

Cirugía y Cirujanos

Volumen 73
Volume

Número 1
Number

Enero-Febrero 2005
January-February

Artículo:

Vacunas preventivas y ensayos clínicos
de inmunoterapia contra cáncer
cervicouterino

Derechos reservados, Copyright © 2005:
Academia Mexicana de Cirugía

Otras secciones de
este sitio:

- ☞ Índice de este número
- ☞ Más revistas
- ☞ Búsqueda

*Others sections in
this web site:*

- ☞ *Contents of this number*
- ☞ *More journals*
- ☞ *Search*



medigraphic.com

Vacunas preventivas y ensayos clínicos de inmunoterapia contra cáncer cervicouterino

Dr. Víctor Manuel Valdespino-Gómez

Resumen

El cáncer cervicouterino (CaCu) invasor se mantiene como un gran problema de salud pública en las mujeres de todo el mundo. Para mejorar el control de la enfermedad se requieren nuevas estrategias terapéuticas adyuvantes. Los avances en inmunología, genómica y proteómica han permitido entender las bases celulares y moleculares de muchos cánceres. El CaCu es uno de los modelos tumorales biológicos cuya iniciación y promoción se relacionan con la infección persistente por virus del papiloma humano (VPH) oncogénicos. Durante la infección viral y el desarrollo de lesiones preinvasoras o invasoras asociadas, los VPH coexpresan proteínas estructurales y no estructurales. Estas proteínas "tempranas" o "tardías" son el blanco antígenico de la respuesta inmune. Los ensayos para estimular la respuesta inmune humoral o celular anti-VPH son el objetivo de la inmunoprevención y de la inmunoterapia contra el CaCu. Recientemente en un ensayo clínico controlado tipo III de vacunación profiláctica contra la infección cervical por VPH 16, en el que se emplearon partículas semejantes a virus de la proteína de la cápside L1, se demostró protección contra la infección específica y contra las lesiones precancerosas asociadas. Aunque los resultados preliminares de los ensayos clínicos de inmunoterapia contra CaCu no han provocado efecto clínico, ocasionalmente han demostrado incremento en la respuesta de los linfocitos contra los VPH. En un ensayo reciente con células dendríticas pulsadas con la oncoproteína E7 de VPH 18 como adyuvante, hubo remisión temporal de la enfermedad y mejoramiento de la calidad de vida en una paciente con CaCu metastásico. Nuevos y diferentes ensayos clínicos de vacunación profiláctica contra la infección por VPH están siendo aplicados, lo cual es esperanzador. El éxito en los ensayos clínicos de inmunoterapia anti-VPH en pacientes con CaCu está menos cercano. En el presente artículo se revisan las bases científicas del desarrollo de las vacunas profilácticas y terapéuticas contra la infección persistente por VPH y contra las lesiones cervicales preinvasoras e invasoras asociadas, así como los principales resultados de los ensayos clínicos de vacunación profiláctica y de inmunomodulación terapéutica en CaCu.

Palabras clave: virus del papiloma humano, cáncer cervicouterino, respuesta inmune, vacunación profiláctica, vacunación terapéutica.

Summary

Cervical cancer (CC) is a public health problem among women worldwide, especially in emerging nations. To improve CC control, new adjuvant therapeutic strategies are required. Advances in immunology, genomics and proteomics have accelerated our understanding of the genetic and cellular basis of many cancer types. CC is a member of virus-related neoplasms and its initiation and promotion is associated with persistent infection of oncogenic human papillomavirus. During viral infection and associated-transforming developing lesions, the HPVs co-express non-structural and structural proteins. These early or late proteins are the antigenic target of the immune response. The intervention to stimulate the humoral or cellular immune anti-HPV response is the objective of the immunoprevention and immunotherapy against CC. Recently, in a controlled phase III trial of HPV type 16 vaccine using virus-like particles of L1 capsid of HPV-16, the incidence was reduced of both HPV-16 infection and HPV-16-related cervical intraepithelial neoplasia. Although preliminary results of immunotherapy clinical trials against CC did not modify the clinical status, they occasionally show improvement of lymphocyte response against HPV. A recent immunotherapy trial using dendritic cells pulsed with HPV-18 E7 oncoprotein as adjuvant resulted in temporal remission and improved performance status in a patient with metastatic CC. New and different vaccine preventive trials against HPV are being put into practice and clinically tested. It is hoped that in the future it may be possible to eradicate cervical cancer. The success of immunotherapy anti-HPV clinical trials in CC patients will be determined at a future time. The scientific basis for the development of papillomavirus prophylactic and therapeutic vaccines against persistent infection and preinvasive-invasive associated cervical lesions along with the present status of immunopreventive and immunotherapy clinical trials against cervical cancer are commented on in this paper.

Key words: human papillomavirus, cervical cancer, immune response, vaccines, immunotherapy.

* División de Cirugía, Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. División de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM, Unidad Xochimilco.

Solicitud de sobretiros: Dr. Víctor M. Valdespino-Gómez, Ángel Urraza 517, Col. Del Valle, 03100 México D. F. Tel. y fax. 5559 7768. E-mail: valdespinov@yahoo.com

Recibido para publicación: 03-05-2004. Aceptado para publicación: 21-07-2004.

El cáncer cervicouterino (CaCu) invasor se mantiene como un gran problema de salud pública en las mujeres en todo el mundo. Cerca de 500 mil nuevos casos se registran anualmente y provocan la muerte a 250 mil mujeres; 80% ocurre en países en desarrollo. Debido a que las pacientes con CaCu avanzado presentan índices de curación bajo, e incluso en etapas tempranas alcanzan 80% después del tratamiento óptimo, se requieren nuevas estrategias terapéuticas adyuvantes para mejorar el control de la enfermedad.¹

Los avances en inmunología, genómica y proteómica han permitido entender las bases celulares y moleculares de muchas enfermedades.² Comprender la carcinogénesis y la progresión tumoral a partir de la relación causal entre el virus de papiloma humano (VPH) y el CaCu, ha permitido iniciar nuevos paradigmas clínicos dirigidos a su prevención primaria y secundaria.^{3,4}

Frecuentemente en la infección genital por virus del papiloma humano (VPH) la paciente se mantiene asintomática por muchos años. La prevalencia de la infección genital por VPH en mujeres y hombres con actividad sexual es de 20 a 40%. La infección persistente por los VPH oncogénicos se asocia con la etapa de iniciación tumoral, y los diferentes cofactores moleculares locales (relacionados con los factores de riesgo clínicos para CaCu) participan en la etapa de *promoción* tumoral. Ambas condiciones, aunadas a una deficiente respuesta inmune local, conllevan a la carcinogénesis cervical y a la progresión tumoral.^{4,5}

En la mayoría de los individuos la infección por VPH es controlada por el sistema inmune del huésped. Cuando persiste la infección, la respuesta inmune ha sido ineficiente en combatir la infección y en los siguientes años se presenta la transformación tumoral asociada, desarrollándose las lesiones precancerosas y cancerosas. Las poblaciones con alta incidencia de CaCu mantienen prevalencia elevada de infección por VPH oncogénicos. Los genes y las oncoproteínas de estos virus oncogénicos se detectan en 99% de los casos de CaCu; demostrándose particularmente la coexpresión de las proteínas E6 y E7, las cuales mantienen el fenotipo tumoral. La coexpresión constitutiva de estas oncoproteínas virales en las lesiones preinvasoras e invasoras las colocan como el blanco antigénico para la respuesta inmune del hospedero.^{6,7}

El sistema inmune está involucrado en el balance que necesitamos para mantener la tolerancia a los antígenos propios y la necesidad de responder a los antígenos extraños. En el modelo inmune del CaCu y lesiones preinvasoras, las proteínas E6 y E7 se reconocen como sus antígenos tumorales asociados (ATA). Se han identificado diferentes estrategias que los VPH emplean para minimizar la respuesta inmune, las cuales sumadas a algunas deficiencias propias del hospedero provocan respuesta inmune antiviral tolerante o no efectiva para erradicar al virus.^{6,8} Novedosas estrategias inmunoinvasivas, consistentes en modular positivamente ciertos pasos

de la generación de la respuesta adaptativa, intentan romper la tolerancia inmune antiviral. Las vacunas profilácticas antivirales tienen el objetivo de prevenir el desarrollo del CaCu, instruyendo electivamente la respuesta inmune humoral del hospedero mediante la administración de subunidades virales;⁹ las vacunas terapéuticas evitarían la recurrencia tumoral en condiciones de enfermedad residual mínima o se emplearían con la finalidad de regresión de las lesiones invasoras avanzadas, por medio de la modulación positiva de la respuesta de linfocitos T CD8⁺ antivirales.¹⁰

En los países desarrollados, los programas de cobertura masiva para detectar y tratar clínicamente lesiones preinvasoras cervicales en las mujeres han reducido las tasas de morbilidad y mortalidad del CaCu en 30 a 80%. Resultados similares podrían obtenerse en las mujeres de los países en desarrollo si se aplicara masivamente esta estrategia. Si la vacunación profiláctica contra la infección de los VPH de alto riesgo fuera exitosa podrían alcanzarse cifras más altas. En los últimos años hemos presenciado progresos sustanciales en el entendimiento del origen y la patogénesis del CaCu; la próxima meta es la prevención y la erradicación de la mayoría de casos de cáncer del cervix en el mundo.¹¹

El objetivo del presente artículo es comentar brevemente los fundamentos científicos de las vacunas profilácticas y terapéuticas contra el CaCu, y los principales resultados obtenidos en los estudios clínicos fases II y III de vacunación en humanos.

