica dirigida contra las proteínas virales tardías estructurales (estrategia de prevención) o contra las proteínas tempranas no estructurales (estrategia de tratamiento) potencialmente modificaría el curso de la infección viral y su persistencia, de la carcinogénesis, de las lesiones tumorales preinvasoras e invasoras y la diseminación tumoral.

- Interacción huésped-virus en la infección por VPH, carcinogénesis y progresión tumoral.

La infección persistente de VPH mas los co-factores moleculares que favorecen su persistencia y progresión aunados a la ineficiente respuesta inmunológica local de la paciente son probablemente los elementos más importantes que participan para la carcinogénesis cervical y progresión tumoral.

La primer línea de defensa en las mucosas contra la infección viral es su respuesta inmune innata; en esta participan múltiples señalamientos parcialmente específicos de reconocimiento de moléculas extrañas para responder con células de la respuesta inmune innata (macrófagos, linfocitos NK), e iniciar la respuesta celular específicas (linfocitos B y T). Las CPPA, particularmente las células dendríticas son un eslabón esencial de ambos tipos de respuesta. Los linfocitos B de la paciente producen anticuerpos particularmente contra proteínas de la cápside L1 del VPH <sup>35,50</sup>, estos son efectores parciales contra la regresión de infecciones por VPH. El papel de los anticuerpos anti-VPH es limitado. A diferencia de los linfocitos B, la respuesta de los linfocitos T es el mecanismo efector mas importante en la eliminación de las células infectadas y de las células transformadas.<sup>29</sup> Diferentes estudios han demostrado respuesta antitumoral mediada por linfocitos T contra las proteínas oncogénicas E6 y E7 del VPH 16

En diferentes modelos animales de cáncer asociados a virus oncogénicos, la inmunidad mediada por células es un importante mecanismo para la eliminación de las neoplasias subclínicas de las células infectadas por virus, específicamente los linfocitos T CD8+ citotóxicos destruyen a las células tumorales de una manera antígeno-específica <sup>45-47</sup>. La respuesta específica de los LTC contra los antígenos virales en mujeres con cáncer cervicouterino ha sido poco estudiada <sup>54-59</sup>. Algunos grupos han demostrado la presencia de LTC contra VPH 16 en pacientes con neoplasias cervicales, sin embargo la proporción positiva presenta rangos de 18% <sup>56</sup> a 100% <sup>59</sup>, predominando las cifras bajas <sup>54,56,58</sup>, o estudios de menos de 5 pacientes <sup>55,57,59</sup>. Otros grupos, empleando el péptido 11-20 de la proteína E7 de VPH 16 restringido a pacientes con alelo HLA-A\*0201 para estimular los LTC, han demostrado gran variabilidad en la detección

de LTC específicos anti-VPH en las pacientes <sup>56,57</sup>. En conjunto, estos estudios indican que los LTC contra VPH pueden ser detectados en pacientes, pero su variabilidad sugiere diferencias entre la respuesta individual anti- VPH de las pacientes, o en la eficiencia en los métodos de detección y re-estimulación *in vitro* de los LTC <sup>60</sup>.

Múltiples técnicas han sido usadas para valorar la respuesta de los LTC contra las E6 y E7 del VPH 16 en pacientes con CC, principalmente a través de los ensayos directos de citotoxicidad y de ELISPOT. Probablemente las células presentadoras de los antígenos y los tipos de células blanco usadas para la re-estimulación y para la valoración del efecto citotóxico, sean el factor mas importante que provoca la variabilidad de estos resultados. Algunos grupos usando líneas celulares de linfoblastos B <sup>54</sup>, células mononucleares de sangre periférica<sup>55-57</sup> o células dendríticas<sup>58,59</sup> como células presentadoras de antígenos para la re-estimulación *in vitro*, con péptidos HLA alelo específicos <sup>55,56,58</sup>,o proteínas solubles recombinantes <sup>54,57,59</sup> como ATA. El estudio donde se empleo células dendríticas (DC) para la re-estimulación *in vitro*, pulsadas con proteína recombinante completa E7 <sup>59</sup>, detectó LTC específicos contra VPH16 en 100% de las pacientes con CC. Sin embargo, solamente solo dos pacientes fueron incluidos en este estudio <sup>59</sup>. Las DC autólogas pulsadas con péptidos <sup>61</sup>, o con las proteínas completas E6 y E7 fusionadas <sup>62</sup>, transfectadas con RNA de E6/E7 <sup>63</sup>, o transducidas con vectores de adenovirus asociados <sup>64,65</sup> han sido empleadas también para inducir una respuesta más fuerte de los LTC *in vitro* contra la proteína E7 del VPH16 en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donadores sanos. Las DC transfectadas con RNA también han sido empleadas exitosamente como blancos en ensayos de citotoxicidad <sup>63</sup>. En diferentes modelos tumorales como el melanoma <sup>66</sup>, las DC transfectadas transitoriamente han también sido usadas exitosamente para la re-estimulación *in vitro* de los PBMC. Estos resultados indican que las DC tanto pulsadas con lisados tumorales <sup>67</sup>, péptidos, proteínas, transfectados con DNA/RNA o tranducidos viralmente, son probablemente el mejor sistema de re-estimulación *in vitro* de los LTC antes de medir su respuesta citotóxica.

Se han identificado diferentes mecanismos por los cuales los VPHs alteran las respuestas inmunes innata y celular, que se comentaran adelante.

#### **II.4 Mecanismos que emplean los VPH para evadir a la respuesta inmunológica del hospedero en pacientes con cáncer cervicouterino:**

Los mecanismos que emplean los VPH para evadir la respuesta inmunológica permiten la persistencia de la infección viral, la carcinogénesis cervical, y la progresión tumoral.

Los VPH oncogénicos alteran diferentes condiciones para que la respuesta inmunológica en contra de la infección se torne ineficiente en la paciente, algunas de las mas importantes son:

1) la proteína E7 bloquea la actividad del  $\text{INF-}\alpha$ , inhibiendo los genes inducibles que responden a la infección viral en el epitelio cervical y por ello los VPH no son reconocidos como extraños (señal de peligro), 2) no generan respuesta inflamatoria, 3) liberándose además localmente citocinas inmunosupresivas como  $\text{TFG-}\beta$ , IL-10 e IL-13; 4) asimismo las CPP (células de Langerhans o células dendríticas locales) son impedidas para su maduración lo que reduce la presentación del antígeno tumoral asociado (E6 y E7); induciendo con ello, que la respuesta de las población de linfocitos T CD4+ y CD8+ no sea Th1-citolítica, sino de tolerancia<sup>68</sup>. Además las células tumorales del CC son deficientes en el procesamiento (E5 evita el adecuado pH-procesamiento antigénico dependiente) y la presentación de los antígenos propios y extraños por una frecuente desregulación en la expresión de moléculas del clase I del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, o HLA en el humano), debido en parte a la inestabilidad génica y a diversas mutaciones en el cromosoma 6, sitio de codificación y transcripción de las moléculas del MHC y del sistema funcional del inmunoproteosoma.

La infección persistente de VPH aunada a co-factores moleculares parcialmente conocidos (relacionados a los factores clínicos de riesgo) mas una respuesta inmunológica local fallida en la paciente son probablemente los elementos mas importantes que participan para la carcinogénesis cervical y la progresión tumoral.

Los VPHs evaden frecuentemente las respuestas inmunológicas innata y adquirida<sup>68</sup>. Como hemos anotado, el sistema de defensa de la respuesta innata antiviral comprende citocinas liberadas por las células infectadas (interferones tipo 1,  $\text{TNF-}\alpha$ ), células centinelas locales (DCs y macrófagos), el sistema del complemento y linfocitos NK. Los genomas virales codifican una gran variedad de productos que minimizan los diferentes mecanismos de la respuesta inmune innata. Las citocinas participan en casi todas las fases de la respuesta inmune contra la infección viral, incluyendo el control de la inflamación, la inducción del estado antiviral y la regulación de la respuesta adaptativa, y constituyen una de las principales formas de comunicación entre la respuesta innata y la respuesta adaptativa inmune. Las primeras citocinas en aparecer como respuesta a las infecciones virales son el  $\text{INF-}\alpha$  y el  $\text{INF-}\beta$ , seguidos del  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-6, IL-12 e  $\text{INF-}\gamma$ . Los VPHs oncogénicos impiden la respuesta antiviral inmune innata en el epitelio cervical porque las proteínas E6 y E7 bloquean la actividad del  $\text{INF-}\alpha$  y del  $\text{INF-}\beta$  por inhibición, tanto de su síntesis (bloqueando la transcripción de sus genes inducibles) como de algunas vías de señalización propias (como p48), al no emitir señales de peligro, los VPH no son reconocidos como extraños. Normalmente los interferones tipo 1 ( $\alpha$  y  $\beta$ ) son secretados en altas

concentraciones después de que las células son infectadas por virus, seguidas por TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 e INF- $\gamma$  como parte de la respuesta inmune innata. Los interferones tipo 1 inducen un estado antiviral por inhibir la replicación viral, inhiben la proliferación celular, estimulan el crecimiento y función citolítica de los NK, incrementan la expresión de moléculas clase I del MHC y disminuyen la expresión de moléculas clase II del MHC, activan la síntesis de gran cantidad de proteínas que provocan en la célula infectada y en sus vecinas la destrucción celular, y además estimulan la proliferación de los linfocitos B. Al no liberarse los INF se bloquean todas estas acciones <sup>69</sup>. Experimentalmente se puede modular positivamente la respuesta inmune de protección anti-viral cuando al administrar el ATA se añade un estímulo inflamatorio (p.ej. endotoxina bacteriana).

No obstante que normalmente en la infección por VPH se provoca una respuesta de citocinas de tipo pro-inflamatorio Th1 (INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6), se ha observado que cuando concurre otra patología cervical simultánea a la infección por VPH se produce un cambio hacia la respuesta de citocinas de tipo anti-inflamatorio Th2 (IL-10, IL-13, TGF- $\beta$ ); así las pacientes con CIN tienen disminución de IL-2, INF- $\gamma$  y elevada producción de IL-4, e IL-10 <sup>50</sup>. En general las respuestas Th1 y Th2 tienen una correlación inversa, cuando una se incrementa, la otra decrece. Las células Th1 producen citocinas que promueven la respuesta inflamatoria y la actividad de los linfocitos T citotóxicos, y las células Th2 sintetizan citocinas que estimulan la respuesta de producción de anticuerpos.

La IL-10 además de debilitar la respuesta mediada por linfocitos T, propicia baja de expresión de moléculas co-estimuladoras en las DCs e inhibe su migración a los ganglios linfáticos regionales. El TGF- $\beta$  está directamente implicado en el escape de las células tumorales del reconocimiento de las células inmunocompetentes, en ensayos de vacunación terapéutica al bloquear esta citocina con anticuerpos anti-TGF- $\beta$  ha permitido la regresión de tumores. Tomando en conjunto un microambiente con niveles altos de TGF- $\beta$  e IL-10 y bajos de TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ , resulta en un nivel bajo de presentación antigénica con un bajo nivel de reconocimiento por los LCT <sup>68</sup>; esta condición de respuesta inmune Th1 deficiente conduce a persistencia de la infección viral y esto incrementa la oportunidad para desarrollar malignidad <sup>50</sup>.

La proteína E6 inhibe la adhesión celular entre las células epiteliales y las CPPA (células de Langerhans o DC locales) por baja expresión de E-caderina (la cantidad de E-caderina en la superficie celular de queratinocitos infectados por VPH-16 se reduce) <sup>70</sup>. Por esto, las CPPAs en estos sitios son escasas y por el ambiente de citocinas anti-inflamatorias son impedidas para alcanzar su maduración, con lo cual se reduce aún más la presentación del ATA del CC a los linfocitos T; induciendo con ello, que la respuesta de la población de linfocitos T CD4+ y CD8+

no sea Th1-citolítica, sino Th2-de tolerancia <sup>35</sup>. Las proteínas E6 y E7 al ser cargadas y presentadas por DC inmaduras transmiten señales tolerogénicas a los linfocitos T. A este respecto, también influye la proteína E5, la cual acidifica los endosomas, reduciendo aún más el procesamiento y presentación del ATA a las CPPAs.

Además las células tumorales del CC son deficientes en la presentación de los antígenos propios y extraños por vía endógena tanto por la desregulación frecuente en la expresión de moléculas de clase I del MHC, como de las proteínas del sistema de transportación del antígeno del citoplasma a la luz del retículo endoplásmico (Tap1-Tap2), en parte debido a la inestabilidad génica y a las diversas mutaciones que se presentan en el cromosoma 6, sitio de codificación y transcripción de las moléculas del MHC y del sistema funcional del inmunoproteosoma. Todo esto, más un microambiente inmunosupresivo de citocinas-Th2 permite que la célula tumoral escape de los mecanismos de inmunoidentificación y citotoxicidad por los linfocitos T CD8+ específicos <sup>35,50</sup>.

La presentación en escasa cantidad de antígenos extraños o “no propios” en la periferia puede inducir a respuesta de tolerancia inmune periférica tanto por falla de los linfocitos T al detectar el antígeno, o porque la regulación inmune del linfocito T funcionalmente competente se restringe por la participación de linfocitos T CD4+ CD25+ inmunorreguladores negativos. Otro mecanismo de escape inmunológico observado durante la progresión hacia el cáncer cervical esta derivado de la acción de los linfocitos T por si mismos. Se ha demostrado que la expresión reducida de la cadena zeta del CD3 en el receptor TCR en los linfocitos T de sangre periférica en pacientes con CC (y en otros tumores) puede contribuir a la incapacidad del huésped para generar una respuesta inmunológica efectiva contra las células infectadas por VPH <sup>41,71</sup>.

Como mencionamos, el control local de la infección por VPH se lleva a cabo por una respuesta eficiente del sistema inmunológico del hospedero en la mayoría de los casos. Sin embargo en lesiones preinvasoras de alto grado, en carcinoma *in situ* e invasor se presentan principalmente diversas alteraciones en los sistemas de presentación antigénica celular, más un microambiente inmunosupresivo de citocinas-Th2, esto conduce a que la célula tumoral escape de los mecanismos de inmunoidentificación así como falla en los sistemas de respuesta de linfocitos T CD4+ ayudadores y CD8+ citotóxicos que impiden la regresión o el control inmunológico de estas lesiones <sup>68</sup>.

## **II.5 Diseño de vacunas preventivas y ensayos clínicos de inmunoterapia contra el cáncer cervicouterino**

En la mayoría de los casos, el control local de la infección por VPH se lleva a cabo por una respuesta eficiente del sistema inmunológico del huésped. Sin embargo en las lesiones de alto grado, y de carcinoma *in situ* e invasor se presentan diversas alteraciones en los sistemas de presentación antigénica celular, así como falla en el sistema de respuesta de linfocitos T CD4+ y CD8+, que impide la regresión o el control de estas lesiones.

Cuando la infección persiste, la respuesta inmunológica ha sido ineficiente para combatir la infección por VPH, en los siguientes años se presenta la transformación tumoral asociada, y se desarrollan las lesiones precancerosas y cancerosas cervicales. Las poblaciones con alta incidencia de CC mantienen elevada prevalencia de infección por los VPHs oncogénicos, sus genes y sus oncoproteínas se detectan en el 99% de los casos de CC; demostrándose particularmente la co-expresión de las proteínas E6 y E7, cuya influencia mantienen el fenotipo tumoral. La co-expresión constitutiva de estas oncoproteínas virales en las lesiones preinvasoras e invasoras las colocan como el blanco antigénico para la respuesta inmunológica del hospedero<sup>41,44</sup>.

