



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

**PROGRAMA DE DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**DESARROLLO DE UNA ESTRATEGIA TERAPÉUTICA
BASADA EN VECTORES ADENOVIRALES QUE
EXPRESAN LA PROTEÍNA E2 Y LA IL-12 EN UN
MODELO TUMORAL EXPERIMENTAL
MURINO HPV 16 POSITIVO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOMÉDICAS)
P R E S E N T A :
M. EN C. VICTOR HUGO BERMÚDEZ MORALES

DIRECTOR DE TESIS: DR. VICENTE MADRID MARINA

MEXICO, D.F.

2011



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.

Esta tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Virus y Cáncer
Departamento de Infecciones Crónicas y Cáncer
Centro de Investigaciones Sobre Enfermedades Infecciosas
Instituto Nacional de Salud Pública

Bajo la dirección del: DR. Vicente Madrid Marina

Comité Tutotial: Dr. Alejandro Gracia Carranca
Dr. Felix Recillas Targa

Desarrollo de una estrategia terapéutica basada en vectores adenovirales que expresan la proteína E2 y la IL-12 en un modelo experimental de cáncer cervicouterino.

Victor Hugo Bermúdez Morales

Créditos

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado una beca para postgrado.
No. de Becario: 125098

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) porque se me otorgo una beca complementaria. No. de Becario: 50103676-2. Además por su apoyo en reactivos para el desarrollo de proyecto de investigación y para la asistencia a un congreso internacional

Al Centro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas, del Instituto Nacional de Salud Pública, por permitirme realizar el trabajo experimental en sus instalaciones.

Dedicatoria

El presente trabajo se lo dedico a mi madre y a todas las personas que han tenido el infortunio de tener algún tipo de cáncer. Ojala el tiempo me de vida para contribuir al tratamiento de alguna neoplasia.

Agradecimientos

Mi profundo agradecimiento a Dios por estar conmigo, fortalecer mi corazón e iluminar mi mente, y sobre todo por haber puesto en mi camino a personas que han sido mi soporte y compañía en mí andar.

Gracias Madre por darme la vida, siempre estarás en mi corazón. Te amo preciosa.

Papá gracias por apoyarme, por tus sabios consejos y sobre todo por creer en mí.

Irmita, eres el amor más puro que tengo. Muchas gracias por ser la luz tan intensa que ilumina mi vida.

Dr. Madrid muchas gracias por encaminarme en la ciencia. Este logro profesional es de ambos. Que Dios me lo bendiga.

Isabel, gracias por abrirme las puertas de su casa, de su familia y por su amistad

Cynthia, mi amor gracias por llegar a mi vida ya te estaba esperando.

Mi agradecimiento al Dr. Oscar Peralta y Juan Manuel Alcocer, Ustedes han sido pilares en mi formación académica.

Un agradecimiento muy especial. Al Dr. Félix Recillas Targa por sus consejos y ubicarme en el camino de la ciencia.

Dr. José Moreno estoy agradecido con Usted, por su valiosa ayuda en la revisión del manuscrito.

Dr. Pepe Ramos, M. en C. Eva Hernández y M en C. Eduardo Gúzman. Gracias por todo su apoyo.

Resumen	8
Introducción	9
Antecedentes	12
Parte I: Epidemiología del Cáncer cervicouterino	12
Factores de riesgo asociados al cáncer cervicouterino	13
Parte II: Virus del Papiloma Humano y CaCu	15
Biología molecular del virus de papiloma humano	18
Virión	18
Región larga de control	19
Proteínas de transcripción temprana	22
Proteína E1	23
Proteína E2	23
<i>Dominios de la proteína</i>	24
<i>Regulación transcripcional</i>	25
<i>Perdida del ORF de E2 por integración viral</i>	26
<i>Función antiproliferativa de la proteína E2</i>	27
<i>Apoptosis inducida por E2</i>	27
<i>Efecto anti tumoral de E2</i>	29
Proteína E4	30
Proteína E5	30
Proteína E6	30
Proteína E7	31
Proteínas de transcripción tardía	34
Expresión de proteínas virales y desarrollo de cáncer	34
Parte III: Respuesta Inmune Contra Tumores	35
Respuesta inmune	35
Citocinas y microambiente tumoral	37
Parte IV: Vacunas contra la infección por HPV y Cáncer cervicouterino	38
Vacunas profilácticas	38
Vacunas terapéuticas	42
Estrategias terapéuticas	43
Parte V: Terapia génica contra cáncer cervicouterino	44
Interleucina 12 como terapia génica contra el cáncer cervicouterino	45
Planteamiento del Proyecto	47
Hipótesis	48
Objetivo General	48
Objetivos Específicos	48
Materiales y Métodos	49
Resultados	56
Discusión	77

Conclusiones	81
Referencias	82
Parte X Anexos:	100
Parte XI: Publicaciones	104

Resumen

El cáncer cervicouterino (CaCu) representa en la actualidad un gran problema de salud pública en el mundo. Uno de los mayores retos en la investigación es desarrollar una estrategia terapéutica efectiva en contra de neoplasias cervicales avanzadas y asociadas a la infección persistente por el virus del papiloma humano de alto riesgo (HR-HPV). En este sentido propongo una novedosa estrategia terapéutica basada en terapia génica viral como tratamiento para el CaCu. Esta estrategia tiene una perspectiva para su aplicación en lesiones precancerosas y cancerosas del cérvix e independiente de los genotipos de HPVs asociados a la neoplasia. La propuesta estuvo enfocada al uso de un gen de la interleucina 12 (IL-12) como activador de la respuesta inmune celular, y al gen que codifica para la proteína temprana E2 de HPV 16 por su propiedad de inducción de apoptosis en células transformadas por el VPH. Adicionalmente, mediante ingeniería genética se le acoplo un promotor inducible por la proteína E2 de HPV al gen de la IL-12, con la finalidad activar la transcripción de la IL-12 en células positivas a la proteína E2 (estadios precancerosos) y en células transformadas con el HPV (cáncer, negativos a E2) co-administrando ambos genes. De esta manera, se generaron tres vectores adenovirales recombinantes con los genes terapéuticos, AdCMVE2HPV16, AdCMVmIL-12 y AdE2mIL-12. Se evaluó su efecto anti-tumoral en un modelo tumoral murino HPV 16 positivo en un contexto de ratones inmunocompetentes. Previamente, se determinó la expresión las proteínas terapéuticas por los adenovirus recombinantes mediante western blot. A Ratones Balb/c de 6 semanas de edad con un volumen tumoral entre 20 y 30 mm³ se les administró vía intratumoral con 5X10⁵ PFUs de los adenovirus recombinantes de manera independiente. Un grupo de ratones se les co-administró los adenovirus AdCMVE2HPV16 y AdE2mIL-12. Adicionalmente, se comparó el efecto antitumoral de los adenovirus mencionados anteriormente con un adenovirus control que lleva el gen de la proteína verde fluorescente (AdCMVGFP). Los ratones tratados con el vector AdCMVHPV16E2 fueron capaces de inhibir el crecimiento tumoral 15 días después de la administración de las partículas virales. Por otro lado, el grupo de ratones tratados con el vector AdCMVmIL-12 se observó un claro efecto de inhibición del crecimiento tumoral y este efecto fue permanente. El efecto observado por la co-administración de los adenovirus AdCMVE2HPV16E y AdE2mIL-12 fue muy similar al efecto del tratamiento con el virus AdCMVmIL-12. Con estos resultados se demuestra un claro efecto de inhibición del crecimiento tumoral por la IL-12 y E2 en el modelo tumoral murino evaluado, lo que indica su potencial aplicación como tratamiento para el control de lesiones tempranas y de neoplasias cervicales de alto grado asociadas a la infección por el HPV.

Introducción

El cáncer cervicouterino (CaCu) es una de las neoplasias de mayor importancia en la salud pública global. Las altas tasas de incidencia de mortalidad y morbilidad ocasionadas por este tipo de cáncer, superadas solo en algunas poblaciones por el cáncer de mama, merece atención especial para el desarrollo de nuevas estrategias para su control y tratamiento.¹⁻² La agencia internacional para la investigación en cáncer (IARC) revela que aproximadamente, el 83% de los casos ocurren en países en vías de desarrollo y en regiones altamente marginadas. Las tasas de incidencia y mortalidad debidas al CaCu, son cerca de 15 veces más altas en países pobres comparadas con países desarrollados.³

El principal factor etiológico asociado al desarrollo del CaCu, es la infección persistente por el virus del papiloma humano (HPV) de alto riesgo.⁴⁻⁵ Los genotipos virales 16 y 18 están predominantemente asociados al desarrollo de lesiones precancerosas y carcinomas ano-genitales. Los cuales son el foco de atención para el desarrollo de vacunas profilácticas y terapéuticas para el control del CaCu. La infección persistente del HPV de alto riesgo al epitelio cervical, genera lesiones que conllevan a la transformación e inmortalización del epitelio y eventualmente su evolución a cáncer. Interesantemente durante este proceso, el estado físico del HPV es determinante en la progresión de la malignidad y además es congruente con la expresión diferencial de las proteínas virales en los diferentes estadios del desarrollo del CaCu.⁶ En estadios precancerosos el HPV se encuentra en forma episomal, con la expresión de genes virales involucrados en la replicación productiva viral (E1 y E2); mientras en estadios avanzados el genoma viral se encuentra integrado al genoma de la célula huésped y favorece la expresión de los oncogenes E6/E7 de HPV.⁷⁻⁹

Por otro lado, se ha demostrado la presencia de un estado de inmunosupresión generado en el sitio del tumor, resultado de la expresión y represión de genes importantes de la respuesta inmune y de la célula tumoral (MHC clase I, CD3 ζ , Fas, citocinas, etc.).¹⁰⁻¹² Particularmente, hemos detectado altos niveles de las citocinas IL-10 y TGF- β en estadios avanzados del CaCu asociados a la infección por el HPV y además estas citocinas son reguladas por las proteínas E2, E6 y E7 del virus del papiloma humano.¹²⁻¹⁴ Estos eventos generan un microambiente tumoral muy favorable para evadir al sistema inmune lo que se traduce en la implantación del tumor en el cérvix y conduce a la progresión de la malignidad.^{13,14} No obstante ante estos eventos desfavorables a la respuesta inmune, el desafío es revertir el estado de

inmunosupresión local y activar a la respuesta inmune celular para eliminar a la célula tumoral.

Este conocimiento previo de la biología del HPV, de la patología y evolución tumoral, la base celular y/o molecular de las neoplasias y además las alteraciones de la respuesta inmune, nos permite plantear nuevas perspectivas de cómo entender, prevenir, abordar y establecer estrategias profilácticas y terapéuticas para el tratamiento de las neoplasias asociadas a la infección por el HPV.¹⁵⁻¹⁹ Particularmente, este proyecto está enfocado en el desarrollo de una estrategia terapéutica en contra de lesiones pre-cancerosas y neoplasias cervicales de alto grado asociado a la infección por el HPV de alto riesgo. Además de la aplicación de tecnologías como el DNA recombinante y la terapia génica como una herramienta en el diseño, mecanismos de liberación de genes terapéuticos y aplicación de una nueva generación de vacunas terapéuticas.

Recientemente, dos vacunas profilácticas han sido aprobadas por la Food and Drug Administration (FDA) para su uso contra la infección del virus del papiloma humano. Gardasil (Merk & Co. Inc) y Cervarix (GlaxoSmithKline) son vacunas generadas de una mezcla de partículas de virus (VLPs) derivadas de la proteína L1 de la capsida de los HPV tipos 6, 11 (Cervarix) y 6, 11, 16 y 18 (Gardasil); estas vacunas están aprobadas para su aplicación en mujeres adolescentes (9-15 años de edad) y jóvenes (16-26 años de edad) sin infección y lesión cervical.²¹⁻²⁴ Con lo cual se pretende que se tenga una protección del 70% de los casos de cáncer asociados a los HPV 6, 11, 16 y 18.²⁵ Sin embargo, de acuerdo con la historia natural del cáncer cervical, se tendrían resultados sobre la protección de las vacunas en por lo menos 10 años, y los casos de cáncer asociados a otros genotipos de HPV no serían cubiertos. Por otro lado, los casos actuales de cáncer cervicouterino en el mundo no están considerados con estas vacunas, por lo que la investigación de vacunas o estrategias terapéuticas contra el cáncer cervicouterino tienen que seguir siendo apoyadas.²⁶

En este sentido, debido al conocimiento previo de la respuesta inmune contra tumores, biología celular y molecular del cáncer cervicouterino asociada a la infección por el virus de papiloma humano, se propone una novedosa estrategia terapéutica basada en terapia génica como tratamiento para el cáncer cervicouterino. Esta estrategia está visualizada para corregir algunas alteraciones detectadas en cáncer cervical, manipulando el ciclo replicativo del HPV y activando la respuesta inmune. Además con un enfoque dirigido a células neoplásicas infectadas por el HPV independiente del genotipo asociado y con una perspectiva aplicación tanto en estadios precancerosos como estadios avanzados del CaCu.

De esta manera se propone a la interleucina 12 como gen candidato activador de la respuesta inmune celular, acoplado a la secuencia promotora ACCN₆GGT (repetida) que reconoce la proteína E2 de los HPVs, llamada elemento de respuesta a la proteína E2. Así, la activación transcripcional del gen de la interleucina 12 es dependiente de la proteína E2 en células HPV positivas. Adicionalmente, se pretendió usar al gen de E2 de HPV 16 por su propiedad de inductor de apoptosis en células tumorales transformadas con HPV. Es decir la co-administración de ambos genes E2 y la IL-12 con un promotor específico para papilomavirus como estrategia terapéutica contra de neoplasias cervicales establecidas, tendrá un efecto de reversión del crecimiento tumoral mediada por la inducción de apoptosis en las células tumorales HPV positivas y por la activación de la respuesta inmune celular. Adicionalmente, la estrategia terapéutica puede ser aplicada en lesiones cervicales de bajo grado cuando el HPV está en forma episomal aplicando solo la IL-12 con el promotor inducible por la proteína E2 y aprovechar la expresión basal de E2 del tejido cervical. En general la estrategia terapéutica fue visualizada para su aplicación mediante terapia génica viral usando vectores adenovirales recombinantes con los genes E2 y la IL-12 en un modelo experimental tumoral murino HPV 16 positivo caracterizado en nuestro laboratorio. En este trabajo se generaron cuatro adenovirus recombinantes para su aplicación en un modelo tumoral murino HPV positivo en un contexto de ratones inmunocompetentes. Se determinó que el adenovirus recombinante que expresa la proteína E2 de HPV 16 (AdCMVE2HPV16), fue capaz de inhibir el crecimiento tumoral hasta el día 15 después de la administración de las partículas virales, posteriormente el tumor comienza a crecer lentamente sin alcanzar el crecimiento de los ratones sin tratamiento. Por otro lado, se determinó un claro efecto de inhibición tumoral cuando se evaluó el adenovirus recombinante que expresa la IL-12 (AdCMVmIL-12). La co-administración de los adenovirus AdCMVE2HPV16 y AdE2mIL-12 (adenovirus que expresa la IL-12 bajo el control de un promotor que responde a E2 de HPV 16), fue muy similar al efecto de inhibición tumoral generado por el vector AdCMVmIL-12. Sin embargo, el tratamiento con los adenovirus AdCMVGFP (virus que expresa la proteína verde fluorescente) y el AdE2mIL-12, no mostraron efecto antitumoral, solo se observó menor crecimiento tumoral frente a los ratones sin tratamiento. Con estos resultados se demuestra un claro efecto de inhibición del crecimiento tumoral por la IL-12 y E2 de HPV 16 en un modelo tumoral murino, lo que indica su potencial aplicación como tratamiento para el control de lesiones tempranas y de neoplasias cervicales de alto grado asociadas a la infección por el HPV.

Parte I: Epidemiología del Cáncer Cervicouterino

El cáncer cervicouterino (CaCu) representa un grave problema de salud pública global. La agencia internacional para la investigación en cáncer (IARC) revela que el CaCu es la segunda causa más común de cáncer en mujeres en el mundo, con una incidencia de 493,243 nuevos casos de mujeres diagnosticadas, con 273,505 muertes anualmente estimadas en todo el mundo.² Aproximadamente, el 83% de los casos ocurren en países en vías de desarrollo y en regiones altamente marginadas. Las tasas de incidencia y mortalidad debidas al CaCu, son cerca de 15 veces más altas en países pobres comparadas con países desarrollados.³

La incidencia más alta generada por el CaCu se observaron en África sub-Sahara, Melanesia, América Latina y el Caribe (LAC). Mientras las tasas de incidencia más bajas se presentan en países desarrollados con una tasa estandarizadas de 14.5 por 100,000 mujeres. No obstante, las tasas más bajas a la estandarizada se presentan en China (6.8 por 100,000), Oeste de Asia (5.8 por 100,000) y en Ardabil y noroeste de Irán con 0.4 por 100,000.^{2,27} Por otro lado, la población femenina originaria de LAC es considerada como de alto riesgo para desarrollar CaCu, se estiman 72,000 nuevos casos y 33,000 muertes registradas por año.²⁸⁻²⁹ Los intervalos de incidencia ajustados por edad son de 8.8-87.3 para el Caribe, 21.6-52.4 para América Central y 18.8-55.0 para Sur América, por 100,000 mujeres anualmente. ⁶ México tiene una incidencia de 29.5 por 10,000 mujeres.²⁸ No obstante, las Bahamas, Puerto Rico y Uruguay son los tres países de LAC con tasas menores a 20 por 100,000 mujeres (figura 1).²⁹⁻³⁰

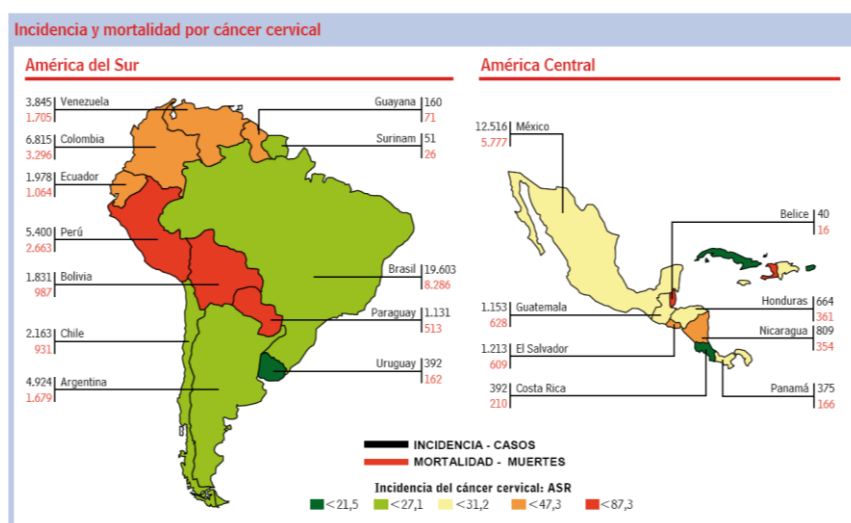


Figura 1: Incidencia y mortalidad por cáncer cervicouterino en Latinoamérica y el Caribe

WHO/ICO, Information Centre on HPV and Cervical Cancer 2002, IARC, Globocan 2002.

En México CaCu es la neoplasia que tiene la tasa de incidencia cruda anual más alta comparada con otros tumores malignos en mujeres en todas las edades; ³¹⁻³² lo que representa una verdadera inequidad de género e injusticia social. El Sistema Nacional de Salud de México brinda atención médica aproximadamente a 9,000 casos de CaCu. Cada año 12,516 mujeres son diagnosticadas con cáncer cervicouterino y 5,777 mueren a causa de esta enfermedad.^{30,32} La tasa estimada de mortalidad por CaCu es de 11.9 por 100,000 mujeres.³³ Las entidades federativas con las tasas de mortalidad más altas se presentan en Campeche, Colima, Morelos, Oaxaca, Veracruz, Chihuahua, Chiapas, Guerrero y Yucatán. Mientras que los estados con tasas de mortalidad más bajas son Nuevo León, Zacatecas, Querétaro y Aguascalientes.³³ En México en promedio 12 mujeres mueren al día a causa de esta neoplasia, y el crecimiento anual de muertes por CaCu es del 0.76%. Adicionalmente, las mujeres que viven en áreas rurales tienen 3.07 veces más riesgo de morir que las mujeres que viven en zonas urbanas.¹

Este tipo de neoplasia es prevenible cuando su diagnóstico es oportuno. Para abatir este importante problema de salud pública, desde 1974 en México se estableció el Programa de Detección Oportuna de CaCu (DOC) el cual sigue hasta la actualidad operando en la población Mexicana. Sin embargo, la mortalidad y la alta incidencia de casos por CaCu en etapas avanzadas reflejan indirectamente el bajo impacto del programa DOC en México, especialmente por que el 90% de estos casos podrían ser detectados mediante el uso efectivo y temprano de la prueba de Papanicolaou (Pap).³⁴⁻³⁵ Adicionalmente, se podrían prevenir de 20 al 60% de las muertes generadas por el CaCu,³⁶ y se estima que el actual programa DOC previene menos de 13% de los casos de CaCu potencialmente prevenibles en México.³⁷ La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006, la cobertura de la prueba de Pap en el país alcanza a 38.9% de las mujeres de 20 años y más. Sin embargo, por entidades federativas se observan diferencias: Chihuahua (30.2%), Sonora (30.8%), Nuevo León (32.7%), San Luis Potosí (32.8%) y Querétaro (33%) cuentan con menor cobertura. Por otro lado, Colima (46.7%), Quintana Roo (48.6%) y Chiapas (46.7%) son las entidades con mayores coberturas.³⁸⁻³⁹ Por tal motivo, se deben de considerar otros factores asociados al CaCu preponderantes para el desarrollo del CaCu, para incidir sobre los índices de mortalidad y morbilidad generados por el CaCu en los siguientes años.

Factores de riesgo asociados al Cáncer Cervical

El virus del papiloma humano (HPV) es el principal agente etiológico asociado al CaCu.¹⁷ Sin embargo, la infección por HPV es necesaria pero por sí misma no es una causa suficiente para desarrollar la enfermedad ⁴⁰ La mayoría de las infecciones por HPV son transitorias,⁴¹ especialmente en las mujeres menores de 30 años de edad

cerca del 70% desaparecen en un periodo de un año y 91% en dos años,⁴²⁻⁴³ y un gran porcentaje no desarrollan ninguna lesión cervical.⁴⁴ El desarrollo y avance del CaCu es un proceso multifactorial que en conjunto pueden influir en el riesgo de la enfermedad o pueden influir en la persistencia viral. Los cuales pueden ser considerados como: a) *Factores ambientales*: Infección por el virus del papiloma humano en la mujer ⁵ y en el hombre,⁴⁵⁻⁴⁶ b) *Factores sociales*: Respuesta del sistema de salud,³⁶ cobertura del programa (DOC),³⁷ barreras culturales, niveles de pobreza,³⁵ educación⁴⁷ y infraestructura de saneamiento.³⁵ c) *Factores epidemiológicos*: Múltiples parejas sexuales,⁴⁸ multiparidad,⁴⁹⁻⁵⁰ tabaquismo,⁵⁰ desnutrición,³⁵ niveles hormonales,⁵⁰ el uso de anticonceptivos hormonales por más de cinco años ⁵¹ e infecciones asociadas.⁵²⁻⁵³ d) *Factores genéticos*: susceptibilidad genética (polimorfismos) a la infección y persistencia al HPV.⁵⁴⁻⁵⁶ e) *Factores del huésped*: Inmunogenética,⁵⁷ inmunosupresión,⁵³ expresión de citocinas inmunosupresoras y pro inflamatorias (IL-10 y TGF-β)^{12, 58-59} y mecanismos de evasión a la respuesta inmune¹³⁻⁶⁰ f) *Factores de la infección por HPV*: Tipo de HPV bajo, intermedio o alto riesgo y variante del HPV ^{5,35,54,61} (figura 2).

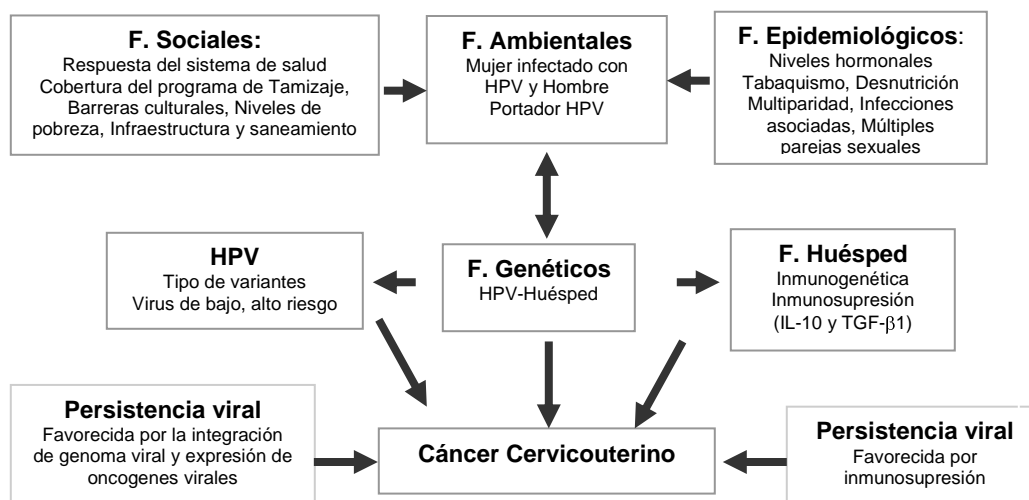


Figura 2: Factores determinantes del desarrollo del cáncer cervicouterino. Las determinantes del CaCu en la población son diversas involucrando la complejidad de la historia natural de la enfermedad ligada a la actividad sexual y a los múltiples factores de riesgo biológicos, genéticos, ambientales, sociales, económicos y culturales, hasta los problemas de disponibilidad de servicios de atención a la mujer en todas las etapas de su vida y la comprensión de las barreras culturales que dificultan la cobertura de la atención en salud y saneamiento. Torres-Poveda KJ, et al. Rev Invest Clin. 2008;60(5):414-20. ³⁵ (Modificado, Bermúdez-Morales V., 2010).

El sustrato social determinado por la pobreza, la inequidad de género y el escaso acceso a la información, baja escolaridad mantienen a grandes sectores de la población femenina en condiciones de alta vulnerabilidad y riesgo de enfermar, morir por ésta y otras causas. Según datos derivados del análisis de los certificados de

defunción del Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI), 30.6% del total de las mujeres que murieron por CaCu en el año 2000 eran mujeres analfabetas; 21.9% cursaron menos de tres años de primaria y 13.8%, únicamente de tres a cinco años de primaria, lo que indica que el 66.3% del total de defunciones por esta causa fueron mujeres analfabetas o con primaria incompleta.⁴⁷

Por consiguiente, para poder abatir la incidencia y mortalidad generada por el cáncer cervicouterino en México, es necesario mejorar los accesos a los servicios de salud en comunidades vulnerables y con altos índices de CaCu, optimizar y re-estructurar los programas de detección temprana del cáncer cervicouterino en México, considerando las entidades federativas con mayor incidencia y mortalidad en México. Además, de implementar nuevas herramientas adicionalmente al Pap, que detecten la presencia de la infección por el HPV en las mujeres. La combinación selectiva de tamizajes podría conferir algunas ventajas para la detección de mujeres con riesgo de CaCu.

Parte II: Virus del Papiloma Humano y CaCu

Los papilomavirus son virus pequeños de DNA circular de doble cadena que infectan epitelios escamosos (células que potencialmente maduran a epitelios escamosos), generando lesiones proliferativas y verrugas de la piel.⁶² Los papilomavirus humano se consideran específico de especie y epitelio-trópicos, infectan epitelios escamosos del tracto genital, anal, área peri anal y la mucosa laríngea. Más de 130 tipos de HPV han sido identificados mediante secuenciación del gen L1,⁶³ considerando 10% de divergencia en la secuencia entre los tipos de HPVs.⁶⁴ Sin embargo, no todos los HPVs están asociados a lesiones cervicales y a cáncer cervical, varios presentan una infección esporádica en el tracto genital (de 30-40 tipos).⁶²

Los tipos de HPVs que infectan al epitelio cervical están clasificados en bajo y alto riesgo (HR y BR) dependiendo de su potencial oncogénico. Los HPVs 6 y 11 de bajo riesgo, están asociados con verrugas ano genitales benignas o condilomas; mientras los HPVs de alto riesgo están asociados con cáncer ano genital y lesiones precursoras de neoplasia intraepiteliales cervicales (NIC), predominantemente se han encontrado los HPV 16, 18, 31, 33, 35 y 45 asociados a este tipo de lesiones cervicales.⁶² Algunos autores refieren que hay HPVs de riesgo intermedio que ocasionalmente se detectan en lesiones cervicales y carcinomas (Tabla I). En este sentido, virtualmente el 100% de los casos de cáncer cervicouterino contienen secuencias de DNA de HPV genital oncogénico de alto riesgo. El HPV 16 se ha encontrado en el 50 al 70% de los casos y el HPV 18 se ha encontrado en el 7 al 20% de los casos.⁶⁵ En conjunto los genotipos 16

y 18 son los responsables del 70% de los casos de cáncer cervicouterino avanzado en todo el mundo⁶⁶ Por lo general, las infecciones genitales por HPV de alto riesgo son muy comunes y la mayoría de los individuos eliminan las infecciones. Sin embargo, las mujeres que no pueden eliminar estas infecciones (10 al 15%) están asociadas con persistencia viral y es un factor de riesgo para el desarrollo de malignidades ano-genitales y de cáncer cervical.^{62,67-68}

Tabla I: Tipos de HPV y su asociación con enfermedad

Enfermedad	Tipo de HPV
Verrugas Plantar	1, 2, 4, 63
Verrugas comunes (piel)	2, 1, 7, 4, 26, 27, 29, 41, 57, 65, 77, 1, 3., 4, 10, 28
Verrugas planas	3, 10, 26, 27, 28, 38, 41, 49, 75, 76
Lesiones cutáneas: Quistes epidermoides, Carcinomas laringeos	6, 11, 16, 30, 33, 36, 37, 38, 41, 48, 60, 72, 73
Epidermoplasias verruciformes	2, 3, 10, 5, 8, 9 12, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 36, 37, 38, 47, 50
Papilomatosis respiratorio recurrentes	6, 11
Hiperplasia focal epitelial de cuello	13, 32
Carcinoma/ papiloma conjuntiva	6, 11, 16
Condiloma acumulata (verrugas genitales)	6, 11, 30, 42, 43, 45, 51, 54, 55, 70
Neoplasia intraepitelial cervical (NIC)	
No específica	30, 34, 39,40,53,57,59,61,62, 64, 66, 67, 68, 69
Bajo riesgo	6, 11, 16, 18, 31, 33,35, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 74
Alto riesgo	16, 18, 6, 11, 31, 34, 33, 35, 39, 42, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 66
Carcinoma cervicouterino	16, 18, 31, 45, 33, 35, 39,51, 52, 56, 58, 66, 68, 70

Meijer C, et al. Gynecol Oncol, 2006,103:12-17. ⁶⁸

Un factor importante en el desarrollo de neoplasias cervicales es su asociación con variantes de HPV.⁶⁹ Las variantes de HPV difieren en sus propiedades químicas, biológicas y en su patogenicidad.⁵² Basado sobre la variación de la secuencia de las regiones L1, L2 y LCR de HPV 16, cinco clusters filogenéticos han sido definidos para el HPV 16: Europea (E), Asiática (As), Asiática-americana (AA), Africana-1 y Africana-2 (Af2). La oncogenicidad de variantes específicas de HPV aparentemente varía geográficamente y por origen étnico de la población.⁷¹ Por otro lado, se ha observado que las infecciones con múltiples tipos de HPV pueden estar asociadas con las severidad de la enfermedad.⁷²⁻⁷³ La prevalencia de múltiples infecciones es de aproximadamente 4.4% dependiendo de las poblaciones.⁷⁴ Las infecciones múltiples son las más frecuentes, pero además se han detectado biopsias con tres, cuatro y cinco tipos de HPV.⁷²⁻⁷³

La historia natural de cáncer cervicouterino es una serie procesos pequeños que progresa lentamente y gradualmente a neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC1), que puede evolucionar a grados severos de neoplasia y lesiones micro invasivas (NIC2 o NIC3) y finalmente a una lesión invasiva o carcinoma invasor (figura 3). Algunos investigadores, han correlacionado el tipo de HPV con diferentes grados de NIC. NIC1 está asociado con infección de HPV transmitida sexualmente y NIC2 y NIC3 son

consideradas como persistencia viral y precursores de cáncer cervicouterino y carcinoma invasor con la integración viral al genoma de la célula huésped.⁷⁵ El tiempo de progresión de displasia moderada (NIC1) a displasia media (NIC2) y subsiguiente carcinoma cervical (CaCu) puede variar dependiendo del tipo de HPV. Sin embargo, se han realizado cálculos; el riesgo de progresión de displasia media a displasia severa es de 1% por año, mientras el riesgo de progresión de displasia moderada a severa es de 16% en un periodo de 2 años y 25% en 5 años.⁷⁶

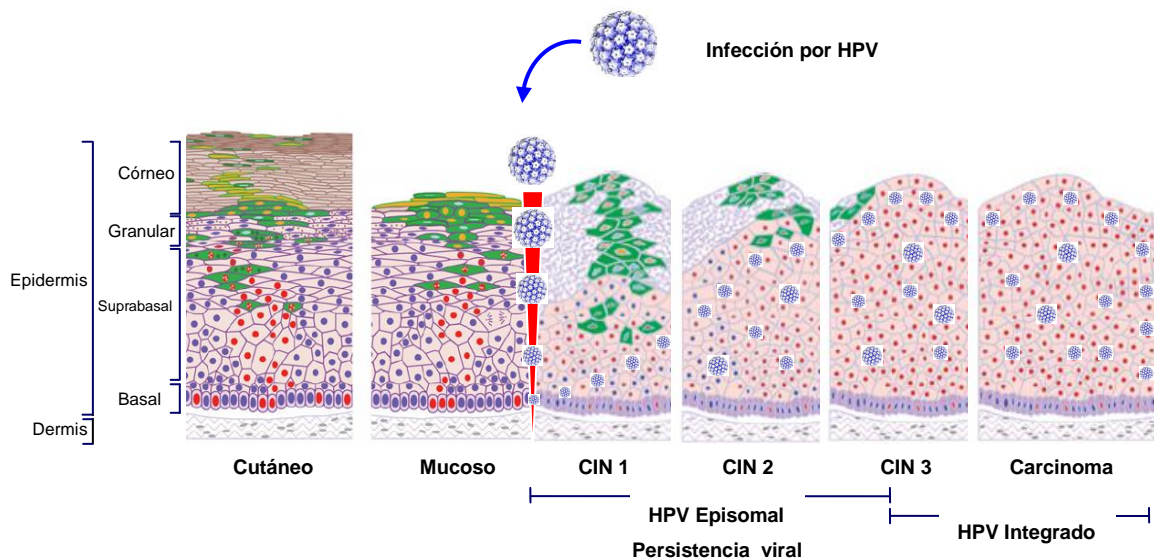


Figura 3: Desarrollo de cáncer cervicouterino. La infección por HPV de alto riesgo en el epitelio cervical generará una serie de lesiones cervicales que evolucionan a neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) y eventualmente al desarrollo de un carcinoma cervical. Durante el proceso de desarrollo del cáncer cervicouterino, el estado físico del genoma de HPV experimenta cambios importantes y están asociados con los eventos patológicos. En NIC grado 1 y 2 el genoma viral está en forma episomal y en NIC 3 el genoma viral se integra al genoma de la célula huésped. El proceso de integración está asociado con la transformación e inmortalización de la célula epitelial. Doorbar J. J Clinical Science, 2006;110:525-541.⁶ (Modificado, Bermúdez-Morales V., 2010).

Los cambios celulares y del tejido cervical ocasionados por la infección persistente por HPV, han sido ampliamente analizados y su interpretación ha generado dos tipos de sistemas de clasificación (Tabla II). El sistema de neoplasias intraepiteliales cervicales (SNIC) y el Sistema Bethesda (SB). El SNIC, está basado en la arquitectura del tejido y promueve el concepto de una enfermedad que evoluciona de lesiones precursoras a cáncer invasor.⁷⁷ El SB fue generado para entender a las neoplasias cervicales e introduce la descripción histológica. Este sistema clasifica a las anomalías cervicales escamosas en cuatro categorías: a) Células escamosas atípicas (ASC), b) Lesiones intraepiteliales de bajo grado (LSIL), c) Lesiones intraepiteliales de alto grado (HSIL) y d) Carcinoma de células escamosas.