Biología de la infección persistente y transformación tumoral por los VPH oncogénicos

Cacu, modelo viral de neoplasia relacionado con infección persistente por VPH oncogénicos

La causa subyacente primaria del CaCu es la infección persistente epitelial de los VPH oncogénicos por muchos años. Los principales pasos para que se desarrolle el cáncer cervical incluyen la infección por VPH, la persistencia de la infección, la progresión a precáncer, la carcinogénesis, la transformación tumoral y la invasión local, regional y a distancia.^{4,12} Los VPH son virus no encapsulados de doble cadena de DNA con tamaño de 8000 nucleótidos y contienen ocho genes o marcos de lectura abiertos denominados E1, E2, E4, E5, E6, E7 (genes tempranos E, no estructurales) y L1 y L2 (genes tardíos L estructurales). Por la homología de su DNA se han identificado más de 100 tipos; cada uno puede presentar subtipos y variantes, cuya variación genómica es de 5 a 10 % y de 0.1 a 5%, respectivamente. Ensayos *in vivo* e *in vitro* han demostrado que los genes E6 y E7 de los VPH de alto riesgo (16, 18 y otros poco frecuentes como 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52,

54, 56, 58, 59, 66, 68 y 69) son capaces de inmortalizar y transformar las células epiteliales.

En la infección cervical por los VPH, tres condiciones biológicas pueden influir para provocar infección persistente y carcinogénesis:

- Tipo de variante viral.
- Influencia de su carga viral.
- Grado de integración viral al DNA de las células.

La participación precisa de cada una de estas condiciones es sólo parcialmente conocida y actualmente es motivo de análisis.¹³⁻¹⁵

Los viriones infectan las células basales del epitelio estratificado de la mucosa cervical, presentando replicación de tipo no-citolítica. Tanto en esta capa de células como en las arabasales, los VPH expresan las proteínas tempranas E1, E2, E5, E6 y E7 confinadas al núcleo y en escasa cantidad (esto potencialmente limita la respuesta inmune efectiva, en comparación con otras condiciones en las cuales el virus se replica activamente). Estas últimas proteínas promueven la proliferación, retardan la diferenciación celular y producen el engrosamiento atípico del epitelio. Las células infectadas siguen expandiéndose verticalmente, diferenciándose terminalmente a células escamosas en donde las proteínas E4, L1 y L2 son expresadas en abundante cantidad (sitio anatómicamente superficial donde las células inmunocompetentes tienen acceso limitado). Es en este estrato celular donde el DNA de los VPH oncogénicos se integra en el genoma de la célula huésped y las oncoproteínas E6 y E7 predisponen que las células infectadas se transformen en displásicas y se desarrollen las lesiones preinvasoras cervicales.

Tres principales procesos participan en la patogénesis del CaCu, dos de ellos directamente relacionados con los VPH de alto riesgo:

1. Efecto de las oncoproteínas virales E6 y E7 sobre los genes supresores tumorales p53 y Rb.
2. Efecto de la integración del DNA viral en las regiones cromosómicas asociadas a la regulación de diferentes protooncogenes y genes supresores tumorales.
3. Participación de los cofactores moleculares relacionados con los factores clínicos de riesgo.

La suma de los tres procesos anteriores propician mayor inestabilidad genómica y conducen a la inmortalización y transformación celular.¹⁵ El desarrollo del CaCu requiere la aparición secuencial de múltiples y progresivas alteraciones genómicas.

A principio de los ochenta, los distintos VPH oncogénicos fueron aislados de biopsias de CaCu por diversos estudios moleculares, demostrándose que la expresión de los oncogenes virales E6 y E7 se relacionaba con la etiología del CaCu. En los años noventa, diferentes estudios epidemiológicos de casos

y controles indicaron que la infección persistente por VPH oncogénicos es el factor de riesgo más significativo o necesario, pero no suficiente para desarrollar CaCu (en el huésped se requieren diferentes condiciones que influyen en el riesgo de progresión).^{1,12}

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

Los VPH oncogénicos se integran predominantemente en localizaciones cromosómicas semiespecíficas o sitios frágiles como 8q24 y 12q15, lo cual provoca la activación “cis” de diferentes protooncogenes. Poco tiempo después se detectan anomalías cromosómicas como pérdida de la heterocigocidad (PH), por delección de uno o de los dos alelos en las regiones relacionadas con genes reparadores del DNA o genes supresores tumorales, localizados en 3p14-22, 4p16, 5p15, 6p21-22, 11q23, 17p13.3, 18q12-22, y 19q13,¹⁵ acumulándose más mutaciones, algunas de las cuales son significativas para desarrollar el fenotipo tumoral.

Finalmente, los queratinocitos transformados mantienen un fenotipo por el cual esquivan las señales locales celulares que suprimen su crecimiento, adquieren su propia señalización de crecimiento independiente de señales externas, evaden la apoptosis, desarrollan un ilimitado potencial de proliferación, generan su propia red de vasos sanguíneos para obtener los nutrientes y el oxígeno que necesitan (angiogénesis) y desarrollan mecanismos que permiten que las células tumorales se separen del tumor principal, penetren al torrente sanguíneo y linfático y alcancen tejidos distantes donde crecen como tumores secundarios o metástasis.¹⁶ Concomitantemente a la

transformación tumoral del queratinocito, otras múltiples alteraciones genéticas participan e inciden en los mecanismos naturales involucrados en el procesamiento y presentación de los antígenos por la célula.

La lesión precursora directa del CaCu es la displasia severa o la lesión intraepitelial escamosa (LIE, diagnósticos basados en estudio citológico) de alto grado, o neoplasia intraepitelial cervical (NIC, diagnóstico basado generalmente en estudio histológico) tipo 3. La mayoría de las displasias leves/moderadas, LIE de bajo grado o NIC 1-2 evolucionan generalmente a la regresión, no progresan y la infección viral es eliminada por la respuesta inmune. Al no ser tratadas, la mayoría de las LIE de alto grado o NIC-3 (lesiones preinvasoras) progresan a lesiones invasoras en un periodo de pocos años.

Para entender la historia natural de la infección por el VPH y la biología del CaCu es imperativo conocer, además, las condiciones fisiopatológicas locales asociadas. Los diferentes factores de riesgo clínicos conocidos en las pacientes para desarrollar CaCu se traducen como microtraumatismos celulares o procesos inflamatorios irritativos crónicos que en la carcinogénesis participan como cofactores moleculares de promoción tumoral, simultáneamente o un poco después que la infección por los VPH oncovirales ha provocado la *iniciación tumoral*.⁵ Las diferentes redes de señalamientos en el desarrollo de la inmortalización y carcinogénesis donde participan estos cofactores moleculares, se conocen muy parcialmente (p. ej., modificando el balance oxidativo-antioxidativo celular que influye en la regulación transcripcional de múltiples genes).^{17,18}

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

Respuesta inmune del huésped contra las infecciones por VPH

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

Aproximadamente 40% de los adultos activos sexualmente son infectados por VPH.¹⁹ La respuesta inmune innata y adaptativa contra el VPH es capaz de eliminar más de 90% de las infecciones y protege consecuentemente del desarrollo de tumores relacionados con los VPH oncovirales.^{9,20} Sin embargo, en la infección viral del queratinocito se presentan diferentes condiciones fisiopatológicas que limitan teóricamente la respuesta inmune efectora local. La erradicación de la infección por VPH en sujetos sanos requiere desarrollar una activación efectiva tanto de la respuesta inmune innata

como de la adaptativa. Así, en los pacientes que cursan con inmunosupresión (p. ej., transplantados que toman medicamentos inmunosupresores) o inmunodeficientes (infectados por HIV), el riesgo de infección persistente y de transformación a malignidad se incrementa en forma importante.^{20,21}

La primera línea de defensa en las mucosas contra la infección viral es la respuesta inmune innata (RII); en esta participan citocinas, células centinelas locales, el sistema del complemento y linfocitos citolíticos poco específicos llamados asesinos naturales (NK). Poco después, la RII interactúa con la respuesta inmune adaptativa (RIA) e inicia la respuesta celular específica con linfocitos B y T. Un gran eslabón para ambos tipos de respuestas es la participación de las células presentadoras profesionales de antígenos (CPPA, especialmente las células dendríticas) y el tipo de citocinas liberadas. Los linfocitos B de la paciente producen anticuerpos (que se unen a los viriones en la sangre y en las mucosas, disminuyendo el número de células que podrían ser infectadas) particularmente contra proteínas de la cápside L1 del VPH,^{9,22} los cuales desempeñan un papel importante en la prevención de la infección pero tienen efecto limitado contra la infección establecida y la regresión de las infecciones por VPH.