El sistema inmunológico es el responsable de mantener el adecuado equilibrio que necesitamos para mantener la tolerancia a los antígenos propios y la respuesta a los antígenos extraños. En el modelo inmunológico del CC y lesiones preinvasoras, las proteínas E6 y E7 se reconocen como sus antígenos tumorales asociados ATA. Se han identificado diferentes estrategias que los VPHs emplean para minimizar la respuesta inmune, que sumadas a algunas deficiencias propias del hospedero provocan que la respuesta inmunológica anti-viral se torne tolerante o no efectiva para erradicar al virus<sup>41,44,68</sup>. Novedosas estrategias inmunoinvasivas consistentes en modular positivamente ciertos pasos de la generación de respuesta adaptativa intentan romper la respuesta de tolerancia inmune antiviral. Las vacunas profilácticas antivirales tienen el objetivo de prevenir el desarrollo del CC, instruyendo electivamente la respuesta inmune humoral del hospedero mediante la administración de subunidades virales<sup>35</sup>; las vacunas terapéuticas evitarían la recurrencia tumoral en condiciones de enfermedad residual mínima o se emplearían con la finalidad de regresión de las lesiones invasoras avanzadas por medio de la modulación positiva de la respuesta de linfocitos T CD8+ antivirales<sup>72</sup>.

Las principales estrategias que emplean los VPH para evadir la respuesta inmune son actualmente conocidas<sup>68</sup>, y a partir de ello, diferentes grupos de investigadores trabajan en generar, manipular e inmunomodular positivamente la respuesta inmune celular contra los ATA del CC, romper su tolerancia y tornarla efectiva.

Las vacunas contra los VPH han sido desarrolladas dirigidas hacia 2 principales blancos clínicos: pacientes quienes en riesgo de ser expuestas al virus (prevención) y quienes cursan con

infección por VPH o neoplasia asociada al VPH establecidas, que requieren tratamiento para evitar progresión futura de la enfermedad (terapéutica)

Se han iniciado grandes esfuerzos para construir vacunas profilácticas contra los VPHs de alto riesgo, y emplear estrategias racionales inmunoterapéuticas adyuvantes a los tratamientos convencionales en pacientes con CC recurrentes o con alto riesgo de recurrencia (actualmente se encuentran registrados 7 protocolos de inmunoestrategias contra el CC en el Instituto Nacional del Cáncer de EE UU; uno de ellos emplea la aplicación de virus recombinantes con E6 y E7 en pacientes con CC en etapas clínicas iniciales: <http://clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00002916>).

La respuesta inmune humoral más efectiva obtenida contra las infecciones por VPHs es la generación de anticuerpos neutralizantes que reconocen los epítopes conformacionales específicos contra la proteína de la cápside L1. Estos anticuerpos neutralizantes generados, en títulos bajos representan la protección humoral contra futuras infecciones del mismo genotipo de VPH y son actualmente la principal estrategia en la vacunación profiláctica anti-VPHs.

Las infecciones persistentes y las lesiones tumorales asociadas a VPH se acompañan de respuesta inmunológica adquirida débil por los LTC anti E6 y E7; la activación de estos LTC es la base para las diferentes estrategias de vacunación terapéutica<sup>50</sup>. En general la respuesta mediada por células elimina las células infectadas por virus sin dañar a las células no infectadas.

- Primeros resultados exitosos de la vacunación profiláctica contra el cáncer cervical.

Diferentes consorcios biotecnológicos, compañías farmacéuticas y grupos de investigadores están trabajando desde hace más de 10 años en el desarrollo de vacunas profilácticas contra la infección por los principales VPH oncogénicos<sup>73,77</sup>.

Las vacunas profilácticas contra los VPH oncogénicos para ser efectivas, necesitarían generar una respuesta inmunológica efectiva humoral en la superficie de la mucosa genital, induciendo anticuerpos neutralizantes dirigidos contra los epítopes conformacionales de las proteínas de la cápside viral, capaces de reconocer e inactivar a los VPH antes de que el virus infecte a las células epiteliales del huésped. Esta protección depende de la cantidad de anticuerpos producidos por el huésped, de su disponibilidad en el sitio de la infección y de la duración de su presencia; sustancialmente se requieren mantener niveles altos de anticuerpos IgA en la superficie de las mucosas por largos periodos de tiempo.

Las vacunas preventivas contra la infección por VPH de alto riesgo tendrán un impacto a mediano plazo sobre la prevalencia del CC. Si estas vacunas provocaran protección contra la infección por VPH y se aplicaran en las adolescentes antes de iniciar la actividad sexual, podrían

prevenir el desarrollo del cáncer cervical en las siguientes décadas. El resultado exitoso tendría el potencial de salvar la vida de mas de 200,000 mujeres en el mundo por año.

Una vacuna profiláctica ideal contra los VPHs requiere varios atributos, como el de no provocar riesgos, ser barata en su producción y venta, aplicarse en una sola ocasión, que proteja por muchos años, y que conlleve a una reducción significativa en la incidencia del cáncer cervical<sup>73</sup>.

Por la dificultad de replicar grandes cantidades de VPH en el laboratorio, las vacunas profilácticas han sido diseñadas empleando subunidades virales (componentes virales purificados, pentámeros repetitivos de L1 construidos por biotecnología), mas que utilizar virus vivos atenuados o inactivados. Actualmente la mayoría de los ensayos en vacunas profilácticas emplean las partículas semejantes a virus (PSV), estas partículas recombinantes se construyen con una o las dos proteínas tardías estructurales. La proteína L1 sola o en combinación con L2, se ensamblan en forma de cápsides vacías (sin los genes tempranos no-estructurales). La L1 tiene la capacidad de autoensamblarse en las PSV cuando son expresadas en sistemas de cultivo de células procariontas o eucariotas (levaduras, células de insecto)<sup>78</sup>. Las PSV de L1 se parecen a los viriones de VPH en el exterior, pero por dentro se encuentran vacías, no contienen DNA viral (no son infecciosas). Las PSV de L1 incluyen los epítopes conformacionales de L1 que inducen anticuerpos neutralizantes. La inmunización con PSV de L1 de diferentes tipos de VP susceptibles en modelos animales (conejo, perros, bovinos) protegieron a los animales vacunados contra la infección viral inducida por la aplicación de altas dosis de VPs y generaron adecuada respuesta de los linfocitos B, determinada a través de títulos elevados de anticuerpos neutralizantes<sup>79</sup>.

Diferentes ensayos clínicos en fase I-II demostraron que las PSV de L1 son fuertemente inmunogénicas, induciendo títulos elevados de anticuerpos por lo menos 40 veces mas altos a los encontrados en la infección natural; su aplicación fue bien tolerada, y generaron respuesta inmune humoral local y sistémica<sup>80</sup>, e incluso respuesta celular<sup>79,81</sup>.

Recientemente se ha reportado los primeros resultados exitosos de la vacunación profiláctica anti-VPH 16 y menos del 1% de las mujeres presentaron reacciones adversas, el estudio fue comparativo (placebo vs. PSV de L1- VPH 16) y doble ciego en mujeres jóvenes<sup>75</sup>, fue realizado en 16 centros hospitalarios de EE. UU. empleando la vacuna monovalente desarrollada por los Laboratorios Merck. Se demostró que la vacunación indujo protección significativa contra la infección persistente de VPH 16, títulos altos y persistentes de anticuerpos neutralizantes específicos y protección para desarrollar lesiones premalignas cervicales asociadas al virus. En este estudio, 2392 mujeres recibieron 3 dosis de vacunas con PSV de L1-VHP 16 por vía intramuscular y tuvieron seguimiento de 17.4 meses, la incidencia de infección viral persistente

del grupo que recibieron placebo fue de 3.8 % de mujeres/año y en el grupo vacunadas de 0%; además se presentaron 9 casos de NIC relacionados con VPH 16 en el primer grupo (placebo) contra ninguno en las jóvenes vacunadas. Estos resultados orientan a que esta estrategia tiene gran potencial de reducir la incidencia del CC a mediano plazo.

En teoría, las vacunas polivalentes que cubran los cuatro VHPs de alto riesgo prevalentes -16, -18,-45,-31) podrían prevenir el 80% de los casos incidentes de CC. Si las niñas/adolescentes fueran vacunadas contra estos VPH oncogénicos y este Programa alcanzara el mismo efecto provocado por la vacunación contra el virus de la hepatitis B en niños africanos y asiáticos (iniciada en 1984, por el cual la prevalencia de hepatitis B decreció del 10.5% al 1.7% en 1992, aunado a una reducción impresionante de prevalencia de carcinoma hepatocelular), podría visualizarse el inicio del fin del CC junto con el de otros múltiples carcinomas relacionados con la infección por los VPH oncogénicos<sup>82</sup>.

Nos encontramos aún distantes de tener las condiciones idóneas que se requieren para la aplicación masiva de la vacuna profiláctica contra el CC, existiendo actualmente algunos inconvenientes o limitantes: son caras, se requieren múltiples aplicaciones, el empleo de una proteína purificada (no DNA) hace que su producción y administración sea compleja, y solo protegería de la infección de un solo genotipo viral. Se requieren de evaluaciones futuras en ensayos clínicos fase III que superen los inconvenientes o limitantes actuales en estudios controlados que involucren a más de 10,000 voluntarias (p.ej. emplear vacunas compuestas por los VHPs oncogénicos prevalentes, solos o en combinación con los VPHs no oncogénicos asociados a la presentación de condilomas y verrugas genitales-tipos 6 y 11). Particularmente para reducir el costo en su producción o simplificar la administración de PSV de L1 se planea utilizar vacunación administrada por vía de mucosas (inhalación) o transdérmica, o como comestible (construcción de frutas o cítricos VPH-transgénicos, empleando vectores o plásmidos recombinantes que expresen la proteína completa L1, o los capsómeros de L1 capaces de inducir anticuerpos neutralizantes). Otra alternativa es emplear PSV quiméricas compuestas con las proteínas L1 y L2 (proteínas estructurales) y algunos polipéptidos de las proteínas E6 y E7 (proteínas no-estructurales) para ampliar el panorama de ensayos combinados de vacunación profiláctica/ terapéutica.

Aún quedan múltiples cuestionamientos por contestar relacionados a la eficacia y duración de la respuesta inmunológica que provocarían las vacunas profilácticas contra el CC.

- Resultados preliminares de la inmunomodulación positiva mediada por linfocitos T como tratamiento adyuvante en lesiones preinvasoras y en cáncer cervical.

Recientes estudios han demostrado que la respuesta citotóxica de los linfocitos T CD8+ en cooperación con los linfocitos T CD4+ son factores esenciales en el desarrollo de una respuesta inmunológica eficiente para la regresión de lesiones precancerosas y tumores<sup>83-85</sup>.

La respuesta inmunológica celular natural contra las proteínas no estructurales del VPH es generalmente débil, sin embargo la generada contra la proteína E7 es discretamente intermedia.

El fundamento de la inmunoterapia contra el CC invasor es inmunomodular positivamente la respuesta mediada por linfocitos T eficientes contra las células epiteliales tumorales infectadas que expresan las proteínas E6 y E7 de los VPH oncogénicos. Los estudios en modelos animales<sup>45-47</sup> preclínicos<sup>83,86,87</sup> indican que estas vacunas pueden erradicar los tumores positivos a VPH.

Los intentos iniciales de inmunoterapia contra el CC se han llevado a cabo en pacientes con etapas clínicas avanzadas<sup>58,88,89</sup>, quienes *per se* están inmunodisminuidos debido al gran volumen tumoral y por los tratamientos de radioterapia y quimioterapia recibidos. Más aún, estos intentos se han realizado frecuentemente sin tomar en cuenta las alteraciones en la respuesta inmunológica innata y en el procesamiento y presentación antigénica. A pesar de todas estas limitantes, en escasas pacientes inmunizadas han sido inducido respuestas celular y humoral específicas de tipo parcial, con muy limitado efecto clínico-terapéutico. Los estudios de inmunoterapia en pacientes con lesiones cervicales preinvasoras-VPH positivas son probablemente el modelo clínico mas representativo para valorar el efecto de inmunomodular la respuesta anti-VPH mediada por linfocitos T.

La estrategia de vacunación terapéutica o inmunomodulación positiva mediada por linfocitos T contra las lesiones preinvasoras o el CC es aún más novedosa que la vacunación profiláctica, y solo se han realizado escasos estudios clínicos en fase I-II. Las vacunas terapéuticas o la inmunomodulación positiva de la respuesta inmunológica celular adquirida esta basada en administrar cantidad suficiente de antígeno tumoral asociado al CC en sus diferentes plataformas (presentaciones), y modificar las condiciones locales de inmunosupresión a través de emplear citocinas pro-inflamatorias y adyuvantes celulares del tipo CPPA especialmente células dendríticas. Los ATA pueden administrarse en forma de péptidos sintéticos previamente identificados como epítopes (restringidos particularmente a los alelos HLA-A2), proteínas recombinantes, PSV quiméricas, vectores virales o plásmidos recombinantes. Otras formas de administrarlos que son actualmente menos utilizados, es como lisados tumorales o células tumorales apoptóticas. Los ATAs son colocados o introducidos en las CPPA, empleando diferentes estrategias metodológicas genómicas como pulsarlas, transfectarlas, infectarlas, e hibridarlas para su subsecuente presentación y estimulación de los linfocitos T.

Las vacunas terapéuticas teóricamente podrían beneficiar a las mujeres quienes ya han sido infectadas por VPH o quienes cursan con lesiones preinvasoras o con CC-VPH positivo (que corresponden al 99% de los casos). Su aplicación se dirige a ser adyuvante terapéutico de los tratamientos convencionales. Este tipo de vacunas podrían ayudar a limitar que no progresaran las lesiones de bajo grado, provocar regresión en lesiones de alto grado, prevenir la recurrencia del CC en condiciones de alto riesgo postratamiento, limitar o erradicar el tumor primario, o controlar la diseminación de las metástasis.

En ensayos clínicos inmunoterapéuticos en fase I-II, las pacientes han sido vacunadas con epitopes-HLA específicos de las proteínas E6 y E7 y menos frecuentemente con las proteínas completas recombinantes o con los vectores virales recombinantes. En las pacientes con cáncer invasor avanzado no se ha observado respuesta clínica significativa <sup>58,72,90,91</sup> y solo en casos esporádicos se ha obtenido respuesta parcial, como en el de una paciente con CC metastásico en el cual se empleo células dendríticas pulsadas con la oncoproteína E7 del VPH 18 y se obtuvo remisión temporal de su enfermedad y mejoramiento en su calidad de vida <sup>92</sup>. Los ensayos de vacunación terapéutica en pacientes con lesiones preinvasoras son también escasos, y en ellos se han obtenido respuestas completas en 18% <sup>93</sup> y respuestas parciales en 50% de los casos <sup>93-95</sup>.

A pesar que no se ha demostrado respuesta clínica en las pacientes con lesiones invasoras vacunadas con finalidades terapéuticas, sí, se han demostrado en 10-30% de los casos, respuestas humorales y celulares valoradas en ensayos inmunológicos *in vitro*. En estos estudios se demostró tanto la generación de linfocitos T citotóxicos anti-virales, como de anticuerpos neutralizantes específicos contra las proteínas E6 y E7 de los VPHs oncogénicos <sup>59,89,93,96</sup>.

Una de las actuales estrategias de este tipo de inmunoterapia anti-tumoral es emplear células dendríticas (la CPPA conocida mas eficiente) autólogas pulsadas *in vitro* con los antígenos tumorales, utilizándose como adyuvantes en la estimulación de los linfocitos T contra E7 de VPH 16 y VPH 18 <sup>72,97,98</sup>. Siendo un campo de investigación muy reciente, los primeros resultados han reportado respuestas limitadas, pero prometedoras. Se está investigando en algunos ensayos clínicos sobre diferentes variables del uso de células dendríticas relacionadas con la frecuencia y periodicidad de su administración.