Tabla II: Lesion y su asociación con enfermedad

Sistema NIC	Sistema Bethesda	Interpretación
Normal	Normal	Células normales
Células escamosas atípicas		Las células escamosas no aparecen completamente normales. Algunas veces los cambios están relacionados con la infección de VPH
NIC 1	LISL: Lesiones intraepiteliales cervicales de bajo grado	Representa solo una displasia leve o crecimiento celular anormal. Se caracteriza por estar confinado al 1/3 basal del epitelio cervical
NIC 2/3	HSIL: Lesiones intraepiteliales cervicales de alto grado	Representan una displasia moderada, confinada a los 2/3 basales del epitelio cervical
. Carcinoma de células escamosas invasivas . Carcinoma de células glandulares invasiva	Carcinoma	Considerada también de alto grado, la displasia es severa y cubre más de los 2/3 de todo el epitelio cervical, en algunos casos incluyendo todo el grosor del revestimiento cervical. Esta lesión es considerada como un carcinoma <i>in situ</i>

La infección de HPV transmitida sexualmente dirige a tres posibles resultados dependiendo del tipo de HPV que esté involucrado. i) Verrugas anogenitales (condiloma acumulata), generadas alrededor o sobre de los genitales y/o el ano en mujeres y hombres. Estas infecciones están asociadas a los HPV 6 y 11, raramente generan carcinomas. Muchas de estas infecciones son asintomáticas o se resuelven espontáneamente de 3 a 4 meses. ii) Infecciones latentes o inactivas, las cuales pocas personas conocen que están infectadas ya que raramente se generan síntomas y el área infectada histológicamente es normal. El DNA de HPV está presente en el 10% de las mujeres con citología normal. Principalmente, están asociados los HPV 6 y 11. iii) Infección activa asociadas a HPV de alto riesgo, causando cambios en las células infectadas del tejido epitelial del pene, uretra, vagina, ano, vulva y genera neoplasias intraepitelial cervical y cáncer cervicouterino (Tabla I).⁷⁸

Biología Molecular del Virus de Papiloma Humano

Virión

Los viriones aislados de verrugas se visualizan por microscopía electrónica como partículas esféricas de simetría icosaédrica de aproximadamente 55 nm de diámetro. El componente básico de la capsida son los capsómeros, un pentámero en forma de estrella formado de la proteína L1. Los capsómeros están unidos en forma de cruz mediante puentes disulfuro entre los residuos cisteína de las moléculas de la proteína L1. La capsida viral completa consiste en 360 moléculas de L1 y algunas moléculas de una proteína L2 (posiblemente 12 por virión).⁷⁹ El virión contiene una molécula sencilla de DNA circular de doble cadena de 8,000 pb, asociada con histonas formando un mini cromosoma. La organización genética de todos los

papilomavirus es muy similar. El genoma contienen 6 ORFs que codifican para 6 genes de transcripción temprana (E) y para 2 genes de transcripción tardía (L), que codifican para proteínas de la capsida.^{4,5,79-80} Adicionalmente, el genoma contiene una secuencia no codificante llamada, región larga de control (LCR), la cual contiene los elementos de regulación transcripcional viral (figura 4). El genoma de los papilomavirus es transcrito como una compleja unidad transcripcional larga, con varios promotores, dos sitios de poly A (temprana y tardía) y splicing alternativos, como resultado existen múltiples oportunidades de regulación post-transcripcional de la expresión génica de papilomavirus. En tumores y en líneas celulares que contienen el DNA de HPV 16, el genoma viral esta actividad transcripcional,⁸¹⁻⁸² revelando varios RNAm policistrónicos putativos que son generados por splicing alternativos para codificar los productos de genes tempranos y tardíos (figura 4).^{81,84-86}

Región Larga de Control: LCR.

La región larga de control, (LCR del ingles long control región) de los papilomavirus (PVs) es un segmento genómico que contiene varios elementos de respuesta-cis que controlan la expresión de los genes de los PVs y su replicación (figura 5). El LCR representa aproximadamente del 7 al 11% del genoma total, aproximadamente alrededor de 850 pb en los HPVs genitales flanqueados por los genes L1 y el sitio de inicio de transcripción del gen E6. Mientras los PVs pueden estar estrechamente relacionados, el LCR de los PVs no muestra semejanzas en la secuencia extensa de nucleótido; solo existe un gran número de motivos (motifs) cortos conservados y aparentemente están relacionados entre los HPVs genitales o entre otros HPVs.⁸⁷ Por lo que se ha especulado que estos motifs están relacionados con las funciones de los HPVs.⁸⁸

Solo cuatro secuencias están suficientemente bien caracterizadas y consideradas comunes entre los PVs. Las cuales son (i) Un sitio de poliadenilación para los RNAm tardíos, el cual es muy cercano al extremo 5' del LCR, (ii) Sitios de unión de la proteína E2, los cuales varía en posición relativa y en número; 4 en HPV genitales a 10 en BPV-1, (iii) un sitio de unión de la proteína E1 y (iv) la caja TATA (TATA box) del promotor del gen E6.⁸⁹ Se ha determinado ampliamente las funciones de regulación de la transcripción y replicación del LCR de los PVs. Particularmente para los HPVs genitales, se ha propuesto un modelo de la organización del LCR. Un segmento 5', un segmento central y un segmento 3'.

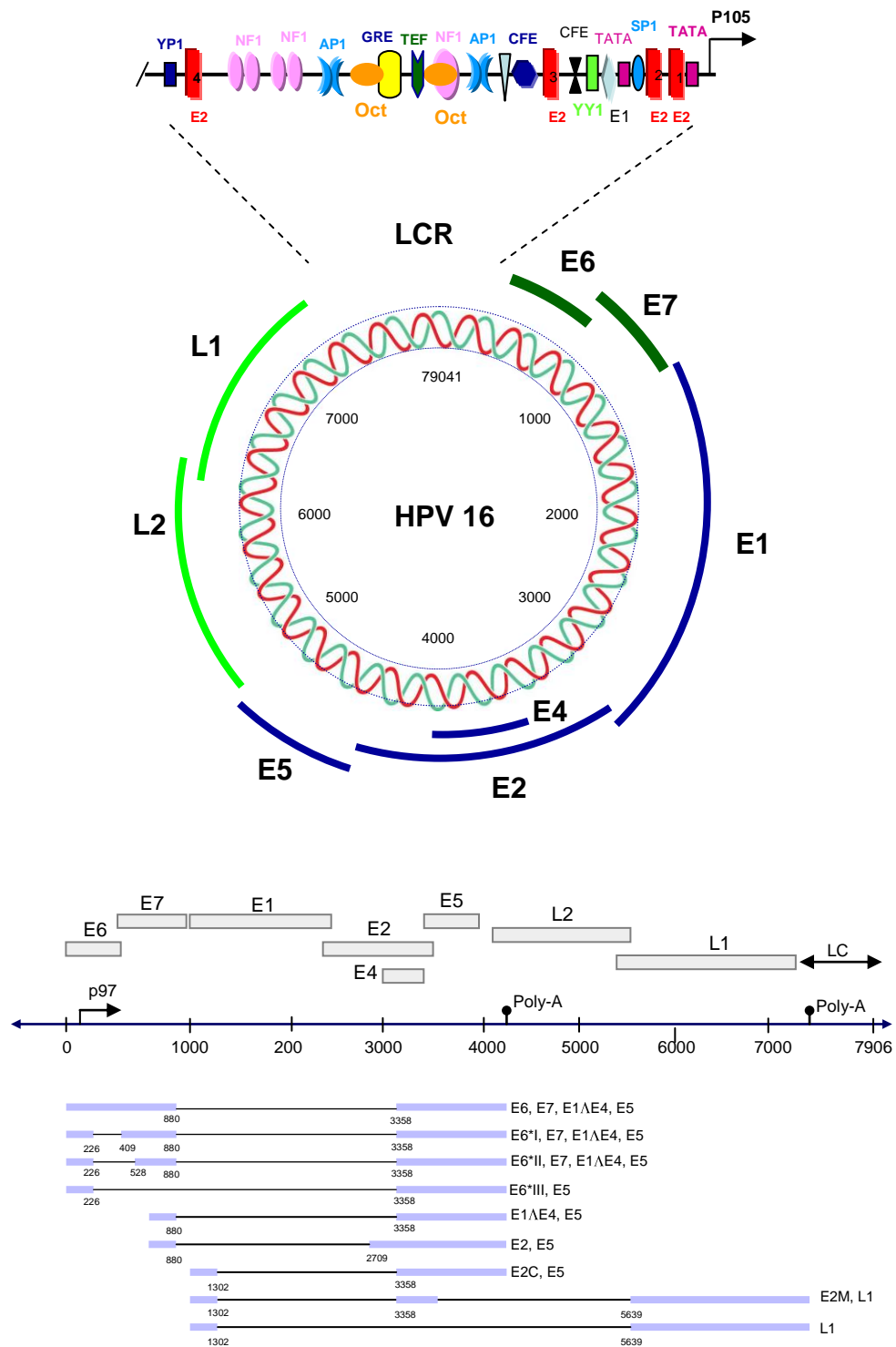


Figura 4: Genoma y transcritos de HPV 16

Schwartz S. Front Biosci. 2008;13:5880-91.⁸¹

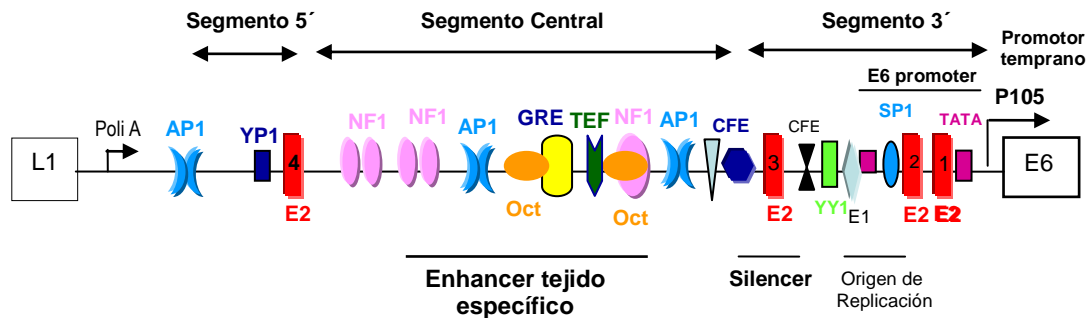


Figura 5: Región larga de control de HPV 16. La figura representa la organización de la región larga de control del genoma de HPV 16. De manera general está constituida por tres regiones importantes. i). Un segmento 5', ii). Un segmento central y iii). Un segmento 3'. Se muestra el promotor temprano, el origen de replicación y secuencias enhancer tejido específico. Importantemente, se presentan cuatro elementos de respuesta a la proteína E2 de HPV, tres presentes en la región 3' y el cuarto se presenta en el segmento 5'.

Segmento 5' del LCR de HPVs genitales. Este segmento tiene un tamaño aproximado de 300 pb flanqueado por el codón de terminación L1 y un sitio de unión a la proteína E2. Este segmento contiene el sitio de terminación y el sitio de poliadenilación para la transcritos tardíos, además de los elementos de regulación negativa que actúan sobre la estabilidad de los RNAm tardíos.⁹⁰ En HPV 18 y 16 se localiza un promotor que controla la expresión de los genes tardíos, sin embargo, no se ha detectado en otros tipos de HPVs genitales. La función del sitio de unión a E2 en este segmento no se conoce con exactitud, pero se ha reportado que puede influir en la transcripción del promotor de E6/E7 *in vitro*.

Segmento central del LCR de HPVs genitales. Este segmento está flanqueado por los 2 sitios de unión de la proteína E2 (#1 y #2). Tiene un tamaño aproximado de 400 pb y se ha reportado que está involucrado como enhancer transcripcional epitelio específico de HPV 16, 18 y 11.^{89,91} En esta región se localizan varios elementos de regulación para factores de transcripción, los cuales se ha especulado que son reconocidos por factores de transcripción de la célula epitelial o tejido específico, sin embargo no se ha demostrado que sean exclusivos de las células epiteliales. El enhancer localizado en este segmento, adicionalmente está involucrado en modular la expresión viral en respuesta al estado fisiológico y de diferenciación de los keratinocitos del huésped en las diferentes capas del epitelio estratificado queratinizado. Esto es el resultado de la unión diferencial de factores de transcripción en sitios afines en el enhancer que pueden modular la expresión presente en el

microambiente celular.⁸⁹ En este segmento se han identificado 11 tipos de factores de transcripción que pueden unirse *in vitro* en más de 20 sitios diferentes en el enhancer de HPV 16, como: AP1, cEBP, receptor de glucocorticoides, receptor de estrógenos, NFI, NF-IL6, Oct-1, PEF-1, TEF-1, TEF-2, y YY1.⁸⁹ Este segmento central está flanqueado por el tercer sitio de unión de la proteína E2, el cual está involucrado en la replicación inicial y además modula la transcripción de los genes E6 y E7.

Segmento 3' del LCR de HPVs genitales. Este segmento tiene un tamaño aproximado de 140 pb, y contiene un sitio de unión para la proteína E1, el cual se identifica como el origen de replicación. El sitio de inicio de la transcripción, el cual se localiza 5 pb upstream del ATG del gene E6, y localizado 90 pb downstream del sitio de unión de la proteína E1. Además contiene un sitio de unión para el factor de transcripción SP1 y dos sitios de unión para la proteína E2 y una caja TATA. Estos cuatro sitios (SP1, E2 y TATA BOX) forman un complejo de nucleótidos que modula la actividad promotora para los genes E6 y E7. La caja TATA es requerida para la unión del factor de transcripción TFIID y establecer el complejo de pre-iniciación, el factor SP1 favorece o median el efecto del enhancer. Los sitios E2 se traslapan con la caja TATA y con el sitio SP1, la unión de la proteína E2 a sus sitios de unión desplaza a los factores de transcripción TFIID y SP1, lo cual ha apoyado la hipótesis que la proteína E2 tiene una función individual y además está interconectada con factores reguladores que favorecen o reprimen la expresión génica. La unión de SP1 al promotor temprano asociado a E2, puede estar involucrado en la represión transcripcional de los oncogenes E6 y E7, mientras que la asociación con la proteína E1 favorecen la replicación viral.⁸⁹ Sin embargo, cada HPV tiene su propio arreglo de elementos reguladores en el LCR y está sujeto a la expresión diferencial y a la presencia de los factores de transcripción que favorece o reprimen la expresión de los genes virales.

Proteínas de Transcripción Temprana (E)

Las proteínas que son expresadas tempranamente en el ciclo viral están involucradas en la iniciación de la expresión de las proteínas virales, replicación del DNA viral y en la proliferación del ciclo celular en presencia de factores anti-proliferativos. En la tabla III se ilustra las proteínas de transcripción temprana que son expresadas por los HPVs y sus principales funciones biológicas.

Tabla III: Funciones de proteínas de transcripción temprana

Proteína	Función
E1	Helicasa, ATPasa, Proteína de unión a ATP para iniciar la replicación del DNA
E2	Factor de transcripción viral. Se une con la proteína E1 para iniciar la replicación viral importante para la encapsulación del genoma
E4	Interacciona con proteínas del citoesqueleto para el ensamble de los viriones
E5	Actividad transformante, sobre regula receptores relacionados con factores de crecimiento
E6	Interacciona con p53 e induce su degradación por la vía de la ubiquitina, con E7 inmortalizan keratinocitos
E7	Se une con la proteína de retinoblastoma, desregula el checkpoint de G1/S

Proteína E1: Es una proteína iniciadora de la replicación viral y tiene un papel crítico en mantener el genoma viral en un estado episomal durante el ciclo de vida viral. E1 muestra algunas similitudes en secuencia y estructura con el antígeno T largo de poliomavirus, involucradas en iniciación de la replicación viral.⁹² En BPV, E1 es una fosfoproteína que tiene actividades de ATPasa y helicasa. E1 y la proteína E2 transactivador completa, son requeridas para la iniciación eficiente de la replicación del DNA viral *in vivo*. E1 y E2 forman un complejo en solución y este complejo se une con alta afinidad al origen de replicación, el cual contiene sitios de unión para ambas proteínas.⁹³⁻⁹⁴ La unión del complejo E1:DNA en conjunto con la maquinaria de replicación de la célula huésped favorecen la iniciación de la síntesis de la nueva hebra de DNA. Adicionalmente, la proteína E1 está involucrada en regular la transcripción viral y transformación.⁹⁵

Tanto el gen de E1, como la proteína (en estructura y función), están altamente conservados entre los PVs.⁹⁶ El ORF de de BPV-1 codifica para dos productos génicos. Una fosfoproteína nuclear completa de 68 a 72 –kDa (E1), la cual es requerida para la replicación del DNA viral, y una fosfoproteína pequeña de 23-kDa (E1-M) la cual se ha descrito que está involucrada en la amplificación del DNA viral durante la fase vegetativa de la infección del BPV-1.

Proteína E2: La proteína E2 de los PVs es un regulador de la transcripción y replicación viral, por lo que es considerada como una proteína de suma importancia en el ciclo de vida viral.⁸⁵ El gen de E2 codifica para una proteína altamente fosforilada de 48 kDa para BPV-1 y 42 kDa para HPV 16.⁹⁷⁻⁹⁹ La proteína E2 está compuesta por tres dominios funcionales (figura 6). i) Un dominio N-Terminal (E2NT) compuesto de aproximadamente 200-aminoácidos el cual está altamente

conservado entre los PVs (E2 Sequence Database, <http://hvp-web.lanl.gov>), este dominio de transactivación es el responsable de la interacción con factores transcripcionales virales y de la célula huésped; tales como Sp1, TFIIIB y AMF. ii) Un dominio de Bisagra flexible rico en prolinas (no conservada entre los PVs) une al dominio E2NT y al iii) dominio Carboxilo-Terminal (E2CT) está compuesto de aproximadamente 90 a 100 aminoácidos, este dominio es el responsable de la unión a DNA en forma de homodímero.^{97,100}

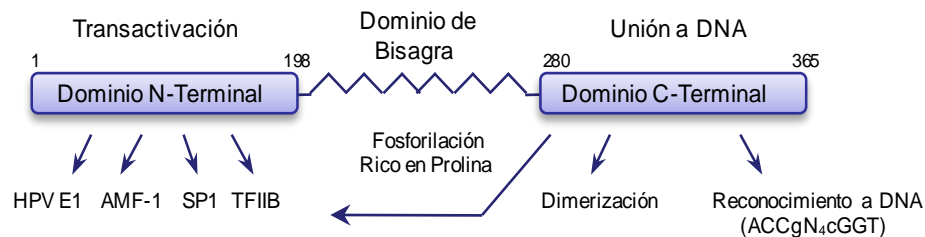


Figura 6: Estructura de la proteína E2 HPV. La proteína E2 de los HPV's tiene un peso molecular aproximado de 42 kDa. Este factor de transcripción puede formar un homodímero, cada monómero está estructurado en tres dominios. Un dominio C-Terminal el cual tiene implicaciones de reconocimiento del DNA reconociendo la secuencia ACCN6GGT. El dominio de Bisagra que sirve de unión a los dominios y un dominio N-Terminal con funciones de transactivación.

Dominio de transactivación, E2NT: Este dominio está formado por dos dominios, un dominio β -hoja anti-paralela y un dominio helicoidal conteniendo tres hélices anti-paralelas. El dominio de transactivación es dimérico en la estructura cristalográfica y se ha sugerido que este dominio favorece la oligomerización en la interacción entre la unión de moléculas de E2 y a sitios de unión a E2 distantes sobre el genoma viral, mediante la formación de loops del DNA.¹⁰⁰ Este dominio es el responsable de la activación transcripción al interactuar con promotores que contienen elementos de respuesta a la proteína E2. Adicionalmente, se ha determinado que la función de transactivación de este dominio es independiente del dominio de bisagra, pero no es claro si el dominio de dimerización es esencial para ejercer su función de transactivación.^{98,100}

Dominio de Bisagra: Este dominio conecta a los dominios E2NT y E2CT. Esta región está pobremente conservada entre los PVs.⁹⁶ La fosforilación de serina (Ser) en este dominio es crítico para la replicación del DNA, y para las funciones de regulación de E2 de HPV-11 durante la transcripción y replicación del DNA viral; por lo que se ha propuesto que este podría ser un segundo dominio de transactivación en BPV-1 que puede alterar la cinética de la unión la proteínas TBP al DNA.¹⁰¹ Adicionalmente, se ha

propuesto que este dominio favorece que el dominio E2CT interaccioné con mayor afinidad al DNA.^{97,102}

Dominio de Unión a DNA: La estructura cristalográfica del dominio carboxilo terminal (85 aminoácidos), consta de una estructura -barril anti-paralela que se une a DNA. La figura 7 muestra a la proteína E2 en forma de un dímero interaccionando con el DNA mediante el dominio de unión a DNA, este dominio está constituido por una subunidad en forma de ocho formado por cuatro β -barril anti-paralela; y un par α -hélices simétricamente posicionadas fuera del barril conteniendo residuos de aminoácidos que son requeridos para la interacción específica con el DNA.¹⁰³

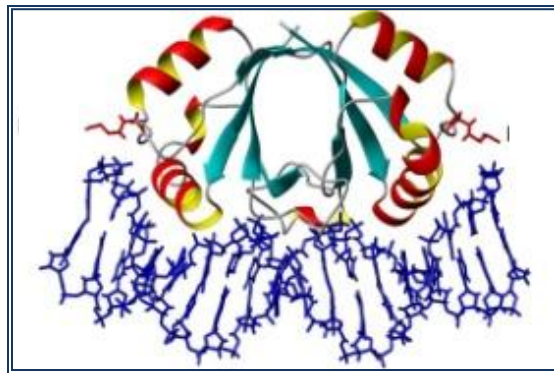


Figura 7: Modelo de la proteína E2 HPV y su interacción con el DNA

Unión de la proteína E2 al DNA: Dieciocho aminoácidos presentes en la proteína E2 son los responsables de la unión con la doble hélice del DNA. En la posición 340 el residuo cisteína es muy sensible a la oxidación, este residuo hace contacto directo con el DNA, cuando este residuo es sustituido por otro (glicina, serina, alanina) la proteína E2 se une al DNA pero no es capaz de inducir la transcripción eficientemente en células de mamífero.¹⁰⁴ Por otro lado, la alta afinidad de la proteína E2 a el DNA se ha calculado en los rangos de $4.5 \times 10^{-9} \text{M}$ a $2 \times 10^{-11} \text{M}$.¹⁰⁵⁻¹⁰⁶ Las proteínas E2 de los PVs se unen a la secuencia palindrómica ACCgNNNNcGGT (sitio de unión a E2),⁹⁵ los nucleótidos internos y la secuencia flanqueante puede tener mucha influencia en la afinidad de la unión de E2.⁹⁹ Los nucleótidos en letras minúsculas son considerados como preferidos pero no son requeridos para el reconocimiento específico por E2. La región central NNNN es referida como el "spacer, espaciador" y el tamaño es absolutamente conservado entre los PVs, lo que varía es la composición en secuencia varía entre los tipos.¹⁰⁵

Regulación Transcripcional: Múltiples sitios de unión a la proteína E2 se han encontrado en el LCR de los genotipos de PVs, y estos están relacionados con su actividad transcripcional. En BPV-1, 12 palindromes se han encontrado en su genoma

y 5 sitios adicionales difieren en un nucleótido. En los genomas de HPV de alto riesgo hay 4 sitios de unión a E2, los cuales están localizados upstream del promotor temprano (P₉₇ en HPV-16, P₁₀₅ en HPV-18) que regulan la expresión de los oncogenes E6 y E7, además de la replicación del genoma viral en conjunto con la proteína E1. La posición y organización de los sitios de unión a E2 en el LCR es muy importante para la represión transcripcional, activación de la transcripción y para la replicación del genoma viral. Esto es el resultado del orden de unión de E2 y los sitios vecinos de unión a factores transcripcionales,⁹⁷ como a los factores transcripcionales SP1 y TFIID. En muchos casos los sitios de E2 próximos al promotor tienen baja afinidad por la proteína E2 en comparación con los sitios upstream del promotor.^{106,108-109} Esto ha permitido plantear un modelo en el cual bajos niveles de E2 a su unión al DNA está relacionado con la alta afinidad a sitios E2 upstream y activación transcripcional, en contraste altos niveles de la proteína E2 baja afinidad a sitios próximos al promotor están relacionados con represión transcripcional (figura 8).

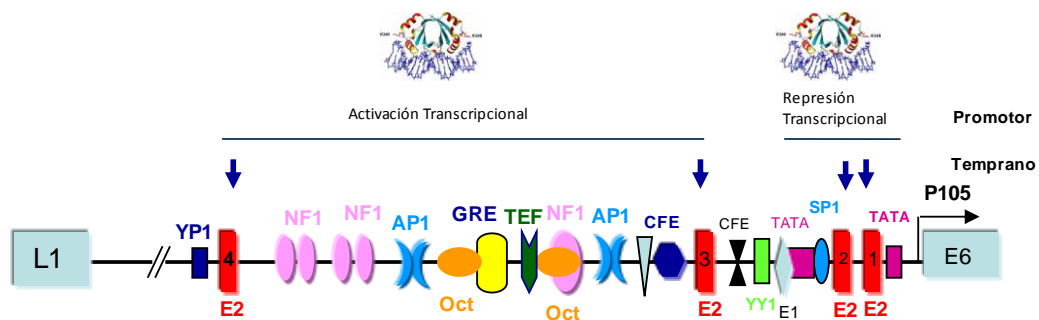


Figura 8: Regulación transcripcional de la proteína E2. La organización de los elementos de regulación transcripcional E2 (ERTE2) presentes en la región larga de control es muy particular de los HPVs. En el LCR del HPV 16 los ERTE2 cercanos al promotor temprano, la proteína E2 tiene funciones de represión transcripcional y los ETE2 tadios E2 favorece la transcripción de los genes virales.

Perdida del ORF de E2 por integración viral: La proteína E2 de los PVs reprime la expresión de los oncogenes E6 y E7 de HPV cuando el genoma del HPV está en forma episomal en la célula huésped.¹¹⁰⁻¹¹² La represión transcripcional ocurre a través de la interacción de la proteína E2 a los sitios de unión a E2 en el LCR. En carcinomas cervicales positivos a HPV 16 y 18, comúnmente están asociados con la integración del genoma viral dentro de los cromosomas de la célula huésped (Figura 3).¹¹³ La integración usualmente ocurre con la ruptura del ORF de E1 y E2, en consecuencia hay pérdida de la expresión de E2 y está relacionada con la pérdida de la expresión de los genes E6 y E7 de HPV.¹¹⁴⁻¹¹⁵ De esta manera, la integración del genoma de HPV y la pérdida de la expresión de E2 puede ser un paso muy importante en el proceso

carcinogénico que resulta en la desregulación de la expresión de los oncogenes E6 y E7.

Función antiproliferativa de la proteína E2: Las primeras observaciones sobre el efecto de inhibición de crecimiento celular, fueron realizadas por Françoise Thierry, 1987. La inducción de la expresión ectópica de la proteína E2 de HPV en células HeLa, demostrando que E2 tiene funciones antiproliferativas.¹¹⁶ Por otro lado, otros grupos han reportado este efecto antiproliferativo en líneas celulares derivadas de carcinoma cervical e induce senescencia y arresto celular.¹¹⁷⁻¹¹⁸ Las proteínas E2 de HPV 16, HPV 18 y BPV 1 inducen arresto del ciclo celular específicamente en células de carcinoma asociadas a la infección con HPV, este efecto está relacionado con la represión transcripcional de los oncogenes E6 y E7; y tanto el dominio de transactivación como el dominio C-Terminal son requeridos para ejercer este efecto.¹¹⁹⁻¹²⁰ En células de carcinoma cervical, la expresión ectópica de E2 induce principalmente arresto en G1 del ciclo celular, asociado con la represión transcripcional del oncogén E6; lo cual generará la estabilización de p53 y en consecuencia se activa al gen p21, lo que conduce al arresto celular en la fase G1.¹²¹ El prolongado arresto celular en células HeLa por la expresión, además genera senescencia replicativa.¹²² Por otro lado, la represión de la expresión de E7 juega un papel muy importante en el fenotipo de senescencia celular el cual está ligado a la activación de p21.¹²³

Apoptosis inducida por E2: Adicionalmente a la inducción del arresto del ciclo celular, se ha demostrado que las proteínas E2 de varios HPVs de alto riesgo pueden inducir apoptosis cuando E2 es suministrada de manera ectópica en células HeLa.^{120, 124-125} El proceso de apoptosis es acompañado con fragmentación de DNA,^{119,121-123} condensación de la cromatina, formación de cuerpos apoptóticos y exposición de fosfatidilserina en la superficie de la célula (finción de annexina V).¹²² Por otro lado, el dominio de unión a DNA de la proteína E2 no es indispensable para la inducción de apoptosis, ya que mutaciones puntuales en este dominio no afectan la activación de la muerte celular.^{119, 124-125} En contraste, el dominio E2NT es suficiente para inducir la muerte celular mutaciones en este dominio abaten la actividad pro-apoptótica de E2.^{119-120,123,125}

Adicionalmente, se ha demostrado que la proteína E2 tiene propiedades pro-apoptóticas en líneas celulares derivadas de carcinomas negativas a HPV, tales como, MCF7 (cáncer de mama), saos-2 (osteocarcinoma), 808F, NIH3T3 y en células epiteliales primarias.¹²⁴ Estos resultados indican que la actividad pro-apoptótica de E2 es independiente de otras funciones virales, tales como la represión transcripcional de E6 y E7. La actividad de inducción de muerte celular de E2, parece ser una función

autónoma por la cual la proteína E2 puede modificar directamente la fisiología de la célula.¹²⁰

El papel de p53 en la inducción de apoptosis por E2 es aún controversial. Varios reportes indican que el efecto pro-apoptótico de E2 en células transformadas por HPV es independiente de la actividad transcripcional de p53.¹¹⁹ Sin embargo, otros reportes, indican que E2 de HPV 16 puede inducir apoptosis mediante dos vías. Una vía involucra la unión de E2 a p53 en células transformadas con HPV, en líneas celulares transformadas o no con HPV y en células normales. La segunda vía requiere de la unión de E2 al genoma viral y opera solamente en líneas celulares transformadas con HPV. Mutaciones en E2 pueden reducir significativamente la unión de la proteína a p53 y no hay activación de apoptosis en células no transformadas con HPV y en células normales, pero la mutación no afecta la capacidad de inducción de apoptosis en células transformadas con HPV.¹²⁶ Por otro lado, la proteína E2 de HPV 16 en ensayos de transfección transitoria no es capaz de inducir la activación de apoptosis en células carentes de p53.¹²⁵ Sin embargo, en células Saos-2, donde p53 está mutado, las células son sensibles a la muerte celular independiente de p53.¹²⁴ Se ha especulado, que el método de transfección puede estar involucrado en la inducción de apoptosis, y se podría especular que la vida media de la proteína E2 en transfecciones transitorias tiene menor actividad comparado con sistemas de transfección con sistemas virales. Por lo tanto, es controversial el papel de p53 en la inducción de apoptosis por E2 y además, pueden existir diferentes mecanismos de inducción de apoptosis entre las proteínas E2 de alto riesgo HPV 16 y HPV 18.

Adicionalmente, la actividad pro-apoptótica de E2 está relacionada con los tipos de HPV oncogénicos. E2 de HPV 6 y 11 relacionados con lesiones benignas, no inducen apoptosis. En cambio los HPV de alto riesgo asociados a cáncer cervicouterino inducen apoptosis.^{120,127} Además, la vía la apoptosis está relacionada con la localización celular de la proteína E2 en líneas celulares de carcinoma cervical después de su re-introducción. Proteínas E2 de bajo grado permanecen en el núcleo, mientras que las proteínas E2 de HPVs de alto riesgo permanecen tanto en el núcleo y citoplasma.¹²⁰ La inducción de apoptosis es causada por la acumulación de la proteína E2 en el citoplasma y está relacionada con la activación de pro-caspasas 8.^{120,124} En ensayos de transfección con E2 en presencia de un inhibidor específico para caspasas (Z-VAD-FMK) la muerte celular es inhibida y no hay activación de caspasa 8. Además, se ha determinado que el dominio E2CT está implicado en la inducción de la apoptosis y en la actividad proteolítica de las caspasa 8. Una forma delectada de la proteína E2 de HPV 18 (carboxilo terminal), aumenta considerablemente la muerte celular de células HeLa comparación con la proteína completa. Por otro lado, se ha especulado que la actividad pro-apoptótica de E2 durante el ciclo viral vegetativo,

podría estar involucrado en los estadios finales de la producción viral en la diferenciación del epitelio queratinizado.¹²⁰ Se propone que E2 se acumula en el citoplasma de las células diferenciadas, seguido de la amplificación del genoma viral, de tal manera que la acumulación de E2 podría entonces inducir apoptosis en células productivas y lo cual favorece la liberación de los viriones (figura 9).

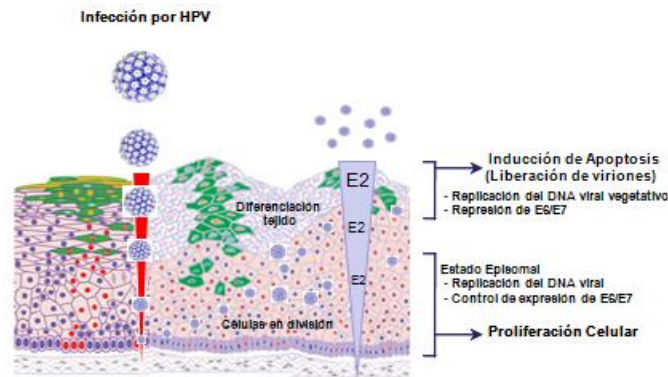


Figura 9: E2 y su función pro-apoptótica en el ciclo viral vegetativo. Se ha especulado que la función pro-apoptótica de la proteína E2 en estadios precancerosos previa a la integración viral, esta relacionada con la inducción de apoptosis de la célula epitelial para la liberación de viriones.

Efecto antitumoral de E2: Adicionalmente a la actividad pro-apoptótica de la proteína E2 de papilomavirus, se ha observado que tiene actividad antitumoral. El primer reporte sobre la actividad antitumoral, fue detectado en un modelo de papilomas en conejos, donde E2 induce regresión tumoral y fue asociada a capacidad de la proteína E2 para inducción de altos títulos de anticuerpos y se sigue que la regresión tumoral es dependiente de la activación de la respuesta inmune celular.¹²⁸⁻¹²⁹ Sin embargo, los estudios con mayor trascendencia sobre el efecto antitumoral, fueron realizados en modelos de ratón generados por la administración de líneas celulares derivadas de carcinoma cervical (HeLa) en un contexto de ratones inmuno-deficientes. El crecimiento tumoral fue tratado con un vector viral atenuado recombinante (basado en el virus de vaccinia Ankara, MVA) que expresa la proteína E2 de papilomavirus bovino. La regresión tumoral fue del 80% de los ratones tratados con el virus de vaccinia.¹³⁰ Los ratones tratados mostraron actividad citotóxica contra las células tumorales, el efecto antitumoral fue asociado a la activación de la respuesta inmune humoral, la producción de anticuerpos anti-tumor son capaces de activar a los macrófagos y destruir a las células eficientemente.¹³¹ Estos estudios están basados en un sistema de ratones inmuno-deficientes inyectados con líneas celulares humanas derivadas de carcinoma cervical. Sin embargo, no se ha demostrado el efecto antitumoral de la proteína E2

de papilomavirus humano ya sea de conejo, bovino o humano en un modelo tumoral murino en ratones inmunocompetentes.