A diferencia de los linfocitos B, la respuesta de los linfocitos T es el mecanismo efector antiviral más importante tanto en la eliminación de las células infectadas como de las células transformadas (reconocen y matan a las células que presentan antígenos virales y secretan citocinas antivirales).^{6,23} Los linfocitos T exploran continuamente la superficie de todas las células y destruyen aquellas con marcadores antigenicos extraños. Los linfocitos T desarrollan por lo menos dos fases para responder contra los VPH: la fase de reconocimiento, en la cual identifican los antígenos virales y la fase efectora, en la cual los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ se expanden clonalmente (estos últimos matan a las células infectadas por virus) y regulan su respuesta.⁷

Las células de los vertebrados han elaborado el mecanismo de degradar y mostrar las proteínas propias y extrañas en su superficie. Localmente las células dendríticas (DC) muestran y presentan muy eficientemente las proteínas de las células cercanas; una vez dentro de las DC estas proteínas son procesadas en fragmentos peptídicos. En presencia de señales inflamatorias de “peligro” provocadas por necrosis tumoral, trauma celular, coinfección u otras señales de citocinas proinflamatorias, las DC expresan en su superficie moléculas coestimuladoras pertenecientes a B7, y viajan del cervix a los ganglios linfáticos regionales donde los péptidos tumorales son procesados y presentados en la superficie celular unidos a las moléculas clase I o clase II del MHC para interactuar con los receptores específicos de los linfocitos T CD8⁺ o CD4⁺, respectivamente. Así, las DC transmiten a los linfocitos T un estímulo de activación convirtiéndolos en “células efectoras”, denominándose ahora linfocitos citotóxicos CD8⁺ (LTC) y

linfocitos ayudadores CD4⁺. Las células efectoras adquieren también moléculas de reconocimiento del sitio en el cual (“homing”) las DC tomaron el ATA y regresan a dichos tejidos donde específicamente atacan a las células que presentan dichos ATA. Los LTC específicos destruyen a los queratinocitos infectados, y los linfocitos T ayudadores CD4⁺ secretan citocinas proinflamatorias (como la L2) para potenciar el efecto de los LTC y estimular la respuesta IgG2a de los linfocitos B (este isotipo de anticuerpo activa la cascada de complemento, se une a los receptores Fc de los macrófagos o de los linfocitos NK e inicia la citotoxicidad dependiente de anticuerpos). Al mismo tiempo, las DC reclutan y secretan mediadores que aumentan el ambiente inflamatorio y promueven la respuesta antiviral de los linfocitos T. Algunos linfocitos T efectores después de haber lisado (por medio de gránulos de perforina y granzima) o inducido el suicidio (vía Fas) a las células diana, se retiran y estimulan su reproducción, convirtiéndose en células de memoria que podrán reactivarse nuevamente cuando se encuentren con el mismo antígeno. Múltiples estudios han demostrado la importancia de la respuesta antitumoral mediada por linfocitos T contra las proteínas onco génicas E6 y E7 del VPH 16.²⁴⁻²⁸

Diferentes razones conducen a que en la infección por los VPH se genere una respuesta inmune poco potente.^{7,29} Los VPH son inmunógenos naturales débiles debido a que su propio patrón de composición molecular no es reconocido por los receptores de las células de la respuesta innata (receptores similares a Toll como T1r3 y T1r9); al estar constituidos por una doble cadena de DNA (a diferencia de virus constituidos por doble cadena de RNA que son inmunógenos potentes) son poco inmunógenos, no contienen señales intramoleculares de peligro virales (p. ej., CpG en su DNA o RNA de doble cadena) y su expresión se presenta en escasa cantidad (comparada con la expresión de proteínas inmunogénicas de otros virus), provocando respuesta inmune innata local mínima. En estas condiciones, la infección por los VPH en células epiteliales no genera un ambiente de citocinas de tipo proinflamatorio sino tipo antiinflamatorio. La infección por VPH en los queratinocitos o en las lesiones preinvasoras epiteliales está limitada a las células superficiales y no penetra por debajo de la membrana basal. Los VPH mantienen un ciclo de vida sin salir del queratinocito infectado, inducen proliferación celular más que histólisis, no provocan lisis celular, por ello no inducen una respuesta inflamatoria potente; no se liberan citocinas ni mediadores solubles del complemento y con esto se impide la activación y el sinergismo entre las RII y las RIA. Además, en general los queratinocitos y particularmente las células epiteliales escamosas diferenciadas tienen naturalmente limitada capacidad de procesar y presentar antígenos.

Por otra parte, la infección por VPH no provoca fase vírica y por lo tanto cursa sin presentación sistémica del antígeno,^{7,29} ya que su replicación está insertada en el progra-

ma de diferenciación del queratinocito. Además, los VPH no infectan las células presentadoras profesionales de los antígenos (CPA), ni provocan lisis en los queratinocitos, lo que impide que las CPA fagociten a los viriones y presenten los antígenos virales a los linfocitos B y T. Por ello, no se genera una respuesta sistémica inmune. Dadas todas estas condiciones, el sistema inmune tiene limitada oportunidad de identificar y combatir eficientemente, y la respuesta inmune natural contra la infección por VPH se torna débil comparada contra la generada en la mayoría de otras infecciones virales.

Por lo tanto, en la infección por VPH se desencadena una respuesta inmune innata limitada en su hospedero, que a su vez bloquea la generación de señales que inician la respuesta inmune adaptativa específica global, por lo que frecuentemente el huésped queda inmunológicamente ignorante de la infección.

Experimentalmente se ha demostrado que la respuesta inmune natural contra la infección primaria de VPH tarda en aparecer,^{6,12} aun cuando las proteínas virales se apliquen con adyuvantes inmunogénicos (p. ej., adyuvante de Freund). Los anticuerpos específicos contra L1-VPH 16 aparecen varios meses después de la primera infección viral y los correspondientes contra E7 frecuentemente sólo se detectan en condiciones de cáncer invasor. También la respuesta inmune celular parece presentarse tarde, aunque su identificación ha sido difícil probablemente por la baja frecuencia de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos de memoria anti-VPH circulantes.

En general, las infecciones virales persistentes se asocian inicialmente a una respuesta deficiente de la defensa celular intrínseca, luego a una respuesta inmune innata deficiente y posteriormente a una respuesta inmune adaptativa deficiente. La apoptosis es un mecanismo de defensa celular intrínseca que limita la replicación viral. Ya que muchas células mueren rápidamente después de una infección viral,³⁰ esta respuesta se encuentra bloqueada en los queratinocitos infectados por VPH onco génicos pues la oncoproteína E6 inhibe la apoptosis.

Aunado a que en general la respuesta inmune natural del huésped contra la infección por VPH es débil, los VPH onco génicos pueden ser ignorados porque emplean adicionalmente otros mecanismos para minimizar o evadir las respuestas innata y adaptativa.

Mecanismos de VPH para evadir la respuesta inmune

La infección persistente de VPH sumada a cofactores moleculares parcialmente conocidos (relacionados al inicio con temprana edad de relaciones sexuales, elevado número de parejas, alta paridad, primer parto antes de los 18, tabaquismo, pobre higiene genital, inflamación cervicovaginal persistente, consumo prolongado de anticonceptivos orales, e infecciones sexuales intercurrentes provocadas por *Chlamydia trachomatis* y virus del herpes simple tipo 2) más una res-

puesta inmune local fallida en la paciente, son probablemente los elementos más importantes que participan para la carcinogénesis cervical y la progresión tumoral.