También se pueden combinar estrategias de vacunación profiláctica junto a vacunación terapéutica empleando por ejemplo PSV quiméricas <sup>86,87</sup> como ATA en los ensayos clínicos.

## II.6 Perspectivas de las vacunas profilácticas y terapéuticas contra el cáncer cervicouterino

En los países desarrollados, los recursos económicos y humanos que se invierten anualmente en los programas de detección oportuna de CC, y del tratamiento de lesiones preinvasoras es uno de los principales rubros del presupuesto destinado a la Salud Pública. Este esfuerzo, ha permitido abatir considerablemente la incidencia de las lesiones cervicales invasoras y disminuir notablemente la prevalencia del CC. Varios miles de dólares es el costo estimado por año de vida salvada en estas mujeres<sup>23</sup>. En los países parcialmente desarrollados, la inversión económica destinada al tratamiento del CC, a la detección oportuna del CC y al tratamiento de lesiones preinvasoras siendo significativa, logra solo desafortunadamente un impacto limitado para disminuir la prevalencia de este tipo de neoplasia. Si las vacunas profilácticas protegieran a la mayoría de las mujeres de las infecciones de los VPHs oncogénicos prevalentes, se podría reducir el número de intervenciones o atenciones médicas como colposcopías, biopsias, tratamientos de lesiones preinvasoras e invasoras con el consecuente el importante ahorro de recursos y con la notable reducción de la morbimortadidad causada por el CC. Considerando esto, es teóricamente rentable invertir en la construcción de vacunas profilácticas y terapéuticas contra el CC.

Para alcanzar el éxito en la estrategia de inmunoterapia en el modelo del CC se requieren dos principales condiciones: 1) que la célula blanco transcriba y traduzca la proteína antigénica tumoral en cantidad suficiente, la cual contenga epítopes inmunodominantes que puedan ser presentados por las moléculas del HLA, que las vías del procesamiento y presentación de los antígenos se mantengan íntegras y eficientes, que la célula infectada sea susceptible de apoptosis, y que no secrete o exprese inhibidores locales de la función efectora de los linfocitos T; 2) que el sistema inmunológico adaptativo cuente con linfocitos T efectores con los receptores apropiados para los epítopes blancos susceptibles de intervención inmunológica, en suficiente cantidad (por clonación de linfocitos T efectores), capaces de viajar al tejido blanco, y contener los mecanismos efectores eficientes, para provocar respuesta anti-tumoral de duración suficiente<sup>35</sup>.

Actualmente para la generación de vacunas profilácticas anti-VPH de aplicación masiva, existen algunos limitantes como es el que las PSV son difíciles de producir a gran escala, y su producción es relativamente costosa. Una alternativa sería generar vacunas de DNA, mediante la amplificación del gen de interés (tanto de las proteínas E6/E7 y L1/L2) en plásmidos bacterianos recombinantes; estas estrategias se encuentran actualmente en investigación<sup>99-101</sup>.

Los resultados recientes exitosos de vacunación profiláctica son preliminares, requieren de reproducirlos en series numerosas a través de ensayos clínicos de fase III, para demostrar su gran impacto de beneficio. Mientras esto se alcanza, el papel preponderante en la prevención y control del CC sigue siendo el tamizaje o “screening” basado en los procedimientos del estudio citológico cervical de Papanicolaou en conjunción con las pruebas de identificación del DNA de los VPH y la colposcopia.

Las vacunas terapéuticas para el control de infecciones persistentes, lesiones preinvasoras y CC son aún experimentales y requieren de mayores esfuerzos de investigación clínica para mejorar sus resultados. Se deben superar diferentes retos como la escasa presentación antigénica de las oncoproteínas de los VPHs, que son expresadas en bajos niveles, incrementar los epítopes inmunodominantes restringidos a los principales haplotipos de HLA, aumentar el mínimo tráfico de las poblaciones efectoras de linfocitos T en sitios de las mucosas infectadas por VPH, donde los señalamientos de inflamación son débiles, inducir el aumento de la respuesta innata que ayude a la resolución de la infección persistente, entre otros.

El desarrollo de tratamientos multimodales inmunológicos que induzcan una respuesta potente anti-viral evitarán su evasión de la respuesta adaptativa y contribuirán al control de las lesiones preinvasoras e invasoras. Para ello, múltiples estrategias se han propuesto: 1) emplear diferentes sistemas o plataformas de presentación de ATAs (genes, epítopes múltiples, proteínas recombinantes), en diferentes combinaciones o secuencias para cebar, aumentar o reforzar la respuesta inmune celular antitumoral.; 2) aumentar la antigenicidad de los oligopéptidos previamente identificados, buscar nuevos ATAs de segunda generación, empleando la estrategia denominada “inmunología reversa”<sup>102-104</sup>; 3) aplicar los protocolos de inmunoterapia en pacientes en etapas clínicas tempranas con enfermedad mínima residual; 4) incorporar a los ensayos inmunoterapéuticos basados en linfocitos T, estimuladores de la respuesta inmune innata como fracciones de microorganismos inmunogénicos (*Listeria monocytogenes*)<sup>105</sup>, o como proteínas de choque térmico o polinucleótidos antigénicos como los oligodeoxinucleótidos-CpG<sup>106</sup>. También se podrían obtenerse epítopes inmunodominantes a partir epítopes subdominantes conocidos por medio de la adición de señales de activación como moléculas co-estimuladoras, o modificar 1 o 2 AA en la secuencia peptídica de los epítopes subdominantes (mimotopes) para aumentar su inmunogenicidad; y podría aumentarse la respuesta efectora celular por medio de bloquear los linfocitos supresores naturales T CD4+ CD25+.

Asimismo además de emplear los ATA virales como blanco de la respuesta inmunológica en pacientes con CC, se podrían emplear otros blancos inmunogénicos de otras múltiples proteínas mutadas o sobre-expresadas en las etapas de carcinogénesis, progresión y diseminación

metastásica como las proteínas de diferentes protooncogenes o genes atípicos coincidentes (p. ej. p21/ras, p 53, beta-catetina, telomerasa, Ki-67), o genes relacionados con la invasividad o con el proceso de diseminación metastásica identificados en la expresión dinámica tumoral, con la finalidad de inmunomodular positivamente múltiples linfocitos T policlonales específicos contra múltiples blancos inmunogénicos de diferentes proteínas en un mismo tumor.

La evaluación de la respuesta inmunológica antitumoral *in vivo* en el humano es difícil, y el mejor método es la respuesta clínica del paciente. Sin embargo, diferentes metodologías experimentales nos ayudan, y aunque precisas para medir las etapas de reconocimiento y amplificación de la respuesta inmune *in vitro* (previamente las hemos comentado) y permitirían predecir la respuesta clínica. El inmunomonitorio de la respuesta anti-tumoral de los linfocitos T en estas etapas es valioso en los ensayos clínicos de inmunoterapia en este tipo de enfermedad neoplásica.

Indudablemente el campo de la tecnología de las vacunas será beneficiada por los avances en la genómica, proteómica y la bioinformática. La efectividad de la respuesta inmune celular anti-VPH podría ser medida indirectamente por la determinación de algunos parámetros de la enfermedad, incluyendo la carga viral, la detección local de células dendríticas maduras, de linfocitos T CD4+ o CD8+ específicos activos y efectores de memoria-CCR7<sup>neg</sup>, y el patrón local de citocinas Th-1, entre otros.

### III. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este estudio fue el investigar la presencia de los LTCs específicos de sangre periférica contra las proteínas E6 y E7 del VPH 16 en pacientes con cáncer cervicouterino que no recibieron tratamiento antitumoral, empleando ensayos *in vitro* de microcitotoxicidad mediante liberación de cromo, utilizando células dendríticas autólogas transfectadas transitoriamente con plásmidos recombinantes que expresaron *in vitro* los oncogenes E6 y E7 del VPH 16 tanto como células de re-estimulación y posteriormente como células blanco,.

#### Objetivos particulares

i. Construcción de los plásmidos recombinantes p16E6, p16E7 o pNP a partir de la recombinación de los genes completos de E6, E7 de VPH 16 y de la nucleoproteína del virus de la influenza humana A/PR/8/34 (H0N1) al vector de expresión pcDNA3

ii. Generación de células dendríticas maduras a partir de monocitos de sangre periférica cultivados *in vitro* con la adición de GM-CSF, IL-4 y de TNF- $\alpha$  recombinantes humanos

iii. Transfección de las células dendríticas inmaduras autólogas derivadas de monocitos con los plásmidos recombinantes empleando el lípido catiónico DMRIE-C como agente transfectante.

liii Realización de los ensayos de microcitotoxicidad *in vitro*, empleando a los linfocitos de sangre periférica estimulados por un ciclo como células efectoras, a las células dendríticas transfectadas con los oncogenes E6 o E7 del VPH 16 como células estimuladoras (primera fracción) y posteriormente y este mismo tipo de células (segunda fracción) como células blanco.

### III. HIPÓTESIS

Los linfocitos T CD8+ citotóxicos de memoria específicos anti-VPH16 se identifican en los linfocitos circulantes de sangre periférica en la mayoría de las pacientes con cáncer cervicouterino invasor-VPH 16-positivo en los ensayos de citotoxicidad donde se emplean las células dendríticas autólogas maduras transfectadas con los oncogenes del VPH 16 como células estimuladoras y como células blanco.

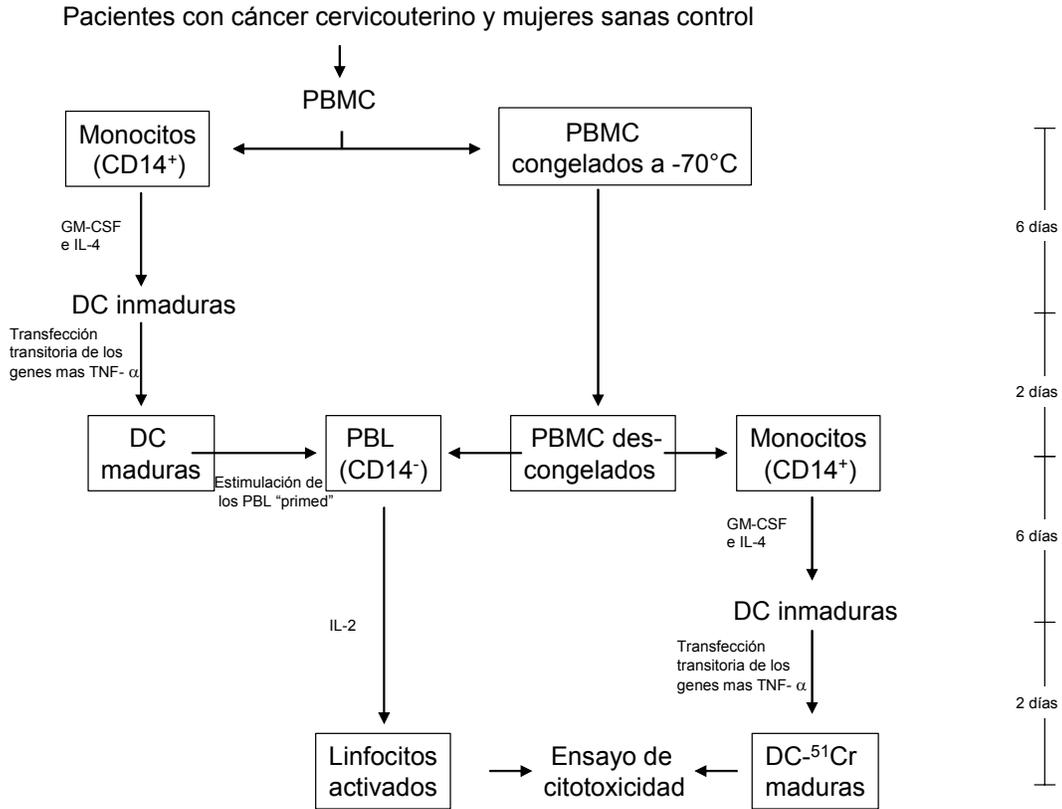
## **IV. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **IV.1 Diseño del estudio**

El presente estudio es un ensayo biomédico de tipo experimental para explorar *in vitro* la respuesta celular inmunológica adquirida, particularmente la correspondiente a la identificación de linfocitos T CD8+ citotóxicos de memoria efectora en sangre periférica en las pacientes con cáncer cervicouterino. Para responder a la pregunta, se empleó el ensayo clásico de valoración de la respuesta citotóxica de los linfocitos T CD8+ que implica su co-cultivo con las células estimuladoras adicionando IL-2. De manera parcialmente novedosa, se emplearon a células dendríticas autólogas maduras transfectadas, con los genes recombinantes, inicialmente como células estimuladoras y luego como células blanco. Este tipo de adyuvante celular permite, a diferencia de lo que sucede en la célula tumoral que el procesamiento y presentación de los antígenos sean óptimos e incrementa la estimulación de los linfocitos T de memoria al potenciar la inmunosinapsis, debido a su expresión de moléculas co-estimuladoras y de adhesión. Las secuencias del diseño experimental se esquematizan en la Figura 1, cada uno de los experimentos fueron repetidos por triplicado con ensayos controles positivos y negativos simultáneos en el proceso de la realización de las metodologías.

### **IV.1 Población de estudio**

Fueron estudiadas veintiún pacientes con cáncer cervicouterino y cuatro mujeres sanas sin infección viral cervical, y con estudio citológico por papanicolaou e imagen colposcópica sin alteraciones. El estudio fue aprobado por el Comité de Investigación de la Institución, se obtuvo el consentimiento por escrito de todas las participantes en el estudio. El VPH 16 fue detectado en solo 12 pacientes con CC y en ninguna de las mujeres sanas, empleando la técnica de PCR específica para VPH16 <sup>107</sup>. Las pacientes con CC-VPH no 16, tanto como las mujeres sanas negativas (control negativo) para el HPV16 fueron investigadas y comparadas con el grupo experimental. Como control positivo de respuesta en el ensayo de citotoxicidad, se empleó la respuesta de los LTCs específicos contra la nucleoproteína del virus de influenza A, esto se realizó en 5 pacientes con CC y en las 4 mujeres sanas, en quienes se obtuvo suficiente cantidad de células.



**Figura 1. Diseño experimental para la valoración de la respuesta específica de los LTC contra las proteínas E6 y E7 del VPH16 en LSP de pacientes con cáncer cervicouterino.** Las células dendríticas autólogas derivadas de monocitos (DCDM) fueron transfectadas transitoriamente con los genes E6 y E7, las cuales fueron utilizadas para re-estimular *in vitro* a LTC de memoria central, y como células blanco de estas células efectoras en los ensayos de citotoxicidad por liberación de cromo. La mitad de las CMSP obtenidos de cada paciente fueron criopreservados a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 8 días (muestra preservada) y el resto de los CMSP fueron procesados inmediatamente (muestra fresca). Los monocitos fueron separados de las CMSP y cultivados por 6 días con GM-CSF y IL-4 para obtener DC inmaduras. Estas DC-inm fueron transfectadas transitoriamente con los genes E6 o E7 y cultivadas adicionalmente TNF- $\alpha$ , por dos días obteniéndose con ello DCs maduras. Los linfocitos de sangre periférica (LSP), obtenidos de la muestra preservada, fueron re-estimulados con las DCs maduras obtenidas de la muestra "fresca" por 8 días en presencia de IL2. Finalmente se realizó el ensayo de citotoxicidad por liberación de cromo radiactivo, incubando los linfocitos activados con DCs maduras marcadas con  $^{51}\text{Cr}$  (células blanco) obtenidas de la muestra "preservada".