En estudios de fase II se evaluó el potencial uso del MVA E2 virus como tratamiento contra lesiones precancerosas (NIC I y NIC II) asociadas con la infección de HPV oncogénicos. Los pacientes fueron tratados con el virus de vaccinia recombinante MVA E2 después de confirmar la infección del HPV por medio de análisis citológico y colposcopia. Adicionalmente, ninguno de los pacientes recibió previo tratamiento para la infección del HPV. Después de considerar los criterios de inclusión y exclusión del protocolo, se evaluó seis semanas después de la aplicación del virus recombinante, determinando la presencia o ausencia del DNA de HPV y la presencia de infección remanente.¹³²

Proteína E4: El RNAm que codifica para E4 es un producto (E1ΔE4) muy abundante en las células y predominantemente es una proteína citoplasmática de 17kDa.¹²¹ Esta proteína sufre un rompimiento de la región N-terminal, generando especies pequeñas de E4 de 16kDa (-15 a.a.), 11kDa y 10kDa (- 59 a.a.),¹³⁴ la región C-terminal está involucrada en su dimerización.¹³⁵ En verrugas asociadas a HPV 1 la expresión de E4 está relacionada con la replicación del DNA viral en estado vegetativo y ocurre preferencialmente arriba de las células de la capa basal.¹³⁶ Una característica de ciertas proteínas E4 es su capacidad para agregarse en el citoplasma y en el núcleo en forma de inclusiones granulares. Se ha observado que las proteínas E4 en ciertas líneas celulares pueden asociarse a los filamentos de keratinas y en ciertos casos pueden causar colapsos de las mismas (HPV16).¹³⁷

Proteína E5: El ORF de los HPV que infectan mucosas, esta río abajo del ORF del gen de E2 y codifica para una proteína altamente hidrofóbica asociada a membrana, con propiedades transformantes y muy poco conservada entre los HPV's.¹³⁸ Todas las proteínas son capaces de transformar fibroblastos de roedores favoreciendo la síntesis de DNA y coopera con el oncogén ras para la transformación de las células epiteliales y de células de riñón de rata de recién nacido. Adicionalmente, E5 se une a varias proteínas y receptores celulares. Se une al receptor del factor de crecimiento epidermal (EGF-R), al factor de crecimiento derivado de plaquetas tipo β (β PDGF-R), α -adaptina (p125), forma complejos con una proteína de 16K que ha sido identificada con una ATPasa H⁺ vacuolar,¹³⁸ se une a la proteína p31 asociada a células B (Bap31),¹³⁹ kariofeina β 3.¹⁴⁰ En células transfectadas con E5 se sobre-expresa c-fos y c-jun, además inhibe el transporte del complejo de histocompatibilidad clase I.¹⁴¹

Proteína E6: Las proteínas E6 de HPV consisten de 151 aminoácidos, son proteínas relativamente pequeñas difíciles de purificar en formas nativas y poco

solubles. Estas proteínas de HPVs contienen estructuras secundarias con alto contenido de α -hélice y β -plegadas, formando dos dedos de zinc caracterizados por un motif CXXC.¹⁴² Las proteínas E6 de HPV son derivados de genes de expresión temprana, constituyen uno de los principales oncogenes de HPV con múltiples funciones. Se ha demostrado que la proteína E6 es un transactivador transcripcional o co-activador,¹⁴³ tiene propiedades hiperproliferativas, impide la diferenciación de las células epiteliales e induce la formación de tumores.¹⁴⁴ La proteína E6 de HPV de HR son suficientes para inmortalizar células epiteliales humanas y coopera con E7 para inmortalizar keratinocitos primarios humanos en cultivo.¹⁴⁵ Sin embargo las proteínas E6 de HPV de BR, son incapaces de inmortalizar este tipo de células.¹⁴⁶ La capacidad de inmortalización de las proteínas E6 de HR radica en su unión a proteínas celulares, en particular con E6AP y E6BP, modulando los procesos celulares. El complejo E6-E6AP pueden unirse *in vitro* a p53,¹⁴⁷ desregulando las funciones de la proteína supresora de tumores y además E6 está involucrada en la degradación de p53 donde este proceso requiere la formación de un complejo ternario formado entre E6, E6AP y p53. Sin embargo las proteínas E6 de HPV de BR como HPV 6 y HPV 11 no tienen la capacidad de degradar a p53.¹⁴⁸ Adicionalmente, se ha determinado que las proteínas E6 de HPV de HR interactúan y subsecuentemente inactivan varias proteínas celulares importantes en el control de la apoptosis, influyendo en la transcripción de genes supresores de tumor, mantenimiento la organización epitelial y el control de la proliferación celular (figura 10).¹⁴⁶

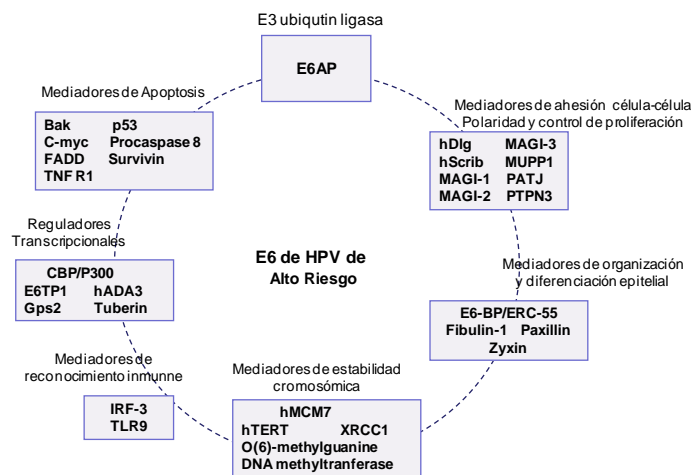


Figura 10: Proteína E6 de HPV de alto riesgo y su interacción con proteínas celulares
Tungteakkhun SS., et al. Arch. Virol. 2008;153:397-408.¹⁴⁶

Proteína E7: Las proteínas E7 de HPV contienen aproximadamente 98 aminoácidos y están estructuradas en tres regiones o dominios conservados llamados CR1, CR2 y CR3.¹⁴⁹ El dominio CR1 comprende al amino N-terminal, el CR2 contiene un motif LXCXE el cual está implicado en la unión con miembros de la familia

supresora de tumor pRb y el dominio CR3 consiste de dos motifs dedo de zinc.¹⁵⁰ Adicionalmente, E7 contiene un sitio de fosforilación por caseína cinasa II que dirige el ciclo celular de la fase G1 a la fase S y tiene un impacto en el crecimiento celular.¹⁵¹ Una de las principales funciones de la proteína E7 en el ciclo viral es su capacidad para unirse y degradar a la proteína pRb. Esta familia de proteínas (pRb) son consideradas como uno de los mayores controladores del ciclo celular, la forma hipofosforilada de pRb se une al factor transcripcional E2F, el cual está involucrado en la regulación del ciclo. En células normales, la fosforilación de pRb por complejos de cinasas-dependiente de ciclinas dirige la liberación de E2F e inducen la transcripción de genes de la fase S. La proteína E7 bloquea el control del ciclo celular a través de la unión y degradación de pRb hipofosforilada dependiente de la vía del proteosoma, sustituyendo la liberación del complejo E2F.^{152,153} Interesantemente, la capacidad de las proteínas E7 para unirse y degradar a pRb está relacionada con dos regiones separadas de la proteína E7. El motif LXCXE presente en el dominio CR2 está involucrado con la unión a pRb, mientras los residuos involucrados en la degradación de pRb están localizados en el dominio N-terminal.¹⁵⁴⁻¹⁵⁵ La degradación de pRb es una característica de las proteínas E7 de HPV de HR, sugiriendo fuertemente que esto favorece a la carcinogénesis cervical (Figura 10).¹⁵⁶ Además E7 se une a otras proteínas de la familia de RB, como p107 y p130, ejerciendo similares efectos sobre la modulación de las funciones de E2F. Adicionalmente, E7 interacciona con la histona clase I desacetilasa (HDACs) el cual actúa como un co-represor transcripcional induciendo la remodelación de la cromatina a través de la desacetilación de las histonas.¹⁵⁷ Las proteínas E7 de HPV de HR inducen la transformación e inmortalización en diversas células líneas celulares, como NIH 3T3, BRK, fibroblastos de embrión de rata, C127 y 3Y1.¹⁵⁸ E6 coopera con E7 para el control del microambiente celular lo cual favorece la replicación del genoma viral, vía la activación transcripcional e inducción de síntesis de DNA, lo que favorece la diferenciación celular y promoviendo el crecimiento celular.⁷ Estos eventos y la asociación o activación transcripcional con diversas proteínas celulares (p300, p300-CAF, TBP, TAF-110, AP1, Akt, p600, etc) favorecen inestabilidad genómica, control de ciclo celular inmortalización celular, activación de crecimiento celular y en consecuencia favorecen la transformación y la carcinogénesis cervical (figura 11).

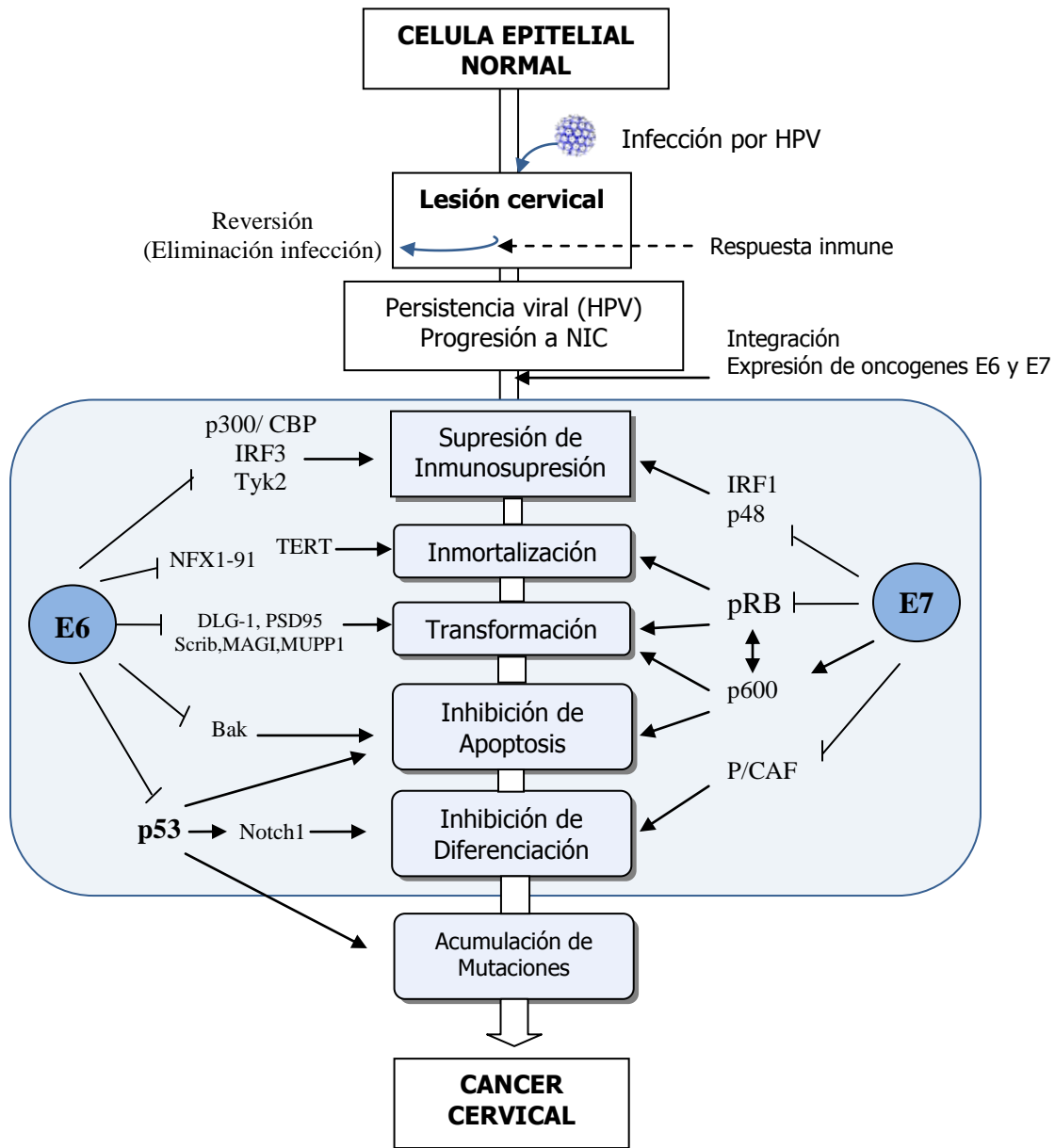


Figura 11: Múltiples pasos de la carcinógenesis cervical asociada a la infección por HPV y a la expresión de los oncogenes E6 y E7. El esquema representa los eventos sucesivos que están involucrados en la carcinógenesis cervical. El HPV infecta células basales del epitelio cervical generando una lesión cervical que puede ser eliminada por la respuesta inmune. Cuando la infección viral persiste la lesión cervical puede evolucionar a una neoplasia intraepitelial cervical (NIC) y a una displasia. Este paso es crucial para la integración viral y este evento favorece la expresión continua de los oncogenes E6 y E7. Estos dos oncogenes pueden interactuar con varias proteínas celulares que repercuten en la supresión de la respuesta inmune, inmortalizan y transforman a la célula huésped, inhiben el proceso de apoptosis y estos eventos repercuten en la evolución de la carcinógenesis cervical. Yugawa T, et al. Rev Med Virol. 2009;19:97-113, ⁷ Modificado (Bermúdez-Morales V., 2009)

Proteínas de Transcripción Tardía (L)

Proteínas de transcripción tardía (L): La capsida de los papilomavirus es de 600Å de diámetro y está compuesto de 72 capsómeros y está formada por dos proteínas de transcripción tardía (L1,L2). Cada capsómeros contiene cinco monómeros de la proteína de la capsida mayor L1 de 55-kDa. La capsida adicionalmente contiene 12 copias de la capsida menor L2 de 72-kDa, asociadas con 12 capsómeros pentavalentes.¹⁵⁹ Mientras la proteína L2 no es requerida estrictamente para el ensamblaje y es crítica para la infectividad de los viriones y pseudovirus.⁷⁹ La expresión de L1 o L1-L2 recombinantes en una variedad de sistemas de expresión, generan un auto ensamblaje de partículas similares a virus (VLPs) similares a un virión nativo.¹⁶⁰ La reconstrucción tridimensional de micrografías crioeléctricas de viriones de BPV, los capsómeros de 9-Å están formados de por 36 copias de L2 por virion.¹⁵⁹ Esta proteína tiene una analogía con las proteínas de la capsida menor del virus del poliomavirus, VP2 y VP3, y con las proteínas de la capsida mayor, VP1.¹⁶¹⁻¹⁶² La región amino terminal, de la proteína L2 contiene secuencias altamente conservadas entre los papilomavirus humano y animales, por lo que es considerada como una proteína candidata para vacunas profilácticas y terapéuticas contra HPV.¹⁶³

Expresión de proteínas virales y desarrollo de cáncer

A causa de que el ciclo viral de los papilomavirus está estrechamente ligada a la diferenciación de las células dentro del epitelio escamoso estratificado cervical, no ha sido posible la propagación *in vitro* de los viriones de papilomavirus. Sin embargo, ampliamente se conoce como se lleva a cabo la infección del HPV al epitelio cervical, y la expresión diferencial de las proteínas de HPV durante el desarrollo de la neoplasia. En lesiones de bajo grado, asociados a la infección por HPV de bajo o alto riesgo, la infección productiva es muy similar con patrones de expresión de los genes virales parecidos y las proteínas de la capsida viral pueden usualmente ser detectadas en las células de la superficie epitelial. En lesiones de alto grado (HSIL, NIC II y III) se ha demostrado que es más extensiva la fase proliferativa.¹⁶⁴ Aproximadamente el 20% de NIC I puede progresar a NIC II, y aproximadamente el 30% de estas lesiones pueden progresar a una NIC III, sin tratamiento alguno, y el 40% de NIC III puede progresar a cáncer.¹⁶⁴ Por otro lado, el perfil de expresión de las proteínas virales está relacionado con la diferenciación del epitelio cervical. En las capas sub-basales del epitelio cervical de NIC I, se expresan bajas cantidades de las proteínas E6 y E7, en las capas superficiales se expresan las proteínas E2, E1 y E4, relacionado con la replicación del genoma viral y con la producción de viriones (expresión de L1 y L2). En NIC II, se expresan bajos niveles de E1, E2 y L2, con menor

producción de viriones. En NICIII muy baja expresión E1, y E4 y nula expresión de L1 y solo en las capas superficiales. Sin embargo, en cáncer cervicouterino preferentemente hay solo expresión de las proteínas E6 y E7 en todo el tejido epitelial (figura 12).

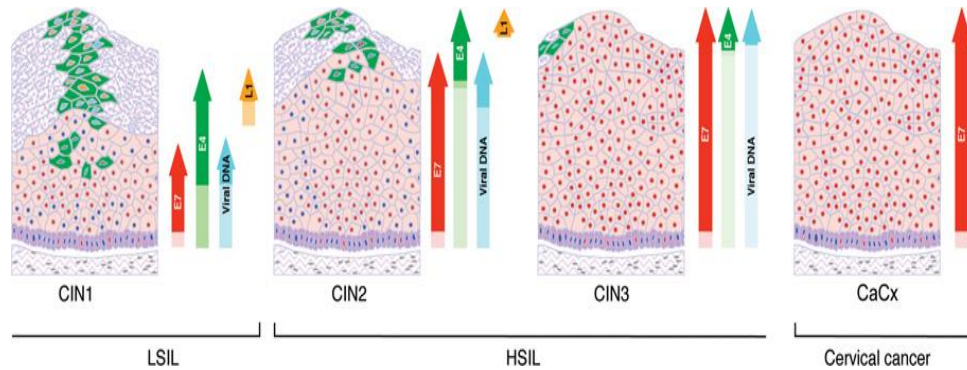


Figura 12: Perfil de expresión de proteínas de HPV y desarrollo de CaCu.
Doorbar J. J Clinical Science, 2006;110:525-541¹⁶⁴

Parte III: Respuesta Inmune contra Tumores

La inmunovigilancia tumoral se mide mediante dos tipos de mecanismos: la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa. La respuesta inmune innata se considera como la primera barrera contra las células tumorales, las cuales son reconocidas por un proceso independiente de antígeno. Este mecanismo es mediado por un patrón de receptores y de moléculas de superficie celular expresados en la célula tumoral. Entre las principales células que reconocen a la célula tumoral se encuentran las células asesinas naturales (células NK), las cuales reconocen la baja o nula expresión de moléculas MHC I sobre la célula tumoral, así como proteínas relacionadas con estrés, como la expresión de MICA y MICB, que son ligandos de los receptores NKG2D expresados por las células NK.¹⁶⁵ En relación con la respuesta inmune adaptativa, ésta requiere del reconocimiento de antígenos tumorales para reconocer y eliminar la célula tumoral por medio de las células efectoras de la respuesta inmune. Se ha demostrado que la respuesta inmune mediada por células es la más importante para eliminar las células neoplásicas. Esta respuesta es dependiente de la activación de los linfocitos T y de las células presentadoras de antígenos profesionales (APC).¹⁶⁵⁻¹⁶⁶ La activación de los linfocitos T, requiere que las células dendríticas (CD) capturen y procesen el detritus celular tumoral, migren a los nódulos linfáticos regionales para presentar los antígenos tumorales a los linfocitos T CD8+ mediante las moléculas del MHC clase I. En este proceso se activan tanto los linfocitos T CD4+ y CD8+ específicos contra péptidos

Citocinas y Microambiente Tumoral

Muchos de los eventos de la respuesta inmune están regulados por moléculas solubles llamadas citocinas, las cuales son secretadas por una gran variedad de tipos celulares, pero principalmente las producen los linfocitos T CD4+. Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular, que pueden secretarse o permanecer unidas a la membrana celular. Para realizar su función biológica se requieren en concentraciones de nano gramos a pico gramos. Las citocinas actúan de manera autócrina al modular la actividad celular, o de manera parácrina al inducir la producción de otras citocinas mediante otras estirpes celulares. Además, las citocinas son importantes en la regulación de la proliferación y diferenciación celular, en la quimio taxis celular y en la activación de células de la respuesta inmune.¹⁶⁹ Las citocinas se secretan en respuesta a una amplia variedad de estímulos como: estrés celular, lesiones inducidas por carcinógenos, infecciones o inflamación. En este contexto, las citocinas estimulan la respuesta del huésped al controlar el estrés y la homeostasis celular.

En general, hay dos grupos de citocinas que pueden ser distinguibles en base en su participación en los procesos de infección y/o inflamación. Las citocinas que están directa o indirectamente involucradas en los procesos inflamatorios reciben el nombre de citocinas proinflamatorias la interleucina (IL) IL-1, IL-2, IL-6, el interferón (IFN)- γ y el factor de necrosis tumoral (TNF)- α y promueven la respuesta inmune mediada por células. Las citocinas que suprimen la actividad de las citocinas proinflamatorias son las citocinas antiinflamatorias. Por ejemplo, IL-4, IL-10 e IL-13, que son potentes mediadores de los linfocitos B. De esta manera, el perfil de expresión de citocinas presentes en una enfermedad determinará el tipo de respuesta inmune que se genere.¹⁷⁰⁻¹⁷¹ Recientemente, se ha determinado que en diversos tipos de cáncer se genera un microambiente tumoral, a causa de la expresión o represión de diferentes genes (como Fas, ligando de Fas, citocinas y quimiocinas), importantes en la respuesta inmune y de la célula tumoral; también se producen citocinas inmunosupresoras en el sitio tumoral, las cuales favorecen la progresión del proceso neoplásico.¹⁷²

En virtud de que las citocinas tienen funciones pleiotrópicas, es difícil determinar la participación de una citocina en la progresión del cáncer. Esto se debe a la relación con otras citocinas, factores de crecimiento y hormonas, que actúan simultáneamente en el sitio del tumor, así como con el blanco celular sobre el que actúan.¹⁷³ Hay dos mecanismos que pueden explicar la participación de las citocinas en el desarrollo del cáncer. 1) Es posible que las citocinas favorezcan el desarrollo tumoral al interactuar con factores de proliferación, inducir la actividad de la angiogénesis del tumor, y promover la metástasis por el incremento de la adhesión

celular. 2) Las citocinas como mediadores de la respuesta inmune pueden inhibir la expresión de las moléculas y receptores, tanto de las células de la respuesta inmune como de la célula tumoral, las cuales están involucradas en la identificación y destrucción de la célula tumoral (como la desregulación de las moléculas MHC clase I y II, de moléculas coestimuladoras y la desregulación de la cadena zeta del complejo TcR/CD3).¹⁷³⁻¹⁷⁶

En diferentes neoplasias, se ha observado una tendencia en la expresión de citocinas anti-inflamatorias y una disminución de expresión de citocinas proinflamatorias.¹⁷⁶⁻¹⁷⁹ Este cambio en la expresión de citocinas proinflamatorias a anti-inflamatorias podría facilitar la progresión tumoral por la subversión de los mecanismos de inmunovigilancia celular. Particularmente, se ha observado un perfil de expresión de citocinas anti-inflamatorias en pacientes con carcinoma cervical.¹⁸⁰ En este sentido, la expresión de las citocinas IL-4, IL-10 y TGF- β 1 correlaciona con la severidad de la enfermedad asociada con la infección del virus del papiloma humano.¹⁸¹⁻¹⁸³ Por lo tanto, la expresión de un perfil de citocinas anti-inflamatorias en el microambiente tumoral cervical favorece un estado de inmunosupresión local, el cual se asocia con la desregulación de varias moléculas de la respuesta inmune.¹⁸⁴ A favor de esta hipótesis, se ha informado sobre varias alteraciones de la respuesta inmune en pacientes con lesiones cervicales premalignas y malignas. Por ejemplo, se ha determinado una baja expresión de moléculas del MHC clase I asociada a la baja expresión de TAP1,¹⁸⁵ de disminución de la expresión de moléculas coestimuladoras como B7 sobre la célula tumoral,¹⁸⁶ de baja expresión de CD25¹⁸⁷ y de la cadena ζ del complejo TcR/CD3 en linfocitos T infiltrantes de tumor y en células NKTs.¹⁸⁸⁻¹⁸⁹

Parte IV: Vacunas contra la Infección por HPV y Cáncer Cervicouterino.

El gran avance en el desarrollo de vacunas contra el HPV en los últimos 20 años, han sido las vacunas profilácticas, diseñadas para prevenir la infección primaria HPV mediante anticuerpos neutralizantes contra el virus y generando protección contra la infección del HPV. Por el contrario, las vacunas terapéuticas que están en desarrollo son diseñadas para prevenir la progresión de una lesión intraepitelial cervical o neoplasia establecida.

Vacunas Profilácticas

Los estudios iniciales de las vacunas profilácticas monovalentes mostraron la seroconversión de prácticamente todos los vacunados, con títulos de anticuerpos mucho más altos que los obtenidos mediante la infección natural, y capaces de neutralizar *in vitro* HPVs.¹⁹⁰⁻¹⁹³ Gardasil, vacuna cuadrivalente (Merck & Co, Inc.;

Whitehouse Station, NJ) y Cervarix, vacuna bivalente (GlaxoSmithKline Biologicals; Rixensart, Belgium), son vacunas preventivas aprobada por la Food and Drug Administration en junio del 2006 (tabla IV). Ambas vacunas están compuestas de partículas recombinantes similares a virus HPV (VLPs). Son estructuras icosaédricas compuestas de la proteína L1, de la capsida mayor. Cuando la proteína L1 es expresada en las células, es capaz de autoensamblarse similar a lo que ocurre naturalmente. Ambas VLPs se ensamblan sin DNA viral, e inducen fuertemente respuesta inmune sistémica, mediante anticuerpos neutralizantes e inmunidad mediada por células.¹⁹⁴⁻¹⁹⁷ Estudios en humanos, ambas vacunas han mostrado altos títulos de anticuerpos específicos en secreciones cervicales de mujeres que recibieron VLPs L1 de HPV 16.¹⁹⁸ Entre un 5 y un 52% de las mujeres vacunadas, presentaban anticuerpos en las secreciones cervicovaginales,¹⁹² y los niveles de células T activadas específicas frente a HPV eran muy superiores a los detectados en la infección natural,¹⁹³ lo que sugiere que la vacuna podría inducir respuestas inmunes adaptativas superiores incluso a las de la infección natural. Ambas vacunas son seguras, bien toleradas y protegen con una eficacia del 100% frente a la infección persistente por los HPV16 y 18.¹⁹⁹⁻²⁰¹ Su eficacia frente a la neoplasia cervical intraepitelial producida por los HPV16 y 18, precursores del cáncer cervical, es también del 100%. En el caso de la vacuna cuadrivalente, el grado de eficacia es igualmente elevado en la protección frente a las verrugas genitales por HPV6 y 11. Se conoce que la vacuna es eficaz al menos durante 4,5 años y 3 años, respectivamente para la vacuna bivalente¹⁹⁹ y la cuadrivalente.^{200,202}

En relación a la historia natural del CaCu asociado a la infección por el HPV, parece lógico pensar que la vacunación se debe aplicar antes del contacto con el virus, es decir al inicio de la actividad sexual, probablemente entre los 9 y los 12 años de edad.²⁰³⁻²⁰⁵ Los modelos matemáticos reafirman la importancia de que la vacunación se realice a esta edad ²⁰³⁻²⁰⁵ y el CDC recomienda que la primera vacunación con la vacuna cuadrivalente se realice idóneamente a los 11-12 años de edad,²⁰⁶ pero respetando, a discreción del médico, el rango aprobado por la FDA desde los 9 a los 26 años.²⁰⁸ Por otro lado, el 30% de los cánceres cervicales están asociados a otros tipos de HPV oncogénicos distintos del 16 y el 18, tales como los HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 66.²⁰⁴ A pesar de la similitud filogenética entre varios de estos tipos en la proteína L1, las infecciones genitales por HPV se caracterizan por respuestas tipo específicas, y sólo los HPV 6 y 11, 31 y 33, y 18 y 45 parecen compartir un epítipo neutralizante.²⁰⁸ En este sentido se ha referido en la literatura que en el caso de la vacuna bivalente podría existir protección cruzada con los tipos 31 y 45, con una eficacia del 55% (IC95% 12-78) y el 94% (IC95% 63-100) respectivamente.¹⁹⁹ Con la vacuna cuadrivalente, se han referido incrementos en los títulos de anticuerpos frente

a los tipos 31, 45, 52 y 58, pero no se han publicado todavía datos de eficacia.²⁰² En cualquier caso, los mecanismos de esta protección cruzada no están claros. Si consideramos que los HPV 16 y 18 suponen aproximadamente la causa del 70% de los cánceres en cérvix, y los HPV 6 y 11 son responsables de prácticamente todos los casos de papilomatosis respiratoria recurrente y de casi el 90% de las verrugas anogenitales, la implantación de estas vacunas tendrá un impacto muy significativo en estas patologías.²⁰³⁻²⁰⁵ Así, asumiendo una eficacia tipo-específica de al menos el 90%, y al margen de las dosis de refuerzo que pudiesen ser eventualmente necesarias, los casos de displasia cervical de grado moderado o alto y carcinomas "in situ" entre las mujeres vacunadas serían entre un tercio y la mitad de los encontrados en las mujeres no vacunadas.²⁰⁵ El impacto de la vacunación en displasias de menor grado o subclínicas es difícilmente evaluable y probablemente más modesto.²⁰³⁻²⁰⁴

Tabla IV: Eficacia sobre vacunas polivalentes profilácticas de HPV²⁰⁹

	Cervarix, (GlaxoSmithKline)	Gardasil (Merck & Co)
Composición	Bivalente Tipos 16 (20 µg) y 18 (20µ g)	Cuadrivalente Tipos 6 (20 µg), 11(40 µg), 16 (40 µg) y 18 (20 µg)
Adyuvante	AS04	Aluminio
Pauta vacunación	0, 1 y 6 meses, intramuscular	0, 2 y seis meses, intramuscular
Características del diseño de los estudios		
Número de pacientes incluidos en los estudios	1113 y 776	552
Distribución de pacientes	EU y Canada (n=607) y Brasil (n=506)	EU (n=251), Brasil (n=187) y Europa (n=114)
Criterios de inclusión	. 15-25 años . Máximo 6 parejas sexuales . Sin antecedentes de anomalías o enfermedades del cérvix . Negatividad a los 6 meses y después de 3 dosis	. 16-23 años . Máximo 4 parejas sexuales . Sin antecedentes de anomalías o enfermedades del cérvix . Negatividad a los 7 meses
	Sero-negatividad y prueba de DNA negativo al HPV 16 y 18.	Sero-negatividad y prueba de DNA negativo al HPV 6, 11,16 y 18.
Eficacia		
Infección Persistente (6 meses)		
Eficacia frente al objetivo del estudio	CIN por HPV 16 / 18	CIN y verrugas genitales por HPV 6,11, 16 y 18
Por protocolo		
Por el tratamiento	100% (42-100)	100% (16-100)
Media geométrica de títulos de anticuerpos/ infección natural	Mes 51-53 HPV 16 (17 veces) HPV 18 (14 veces)	Mes 36 HPV 16 (18 veces, HPV 18 2(v veces)
Seguimiento máximo lo publicado	53 meses	37 meses
Efectos adversos		
Efectos adversos graves	4% vs 3.5 % (0-27 meses) y 4% vs 5% (27-53 meses), ninguno relacionado con la vacuna	Ninguno relacionado con la vacuna
Efectos adversos locales	94% vs 88%	
Licencia de Uso	Aprobado por la FDA	Aprobado por la FDA

Las vacunas frente al HPV han demostrado su eficacia frente a la prevención de la infección persistente por los tipos de papilomavirus incluidos en dichas vacunas, y los informes preliminares de los estudios fase III de ambas vacunas también señalan una elevada eficacia también en la prevención de las lesiones precancerosas cervicales, así como en la prevención de las verrugas genitales en el caso de la vacuna cuadrivalente. Quedan, sin embargo, importantes interrogantes por dilucidar, para muchos de los cuales ya están en marcha estudios potencialmente aclaradores (tabla V).

Tabla V:
Consideraciones de las vacunas profilácticas de HPV ²⁰⁹

- 1.- La duración a largo plazo de la protección, y la necesidad de una o varias dosis de refuerzo tras la primovacuna, así como sus consecuencias en la relación coste-beneficio de la vacunación preventiva.
- 2.- El efecto que la vacunación frente a una enfermedad de transmisión sexual en edades tan tempranas de la vida pueda tener sobre los conceptos y los hábitos sexuales de los más jóvenes.
- 3.- La posibilidad de reemplazamiento de los tipos de HPV incluidos en las vacunas por otros tipos virales no incluidos.
- 4.- La eficacia y el papel de la vacuna administrada en el sexo masculino, y la importancia y la rentabilidad de su eventual vacunación.
- 5.- Cómo afectaría a corto y a medio plazo la introducción de la vacuna profiláctica frente a HPV a los programas de detección de cáncer ya implantado e institucionalizado.
- 6.- Determinar la estrategia de vacunación en aquellos adultos jóvenes que previamente hayan tenido un posible o probable contacto con el virus, o incluso un contacto confirmado.
- 7.- Establecer la titulación de anticuerpos protectores.
- 8.- Confirmar la existencia de protección cruzada frente a otros serotipos no incluidos en la vacuna, y evaluar la importancia de la misma en el impacto vacunal.
- 9.- Evaluar la eficacia de la vacuna en la prevención de otros cánceres y formas de enfermedad relacionadas con la infección por HPV distintos del cáncer de cervix.
- 10.- Conocer como afectará a los sujetos vacunados la exposición posterior al virus salvaje frente al que está vacunado, así como a otros tipos no incluidos.
- 11.- Corroborar el perfil de elevada seguridad que hasta la fecha han mostrado estas vacunas, una vez aplicadas a gran escala.
- 12.- Establecer la inmunogenicidad y seguridad de la vacuna en poblaciones inmno-deprimidas (SIDA, transplantados) o con otras afecciones endémicas (hepatitis B, malaria)
- 13.- Evaluar el papel de la vacunación en los países más desfavorecidos donde acontece el 80% de los cánceres cervicales, y adecuar los costos de la vacuna para lograr una implantación eficaz en este entorno.

Por otro lado, las vacunas profilácticas basadas en los tipos 16 y 18, de acuerdo con la frecuencia de estos tipos de virus en la población mexicana con cáncer cervicouterino, 70% de estas mujeres están infectadas con estos tipos de virus; si la cobertura de vacunación, en condiciones óptimas fuera del 80%, la protección sería de 25%; así, de 4,000 mujeres que mueren al año por cáncer cervical, aproximadamente con un promedio de 48 años de edad, sólo morirían 3,000, lo cual hace todavía del cáncer cervicouterino un grave problema de salud pública. Más aún, el Dr. García Carrancá hace un análisis más profundo respecto al impacto de estas vacunas profilácticas en programas de inmunizaciones masivas. Primero, estima el número de vacunas que se requieren para prevenir un solo caso de cáncer cervical, y luego, estima el tiempo que se requiere para que un programa de inmunizaciones pueda tener un gran impacto sobre el número de casos en una determinada población. Así, tales cálculos fueron hechos, tanto para países en desarrollo como desarrollados. La eficiencia de la vacuna fue valorada en función de

la eficiencia de ésta contra un tipo en particular del HPV, y a la proporción de casos de cáncer atribuidos a un tipo viral específico. Si los tipos virales más comunes (16, 18, 31 y 45) son responsables de 80% de los casos de cáncer, y si atribuimos una eficiencia de 90% para una vacuna combinada contra estos tipos virales, entonces la eficiencia de esta vacuna para la prevención del cáncer sería de 72%. Según García Carrancá, esto significa que se necesitarían 200 inmunizaciones para países desarrollados y 300 para países en desarrollo, para prevenir un solo caso de cáncer cervical. Por otro lado, si suponemos que una vacuna profiláctica esté lista en cinco años, se necesitarán hacer inmunizaciones masivas en el año 2010 contra el HPV en mujeres y que la vacuna se aplicara a las menores de 15 años de edad, que la aceptaran, no encontraríamos diferencias hasta que este grupo de mujeres alcance el rango de edad de la presencia de cáncer, es decir hasta los 40-45 años de edad. De tal manera, considerando que morirían 3,000 mujeres por año, durante estos 30 años lo harían 90,000 mujeres jóvenes. Estas estimaciones indican claramente que un programa de vacunación masiva en contra del HPV, aun siendo muy eficiente, nos tomaría años antes de tener un impacto real en la tasa de mortalidad por cáncer cervicouterino en las poblaciones vacunadas. Por estas razones, es claro que programas masivos de detección temprana de cáncer se deben mejorar en países en desarrollo para reducir su incidencia. Consecuentemente, tanto los sistemas de diagnóstico como los sistemas de salud que apliquen estos nuevos métodos de diagnóstico rápido de detección del HPV se tienen que mejorar. Pese a los logros importantes en vacunas profilácticas, todavía tenemos que trabajar en desarrollar nuevos sistemas de diagnóstico, nuevas vacunas profilácticas, nuevas alternativas terapéuticas, incluyendo vacunas. Estas estrategias combinadas, diagnóstico oportuno, la aplicación de vacunas profilácticas y el uso de vacunas terapéuticas en estadios tempranos de la enfermedad, lograrán en un futuro no lejano la disminución de la morbilidad y de la mortalidad por cáncer cervicouterino.²⁶

Vacunas Terapéuticas

Estas vacunas tiene por objetivo prevenir la progresión de la infección de HPV a lesiones intraepiteliales cervicales escamosas de bajo grado y de alto grado o erradicar el una neoplasia intraepitelial cervical o incluso eliminar un cáncer cervicouterino residual. Uno de sus principales objetivos es activar a la respuesta inmune celular específica contra algún antígeno específico de tumor o proteína activadora y para erradicar una lesión cervical establecida o una neoplasia insipiente. Adicionalmente, las vacunas pretenden contribuir al tratamiento del cáncer cervicouterino como una terapia adyuvante para prevenir la recurrencia o metástasis.²⁶

Por otro lado, uno de los mayores obstáculos de las vacunas o estrategias terapéuticas contra el cáncer cervicouterino y la infección por HPV; es el conocimiento de los determinantes inmunológicos para la persistencia viral o regresión y de la caracterización molecular de la evolución tumoral. No obstante, la expresión de las proteínas virales durante la evolución de la carcinogénesis cervical está bien caracterizada, las cuales son los principales antígenos específicos de tumor y blancos para vacunas o estrategias terapéuticas. Adicionalmente, debido a que el desarrollo del cáncer cervicouterino es una enfermedad multifactorial, diversos eventos moleculares ocurren de un estadio a otro, de tal manera que cada tumor es molecularmente diferente a otro y esto impide que una vacuna terapéutica pueda ser aplicable para todas las neoplasias. Por lo cual, actualmente el diseño de vacunas terapéuticas tiene como objetivo no basarse en blancos específicos, sino que actúe sobre procesos biológicos generales que tengan una repercusión directa e indirecta sobre las lesiones y neoplasias cervicales, así como tumores establecidos.^{26, 211-213}

En la actualidad varias son las vacunas terapéuticas que se están desarrollando en el mundo y se encuentran en diferentes fases clínicas en humanos (tabla VI). Estas vacunas o estrategias terapéuticas están basadas en proteínas, péptidos dirigidas contra antígenos tumorales, vacunas basados en células, en vectores virales y bacterianos. Sin embargo, en los últimos años un gran número de estrategias terapéuticas están basadas en el empleo de la terapia génica contra el CaCu.