Se han identificado algunos mecanismos por los cuales los VPH evaden las respuestas inmunes innata y celular.⁸ Como hemos anotado, el sistema de defensa de la respuesta innata antiviral comprende citocinas liberadas por las células infectadas (interferones tipo 1, TNF- α), células centinelas locales (DC y macrófagos), el sistema del complemento y linfocitos NK. Los genomas virales codifican una gran variedad de productos que minimizan los diferentes mecanismos de la respuesta inmune innata. Las citocinas participan en casi todas las fases de la respuesta inmune contra la infección viral, incluyendo el control de la inflamación, la inducción del estado antiviral y la regulación de la respuesta adaptativa, y constituyen una de las principales formas de comunicación entre la respuesta innata y la respuesta adaptativa inmune. Las primeras citocinas en aparecer como respuesta a las infecciones virales son INF- α y INF- β , seguidas de TNF- α , L6, L12 e INF- γ . Los VPH oncogénicos impiden la respuesta antiviral inmune innata en el epitelio cervical porque las proteínas E6 y E7 bloquean la actividad del INF- α y del INF- β por inhibición tanto de su síntesis (impidiendo la transcripción de sus genes inducibles) como de algunas vías de señalización propias (como p48); al no emitir señales de peligro, los VPH no son reconocidos como extraños. Normalmente los interferones tipo 1 (α y β) son secretados en altas concentraciones después de que las células son infectadas por virus, seguidas por TNF- α , L6, L12 e INF- γ como parte de la respuesta inmune innata. Los interferones tipo 1 inducen un estado antiviral por inhibir la replicación viral, inhiben la proliferación celular, estimulan el crecimiento y función citolítica de los NK, incrementan la expresión de moléculas clase I del MHC y disminuyen la expresión de moléculas clase II del MHC, activan la síntesis de gran cantidad de proteínas que provocan destrucción celular en la célula infectada y en sus vecinas, y además estimulan la proliferación de los linfocitos B. Al no liberarse los INF se bloquean todas estas acciones.³¹ Experimentalmente se puede modular positivamente la respuesta inmune de protección antiviral cuando al administrar el ATA se añade un estímulo inflamatorio (p. ej., endotoxina bacteriana).

No obstante que normalmente la infección por VPH provoca una respuesta de citocinas de tipo proinflamatorio Th1 (INF- γ , TNF- α , IL-1b, L6), se ha observado que cuando concurre otra patología cervical simultánea a la infección por VPH se produce un cambio hacia la respuesta de citocinas de tipo antiinflamatorio Th2 (L10, L13, TGF- β). Pacientes con NIC tienen disminución de L2, INF- γ y elevada producción de L4 e L10.²⁹ En general, las respuestas Th1 y Th2 tienen una correlación inversa, cuando una se incrementa, la otra decrece. La células Th1 producen citocinas que promueven la respuesta inflamatoria y la actividad de los linfocitos T citotóxicos, y las

células Th2 sintetizan citocinas que estimulan la respuesta de producción de anticuerpos.

La L10, además de debilitar la respuesta mediada por linfocitos T, propicia baja expresión de las moléculas coestimuladoras en las DC e inhibe su migración a los ganglios linfáticos regionales. El TGF- β está directamente implicado en el escape de las células tumorales del reconocimiento de las células inmunocompetentes. En ensayos de vacunación terapéutica, el bloqueo de esta citocina con anticuerpos anti-TGF- β ha permitido la regresión de tumores. Tomando en conjunto un microambiente con niveles altos de TGF- β e L10 y bajos de TNF- α e INF- γ , resulta un nivel bajo de presentación antigenica con un bajo nivel de reconocimiento por los LCT; esta condición de respuesta inmune Th1 deficiente conduce a persistencia de la infección viral e incrementa la oportunidad de desarrollar malignidad.

La proteína E6 inhibe la adhesión celular entre las células epiteliales y las CPPA (células de Langerhans o DC locales) por baja expresión de E-caderina (la cantidad de E-caderina en la superficie celular de queratínocitos infectados por VPH-16 se reduce).³² Por esto, las CPPA en estos sitios son escasas y por el ambiente de citocinas antiinflamatorias son impedidas para alcanzar su maduración, con lo cual se reduce aún más la presentación del ATAs del CaCu a los linfocitos T, induciendo con ello que la respuesta de la población de linfocitos T CD4 $^{+}$ y CD8 $^{+}$ no sea Th1-citolítica, sino Th2-de tolerancia.⁹ Las proteínas E6 y E7, al ser cargadas y presentadas por DC inmaduras, transmiten señales tolerogénicas a los linfocitos T. A esto también influye la proteína E5, la cual acidifica los endosomas, reduciendo el procesamiento y presentación del ATA a las CPPA.

Además, las células tumorales del CaCu son deficientes en la presentación de los antígenos propios y extraños por vía endógena, tanto por la desregulación frecuente en la expresión de moléculas de clase I del MHC (o HLA en el humano) como de las proteínas del sistema de transportación del antígeno del citoplasma a la luz del retículo endoplásmico (Tap1-Tap2), en parte debido a la inestabilidad génica y a las diversas mutaciones que se presentan en el cromosoma 6, sitio de codificación y transcripción de las moléculas del MHC y del sistema funcional del inmunoproteosoma. Todo esto, más un microambiente inmunosupresivo de citocinas-Th2, permite que la célula tumoral escape de los mecanismos de inmunoidentificación y citotoxicidad por los linfocitos T CD8 $^{+}$ específicos.^{9,29}

La presentación en escasa cantidad de antígenos extraños o “no propios” en la periferia puede inducir a respuesta de tolerancia inmune periférica, tanto por falla de los linfocitos T a detectar el antígeno o porque la regulación inmune del linfocito T funcionalmente competente se restringe por la participación de linfocitos T CD4 $^{+}$ e CD25 $^{+}$ inmunorreguladores negativos. Otro mecanismo de escape inmune observado

durante la progresión hacia el cáncer cervical está derivado por la acción de los linfocitos T por sí mismos. Se ha demostrado que la expresión reducida de la cadena zeta del CD3 en el receptor TCR en los linfocitos T de sangre periférica en pacientes con CaCu (y en otros tumores) puede contribuir a la incapacidad del huésped de generar una respuesta inmune efectiva contra las células infectadas por VPH.^{6,33}

Como mencionamos, en la mayoría de los casos el control local de la infección por VPH se lleva a cabo por una respuesta eficiente del sistema inmune del hospedero. Sin embargo, en lesiones preinvasoras de alto grado, en carcinoma *in situ* e invasor, se observan diversas alteraciones en los sistemas de presentación antigenica celular, así como falla en los sistemas de respuesta de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ que impiden la regresión o el control inmunológico de estas lesiones.

Blancos antigenicos en la modulación de la respuesta inmune

Dado que en la neoplasia intraepitelial cervical y en el CaCu los VPH oncogénicos expresan constitutivamente sus proteínas virales y algunas de ellas son moderadamente inmunogénicas, en teoría serían el blanco antigenico para desarrollar o modular la respuesta inmune local o sistémica de la paciente.

En la década pasada se identificaron las proteínas E6, E7, E2, L1 como ATA del CaCu. Las principales proteínas transformantes de los VPH de alto riesgo son las proteínas tempranas E6 y E7. Estos ATA se han reconocido en sus diferentes plataformas, desde su configuración genómica y proteómica hasta como péptidos inmunogénicos restringidos en el polimorfismo de los diferentes alelos de las moléculas clase I del antígeno de histocompatibilidad leucocitario humano (HLA). La mayoría de los epítopes identificados actualmente están restringidos al alelo HLA-A2⁺ (antígeno de histocompatibilidad más frecuentemente identificado en las poblaciones caucásicas). La proteína E6 es una proteína multifuncional cuya función es de transactivador transcripcional, y se une a una proteína asociada (E6Ap) que liga la ubiquitina al p53, promoviendo su degradación por el proteosoma; induce la inmortalización de queratinocitos y fibroblastos en cultivos *in vitro*; es una proteína básica nuclear y citoplasmática de 18 kDa y contiene cuatro residuos de cisteína formando dos dedos de zinc. La proteína E7, sola o en cooperación con E6 y *ras*, provoca inmortalización y transformación de queratinocitos y fibroblastos en cultivos *in vitro*, induce la síntesis de DNA y la proliferación celular. Algunas regiones de la proteína E7 se unen al Rb hipofosforilado, e inhiben que este último bloquee el factor de transcripción E2f, lo cual permite la inducción de la transcripción de los genes dependientes de E2f (entre ellos Cdk2 dependiente de ciclina A) y que las células progresen a la fase S; es una proteína nuclear y citoplasmática de 10 kDa, parecida a la E1A de los adenovirus

y a la Tag del SV40. La L1 es la principal proteína de la cápside viral, se oligomeriza en pentámeros y estos capsómeros se ensamblan en partículas semejantes a virus, las cuales son inmunogénicas potentes.

Las proteínas E6 y E7 del VPH16 son expresadas constitutivamente en la etapa de carcinogénesis y progresión tumoral, son digeridas intracelularmente de manera "natural" por las enzimas del proteosoma, produciendo pequeños fragmentos peptídicos antigenicos o epítopes que son transportados al retículo endoplásmico, donde son combinados con las moléculas clase I o II del HLA. Los epítopes virales restringidos al alelo HLA-A*0201 que evocan respuesta de LCTs *in vivo* en humanos de la proteína E6 son 29-38 TIHDIIILECV y la proteína E7 (11-20, YMLDLQPETT; 82-90, LLMGTLGIV; y 86-93, TLGIVCPI).³⁴ Una vez identificada la secuencia de estos oligopeptidos, pueden ser sintetizados artificialmente por métodos automatizados en fase sólida. La identificación y secuenciación molecular de los oligopeptidos tumorales inmunogénicos requieren técnicas experimentales complejas como la elusión de los complejos péptido-HLA-A2⁺ de las células presentadoras de antígenos, cromatografía líquida de alta presión y espectrometría de masas. Diferentes diseños experimentales de vacunación profiláctica o terapéutica en animales de laboratorio con estos oligopeptidos, han demostrado respuesta antitumoral local y sistémica significativa en animales *in vivo* y respuesta antitumoral de los linfocitos T específicos en humanos *in vitro*.^{25,27,28,35} En la mayoría de los protocolos de inmunoterapia contra NIC y CaCu se han empleado estos oligopeptidos tumorales como vacunas terapéuticas. Algunos otros oligopeptidos de las proteínas no estructurales E6 y E7 recientemente identificados con estas técnicas u otras igualmente complejas, como el análisis serológico de bibliotecas de expresión de tumores humanos (SEREX), se encuentran en valoración para comprobar su inmunogenicidad y su capacidad de provocar respuesta de prevención y protección antitumoral.