## IV.2 Metodologías

### IV.2.1 Generación de células dendríticas a partir de monocitos de sangre periférica

Fueron colectados 40 ml de sangre periférica por cada mujer en tubos heparinizados. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) fueron aislados empleando el gradiente de densidad Ficoll-Hypaque (Lymphoprep Nycomed, Oslo, Norway). La capa celular fue aislada y lavada con solución salina. Se obtuvieron un millón de PBMC por ml de sangre. La mitad de las células fueron criopreservadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 8 días (muestra congelada) y las PBMC remanentes fueron procesadas inmediatamente (muestra fresca). Los monocitos CD14<sup>+</sup> fueron separados por selección positiva con anticuerpos monoclonales de ratón anti- CD14 humano conjugados con microperlas magnéticas usando tecnología de selección positiva de perlas magnéticas (MACS) <sup>108-109</sup> siguiendo las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany). La producción fue generalmente  $1-1.5 \times 10^5$  monocitos/ml de sangre. Alícuotas de  $7.5 \times 10^5$  monocitos fueron sembrados en pozos por duplicado o triplicado en una placa de 6 pozos (Corning, NY) con el medio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis Missouri) enriquecido con 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio, 100 UI/ml de penicilina, 100  $\mu\text{g/ml}$  de estreptomycin, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales, 10 mM de HEPES (pH7.2), 50  $\mu\text{M}$  of  $\beta$ -mercaptoetanol, y 10% de suero bovino fetal (FCS; Hyclone, Logan, UT). Las células fueron cultivadas por 8 días en un incubador humidificado a  $37^{\circ}$  con 5% de  $\text{CO}_2$ . Después de los días 2, 4 y 6 del inicio del experimento, el medio RPMI fue complementado con 800 unidades/ml de GM-CSF humano recombinante (BD-PharMingen, Palo Alto, CA) y 500 unidades/ml de IL-4 (Calbiochem-Novabiochem Co., La Jolla, CA) para inducir la diferenciación de los monocitos a células dendríticas <sup>110,111</sup>(Figura 1). Las células dendríticas derivadas de monocitos (DCDM) fueron verificadas empleando anticuerpos fluorescentes por medio de FACS en los días 6 y 8 después del inicio del experimento. Los diferentes anticuerpos monoclonales de ratón anti-humano en contra de los antígenos para identificar los inmunofenotipos de células dendríticas inmaduras y maduras fueron conjugados con diferentes fluorocromos (FITC, -PE o -PerCP), , en particular anti-CD3, anti-CD13, anti-CD14, anti-CD19, anti-CD25, anti-CD-45, anti-HLA-A2, anti-DR, anti-CD83 (Beckman-Coulter, Miami, FL) y anti-CD86 (PharMingen, San Diego, CA), como previamente ha sido reportado (35, 38-41). Las células fueron analizadas por FACS Coulter Epics XL-MCL con láser de Argón de 15 mV a 488 nm. Al día 6 del cultivo, se obtuvieron las células dendríticas inmaduras (negativas para CD3, CD13, CD14, y CD19, baja expresión MHC I, MHC II, CD83 y CD86, y positivas para CD25, CD45; datos no mostrados). Estas células dendríticas inmaduras fueron transitoriamente transfectadas con los vectores recombinantes (ver

abajo) agregando además 10 ng/ml TNF- $\alpha$  recombinante humano (Biosource International, Camarillo, CA) para promover su maduración (negativas para CD3, CD13, CD14, y CD19, positivas para CD25, CD45, y alta expresión de MHC I, MHC II, CD83 y CD86; datos no mostrados);<sup>66,110,111</sup>.

#### **IV.2.2 Transfección de las células dendríticas inmaduras autólogas derivadas de monocitos (MDDCs) con DNA**

Construcción de plásmidos: Los genes E6 y E7 del genoma clonado de VPH16 fueron amplificadas por PCR usando la DNA polimerasa Pfu (Stratagene, La Jolla, CA) con primers que contenían sitios de restricción en los extremos 5' (secuencias subrayadas en los siguientes). La secuencia y posición de los primers fueron:

5'- AGCGGATCCATGTTTCAGGACCCACAGGAGCGACCCG -3' (posiciones 104-131) y 5'- AGCGAATTCTTACAGCTGGGTTTCTCTACGTGTTCTT-3 (posiciones 532-559) para E6 y 5'- AGCGGATCCATGCATGGAGATACACCTACATTGCATGA-3' (posición 562-590) y 5'- AGCGAATTCTTATGGTTTCTGAGAACAGATGGGGCACA-3' (posición 830-858) para los genes E7. La amplificación y clonación de los genes E6 y E7 fueron realizados como se describió previamente<sup>112</sup>. Los genes E6 y E7 fueron subclonados dentro de los sitios de restricción BamHI/EcoRI del vector pcDNA3 de expresión fuerte en mamíferos (Invitrogen, Carlsbad, CA) generando los plásmidos p16E6 y p16E7, respectivamente (Figura 2A). El gen completo de nucleoproteína del virus de la influenza humana (posiciones 46-1542; <sup>113</sup>) de la cepa A/PR/8/34 (H0N1) clonado en el vector pCR2.1 (Invitrogen) fue donado por el Dr. Fernando Esquivel Guadarrama de la Universidad Autónoma de Morelos, México. El gen de NP (nucleoproteína) fue obtenido por el corte de las enzimas de restricción Kpn I y Xho I y subclonado en los sitios correspondientes al vector pcDNA3 (Invitrogen), dando como resultado el plásmido pNP. Todas las construcciones moleculares de plásmidos fueron verificadas por secuenciación de DNA en un secuenciador automatizado Applied Biosystems (ABI 310).

Transfecciones celulares: Las células dendríticas inmaduras autólogas MDDC fueron transitoriamente transfectadas con las construcciones de plásmidos p16E6, p16E7 o pNP el día 6 de cultivo usando dos lípidos catiónicos: con DMRIE-C (Invitrogen) y Lipofectamine- plus<sup>TM</sup> (Invitrogen), como fue previamente reportado<sup>108</sup>. Brevemente, 5  $\mu$ l de los agentes transfectantes fueron combinados con 2  $\mu$ g del plásmido recombinante de DNA-pcDNA3 y mezclados con 500  $\mu$ l de medio RPMI libre de suero y adicionados a las células dendríticas. Las células fueron incubadas por 4 horas a 37°C en un incubador de CO<sub>2</sub>, al cabo de este tiempo el medio de

cultivo fue reemplazado con RPMI más 20% de FCS mas 10 ng/ml de TNF- $\alpha$  recombinante humano. Después de 48 horas de incubación, las células dendríticas maduras transfectadas derivadas de la muestra fresca fueron usadas para la estimulación *in vitro* por una semana de los linfocitos separados de sangre periférica depletados de monocitos (LSP), mientras que aquellas derivadas de la muestra congelada fueron usadas como células blanco en ensayos de citotoxicidad (Figura 1).

#### **IV.2.3 Detección de la expresión de E6, E7 y NP en células dendríticas transfectadas**

El RNA fue extraído de las células dendríticas maduras transfectadas por medio de Trizol (Invitrogen) usando las condiciones recomendadas por el fabricante. El RNA purificado fue tratado con DNasa I para evitar su contaminación con DNA. Un  $\mu$ g del RNA total fue transcrito reversamente usando el kit GeneAmp RNA PCR (Perkin-Elmer) siguiendo las instrucciones del fabricante, en 20  $\mu$ l del producto de la reacción, de estos, 5  $\mu$ l fueron tomados para la amplificación de E6 y E7 por PCR, como fue reportado previamente <sup>112</sup>. La secuencia y posición de los primers río arriba (F) y río abajo (R) fueron designadas como sigue:

F104 (ATGTTTCAGGACCCACAGGAGCGACCCGGA posición 104-133),

R393 (CACACTAAACAATTAATCCACATAATTG posición 393-418),

F648 (CAATTAATGACAGCTCAGAGGAGGAG posición 648-666),

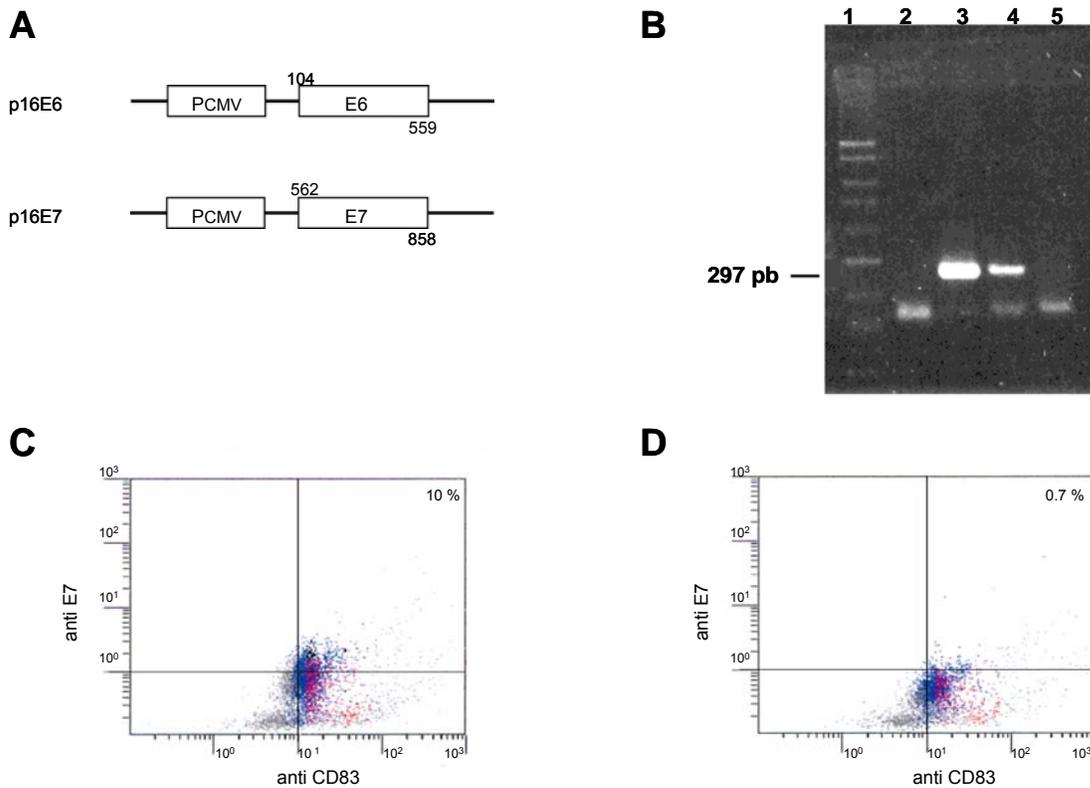
R830 (ACACGGGGTAGACAAGACTCTTTGGTATT posición 830-858).

Los transcritos del gen E6 fueron detectados con los primers F104/R393 y los del gen E7 con los primers F648/R830. Los experimentos de RT-PCR fueron estandarizados con la detección de los transcritos de actina usando los siguientes primers:

ACT1 (ATCATGTTTGAGACCTTCAA, posición 1854-1874 y ACTinv (CATCTCTTGCTCGAAGTCCA, posición 2172-2152) <sup>112</sup>.

La expresión proteínas E6 y E7 del VPH16 y de NP del virus de influenza (VI-A fue identificada en las células dendríticas maduras transfectadas MDDCs usando anticuerpos monoclonales-IgG1 de contra la proteína E6 del VPH16 (HPV-C1P5: sc-460, Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA), contra la proteína E7 del VPH16 (HPV 16-E7: sc-6981, Santa Cruz Biotechnology), y contra la nucleoproteína de virus de influenza A/PR/8/34-H0N1 (MCA400, Serotec Inc, Raleigh, NC); estos anticuerpos fueron introducidos intracelularmente y detectados con FACS. Las células fueron permeabilizadas para la identificación intracelular usando el kit Fix and Perm Cell (Caltag Laboratories, Burlingame, CA). Brevemente,  $1 \times 10^5$  células (50  $\mu$ l) fueron lavadas tres veces con 5 ml de buffer FACS (PBS + 1% BSA + 0.1% azida

de sodio) y después incubados con 100  $\mu$ l de solución fijadora por 15 min a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas con 5 ml de buffer PBS e incubadas con 100  $\mu$ l de medio



**Figura 2. Expresión de la proteína E7 en DC autólogas maduras transfectadas transitoriamente con el gen clonado de E7.** Se muestran representaciones esquemáticas parciales de las construcciones plasmídicas en el panel A. Los genes completos de E6 (posiciones 104-559) y E7 (posiciones 562-858) del VPH 16 fueron clonados en el vector pcDNA3 frente al promotor del CMV, obteniéndose los recombinantes p16E6 y p16E7, respectivamente. Los transcritos de los genes E6 y E7 fueron medidos por RT-PCR a partir del RNA obtenido de las DCs transfectadas transitoriamente con p16E6 o p16E7, respectivamente. Se muestra en el panel B: el DNA obtenido de las transfecciones con p16E7, usando el lipido catiónico DMRIE-C (carril 3), o Lipofectamine plus<sup>TM</sup> (carril 4) como agentes transfectantes; en los carriles 2 y 5 los resultados de las DCs transfectadas con el vector vacío de pcDNA3. La expresión de las proteínas E7 y E6 fue medida en las DCs transfectadas con las construcciones p16E6 o p16E7 (panel C) o con el plásmido vacío pcDNA3 (panel D), empleando anticuerpos monoclonales de ratón contra las proteínas E6 o E7 de VPH16 respectivamente, y un anticuerpo secundario anti-ratón marcado con PE. Las DCs maduras fueron identificadas mediante el anticuerpo anti-CD83-FITC y la fluorescencia fue detectada por FACS.

para permeabilizar la membrana celular y 20  $\mu$ l de anticuerpos anti-E6, anti-E7, anti-NP, o con anticuerpos control de diferentes isotipos por 15 minutos a temperatura ambiente, y después lavadas con PBS. Los anticuerpos IgG1 de cabra anti-ratón (Becton Dickinson) conjugados con -FITC o -PE- fueron utilizados para identificar las proteínas intracelulares marcadas, siguiendo las instrucciones del fabricante. El anticuerpo anti-IgG2 anti-ratón (Becton Dickinson) conjugado con FITC fue usado como control negativo. Finalmente las células fueron resuspendidas en 0.5 ml de paraformaldehído al 1.0% y almacenadas en oscuridad a 4<sup>o</sup>C. El análisis citométrico de triple color fue desarrollado en un Coulter FACS Epics XL-MCL. Los datos fueron analizados con el software EXPO2.