**Tabla VI:
Estrategias Terapéuticas contra el cáncer cervicouterino**

Estrategias Terapéuticas o vacunas contra el cáncer cervicouterino
<p>Vacunas basadas en proteínas: Estas vacunas utilizan proteínas completas que incluyan epítopes de antígenos específicos de tumor e inmunogénicos para cada haplotipo de MHC. Las células presentadoras de antígeno (CPA) capturan el antígeno y lo procesan en péptidos que son cargados en las moléculas MHC-I y MHC-II. Adicionalmente, las CPA activan a los linfocitos T citotóxicos (CTLs) específicos para el antígeno, los cuales ejercen su efecto biológico en las células tumorales. Adicionalmente, este tipo de vacuna induciría tanto la producción de anticuerpos como una respuesta inmune de linfocitos T cooperadores y de linfocitos T citotóxicos. Ya que las proteínas utilizadas son degradadas rápidamente luego de su inyección, también requieren adyuvante además de múltiples aplicaciones.²¹⁴⁻²¹⁵</p>
<p>Vacunas basadas en péptidos En este tipo de vacunas se sintetizan péptidos a partir de determinadas secuencias de proteínas virales o antígenos. Estos péptidos actúan como antígeno específico de tumor que se unen a las moléculas del MHC y activan los receptores de los linfocitos T citotóxicos. Esta vacuna requiere una adecuada configuración del péptido que permita el adecuado transporte intracelular hacia la superficie. Aunque este tipo de diseño de vacuna es seguro, fácil de sintetizar a gran escala, e induce respuestas inmunológicas específicas, también presenta inconvenientes o dificultades para su producción. Éstas incluyen: la baja inmunogenicidad del péptido, la restricción de las moléculas de MHC y la necesidad de definir epítopes para los linfocitos T citotóxicos.²¹⁶⁻²¹⁷</p>
<p>Vacunas basadas en células: Estas vacunas están basadas en la manipulación de células presentadoras de antígeno de tal forma que son cargadas con proteínas, péptidos o ADN de antígenos tumorales; como las oncoproteínas E6 y E7 de HPV. Adicionalmente, también se pueden manipular genéticamente las células tumorales aisladas del paciente. Dichas células se transfectan con genes de citocinas inmunoestimuladoras o moléculas co-estimuladoras y posteriormente se reintroducen al paciente, con el fin de inducir una respuesta inmune antitumoral.²¹⁸⁻²¹⁹</p>

Vacunas de vectores virales: En general estas vacunas consisten en un vector viral al cual se les introducen genes virales específicos (E6/E7). Estos vectores son utilizados como "vehículos" de transporte del antígeno viral hacia el interior de la célula blanco para de esta forma estimular respuestas de CTL's contra antígenos virales específicos. Así, este antígeno es procesado y presentado por moléculas del MHC-I induciendo tanto la producción de anticuerpos como la proliferación de células T y la activación de CTL's. Para el desarrollo de estas vacunas se han utilizado los virus de vaccina, adenovirus, retrovirus, adenoasociados etc.²²⁰⁻²²³

Vacunas de ADN: Corresponden al uso de ADN desnudo en plásmidos, el cual es inyectado por vía intramuscular, intradérmica, intratumoral o intravenosa o mediante el uso de una pistola que introduce genes en la piel. El gen administrado es expresado en la célula blanco; si es una antígeno es captado por las APC's y activan a los CTLs para actuar sobre la célula blanco (neoplásica). En el caso de que el gen administrado es una proteína activadora de la respuesta inmune (citocina), esta ejerce su efecto sobre la respuesta inmune celular para eliminar la neoplasia. Este tipo de vacunas tienen la ventaja de que el ADN utilizado es susceptible de ser modificado y adicionalmente es posible diseñar plásmidos con múltiples genes que permiten ser combinados, lo cual facilitaría la inmunización de individuos con MHC diferentes. Las ventajas de esta modalidad incluirían su bajo costo, su estabilidad a cualquier temperatura, su inmunogenicidad duradera y su posibilidad de múltiple administración. Se ha diseñado un tipo de pistola génica ("*gene gun*") cargada con genes quiméricos en los que a la proteína E7 se le ha adicionado un péptido que actúa como señal de translocación en el retículo endoplásmico, lo cual permite su unión a la molécula del MHC-II, lo que mejora su potencia inmunológica. Actualmente se realizan estudios en animales con vacunas de este tipo utilizando la proteína E7 de VPH's específicos.²²⁴⁻²²⁷

Parte V: Terapia génica contra cáncer cervicouterino

El gran avance de las investigaciones en la terapia génica contra el cáncer cervicouterino está enfocado principalmente a los oncogenes E6 y E7 del virus del papiloma humano (HPV), como antígenos específicos del tumor para generar inmunogenicidad tumoral. Estos genes se han usado en vacunas profilácticas y terapéuticas en diversas estrategias de terapia génica. En este sentido, se han inyectado simplemente los genes en el sitio del tumor como DNA desnudo,²²⁸⁻²³⁰ mediante el uso de una pistola de DNA (*gene gun*)²³¹ o usando vehículos virales para liberar el material genético como: los vectores adenovirales,²²⁰ virus adenoasociados,²³² el virus de vaccinia,²²¹ alphavirus,²²² el virus de estomatitis vesicular ²²³ o pseudovirus de HPV.²³³⁻²³⁴ Además, se han utilizado otros vehículos bacterianos como: *Listeria monocytogenes*,²³⁵ *Salmonella typhimurium*,²³⁶ y *Mycobacterium bovis*.²³⁷ Adicionalmente, otras proteínas de HPV como E1, E2, E4, E5, L1 y L2 se han considerado como antígenos de tumor para el control del cáncer cervical.^{228,231,238}

Recientemente se demostró que las proteínas virales E5, E6 y E7 del HPV regulan la expresión de genes heterólogos celulares y pueden contribuir al desarrollo del cáncer cervical.²³⁹⁻²⁴¹ Entre estos genes se encuentran la regulación de las citocinas IL-10 y TGF- β 1, lo cual correlaciona con la detección de estas citocinas en pacientes con

cáncer cervicouterino y con el desarrollo de un estado de inmunosupresión en el microambiente tumoral. Este mecanismo de evasión de la respuesta inmune es consistente con la desregulación de la inmunovigilancia tumoral de la que se informa en otros tipos de cáncer. A favor de revertir el efecto de inmunosupresión en el microambiente tumoral, se han empleado diferentes estrategias como la inhibición de las proteínas oncogénicas de HPV, la activación de la respuesta inmune específica del huésped en contra del HPV por el uso de antígenos específicos de HPV, la inducción de la expresión de moléculas coestimuladoras (B7, cadena ζ de CD3, MHC clase I), y muy importante, la administración de citocinas para activar la respuesta inmune tipo celular.²⁴² Los interferones (IFN), así como las citocinas IL-2, IL-12, y GM-CSF, se consideran como los principales inmunomoduladores de la respuesta inmune celular, y se han empleado en diversos modelos preclínicos contra el cáncer cervical.²⁴³ De igual manera, diversas vías y vehículos de inmunización se han utilizado en diversos modelos tumorales murinos asociados al HPV.

Interleucina 12 como terapia génica contra el cáncer cervicouterino

La IL-12 es una citocina que gracias a sus propiedades como inmunomodulador de la respuesta celular y actividad antitumoral, se ha usado ampliamente en la terapia génica en diversos tumores murino generando la inhibición del crecimiento tumoral y reduciendo el número de metástasis experimentales.²⁴⁴⁻²⁴⁶ Tal vez la IL-12 es una de las citocina más utilizada como terapia génica contra el cáncer cervicouterino; su efecto adyuvante se ha demostrado en diversos modelos de tumor en animales asociados al HPV. El tratamiento con el gene de IL-12 se ha empleado mediante terapia génica no viral (DNA desnudo),²⁴⁷⁻²⁴⁸ terapia génica viral (adenovirus)²⁴⁹ terapia génica *ex vivo*,²⁵⁰ en combinación con antígenos E6/E7^{248,249} y con genes de moléculas inmunomoduladoras de la respuesta inmune celular (B7).²⁵⁰ El efecto de represión de crecimiento tumoral es observado en todos los casos, y es capaz de inhibir la formación de metástasis experimentales. Esta citocina es considerada como candidata para el tratamiento basado en la terapia génica contra el cáncer cervicouterino. El efecto antitumoral de la IL-12 es dependiente de la activación y expansión de los linfocitos T CD8+ citotóxicos,²⁴⁹ y del aumento en la producción de INF- γ en el sitio de inmunización; el cual es mediado por la activación de las células NK y NKT (figura 14).^{245,249}

Adicionalmente, el uso de IL-12 en la terapia génica contra el cáncer cervicouterino se ha empleado en conjunto con otras citocinas como el GM-CSF e IL-2, donde ocurre un aumento del efecto protector contra el avance del tumor.²⁵¹ Sin embargo, el mejor efecto adyuvante se ha observado por la administración peritumoral de IL-12 y el GM-CSF. De igual manera, se han probado diferentes combinaciones de

citocinas como terapia génica en modelos tumorales experimentales asociados al HPV. La administración de IL-2 y el GM-CSF en conjunto inhiben el desarrollo tumoral y la formación de tumores residuales después de la cirugía o quimioterapia en sistemas experimentales. No obstante, el tratamiento únicamente con GM-CSF no tiene capacidad de inhibir la metástasis a pulmón, y se requiere de IL-12 para inhibir este proceso.²⁵² Se ha demostrado que el tratamiento simultáneo con IL-2, IFN- γ y GM-CSF en un modelo tumoral experimental asociado al HPV-16, inhibe la formación de tumores recurrentes y no se detectan diferencias en la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8⁺ del bazo.²⁵³ Por otro lado, la terapia génica con citocinas como tratamiento para el cáncer cervicouterino ha sido probada en conjunto con terapias combinadas, usando RNA antisentido para E7, antígenos de HPV,^{249,254,255} terapia génica suicida,²⁵⁶⁻²⁵⁷ citocinas recombinantes⁷³ y moléculas co-estimuladoras de la respuesta inmune celular como B7-1 y B7-2.^{250,257}

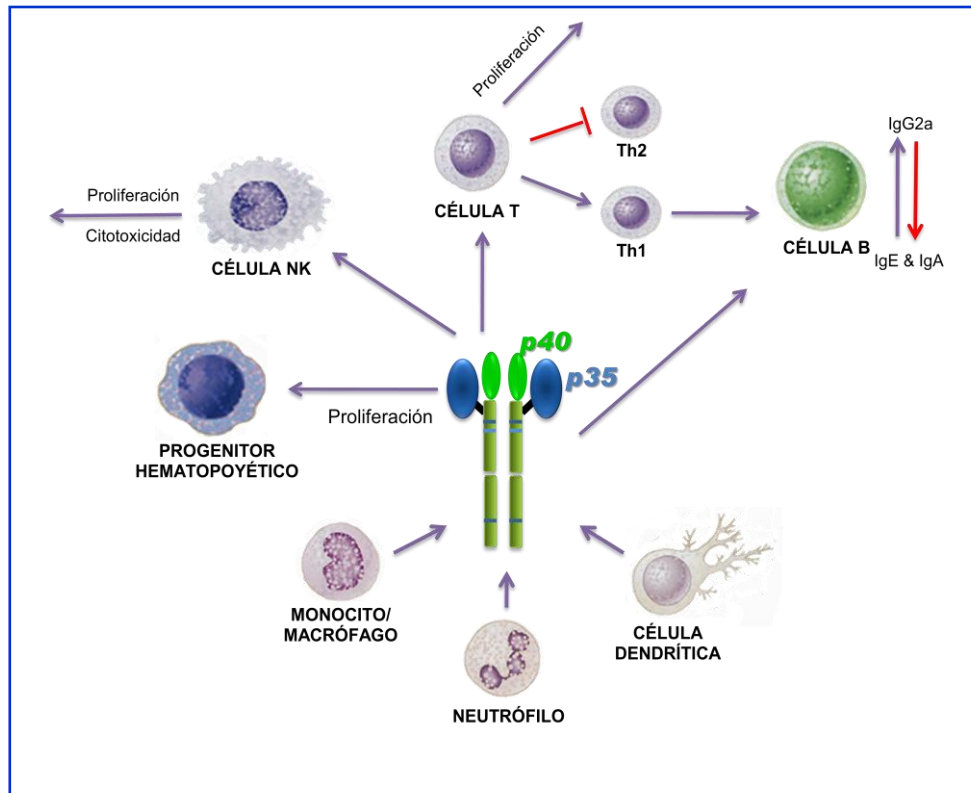


Figura 14: Efectos biológicos de la interleucina 12

La interleucina 12 (IL-12) es una citocina inmunoreguladora que tiene un peso molecular de 70 kDa compuesta por dos subunidades unidas covalentemente. IL-12p35 (35 kDa) y IL-12p40 (40 kDa). IL-12 es producida por las células dendríticas, macrófagos y neutrófilos en respuesta a estímulos antígenicos. IL-12 favorece la activación de células NK y linfocitos T. Es un inductor de la respuesta inmune mediada por linfocitos T CD8 citotóxicos, induce la expresión de INF- γ además es un inhibidor de la angiogénesis.

Planteamiento del proyecto

Los papilomavirus dentro de la región larga de control (LCR) contienen uno o varios sitios de reconocimiento para la proteína E2, la cual reconoce la secuencia palindrómica ACCN₆GGT, vía que es utilizada por los HPVs para reprimir la expresión de los oncogenes E6 y E7 en estado episomal, de esta manera esta vía común de los HPVs es posible ser utilizada para reprimir estos oncogenes en estadios avanzados del CaCu por la proteína E2. Además se ha determinado en líneas celulares derivadas de CaCu cuando son transfectadas con la proteína E2 de HPV, son dirigidas a apoptosis, por una vía independiente de la activación de p53 por dos mecanismos inducidos por E2.⁴⁰⁻⁴¹ Por otra parte, el sitio de reconocimiento por la proteína E2, es una secuencia potencial específica para las células infectadas por HPV que puede ser útil como secuencia promotora acarreadora de un gen terapéutico, para activar linfocitos CD8+ citotóxicos (como IL-2 o IL-12), así este sistema puede ser utilizado en estadios tempranos de la malignidad cuando esta expresa la proteína E2 y en estadios avanzados en conjunto con un vector que exprese la proteína E2 de HPV. Así el objetivo del presente trabajo, es desarrollar una vacuna terapéutica que puede ser utilizada en los diferentes estadios del cáncer cervicouterino, utilizando una vía común de los HPVs independiente del genotipo y sus variantes, además de manipular la respuesta inmune para activar linfocitos T CD8+ citotóxicos para eliminar al tumor.

El objetivo de la propuesta fue utilizar un vector adenoviral recombinante infeccioso y carente de replicación, como vehículo para transportar a un gen terapéutico. Los adenovirus tienen alta eficiencia de transgénesis (temporal y no se integran) en células en proliferación y quiescentes *in vitro* e *in vivo*. Se planeó generar un vector adenoviral recombinante que exprese la proteína E2 de HPV 16 bajo el promotor de citomagalavirus, junto a un vector adenoviral recombinante que exprese la IL-12 bajo un promotor constituido por cuatro elementos repetidos de reconocimiento de la proteína E2 de HPV 16. Estos vectores se inyectaron juntos e independientes en un modelo tumoral en ratones Balb/c inmunocompetentes. Para lo cual se utilizó la línea BMK-16/myc, que contiene integrado al genoma de HPV 16 y una mutación en el proto-oncogén myc, específica para ratones Balb/c, la cual expresa las oncoproteínas E6 y E7 de HPV 16. De esta manera se reprime la expresión de los oncogenes E6 y E7, se induce la muerte celular de las células tumorales y se expresa la IL-12 para activar linfocitos T CD8+ citotóxicos, la cual induce la expresión de INF- γ por la célula NK, inhibe la replicación viral, aumenta el potencial lítico de las células NK e induce la expresión de moléculas del MHC clase I importantes para reconocer y eliminar a las células tumorales.

Hipótesis

La inhibición de los oncogenes E6 y E7 de HPV e inducción de apoptosis por E2 de HPV, en conjunto con la activación de la respuesta inmune mediada por células por la interleucina 12 usando adenovirus recombinantes, tendrá un efecto antitumoral sobre un modelo experimental tumoral murino positivo al virus del papiloma humano tipo 16.

Objetivo general

Desarrollar una vacuna terapéutica basada en vectores adenovirales recombinantes para bloquear los oncogenes virales de HPV y activar la respuesta inmune específica para CaCu en un modelo tumoral murino.

Objetivos específicos

1. Determinar si la proteína E2 de HPV 16 induce la represión de los oncogenes E6 /E7, efecto antiproliferativo e inducción de muerte celular sobre la línea celular BMK-16/*myc in vitro*.
2. Generar un modelo tumoral murino que exprese los oncogenes E6 y E7 de HPV 16, como blanco para probar estrategias terapéuticas para el tratamiento para el CaCu.
3. Generar un vector adenoviral recombinante que exprese la proteína E2 de HPV 16 (AdCMVE2HPV16)
4. Desarrollar y caracterizar un vector adenoviral recombinante que exprese la citocina IL-12 bajo el control de cuatro elementos de respuesta a la proteína E2 repetidos como secuencia promotora (AdE2mIL-12).
5. Evaluar el efecto antitumoral por la administración del vector adenoviral recombinante que expresa la proteína E2 de HPV 16 en un modelo tumoral murino.
6. Establecer si la administración del vector adenoviral AdE2mIL-12 es capaz por sí solo de expresar la IL-12 y generar un efecto antitumoral.
7. Determinar el efecto de reducción de masa tumoral y sobrevida por la co-inyección de los vectores adenovirales AdCMVE2HPV16 y AdE2mIL-12 en un modelo tumoral murino HPV positivo.

Materiales y Métodos

Cultivos celulares

Las líneas celulares derivadas de carcinoma cervical fueron obtenidas del American Type Culture Collection (ATCC). La línea celular C-33A no está infectada por el virus del papiloma humano (HPV) pero presenta anomalías en las proteínas retinoblastoma (pRB) y p53; pRb está presente pero es anormal en su tamaño y la expresión de p53 es elevada y presenta una mutación en el codón 273 generando una sustitución de Arg->Cys. Las líneas celulares SiHa y CaSki están transformadas con el genoma del HPV 16, con algunas diferencias en el número de copias del genoma viral. Las células SiHa contienen de 1 a 2 copias y las células CaSki contienen 600 copias del genoma de HPV 16 integrado en el DNA de la célula. Por otro lado, se utilizó la línea celular Ad293 (Stratagene), esta línea es derivada de la línea HEK293, la cual es de origen epitelial de células de riñón embrionario humano transformadas con el gen E1 del adenovirus tipo 5 involucrado en la producción de partículas virales infecciosas. Adicionalmente, la línea celular murina BMK-16/myc fue amablemente donada por la Dr. Sophie Hallez (Université Libre de Bruxelles, Rhode-saint-genése, Bélgica), esta línea celular fue estabilizada por la co-transformación del proto-oncogen c-myc y el genoma entero de HPV 16 previamente descrita.²⁵⁰ Las líneas celulares fueron cultivadas en Medio Eagle's Dulbeccó's (DMEM) suplementado con 10% de suero bovino fetal (Life Technologies), 10 µg de ampicilina, estreptomycin y 2.5% de anfotericina B, a 37°C con 95% de humedad y 5% de CO₂.

Plásmidos

El plásmido pCMVp16-E2 (el cual contiene el ORF del gen que codifica para la proteína E2 de HPV 16) y el plásmido pC18SP1Luc (contiene cuatro elementos de respuesta a la proteína E2 de HPV 16 y un sitio SP1 frente al gen de luciferasa como gen reportero) fueron donados por el Dr. G Veress (Escuela de Medicina de la Universidad de Debrecen, Hungría).²⁵⁸ Por otro lado, plásmidos pNGVL3-mIL-12, el cual contiene clonado las dos subunidades (p35 y p40) del gen de la IL-12 de ratón, fue obtenido del National Gene Vector Laboratory, de la Universidad de Michigan (Medical Center) Anexo 1. Adicionalmente para generar los adenovirus recombinantes, se utilizó el sistema AdEasy system reportado por Vogelstein.⁴⁵ Se utilizaron los plásmidos pAdtrack, pAdtrack-CMV y el plásmido pAdenoEasy 1 (Anexo 2). Los plásmidos fueron propagados en bacterias DH5-α y purificados por lisis alcalina; la integridad fue verificada en geles de agarosa al 0.8% y al 1%.

Ensayos de transfección transitoria

Aproximadamente, 5×10^5 células BMK-16/myc y SiHa fueron cultivadas en placas de cultivo de 6 pozos y se transfectaron con 5 μg del plásmido pCMVp16E2 mediante 3 μl de lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del manual. Las células fueron cosechadas a las 0, 8, 24, 36 y 48 h después de la transfección. Las células fueron lavadas con buffer salino de fosfatos (PBS 1X) antes de la extracción de RNA total y proteínas. Los ensayos fueron realizados por triplicado y el porcentaje de transfección fue calculado por la cuantificación del número de células que expresaron la proteína verde floreciente después de la transfección con el plásmido pEGFP-N1 (Clontech, Palo Alto, Calif, USA). Aproximadamente, 40-50% de transfección fue obtenido en células BMK-16/myc y del 30-45% en la línea células SiHa.

Extracción de RNA total y RT-PCR en tiempo final

El RNA total de las células BMK-16/myc y SiHa fue aislado de acuerdo a la técnica descrita por Chomczynski et al. 1993.²⁵⁹ Cien microlitros del buffer D (10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 0.5% SDS y 5 mM EDTA) fueron usados para digerir las células SiHa y BMK-16/myc. La mezcla fue diluida y homogenizada con 1 mL del reactivo de Trizol (Invitrogen), posteriormente fue centrifugada a 12,000 rpm en presencia de 200 μL de cloroformo a 4°C por 15 min. La fase incolora superior (RNA) fue precipitada con 500 μL de isopropanol y lavado con etanol al 70% tratado con dietilpircarbonato (DEPC). El RNA total fue re suspendido en agua tratada con DEPC, y fue cuantificado en un espectrofotómetro DU-40 (GeneQuant, GE Healthcare, Amersham, UK). La integridad del RNA fue verificado en un gel de acrilamida urea al 6%.

Cinco microgramos del RNA total fue utilizado para realizar la síntesis de la primera cadena de DNA (cDNA), en presencia de de 200 U de la enzima transcriptasa inversa (MMLV-RT), 0.5 U inhibidores de RNasas, 0.5 mM dNTP's y 2.5 μM de Oligo dT₁₂₋₁₈ (Invitrogen) a 37 °C por 1 h. el cDNA fue almacenado a -20°C. La amplificación por PCR se realizó en un volumen final de 25 μL conteniendo: 1 μL de cDNA, 200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTPs, 20 pmol de cada oligonucleótido y 2 U de Taq DNA polimera (Invitrogen). Las reacciones de amplificación se realizaron un equipo Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany) por 40 ciclos. Cada ciclo consistió de un paso de desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento de 55°C por 1 min y un paso de elongación a 72°C por 1 min. Posteriormente, 10 μL del amplificado fue separado en geles de poliacrilamida al 6% y visualizado mediante bromuro de etidio. La secuencia de los oligonucleótidos para el gen E6 de HPV 16 fue: Sentido 5'-GTTGCAGCTCTGTGCATA-3', y antisentido 5'-AAGGGCGTAACCGAAATCGGT-3' amplificado de 140 pb. Para el gen E7 de HPV 16, el oligonucleótido sentido 5'-ATGACAGCTCAGAGGAGGAG-3' y antisentido 5'-TCATAGTGTGCCATTAAACAG-3', amplificado de 150 pb. Adicionalmente, se utilizo el

gen GAPDH como gen endógeno. Oligonucleótido sentido 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' y anti sentido 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3', 450 pb de amplicon.

Análisis de expresión de E6 y E7 por RT-PCR tiempo real (SYBR Green)

La determinación cuantitativa de la expresión de E6 y E7 de HPV 16 por RT-PCR en tiempo real se realizó usando el equipo LightCycler 2.0 Real-Time PCR instrument (Roche Applied Science, Basel, Switzerland) y el FastStart DNA Master SYBR Green I Kit (Roche Applied Science). Las condiciones de reacción se llevaron a cabo de acuerdo a las instrucciones del manual con los oligonucleótidos usados para la reacción de RT-PCR tiempo final. La concentración de cada gen fue determinada sobre la cinética de amplificación usando el software Lightcycler. La expresión del gen fue calculado sobre el Ct (ciclo de amplificación) del gen a evaluar normalizado con el GAPDH como gen endógeno como control interno, considerando al calibrador las condiciones sin tratamiento.

Ensayo de Viabilidad Celular

La viabilidad celular fue determinada mediante el ensayo de MTT [3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl) 2,5 diphenyl tetrazolium bromide]. 3×10^3 células BMK-16/myc y SiHa fueron cultivadas en placas de 96 pozos y fueron transfectadas con 2 μ g del plásmido pCMVp16-E2 en presencia de 1 μ L de Lipofectamina 2000 Reagent (Invitrogen). La proliferación celular fue analizada a las 0, 8, 12, 24, 48 y 60 h usando MTT (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo., USA). Doscientos micro litros de MTT (0.456 mg/mL) fueron adicionados a los cultivos celulares y fueron incubados 4 h a 37°C. El formazan generado fue disuelto con 200 μ L de dimetilsulfosido (DMSO) generando una solución coloreada. La absorbancia fue calculada con un espectrofotómetro a 490 nm.

Detección de Muerte Celular

Aproximadamente 2×10^3 células BMK-16/myc y SiHa fueron cultivadas en cámaras de cultivo en porta objetos (lab-tek chamber slide) (Nalge Nunc International, Rochester, N.Y., USA) y transfectadas con el plásmido pCMVp16-E2 en presencia de lipofectamina 2000 (Invitrogen) como se describió anteriormente. Posterior a la transfección, las células fueron fijadas con 4% de paraformaldehido-PBS 1% a diferentes tiempos después de la transfección. (0, 8, 12, 24 36 y 48 h). Los cambios morfológicos celulares fueron analizados por microscopia de campo claro. Adicionalmente, la fragmentación de DNA fue detectado usando el kit, *in situ* cell death (Roche) de acuerdo a las condiciones del protocolo.

Ensayo de Western Blot

Células BMK-16/myc fueron cosechadas a las 0, 8, 12, 24, 36 y 48 h después de ser transfectadas con el plásmido pCMVp16-E2 y además las células fueron lisadas con el buffer de lisis RIPA (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM NaCl, 10 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0.5% triton X-100, 0.5% NP-40) en presencia de inhibidores de proteasas. Las proteínas fueron colectadas por centrifugación y fueron cuantificadas usando el kit BCA protein assay (Pierce, Rockford, Ill., USA) de acuerdo al protocolo. Veinte microgramos de proteínas totales fueron separados en geles de poliacrilamida al 10% SDS-PAGE, las proteínas resueltas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Amersham Biosciences, Piscataway, N.J., USA). Las membranas (blots) fueron bloqueadas con TBS (20 mM Tris-base, pH 7.6, 137 mM NaCl and 1 M HCl) Tween-20, 5% de leche libre de grasa por 2 h. Posteriormente, las membranas fueron lavadas con PBS 1X e incubada con el anticuerpo primario por 16 h a 4°C. Posteriormente, la membrana fue nuevamente lavada con PBS 1X e incubada con el segundo anticuerpo por 30 a 45 min a temperatura ambiente. La detección se realizó mediante el kit ECL Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer Life Sciences, Boston, Mass., USA). Los anticuerpos fueron diluidos en TBS-Tween-20 2.55 de leche libre de grasas. La dilución de los anticuerpos usados fueron: anti-IL-12 (dilución 1:1,000), anti-caspase 8 (dilución 1:500), anti-caspase 3 (dilución 1:1,000), anti-actina (dilución 1:1,000), anti-cabra HRP (dilución 1:10,000) y anti-ratón (dilución 1:8,000), de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Calif. USA). El suero inmune (dilución 1:50) fue usado para detectar la proteína E2 de HPV 16.

Producción de anticuerpo anti-proteína E2 de HPV 16 por inmunización con DNA

El plásmido pCMVp16-E2 fue aislado de bacterias *Escherichia coli* DH5 α transformas por medio del Mega Kit Endo-Free (Quiagen, Germany) y re-suspendido en PBS 1X. Ratones hembras Balb/c de 6 semanas de edad fueron inyectadas con 3 dosis a intervalos de 7 días por vía intramuscular en la pata derecha (20 μ L con 50 μ g del plásmido, pCMVp16-E2). Cuarenta y cinco días después de la inmunización, muestras de sangre total fueron obtenidas de la cola de los ratones. Posteriormente, suero fue obtenido y almacenado a -80°C. El anticuerpo anti la proteína E2 de HPV 16 fue analizado mediante Western Blot y lisado de bacterias que expresan la proteína E2 de HPV 16. La reactividad fue comparada con el suero pre-inmune.

Construcción de Adenovirus Recombinantes

Mediante el sistema AdEasy system, reportado por Vogelstein²⁶⁰ se generaron los adenovirus recombinantes en bacterias con replicación defectiva. Se utilizó el pAdtrack-CMV para clonar el gen E2 de HPV 16 y la IL-12 ambos genes contienen el

promotor de citomagalovirus (CMV) como secuencia promotora. Adicionalmente, el plásmido pAdTrack se uso para clonar el gen de la IL-12 frente a 4 sitios de respuesta a la proteína E2 como secuencia promotora. Los vectores generados fueron recombinados con el plásmido pAdenoEasy 1 en bacterias *E. coli* BJ5183 para generar un plásmido recombinante con los genes terapéuticos. Finalmente, la producción de viriones se realizó al transfectar los plásmidos recombinantes en células AD293. Los vectores recombinantes generado se monitorearon por la producción de la proteína verde fluorescente (GFP) generada por lo virus, debido a que los plásmidos AdTrack y AdTrack-CMV contiene el gen que codifica para la proteína GFP.

Construcción del Vector adenoviral AdCMVE2HPV16: El vector adenoviral recombinante que contiene el gen de E2 de HPV 16 sobre el control del promotor de CMV se realizó amplificando el gen de E2 por PCR a partir del plásmido pCMVp16-E2 descrito anteriormente. La amplificación se realizó mediante oligonucleótidos con sitios de restricción para las enzimas *Kpn I* y *Hind III* para facilitar su clonación. Oligo sentido 5'-GCG CGGTACCAGGACGAGGACAAGGAAAA-3' y oligo antisentido 5'-GCGC AAGCTTGGATGCAGTATCAAGATTG-3'. El fragmento amplificado de E2 fue clonado en el vector AdTrackCMV en los sitios *Kpn I* y *Hind III*. Los plásmidos generados fueron verificados por electroforesis en agarosa al 0.9%.

Construcción de los Vectores adenovirales AdCMVmIL-12 y AdE2mIL-12: El adenovirus recombinante AdCMVmIL-12 fue generado liberando las dos sub-unidades (p35 y p40) del gen de la IL-12 del plásmido pNGVL-3-mIL-12 (descrito anteriormente) mediante restricción enzimática en los sitios *EcoR V* y *Bgl II*. En estos mismos sitios fue clonado el gen de IL-12 en el vector pAdTrack-CMV. Las clonas fueron seleccionadas con Kanamicina. Por otro lado, el vector adenoviral AdE2mIL-12, que exprese la mIL-12 bajo cuatro elementos de respuesta a la proteína E2 de HPV 16 como secuencia promotora fue generado de la manera siguiente. El promotor E2Sp1 fue liberado con los sitios *BamH I* / *Hind III* a partir del plásmido pC18SP1Luc y fue clonado en el vector pCDNA3 para ser secuenciado y fue sub-clonado a el vector pAdTrack en los sitios *Hind III* / *EcoR V*, el vector generado (pAdTrack SPIE2) se le clonó en los sitios *Eco R V* y *Bgl II* las dos sub-unidades de la mIL-12 liberados con los mismos sitios de la construcción pNGVL3-mIL-12 mencionada anteriormente. Así se generó la construcción pAdTrack-SPIE2mIL-12, sin embargo, tal construcción no contenía la secuencia de poliadenilación, para lo cual ésta fue amplificada por PCR del vector original de la mIL-12, y fue clonada en el sitio único *Bgl II*, y orientación fue verificada por PCR.

Producción y purificación de viriones: Los plásmidos con los genes terapéuticos generados, AdCMVE2HPV16, AdCMVmIL-12 y AdE2mIL-12, fueron linearizados con la enzima de restricción *Pme I* y co-transformados en bacterias *E. coli* BJ5183 junto con el

vector pAdEasy-1 (plásmido con el DNA viral). Las recombinantes (plásmidos recombinantes con genes virales) fueron seleccionadas con kanamicina y las clonas fueron determinadas por análisis de restricción enzimática con la enzima *Pac I*. Los virus recombinantes fueron generados al transfectar células en cultivo AD293 (Stratagene, La Jolla, Calif., USA) con los plásmidos recombinantes cortados con la enzima de restricción *Pac I*. Diez días posterior a la transfección las células AD293 expresaron la proteína GFP, visualizada mediante un microscopio de fluorescencia vertical, indicando la producción de viriones. Las células fueron cosechadas en presencia de 5 mL del buffer A (10 mM Tris HCL, 0.5 M NaCl₂, pH. 8.0), posteriormente fueron centrifugadas a 3,000 rpm y lisadas (por calor y frío). El lisado fue centrifugado a 3,000 rpm por 5 min a 4°C, el sobrenadante fue utilizado para la producción a gran escala de los adenovirus recombinantes. Veinticinco cajas de cultivo T75 con 100% de confluencia de células AD293, fueron infectadas con 1 mL del sobrenadante. Cinco días posteriores a infección las células fueron cosechadas con un rapador (scraper) en presencia de 10 ml del buffer A. Las células fueron lisadas por calor de frío y centrifugadas a 3,000 rpm. Los viriones fueron purificados del sobrenadante por ultra centrifugación por gradiente por CsCl (32,000 rpm, 18 h a 4°C), diálisados y se almacenados a -70°C. Los títulos virales (PFU) fueron determinados por ensayos en placa en células AD293 de acuerdo al protocolo de Vogelstein.²⁶⁰ Mediante análisis de western Blot fue verificado la producción de la proteína E2 y IL-12 en células AD293 y BMK-16/myc. Adicionalmente, se generó un adenovirus que expresa la proteína GFP (AdGFP) como control para los ensayos de infección y de protección tumoral.

Ensayo de Protección Tumoral

Modelo tumoral: La evaluación preclínica fue llevada cabo en un modelo tumoral murino HPV 16 positivo. Para ello se utilizaron ratones Balb/c, hembras de 6 semanas de edad.²⁵⁰ Aproximadamente. 2×10^5 y 3×10^5 células BMK16/myc fueron inyectadas vía subcutánea en el dorso de ratones Balb/c previamente rasurado el sitio donde se les inyectó las células. Cada grupo de 5 ratones (provisto del bioterio del Instituto Nacional de Salud Pública, cepa provienen del Charles River Laboratories, Wilmington, Mass., USA), se les midió el volumen tumoral por día en mm³ ($V = \text{diámetro mayor} \times \text{diámetro menor}^2$) y la sobrevivencia de los mismos. El volumen tumoral para determinar el efecto terapéutico de los adenovirus en estudio fue de [20 a 30] mm³, este volumen tumoral se consideró como tiempo cero y posterior a este se determinó el efecto de inhibición tumoral sobrevida y los adenovirus.

Administración de adenovirus recombinantes: Grupo de 5 ratones con volumen tumoral de 20 a 30 mm³ se les administró vía intratumoral 5×10^5 PFU de los viriones recombinantes, AdCMVE2HPV16, AdCMVmlL-12 y AdGFP en un volumen final de 30 µL en PBS 1X por separado. Adicionalmente, a un grupo de 5 ratones con

tumor, se les co-administró 5×10^3 PFU de cada adenovirus (AdE2mIL-12 y AdCMVE2HPV16) en un volumen final de 30 μ L vía intratumoral. Todos los ratones fueron monitoreados por un periodo de 28 días, se determinó la inhibición tumoral mediante la cuantificación del volumen tumoral (mm^3) cada tres días con un calímetro digital y la curva de supervivencia.

Análisis Estadístico: Los datos se analizaron y se expresan como media (\bar{X}) y por error estándar (ES). Adicionalmente, un análisis de varianza (ANOVA) para determinar las diferencias entre los grupos experimentales en el programa STATA. Con un valor de $P < 0.05$ para considerar diferencias significativas.

Resultados

La proteína E2 de HPV 16 reprime la expresión de los oncogenes E6 y E7 en células transformadas con HPV 16. La línea celular BMK-16/myc fue previamente transformada con el genoma completo de HPV 16,²⁵⁰ y el estatus del genoma de HPV 16 en las células fue determinado por PCR-RFLPs (figura 15A) amplificando un fragmento de DNA del LCR del genoma de virus y por restricción enzimática fue determinado el genotipo de HPV. Por otro lado, para confirmar que los oncogenes E6 y E7 son expresados por la línea celular murina, los niveles de expresión de los RNAm de E6 y E7 fueron analizados y fueron comparados con líneas celulares transformadas con HPV 16 (SiHa y CaSki) y no transformadas con HPV (C-33 A). La figura 15B muestra la expresión de los oncogenes E6 y E7 mediante RT-PCR en las líneas celulares transformadas con el HPV 16. Este resultado demuestra que la línea celular BMK-16-myс expresa constitutivamente los oncogenes E6 y E7 similar a líneas celulares humanas transformadas con HPV 16.