En los laboratorios de inmunología se puede medir la respuesta celular inmune antiviral. Los LCT CD8⁺ anti-VPH se pueden medir basados en dos de sus atributos: su capacidad para expandirse por estimulación *in vitro* de CPPA cargadas con la proteína o el péptido (antígeno) que reconocen, y su capacidad de lisar a las células blanco presentadoras del ATA. Los LCT específicos se pueden identificar por diferentes inmunométodos, como el de microcitotoxicidad, marcando las células blanco con isótopos radiactivos, empleando tetrámeros de HLA unidos a epítopes específicos para identificar los linfocitos T específicos, midiendo la secreción de citocinas de los linfocitos T por ELISPOT o su expresión intracelular por medio de FACS.

La modulación positiva de la respuesta inmune dirigida contra las proteínas virales tardías estructurales (prevención) o contra las proteínas tempranas no estructurales (tratamiento)

to) modificaría el curso de la infección viral y su persistencia de infección, la carcinogénesis, las lesiones tumorales preinvasoras e invasoras asociadas y la progresión tumoral.

Principios para hacer eficiente la respuesta inmune

Las principales estrategias que emplean los VPH para evadir la respuesta inmune son actualmente conocidas,⁸ y a partir de ello diferentes grupos de investigadores trabajan en generar, manipular e inmunomodular positivamente la respuesta inmune celular contra los ATA del CaCu, romper su tolerancia y tornarla efectiva.

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

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

Las infecciones y las lesiones tumorales asociadas a VPH se acompañan de respuesta inmune celular débil por los LTC anti E6 y E7; la activación de estos LTC es la base para las diferentes estrategias de vacunación terapéutica.²⁹ En general, la respuesta mediada por células elimina las células infectadas por virus sin dañar a las células no infectadas, además, una vez que matan a la célula blanco se separan y pueden matar a otra célula infectada.

Resultados exitosos con la vacuna profiláctica contra el cáncer cervical

Diferentes consorcios biotecnológicos, compañías farmacéuticas y grupos de investigadores están trabajando desde hace más de 10 años en el desarrollo de vacunas profilácticas contra la infección por los principales VPH oncogénicos.³⁶⁻⁴⁰

Las vacunas profilácticas contra los VPH oncogénicos para ser efectivas necesitarían generar una respuesta inmune efectiva humoral en la superficie de la mucosa genital, induciendo anticuerpos neutralizantes dirigidos contra los epítopes conformacionales de las proteínas de la cápside viral, capaces de reconocer e inactivar a los VPH antes que el virus infecte a

las células epiteliales del huésped. Esta protección depende de la cantidad de anticuerpos producidos por el huésped, de su disponibilidad en el sitio de la infección y de la duración de su presencia; sustancialmente se requiere mantener niveles altos de anticuerpos en la superficie de las mucosas por largos períodos de tiempo.

Las vacunas preventivas contra la infección por VPH de alto riesgo tendrán un impacto a mediano plazo sobre la prevalencia del CaCu. Si estas vacunas provocan protección contra la infección por VPH y se aplicaran en las adolescentes antes de iniciar la actividad sexual, podrían prevenir el desarrollo del cáncer cervical en las siguientes décadas. El resultado exitoso tendría el potencial de salvar la vida de más de 200 mil mujeres en el mundo por año.

Una vacuna profiláctica ideal contra los VPH requiere varios atributos, como no provocar riesgos, ser barata en su producción y venta, aplicarse en una sola ocasión, que proteja por muchos años y que conlleve a una reducción significativa en la incidencia del cáncer cervical.³⁶

Por la dificultad de replicar grandes cantidades de VPH en el laboratorio, las vacunas profilácticas han sido diseñadas empleando subunidades virales (componentes virales purificados), más que utilizar virus vivos atenuados o inactivados. Actualmente la mayoría de los ensayos en vacunas profilácticas emplean partículas semejantes al virus (PSV), estas partículas recombinantes se construyen con una o las dos proteínas tardías estructurales. La proteína L1, sola o en combinación con L2, se ensambla en forma de cápsides vacías (sin los genes tempranos no-estructurales). La L1 tiene la capacidad de autoensamblarse en las PSV cuando son expresadas en sistemas de cultivo de células procariotas o eucariotas (levaduras, células de insecto).⁴¹ Las PSV de L1 se parecen a los viriones de VPH en el exterior, pero por dentro se encuentran vacías, no contienen DNA viral (no son infecciosas). Las PSV de L1 incluyen los epítopes conformacionales de L1 que inducen anticuerpos neutralizantes. La inmunización con PSV de L1 de diferentes tipos de PV susceptibles en modelos animales (conejo, perros, bovinos) protegieron a los animales vacunados contra la infección viral inducida por la aplicación de altas dosis de VPH y generaron adecuada respuesta de los linfocitos B, determinada a través de títulos elevados de anticuerpos neutralizantes.⁴²

Diferentes ensayos clínicos en fases I y II demostraron que las PSV de L1 son fuertemente inmunogénicas, induciendo títulos elevados de anticuerpos por lo menos 40 veces más altos que los encontrados en la infección natural; su aplicación fue bien tolerada y generó respuesta inmune humoral local y sistémica,⁴³ e incluso respuesta celular.^{42,44}

Recientemente se han reportado los primeros resultados exitosos de la vacunación profiláctica anti-VPH 16, en un estudio comparativo (placebo *versus* PSV de L1-VPH 16) doble ciego en mujeres jóvenes,³⁸ realizado en 16 centros hospitala-

rios de Estados Unidos aplicando una vacuna monovalente desarrollada por los laboratorios Merck. Se demostró que la vacunación indujo protección significativa contra la infección persistente de VPH 16, títulos altos y persistentes de anticuerpos neutralizantes específicos y protección para desarrollar lesiones premalignas cervicales asociadas al virus. En este estudio, 2392 mujeres recibieron tres dosis de vacunas con PSV de L1-VHP 16 por vía intramuscular y tuvieron seguimiento de 17.4 meses, la incidencia de infección viral persistente del grupo que recibió placebo fue de 3.8 % de mujeres/año y en el grupo vacunado de 0%; además, se presentaron en el primer grupo nueve casos de NIC relacionada con VPH 16 y ninguno en las jóvenes vacunadas. Estos resultados orientan a que esta estrategia tiene el gran potencial de reducir la incidencia del CaCu a mediano plazo.

En teoría, las vacunas profilácticas polivalentes que cubren los cuatro VHP de alto riesgo con mayor prevalencia (16,18, 45 y 31) podrían prevenir 80% de los casos incidentes de CaCu. Si las niñas/adolescentes fueran vacunadas contra estos VPH oncogénicos y el programa alcanzara el mismo efecto provocado por la vacunación contra el virus de la hepatitis B en niños africanos y asiáticos (iniciada en 1984, por el cual la prevalencia de hepatitis B decreció de 10.5% a 1.7% en 1992, aunada a una reducción impresionante de prevalencia de carcinoma hepatocelular), podría visualizar el inicio del fin del CaCu junto con el de otros múltiples carcinomas relacionados con los VPH oncogénicos.⁴⁵

Estamos lejos de tener las condiciones idóneas que se requieren para la aplicación masiva de la vacuna profiláctica contra el CaCu. Existen actualmente algunos inconvenientes o limitantes: son caras, se requieren múltiples aplicaciones, al emplear una proteína purificada (no DNA) su producción y administración es compleja, y sólo protege de la infección por un genotipo viral. Se requieren evaluaciones futuras en ensayos clínicos de fase III que superen los inconvenientes o limitantes actuales en estudios controlados que involucren a más de 10 mil voluntarias (p. ej., emplear vacunas compuestas por los VHP oncogénicos prevalentes, solos o en combinación con los VPH no oncogénicos asociados a la presentación de condilomas y verrugas genitales-tipos 6 y 11). Particularmente para reducir el costo en su producción o simplificar la administración de PSV de L1, se está planeando utilizar vacunación administrada por vía de mucosas (inhalación) o transdérmica, o en forma comestible (construcción de frutas o cítricos VPH transgénicos, empleando vectores o plásmidos recombinantes que expresen la proteína completa L1, o los capsómeros de L1 capaces de inducir anticuerpos neutralizantes). Otra alternativa es emplear PSV químéricas compuestas con las proteínas L1 y L2 (proteínas estructurales) y algunos polipéptidos de las proteínas E6 y E7 (proteínas no-estructurales) para realizar ensayos combinados de vacunación profiláctica/terapéutica.