#### **IV.2.4 Ensayos de microcitotoxicidad *in vitro***

Los LTC específicos contra E6, E7 de VPH16 y NP de VI-A/PR/8/34-H0N1 fueron cuantificados mediante ensayos de citotoxicidad de liberación de <sup>51</sup>Cr estándar por 4 horas. Los LTC de las pacientes y los controles fueron activados usando células dendríticas autólogas transitoriamente transfectadas derivadas de monocitos producidas *in vitro* a partir de PBMC recién aisladas. Las DCDM obtenidas de las alícuotas congeladas de PBMC fueron usadas como células blanco (ver Figura 1). La viabilidad celular de las PBMC recién aisladas y de las descongeladas fueron monitoreadas excluyendo células muertas con la tinción de azul de tripano. Para su estimulación *in vitro*, la fracción de LSP depletados de monocitos de CMSP (células efectoras) obtenidas de la fracción congelada, fue incubada en co-cultivo por 8 días con células dendríticas transitoriamente transfectadas en una proporción 20:1. Se adicionó IL-2 (10 ng/ml) (Biosource International, Camarillo, CA) a las placas de cultivo en los días 1, 3, 5 y 7 [39]. Al octavo día, las células estimuladas fueron entonces lavadas con PBS y utilizadas para el ensayo de citotoxicidad. Las células blanco transfectadas fueron marcadas con 200  $\mu$ Ci de cromato de sodio en solución de cloruro de sodio (actividad específica de 5 mCi/ml; Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England) por 90 min a 37<sup>o</sup>C. Las células fueron lavadas con PBS y dispuestas por triplicado en placas de fondo redondo de 96 pozos a una concentración promedio de 5x10<sup>3</sup> células/pozo, para ser usadas en el ensayo de citotoxicidad. Los LTC estimulados junto con las células blanco marcadas fueron incubadas a 37<sup>o</sup>C por 4 horas a cuatro diferentes proporciones de célula efector/célula blanco en un volumen final de 200  $\mu$ l/pozo. Esta suspensión celular fue centrifugada y los sobrenadantes fueron coleccionados para realizar la determinación de c.p.m. del <sup>51</sup>Cr en un contador Cobra II Auto-gamma (Packard Bioscience Co, Fullerton CA). La liberación espontánea y máxima de <sup>51</sup>Cr fué determinada al incubar solo

células blanco con 100  $\mu$ l de medio de ensayo y con la adición de 5% duodecil sulfato de sodio, respectivamente. El porcentaje de lisis específica fue calculada con la siguiente fórmula: porcentaje de lisis específica =  $[(\text{liberación experimental} - \text{liberación espontánea}) / (\text{liberación máxima} - \text{liberación espontánea})] \times 100$ .

#### **IV.2.5 Análisis estadístico**

Todos los experimentos fueron desarrollados en triplicado. Para los ensayos de citotoxicidad de LTC, los resultados fueron expresados con el valor de la media  $\pm$  el valor de la desviación estándar. La significancia estadística de las diferencias entre los grupos en la proporción 100:1 de las células efectoras/células blanco fue establecida por la prueba de t-Student y la diferencia de los resultados de las diferentes proporciones de las células efectoras/células blanco, a través por la prueba de ANOVA de dos vías. Las diferencias fueron consideradas significativas a un nivel de  $p < 0.05$ . El software utilizado para los análisis estadísticos fue el Sigma Stat (SPSS Inc., Chicago, Illinois).

## V. RESULTADOS

Las células dendríticas autólogas transfectadas transitoriamente con los genes E6 o E7 de VPH 16 fueron usadas para detectar la respuesta específica de los linfocitos T CD8+ citotóxicos anti VPH16 en pacientes con cáncer cervicouterino (Figura 1). Estas DC autólogas transfectadas fueron usadas para i) una ronda de estimulación *in vitro* (8 días) a los linfocitos T CD8+ citotóxicos de memoria central y ii) como células blanco en ensayos de liberación de <sup>51</sup>Cr para los linfocitos T CD8+ citotóxicos de memoria efectora. Inicialmente, se comparó la eficiencia de la transfección de las células dendríticas con las construcciones de plásmidos E6 o E7 a través del empleo de dos diferentes agentes de lipofección. La transcripción de RNA de las oncoproteínas E6 y E7 fue mayor empleando DMRIE-C como agente tranfectante, que con la Lipofectamine- plus™ medidos por RT-PCR (Figura 2B). Para verificar la traducción del codificado por RNAm, se midió el contenido protéico a través de su tinción intracelular por FACS. La expresión de la proteína E7 del virus del papiloma humano 16 se detectó intracelularmente en alrededor del 10% de las células dendríticas transfectadas, al menos 24 horas (Figuras 2C y 2D) y 48 horas después de la transfección. La E6 del VPH16 y la NP del virus de influenza fueron detectadas con frecuencia similar (datos no mostrados). Las células dendríticas fueron empleadas 48 horas después de la transfección tanto para la estimulación de los LTC de memoria o como para células blanco para el ensayo de citotoxicidad (Figura 1). Para investigar si estos linfocitos específicos de memoria son estimulados por células dendríticas durante la activación *in vitro* y si funcionan como estas, como células blanco de los LTC activados, se exploró inicialmente a dos pacientes con cáncer cervical, una paciente fue positivo en la identificación de VPH16 por PCR (P4 in Tabla 1) y la otra, negativo (P20 in Tabla 1). Las células dendríticas transfectadas con el plásmido pNP que contenía al gen del virus de Influenza A, estimularon los LTC de memoria central y fueron lisadas por LTC de memoria efectora específicos en ambas pacientes (Tabla 1), indicando que las células dendríticas transitoriamente transfectadas utilizadas para la reestimulación *in vitro* de los LCT y como células blanco para ensayos de citotoxicidad, son capaces de clonar y activarlos y por ello detectar la respuesta inmunológica de los LTC. Además, los datos indicaron que una respuesta citotóxica de los LSP anti-NP específica se presenta en pacientes con cáncer cervicouterino a pesar de sus lesiones neoplásicas. En contraste, una respuesta específica de los LTC contra las oncoproteínas E6, E7 de VPH 16 solo fueron detectadas en pacientes positivas para VPH16, mostrando potencialmente que este método de análisis es capaz de detectar una respuesta citotóxica específica de los LSP en contra de los epítopes E6 y E7 de VPH 16 en pacientes con CC.

Utilizando este método de análisis, se investigó el status de la respuesta inmune específica de los LTC contra las oncoproteínas E6 y E7 de VPH 16 en 19 pacientes adicionales con CC, 11 positivos y 8 negativos para VPH 16, y cuatro mujeres sanas negativas para HPV 16, como controles (Tabla 1). La obtención de sangre periférica fue realizada antes que las pacientes hubieran sido tratadas en alguna forma. La respuesta específica de los LTC en contra del antígeno NP del virus de influenza A fueron evaluadas en los casos en los cuales hubo suficiente material celular disponible.

En general, las respuestas de los linfocitos T CD8+ citotóxica NP-específicas fueron similares tanto en las pacientes con cáncer cervical positivas (promedio  $44.3 \pm 4.3$ ; P1, P2 y P4, en Tabla 1) como negativas (promedio  $37.5 \pm 9.5$ ; P14 y P20 en Tabla 1) para VPH 16, y para las pacientes sanas exploradas (promedio  $39 \pm 4.8$ ) (Tabla 1;  $p > 0.05$ , test-t). Estos resultados confirman que la respuesta inmunológica de memoria NP-específica de los LTC no está comprometida en el conjunto de pacientes estudiadas con el CC. Las respuestas citotóxicas de los LSP en contra de E6 y E7 de VPH16 fueron significativamente altas en pacientes VPH 16-positivas que en las pacientes VPH 16-negativas, ( $p < 0.001$ , ANOVA de dos vías) y no se encontraron diferencias de respuesta para las proteínas E6 y E7 (Figura 3). En las pacientes VPH16-positivas, los promedios de la respuesta citotóxica E6 y E7 específica de los LSP se incrementaron con las proporciones mayores de células efectoras/células blanco, p.ej. de 11.5% para E7 en 12.5:1 a 47.1% para E7 en 100:1 (Figura 3), evidenciando la especificidad de los ensayos de citotoxicidad. Se encontraron similares tendencias para el antígeno NP en todas las pacientes con cáncer examinadas (Figura 3). El porcentaje de lisis específica de células dendríticas autólogas en la proporción de 100:1 de efectoras/blanco fue comparada en las pacientes y en las mujeres controles (Figura 4), en las pacientes VPH 16-positivas, la lisis varió entre 22 a 59% tanto para el antígeno E6 como para el E7 y la mayoría de ellas (85.7%) fue superior de 30% (Figura 4 y Tabla 1). En contraste, la respuesta de los LTC en pacientes con cáncer VPH16-negativas varió de 2 a 14% y fue similar a la encontrada en los controles sanos (Tabla 1), apoyando la especificidad de la respuesta contra los epítopes de las oncoproteínas del VPH 16. La diferencia de la respuesta citotóxica de LSP entre las pacientes con CC-VPH 16-positivas, y CC-VPH 16-negativas es totalmente diferente en contra de antígenos independientes no reactivos a los LCT p.ej. de las células asesinas naturales. Se esperaría que tales células fueran activadas de manera similar en ambos grupos de pacientes.

Estos resultados mostraron claramente que la respuesta específica de los LCT en contra de las oncoproteínas E6, E7 de VPH 16 ha sido inducida y puede estar presente sistémicamente durante el curso de la enfermedad en pacientes con CC-VPH 16-positivas.

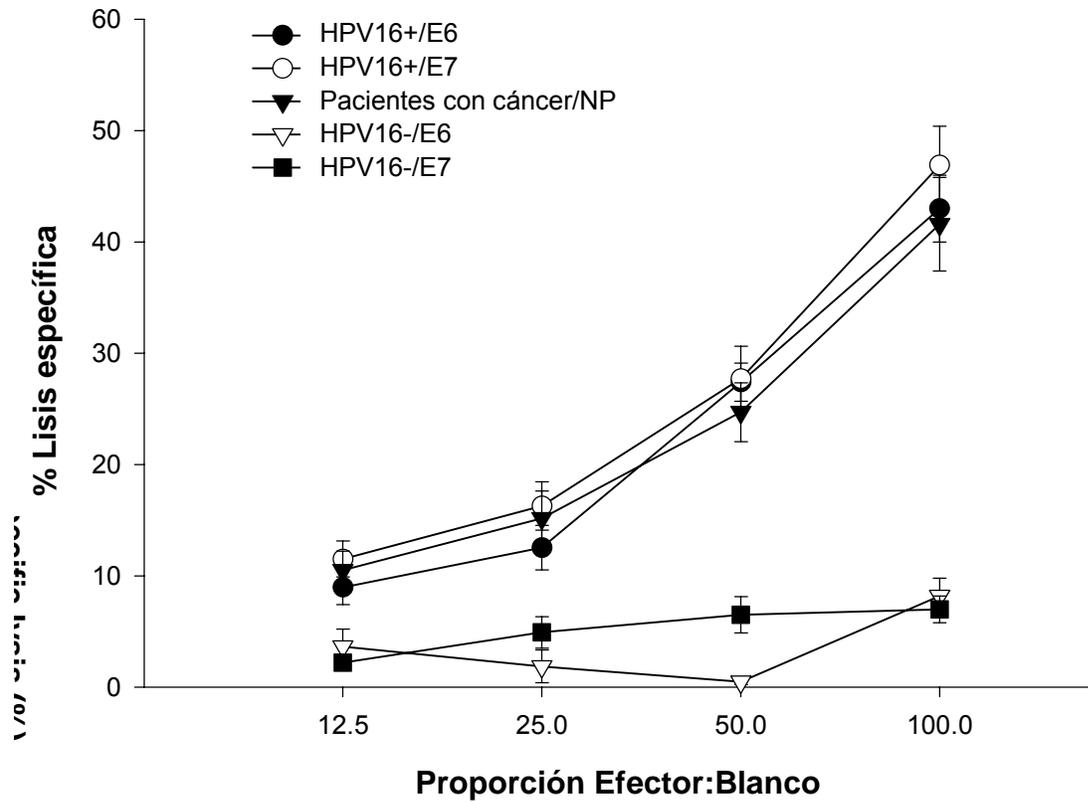
**Tabla1. Respuesta de los CTLs- HPV16 específicos en pacientes con CaCu y controles.**

Pacientes <sup>a</sup>	Etapa Clínica <sup>b</sup>	% Lisis específica (media ± E.E.) <sup>c</sup> DC-transfectadas con los antígenos		
		E6	E7	NP
<b>Pacientes con cáncer cervicouterino-HPV16-positivo</b>				
P1	IIB	49±2.4	ND	44±4.1
P2	III	40±8.7	ND	37±5.3
P3	III	47±8.9	46±1.4	ND
P4	IIA	59±3.9	50±6.4	52±5.1
P5	III	44±5.3	51±11.5	ND
P6	IV	30±0.5	22±2.7	ND
P7	IIB	22±3.0	53±4.8	ND
P8	III	53±8.5	55±6.8	ND
P9	IIB	41±1.3	42±4.9	ND
P10	III	52±6.9	46±6.1	ND
P11	IV	43±1.3	ND	ND
P12	III	36±3.2	57±10.2	ND
<b>Pacientes con cáncer cervicouterino-HPV16-negativo</b>				
P13	IV	6±3.6	3±1	ND
P14	IIB	14±7.1	7±2.8	28±3.9
P15	III	5±0.6	12±0.6	ND
P16	IIB	ND	2±2	ND
P17	IIB	11±5.9	8±2	ND
P18	III	ND	2±2	ND
P19	III	ND	5±5	ND
P20	IIA	4±2.5	11±0.9	47±8.3
P21	III	9±4.9	4±2.2	ND
<b>Controles HPV16-negativo.</b>				
C1	Control	1±0.7	11±1.2	50±4
C2	Control	6±1.7	4±0.4	35±1.9
C3	Control	8±3.5	2±0.8	28±2.6
C4	Control	4±2.7	5±2	43±5.6

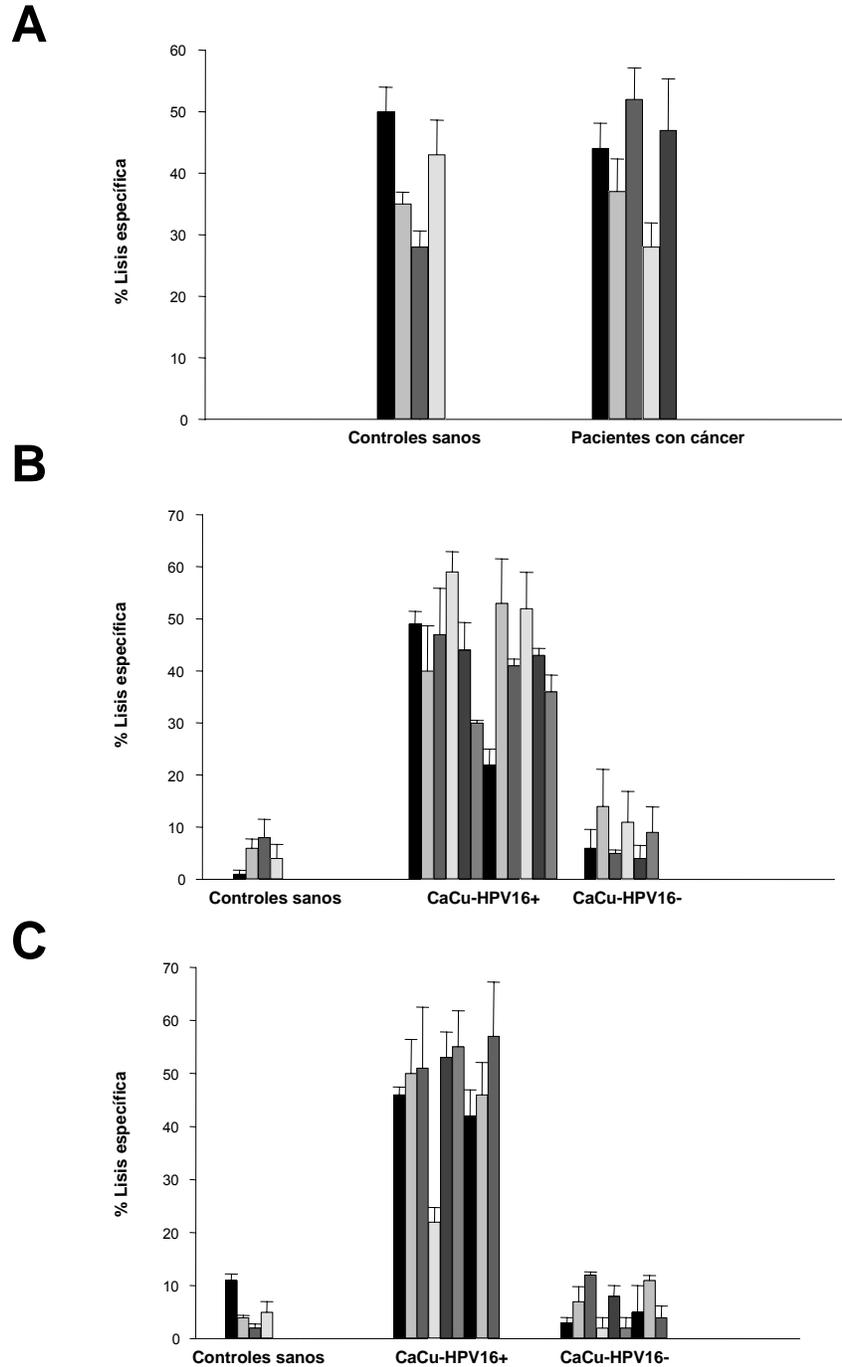
<sup>a</sup>Todos los pacientes fueron analizados antes del tratamiento.