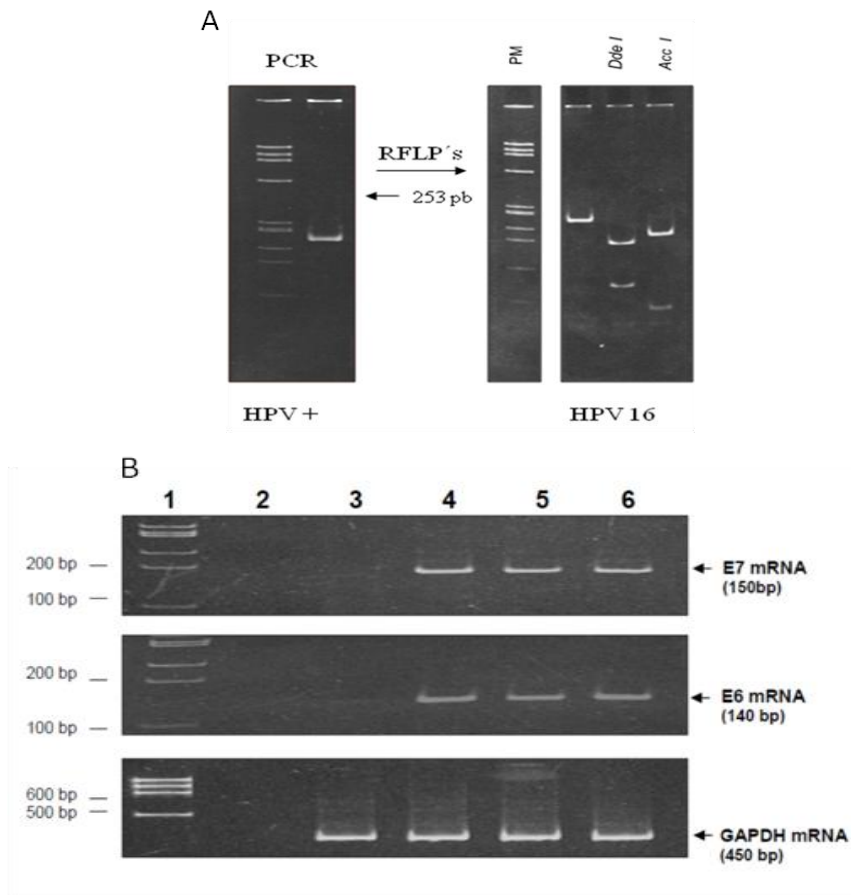


Figura 15: Detección del DNA viral la línea celular BMK-16/myc por PCR-RFLPs (A) y detección de los RNAm de los oncogenes E6 y E7 de HPV 16 por RT-PCR (B). 1). Leader 100, 2) control negativo, 3). Células C-33 A, 4) células CaSki, 5) células SiHa y 6) Células BMK-16/myc

Por otro lado, varios reportes han demostrado que la proteína E2 de HPV 16 tiene una influencia de regulación negativa sobre la expresión de los oncogenes E6 y E7.¹⁰⁸⁻¹¹² De esta manera, los efectos de regulación de la proteína E2 de HPV 16 fueron examinados en la línea celular BMK-16/myc y además fueron comparados con los efectos generados sobre la línea celular SiHa. La figura 16A muestra la represión del oncogen E6 de HPV 16 en células BMK-16/myc y SiHa después de ser transfectadas con el gen de E2 de HPV16. Veinticuatro horas después de la transfección se detectó una reducción de aproximadamente el 80% de la expresión del gen de E6 y la inhibición decae hasta las 60 horas. Similares efectos fueron observados para el oncogén E7, solo que la represión de la expresión del gen E7 se presenta de manera continua (Figura 16B). Estos resultados confirman que la proteína E2 de HPV 16 afecta la regulación de la expresión de los oncogenes E6 y E7 y estos efectos también se presentan en células transformadas con HPV integrado.

La proteína E2 altera el crecimiento celular e induce apoptosis a través de la activación de pro-caspasa 8 en la línea celular BMK-16/myc. Se ha documentado que la proteína E2 de HPV 16 tiene efectos sobre la proliferación celular en células humanas transformadas por HPV. A favor de demostrar su efecto sobre una línea celular murina HPV 16 positiva. Células BMK-16/myc fueron transfectadas con el gen de E2 y se determinó el porcentaje de proliferación celular por un ensayo de MTT. Adicionalmente, se transfectaron células SiHa para comparar los efectos de E2 en una línea celular humana. La figura 17 se muestra las curvas de proliferación de las líneas celulares BMK-16/myc y SiHa sin transfectar, transfectadas con un plásmido irrelevante (pCDNA3) y transfectadas con el plásmido pCMVP16-E2. Se observa que la proteína E2 inhibe el crecimiento celular de ambas líneas celulares, BMK-16/myc y SiHa.

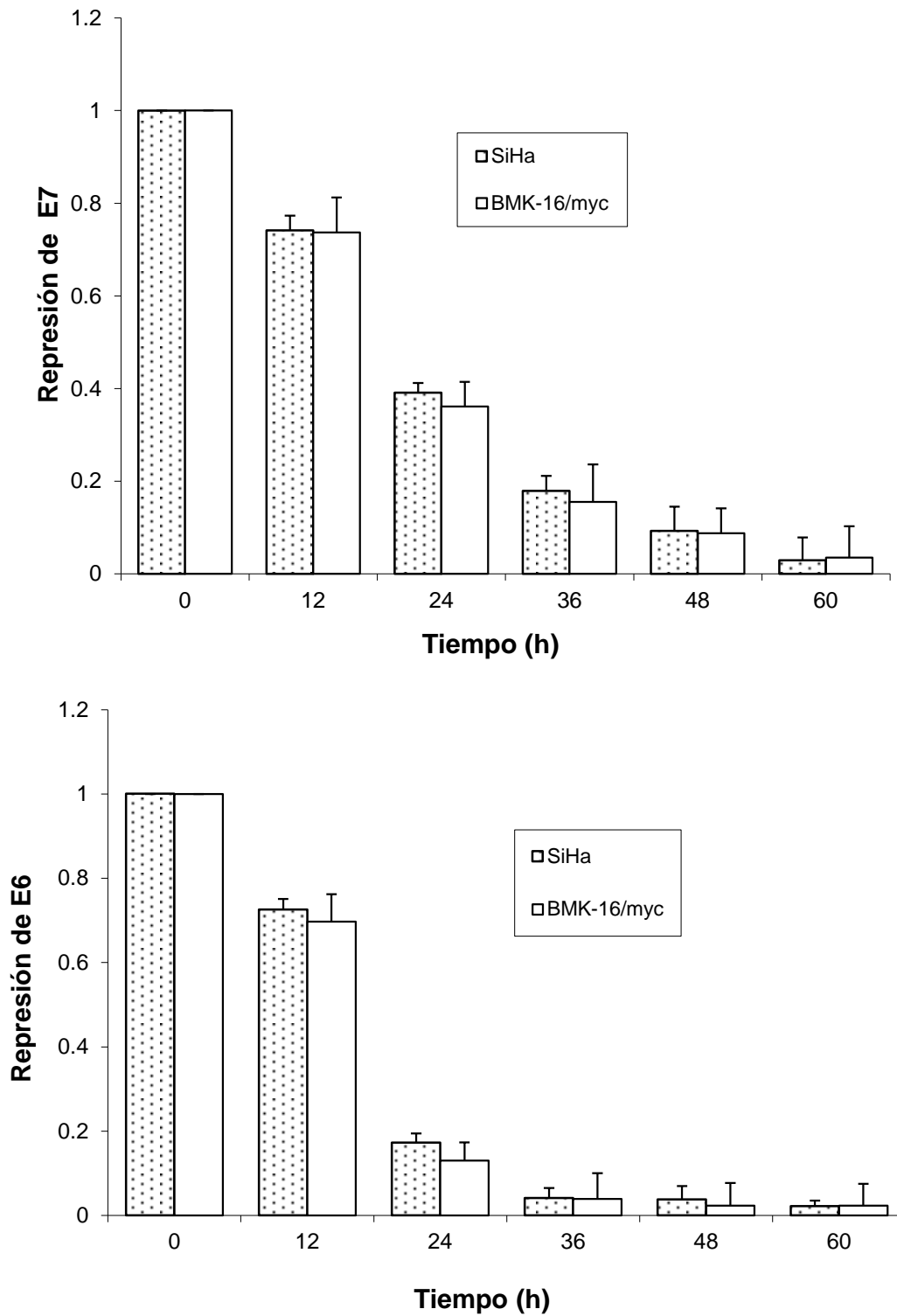


Figura 16: Represión de los oncogenes E6 y E7 de HPV 16 por la proteína E2 en las líneas celulares SiHa y BMK-16/myc por RT-PCR tiempo real.

Aproximadamente, el 30% de inhibición de crecimiento celular se observó 24 horas después de la transfección transitoria en ambas líneas celulares. Sin embargo, los efectos de E2 fueron más evidentes a las 36 y 48 horas después de la transfección. Por otro lado, las células transfectadas con un plásmido irrelevante (pcDNA3), no mostraron cambios significativos en el crecimiento celular comparado con las células sin transfectar. Estos resultados indican que la proteína E2 de HPV tiene un efecto negativo sobre el crecimiento celular en la línea celular BMK-16/myc y estos efectos son comparables a los observados en células humanas transformadas con HPV.

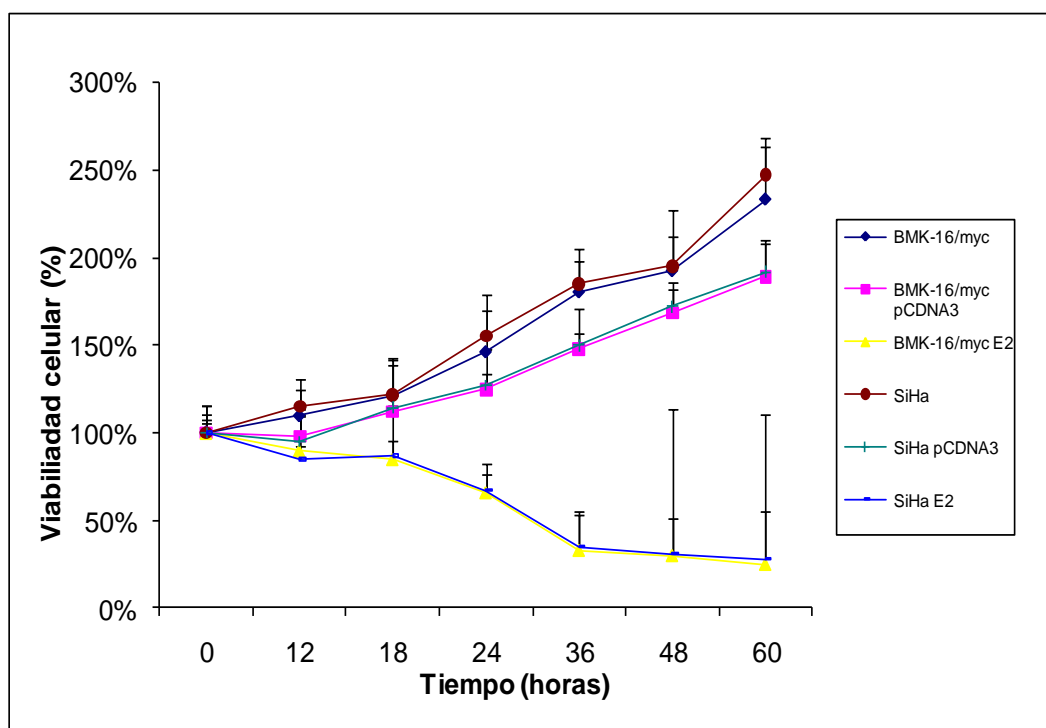


Figura 17: Efecto de inhibición del crecimiento celular y viabilidad celular por E2 de HPV 16 en las líneas celulares SiHa y BMK-16/myc.

Adicionalmente, se evaluó si la proteína E2 de HPV es capaz de inducir la muerte celular de la línea celular murina BMK-16/myc. Basados en el mismo sistema de transfección transitoria *in vitro* descrito en materiales y métodos, se observó que después de la transfección las células BMK-16/myc presentan varios cambios morfológicos celulares, incluyendo cambios de la membrana plasmática, pérdida de contacto célula-célula, encogimiento del citoplasma, cuerpos apoptóticos (figura 18).

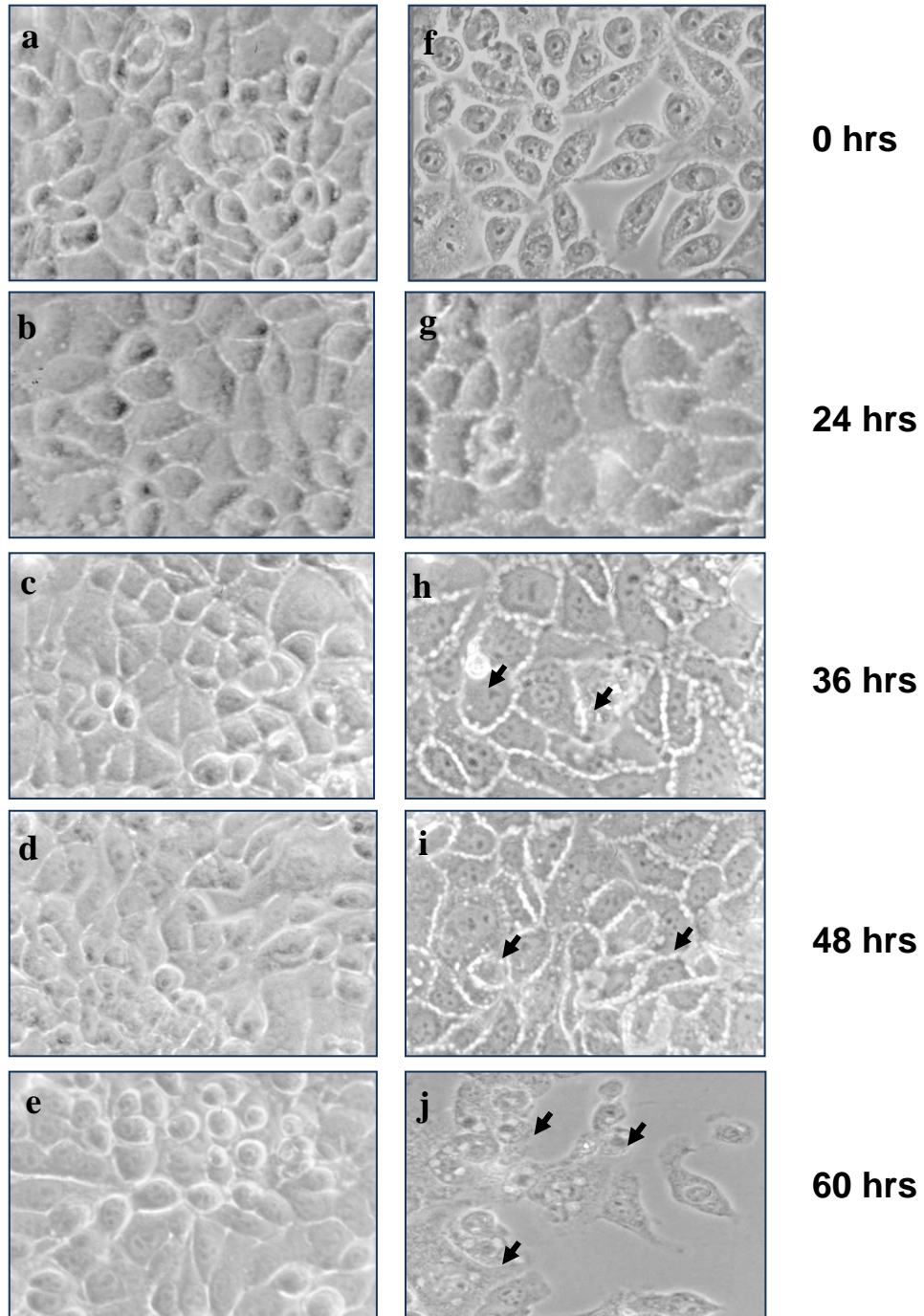


Figura 18: Efecto de la expresión de E2 de HPV 16 en células BMK-16/myc. a-e) Células no transfectadas, f-j) Células transfectadas con los E2 de HPV 16. Se observan cambios en los contactos célula-célula (h) y formación de cuerpos apoptóticos (j).

Por otro lado, mediante un ensayo de TUNEL, se verificó si la proteína E2 de HPV 16 tiene algún efecto sobre la fragmentación de DNA en las células BMK-16/myc. La figura 19A muestra a las células BMK-16/myc después de la transfección con E2 y visualizadas con un microscopio de fluorescencia y en campo claro (MCC). Se detectó hebras de DNA fragmentadas por el proceso de apoptosis (Anexo 3). Cuarenta y ocho horas después a la transfección, se observó un claro marcaje de los núcleos de las células. Además se observaron otros cambios celulares, tales como una reducción en el tamaño de citoplasma y núcleo, cambios morfológicos en el núcleo, fragmentación celular y cuerpos apoptóticos. En el mismo ensayo de transfección transitoria con E2 se detectó la presencia de la proteína E2 por Western Blot, la cual fue evidente 36 y 48 horas después de la transfección (Figura 19B).

Los hallazgos anteriormente descritos demuestran una correlación entre la supresión del crecimiento celular y la subsiguiente muerte celular de la línea celular murina BMK-16/myc. Resultados similares fueron detectados en células humanas transformadas con HPV 16 (SiHa), no obstante la línea celular C-33 A no sufrió cambios por el efecto de la proteína E2.²⁶¹ Conjuntamente al efecto apoptótico de E2 en la línea celular BMK-16/myc, se analizó si la vía extrínseca de la apoptosis estaba implicada en la activación de la muerte celular. La figura 20A muestra las células BMK-16/myc transfectadas con el gen de E2 de HPV 16 y diferentes tiempos de la transfección se detectaron las proteínas pro-caspasas (forma inactiva o precursor) y caspasa (fragmentada, forma activa o efectora) 8 y 3. El precursor de caspasa 8, (50-55 kDa) fue detectado en todos los tiempos de la transfección y la caspasa 8 fue evidente 36 horas después de la transfección con el gen de E2. La cinética de la caspasa 3 efectora (forma activa) fue muy similar a la de caspasa 8. La administración de un inhibidor específico para caspasa 8 (AcIETD-CHO), inhibe la activación de la caspasa 8 y 3, se bloquea la fragmentación de DNA y en consecuencia no se presenta muerte celular (Figura 20B y Anexo 4). Por lo tanto, la muerte celular de la línea celular BMK-16/myc mediada por E2 está relacionada con la activación de la vía extrínseca de la apoptosis.

A

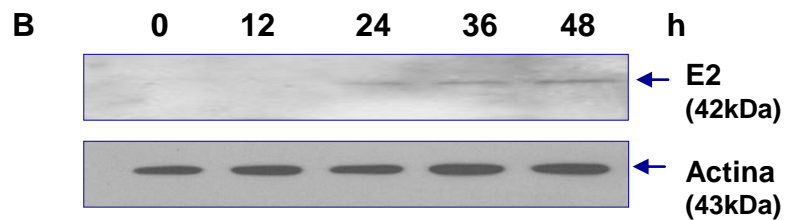
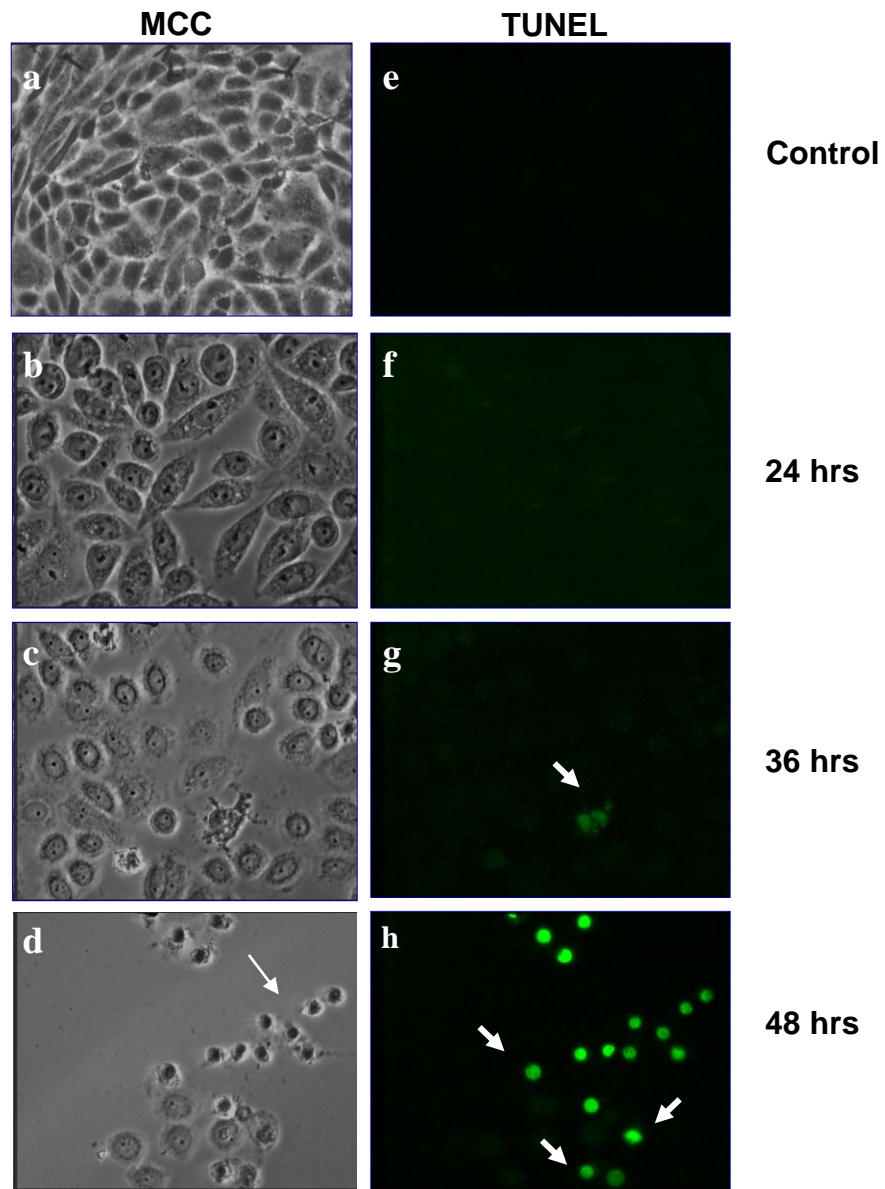


Figura 19: La expresión de E2 de HPV 16 en células BMK-16/myc induce la fragmentación de DNA. A) Ensayo de Tunnell, (a-d) células transfectadas con E2 y visualizadas en microscopio campo claro (MCC) y (e-h) células transfectadas con E2 y visualizadas en microscopio de fluorescencia (MF). B). Western Blot para la detección de la proteína E2 de HPV 16 y actina en células transfectadas con el plásmido pCMVp16-E2.

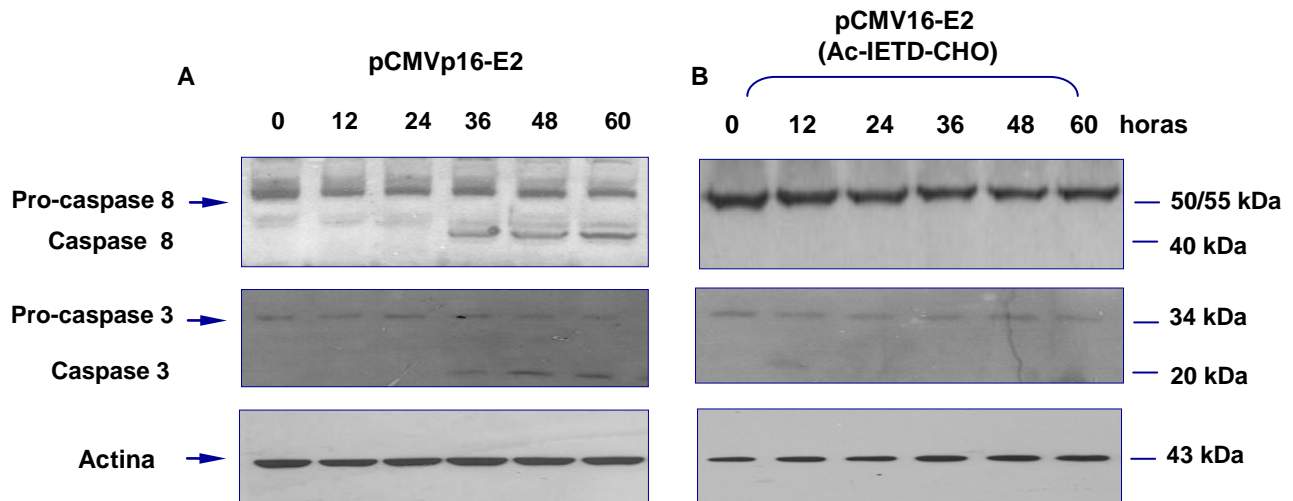


Figura 20: Efecto de E2 de HPV 16 sobre la activación de la vía extrínseca de la apoptosis mediante la activación de caspasa 8 y 3 en células BMK-16/myc

La línea celular BMK-16/myc induce tumores en ratones Balb/c inmunocompetentes. Con el objetivo de generar un modelo experimental tumoral murino positivo al HPV como una aproximación de un modelo de cáncer cervical. 2×10^5 y 3×10^5 células BMK-16/myc HPV16 positiva anteriormente descrita, fueron administradas vía subcutánea en el dorso de ratones Balb/c inmunocompetentes. El crecimiento tumoral fue palpable 15 días después de la administración y se monitoreo hasta que el crecimiento fue medible. La figura 21A muestra el crecimiento tumoral en los ratones con las células administradas. El 80% de los ratones desarrollaron tumor con la administración de 2×10^5 y el 100% desarrollo tumor con la dosis de 3×10^5 . Además, se detectaron casos de ratones que desarrollaron metástasis en pulmón, riñón, tumores en piel y caja torácica. El tejido tumoral metastásico fue analizado por RT-PCR con la finalidad de detectar los RNAs mensajeros de los oncogenes E6 y E7 de HPV 16 los cuales son expresados por la línea celular BMK-16/myc (Figura 21B).

Adicionalmente, se detectó que a partir del día 25 posterior a la implantación del tumor, el crecimiento tumoral es irregular y se invagina, esto impide una clara medición tumoral. Por otro lado, se analizó la curva de sobrevivida de los ratones, se detectó que el 100% de los ratones muere producto del proceso canceroso. Los ratones al día 45 posterior al implante del tumor, es evidente la baja de peso y la falta de apetito. Los ratones con la dosis más alta de células tumorales, comienzan a morir a partir del día 55 y los ratones con la dosis más baja mueren en el día 65.

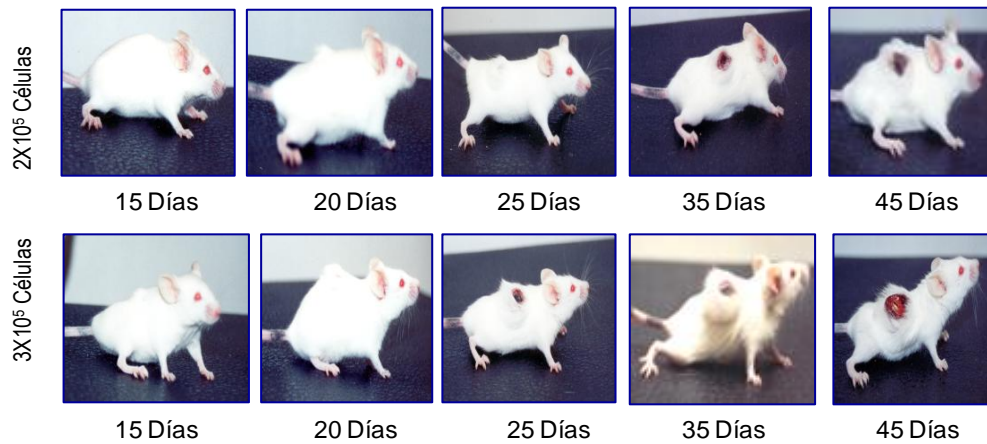


Figura 21A: Modelo tumoral murino en ratones Balb/c HPV 16 positivo: Grupo de ratones tratados con 2×10^5 y 3×10^5 células BMK-16/myc, el 80 y 100% de ratones desarrolla tumores respectivamente.

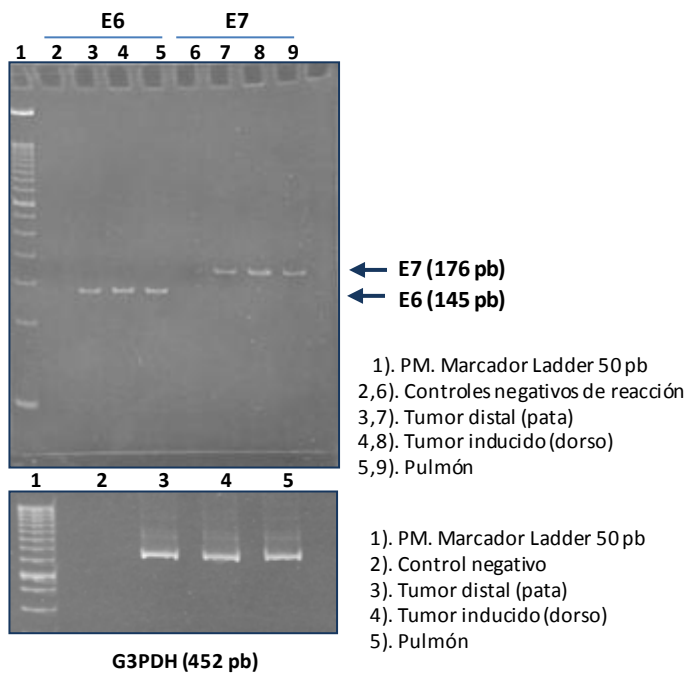


Figura 21B: RT-PCR punto final para la detección de los oncogenes E6 y E7 en tejidos de ratones con tumor.

Construcción y Producción de Adenovirus Recombinantes: Usando un sistema de generación de adenovirus recombinantes en bacterias descrito en materiales y métodos, se realizó el diseño y la generación a gran escala de los adenovirus recombinantes. El interés del proyecto fue la construcción y producción de cuatro vectores virales. a). Vector adenoviral recombinante que expresa el gen de la IL-12 de ratón bajo un promotor de CMV, AdCMVmIL-12 b). Vector adenoviral recombinante que expresa el gen de E2 del HPV 16 bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV), AdCMVE2HPV16 c). Vector adenoviral recombinante que expresa la interleucina 12 bajo un promotor compuesto de cuatro elementos de respuesta a la proteína E2 de HPV 16, AdE2mIL-12 y d). Vector adenoviral recombinante que expresa la proteína GFP bajo un promotor de CMV, AdCMVGFP. Adicionalmente los vectores AdCMVE2HPV16, AdCMVmIL-12 y AdE2mIL-12, contienen la proteína GFP como marcador adicional para monitorear la capacidad de infección, transgénesis, de expresión génica y producción de viriones. Los vectores fueron generados como se describe en materiales y métodos.

Para generar los adenovirus recombinantes, inicialmente se clono el gen de interés o promotor en un plásmido de transferencia (pAdTrack-CMV, pAdTrack), el cual contiene dos brazos de recombinación homóloga con el plásmido pAdEasy. El plásmido recombinante posteriormente fue linearizado y mediante lipofección se transfecto en células AD293 para generar la producción de viriones recombinantes (Figuras 22-25). Posterior a la purificación de los virus y se realizó la producción a gran escala de los viriones en cajas de cultivo. La Figura 25 ejemplifica la producción de viriones de adenovirus en células AD293 en cultivo, posteriormente las células fueron cosechadas y lizadas. Por medio de gradiente de CsCl se purificaron los viriones y se dializaron toda la noche en presencia de un buffer neutro. Los viriones fueron cuantificados y se determinó su capacidad de infección en células en cultivo AD293. La transgénesis fue determinada por la capacidad de producción de la proteína verde fluorescente en las células infectadas.

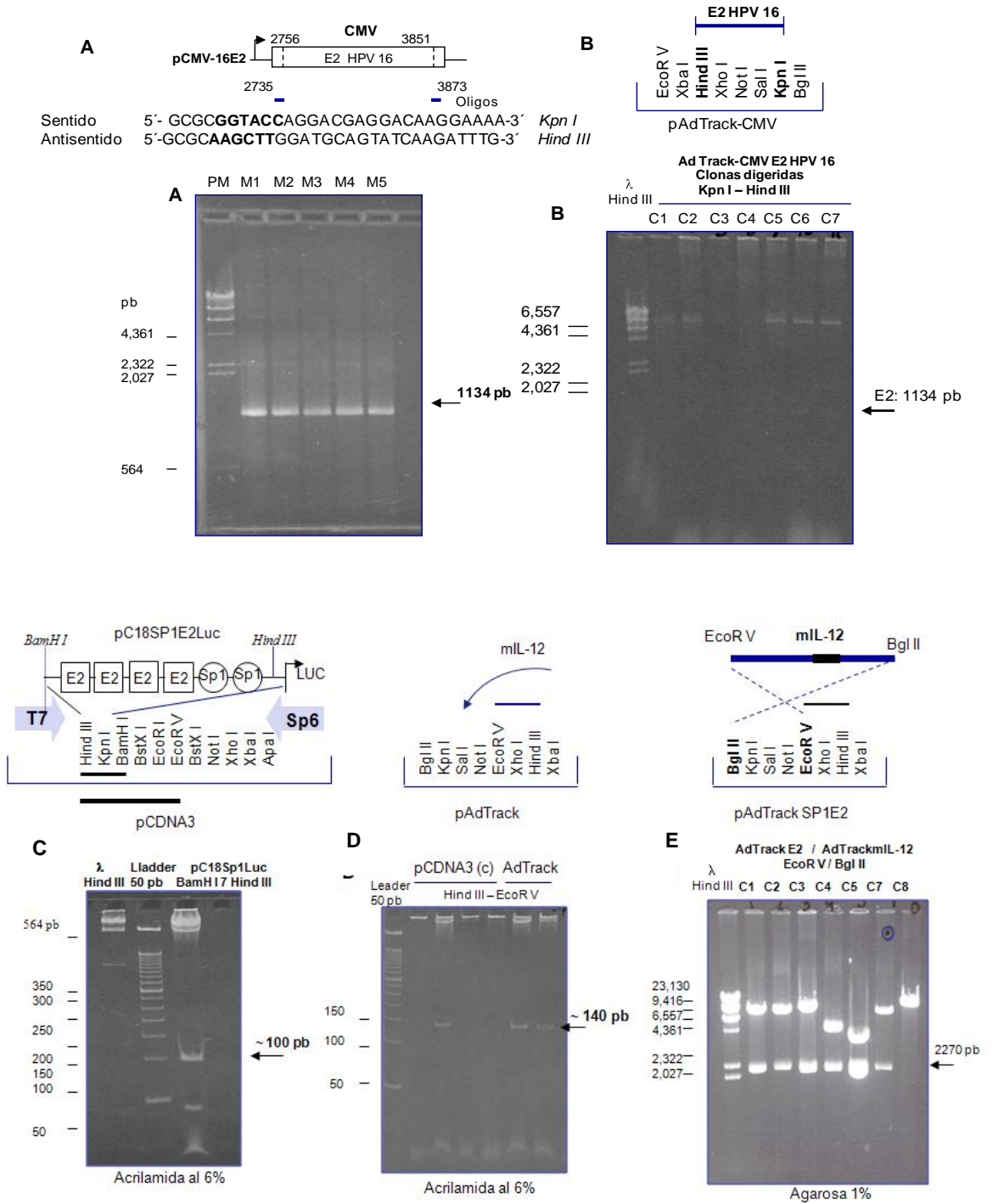


Figura 23: Caracterización de las construcciones pAdTrackCMVE2HPV16, pAdTrackCMVmIL-12 y pAdTrackE2mIL-12. pAdTrackCMVE2HPV16. A) Amplificación del gen de E2 de HPV 16 por PCR. B) Caracterización de la clonación del gen de E2 en el plásmido pAdTrackCMV en sitios *Hind III* y *Kpn I*. **pAdTrackCMVmIL-12 y pAdTrackE2mIL-12.** C). Liberación del promotor E2 del plásmido pC18SP1E2Luc en sitios *Hind III* y *BamHI*. D). Clonación del promotor de E2 en el plásmido pCDNA3 y posterior clonación en el plásmido pAdTrack (construcción pAdTrackSP1E2 en sitios *Hind III* y *EcoR V*). E). Clonación del gen de la IL-12 en los plásmidos pAdTrackSP1E2 y pAdTrackCMV, en sitios *EcoR V* y *Bgl II*. Caracterización de productos en gel de agarosa al 1%.

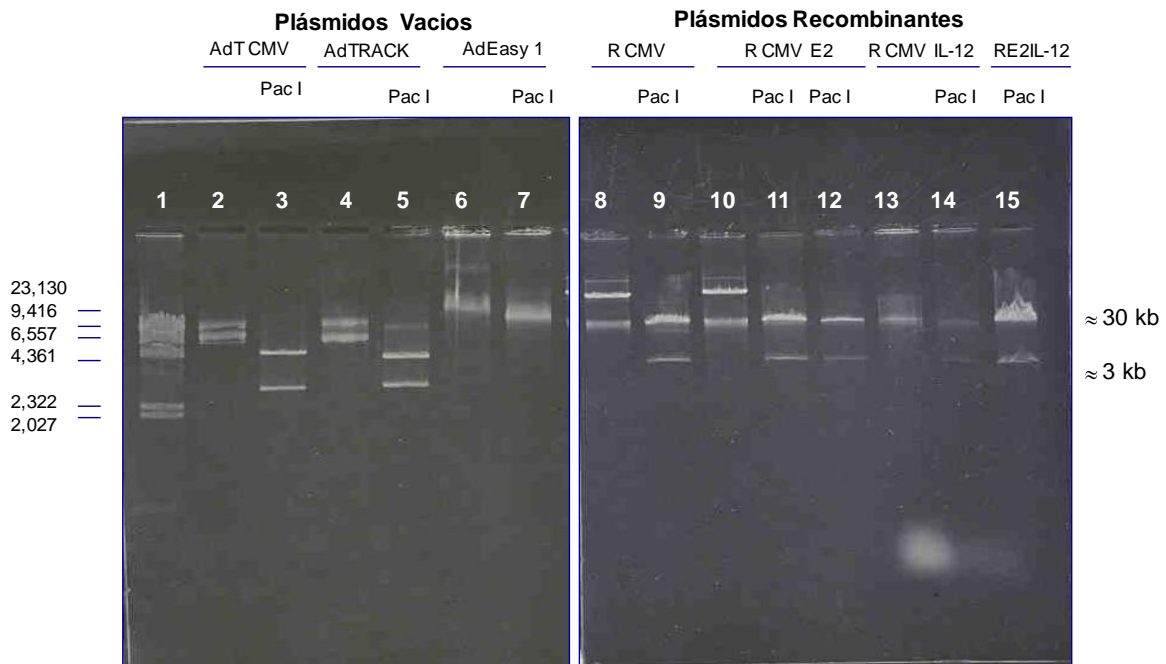


Figura 24: Caracterización de plásmidos de transferencia (A) y recombinantes (B): La caracterización de los plásmidos se realiza mediante la digestión enzimática con la enzima de restricción *Pac I*. Los vectores de transferencia tienen dos sitios de digestión, liberando el gen de resistencia a kanamicina. Los plásmidos recombinantes contienen los dos sitios de restricción; sin embargo, producto de la recombinación homóloga el producto de liberación es de mayor peso molecular, como se muestra en la figura. 1). Marcador λ *Hind III*, 2). pAdTackCMV, 3).pAdTrackCMV *Pac I*, 4). pAdTrack, 5). pAdTrack *Pac I*, 6). pAdEasy 1, 7).pAdEasy1 *Pac I*. 8-15). Plásmidos recombinantes (R). 8). pRAdCMVGFP, 9). pRAdCMVGFP *Pac I*, 10). pRAdCMVE2HPV16, 11). pRAdCMVE2HPV16 *Pac I*, 12). pRAdCMVmIL-12, 13). pRAdCMVmIL-12 *Pac I*, 14). pRAdE2mIL-12 y 15). pRAdE2mIL-12 *Pac I*.