Todavía quedan múltiples cuestionamientos que contestar relacionados con la eficacia y duración de la respuesta inmune que provocan las vacunas profilácticas contra el CaCu.

Resultados preliminares de la inmunomodulación positiva mediada por linfocitos T

Recientes estudios han demostrado que la respuesta citolítica de los linfocitos T CD8⁺ en cooperación con los linfocitos T CD4⁺, desempeñan un papel esencial en el desarrollo de la respuesta inmune eficiente para la regresión de lesiones precancerosas y tumores.⁴⁶⁻⁴⁸

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

El fundamento de la inmunoterapia contra el CaCu invasor es inmunomodular positivamente la respuesta mediada por linfocitos T eficientes contra las células epiteliales tumorales infectadas que expresan las proteínas E6 y E7 de los VPH oncogénicos. Los estudios en modelos animales²⁴⁻²⁶ y preclínicos^{46,49,50} indican que estas vacunas pueden erradicar los tumores positivos a VPH.

Los intentos iniciales de inmunoterapia contra el CaCu se han llevado a cabo en pacientes con etapas clínicas avanzadas,⁵¹⁻⁵³ quienes *per se* están inmunodisminuidas por el gran volumen tumoral y por los tratamientos de radioterapia y quimioterapia recibidos. Más aún, se han realizado frecuentemente sin tomar en cuenta las alteraciones en la respuesta inmune innata y en el procesamiento y presentación antigenica. A pesar de todas estas limitantes, en algunas pacientes inmunizadas han sido inducidas respuestas celular y humoral específicas de tipo parcial, aunque con muy limitado efecto clínico-terapéutico. Los estudios de inmunoterapia en pacientes con lesiones cervicales preinvasoras-VPH positivas son probablemente los modelos clínicos más representativos para valorar el efecto inmunomodular de la respuesta anti-VPH mediada por linfocitos T.

La estrategia de vacunación terapéutica o inmunomodulación positiva mediada por linfocitos T contra las lesiones preinvasoras o el CaCu es todavía más novedosa que la vacunación profiláctica, y sólo se han realizado escasos estudios clínicos en fases I y II. Las vacunas terapéuticas o la inmunomodulación positiva de la respuesta inmune celular adquirida está basada en administrar cantidad suficiente de antígeno tumoral asociado al CC en sus diferentes plataformas (presentaciones), y modificar las condiciones locales de inmunosupresión a través de citocinas proinflamatorias y adyuvantes celulares del tipo CPPA, especialmente las DC. Los ATA pueden administrarse en forma de péptidos sintéticos previamente identificados como epítopes (restringidos particularmente a los alelos HLA-A2), proteínas recombinantes, PSV químéricas, vectores virales o plásmidos recombinantes. Otras for-

mas de administrarlos menos utilizadas son los lisados tumorales y las células tumorales apoptóticas. Los ATA son colocados o introducidos en las CPPA utilizando diferentes estrategias metodológicas genómicas como pulsarlas, transfectarlas, infectarlas e hibridarlas para su presentación y subsiguiente estimulación de los linfocitos T.

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

En ensayos clínicos inmunoterapéuticos en fases I y II, las pacientes han sido vacunadas con epítopes-HLA específicos de las proteínas E6 y E7 y menos frecuentemente con las proteínas completas recombinantes o con los vectores virales recombinantes con la finalidad de expandir y activar la respuesta citotóxica de los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos VPH-específicos. En las pacientes con cáncer invasor avanzado no se ha observado respuesta clínica significativa^{10,53-55} y sólo en algunos casos se ha obtenido respuesta parcial, como en el de una paciente con CaCu metastásico en quien se empleó células dendríticas pulsadas con la oncoproteína E7 del VPH 18, obteniéndose remisión temporal de su enfermedad y mejoramiento en su calidad de vida.⁵⁶ Los ensayos de vacunación terapéutica en pacientes con lesiones preinvasoras son también escasos, y en ellos se han obtenido respuestas completas en 18%⁵⁷ y respuestas parciales en 50% de los casos.⁵⁷⁻⁵⁹

A pesar que no se ha demostrado respuesta clínica en las pacientes con lesiones invasoras vacunadas con finalidades terapéuticas, sí se han demostrado respuestas humorales y celulares valoradas en ensayos inmunológicos *in vitro* en 10 a 30% de los casos. En este tipo de respuestas se ha encontrado tanto la generación de linfocitos T citotóxicos antivirales, como de anticuerpos neutralizantes específicos contra las proteínas E6 y E7 de los VPH oncogénicos.^{53,56,59,60}

Una de las estrategias actuales de este tipo de inmunoterapia antitumoral es emplear células dendríticas (la CPPA conocida más eficiente) autólogas pulsadas *in vitro* con los抗ígenos tumorales, utilizadas como adyuvantes en la estimulación de los linfocitos T contra E7 de VPH 16 y VPH 18.^{10,61,62} Siendo un campo de investigación muy reciente, los primeros resultados han reportado respuestas limitadas. Actualmente se investigan diferentes variables relacionadas con la frecuencia y periodicidad de su administración en los ensayos clínicos.

Se pueden combinar las estrategias de vacunación profiláctica con terapéutica (p. ej., empleando PSV químéricas).^{49,50}

Perspectivas de las vacunas profilácticas y terapéuticas contra el cáncer cervicouterino

En los países desarrollados, los recursos económicos y humanos que se invierten anualmente en los programas de detección oportuna de CaCu y en el tratamiento de lesiones preinvasoras, es uno de los principales rubros del presupuesto destinado a la salud pública. Este esfuerzo ha permitido abatir considerablemente la incidencia de las lesiones cervicales invasoras y disminuir notablemente la prevalencia del CaCu. Varios miles de dólares es el costo estimado por año de vida salvada en estas mujeres.⁶³ En los países en desarrollo, la moderada inversión económica destinada al tratamiento del CaCu, a la detección oportuna del CaCu y al tratamiento de lesiones preinvasoras, sólo logra un impacto de utilidad limitado en la prevalencia del CaCu. Se espera que las vacunas profilácticas que cubran los VPH oncogénicos prevalentes podrán reducir el número de intervenciones como colposcopias, biopsias, tratamientos de lesiones preinvasoras e invasoras (con ahorro importante de recursos y con reducción notable de la morbilidad causada por el CaCu). Considerando esto, es teóricamente rentable invertir en la construcción de vacunas profilácticas y terapéuticas contra el CaCu.

Tres condiciones principales se requieren para alcanzar una inmunoterapia exitosa en el modelo del CaCu:

1. Que la célula blanco...
 - a) transcriba y traduzca la proteína antigénica tumoral, la cual contenga epítopes inmunodominantes que puedan ser presentados por las moléculas del HLA;
 - b) que se mantenga íntegra y eficiente la vía del procesamiento y presentación de los antígenos;
 - c) que sea susceptible de apoptosis;
 - d) que no secrete o exprese inhibidores locales de la función efectora de los linfocitos T.
2. Que el sistema inmune adaptativo cuente con linfocitos T efectores con los apropiados receptores para los epítopes blancos susceptibles de intervencionismo inmunológico, mediante la clonación de linfocitos T efectores en suficiente cantidad capaces de viajar al tejido blanco, contener apropiados mecanismos efectores y provocar respuesta antitumoral de suficiente duración.⁹

Para la generación de vacunas profilácticas anti-VPH de aplicación masiva existen algunos limitantes como que las PSV son difíciles de producir a gran escala y son relativamente caras. Una alternativa sería generar vacunas de DNA mediante la amplificación del gen de interés (tanto de las proteínas E6/E7 y L1/L2) en plásmidos bacterianos recombinantes; estas estrategias se encuentran en investigación.⁶⁴⁻⁶⁵

Los resultados exitosos recientes de vacunación profiláctica son preliminares, quizás muy pronto alcanzables para la

población en riesgo. Sin embargo, mientras esto se logra, el papel preponderante en la prevención y control del CaCu es el tamizaje basado en procedimientos de papanicolaou en conjunción con las pruebas de identificación del DNA de los VPH y la coloscopia.