<sup>b</sup>La etapa clínica fue establecida de acuerdo a la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO).

<sup>c</sup>El % de lisis específica fue determinada en la proporción de 100/1 de E/B .  
ND. No determinada



**Figura 3. Promedio del índice de citotoxicidad de los LTC contra las oncoproteínas E6 y E7 en pacientes con cáncer cervicouterino HPV16-positivo y HPV16-negativo.** La respuesta de los LTC contra las proteínas E6 y E7 del VPH16 fue medida en 12 pacientes con CC-VPH 16-positivo y en 9 pacientes con CC-VPH 16-negativo usando la metodología descrita en la Figura 1. La citotoxicidad contra la nucleoproteína (NP) del virus de influenza A fue medida solo en 5 pacientes con cáncer cervicouterino y en las mujeres sanas. La citotoxicidad fue medida por triplicado en 4 diferentes relación de proporciones entre los LSP y las células blanco. En la figura se grafica el promedio y el error estándar para cada grupo.



**Figura 4. Citotoxicidad de los LTC contra las oncoproteínas E6 y E7 de pacientes con cáncer cervicouterino-VPH 16-positivo y -VPH 16-negativo y de mujeres normales.** El promedio y la desviación estándar de la lisis específica de la proporción 100:1 de células efectoras/célula blanco de cada paciente incluidos en la Figura 3, son graficados. En el Panel A se muestra la respuesta de los LTC contra la proteína NP del virus de influenza A, en 4 mujeres controles y en 5 pacientes con cáncer cervicouterino. En el Panel B se muestra la respuesta de los LTC contra la proteína E6 del HPV16 en 12 pacientes con CC-VPH 16-positivo, en 6 con CC-VPH 16-negativo y en 4 mujeres control. En el Panel C se muestra la respuesta de los LTC contra la proteína E7 del VPH16 en 9 pacientes con CC-VPH 16-positivo, en 9 con CC-VPH 16-negativo y en 4 mujeres control. La respuesta de los LTC contra el antígeno NP fue utilizado como control positivo.

## VI. DISCUSIÓN

En este estudio, la respuesta de memoria específicas de los LTC contra E6 y E7 de VPH 16 fue detectada en PBMC de todas las pacientes investigadas con CC VPH16-positivas que no recibieron algún tratamiento. Usando células dendríticas autólogas transitoriamente transfectadas con plásmidos recombinantes con los genes E6 o E7 de VPH 16, los LTC de memoria fueron activados y detectados con alta sensibilidad. Los LTC específicos para NP fueron detectados en las 5 pacientes exploradas con CC (VPH16-positivas o negativas) y en las mujeres controles. Los resultados de este trabajo indican que la respuesta inmunológica de los LTC *per se* no está alterada (fase de reconocimiento y efectora *in vitro*) en pacientes con CC contra los antígenos específicos de la enfermedad, ni tampoco para otros antígenos irrelevantes a la enfermedad.

La transfección de las células dendríticas usando el lípido catiónico DMRIE-C fue exitosa y eficiente, como fue mostrado, por la detección de la expresión de RNAm por RT-PCR y la identificación de proteínas por el análisis de FACS intracelular. Se obtuvo que el 10% de las DC maduras-CD83 positivas reaccionaron con los anticuerpos E6 y E7 del VPH 16, esto podría tratarse de una subestimación de la expresión, ya que muy pocas moléculas debajo de los niveles de detección del análisis de FACS pueden ser suficientes para conferirle la sensibilidad de lisis a los LTC específicos. De 20 a 60% de las DC que fueron lisadas en los ensayos de liberación de <sup>51</sup>Cr, sugieren una positividad más alta de expresión del antígeno viral en las DC transfectadas. La liberación de proteínas de VPH o péptidos desde las DC apoptóticas, resultarían en presentación cruzada, o por la transferencia de exosomas del complejo epítotope-MHC célula a célula, podrían ser mecanismos adicionales que contribuyen al incremento de la positividad del antígeno de las DC blanco <sup>114</sup>. Obviamente, una respuesta primaria de los LTC contra las oncoproteínas E6 y E7 del VPH 16 fue generada durante el curso de la enfermedad en pacientes con CC-VPH 16-positivas. Una sola re-estimulación *in vitro* no es suficiente para primar células T "inocentes", como se observó a través de la falta de reactividad de las pacientes con CC VPH16-negativas y las mujeres controles sanas, por lo que no sucedió la activación y expansión de las células T de memoria por arriba del umbral de sensibilidad en nuestro ensayo. En ambas poblaciones control, mujeres sanas y pacientes con CC-VPH 16-negativas, no encontramos respuesta significativa a pesar de que sus LSP se expusieron durante una semana a los antígenos del VPH 16, esta condición podría ser una ventaja, cuando se quisiera discriminar una respuesta fuerte inducida por el uso de vacunas de la respuesta de memoria provocada por la exposición previa.

Los resultados contrastan marcadamente con aquellos de estudios previos donde los autores investigaron las células T restringidas al alelo HLA-A\*0201, tanto por DC autólogas<sup>58</sup> o por PBMC<sup>56</sup> cargadas con péptidos específicos HLA-A\*0201 E7 86-93 o E7 11-20, respectivamente. En estos estudios solo 18.2% (2 de 11)<sup>56</sup> y 20% (1 de 5)<sup>58</sup> de las pacientes con CC VPH16-positivas se encontraron LTC específicos para E7 de VPH 16. Sin embargo, resultados similares a los nuestros, los LTC de todas las pacientes (5)<sup>58</sup> respondieron contra el epítipo 58-66 restringido al alelo HLA-A\*0201 de la nucleoproteína del virus de influenza A. En el estudio<sup>56</sup>, donde emplearon PBMC, se encontraron resultados similares a los nuestros solo cuando los linfocitos T fueron re-estimulados *in vitro* después de 14 días (por lo menos dos ciclos de estimulación). Las DCs son mucho mejores células presentadoras de antígenos en la re-estimulación *in vitro* de los LTC que las líneas celulares B transformadas por EBV<sup>110,111</sup>. La detección de LTC específicos contra las proteínas del virus de influenza en los pacientes con VPH 16 positivo en los 3 estudios tanto como en los pacientes con CC-VPH 16 negativos de nuestro estudio, sugiere que la respuesta inmunológica de los LTC (fase de reconocimiento y efectora *in vitro*) no está alterada, aún en pacientes con CC tratados<sup>56,58</sup>.

Varios factores pueden explicar la diferencia de la mayor proporción de respuesta de LTC anti E7 de VPH 16 en de los pacientes con CC-VPH-16 positivos, comparando los estudios previos y el nuestro. La etapa clínica, el estado de tratados y no-tratados, el uso de péptidos-HLA específicos o de las proteínas completas como antígenos, el cargar o transfectar las DCs y el uso seleccionado o no de los linfocitos T CD8+ para ser re-estimulados *in vitro*, pueden ser elementos trascendentes que inciden en su valoración. Las etapas clínicas del CC fueron más avanzadas en nuestro estudio que en los correspondientes, realizados por Rensing y col.<sup>56</sup> y por Steller y col.<sup>58</sup>, nuestros resultados coinciden con los encontrados en pacientes con melanoma maligno, en donde la proporción de pacientes a quienes se les detectó LTC específicos fue mucho mayor en etapas avanzadas que en etapas iniciales<sup>115</sup>. Estos datos sugieren que siendo la etapa clínica más avanzada, el tumor es más grande y puede exponer mayor cantidad de ATA, y esto puede incrementar la probabilidad de que el paciente genere una respuesta primaria específica durante el curso de la enfermedad. Todos los pacientes reportados en los estudios de Steller y col. y de Rensing y col., fueron tratados con radioterapia local más quimioterapia o cirugía antes de que los LTC fueran medidos, la radioterapia y la quimioterapia pueden suprimir la respuesta inmunológica local, como se ha comunicado previamente<sup>116</sup>, y esto puede influir en la detección de los LTC específicos anti-E7 de VPH16, pero no en los LTC específicos contra los epítipos del virus de influenza, sin embargo, la

mayoría de los LTC específicos anti-E7 de VPH16 de memoria central circulan sistémicamente y deberían de conservarse aún después que la aplicación de la radioterapia.

Además de los oligopéptidos 86-93, 11-20 y 82-90<sup>52</sup> de la proteína E7 que se anclan en la molécula del alelo HLA-A\*0201, se han identificado mas recientemente otros, restringidos a otros alelos del HLA <sup>44,117</sup>. Algunos oligopéptidos pueden ser mas inmunogénicos que otros, como el caso del E7 11-20, el cual ha demostrado generar LTC específicos en pacientes con lesiones intraepiteliales escamosas (SIL) y en lesiones invasoras de CC <sup>56</sup>. Por ello, el uso de la proteína completa como antígeno genera una mayor cantidad de péptidos inmunogénicos y con ello puede obtenerse mejores oportunidades de inducir LTC oligoclonales específicos, como se ha demostrado previamente <sup>67,118</sup>. En el estudio realizado por Steller y cols., las DCs fueron cargadas por oligopéptidos antigénicos, mientras que en nuestro estudio fueron transfectadas transitoriamente con el gen que codifica la oncoproteína completa. Existe evidencia de que los genes transfectados, expresan y producen mayor cantidad de antígeno <sup>67</sup>. Por otro lado, las proteínas pulsadas a las DCs son dirigidas principalmente por la vía de moléculas MHC clase II en su presentación, estimulando con ello, mayormente la respuesta de los linfocitos T CD4+ "helpers". En contraste, la presentación las proteínas expresadas por la transfección de genes se realiza predominantemente por la vía de las moléculas MHC clase I, lo que resulta de una mejor y mas directa respuesta de los LTC <sup>41</sup>. A diferencia de este reporte, en el estudio de Steller y cols., los linfocitos T CD8+ fueron seleccionados previamente antes de su re-estimulación *in vitro*. Los linfocitos T CD4+ participan habitualmente y aumentan la producción de los LTC de memoria *in vivo* <sup>118-120</sup>. La ausencia de linfocitos CD4+ durante la re-estimulación *in vitro* de los LTC puede contribuir a detectar una menor proporción de LTC específicos <sup>118</sup>, sin embargo, esta variación experimental no explica completamente las diferencias en la detección de los LTC-VPH16 específicos, ya que la respuesta de los LTC específicos anti-NP del virus de influenza fue similar entre los diferentes estudios. Sin embargo la baja respuesta de LTC encontradas por los diferentes estudios refleja una baja inducción de ellos en las pacientes con cáncer cervicouterino.

Nuestros métodos de re-estimulación y las variables de nuestro modelo parecen ser adecuados para la detección diferencial de la respuesta de los linfocitos T citotóxicos específicos, la especificidad aumento, ya que la influencia de primar inmunologicamente *in vitro* con un ciclo de re-estimulación a los LTC no fue detectada en las mujeres sanas y en las pacientes con CC-VPH 16-negativo. La sensibilidad aumento también, debido a que mayor cantidad de epitopes disponibles y mejor presentación cruzada <sup>121</sup>, lograda después de la transfección con el gen de la proteína completa. Las DC como blanco pueden ser mas sensibles de la acción citotóxica de los

LTC por su elevada expresión de moléculas MHC-epitopes y de señales co-estimuladoras, resultando con ello un mayor porcentaje de lisis específica en los ensayos con liberación de  $^{51}\text{Cr}$ . De acuerdo a ello, en la valoración de la respuesta de los LTC específicos puede tener mayor ventaja medir el efecto citotóxico que la liberación de  $\text{IFN-}\gamma$  por ELISPOT.

La mayoría de las vacunas terapéuticas probadas y otras en desarrollo contra el cáncer cervicouterino han sido diseñadas para inducir LTC específicos contra los epitopes de E6 y E7 de VPH16 <sup>58,88,95,123</sup> y emplean como ATA proteínas completas recombinantes de E6 o E7 o sus genes clonados en vectores virales de adenovirus o vaccinia, así como péptidos HLA específicos. Aunque la inducción de LTC específicos en pacientes con cáncer cervical ha sido variable en estos estudios (13%, 4 de 29 <sup>96</sup>; 33%, 1 de 3 <sup>88</sup>; 71%, 5 de 7 <sup>58</sup>), ninguna de estas vacunas ha detenido el crecimiento tumoral o ha incrementado la supervivencia de estas pacientes, sugiriendo que otras deficiencias inmunológicas además de la insuficiente inducción de la respuesta de los LTC pueden participar en la ejecución de la respuesta eficiente mediada por células <sup>44,124</sup>. Así, la transformación maligna puede ser acompañada frecuentemente por una significativa baja regulación de las moléculas MHC clase I <sup>124,125</sup>, de proteínas TAP y de moléculas de adhesión celular (ICAM-1) <sup>126</sup>; de alteración del interruptor de citocinas para cambiar el microambiente tumoral de tipo Th1 (IL-2,IFN- $\gamma$ ) al correspondiente de tipo Th2 (IL-4,IL-10) <sup>41,124,127</sup>, lo cual contribuye a la falla en la respuesta clínica de los diferentes protocolos de inmunoterapia en pacientes con cáncer cervicouterino.

## VII. CONCLUSIONES

Se lograron la obtención *in vitro* de células dendríticas autólogas inmaduras a partir de monocitos de sangre periférica, y la tranfección transitoria y maduración de las células dendríticas autólogas derivadas de monocitos con los genes E6, E7 del VPH-16 y el NP del VI A/PR/8/34, junto con la adición de TNF- $\alpha$  recombinante humano.

Se realizaron 53 ensayos de microcitotoxicidad *in vitro* para valorar la respuesta celular específica de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de las pacientes con cáncer cervicouterino contra los epítopes de las proteínas E6, E7 del VPH-16 y los de la proteína NP del VI A/PR/8/34, con ensayos y controles simultáneos positivos y negativos.

En nuestro estudio, en casi todas las pacientes con cáncer cervicouterino-VPH 16 positivo (11/12) sus linfocitos T CD8<sup>+</sup> de memoria efectora de sangre periférica fueron expandidos y activados y mostraron respuesta de citotoxicidad contra las células dendríticas que expresaron epítopes de E6 y E7 del VPH-16.

Comparando los resultados obtenidos previamente, en los cuales se emplearon variables experimentales diferentes en los sistemas de estimulación y exploración de la respuesta celular, nuestros resultados son significativamente diferentes con valores mayores en la identificación de LTC específicos; esta diferencia nos la explicamos a partir de que en nuestro diseño experimental se emplean condiciones biológicas que facilitan expansión e identificación de las poblaciones de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos específicos en las pacientes con cáncer cervicouterino.