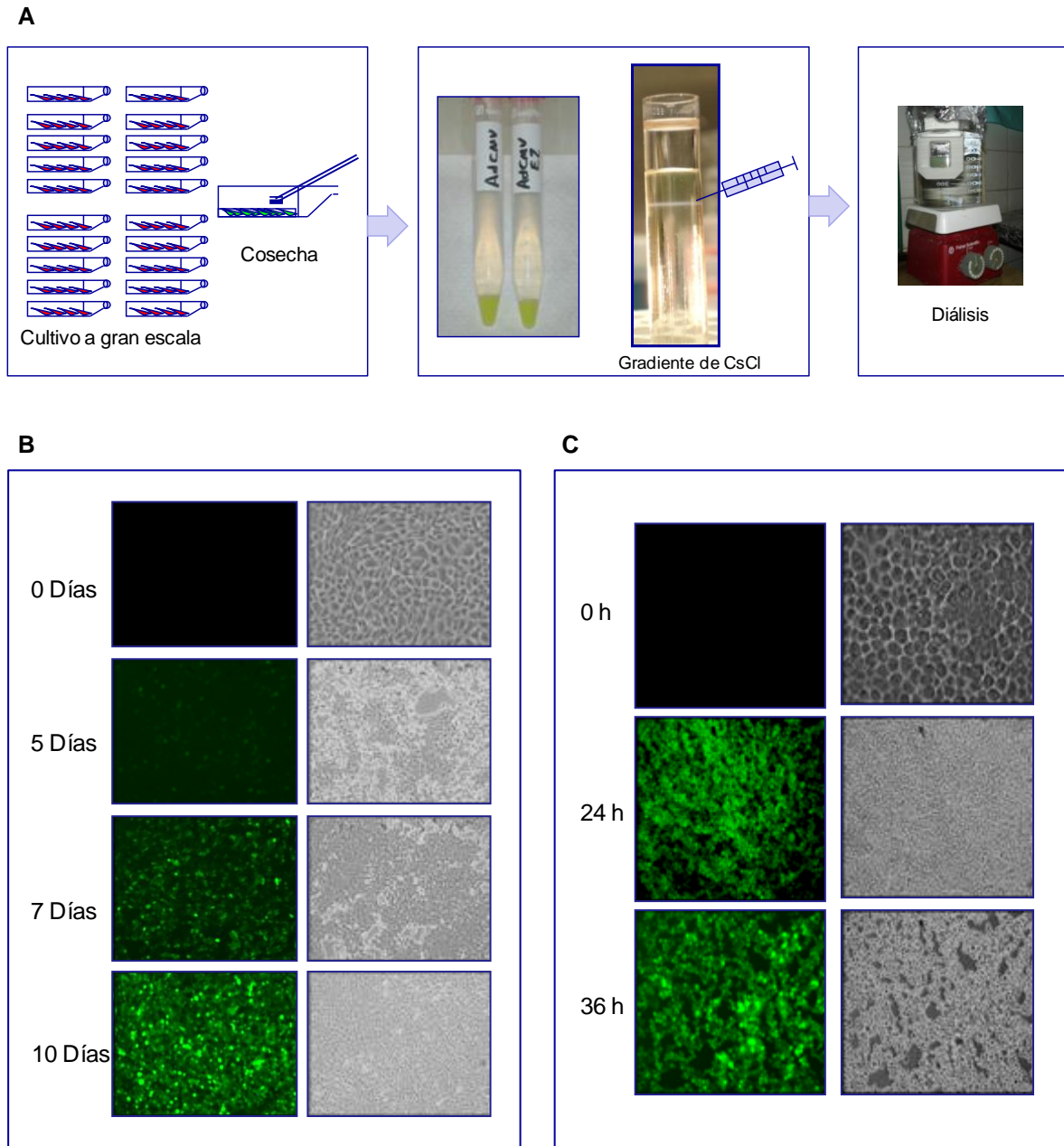


Figura 25: Producción a gran escala de adenovirus recombinantes: A). Cultivo a gran escala de células AD293 transfectadas con los plásmidos recombinantes. Se muestra las células cosechadas y centrifugadas 10 días después de la transfección. Las células fueron lizadas por congelación y descongelación, posteriormente se centrifugaron para formar un gradiente de CsCl. La banda translúcida corresponde a los viriones generados, los cuales se recuperaron por pinzón mediante una jeringa. Los viriones fueron dializados para eliminar el CsCl. B). Se muestra la detección de la proteína verde fluorescente expresada por las células transfectadas con los plásmidos recombinantes 10 días después de la transfección indicando la producción de viriones. C). Células AD293 infectas con los 50 MOI de los viriones generados A-B. Treinta y seis horas después de la infección se observa un 100 % de células infectadas por el adenovirus. Nota: en B-C, se presentan las células visualizadas en un microscopio de fluorescencia y además se presentan las células visualizadas en campo caro.

Adenovirus recombinante que expresa la proteína E2 de HPV 16 tiene un efecto antitumoral in vivo: Previamente fue demostrado las funciones de la proteína E2 de HPV 16 como represor transcripcional de los oncogenes E6 y E7, inhibición de la proliferación celular e inductor de la muerte celular a través de la vía extrínseca en la línea celular BMK-16/myc. Por lo tanto, se decidió examinar si la proteína E2 de HPV 16 tiene propiedades antitumorales en un modelo tumoral *in vivo*. Para comprobar esta hipótesis, un vector adenoviral recombinante que expresa la proteína E2 de HPV 16 fue generado, AdCMVE2HPV16, como se indica en materiales y métodos. Inicialmente, se evaluó la expresión de la proteína E2 por la infección en células en cultivo por el vector adenoviral AdCMVE2HPV16. La figura 26A, demuestra la detección de la proteína E2 de HPV en células BMK-16/myc después de 48 horas después de ser infectadas con 50 y 100 MOI del AdCMVE2HPV16. El Western Blot demuestra una clara banda de un peso molecular de 42 kDa correspondiente a la proteína de E2 de HPV 16, mediante un anticuerpo generado en el laboratorio (ver materiales y métodos).

Posteriormente, se examinó el efecto anti-tumoral de E2 de HPV 16 en el modelo tumoral experimental. Grupos de ratones con tumor fueron inyectados vía intratumoral con una dosis única de 5×10^8 PFUs con los virus AdCMVE2HPV16 y AdCMVFGFP, y un grupo control de ratones con tumor sin tratamiento (ver materiales y métodos). La figura 26B muestra que la mayor reducción tumoral se observa con el tratamiento con AdCMVE2HPV16. Este efecto es muy evidente hasta el día 15 después de la administración del adenovirus AdCMVE2HPV16. No obstante, después de este día el tumor crece lentamente hasta el día 30 de análisis. Por otro lado, los ratones tratados con el vector AdCMVFGFP inicialmente mostrarán una ligera reducción del tumor, pero posteriormente crece gradualmente menor que los ratones sin tratamiento. Estos resultados indican que la proteína E2 de HPV16 tiene un efecto de inhibición de tumoral, lo cual es una buena aproximación para su uso como estrategia terapéutica contra el cáncer cervical.

Adenovirus recombinante que expresa la proteína IL-12 tiene un efecto antitumoral in vivo: Con el objetivo de determinar el efecto antitumoral de la IL-12 sobre un tumor experimental HPV 16 positivo en un contexto de ratones inmunocompetentes. Un vector adenoviral recombinante que expresa la IL-12 fue generado como se describe en materiales y métodos. Se evaluó la expresión de la proteína IL-12 en células en cultivo AD293 infectadas con el virus recombinante. La figura 27A muestra la detección de la proteína IL-12 mediante western blot, se detectó una banda de aproximadamente 40 kDa correspondiente a la proteína. Posteriormente, se evaluó el efecto anti-tumoral del virus recombinante AdCMVmlL-12. Grupo de ratones con tumores establecidos de entre 20 a 30 mm³ de volumen

fueron inmunizados con 5×10^8 PFUs del AdCMVmIL-12, donde se determinó el efecto e inhibición tumoral. Cinco días posteriores al tratamiento se observó reducción total del tamaño tumoral en 4 de 5 ratones tratados y un ratón mostró moderada respuesta al tratamiento, No obstante el crecimiento tumoral fue muy lento. Adicionalmente, los ratones tratados con el adenovirus AdCMVGFP se observa una protección tumoral transitoria hasta el día 10 posterior al tratamiento. Sin embargo, el crecimiento tumoral no alcanza el crecimiento de los ratones sin tratamiento (figura 27B). Estos resultados indican un claro efecto antitumoral de la citocina IL-12 en el modelo tumoral evaluado e indica su posible implicación para el tratamiento del cáncer cervical.

Efecto antitumoral aumentado por la co-administración de los adenovirus recombinantes AdE2mIL-12 y AdCMVE2HPV16: Previamente se demostró el efecto anti-tumoral de los genes E2 de HPV 16 y la IL-12 mediante adenovirus recombinantes como vehículos de transgénesis. Sin embargo, como una aproximación de generar una estrategia terapéutica específica contra células neoplásicas HPV positivas, se planteó el uso de un adenovirus recombinante que expresara la IL-12 bajo un promotor específico que respondiera a la proteína E2 de HPV (AdE2mIL-12). De tal manera, que la co-administración de un vector adenoviral AdCMVE2HPV16 y el vector AdE2mIL-12, en conjunto ejerzan un efecto antitumoral amplificado. La prueba de concepto fue que el vector AdCMVE2HPV16 induzca la muerte celular de la célula neoplásica por vía de apoptosis y por otro lado la proteína E2 estimule la expresión de la IL-12 vía activación promotor de E2 presente en el vector AdE2mIL-12. En consecuencia, la expresión de la IL-12 favorezca la activación de la respuesta inmune celular lo cual tendría un efecto directo sobre la eliminación de la célula tumoral. Este efecto en el sistema tumoral *in vivo* en el contexto de ratones inmunocompetentes, se observaría un efecto anti-tumoral amplificado.

En este estudio se generó el vector AdE2mIL-12 como se describió previamente (materiales y métodos) y se evaluó su funcionalidad mediante ensayos *in vitro*. Se infectaron células en cultivo BMK-16/myc con los el vector AdE2mIL-12 y se co-infectadas con el vector AdCMVE2HPV16. La figura 28 muestra la detección de la proteína IL-12 mediante wester blot en las células BMK-16/myc infectadas. Se observa que a medida que aumenta la concentración de partículas virales de AdCMVE2HPV16 (rango 0, 5, 10, 50, 100 MOI) y manteniendo constante la concentración de AdE2mIL-12 (50 MOI), un aumento en la concentración de la proteína IL-12 a 48 hrs posterior a la co-infección. Estos resultados determinan una clara inducción de la expresión de la IL-12 mediada por la activación transcripcional de E2 y su interacción con el promotor (E2) presente en el vector AdE2mIL-12.

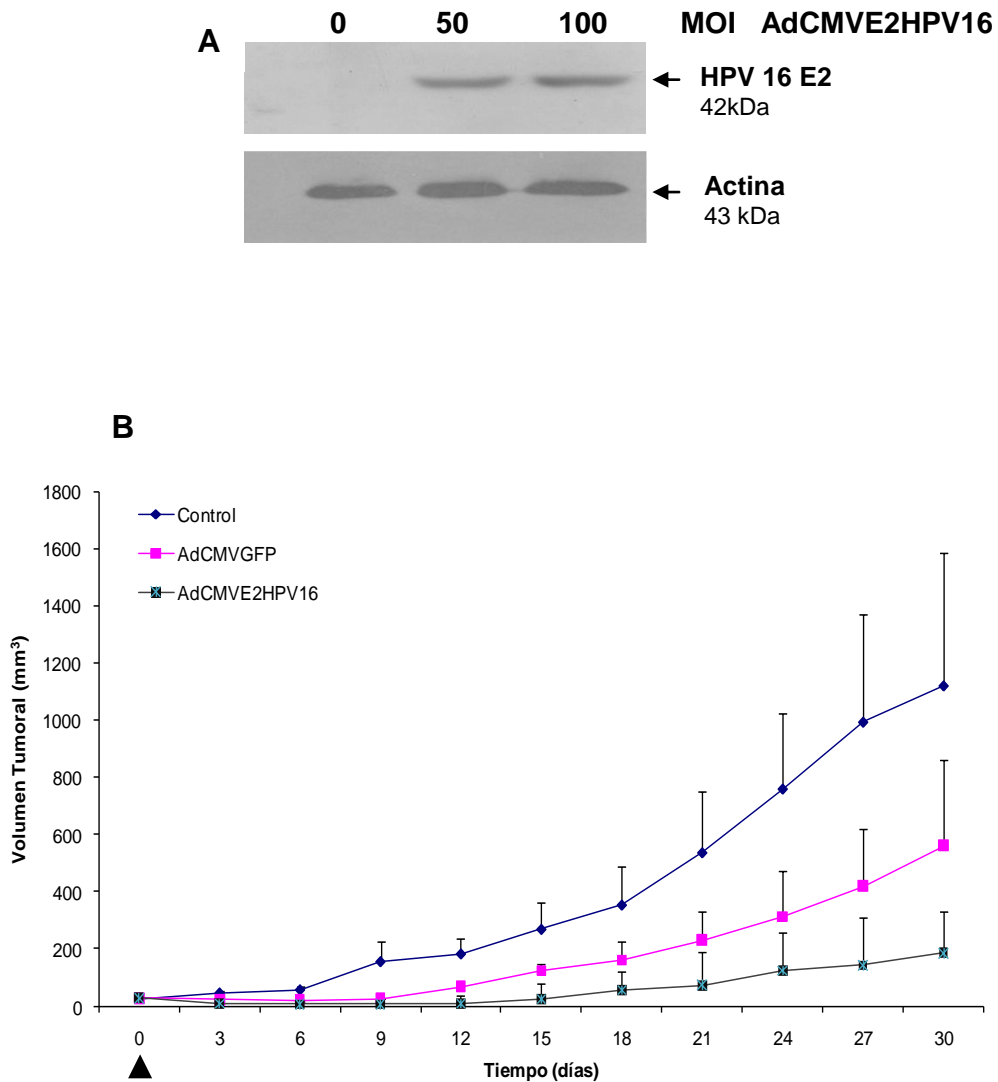


Figura 26: Efecto antitumoral del adenovirus recombinante AdCMVE2HPV16 en un modelo tumoral murino. A). Detección de la proteína E2 por western blot en células BMK-16/myc infectadas con el adenovirus AdCMVE2HPV16, B). Efecto antitumoral del AdCMVE2HPV16 y comparación ratones tratados con AdCMVGFP y sin tratamiento. Los datos se presentan como $X \pm ES$. $P < 0.0001$ comparada entre los grupos.

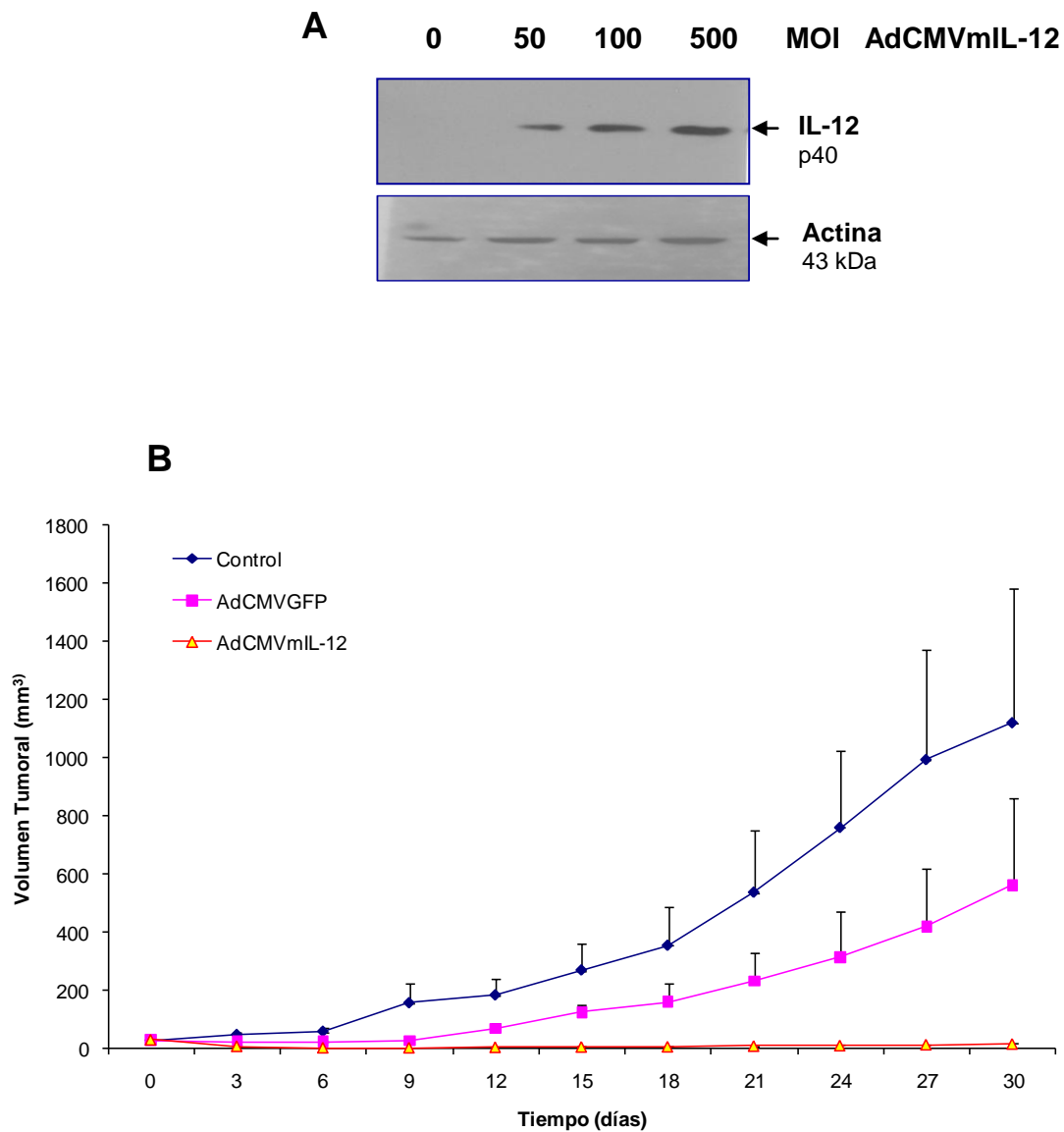


Figura 27: Efecto antitumoral del adenovirus recombinante AdCMVIL-12 en un modelo tumoral murino. A). Detección de la proteína IL-12 por western blot en células BMK-16/myc infectadas con el adenovirus AdCMVmIL-12 B). Claro efecto antitumoral del AdCMVmIL-12 y comparación ratones tratados con AdCMVGFP y sin tratamiento. Los datos se presentan como $X \pm ES$. $P < 0.000$ comparada entre los grupos.

Una vez determinado la inducción de la IL-12 por la proteína E2, el siguiente paso fue detectar el efecto antitumoral de E2. Ratones con tumor establecido (20 a 30 mm³) fueron tratados con los vectores virales, se co-infectaron vía intratumoral y se determinó la inhibición del crecimiento tumoral. Además este efecto fue comparado con los ratones tratados con los vectores virales solos, con el vector AdCMVGFP y ratones sin tratamiento. La figura 29 muestra un claro efecto de inhibición tumoral en los ratones tratados con la co-infección. Se observa casi una reducción total de la masa tumoral; no obstante el efecto es muy similar al generado con el tratamiento con solo el virus AdCMVmIL-12. Sin embargo, observamos una diferencia in vivo en los ratones monitoreándolos físicamente. Los ratones tratados con la co-infección de los vectores, en el 100% de los casos no se presentó recurrencia del crecimiento tumoral. En comparación con los ratones tratados el AdCMVmIL-12, un ratón (1/5) mostró un lento crecimiento tumoral hasta el día representado, no obstante después de este tiempo (datos no presentados) el tumor crece lentamente. Adicionalmente, la figura 29 además muestra una comparación de todos los tratamientos evaluados en los ratones. Se observa que solo el tratamiento con los vectores adenovirales recombinantes, ejercen un efecto antitumoral pero este es transitorio. El adenovirus AdE2IL-12 no presentó protección tumoral y el AdCMVE2HPV16 indujo inhibición tumoral hasta los 15 días después del tratamiento. Sin embargo, los mejores efectos de inhibición tumoral fueron los tratamientos con el adenovirus AdCMVmIL-12 y el co-tratamiento con los virus AdE2mIL-12 y AdCMVE2HPV16 (figura 29).

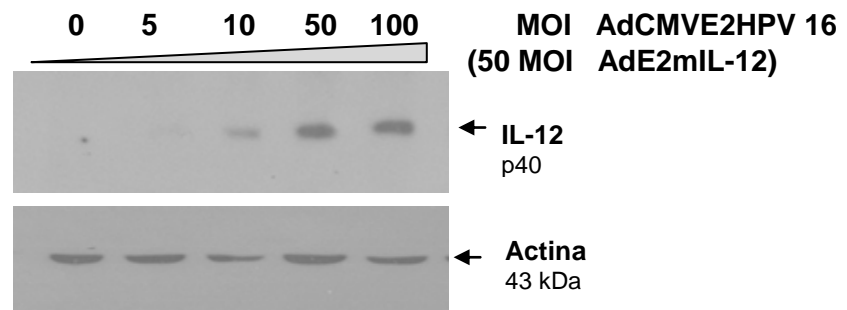


Figura 28: Inducción transcripcional de la IL-12 por la proteína E2 de HPV 16. Células BMK-16/myc fueron co-infectadas con los virus AdE2mIL-12 (50 MOI) y con dosis crecientes del adenovirus AdCMVE2HPV 6 (5-100 MOI), 48 hrs posterior al tratamiento se detectó la inducción de la proteína mIL-12 por medio de western blot.

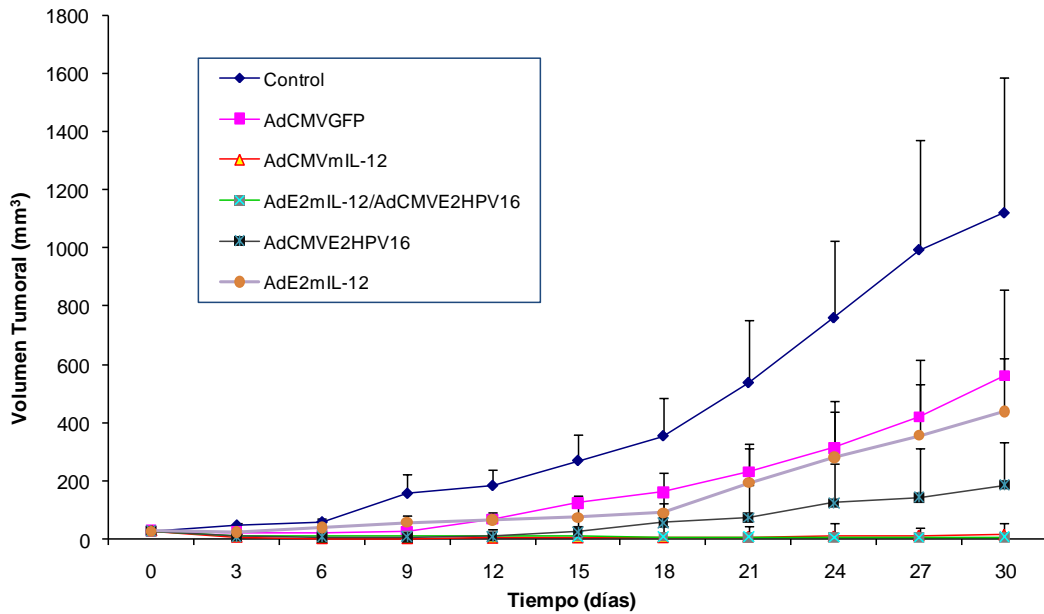


Figura 29: Efecto antitumoral de los genes E2 de HPV 16 y la IL-12 mediante vectores adenovirales recombinantes evaluado en un modelo experimental murino HPV 16 positivo. Ratones balb/c con un tumor inducido por la administración de células BMK-16/myc, fueron tratados con los vectores adenovirales recombinantes AdCMVE2HPV16, AdCMVmIL-12, AdE2mIL-12, ADCMVGFP y con la co-administración de los adenovirus AdE2mIL-12 y AdCMVE2HPV16. Posteriormente, se evaluó el efecto de inhibición de crecimiento tumoral a diferentes tiempos del tratamiento. Los datos se presentan como $X \pm ES$. $P < 0.0001$ comparada entre los grupos.

Finalmente se evaluó la sobrevida de los ratones con tumor tratados con los vectores adenovirales recombinantes. La figura 30 muestra un discreto aumento en la sobrevida de los ratones tratados con los adenovirus AdCMVGFP y AdE2mIL-12 comparado con los ratones control. No obstante, se observó un aumento considerable en la sobrevida de los ratones (57%) tratados con el AdCMVE2HPV16. Sin embargo, el mayor efecto en la sobrevida fue observada con el tratamiento del adenovirus AdCMVmIL-12 y el co-tratamiento con los virus AdE2mIL-12 y AdCMV-E2HPV16. Ambos vectores virales tienen un efecto sobre la eliminación tumoral en 3/5 (60%) ratones lo cual correlaciona con la sobrevida de los ratones y con el 30% de los ratones que no responden al tratamiento. Estos resultados son muy alentadores y establecen el potencial que tienen los vectores adenovirales en la terapia génica contra cáncer cervicouterino (CaCu), y la factibilidad del uso de la IL-12 como gen terapéutico con actividad anti-tumoral como posible tratamiento contra lesiones precancerosas y cancerosas del cérvix asociadas a la infección por el virus del papiloma humano.

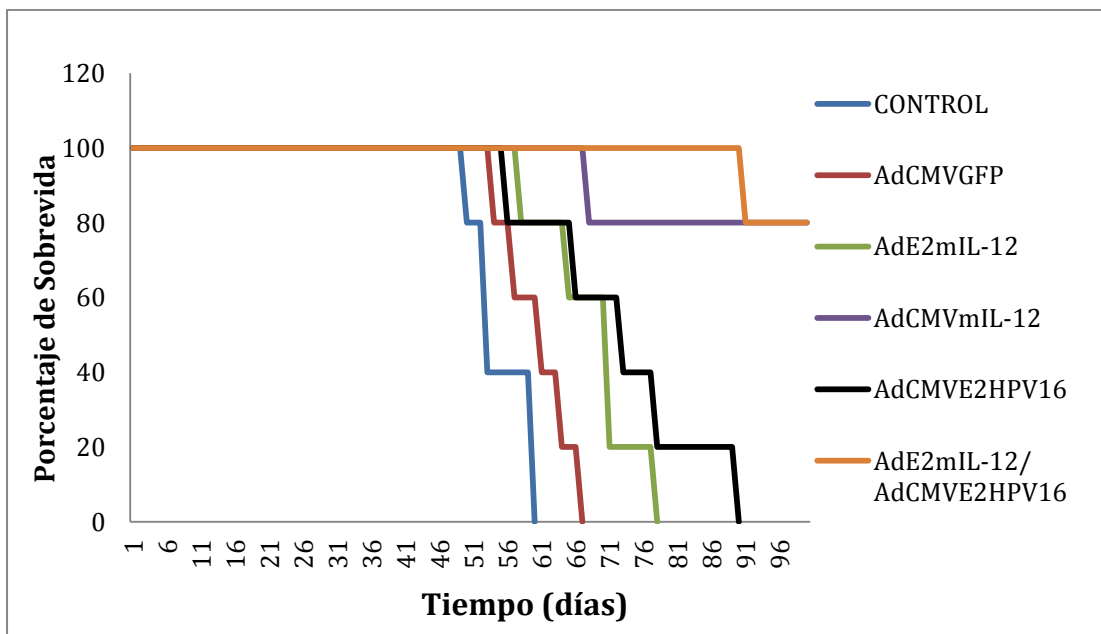


Figura 30: Sobrevida de los ratones con tumor tratados con adenovirus recombinantes.

Discusión

El cáncer cervicouterino (CaCu) representa un grave problema de salud pública global, lo cual implica redoblar esfuerzos para mejorar los sistemas de diagnóstico, control y tratamiento de esta neoplasia. En este sentido el presente trabajo pretende ser un acercamiento para el desarrollo de una estrategia terapéutica como tratamiento para lesiones cervicales precancerosas y neoplasias cervicales asociadas a la infección por el virus del papiloma humano.

El cáncer cervicouterino es una neoplasia de desarrollo lento que conlleva la acumulación de diversas alteraciones moleculares, celulares y de la respuesta inmune generando un microambiente tumoral favorable para su desarrollo tumoral. Particularmente, hemos caracterizado un estado de inmunosupresión local generado por la producción de citocinas inmunosupresoras asociadas a la infección por HPV, lo cual representa un mecanismo de evasión a la respuesta inmune mediada por células tumorales HPV positivas.¹²⁻¹³ No obstante nuestro reto fue modificar o revertir el estado de inmunosupresión local mediante activación de respuesta inmune celular y eliminar a las células tumorales por un evento de muerte celular, usando la IL-12 y la proteína E2 de HPV respectivamente, mediante terapia génica viral evaluada en un modelo tumoral murino HPV positivo.

La prueba de concepto fue evaluada en un sistema *in vitro*, células BMK-16/myc y SiHa fueron transfectadas con el plásmido pCMVp16-E2 (codifica para la proteína E2 de HPV 16), mostraron un claro efecto de represión transcripcional de los oncogenes E6/E7 con una correlación antiproliferativa sobre las líneas celulares. Estos resultados son consistentes con las propiedades biológicas de E2 sobre otras línea celulares.^{98,104,111,118,123} La línea celular murina BMK-16/myc transformada con el HPV 16 responde de manera similar a las líneas celulares humanas derivadas de carcinoma cervical HPV positivas. Adicionalmente, E2 de HPV 16 tienen similares efectos antiproliferativos en células transformadas por los eventos de la infección viral y en células epiteliales transformadas con el HPV experimentalmente. Por otro lado, se ha demostrado que E2 de HPV de alto riesgo tiene un efecto antiproliferativo sobre líneas celulares epiteliales inmortalizadas o transformadas HPV negativas. Lo que implica que la propiedad anti-proliferativa de la proteína E2 puede ser independiente de la presencia de HPV, lo cual tendría implicaciones sobre los mecanismos intrínsecos de la transformación celular.

La expresión ectópica de E2 en las células BMK-16/myc induce cambios citológicos muy claros de aparente muerte celular (figura 18). Mediante un ensayo de TUNEL *in situ* se demostró que E2 induce la fragmentación de DNA 48-72 hrs posteriores a la transfección, lo que indica la muerte celular por apoptosis (figura 19, anexo 3). Estos

hallazgos tienen una relación con la represión de los oncogenes E6/E7 y la función anti-proliferativa de E2 detectada inicialmente (figuras 16 y 17). No obstante, nuestro interés fue precisar en la vía de activación de la muerte celular mediada por E2 en células BMK-16/myc. Basados en el sistema de transfección *in vitro* se demostró que E2 induce la activación de la vía extrínseca de la apoptosis, con una especificidad de activación de pro-caspasa 8 al incubar las células con un inhibidor específico para esta pro-caspasa (figura 20 y anexo 4). Este hallazgo es congruente con un reporte previo sobre la activación de pro-caspasa 8 en keratinocitos transformados con HPV y transfectados con E2,¹²⁵ pero no hay reportes en líneas celulares derivadas de cáncer cervicouterino HPV positivas. La activación de la vía intrínseca de la apoptosis no fue evaluada. Sin embargo, hay reportes controversiales donde se involucra la participación de p53 como mediador de la muerte celular en células derivadas de carcinoma cervical pero sin precisar la activación de procaspasas asociadas a la activación de la vía intrínseca.¹²⁶ En las células BMK-16/my se presupone que no se activa la vía intrínseca ya que en células transfectadas con E2 en presencia del inhibidor específico para pro-caspasa 8, (vía intrínseca está intacta) no se detecta muerte celular (Anexo 4). Por otro lado, se ha reportado que solo las proteínas E2 de HPV de alto riesgo pueden inducir muerte celular por apoptosis en células de carcinoma cervical HPV positivo, en comparación con las proteínas E2 de HPV de bajo riesgo.¹²¹ Además, se ha reportado que las proteínas E2 de HPV de alto riesgo y bajo riesgo tienen diferente capacidad de interaccionar con p53 e implicaciones en inducir muerte celular.¹²⁸ Estos resultados demuestran las múltiples funciones de la proteína E2 y la controversia de los mecanismos usados por la proteína E2 para inducir muerte celular mediada por apoptosis en diversas líneas células transformadas con o sin HPV.

Por otro lado, se evaluó la capacidad terapéutica de los vectores adenovirales en tumores establecido en ratones balb/c por la administración sub-cutánea de las células BMK-16 como se describe en la sección de materiales y métodos (figuras 26-30). Ratones con tumor fueron tratados con una dosis del adenovirus AdCMVE2HPV16, observando inhibición del crecimiento tumoral transitoria hasta 15 días posterior al tratamiento comparada con los controles (figura 26). Estos resultados sugieren que la proteína E2 de HPV 16 tiene un efecto antitumoral temporal, que pudiera ser atribuida por la dosis evaluada y por la infección/expresión del transgen transitorio por los adenovirus recombinantes generados. Este efecto antitumoral temporal pudiera ser superado aumentando la dosis o la administración de dosis repetidas del adenovirus recombinante. Esta especulación está sustentada por un estudio previo donde se muestra un efecto antitumoral más prolongado en un modelo tumoral en ratones desnudos (generado por la administración de células HeLa de origen humano) tratados con tres dosis con un virus de vaccinia recombinante con el gen de E2 del

virus de papiloma bovino.¹³¹ Adicionalmente, los ratones tratados con el adenovirus AdCMVmlL-12 mostraron un claro efecto antitumoral que se mantiene constante hasta el tiempo evaluado (figura 27). El efecto de la IL-12 es muy evidente y es congruente con el efecto antitumoral de la IL-12 observada en otros modelos de tumor reportados.²⁴⁴⁻²⁴⁸ Lo cual nos permite especular si la dosis evaluada es capaz de eliminar tumores con mayor volumen o dosis repetidas puede rescatar tumores más agresivos. Estos resultados sugieren fuertemente que la IL-12 es una citocina con propiedades antitumorales y el efecto terapéutico de IL-12 puede estar asociado con activación local de diferentes bancos de la respuesta inmune y en procesos biológicos de la célula tumoral.

La producción de la IL-12 en el tejido tumoral podría activar a los linfocitos T y promover una respuesta tipo Th1, es decir la activación de los linfocitos T CD4+ cooperadores e inducir la producción de citocinas como IL-2, IL-12 e INF- γ involucradas en la activación de la respuesta inmune celular.²⁶²⁻²⁶³ La IL-12 es un factor estimulante de las células asesinas naturales (NK), inductor de la expresión de INF- γ y promueven la destrucción de células tumorales.²⁶⁴ El mecanismo de acción de las células NK sobre las células tumorales se relaciona con la falta de expresión del MHC clase I, ²⁶³⁻²⁶⁶ y por otro lado INF- γ puede restablecer los niveles de expresión de MHC clase I promoviendo la presentación antigénica en la célula tumoral. ²⁶⁷⁻²⁶⁸ Sin embargo, tal vez el principal mecanismo de acción de IL-12 y su efecto antitumoral se relaciona con la activación de los linfocitos T CD8+ citotóxicos (CTL). La transgénesis intratumoral de IL-12 mediante adenovirus recombinantes puede generar una respuesta exacerbada de CTL específicas de tumor, aumentando los niveles de linfocitos T CD8+ infiltrantes de tumor asociados al reconocimiento de antígenos específicos de tumor y a la regresión tumoral. Este mecanismo se ha observado en otros modelos experimentales de tumor en animales tratados con IL-12 repletados en linfocitos T CD4+ ó/ CD8+ donde se ha demostrado el efecto de protección tumoral por parte de los linfocitos T CD8+.²⁶⁹⁻²⁷¹ Finalmente, el efecto antitumoral de IL-12 puede estar relacionado con su acción sobre inducción de apoptosis de la célula tumoral y un efecto anti-angiogenesis.²⁷² IL-12 sobre regula la expresión de Fas y el ligando de Fas (FasL). Fas es una molécula de superficie celular capaz de inducir apoptosis mediada por su ligando. La capacidad de IL-12 para incrementar la expresión de Fas/FasL puede estar ligada a la regresión tumoral.²⁷³⁻²⁷⁵

Por otro lado, se evaluó el efecto antitumoral de la co-administración de los adenovirus AdCMVE2HPV16 y AdE2mlL-12. La figura 29 muestra un claro efecto de inhibición del crecimiento tumoral por la co-administración viral, mostrando un comportamiento similar al tratamiento con solo el AdCMVmlL-12. Este evento puede ser debido al volumen tumoral analizado, probablemente la evaluación en tumores más grandes el efecto antitumoral puede ser mejor que la aplicación de un solo

vector viral. No obstante el efecto antitumoral por la co-administración de adenovirus recombinantes se mantiene y el tumor no revierte hasta el día 100 posterior al tratamiento (figura 30). Notablemente, se determinó que la sobrevida de los ratones con tumor tratados con los adenovirus AdCMVmIL-12 y AdCMVE2HPV16/AdE2mIL-12, aumenta muy considerablemente respecto a los ratones control y tratados con AdCMVGFP (figura 30). Este hallazgo tiene gran importancia y relevancia, ya que en la clínica cuando se aplican tratamientos contra neoplasias el principal factor a considerar es evaluar la sobrevida de los pacientes. En este ensayo preclínico la sobrevida es muy considerable y nuestro reto ahora es tratar ratones con tumor más grandes para poder determinar el alcance terapéutico de los adenovirus recombinantes generados en la terapia génica contra cáncer cervical.