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

Tratamientos multimodales inmunes que induzcan una potente respuesta inmune antiviral evitarán la evasión de la respuesta inmunoadaptativa y contribuirán al control de las lesiones preinvasoras e invasoras. Para ello, se ha propuesto un sinnúmero de estrategias:

1. Emplear diferentes sistemas o plataformas de presentación de ATA (genes, epítopes múltiples, proteínas recombinantes), en diferentes combinaciones o secuencias para cebar, aumentar o reforzar la respuesta inmune celular antitumoral.
2. Aumentar la antigenicidad de los oligopeptídos previamente identificados, buscar nuevos ATA de segunda generación, por medio de la estrategia denominada "inmunología reversa".⁶⁶⁻⁶⁸
3. Aplicar los protocolos de inmunoterapia en pacientes en etapas clínicas tempranas con mínima enfermedad residual.
4. Incorporar a los ensayos inmunoterapéuticos estimuladores de la respuesta inmune innata, como fracciones de microorganismos inmunogénicos (*Listeria monocytogenes*),⁶⁹ proteínas de choque térmico o polinucleótidos antígenicos como los oligodeoxinucleótidos-CpG.⁷⁰

También se podrían obtenerse epítopes inmunodominantes a partir de epítopes subdominantes, al agregarles señales de activación como moléculas coestimuladoras o al modificar 1 o 2 AA en los péptidos subdominantes (mimotopos); de igual forma podría aumentarse la respuesta efectora celular por medio del bloqueo de los linfocitos supresores naturales T CD4⁺ y CD25⁺.

Además de emplear los ATA virales como blanco de la respuesta inmune en pacientes con CaCu, se podrían utilizar otros blancos inmunogénicos de otras múltiples proteínas expresadas en las etapas de carcinogénesis, progresión y diseminación metastásica, tal es el caso de las proteínas de protooncogenes o genes atípicos coincidentes (p. ej., p21/

ras, p 53, beta-catenina, telomerasa, Ki-67), o genes relacionados con la invasividad o con el proceso de diseminación metastásica identificados en la expresión dinámica tumoral, con la finalidad de inmunomodular positivamente múltiples linfocitos T policlonales específicos contra múltiples blancos inmunogénicos de diferentes proteínas en un mismo tumor.

La evaluación de la respuesta inmune antitumoral *in vivo* en el humano es difícil, y el mejor método es la respuesta clínica. Sin embargo, diferentes metodologías experimentales determinan con precisión las etapas de reconocimiento y amplificación de la respuesta inmune *in vitro* (previamente las hemos comentado) y ayudan a predecir la respuesta clínica.

Indudablemente el campo de la tecnología de las vacunas será beneficiada por los avances en la genómica y la bioinformática. La efectividad de la respuesta inmune celular anti-VPH podría ser medida indirectamente por la determinación de algunos parámetros: la carga viral, la detección local de células dendríticas, linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ o el patrón de citocinas Th-1, entre otros.

Conclusiones

El índice terapéutico en pacientes con CaCu avanzado es bajo, incluso en etapas tempranas es de 80%. Para mejorar las tasas de sobrevida en pacientes con CC son necesarias nuevas estrategias terapéuticas adyuvantes.

La infección persistente por VPH oncogénicos aunados a los cofactores moleculares (generados por las condiciones de alto riesgo clínico) más una respuesta inmune local ineficiente en la paciente son probablemente los elementos más importantes que participan en la carcinogénesis cervical y en la progresión tumoral. La modulación positiva de la respuesta inmune humoral y celular dirigida contra las proteínas virales tardías estructurales (prevención) y contra las proteínas tempranas no estructurales (tratamiento) modifican el curso de la enfermedad en la infección viral, su persistencia de la infección, la carcinogénesis cervical y la progresión tumoral.

Recientemente se han reportado los primeros resultados exitosos de la vacunación profiláctica anti-VPH 16 en un estudio comparativo doble ciego fase III en mujeres jóvenes, el cual demostró que la vacunación indujo protección significativa contra la infección persistente de VPH 16, y protección para desarrollar lesiones premalignas cervicales asociadas con el virus. Estos resultados indican que esta estrategia tiene el potencial de reducir la incidencia del CaCu a mediano plazo.

Los ensayos con vacunación terapéutica son más recientes; en pacientes con lesiones preinvasoras se han obtenido respuestas clínicas completas en 18% y parciales en 50% de los casos; en las pacientes con cáncer invasor avanzado no se ha observado respuesta clínica significativa. Sin embargo, en este último grupo los ensayos de inmunoterapia anti-VPH

han demostrado respuestas humorales y celulares en 10 a 30% de los casos valorados en ensayos inmunológicos *in vitro*.

El mejoramiento de estrategias inmunopreventivas e inmunoterapéuticas contra los VPH permitirá la erradicación de sus infecciones persistentes y sus lesiones preinvasoras e invasoras cervicales asociadas.

Agradecimientos

A la señora Adriana Medina Delgado, asistente bibliotecaria del Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, por su ayuda en la búsqueda documental.

Referencias

1. Bosch FX, de Sanjose S. Human papillomavirus and cervical cancer burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003;31:3-13.
2. Nabel GJ. Genetic, cellular and immune approaches to disease therapy: past and future. *Nat Med* 2004;10:135-141.
3. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002;2:342-350
4. Schiffman M, Kruger KS. Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003;31:14-19.
5. DeVita V, Hellman S, Rosenberg S. *Cancer. Principles & practice of oncology*. 6th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. pp. 1522-1548.
6. Eiben GL, Velders MP, Kast WN. The cell-mediated immune response to human papillomavirus-induced cervical cancer: implications for immunotherapy. *Adv Cancer Res* 2002;113-148
7. Scott M, Nakagawa M, Moscicki AB. Cell-mediated immune response to human papillomavirus infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001;8:209-220.
8. Tindle RW. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nat Rev Cancer* 2002;2:59-65.
9. Frazer IH. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev Immunol* 2004;4:46-54.
10. Nonn M, Schinz M, Zumbach K, et al. Dendritic cell-based tumor vaccine for cervical cancer. I. In vitro stimulation with recombinant protein-pulsed dendritic cells induce specific T cells to HPV16 E7 or HPV18 E7. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003;129:511-520.
11. Rohan ET, Burk RD, Franco EL. Toward a reduction of the global burden of cervical cancer. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:S37-S39.
12. Wang SS, Hildesheim A. Viral and host factors in human papillomavirus persistence and progression. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003;31:35-40.
13. Berumen J, Ordoñez RM, Salmeron J, et al. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case control study. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1325-1330.
14. Sherman ME, Schiffman M, Cox JT. Effects of age and HPV viral load on colposcopy triage: data from the randomized atypical squamous cells of undetermined significance/low-grade squamous intraepithelial lesion triage study (ALTS). *J Natl Cancer Inst* 2002; 94:102-107.
15. Lazo PA. The molecular genetics of cervical carcinoma. *Br J Cancer* 1999;80:2008-2018.
16. Hanahan D, Winberg R. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
17. Giuliano A. Cervical carcinogenesis: the role of co-factors and generation of reactive oxygen species. *Salud Pública Mex* 2003;45:S354-S354.
18. Pinto AP, Tulio S, Cruz OR. HPV cofactors in cervical carcinogenesis. *Rev Assoc Med Bras* 2002;48:73-78.
19. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, et al. Natural history of cervico-vaginal papillomavirus in young women. *N Engl J Med* 1998;338: 423-428.
20. Hildesheim A, Wang SS. Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review. *Virus Res* 2002;89:229-240.
21. Petry KU, Sheffel D, Bode U, et al. Cellular immunodeficiency enhances the progression of human papillomavirus-associated cervical lesions. *Int J Cancer* 1994;57:836-840.
22. Rocha ZL, Barrios T, Garcia CA, et al. Cervical secretory immunoglobulin A to human papillomavirus type 16 (HPV 16) from HPV 16-infected women inhibit HPV 16 virus-like particle-induced hemagglutination of mouse red blood cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2001;31:47-51.
23. Valdespino GV, Rocha ZL. Immunoterapia mediada por linfocitos T en pacientes con cáncer. *Cir Ciruj* 2003;71:235-244.
24. Chen LP, Thomas EK, Hu SL, Hellstrom I, Hellstrom KE. Human papillomavirus type 16 nucleoprotein E7 is a tumor rejection antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:110-114.
25. Feltkamp MC, Smits HL, Vierboom MP, et al. Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. *Eur J Immunol* 1993;23:2242-2249.
26. De Brujin ML, Schuurhuis DH, Vierboom MP, et al. Immunization with human papillomavirus type 16 (HPV16) oncoproteins loaded dendritic cells as well as protein in adjuvant MHC clas I restricted protection to HPV-induced tumor cells. *Cancer Res* 1998 58:724-731.
27. Eiben GL, Velders MP, Schreiber H, et al. Establishment of an HLA-A*0201 human papillomavirus type 16 tumor model to determine the efficacy of vaccination strategies in HLA-A*0201 transgenic mice. *Cancer Res* 2002;62:5792-5799.
28. Villa LL. Vaccines against papillomavirus infections and disease. *Salud Pública Mex* 2003;45:S443-S448.
29. Konya J, Dillner J. Immunity to oncogenic human papillomavirus. *Adv Cancer Res* 2001;82:205-238.
30. Flint SJ, Enquist LW, Racaniello VR, Skalka AM. *Principles of Virology. Molecular biology, pathogenesis, and control of animal viruses*. 2nd edition: Washington, DC: ASM Press; 2004. pp. 530-595,554-700.
31. Nees M, Geoghegan JM, Hyman T, Frank S, Miller L, Woodworth CD. Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-response genes and upregulate proliferation-associated and NF-κB response genes in cervical keratinocytes. *J Virol* 2001;75: 4283-4296.
32. Matthews K, Leong CM, Baxter L, et al. Depletion of Langerhans cells in human papillomavirus type 16-infected skin is associated with E6-mediated downregulation of E-cadherin. *J Virol* 2003;77:8378-8385.
33. Kono K, Ressing ME, Brandt MR. Decreased expression of signal-transducing zeta chain in peripheral T cells and natural killer cells in patients with cervical cancer. *Clin Cancer Res* 1996;2:1825-1828.
34. Ressing ME, Sette A, Brandt RMP, et al. Human CTL epitopes encoded by human papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through *in vivo* and *in vitro* immunogenicity studies of HLA-A*0201-binding peptides. *J Immunol* 1995;154:5934-5943.