El monitorear la respuesta inmunológica de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos contra los antígenos del virus del papiloma humano en mujeres con cáncer cervicouterino con elevada sensibilidad y especificidad es clave para entender su participación en la enfermedad y son indicadores adicionales en la respuesta clínica de estrategias terapéuticas de inmunomodulación biológica contra la neoplasia.

El modelo experimental empleado para identificar estos LTC guarda tres cualidades que probablemente incrementaron la sensibilidad y especificidad en el inmunomonitorio, particularmente i.) el uso de células dendríticas autólogas maduras como adyuvante en la presentación de los antígenos y activación de los linfocitos T de memoria central, ii.) el uso de la tranfección del gen completo, lo que conduce a la presentación de múltiples epítopes de las oncoproteínas virales asociadas al tumor y consecuentemente la activación potencial de oligo clonas de LTC, y finalmente iii.) el tipo de re-estimulación de los LTC de memoria central *in vitro*

limitada en tiempo , a partir de su co-cultivo con las DCs tranfectadas estimuladoras solo por un ciclo (ocho días).

Nuestro método, empleando células dendríticas como células estimuladoras y como células blanco puede mejorar el inmunomonitoro de la respuesta de los linfocitos T CD8+ citotóxicos de las pacientes con cáncer cervicouterino.

## VIII. REFERENCIAS

- 1.- Pisani P, Parkin DM, Ferlay J. Estimates of the worldwide mortality from eighteen major cancers in 1985. Implications for prevention and projections of future burden. *Int J Cancer* 1993; 55 (6): 891-903.
- 2.- Bosch FX, de Sanjose S. Human papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003; 31: 3-13.
- 3.- Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas. Compendio Mortalidad y Morbilidad 1998. *Secretaría de Salud-México*.
- 4.- Palacio MLS, Rangel GG, Hernández AM, Lazcano PE. Cervical cancer, a disease of poverty: Mortality differences between urban and rural areas in México. *Salud Publica Mex*, 2003, 45 (S3):S315-S325.
- 5.- Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus in young women. *N Engl J Med* 1998; 338: 423-428.
- 6.- Schiffman M, Kruger KS. Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003; 31: 14-19.
- 7.- Disaia PJ, Creasman WT. *Oncología Ginecológica Clínica*. 6th edición. Elsevier Science, Madrid 2002 Cap.3 Cáncer cervical invasor: 53-112.
- 8.- Kiki S C. Molecular Biology of Gynecologic Cancers. y Eifel P, Berek J, Thigpen J. Cancer of the Cervix. En De Vita V, Hellman S, Rosenberg S. *Cancer. Principles & Practice of Oncology*. 6a. edición. Filadelfia EE.UU. Lippincott Williams & Wilkins; 2001:1522-1525 y 1526-1548.
- 9.- Nabel GJ. Genetic, cellular and immune approaches to disease therapy: past and future. *Nature Medicine* 2004;10(2):135-141.
- 10.- zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Rev Cancer* 2002;2:342-350.
- 11.- Hildesheim A, Wang SS. Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review. *Virus Res* 2002; 89: 229-240.
- 12.- Wang SS, Hildesheim A. Viral and host factors in human papillomavirus persistence and progression. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003; 31: 35-40.
- 13.- Zarama MFA, Amancio CO, Buitron GR, Oropez RG. Factores de riesgo para cáncer de cervix. *Ginec Obset Mex* 2003; 71: 112-117.
- 14.- Murthy N S and Mathew A . Risk factors for pre-cancerous lesions of the cervix. *Eur J Cancer Prev* 2000; 9 (1): 5-14.
- 15.- Smith J S, Herrero R, Bosetti C, Muñoz N, Bosh FX, Euf-Neto J, Ashley R. Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94 (21): 1604-1613.
- 16.- Berumen CJ. Nuevos virus del papiloma humano descubiertos en México: su asociación a la alta incidencia del cáncer de cervix. *Gac Med Mex* 2003; 139 Supl (4): S3-S10.
- 17.- Lizano M, Berumen J, Guido MC, Casas L, Garcia CA. Association between human papillomavirus type 18 variants and histopathology of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 1227-1231.

18.- Berumen J, Ordoñez RM, Lazcano E, Salmeron J, Galvan SC, Estrada RA, Yunes E, Garcia CA, Gonzalea GL, Madrigal CA . Asian-american variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case control study. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 1325-1330.

19.- Sherman ME, Schiffman M, Cox JT. Effects of age and HPV viral load on colposcopy triage: data from the randomized atypical squamous cells of undetermined significance/low-grade squamous intraepithelial lesion triage study (ALTS). *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 102-107.

20.- Hernandez HDM, Ornelas BL, Guido JM, Apresa Gt, Alvarado CI, Salcedo VM, Mohar BA, Garcia CA. Association between high-risk human papillomavirus DNA load and precursor lesions of cervical cancer in Mexican women. *Gynecol Oncol* 2003; 90: 310-317.

21.- Luft F, Klaes R, Nees M, Apresa GT, Alvarado CI, salcedo VM, Mohar BA, Garcia CA. Detection of integrated papillomavirus sequences by ligation-mediated PCR (DIPS-PCR) and molecular characterization in cervical cancer cells. *Int J Cancer* 2001; 92: 9-17.

22.- Lazo P A. The molecular genetics of cervical carcinoma. *Brit J Cancer* 1999; 80 (12): 2008-18

23.- Goldie SJ, Kuhn L, Denny L, Pollack A, Wright TC. Policy analysis of cervical cancer screening strategies in low-resource settings: clinical benefits and cost-effectiveness. *JAMA* 2001; 285 (24): 3010-3015. Erratum 286 (9): 1026.

24.- Planificación de programas apropiados para la prevención del cáncer cervicouterino. Programa para una Tecnología Apropiada en Salud. *Organización Panamericana de la Salud*. 3ª edición, 2002: 1-57.

25.- Rocha ZL, Garcia CA, Lira AC, Barrios T, Valdespino V, Cruz TF. Molecular evaluation of the prevalence of oncogenic human papillomavirus genotypes in cervical acetowhite lesions. *Intervirology* 2002; 45: 111-114.

26.- Lazcano-Ponce E C, Moss A, Alonso P, Najera P, Alonso RPA, Hernandez AM. Cervical cancer screening in developing countries: why is it ineffective? The case of Mexico. *Arch Med Res* 1999; 30: 240-250.

27.- Lazcano-Ponce E C, Castro R, Allen B y col. Barriers to early detection of cervical-uterine cancer in México. *J Women's Health* 1999; 8 (3): 399-408.

28.- *AJCC Cancer Staging Manual*. 6a. edición, 2002: 259-265.

29.- Green J A, Kirwan J M, Tierney J F, Symonds P, Fresco L, Collingwood M, Williams CJ. Survival and recurrence after concomitant chemotherapy and radiotherapy for cancer of uterine cervix: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2001; 358: 781-786.

30.- Dueñas GA, Cetina L, Mariscal I, de la Garza J. Modern management of locally advanced cervical carcinoma. *Cancer Treat Rev* 2003; 29: 389-399.

31.- Lazo P A. The molecular genetics of cervical carcinoma. *Brit J Cancer* 1999;80(12):2008-18.

32.-Hanahan D, Winberg R. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.

33.- Giuliano A. Cervical carcinogenesis: The role of co-factors and generation of reactive oxygen species. *Salud Pub Mex* 2003;45:S354-S354.

34.- Pinto AP, Tulio S. Cruz OR. HPV cofactors in cervical carcinogenesis. *Rev Assoc Med Bras* 2002;48(1):73-8.

35.- Frazer IH. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nature Rev Immunol* 2004; 4: 46-54.

- 36.- Petry KU, Sheffel D, Bode U, Gabrysiak T, Kochel H, Kupsch E, Glaubitz M, Niesert S, Kuhnle H, Schedel I. Cellular immunodeficiency enhances the progression of human papillomavirus-associated cervical lesions. *Int J Cancer* 1994;57(6):836-40.
- 37.- Ahr A, Scharl A, Lutke K, Staszewski S, Kacer PZ, Kaufmann M. Cervical intraepithelial neoplasia in human immunodeficiency virus-positive patients. *Cancer Detect Prev* 2000; 24 (2): 179-85.
- 38.- Maiman M. Management of cervical neoplasia in human immunodeficiency virus-infected women. *J Natl Cancer Inst Monogram* 1998; (23): 43-9.
- 39.- Laga M, Icenogle JP, Marsella R, Manoka AT, Nzila N, Ryder RW, Vermund SH, Heyward WL, Nelson A, Reeves WC. Genital papillomavirus infection and cervical dysplasia--opportunistic complications of HIV infection. *Int J Cancer* 1992; 50 (1): 45-8.
- 40.- Halpert R, Fruchter RG, Sedlis A, Butt K, Boyce JC, Sillman FH. Human papillomavirus and lower genital neoplasia in renal transplant patients. *Obstet Gynecol* 1986; 68 (2): 251-8.
- 41.- Eiben GL, Velders MP, Kast Wn. The cell-mediated immune response to human papillomavirus-induced cervical cancer: implications for immunotherapy. *Adv Cancer Res* 2002:113-48.
- 42.- Rocha ZL, Barrios T, Garcia CA, Valdespino V, Cruz TF. Cervical secretory immunoglobulin A to human papillomavirus type 16 (HPV 16) from HVP 16-infected women inhibit HPV 16 virus-like particles-induced hemagglutination of mouse red blood cells. *FEMS Imm Med Microb* 2001; 31: 47-51.
- 43.- Rouse TB, Ahmed R. Immune responses to viruses. En Rich RR, Fleisher AT, Shearer TW, Kotzin LB, Schoeder WH. *Clinical Immunology. Principles and practice*. 2th Edición, Mosby, London 2001: 28.1-10.
- 44.- Scott M, Nakagawa M, Moscicki AB. Cell-mediated immune response to human papillomavirus infection. *Clin Diag Lab Immunol* 2001;8(2):209-20.
- 45.- Chen LP, Thomas EK, Hu SL, Hellstrom I, Hellstrom KE. Human papillomavirus type 16 nucleoprotein E7 is a tumor rejection antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88(1):110-4.
- 46.- Feltkamp MC, Smits HL, Vierboom MP, Minnaar RP, de Jongh BM, Drijfhout JM, terSchegget J, Melief CJ, Kast WM. Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. *Eur J Immunol* 1993;23(9):2242-9.
- 47.- De Bruijn ML, Schuurhuis DH, Vierboom MP, Vermeulen H, de Cock KA, Ooms ME, Rensing ME, Melief CJ. Immunization with human papillomavirus type 16 (HPV16) oncoproteins loaded dendritic cells as well as protein in adjuvant MHC clas I restricted protection to HPV-induced tumor cells. *Cancer Res* 1998 58(4):724-31.
- 48.- Eiben GL, Velders MP, Schreiber H et al. Establishment of an HLA-A\*0201 human papillomavirus type 16 tumor model to determine the efficacy of vaccination strategies in HLA-A\*0201 transgenic mice. *Cancer Res* 2002;62:5792-99.
- 49.-Villa LL. Vaccines against papillomavirus infections and disease. *Salud Pub Mex* 2003;45: S443-S448.
- 50.- Konya J, Dillner J. Immunity to oncogenic human papillomavirus. *Adv. Cancer Res* 2001;82: 205-38.
- 51.- Flint SJ, Enquist LW, Racaniello VR, Skalka AM. *Principes of Virology. Molecular biology, pathogenesis, and control of animal viruses*. 2o. Edition. ASM Press Washington, USA. 2004.

Chapter 15, Virus offense meets host defense 530-595; Chapter 18 Transformation and Oncogenesis 654-700.

52.- Rensing ME, Sette A, Brandt RMP, Ruppert J, Wentworth PA, Hartman M, Oseroff C, Grey HM, Melief CJ, Kast WM. Human CTL epitopes encoded by human papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through in vivo and in vitro immunogenicity studies of HLA-A\*0201-binding peptides. *J Immunol* 1995;154:5934-43.

53.- Parmiani G, Castelli C, Dalerba P, Mortarini R, Rivoltini L, Marincola FM, Anichini A. Cancer immunotherapy with peptide-based vaccines: what have we achieved? Where are we going? *J Natl Cancer Inst* 2002;94(11):805-818.

54.- Bontkes HJ, de Gruijl TD, van den Muysenberg AJ, Verheijen RH, Stukart MJ, Meijer CJ, Scheper RJ, Stacey SN, Duggan-Keen MF, Stern PL, Man S, Borysiewicz LK, Walboomers JM. Human papillomavirus type 16 E6/E7-specific cytotoxic T lymphocytes in women with cervical neoplasia. *Int J Cancer* 2000; 88 (1): 92-8.

55.- Alexander M, Salgaller ML, Celis E, Sette A, Barnes WA, Rosenberg SA, Steller MA. Generation of tumor-specific cytolytic T lymphocytes from peripheral blood of cervical cancer patients by in vitro stimulation with a synthetic human papillomavirus type 16 E7 epitope. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175 (6): 1586-93

56.- Rensing ME, van Driel WJ, Celis E, Sette A, Brandt RMP, Hartman M, Anholts JDH, Schrueder GMT, ter Harmsel WB, Fleuren GJ, Trimbos BJ, Kast WM, Melief CJ. Occasional memory cytotoxic T-cell responses of patients with human papillomavirus type 16-positive cervical lesions against a human leukocyte antigen-A\*0201-restricted E7-encoded epitope. *Cancer Res* 1996; 56: 582-88.

57.- Evans EM, Man S, Evans AS, Borysiewicz LK. Infiltration of cervical cancer tissue with human papillomavirus-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Cancer Res* 1997; 57 (4): 2943-50.

58.- Steller MA, Gurski KJ, Murakami M, Daniel RW, Shah KV, Celis E, Sette A, Trimble EL, Park RC, Marincola FM. Cell-mediated immunological responses in cervical and vaginal cancer patients immunized with a lipidated epitope of human papillomavirus type 16 E7. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 2103-09.

59.- Santin AD, Hermonat PL, Ravaggi A, Chivira-Internati M, Zhan D, Pecorelli S, Parham GO, Cannon MJ. Induction of human papillomavirus-specific CD4+ and CD8+ lymphocytes by E7-pulsed autologous dendritic cells in patients with human papillomavirus type 16- and 18- positive cervical cancer. *J Virol* 1999; 73: 5402-10.

60.- McMichael AJ, O'Callaghan CA. A new look at T cells. *J Exp Med* 1998; 187, 9: 1367-71.

61.- Schoell WM, Mirhashemi R, Liu B, Janicek MF, Podack ER, Penalver MA, Averette HE. Generation of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes by stimulation with HPV type 16 E7 peptide-pulsed dendritic cells: an approach to immunotherapy of cervical cancer. *Gynecol Oncol* 1999; 74: 448-55.

62.- Murakami M, Gurski KJ, Marincola FM, Ackland J, Steller M. Induction of specific CD8+ T-lymphocyte responses using a human papillomavirus-16 E6/E7 fusion protein and autologous dendritic cells. *Cancer Research* 1999; 59: 1184-87.

63.- Thornburg C, Boczkowski D, Gilboa E, Nair SK. Induction of cytotoxic T lymphocytes with dendritic cells transfected with human papillomavirus E6 and E7 RNA: implications for cervical cancer immunotherapy. *J Immunother* 2000; 23: 412-18

64.- Chiriva-Internati M, Liu Y, Salati E, Zhou W, Wang Z, Grizzi F, Roman JJ, Lima SH, Hermonat PL. Efficient generation of cytotoxic T lymphocytes against cervical cancer cells by

adeno-associated virus/human papillomavirus type 16 E7 antigen gene transduction into dendritic cells. *Eur J Immunol* 2002; 32 (1): 30-8.