Esta estrategia terapéutica es muy prometedora como tratamiento de lesiones precancerosas y cancerosas. Las lesiones intraepiteliales de bajo grado podrían ser tratado con el adenovirus AdE2mIL-12 y la expresión de la proteína E2 de la lesión cervical sería la proteína transactivadora de la expresión de la IL-12, lo cual favorecería de manera temprana la activación de la respuesta inmune tipo celular. Este evento minimizaría los efectos de los inmunosupresores de la IL-10 y evitaría la evolución de la lesión a un NIC I/II. En el caso de lesiones intraepiteliales de alto grado, caracterizado por la pérdida de expresión del gen E2; el tratamiento sería la co-administración de AdCMVE2HPV16 y el AdE2mIL-12. La carencia de la proteína E2 sería restablecida por el AdCMVE2HPV16 la cual tendría un efecto sobre la activación de la apoptosis de la célula tumoral y por otro lado induciría la respuesta inmune celular mediada por la activación de la IL-12 vía el promotor de respuesta a E2 presente en el vector AdE2mIL-12. El tratamiento en conjunto de los genes E2 y la IL-12 sería una estrategia terapéutica para aplicación en los diferentes estadios del desarrollo del cáncer cervicouterino e independiente del tipo de HPV que esté infectando al tejido cervical.

Este trabajo es una buena aproximación de una estrategia terapéutica para cáncer cervicouterino evaluada en un modelo tumoral murino HPV positivo. Aquí se establece las propiedades terapéuticas de la proteína E2 de HPV 16 y la IL-12 evaluadas mediante terapia génica viral. Además se establece la capacidad de infección de los adenovirus recombinantes en el modelo tumoral murino y su capacidad de transgénesis como vehículo para el transporte y liberación de genes terapéuticos. En conclusión, se demuestra que la aplicación de adenovirus recombinantes con los genes E2 e IL-12 y la co-administración de E2 e IL-12 con un promotor específico para papiloma (E2), son buenos candidatos y promisorios como potencial tratamiento para el control de lesiones tempranas y de neoplasias cervicales de alto grado asociadas a la infección por el HPV.

Conclusiones

1. La proteína E2 de HPV 16 tiene un efecto antiproliferativo, inhibición de la expresión de los oncogenes E6 /E7 e inducción de apoptosis vía caspasa 8 sobre la línea celular BMK-16/myc de ratón transformada con HPV 16. Este efecto de E2 es muy similar a lo generado en las células SiHa HPV 16 positivas derivadas de cáncer cervicouterino.
2. Se estableció un modelo tumoral murino HPV positivo generado en ratones Balb/c inmunocompetentes por la administración de células BMK-16/myc transformadas con HPV 16. Adicionalmente, se detectó metástasis a pulmón, la cual en periodo de 55 a 60 días es letal.
3. Mediante el sistema AdEasy se generaron cuatro vectores adenovirales recombinantes (AdCMVE2HPV16, AdCMVmIL-12, AdE2mIL-12 y AdCMVGFP). Se determinó alta eficiencia en la producción de viriones y el 100% de infección de los adenovirus recombinantes en células AD293. Además, se determinó mediante Western Blot la producción de las proteínas E2 e IL-12 producidas por los adenovirus recombinantes AdCMVE2HPV 16 y AdCMVmIL-12 respectivamente.
4. Se demostró que el adenovirus recombinante AdCMVE2HPV16 fue capaz de transactivar el promotor de la interleucina IL-12 vía elementos de respuesta a la proteína E2 presente en el adenovirus AdE2mIL-12 en un sistema de co-infección *in vitro* en células BMK-16/myc con los adenovirus AdCMVE2HPV16 y AdE2mIL-12.
5. El tratamiento de ratones Balb/c con tumor establecido, infectados con el adenovirus recombinantes AdCMVE2HPV16, generó un efecto antitumoral transitorio; pero se observó un aumento en la sobrevida del 57% respecto a los ratones control.
6. El adenovirus recombinante AdCMVmIL-12 fue capaz de producir un efecto de inhibición tumoral en ratones Balb/c con tumor establecido y una sobrevida del 80% de los ratones hasta el día 100, posterior al tratamiento comparado con los ratones sin tratamiento.
7. Los ratones Balb/c con tumor establecido tratados con la co-infección de los adenovirus recombinantes AdE2mIL-12 y AdCMVE2HPV16, generaron inhibición tumoral en el 80% de los casos. Lo cual correlaciona con un aumento considerable en la sobrevida de los ratones libres de tumor en un 100% respecto a los ratones control.

Referencias

1. Palacio-Mejía LS, Lazcano-Ponce E, Allen-Leigh B, Hernández-Avila M. Regional differences in breast and cervical cancer mortality in Mexico between 1979-2006. *Salud Publica Mex.* 2009;51 Suppl 2:s208-19.
2. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002, International Agency for Research on Cancer. *CA Cancer J Clin.* 2005;55(2):74-108.
3. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. *Globocan 2000: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. Version 1.0 IARC Cancer Base No 5.* Lyon: IARC press, 2001. Edición limitada disponible. www.dep.iarc.fr/globocan7globocan.htm.
4. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(5):342-50.
5. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999;189(1):12-19.
6. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond).* 2006;110(5):525-41.
7. Yugawa T, Kiyono T. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins *Rev Med Virol.* 2009;19:97-113.
8. Collins SI, Constandinou-Williams C, Wen K, Young LS, Roberts S, Murray PG, Woodman CB. Disruption of the E2 gene is a common and early event in the natural history of cervical human papillomavirus infection: a longitudinal cohort study. *Cancer Res.* 2009;69(9):3828-32.
9. Matovina M, Sabol I, Grubisić G, Gasperov NM, Grce M. Identification of human papillomavirus type 16 integration sites in high-grade precancerous cervical lesions. *Gynecol Oncol.* 2009;113(1):120-7
10. Giannini, S.L.; Hubert, P.; Doyen, J.; Boniver, J.; Delvenne, P. Influence of the mucosal epithelium microenvironment on Langerhans cells: implications for the development of squamous intraepitheliallesions of the cervix. *Int J Cancer.* 2002, 97, 654–659.
11. Bermudez, V.H.; Peralta, O.; Madrid-Marina, V. Gene therapy with cytokines against cervical cancer. *Salud Pública Mex.* 2005, 47,458–468.
12. Alcocer-González JM, Berumen J, Taméz-Guerra R, Bermúdez-Morales V, Peralta-Zaragoza O, Hernández-Pando R, Moreno J, Gariglio P, Madrid-Marina V. In vivo expression of immunosuppressive cytokines in human papillomavirus-transformed cervical cancer cells. *Viral Immunol.* 2006;19(3):481-91.
13. Bermudez-Morales VH, Gutierrez LX, Alcocer-Gonzalez JM, Burguete A, Madrid-Marina V. Correlation between IL-10 gene expression and HPV infection in cervical cancer: a mechanism for immune response escape. *Cancer Invest.* 2008;26(10):1037-43.
14. Peralta-Zaragoza O, Bermúdez-Morales V, Gutiérrez-Xicotencatl L, Alcocer-González J, Recillas-Targa F, Madrid-Marina V. E6 and E7 oncoproteins from human papillomavirus type 16 induce activation of human transforming growth factor beta1 promoter throughout Sp1 recognition sequence. *Viral Immunol.* 2006;19(3):468-80.
15. Han R, Reed CA, Cladel NM, Christensen ND. Intramuscular injection of plasmid DNA encoding cottontail rabbit papillomavirus E1, E2, E6 and E7 induces T cell-mediated but no humoral immune responses in rabbits. *Vaccine.* 1999;17:1558-1566.

16. Shi W, Bu P, Liu J, Polack A, Fisher S and Qiao L. Human papillomavirus type E7 DNA vaccine: mutation in the open reading frame of E7 enhances specific cytotoxic T-lymphocyte induction and antitumor activity. *J Virol.* 1999;73:7877-7881.
17. De Marco F, Hallez S, Brulet JM, Gesche F, Marzano P, Flamini S, Marcante ML and Venuti A. DNA vaccines against HPV-16 E7-expressing tumours cells. *Anticancer Res.* 2003;23:1449-1454.
18. He Z, Wlazlo AP, Kowalczyk DW, Cheng J, Xiang ZQ, Giles-davis W and Ertl HC. Viral recombinant vaccines to the E6 and E7 antigens of HPV-16. *Virol.* 2000;270:146-161 1999:7039-7043.
19. Chiriva-Internati M, Lui Y, Salati E, Zhou W, Wang Z, Grizzi F, Roman JJ, Lim SH and 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 :30-38.
20. Judicial Watch Special Report: Examining The FDA's HPV Vaccine Records: Detailing the Approval Process, Side-Effects, Safety Concerns and Marketing Practices of a Large-Scale Public Health Experiment. 2008, June 30. www.judicialwatch.org/documents
21. Shi L, Sings HL, Bryan JT et al. GARDASIL®: Prophylactic human papillomavirus vaccine development from bench top to bed-side. *Clin Pharmacol Ther.* 2007;81:259-264.
22. Simon P, Dupond I. Anti-HPV vaccination: preventing cervical cancer. *Rev Med Brux.* 2006;27:S338-340.
23. Hanna E, Bachmann G. HPV vaccination with Gardasil: a breakthrough in women's health. *Expert. Opin Biol Ther.* 2006;6:1223-1227.
24. No authors: A human papillomavirus vaccine. *Med. Lett. Drugs Ther.* 2006;48:65-66.
25. Schmiedeskamp Mr, Kocker DR. Human papillomavirus vaccines. *Ann Pharmacother.* 2006;40:1344-1352.
26. Madrid-Marina V, Bermúdez-Morales VH. En relación con las vacunas contra el virus del papiloma humano. *Salud Publ Mex.* 2004;46:284-285.
27. Sadjadi A, Malekzadeh R, Derakhshan MH, Sepehr A, Nouraiie M, Sotoudeh M, Yazdanbod A, Shokoohi B, Mashayekhi A, Arshi S, Majidpour A, Babaei M, Mosavi A, Mohagheghi MA, Alimohammadian M. Cancer occurrence in Ardabil: results of a population-based cancer registry from Iran. *Int J Cancer.* 2003;107(1):113-8.
28. Ferlay J, Bray F, Pisani P. et AL. Globocan 2002: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. IARC CancerBase No. 5. Version 2.0 Lyon: IARC Press; 2004.
29. Luciani S, Andrus JK. A Pan American Health Organization strategy for cervical cancer prevention and control in Latin America and the Caribbean. *Reprod Health Matters.* 2008;16(32):59-66.
30. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Storm H. Cancer incidence in five continents, Volumen I to VIII. IARC CancerBase No. 7 ed. Lyon: 2005.
31. Sosa-Rubí SG, Walker D, Serván E. Performance of mammography and Papanicolaou among rural women in Mexico. *Salud Pública Mex.* 2009;51 Suppl 2:s236-45.
32. Franco EL, Tsu V, Herrero R, Lazcano-Ponce E, Hildesheim A, Muñoz N, Murillo R, Sánchez GI, Andrus JK. Integration of human papillomavirus vaccination and cervical cancer screening in Latin America and the Caribbean. *Vaccine.* 2008;26 Suppl 11:L88-95.

33. WHO/ICO information centre on HPV and cervical cancer. Summary report on HPV and cervical cancer statistics in México 2007. Disponible: www.who.int/hpvcentre
34. Secretaria de Salud. Estadísticas de mortalidad relacionadas con salud reproductiva. México, 2002. *Salud Publica de Mex.* 2004;46(1):75-88.
35. Flores Y, Bishai D, Lazcano E, Shah K, Lörinz A, Hernández M, Salmerón J. Improving cervical cancer screening in Mexico: results from the Morelos HPV Study. *Salud Publica Mex.* 2003;45 Suppl 3:S388-98.
36. Torres-Poveda KJ, Burguete A, Bermúdez-Morales VH, Madrid-Marina V. Human papilloma virus infection and cervical cancer: a public health perspective. *Rev Invest Clin.* 2008;60(5):414-20.
37. Lazcano-ponce EC, Nájera-Aguilar P, Alonso de Ruiz P, Buiatti, Hernandez-Avila M. Programa de detección oportuna de cáncer cervical en México. Diagnóstico situacional. *Cancerología.* 1996;42:123-140.
38. Hidalgo Martínez A. El cáncer cérvico-uterino, su impacto en México y el por que no funciona el programa nacional de detección oportuna. *Rev Biomed.* 2006;17:81-84.
39. Instituto Nacional de Salud Pública, Secretaria de Salud. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006.
40. Mujeres y Hombres de México 2008. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. INEGI, 12 Edición, 2008.
41. Franco EL, Rohan TE, Villa LL. Epidemiologic evidence and human papillomavirus infection as a necessary cause of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91(6):506-11.
42. Ho GY, Kadish AS, Burk RD, Basu J, Palan PR, Mikhail M, Romney SL. HPV 16 and cigarette smoking as risk factors for high-grade cervical intra-epithelial neoplasia. *Int J Cancer.* 1998;78(3):281-5.
43. Moscicki AB, Shiboski S, Broering J, Powell K, Clayton L, Jay N, Darragh TM, Brescia R, Kanowitz S, Miller SB, Stone J, Hanson E, Palefsky J. The natural history of human papillomavirus infection as measured by repeated DNA testing in adolescent and young women. *J Pediatr.* 1998;132(2):277-84.
44. Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, Glass AG, Cadell DM, Rush BB, Scott DR, Sherman ME, Kurman RJ, Wacholder S, et al. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* 1993;85(12):958-64.
45. Evander M, Edlund K, Gustafsson A, Jonsson M, Karlsson R, Rylander E, Wadell G. Human papillomavirus infection is transient in young women: a population-based cohort study. *J Infect Dis.* 1995;171(4):1026-30.
46. Chan PK, Luk AC, Luk TN, Lee KF, Cheung JL, Ho KM, Lo KK. Distribution of human papillomavirus types in anogenital warts of men. *J Clin Virol.* 2009;44(2):111-4.
47. Giuliano AR, Lazcano E, Villa LL, Flores R, Salmeron J, Lee JH, Papenfuss M, Abrahamsen M, Baggio ML, Silva R, Quiterio M. Circumcision and sexual behavior: factors independently associated with human papillomavirus detection among men in the HIM study. *Int J Cancer.* 2009;124(6):1251-57.
48. Programa de Acción para la Prevención y control del cáncer Cérvico Uterino 2001-2006. Secretaria de Salud, Sub-secretaría de prevención y protección de la Salud. 2002. Primera Edición.

49. Cwikel JG, Lazer T, Press F, Lazer S. Sexually transmissible infections among female sex workers: an international review with an emphasis on hard-to-access populations. *Sex Health*. 2008;5(1):9-16.
50. Muñoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS, Shah KV, Meijer CJ, Bosch FX; International Agency for Research on Cancer. Multicentric Cervical Cancer Study Group. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet*. 2002 ;359(9312):1093-101.
51. Castellsagué X, Muñoz N. Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis--role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003;(31):20-8.
52. Smith JS, Green J, Berrington de Gonzalez A, Appleby P, Peto J, Plummer M, Franceschi S, Beral V. Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review. *Lancet*. 2003;361(9364):1159-67.
53. Bosch FX, de Sanjosé S. The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Dis Markers*. 2007;23(4):213-27.
54. Clarke B, Chetty R. Postmodern cancer: the role of human immunodeficiency virus in uterine cervical cancer. *Mol Pathol*. 2002;55(1):19-24.
55. Wang SS, Bratti MC, Rodríguez AC, Herrero R, Burk RD, Porras C, González P, Sherman ME, Wacholder S, Lan ZE, Schiffman M, Chanock SJ, Hildesheim A. Common variants in immune and DNA repair genes and risk for human papillomavirus persistence and progression to cervical cancer. *J Infect Dis*. 2009;199(1):20-30.
56. Kordi Tamandani MK, Sobti RC, Shekari M, Mukesh M, Suri V. Expression and polymorphism of IFN-gamma gene in patients with cervical cancer. *Exp Oncol*. 2008;30(3):224-9.
57. Han SS, Cho EY, Lee TS, Kim JW, Park NH, Song YS, Kim JG, Lee HP, Kang SB. Interleukin-12 p40 gene (IL12B) polymorphisms and the risk of cervical cancer in Korean women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2008;140(1):71-5.
58. Guzman VB, Yambartsev A, Goncalves-Primo A, Silva ID, Carvalho CR, Ribalta JC, Goulart LR, Shulzhenko N, Gerbase-Delima M, Morgun A. New approach reveals CD28 and IFNG gene interaction in the susceptibility to cervical cancer. *Hum Mol Genet*. 2008;17(12):1838-44.
59. Sheu BC, Lin RH, Lien HC, Ho HN, Hsu SM, Huang SC. Predominant Th2/Tc2 polarity of tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical cancer. *J Immunol*. 2001;167(5):2972-8.
60. Díaz-Benítez CE, Navarro-Fuentes KR, Flores-Sosa JA, Juárez-Díaz J, Uribe-Salas FJ, Román-Basaure E, González-Mena LE, Alonso de Ruíz P, López-Estrada G, Lagunas-Martínez A, Bermúdez-Morales VH, Alcocer-González JM, Martínez-Barnetche J, Hernández-Pando R, Rosenstein Y, Moreno J, Madrid-Marina V. CD3zeta Expression and T Cell Proliferation are Inhibited by TGF-beta1 and IL-10 in Cervical Cancer Patients. *J Clin Immunol*. 2009, 29(4); 532-544.
61. Tindle RW. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(1):59-65.
62. de Koning MN, Quint WG, Pirog EC. Prevalence of mucosal and cutaneous human papillomaviruses in different histologic subtypes of vulvar carcinoma. *Mod Pathol*. 2008;21(3):334-44.

63. Stanley MA, Pett MR, Coleman N. HPV: from infection to cancer. *Biochem Soc Trans.* 2007;35(6):1456-60.
64. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004;324(1):17-27.
65. González Martín A. Molecular biology of cervical cancer. *Clin Transl Oncol.* 2007;9(6):347-54.
66. Parkin DM, Bray F. The burden of HPV-related cancers. *Vaccine.* 2006;24 Suppl 3:S3/11-25.
67. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003;348(6):518-27.
68. Schiffman M, Herrero R, Desalle R, Hildesheim A, Wacholder S, Rodriguez AC, Bratti MC, Sherman ME, Morales J, Guillen D, Alfaro M, Hutchinson M, Wright TC, Solomon D, Chen Z, Schussler J, Castle PE, Burk RD. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology.* 2005;337(1):76-84
69. Meijer CJ, Snijders PJ, Castle PE. Clinical utility of HPV genotyping. *Gynecol Oncol.* 2006;103(1):12-7.
70. Giannoudis A, Herrington CS. Human papillomavirus variants and squamous neoplasia of the cervix. *J Pathol.* 2001;193(3):295-302.
71. Stöppler MC, Ching K, Stöppler H, Clancy K, Schlegel R, Icenogle J. Natural variants of the human papillomavirus type 16 E6 protein differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation. *J Virol.* 1996;70(10):6987-93.
72. Veress G, Szarka K, Dong XP, Gergely L, Pfister H. Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol.* 1999;80:1035-43.
73. Jacobs MV, Snijders PJ, van den Brule AJ, Helmerhorst TJ, Meijer CJ, Walboomers JM. A general primer GP5+/GP6(+)-mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. *J Clin Microbiol.* 1997;35(3):791-5.
74. Quint WG, Scholte G, van Doorn LJ, Kleter B, Smits PH, Lindeman J. Comparative analysis of human papillomavirus infections in cervical scrapes and biopsy specimens by general SPF(10) PCR and HPV genotyping. *J Pathol.* 2001;194(1):51-8
75. Kleter B, van Doorn LJ, Schrauwen L, Molijn A, Sastrowijoto S, ter Schegget J, Lindeman J, ter Harnsel B, Burger M, Quint W. Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. *J Clin Microbiol.* 1999;37(8):2508-17.
76. Kiviat NB, Koutsky LA. Specific human papillomavirus types as the causal agents of most cervical intraepithelial neoplasia: implications for current views and treatment. *J Natl Cancer Inst.* 1993;85(12):934-5.
77. Spitzer M. Cervical screening adjuncts: recent advances. *Am J Obstet Gynecol.* 1998;179(2):544-56.
78. Richart RM. Cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Annu.* 1973;8:301-28.
79. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16:1-17.

80. Streeck RE. A short introduction to papillomavirus biology. *Intervirology*. 2002;45(4-6):287-9.
81. Howley, PM, Lowy DR. Papillomaviridae and their replication. In *Virology*. Lippincott/The Williams and Wilkins Co. Philadelphia. Pa, 2001
82. Schwartz S. HPV-16 RNA processing. *Front Biosci*. 2008;13:5880-91.
83. Schwarz E, Freese UK, Gissman L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A & zur Hausen H. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature*. 1985;314:111-114.
84. Yee C, Krishnan-Hewlett I, Baker CC, Schlegel R & Howley PM. Presence and expression of human papillomavirus sequence in human cervical carcinoma cell lines. *Am J Pathol*. 1985;119:361-366.
85. Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C & Crawford L. Specific interaction between HPV 16 E1/E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature*. 1991;352:824-827.
86. Sherman L & Allouf N. Human papillomavirus type 16 expresses a variety of alternatively spliced mRNA putatively encoding the E2 protein. *Virology* 1992;191:953-959.
87. Sherman L, Allouf N, Golan I, Durst M & Baram A. Expression and splicing patterns of human keratinocytes immortalized by HPV 16, and in cell lines established from cervical cancers. *Int J Cancer*. 1992;50:356-364.
88. Chong T, Chan WR, & Bernard HU. Transcriptional activation of human papillomavirus 16 by nuclear factor I, AP1, steroid receptor and a possibly novel transcription factor, PVF: a model for the composition of genital papillomavirus enhancers. *Nucleic Acids Res*. 1990;18:465-470.
89. Ensser A. & Pfister H. Epidermodysplasia verruciformis associated human papillomavirus present a subgenus-specific organization of the regulatory genome region. *Nucleic Acids Res*. 1990;18:3919-3922.
90. O'Connor, Chan S-Y & Bernard HU. Transcription factor binding sites in the long control region of genital HPVs. *Compendio de HPV*. <http://hvp-web.lanl.gov>.
91. Kennedy IM, Haddow JK, Clements JB. A negative regulatory element in the human papillomavirus type 16 genome acts at the level of late mRNA stability. *J Virol*. 1991;65(4):2093-7.
92. Cid A, Auewarakul P, Garcia-Carranca A, Ovseiovich R, Gaissert H, Gissmann L. Cell-type-specific activity of the human papillomavirus type 18 upstream regulatory region in transgenic mice and its modulation by tetradecanoyl phorbol acetate and glucocorticoids. *J Virol*. 1993;67(11):6742-52.
93. Clertant P, Seif I. A common function for polyoma virus large-T and papillomavirus E1 proteins? *Nature*. 1984;311(5983):276-9.
94. Lace MJ, Anson JR, Turek LP, Haugen TH. Functional mapping of the human papillomavirus type 16 E1 cistron. *J Virol*. 2008;82(21):10724-34.
95. Côté-Martin A, Moody C, Fradet-Turcotte A, D'Abramo CM, Lehoux M, Joubert S, Poirier GG, Coulombe B, Laimins LA, Archambault J. Human papillomavirus E1 helicase interacts with the WD repeat protein p80 to promote maintenance of the viral genome in keratinocytes. *J Virol*. 2008;82(3):1271-83.
96. Sverdrup F and Myers G. The E1 Proteins. *Compendio de HPV Falta....* <http://hvp-web.lanl.gov>.

97. Lusky M, Fontane E. Formation of the complex of bovine papillomavirus E1 and E2 proteins is modulated by E2 phosphorylation and depends upon sequences within the carboxyl terminus of E1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(14):6363-7.
98. Hegde RS. The papillomavirus E2 proteins: structure, function, and biology. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 2002;31:343-60.
99. Choe J, Vaillancourt P, Stenlund A, Botchan M. Bovine papillomavirus type 1 encodes two forms of a transcriptional repressor: structural and functional analysis of new viral cDNAs. *J Virol.* 1989;63(4):1743-55.
100. McBride A and Myers G. The E2 Proteins. *Compendio de HPV Falta....* <http://hpv-web.lanl.gov>.
101. Antson AA, Burns JE, Moroz OV, Scott DJ, Sanders CM, Bronstein IB, Dodson GG, Wilson KS, Maitland NJ. Structure of the intact transactivation domain of the human papillomavirus E2 protein. *Nature.* 2000;403(6771):805-9.
102. McBride AA, Howley PM. Bovine papillomavirus with a mutation in the E2 serine 301 phosphorylation site replicates at a high copy number. *J Virol.* 1991;65(12):6528-34.
103. Pepinsky RB, Prakash SS, Corina K, Grossel MJ, Barsoum J, Androphy EJ. Sequences flanking the core DNA-binding domain of bovine papillomavirus type 1 E2 contribute to DNA-binding function. *J Virol.* 1997;71(1):828-31.
104. McBride AA, Romanczuk H, Howley PM. The papillomavirus E2 regulatory proteins. *J Biol Chem.* 1991;266(28):18411-4.
105. Grossel MJ, Barsoum J, Prakash SS, Androphy EJ. The BPV-1 E2 DNA-contact helix cysteine is required for transcriptional activation but not replication in mammalian cells. *Virology.* 1996;217(1):301-10.
106. Li R, Knight J, Bream G, Stenlund A, Botchan M. Specific recognition nucleotides and their DNA context determine the affinity of E2 protein for 17 binding sites in the BPV-1 genome. *Genes Dev.* 1989;3(4):510-26.
107. Sanders CM, Maitland NJ. Kinetic and equilibrium binding studies of the human papillomavirus type-16 transcription regulatory protein E2 interacting with core enhancer elements. *Nucleic Acids Res.* 1994;22(23):4890-7.
108. Hawley-Nelson P, Androphy EJ, Lowy DR, Schiller JT. The specific DNA recognition sequence of the bovine papillomavirus E2 protein is an E2-dependent enhancer. *EMBO J.* 1988;7(2):525-31.
109. Jackson ME, Campo MS. Both viral E2 protein and the cellular factor PEBP2 regulate transcription via E2 consensus sites within the bovine papillomavirus type 4 long control region. *J Virol.* 1995;69(10):6038-46.
110. Steger G, Corbach S. Dose-dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type 18 by the viral E2 protein. *J Virol.* 1997;71(1):50-8.
111. Dong G, Broker TR, Chow LT. Human papillomavirus type 11 E2 proteins repress the homologous E6 promoter by interfering with the binding of host transcription factors to adjacent elements. *J Virol.* 1994;68(2):1115-27.
112. Romanczuk H, Thierry F, Howley PM. Mutational analysis of cis elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 P97 and type 18 P105 promoters. *J Virol.* 1990;64(6):2849-59.
113. Thierry F, Howley PM. Functional analysis of E2-mediated repression of the HPV18 P105 promoter. *New Biol.* 1991;3(1):90-100.

114. Dürst M, Kleinheinz A, Hotz M, Gissmann L. The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumours. *J Gen Virol.* 1985;66:1515-22.
115. Baker CC, Phelps WC, Lindgren V, Braun MJ, Gonda MA, Howley PM. Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Virol.* 1987;61(4):962-71.
116. Dürst M, Croce CM, Gissmann L, Schwarz E, Huebner K. Papillomavirus sequences integrate near cellular oncogenes in some cervical carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(4):1070-4.
117. Thierry F, Yaniv M. The BPV1-E2 trans-acting protein can be either an activator or a repressor of the HPV18 regulatory region. *EMBO J.* 1987;6(11):3391-7.
118. Dowhanick JJ, McBride AA, Howley PM. Suppression of cellular proliferation by the papillomavirus E2 protein. *J Virol.* 1995;69(12):7791-9.
119. Hwang ES, Riese DJ 2nd, Settleman J, Nilson LA, Honig J, Flynn S, DiMaio D. Inhibition of cervical carcinoma cell line proliferation by the introduction of a bovine papillomavirus regulatory gene. *J Virol.* 1993;67(7):3720-9.
120. Desaintes C, Goyat S, Garbay S, Yaniv M, Thierry F. Papillomavirus E2 induces p53-independent apoptosis in HeLa cells. *Oncogene.* 1999;18(32):4538-45.
121. Blachon S, Demeret C. The regulatory E2 proteins of human genital papillomaviruses are pro-apoptotic. *Biochimie.* 2003;85(8):813-9.
122. Desaintes C, Demeret C, Goyat S, Yaniv M, Thierry F. Expression of the papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis. *EMBO J.* 1997;16(3):504-14.
123. Goodwin EC, Yang E, Lee CJ, Lee HW, DiMaio D, Hwang ES. Rapid induction of senescence in human cervical carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(20):10978-83.
124. Wells SI, Francis DA, Karpova AY, Dowhanick JJ, Benson JD, Howley PM. Papillomavirus E2 induces senescence in HPV-positive cells via pRB- and p21(CIP)-dependent pathways. *EMBO J.* 2000;19(21):5762-71.
125. Demeret C, Garcia-Carranca A, Thierry F. Transcription-independent triggering of the extrinsic pathway of apoptosis by human papillomavirus 18 E2 protein. *Oncogene.* 2003;22(2):168-75.
126. Webster K, Parish J, Pandya M, Stern PL, Clarke AR, Gaston K. The human papillomavirus (HPV) 16 E2 protein induces apoptosis in the absence of other HPV proteins and via a p53-dependent pathway. *J Biol Chem.* 2000;275(1):87-94.
127. Green KL, Brown C, Roeder GE, Southgate TD, Gaston K. A cancer cell-specific inducer of apoptosis. *Hum Gene Ther.* 2007;18(6):547-61.
128. Parish JL, Kowalczyk A, Chen HT, Roeder GE, Sessions R, Buckle M, Gaston K. E2 proteins from high- and low-risk human papillomavirus types differ in their ability to bind p53 and induce apoptotic cell death. *J Virol.* 2006 May;80(9):4580-90.
129. Selvakumar R, Borenstein LA, Lin YL, Ahmed R, Wettstein FO. Immunization with nonstructural proteins E1 and E2 of cottontail rabbit papillomavirus stimulates regression of virus-induced papillomas. *J Virol.* 1995;69(1):602-5.
130. Selvakumar R, Ahmed R, Wettstein FO. Tumor regression is associated with a specific immune response to the E2 protein of cottontail rabbit papillomavirus. *Virology.* 1995;208(1):298-302.

131. Valdez Graham V, Sutter G, José MV, García-Carranca A, Erfle V, Moreno Mendoza N, Merchant H, Rosales R. Human tumor growth is inhibited by a vaccinia virus carrying the E2 gene of bovine papillomavirus. *Cancer*. 2000;88(7):1650-62.
132. Rosales C, Graham VV, Rosas GA, Merchant H, Rosales R. A recombinant vaccinia virus containing the papilloma E2 protein promotes tumor regression by stimulating macrophage antibody-dependent cytotoxicity. *Cancer Immunol Immunother*. 2000;49(7):347-60.
133. Ricardo Rosales, et al. A Phase II Study: Efficacy of the Gene Therapy of the MVAE2 Recombinant Virus in the Treatment of Precancerous Lesions (NIC I and NIC II) Associated with Infection of Oncogenic Human Papillomavirus. *Human Gen Ther*. 2002;13:1127-1140
134. Doorbar J, Campbell D, Grand RJ, Gallimore PH. Identification of the human papilloma virus-1a E4 gene products. *EMBO J*. 1986;5(2):355-62.
135. Roberts S, Ashmole I, Gibson LJ, Rookes SM, Barton GJ, Gallimore PH. Mutational analysis of human papillomavirus E4 proteins: identification of structural features important in the formation of cytoplasmic E4/cytokeratin networks in epithelial cells. *J Virol*. 1994;68(10):6432-45.
136. Doorbar J, Medcalf E, Napthine S. Analysis of HPV1 E4 complexes and their association with keratins in vivo. *Virology*. 1996;218(1):114-26.
137. Crum CP, Barber S, Symbula M, Snyder K, Saleh AM, Roche JK. Coexpression of the human papillomavirus type 16 E4 and L1 open reading frames in early cervical neoplasia. *Virology*. 1990 ;178(1):238-46.
138. Sterling JC, Skepper JN, Stanley MA. Immunoelectron microscopical localization of human papillomavirus type 16 L1 and E4 proteins in cervical keratinocytes cultured in vivo. *J Invest Dermatol*. 1993;100(2):154-8.
139. Bubb V, McCance DJ, Schlegel R. DNA sequence of the HPV-16 E5 ORF and the structural conservation of its encoded protein. *Virology*. 1988;163(1):243-6.
140. Regan JA, Laimins LA. Bap31 is a novel target of the human papillomavirus E5 protein. *J Virol*. 2008;82(20):10042-51.
141. Krawczyk E, Hanover JA, Schlegel R, Supryniewicz FA. Karyopherin beta3: a new cellular target for the HPV-16 E5 oncoprotein. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;371:684-8.
142. Ashrafi GH, Haghshenas M, Marchetti B, Campo MS. E5 protein of human papillomavirus 16 downregulates HLA class I and interacts with the heavy chain via its first hydrophobic domain. *Int J Cancer*. 2006;119(9):2105-12.
143. Nominé Y, Ristriani T, Laurent C, Lefèvre JF, Weiss E, Travé G. Formation of soluble inclusion bodies by hpv e6 oncoprotein fused to maltose-binding protein. *Protein Expr Purif*. 2001;23(1):22-32.
144. Desaintes C, Hallez S, Van Alphen P, Burny A. Transcriptional activation of several heterologous promoters by the E6 protein of human papillomavirus type 16. *J Virol*. 1992;66(1):325-33.
145. Mantovani F, Banks L. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene*. 2001;20(54):7874-87.
146. Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, Schiller JT. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J*. 1989;8(12):3905-10.