35. Parmiani G, Castelli C, Anichini A, et al. Cancer immunotherapy with peptide-based vaccines: what have we achieved? Where are we going? *J Natl Cancer Inst* 2002;94:805-818.
36. Lowy RD, Frazer HI. Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003;31:111-116.
37. Billich A. HPV vaccine. MedImmune/GlaxoSmithKline. *Curr Opin Invest Drugs* 2003;4:210-213.
38. Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, et al. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N Engl J Med* 2002;347:1645-1651.
39. Hopfl R, Heim K, Christensen N, et al. Spontaneous regression of CIN and delayed-type hypersensitivity to HPV-16 oncoprotein E7. *Lancet* 2000;356:1985-1986.
40. Kols A, Sherris J. HPV vaccines: promise and challenges. *Pathology* 2000;1:3-35.
41. Chen XJS, Garcea RL, Goldberg I, et al. Structure of small virus-like particles assembled from L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol Cell Biol* 2000;5:557-567.
42. Tobby TW, Smith JF, Kuklin N, et al. Effect of vaccine delivery system on the induction of HPV 16L1-specific humoral and cell-mediated immune response in immunized Rhesus macaques. *Vaccine* 2003;21:1539-1547.
43. Nardelli-Haeflinger D, Wirthner D, Schiller JT, et al. Specific antibody levels at the cervix during the menstrual cycle of women with human papillomavirus 16 virus-like particles. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:1128-1137.
44. Pinto LA, Edwards J, Castle PE, et al. Cellular immune responses to human papillomavirus (HPV)-16 in healthy volunteers immunized with recombinant HPV-16 L1 virus-like particles. *J Infect Dis* 2003;188:327-338.
45. Crum CP. The beginning of the end for cervical cancer? *N Engl J Med* 2002;347:1703-1705.
46. Zwaveling S, Ferreira MSC, Nouta J, et al. Established human papillomavirus type 16-expressing tumors are effectively eradicated following vaccination with long peptides. *J Immunol* 2002;69:350-358.
47. Gao FG, Khammanivong V, Liu WJ, Legatt GR, Frazer IH, Fernando GJ. Antigen-specific CD4+T-cell is required to activate memory CD8+ T cell to a fully functional tumor killer cell. *Cancer Res* 2002;62:6438-6441.
48. Marzo AL, Kinner BF, Lake R, et al. Tumor-specific CD4+ T cells have a major "post-licensing" role in CTL mediated anti-tumor immunity. *J Immunol* 2000;6047-6055.
49. Kaufmann AM, Nieland J, Schinz M, et al. HPV 16 L1 E7 chimeric virus-like particles induce specific HLA-restricted T cells in humans after *in vitro* vaccination. *Int J Cancer* 2001;92:285-293.
50. Da Silva DM, Schiller JT, Kast WM. Heterologous boosting increases immunogenicity of chimeric papillomavirus virus-like particles vaccines. *Vaccine* 2003;21:3219-3227.
51. Borysiewicz LK, Fiander A, Nimako M, et al. A recombinant vaccinia virus encoding human papillomavirus types 16 and 18, E6 and E7 proteins as immunotherapy for cervical cancer. *Lancet* 1996; 347:1523-1527.
52. Adams M, Borysiewicz L, Fiander A, et al. Clinical studies of human papilloma vaccines in pre-invasive and invasive cancer. *Vaccine* 2001;19:2549-2556.
53. Steller MA, Gurski KJ, Murakami M, Daniel RW, Shah KV, Celis E, Sette A, Trimble EL, Park RC, Marincola FM. Cell-mediated immunologic responses in cervical and vaginal cancer patients immunized with lipidated epitope of human papillomavirus type 16 E7. *Clin Cancer Res* 1998;4:2103-2109.
54. Tsuda N, Mochizuki K, Harada M, et al. Vaccination with predesignated or evidence-based peptides for patients with recurrent gynecologic cancer. *J Immunother* 2004;27:60-72.
55. Ferrara A, Nonn M, Sehr P, et al. Dendritic cell-based tumor vaccines for cervical cancer. II. Results of a clinical pilot study in 15 individual patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003;129:521-530.
56. Santin AD, Bellone S, Gokden M, Cannon MJ, Parham GP. Vaccination with HPV-18. E7-pulsed dendritic cells in a patient with metastatic cervical cancer. *N Engl J Med* 2002;346:1752-1753.
57. Muderspach L, Wilczynski S, Roman L, et al. A phase I trial of a human papillomavirus (HPV) peptide vaccine for women with high grade cervical and vulvar intraepithelial neoplasia who are HPV 16 positive. *Clin Cancer Res* 2000;6:3406-3416.
58. Baldwin P, van der Burg SH, Boswell CM, et al. Vaccinia-expressed human papillomavirus 16 and 18 E6 and E7 as a therapeutic vaccination for vulval and vaginal intraepithelial neoplasia. *Clin Cancer Res* 2003;9:5205-5213.
59. Kaufmann AM, Stern PL, Rankin EM, et al. Safety and immunogenicity of TA-HPV, a recombinant vaccinia virus expressing modified human papillomavirus (HPV)-16 and HPV-18 E6 and E7 genes in women with progressive cervical cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8: 3676-3685.
60. Santin AD, Hermonat PL, Ravaggi A, et al. Induction of human papillomavirus-specific CD4+ and CD8+ lymphocytes by E7-pulsed autologous dendritic cells in patients with human papillomavirus type 16- and -18-positive cervical cancer. *J Virol* 1999;73:5402-5410.
61. Ribas A, Butterfield LH, Glaspy JA, Economou JS. Cancer immunotherapy using gene-modified dendritic cells. *Curr Gen Ther* 2002;2: 57-78.
62. Salio M, Sheperd D, Dunbar PR, et al. Mature dendritic cells prime functionally superior melan-a-specific CD8+ lymphocytes as compared with nonprofessional APC. *J Immunol* 2001;167:1188-1197.
63. Goldie SJ, Kuhn L, Denny L, et al. Policy analysis of cervical cancer screening strategies in low-resource settings: clinical benefits and cost-effectiveness. *JAMA* 2001; 285:3010-3015 (erratum 286:1026).
64. Monz M, Ling M, Hung CF, Wu TC. HPV DNA vaccines. *Front Biosci* 2003;8:d55-68.
65. Garcia CA. Vaccines against human papillomavirus and perspectives for the prevention and control of cervical cancer. *Salud Publica Mex* 2003;45:S437-S442.
66. Schultze JL, Vonderheide RH. From cancer genomics to cancer immunotherapy: toward second-generation tumor antigens. *Trends Immunol* 2001;22,9:516-523.
67. Monzavi KB, Keiber ET. Current concepts in cancer vaccine strategies. *Biotechniques* 2001;30:170-189.
68. Kather A, Ferrara A, Nonn M, et al. Identification of a naturally processed HLA-A*0201 HPV18 T cell epitope by tumor cell mediated *in vitro* vaccination. *Int J Cancer* 2003;104:345-353.
69. Lamikanra A, Pan ZK, Issacs SN, Wu TC, Paterson Y. Regression of established human papillomavirus type 16 (HPV-16) immortalized tumors *in vitro* by vaccinia viruses expressing different forms of HPV-16 E7 correlates with enhanced CD8(+) T-cell responses that home to the tumor site. *J Virol* 2001;75:9654-9664.
70. Kim TY, Myoung HJ, Kim JH, et al. Both E7 and CpG-oligodeoxynucleotide are required for protective immunity against challenge with human papillomavirus 16 (E6/E7) immortalized tumor cells: involvement of CD4+ and CD8+ T cells in protection. *Cancer Res* 2002;62:7234-7240.