65.- Liu Y, Chiriva-Internati M, Grizzi, Salati E, Roman JJ, Lim S, Hermonat PL. 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* 2002; 8 (12): 948-57.

66.- Philip R, Brunette E, Ashton J, Alters S, Gadea J, Sorich M, Yau J, O'Donoghue G, Lebkowxki J, Okarma T, Philip M. Transgene expression in dendritic cells to induce antigen-specific cytotoxic T cells in healthy donors. *Cancer Gene Ther* 1998; 5(4): 236-46.

67.- Adams M, Navabi H, Jasani B, Man S, Fiander A, Evans AS, Donninger C, Mason M. Dendritic cell (DC) based therapy for cervical cancer: use of DC pulsed with tumour lysate and matured with a novel synthetic clinically non-toxic double stranded RNA analogue poly [I]: poly [C(12)U] (Ampligen (R)). *Vaccine* 2003; 21 (7-8): 787-790.

68.-Tindle R W. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nature Rev Cancer* 2002; 2: 59-65.

69.- Nees M, Geoghegan JM, Hyman T, Frank S, Miller L, Woodworth CD. Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-response genes and upregulate proliferation-associated and NF- $\kappa$ B response genes in cervical keratinocytes. *J Virol* 2001;75:4283-96

70.- Matthews K, Leong CM, Baxter L, Inglis E, Yun K, Backstrom BT, Doorbar J, Hibma M. Depletion of Langerhans cells in human papillomavirus type 16-infected skin is associated with E6-mediated downregulation of E-cadherin. *J Virol* 2003; 77:8378-85.

71.- Kono K, Rensing ME, Brandt MR. Decreased expression of signal-transducing zeta chain in peripheral T cells and natural killer cells in patients with cervical cancer. *Clin Cancer Res* 1996;2(11):1825-28.

72.- Nonn M, Schinz M, Zumbach K et al. Dendritic cell-based tumor vaccine for cervical cancer I: in vitro stimulation with recombinant protein-pulsed dendritic cells induce specific T cells to HPV16 E7 or HPV18 E7. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003; 129: 511-520.

73.- Lowy RD, Frazer HI. Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003;31:111-116.

74.- Billich A. HPV vaccine MedImmune/GlaxoSmithKline. *Curr Opin Investig Drugs* 2003;4:210-213.

75.-Koutsky L A, Ault K A, Wheeler CM, Brown DR, Barr E, Alvarez FB, Chiacchierini Lm, Jansen KV. A controlled trial of a human papillomavirus type 16. vaccine. *N Engl J Med* 2002; 347 (21): 1645-1651.

76.-Hopfl R. Heim K, Christensen N, Casini G, Harrison SC. Spontaneous regression of CIN and delayed-type hypersensitivity to HPV-16 oncoprotein E7. *Lancet* 2000;356(9246):1985-86.

77.-Kols A, Sherris J. HPV vaccines: promise and challenges. *Path* 2000:1-35.

78.-Chen XS, Garcea RL, Golberg I et al. Structure of small virus-like particles assembled from L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol Cell* 2000;5:557-567.

79.- Tobery TW, Smith JF, Kuklin N, Skulsky D, Ackerson C, Huang L, Chen L, Cook JC, McClements WL, Jansen KU. Effect of vaccine delivery system on the induction of HPV 16L1-specific humoral and cell-mediated immune response in immunized Rhesus macaques. *Vaccine* 2003;21(13-14):1539-47.

- 80.- Nardelli-Haeflinger D, Wirthner D, Schiller JT, Lowy DR, Hidesheim a, Ponci F, De Grandi P. Specific antibody levels at the cervix during the menstrual cycle of women with human papillomavirus 16 virus-like particles. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:1128-37.
- 81.- Pinto LA, Edwards J, Castle PE, et al. Cellular immune responses to human papillomavirus (HPV)-16 in healthy volunteers immunized with recombinant HPV-16 L1 virus-like particles. *J Infect Dis* 2003; 188(2):327-38.
- 82.- Crum CP. The beginning of the end for cervical cancer? *N Engl J Med* 2002; 347 (21): 1703-1705.
- 83.- Zwaveling S, Ferreira MSC, Nouta J, Johnson M, Lipford GB, Offringa R, van der Burg SH, Melief CJ. Established human papillomavirus type 16-expressing tumors a effectively eradicated following vaccination with long peptides. *J Immunol* 2002;69(1):350-58.
- 84.- Gao FG, Khammanivong V, Liu WJ, Legatt GR, Frazer IH, Fernando GJ. Antigen-specific CD4+T-cell is required to activate memory CD8+ T cell to a fully functional tumor killer cell. *Cancer Res* 2002;62(22):6438-41.
- 85.- Marzo AL, Kinner BF, Lake R, et al. Tumor-specific CD4+ T cells have a mayor “post-licensing” role in CTL mediated anti-tumor immunity. *J Immunol* 2000(165):6047-55.
- 86.- Kaufmann AM, Nieland J, Schinz M et al. HPV 16 L1 E7 chimeric virus –like particles induce specific HLA-restricted T cells in humans after in vitro vaccination. *Int J Cancer* 2001;92(2):285-93.
- 87.- Da Silva DM, Schiller JT, Kast WM. Heterologous boosting increases immunogenicity of chimeric papillomavirus virus-like particles vaccines. *Vaccine* 2003;21(23):3219-27
- 88.- Borysiewicz LK, Fiander A, Nimako M, Man S, Wilkinson GW, Westmoreland D, Evans AS, Adam M, Stacey SN, Boursnell ME, Rutherford E, Hickling JK, Inglis SC. A recombinant vaccinia virus encoding human papillomavirus types 16 and 18, E6 and E7 proteins as immunotherapy for cervical cancer. *Lancet* 1996,347:1523-27.
- 89.- Adams M, Borysiewicz L, Fiander A, Mans S, Jasani B, Navabi H, Lipetz C, Evans AS, Mason M. Clinical studies of human papilloma vaccines in pre-invasive and invasive cancer. *Vaccine* 2001;19(17-19):2549-56.
- 90.- Tsuda N, Mochizuki K, Harada M et al. Vaccination with predesignated or evidence-based peptides for patientes with recurrent gynecologic cancer. *J Immunother* 2004;27(1):60-72.
- 91.- Ferrara A, Nonn M, Sehr P et al. Dendritic cell-based tumor vaccines for cervical cancer II: results of a clinical pilot study in 15 individual patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003;129(9):521-30.
- 92.- Santin AD, Bellone S, Gokden M, Cannon MJ, Parham GP. Vaccination with HPV-18 E7-pulsed dendritic cells in a patient with metastatic cervical cancer. *N Engl J Med* 2002;346(22):1752-53.
- 93.- Muderspach L, Wilczynski S, Roman L, Blade L, Felix J, Small LA, Kast WM, Fascio G, Marty V, Weber J. 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* 2000;6:3406-16.
- 94.- Baldwin P, van der Burg SH, Boswell CM, Offringa R, Hickling JK, Dobson J, Roberts Js, Latimer JA, Moseley RP, Coleman N, Stanley MA, Sterling JC. Vaccinia-expressed human papillomavirus 16 and 18 E6 and E7 as a therapeutic vaccination for vulval and vaginal intraepithelial neoplasia. *Clin Cancer Res* 2003;9:5205-13.

- 95.- Kaufmann AM, Stern PL, Rankin EM, Sommer H, Adams M, Zwierzina H. Safety and immunogenicity of TA-HPV, a recombinant vaccinia virus expressing modified human papillomavirus (HPV)-16 and HPV-18 E6 and E7 genes in women with progressive cervical cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8(12):3676-85.
- 96.- Padilla-Paz LA. Human papillomavirus vaccine: History, immunology, current status, and future prospects. *Clin Obstet Gynecol* 2005, 48,1: 226-240.
- 97.- Ribas A, Butterfield LH, Glaspy JA, Economou JS. Cancer immunotherapy using gene-modified dendritic cells. *Curr Gen Ther* 2002;2(1):57-78.
- 98.- Salio M, Shepherd D, Dunbar PR, Palmowski M, Murphy K, Wu L, Cerundolo V. Mature dendritic cells prime functionally superior melan-a-specific CD8<sup>+</sup> lymphocytes as compared with nonprofessional APC. *J Immunol* 2001;167:1188-97.
- 99.-Cohen J. Public health. High hopes and dilemmas for a cervical cancer. *Science* 2005, 308 (5722):618-21
- 100.- Monz M, Ling M, Hung CF, Wu TC. HPV DNA vaccines. *Front Biosci* 2003;8:d55-68.
- 101.-Garcia CA. Vaccines against human papillomavirus and perspectives for the prevention and control of cervical cancer. *Salud Pub Mex* 2003; 45: S437-S442.
- 102.- Schultze JL, Vonderheide RH. From cancer genomics to cancer immunotherapy: toward second-generation tumor antigens. *Trends Immunol* 2001;22,9:516-23.
- 103.- Monzavi KB. Keiber ET. Current concepts in cancer vaccine strategies. *Biotechniques* 2001;30:170-89.
- 104.- Kather A, Ferrara, Nonn M et al. Identification of a naturally processed HLA-A\*0201 HPV18 T cell epitope by tumor cell mediated in vitro vaccination. *Int J Cancer* 2003; 104(3):345-53.
- 105.- Lamikanra A, Pan ZK, Issacs SN, Wu TC, Paterson Y. Regression of established human papillomavirus type 16 (HPV-16) immortalized tumors in vitro by vaccinia viruses expressing different forms of HPV-16 E7 correlates with enhanced CD8(+) T-cell responses that home to the tumor site. *J Virol* 2001;75(20):9654-64.
- 106.- Kim TY, Myoung HJ, Kim JH, Moon IS, Kim TG, Ahn WS, Sin JI. Both E7 and CpG-oligodeoxynucleotide are required for protective immunity against challenge with human papillomavirus 16 (E6/E7) immortalized tumor cells: involvement of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in protection. *Cancer Res* 2002;62(24):7234-40.
- 107.- Berumen J, Casas L, Segura E, Amezcua JL, Garcia CA. Genome amplification of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical carcinomas is related to the retention of E1/E2 genes. *Int J Cancer* 1994; 56: 640-645.
- 108.- Nair SK, Boczkowski D, Morse M, Cumming I, Lyerly HK, Gilboa E. Induction of primary carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T lymphocytes in vitro using human dendritic cells transfected with RNA. *Nature Biotech* 1998, 16: 364-369.
- 109.- Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kampgen E, Eibl B, Niderwieser D, Schuler G. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Meth* 1996; 196: 137-151.
- 110.- Boczkowski D, Nair SK, Nam JH, Lyerly HK, Gilboa E. Induction of tumor immunity and cytotoxic T lymphocyte responses using dendritic cells transfected with messenger RNA amplified from tumor cells. *Cancer Research* 2000; 60: 1028-1034.

- 111.- Salio M, Shepherd D, Dunbar PR, Palmowski M, Murphy K, Wu L, Cerundolo V. Mature dendritic cells prime functionally superior melan-A-specific CD8+ lymphocytes as compared with nonprofessional APC. *J Immunol* 2001; 167: 1188-97.
- 112.- Ordóñez RM, Armendáriz-Borunda J, Berumen J. Enhanced oncogenicity of Asian-American Human Papillomavirus 16 is associated with impaired E2 repression of E6/E7-oncogenes transcription. *J Gen Virol* 2004; 85:1433-44.
- 113.- Van Rompuy L, Min Jou W, Huylebroeck D, Devos R, Fiers W. Complete nucleotide sequence of the nucleoprotein gen from human influenza strain A/PR/8/34 (HON1). *Eur J Biochem* 1981; 116 (2): 347-53.
- 114.- Wolfers J, Lozier A, Raposo G, Regnault A, Thery C, Masurier C, Flament C, Pouzieux S, Faure F, Tursz T, Angevin E, Amigorena S, Zitvogel L. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med* 2001; 7: 297-303.
- 115.- Letsh A, Keilholz U, Schadendorf D, Nagorsen D, Schmittel A, Thiel E, Scheibenbogen C. High frequencies of circulating melanoma-reactive CD8+ T cells in patients with advanced melanoma. *Int J Cancer* 2000; 87: 659-664.
- 116.- Reckzeh B, Merte H, Pfluger KH, Pfab R, Wolf M, Havemann K. Severe lymphocytopenia and interstitial pneumonia in patients treated with paclitaxel and simultaneous radiotherapy for non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1996; 14(4): 1071-76.
- 117.- Nakagawa M, Kim KH, Moscicki AB. Identifying new antigenic epitopes of the HPV16 E6 protein. 21<sup>st</sup> *International Papillomavirus Conference*, 2004 Mexico City, Mexico abstract # 201.
- 118.-Strobel I, Berchtold S, Gotze A, Schulze U, Schuler G, Steinkasserer A. Human dendritic cells transfected with either RNA or DNA encoding influenza matrix protein M1 differ in their ability to stimulate cytotoxic T lymphocytes. *Gene Ther* 2000; 7(23): 2028-35.
- 119.- Marzo AL, Kinnear BF, Lake R, Frelinger J, Collins E, Robinson B, Scott B. Tumor-specific CD4+ T cells have a mayor "post-licensing" role in CTL mediated anti-tumor immunity. *J Immunol* 2000; 165: 6047-55.
- 120.- Kim TY, Myoung HJ, Kim JH, Moon IS, Kim TG, Anh WS, Sin JI. Both E7 and CpG-oligodeoxynucleotide are required for protective immunity against challenge with human papillomavirus 16 (E6/E7) immortalized tumor cells: involvement of CD4+ and CD8+ T cells in protection. *Cancer Res* 2002; 62: 7234-40.
- 121.- Nakagawa M, Sites DP, Palefsky JM, Kneass Z, Moscicki AB. CD4-positive and CD8-positive cytotoxic T lymphocytes contribute to human papillomavirus type 16 E6 and E7 responses. *Clin Diag Lab Immunol* 1999; 6(4): 494-498.
- 122.- Bahjat SK, Shoenberg PS. APCs size um antigens. *Nat Med* 2004; 10(7): 679-81.
- 123.- van Driel WJ, Rensing ME, Kenter GG, Brandt RMP, Krul EJT, van Rossum AB, Schuurin E, Offringa R, Bauknecht T, Tamm-Hermelink A, van Dam PA, Flueuren GJ, Kast WM, Melief CJM, Trimbos JB. Vaccination with HPV16 peptides of patients with advanced cervical carcinoma: Clinical evaluation of a phase I-II trial. *Eur J Cancer* 1999; 35 (6): 946-52.
- 124.- Frazer IH, Thomas R, Zhou J, Leggatt GR, Dunn L, McMillan N, Tindle RW, Filgueira L, Manders P, Barnard P, Sharkey M. Potential strategies utilized by papillomavirus to evade host immunity. *Immunol Rev.* 1999; 168: 131-42.
- 125.-Brady CS, Bartholemew JS, Burt DJ, Duggan-Keen MF, Glenville S, Telford N, Little AM, Davidson JA, Jimenez P, Ruiz-Cabello F, Garrido F, Stern PL. Multiple mechanisms underlie HLA dysregulation in cervical cancer. *Tissue Antigens* 2000; 55 (5): 401-11.

126.-Woodworth CD, Simpson S. Comparative lymphokine secretion by cultured normal human cervical keratinocytes, papillomavirus-immortalized, and carcinoma cell lines. *Am J Pathol* 1993; 142 (5): 1544-55.

127.- Clerici M, Merola M, Ferrario E, -Trabattoni D, Villa ML, Stefanon B, Venzon DJ, Shearer GM, De Palo G, Clerici E. Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst* 1997;89 (3): 245-50.