147. Tungteakkhun SS, Duerksen-Hughes PJ. Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein. *Arch Virol.* 2008;153(3):397-408.
148. Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM. Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Mol Cell Biol.* 1993;13(2):775-84.
149. SKeen N, Elston R, Crawford L. Interaction of the E6 protein of human papillomavirus with cellular proteins. *Oncogene.* 1994;9(5):1493-9.
150. Barbosa MS, et al. The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1a and Sv40 large T antigen contains separate domains for Rb binding and casein kinase II phosphorylation. *EMBO J* 1990; 9: 153–160.
151. Chellappan S, et al. Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proc Natl AcadSci USA* 1992; 89: 4549–4553.
152. Massimi P, Banks L. Differential phosphorylation of the HPV-16 E7 oncoprotein during the cell cycle. *Virology* 2000; 276: 388–394.
153. Patrick DR, Oliff A, Heimbrook DC. Identification of a novel retinoblastoma gene product binding site on human papillomavirus type 16 E7 protein. *J Biol Chem.* 1994; 269: 6842–6850.
154. Nguyen DX, Westbrook TF, McCance DJ. Human papillomavirus type 16 E7 maintains elevated levels of the cdc25A tyrosine phosphatase during deregulation of cell cycle arrest. *J Virol.* 2002; 76:619–632.
155. Jones DL, Thompson DA, Munger K. Destabilization of the RB tumor suppressor protein and stabilization of p53 contribute to HPV type 16 E7-induced apoptosis. *Viol.* 1997; 239: 97–107.
156. Gonzalez SL, et al. Degradation of the retinoblastoma tumor suppressor by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is important for functional inactivation and is separable from proteasomal degradation of E7. *J Virol.* 2001; 75: 7583–7591.
157. Schmitt A, et al. Comparison of the properties of the E6 and E7 genes of low- and high-risk cutaneous papillomaviruses reveals strongly transforming and high Rb-binding activity for the E7 protein of the low-risk human papillomavirus type 1. *J Virol.* 1994; 68: 7051–7059.
158. Longworth MS, Wilson R, Laimins LA. HPV31 E7 facilitates replication by activating E2F2 transcription through its interaction with HDACs. *EMBO J.* 2005; 24: 1821–1830.
159. Münger K, Phelps WC. The human papillomavirus E7 protein as a transforming and transactivating factor. *Biochim Biophys Acta.* 1993;1155(1):111-23.
160. Doorbar, J., and P. H. Gallimore. 1987. Identification of proteins encoded by the L1 and L2 open reading frames of human papillomavirus 1a. *J. Virol.* 61:2793–2799.
161. Trus, B. L., R. B. Roden, H. L. Greenstone, M. Vrhel, J. T. Schiller, and F. P. Booy. 1997. Novel structural features of bovine papillomavirus capsid revealed by a three-dimensional reconstruction to 9 Å resolution. *Nat Struct Biol.* 4:413–420.
162. René L. Finnen,¹ Kimberly D. Erickson,¹ Xiaojiang S. Chen,² and Robert L. Garcea¹ Interactions between Papillomavirus L1 and L2 Capsid Proteins. *J Virol.* 2003;77: 4818–4826

163. Griffith, J. P., D. L. Griffith, I. Rayment, W. T. Murakami, and D. L. Caspar. 1992. Inside polyomavirus at 25-A° resolution. *Nature*. 355:652–654.
164. Christopher B. Buck,¹ Naiqian Cheng,² Cynthia D. Thompson,¹ Douglas R. Lowy,¹ Alasdair C. Steven,² John T. Schiller,¹ and Benes L. Trus. Arrangement of L2 within the Papillomavirus Capsid. *J Virol*. 2008; 82:5190-5197.
165. Godfrey DI, Stankovic S, Baxter AG. Raising the NKT cell family. *Nat Immunol*. 2010;11(3):197-206.
166. Peto, J., Gilham, C., Fletcher, O. and Matthews, F. E. The cervical cancer epidemic that screening has prevented in the UK. *Lancet*. 2004;364:49–256.
167. Sadelain M, Rivière I, Brentjens R. Targeting tumours with genetically enhanced T lymphocytes. *Natl Rev Cancer*. 2003;3:35-45.
168. Pardoll DM, Topalian SL. The role of CD4+ T-cell responses in antitumor immunity. *Curr Opin Immunol*. 1998;10:588-594.
169. Toes RE, Ossendorp F, Ofringa R, Melief CJM. CD4 T cells and their antitumor immune responses. *J Exp Med*. 1999;189:753-756.
170. Paul WE. Pleiotropy and redundancy: T cell-derived lymphokines in the immune response. *Cell*. 1989;57:521-524.
171. Schiepers OJ, Wicher MC, Maes M. Cytokines and major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2005;29:201-217.
172. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest*. 2000;118:503-508.
173. Giannini SL, Al-Saleh W, Piron H, Jacobs N, Doyen J, Boniver J, et al. Cytokine expression in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix: implications for generation of local immunosuppression. *Clin Exp Immunol*. 1998;113:183-189.
174. Nash MA, Ferrandina G, Loercher A, Freedman RS. The role of cytokines in both the normal and malignant ovary. *Endocrine-Related Cancer*. 1999;6:93-107.
175. Matsuda M, Salazar F, Petersson M, Masucci G, Hansson J, Pisa P, et al. Interleukin 10 pretreated protects target cells from tumor and allospecific cytotoxic T cells and downregulates HLA class I expression. *J Exp Med*. 1994;180:2371-2376.
176. Reichert TE, Rabinowich H, Johnson JT, Whiteside TL. Immune cells in the tumor microenvironment: mechanisms responsible for significant and functional defects. *J Immunother*. 1998;21:295-306.
177. Taylor DD, Gercel-Taylor C, Lyons KS, Stanson J, Whiteside TL. T-cell apoptosis and suppression of T-cell receptor/CD3-z by Fas ligand-containing membrane vesicles shed from ovarian tumors. *Clin Cancer Res*. 2003;9:5113-5119.
178. Pisa P, Halapi E, Pisa EK, Gerdin E, Hising C, Bucht A, et al. Selective expression of interleukin 10, interferon gamma, and granulocyte macrophages colony-stimulating factor in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:7708-7712.
179. Huang M, Wang J, Lee P, Sharma S, Mao JT, Meissner H, et al. Human non-small cell lung cancer cells express a type 2 cytokine pattern. *Cancer Res*. 1995;55:3847-3853.
180. Kruger-Krasagakes S, Krasagakis K, Garbe C, Schmitt E, Huls C, Blankenstein T, et al. Expression of interleukin 10 in human melanoma. *Br J Cancer*. 1994;70:1182-1185.
181. Wu T-C, Kurman RJ. Analysis of cytokine profiles in patients with human papillomavirus-associated neoplasms. *J Natl Cancer Inst*. 1997;89:185-187.

182. De Grujil TD, Bontkes HJ, van de Muysengerg AJC, van Ostveen JW, Stukart MJ, Verheijen RHM, et al. Differences in cytokine mRNA profiles between premalignant and malignant lesion of the uterine cervix. *Eur J Cancer*. 1999;35:490-497.
183. Bor-Ching S, Rong-Hwa L, Huang-Chun L, Hong-Nerng Ho, Su-Ming H, Su-Cheng H. Predominant Th2/Tc2 polarity of tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical cancer. *J Immunol*. 2001;167:2972-2978.
184. Clerici M, Merola M, Ferrario E, Trabattoni D, Villa ML, Stefanon B, et al. Cytokines production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst*. 1997;89:245-250.
185. Sheu BC, Lin RH, Lien HC, Ho HN, Hsu SM, Huang SC. Predominant Th2/Tc2 polarity of tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical cancer. *J Immunol*. 2001;167:2972-2978.
186. Ritz U, Momburg F, Pilch H, Huber C, Maeurer MJ, Seliger B. Deficient expression of components of the MHC class I antigenprocessing machinery in human cervical carcinoma. *Int J Oncol*. 2001;19:1211-1220.
187. Ellis JR, Keating PJ, Baird J, Hounsell EF, Renouf DV, Rowe M, et al. The association of an HPV16 oncogene with HLA-B7 has implication for vaccine design in cervical cancer. *Nat Med*. 1995;1:464-470.
188. Sheu BC, Lin RH, Ho HN y Huang SC. Down-regulation of CD25 expression on the surface of activated tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical carcinoma. *Hum Immunol*. 1997;56:39-48.
189. De Grujil TD, Bontkes HJ, Preccatori F, Galle MP, Helmerhorst TJ, Verheijen RH, et al. Expression of CD3-zeta on T-cells in primary cervical carcinoma and in metastasis-positive and -negative pelvic lymph nodes. *Br J Cancer*. 1999;79:1127-1132.
190. Kono K, Rensing ME, Brandt RM, Melief CJ, Potkul RK, Andersson B, et al. Decreased expression of signal-transducing zeta chain in peripheral T cells and natural killer cells in patients with cervical cancer. *Clin Cancer Res*. 1996;2:1825-1828.
191. Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, Brown DR, Barr E, Alvarez FB, et al. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N Engl J Med*. 2002; 347: 1645-51.
192. Harro CD, Pang YY, Roden RB, Hildesheim A, Wang Z, Reynolds MJ, et al. Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine. *J Natl Cancer Inst* 2001;93(4):284-92.
193. Fife KH, Wheeler CM, Koutsky LA, Barr E, Brown DR, Schiff MA, et al. Dose-ranging studies of the safety and immunogenicity of human papillomavirus Type 11 and Type 16 virus-like particle candidate vaccines in young healthy women. *Vaccine*. 2004;22(21-22):2943-52.
194. Evans TG, Bonnez W, Rose RC, Koenig S, Demeter L, Suzich JA, et al. A Phase I study of a recombinant viruslike particle vaccine against human papillomavirus type 11 in healthy adult volunteers. *J Infect Dis*. 2001;183(10):1485-93
195. Coeshott CM, Smithson SL, Verderber E, et al. Pluronic F127-based systemic vaccine delivery systems. *Vaccine*. .2004;22(19):2396-405
196. Pinto LA, Castle PE, Roden RB, et al. HPV-16 L1 VLP vaccine elicits a broad-spectrum of cytokine responses in whole blood. *Vaccine*. 2005;23(27):3555-64.

197. Pinto LA, Edwards J, Castle PE, et al. Cellular immune responses to human papillomavirus (HPV)-16 L1 in healthy volunteers immunized with recombinant HPV-16 L1 virus-like particles. *J Infect Dis.* 2003;188(2):327–38.
198. Schreckenberger C, Kaufmann AM. Vaccination strategies for the treatment and prevention of cervical cancer. *Curr Opin Oncol.* 2004;16(5):485–91.
199. Qian J, Dong Y, Pang YY, et al. Combined prophylactic and therapeutic cancer vaccine: enhancing CTL responses to HPV16E2 using a chimeric VLP in HLA-A2 mice. *Int J Cancer.* 2006;118(12):3022–3029.
200. Harper DM, Franco EL, Wheeler C, Ferris DG, Jenkins D, Schuind A, et al. Efficacy of bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2004;364(9447):1757-65.
201. Villa LL, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, Ault KA, Giuliano AR, et al. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *Lancet Oncol.* 2005;6(5):271-8.
202. Mao C, Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, Brown DR, Wiley DJ, et al. Efficacy of human papillomavirus-16 vaccine to prevent cervical intraepithelial neoplasia: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol.* 2006;107(1):18-27.
203. Villa LL, Ault KA, Giuliano AR, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, et al. Immunologic responses following administration of a vaccine targeting human papillomavirus Types 6, 11, 16, and 18. *Vaccine.* 2006;24(27-28):5571-83.
204. Villa LL. Prophylactic HPV vaccines: reducing the burden of HPV-related diseases. *Vaccine.* 2006;24 Suppl 1:S23-8.
205. Lowy DR, Schiller JT. Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J Clin Invest.* 2006;116(5):1167-73.
206. Stanley MA. Human papillomavirus vaccines. *Rev Med Virol.* 2006;16(3):139-49.
207. HPV vaccine. Advisory Committee on Immunization Practices. Centers for Disease Control and Prevention. Disponible en: <http://www.cdc.gov/nip/vaccine/hpv/default.htm>.
208. Informe de la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos sobre Gardasil®: Disponible en: <http://www.fda.gov/cber/products/hpvmer060806.htm>
209. Nguyen HH, Broker TR, Chow LT, Alvarez RD, Vu HL, Andradi J, et al. Immune responses to human papillomavirus in genital tract of women with cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2005;96(2):452-61.
210. Informe del comité asesor de Vacunas: Vacuna frente a papilomavirus humano 2007: www.vacunasae.org/advertencias.htm.
211. Gissmann L, Osena W, Müller J M. Therapeutic Vaccines for Human Papillomaviruses. *Intervirology.* 2001;44:167–175.
212. Lin K, Doolan K, Hung CF, Wu TC. Perspectives for preventive and therapeutic HPV vaccines. *J Formos Med Assoc.* 2010;109(1):4-24.
213. Cid-Arregui A. Therapeutic vaccines against human papillomavirus and cervical cancer. *Open Virol J.* 2009; 23:3:67-83.

214. Cuburu N, Kweon MN, Hervouet C, Cha HR, Pang YY, Holmgren J, Stadler K, Schiller JT, Anjuère F, Czerkinsky C. Sublingual immunization with nonreplicating antigens induces antibody-forming cells and cytotoxic T cells in the female genital tract mucosa and protects against genital papillomavirus infection. *J Immunol.* 2009;183(12):7851-9.
215. Van Doorslaer K, Reimers LL, Studentsov YY, Einstein MH, Burk RD. Serological response to an HPV16 E7 based therapeutic vaccine in women with high-grade cervical dysplasia. *Gynecol Oncol.* 2010;116(2):208-12.
216. Yin R, Zheng W, Hao F, Yang XC, Zhong BY, Li QJ. HPV16E7 tumor antigen modified by KDEL sequence induces specific cytotoxic T lymphocytes-dependent antitumor immunity. *J Dermatol Sci.* 2009;55(2):116-22.
217. Welters MJ, Kenter GG, Piersma SJ, Vloon AP, Löwik MJ, Berends-van der Meer DM, Drijfhout JW, Valentijn AR, Wafelman AR, Oostendorp J, Fleuren GJ, Offringa R, Melief CJ, van der Burg SH. Induction of tumor-specific CD4+ and CD8+ T-cell immunity in cervical cancer patients by a human papillomavirus type 16 E6 and E7 long peptides vaccine. *Clin Cancer Res.* 2008;14(1):178-87.
218. AD, Bellone S, Palmieri M, Zanolini A, Ravaggi A, Siegel ER, Roman JJ, Pecorelli S, Cannon MJ. Santin Human papillomavirus type 16 and 18 E7-pulsed dendritic cell vaccination of stage IB or IIA cervical cancer patients: a phase I escalating-dose trial. *J Virol.* 2008;82(4):1968-7.
219. Bellone S, Pecorelli S, Cannon MJ, Santin AD. Advances in dendritic-cell-based therapeutic vaccines for cervical cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2007;7(10):1473-86.
220. Ahn WS, Bae SM, Lee KH, Lee JM, Namkoong SE, Chun HJ, Kim CK, Kim YW. Recombinant adenovirus-p53 gene transfer and cell-specific growth suppression of human cervical cancer cells in vitro and in vivo. *Gynecol Oncol.* 2004;92(2):611-21.
221. Boursnell ME, Rutherford E, Hickling JK, Rollinson EA, Munro AJ, Rolley N, et al. Construction and characterization of a recombinant vaccinia virus expressing human papillomavirus proteins for immunotherapy of cervical cancer. *Vaccine* 1996;14:1485-1494.
222. Velders MP, McElhiney S, Cassetti MC, Eiben GL, Higgins T, Kovacs GR, et al. Eradication of established tumors by vaccination with Venezuelan equine encephalitis virus replicon particles delivering human papillomavirus 16 E7 RNA. *Cancer Res.* 2001;61:7861-7867.
223. Reuter JD, Vivas-Gonzalez BE, Gomez D, Wilson JH, Brandsma JL, Greenstone HL, et al. Intranasal vaccination with a recombinant vesicular stomatitis virus expressing cottontail rabbits papillomavirus L1 protein provides complete protection against papillomavirus-induced disease. *J Virol.* 2002;76:8900-8909.
224. Huang CF, Monie A, Weng WH, Wu T. DNA vaccines for cervical cancer. *Am J Transl Res.* 2010 Jan 2;2(1):75-87.
225. Poláková I, Pokorná D, Dusková M, Smahel M. DNA vaccine against human papillomavirus type 16: modifications of the E6 oncogene. *Vaccine.* 2010;28(6):1506-13
226. Lin CT, Yen CF, Shaw SW, Yen TC, Chen YJ, Soong YK, Lai CH. Gene gun administration of therapeutic HPV DNA vaccination restores the efficacy of prolonged defrosted viral based vaccine. *Vaccine.* 2009;27(52):7352-8.
227. Ohlschläger P, Quetting M, Alvarez G, Dürst M, Gissmann L, Kaufmann AM. Enhancement of immunogenicity of a therapeutic cervical cancer DNA-based

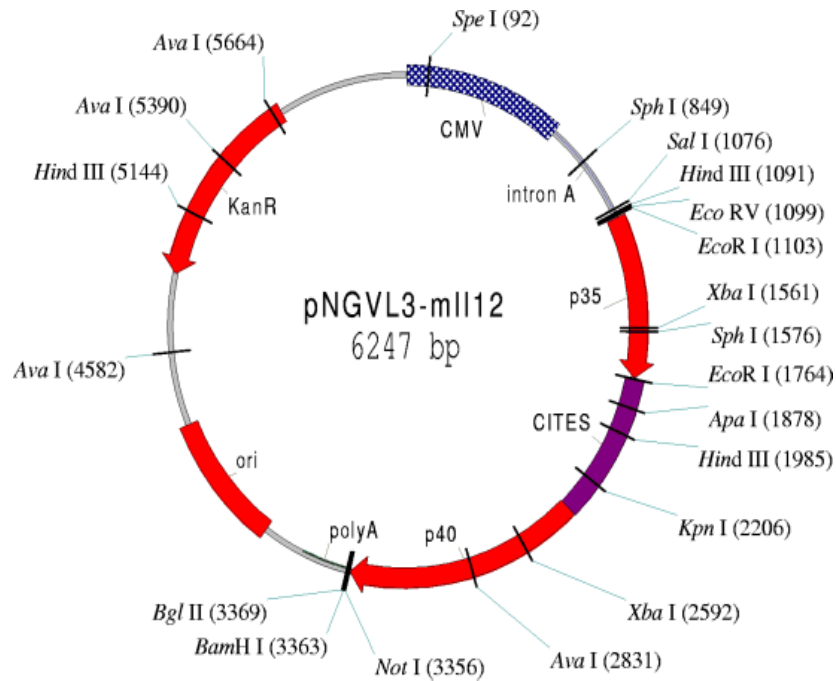
- vaccine by co-application of sequence-optimized genetic adjuvants. *Int J Cancer*. 2009;125(1):189-98.
228. Ahn WS, Bae SM, Lee KH, Lee JM, Namkoong SE, Chun HJ, Kim CK, Kim YW. Recombinant adenovirus-p53 gene transfer and cell-specific growth suppression of human cervical cancer cells in vitro and in vivo. *Gynecol Oncol*. 2004;92(2):611-21.
229. Peng S, Ji H, Trimble C, He L, Tsai YC, Yeatermeyer J, Boyd DA, Hung CF, Wu TC. Development of a DNA vaccine targeting human papillomavirus type 16 oncoprotein E6. *J Virol*. 2004;78(16):8468-76.
230. Huang CF, Monie A, Weng WH, Wu T. DNA vaccines for cervical cancer. *Am J Transl Res*. 2010;2(1):75-87.
231. Han R, Cladel NM, Reed CA, Peng X, Christensen ND. Protection of rabbits from viral challenge by gene gun-based intracutaneous vaccination with a combination of cottontail rabbit papillomavirus E1, E2, E6 and E7 genes. *J Virol*. 1999;7039-7043.
232. Kunke D, Grimm D, Denger S, Kreuzer J, Delius H, Komitowski D, Kleinschmidt JA. Preclinical study on gene therapy of cervical carcinoma using adeno-associated virus vectors. *Cancer Gene Ther*. 2000;7(5):766-77.
233. Shi W, Liu J, Huang Y, Qiao L. Papillomavirus pseudovirus: a novel vaccine to induce mucosal and systemic cytotoxic T-lymphocytes responses. *J Virol*. 2001;75:10139-10148.
234. Gunn GR, Zubair A, Peters C, Pan ZK, Wu TC, Paterson Y. Two *Listeria monocytogenes* vaccine vectors that express different molecular forms of human papillomavirus-16 (HPV-16) E7 induce qualitatively different T cell immunity that correlates with their ability to induce regression of established tumors immortalized by HPV-16. *J Immunol*. 2001;167:6471-6479.
235. Lin CW, Lee JY, Tsao YP, Shen CP, Lai HC, Chen SL. Oral vaccination with recombinant *Listeria monocytogenes* expressing human papillomavirus type 16 E7 can cause tumor growth in mice to regress. *Int J Cancer*. 2002;629-637.
236. Revaz V, Benyacooub J, Kast WM, Schiller JT, De Grandi P, Nardelli-Haeffliger D. Mucosal vaccination with a recombinant *Salmonella typhimurium* expressing human papillomavirus type 16 (HPV16) L1 virus-like particles (VLPs) or HPV16 VLPs purified from insect cells inhibits the growth of HPV16-expressing tumors cells in mice. *Virol*. 2001;279:354-360.
237. Jabbar IA, Fernando GJ, Saunders N, Aldovini A, Young R, Malcolm K, Frazer IH. Immune responses induced by BCG recombinant for human papillomavirus L1 and E7 proteins. *Vaccine*. 2000;18:2444-2453.
238. Liu DW, Tsao YP, Hsieh JT, Kung JT, Chiang CL, Huang SJ, et al. Induction of CD8 T cells by vaccination with recombinant adenovirus expressing human papillomavirus type 16 E5 gene reduces tumor growth. *J Virol*. 2000;74:9083-9089.
239. Morosov A, Phelps CW, Raychaudhuri P. Activation of the c-fos gene by the HPV16 oncoprotein depends upon the cAMP-response elements at -60. *J Biol Chem*. 1994;269:18434-18440.
240. Show-Li C, Ying-Kuang L, Long-Yuan L, Yeou-Ping T, Hsiang-Yun L, Won-Bo W, et al. E5 proteins of human papillomavirus types 11 and 16 transactivate the c-fos promoter through the NF1 binding element. *J Virol*. 1996;70:8558-8563.
241. Dey A, Atcha IA, Bagchi S. HPV 16 E6 oncoprotein stimulates the transforming growth factor- β 1 promoter in fibroblast through a specific GC-rich sequence. *Virol*. 1997;228:190-199.

242. Kaufman AM, Gissman L, Simms P, Schreckenberger C, Qioa L. Comparison of cytokines and CD80 for enhancement of immunogenicity of cervical cancer cells. *Immunobiol.* 2000;202:339-352.
243. Idrova M, Mikyskova R, Jandlova T, Vonka V, Bubenik J, Bieblova J. Adjuvant cytokine treatment of minimal residual disease after surgical therapy in mice carrying HPV16-associated tumours: cytolytic activity of spleen cells from tumour regressors. *Folia Biol.* 2003;49:217-222.
244. Song K, Chang Y, Prud'homme GJ. IL-12 plasmid-enhanced DNA vaccination against carcinoembryonic antigen (CEA) studied in immune gene knockout mice. *Gene Ther.* 2000;7:1527-1535.
245. Thomas GR, Chien Z, Enamorado I, Bancroft C Van, Waes C. IL-12 and IL-2- induced tumor regression in a new murine model of oral squamous-cell carcinoma is promoted by expression of the CD80 co- stimulatory molecule and interferon-g. *Int J Cancer.* 2000;86:368-374.
246. Hull GW, Mccurdy MA, Nasu Y, Bangma, Yang G, Shimura S, et al. Prostate cancer gene therapy: comparison of adenovirus-mediated expression of interleukin 12 with interleukin 12 plus B7-1 for in situ gene therapy and gene-modified cell-based vaccines. *Clin Cancer Res.* 2000;6:4101-4109.
247. Lui VW, He Y, Falo L, Huang L. Systemic administration of naked DNA encoding interleukin 12 for the treatment of human papillomavirus DNA-positive tumor. *Hum Gene Ther.* 2002;13:177-185.
248. He YK, Lui VW, Baar J, Wang L, Shurin M, Almonte C, et al. Potentiation of E7 antisense RNA-induced antitumor immunity by co- delivery of IL-12 gene in HPV16 DNA-positive mouse tumor. *Gene Ther.* 1998;5:1462-1471.
249. Ahn WS, Bae SM, Kim TY, Kim TG, Lee JM, Namkoong SE, et al. A therapy modality using recombinant IL-12 adenovirus plus E7 protein in a human papillomavirus 16 E6/E7-associated cervical cancer animal model. *Hum Gene Ther.* 2003;14:1389-1399.
250. Hallez S, Detremmerie O, Giannouli C, Thielemans K, Gajewski TF, Burny A et al. Interleukin-12-secreting human papillomavirus type 16- transformed cells provide potent cancer vaccine that generates E7- directed immunity. *Int J Cancer.* 1999;81:428-437.
251. Indrova M, Bubenik J, Mikyskova R, Mendoza L, Simova J, Bieblova J, et al. Chemoimmunotherapy in mice carrying HPV16-associated, MHC class I+ and class I- tumours : Effects of CBM-4A potentiated with IL-2, IL-12, GM-CSF and genetically modified tumour vaccines. *Int J Oncol.* 2003;22:691-695.
252. Mikyskova R, Indrova M, Simova J, Jandlova T, Bieblova J, Jinoch P, et al. Treatment of minimal residual disease after surgery or chemotherapy in mice carrying HPV16-associated tumours: Cytokine and gene therapy with IL-2 and GM-CSF. *Int J Oncol.* 2004;24:161-167.
253. Indrova M, Mikyskova R, Jandlova T, Vonka V, Bubenik J, Bieblova J. Adjuvant cytokine treatment of minimal residual disease after surgical therapy in mice carrying HPV16-associated tumours: cytolytic activity of spleen cells from tumour regressors. *Folia Biol.* 2003;49:217-222.
254. Leachman SA, Tigelaar RE, Schlyankevich M, Slade MD, Irwin M, Chang E, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor priming plus papillomavirus E6 DNA vaccination: effects on papilloma formation and regression in the cottontail rabbit papillomavirus-rabbit model. *J Virol.* 2000;74:8700-8708.

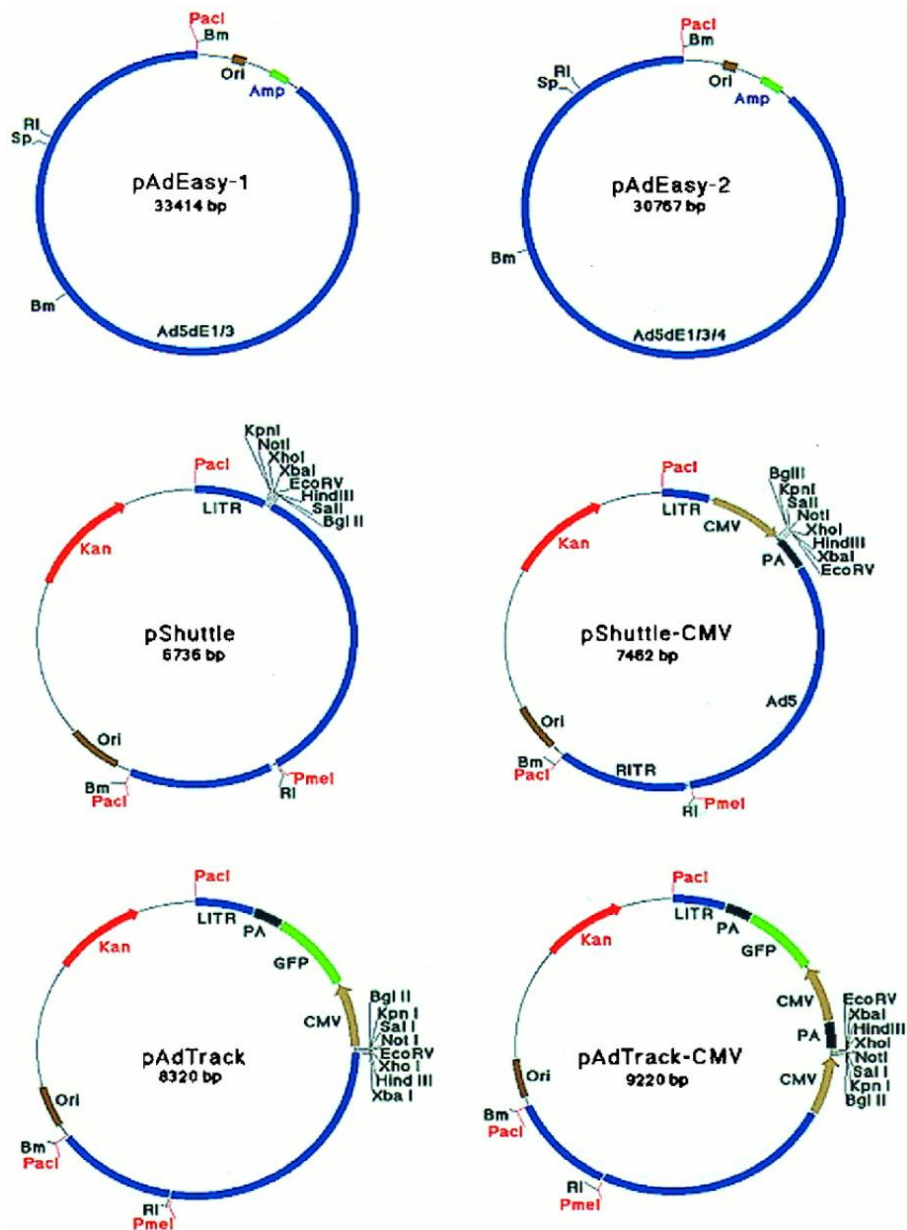
255. Tan J, Yang NS, Turner JG, Niu GL, Maassab HF, Sun J, et al. Interleukin-12 cDNA skin transfection potentiates human papillomavirus E6 DNA vaccine-induced antitumor immune response. *Cancer Gene Ther.* 1999;6:331-339.
256. Jinoch P, Zak R, Janouskova O, Kunke D, Rittich S, Duskova M, et al. Immunization with live HPV-16-transformed mouse cells expressing the herpes simplex thymidine kinase and either GM-CSF or IL-2. *Int J Oncol.* 2003;23:775-783.
257. Janouskova O, Sima P, Kunke D. Combined suicide gene and immunostimulatory gene therapy using AAV-mediated gene transfer to HPV-16 transformed mouse cell: decrease oncogenicity and induction of protection. *Int J Oncol.* 2003;22:569-577.
258. Veress G, Szarka K, Dong X-P, Gergely L & Pfister H. Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16.
259. Chomczynski PA. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques.* 1993;15:532-534.
260. He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(5):2509-14.
261. Bermúdez-Morales VH, Peralta-Zaragoza O, Guzmán-Olea E, García-Carrancá A, Bahena-Román M, Alcocer-González JM, Madrid-Marina V. HPV 16 E2 protein induces apoptosis in human and murine HPV 16 transformed epithelial cells and has antitumoral effects in vivo. *Tumour Biol.* 2009;30(2):61-72.
262. Hamza T, Barnett JB, Li B. Interleukin 12 a key immunoregulatory cytokine in infection applications. *Int J Mol Sci.* 2010;11(3):789-806.
263. Watford WT, Moriguchi M, Morinobu A, O'Shea JJ. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003;14(5):361-368.
264. Chiu TL, Lin SZ, Hsieh WH, Peng CW. AAV2-mediated interleukin-12 in the treatment of malignant brain tumors through activation of NK cells. *Int J Oncol.* 2009 ;35(6):1361-1367.
265. Xu M, Mizoguchi I, Morishima N, Chiba Y, Mizuguchi J, Yoshimoto T. Regulation of antitumor immune responses by the IL-12 family cytokines, IL-12, IL-23, and IL-27. *Clin Dev Immunol.* 2010;20:1-9.
266. Zwirner NW, Domaica CI. Cytokine regulation of natural killer cell effector functions. *Biofactors.* 2010;36(4):274-288.
267. Zhao X, Bose A, Komita H, Taylor JL, Kawabe M, Chi N, Spokas L, Lowe DB, Goldbach C, Alber S, Watkins SC, Butterfield LH, Kalinski P, Kirkwood JM, Storkus WJ. Intratumoral IL-12 Gene Therapy Results in the Crosspriming of Tc1 Cells Reactive Against Tumor-associated Stromal Antigens. *Mol Ther.* 2010;7: 826-838.
268. Propper DJ, Chao D, Braybrooke JP, Bahl P, Thavasu P, Balkwill F, Turley H, Dobbs N, Gatter K, Talbot DC, Harris AL, Ganesan TS. Low-dose IFN-gamma induces tumor MHC expression in metastatic malignant melanoma. *Clin Cancer Res.* 2003;9:84-92.
269. Narvaiza I, Mazzolini G, Barajas M, Duarte M, Zaratiegui M, Qian C, Melero I, Prieto J. Intratumoral coinjection of two adenoviruses, one encoding the chemokine IFN-gamma-inducible protein-10 and another encoding IL-12, results in marked antitumoral synergy. *J Immunol.* 2000;164(6):3112-3122.

270. Nishimura T, Kuge S, Watanabe K, Lee U, Yahata T, Habu S. An efficient method for the induction of human antitumor effector CD4⁺ and CD8⁺ T cells: their application to tumor immunotherapy. *Hum Cell*. 1994;7(3):131-137.
271. Mingli Xu,¹ Izuru Mizoguchi,^{1, 2} Noriko Morishima,^{1, 2} Yukino Chiba,¹ Junichiro Mizuguchi,^{1, 2} and Takayuki Yoshimoto^{1*} Regulation of Antitumor Immune Responses by the IL-12 Family Cytokines, IL-12, IL-23, and IL-27. *Clin Dev Immunol*. 2010; 34:832454.
272. Alves A, Vibert E, Trajcevski S, Solly S, Fabre M, Soubrane O, et al. Adjuvant interleukin-12 gene therapy for the management of colorectal liver metastases. *Cancer Gene Ther* 2004;11: 782-789.
273. Jia SF, Duan X, Worth LL, Guan H, Kleinerman ES. Intratumor murine interleukin-12 gene therapy suppressed the growth of local and distant Ewing's sarcoma. *Cancer Gene Ther*. 2006;13:948-957.
274. Peng SL, Robert ME, Hayday AC, Craft J. A tumor-suppressor function for Fas (CD95) revealed in T cell-deficient mice. *J Exp Med*. 1996;184:1149-1154.
275. Zhao X, Bose A, Komita H, Taylor JL, Kawabe M, Chi N, Spokas L, Lowe DB, Goldbach C, Alber S, Watkins SC, Butterfield LH, Kalinski P, Kirkwood JM, Storkus WJ. Intratumoral IL-12 Gene Therapy Results in the Crosspriming of Tc1 Cells Reactive Against Tumor-associated Stromal Antigens. *Mol Ther*. 2010.

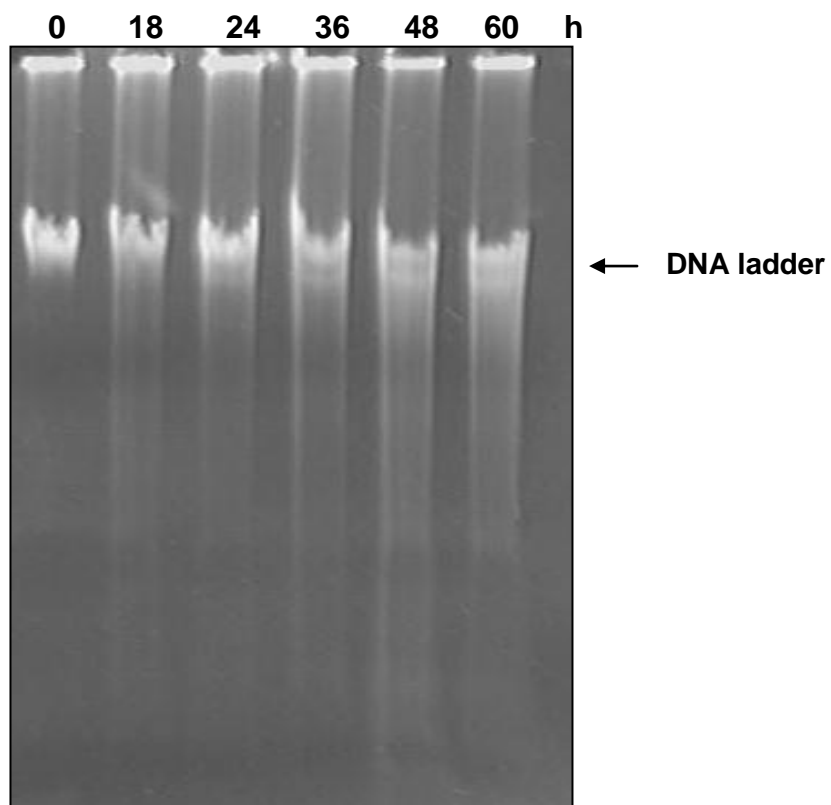
Anexos



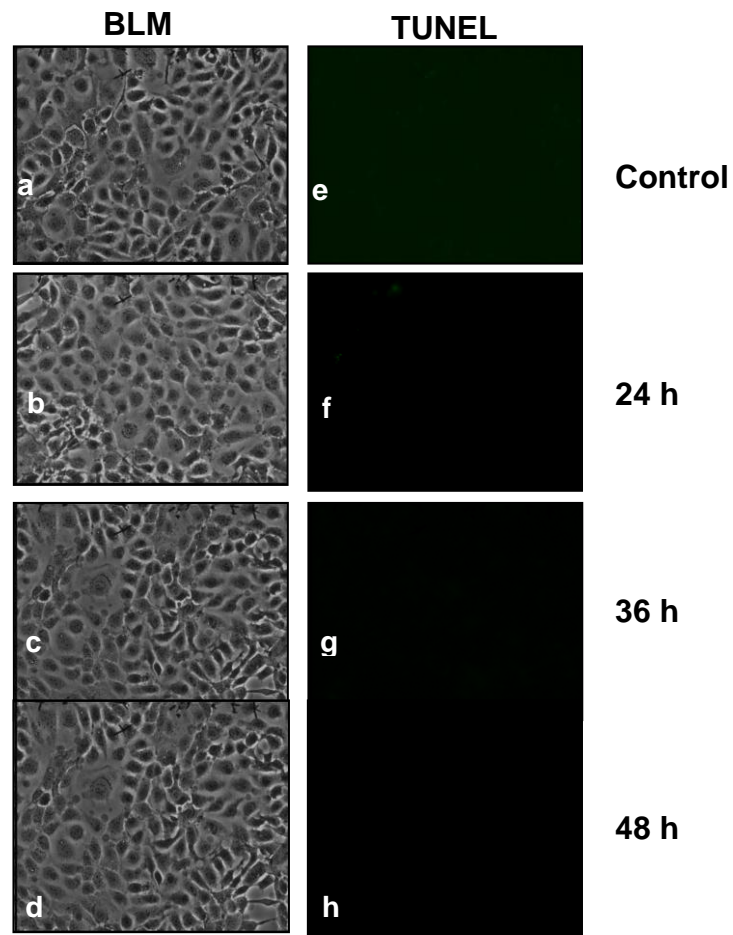
Anexo 1: Mapa del plásmido pNGVL3-mIL-12. El plásmido contiene los dos genes que codifican para las subunidades p35 y p40 correspondientes a la proteína IL-12. Los genes están unidos por un sitio de internalización a ribosoma (CITES) y están regulados transcripcionalmente por el promotor de citomagalivirus. El plásmido contiene el gen que le confiere resistencia a kanamicina.



Anexo 2: Juego de plásmidos utilizados para generar vectores adenovirales recombinantes. Los plásmidos pAdEasy-1 y pAdEasy-2 recombinan con los plásmidos pShuttle, pShuttle-CMV, pAdTrack y pAdTrack-CMV. Los plásmidos pShuttle y pShuttle-CMV no contienen el gen que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) en comparación con los plásmidos pAdTrack y pAdTrack-CMV.



Anexo 3: Ensayo de fragmentación de DNA producto de un proceso de apoptosis en células BMK-16/myc transfectadas con el plásmido pCMVp16-E2. Se observa una clara fragmentación del DNA gradual al tiempo de transfección con un plásmido que expresa la proteína E2 de HPV 16.



Anexo 4: Inhibición de fragmentación de DNA en células BMK-16/myc transfectadas con el plásmido pCMVp16-E2 y tratadas con un inhibidor específico para la pro-caspasa 8. BLM: Microscopia de luz blanca (a-d), TUNEL: Visualización de las células BMK-16/myc en un microscopio de fluorescencia (e-h).

Publicaciones