



ARTÍCULO DE REVISIÓN

Hacia la prevención del cáncer cérvico-uterino: estrategias empleadas en el desarrollo de vacunas contra el VPH

Erick de la Cruz-Hernández,* Adriana Contreras-Paredes,* Marcela Lizano-Soberón*

* Unidad de investigación Biomédica en Cáncer. Instituto Nacional de Cancerología-Instituto de Investigaciones Biomédicas.

***Toward cervical cancer prevention:
strategies employed in the
development of HPV vaccines***

ABSTRACT

An HPV persistent infection is doubtless the main factor involved in cervical cancer development. It is clear that the majority of HPV infections are self-limited and not all high-risk HPV infections are destined to progress to a higher grade lesion. Due to viral mechanisms that evade the immune system, in some cases the immune response against HPV is not as effective, allowing the establishment of persistent infections. The promise of a vaccine that can avoid HPV infections and therefore decrease cervical cancer incidence, has been motive of great interest and enthusiasm on the search of different strategies for obtaining an effective vaccine. At present, several prophylactic vaccines have been developed based in virus like particles (VLPs) produced with L1 viral proteins. Results of these vaccines applied to women between 16 and 23 years old show high tolerability and immunogenicity with higher antibody titers than those seen in an HPV natural infection. Even these vaccines can not wholly prevent infections caused by HPV types included in the vaccine design; its efficacy has been demonstrated for their ability to eliminate HPV persistent infections and to prevent the development of cervical intraepithelial neoplasia. These vaccines are currently in phase III of clinical trials, whose results will determine its impact in the general population. Therapeutic vaccines are focused in the elimination of established cervical lesions; nevertheless their efficacy has not been proved for clinical use.

Key words. HPV. Vaccine. Cervical cancer.

RESUMEN

La infección persistente del VPH es, sin duda, el factor más importante para el desarrollo del cáncer cérvico-uterino. La mayoría de las infecciones por VPH son eliminadas y sólo una pequeña proporción de infecciones con VPH de alto riesgo progresan a una lesión de alto grado o a cáncer. Por mecanismos de evasión de la respuesta inmune, en algunos casos la respuesta contra el VPH no es efectiva, lo que permite el establecimiento de una infección persistente. La promesa de una vacuna que neutralice la infección por VPH y por lo tanto elimine la incidencia del cáncer cérvico-uterino, ha causado gran interés y entusiasmo en la búsqueda de diferentes estrategias para obtener una vacuna efectiva. A la fecha, se han desarrollado vacunas profilácticas contra VPH basadas en partículas tipo-virus (VLPs) generadas a partir de las proteínas virales L1. Los resultados de estas vacunas en mujeres de 16 a 23 años de edad muestran una elevada tolerabilidad e inmunogenicidad con títulos de anticuerpos mucho más altos que los observados en una infección natural por VPH. Si bien estas vacunas no son capaces de evitar completamente las infecciones por los tipos virales incluidos en la vacuna (VPH16 y 18), son muy eficaces para eliminar las infecciones persistentes y prevenir el desarrollo de neoplasias intraepiteliales del cervix. Estas vacunas se encuentran en fase III de pruebas clínicas, cuyos resultados determinarán el impacto en la población abierta. Los estudios de vacunas terapéuticas contra VPH, cuyo objetivo es lograr eliminar lesiones de cervix ya establecidas, aún no muestran la eficacia necesaria, para su implementación en la clínica.

Palabras clave. VPH. Vacuna. Cáncer cérvico-uterino.

www.medigraphic.com

INTRODUCCIÓN

El cáncer cérvico-uterino (CaCU) se previene a través de programas de muestreo diseñados para diagnosticar y tratar tempranamente, lesiones cervicales con riesgo a progresar a cáncer invasor. En las últimas décadas, los programas de detección oportuna han mostrado resultados satisfactorios en la detección de lesiones premalignas. Sin embargo, a pesar de los avances que se han logrado en el diagnóstico, cada año se detectan aproximadamente 500,000 casos nuevos de CaCU en el mundo, de los cuales cerca del 50% mueren por esta causa.¹ Esto representa un grave problema de salud pública en los países en vías de desarrollo, donde ocurre el 80% de las muertes anuales por esta neoplasia. En México, el CaCU constituye la primera causa de muerte por cáncer.²

Los estudios epidemiológicos han demostrado que el virus del papiloma humano (VPH) es el principal agente etiológico en el desarrollo de la neoplasia cervical; el DNA del virus se detecta en más del 99% de los tumores cervicales.³

A la fecha, se han identificado más de 200 tipos de VPH, de los cuales 80 han sido secuenciados por completo. Actualmente se ha clasificado a los papilomavirus en una familia de virus llamada *Papilomaviridae*. En esta familia se clasifica a todos los VPH conocidos de acuerdo con sus características filogenéticas, en géneros, tipos, subtipos y variantes.⁴

Mediante los estudios epidemiológicos de prevalencia, se ha determinado que cerca de 40 tipos de VPH tienen la capacidad de infectar la mucosa de los genitales. De éstos, alrededor de 18 tipos se han catalogado como papilomavirus de “alto riesgo”, debido a su asociación con cáncer invasor. Los tipos virales más frecuentes en el cáncer de cervix son los VPH16 y 18, que se encuentran en cerca del 65% de los casos de CaCU.^{3,5} A partir de 1995, la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer clasificó a los VPH16 y 18 como agentes carcinogénicos; mientras que los tipos 31 y 33 se clasificaron como probables agentes carcinógenos.⁶ Por otro lado, los tipos 6 y 11 son los aislados más frecuentes en lesiones proliferativas benignas, como las verrugas genitales o condilomas, por lo que pertenecen al grupo de VPH considerado de “bajo riesgo”.

BIOLOGÍA DEL VPH

El VPH consiste en un genoma de DNA de doble cadena circular. El genoma viral está organizado en tres regiones: una región temprana, donde se encuentran los genes implicados en la replicación viral (E1), con-

trol de la transcripción (E2), inmortalización y transformación celular (E5, E6 y E7). Una segunda región denominada tardía, que contiene los genes relacionados con la formación de la estructura externa (cápside), L1 y L2. Por último, una región donde se encuentran los sitios de unión para numerosos factores que inician o reprimen la transcripción, así como

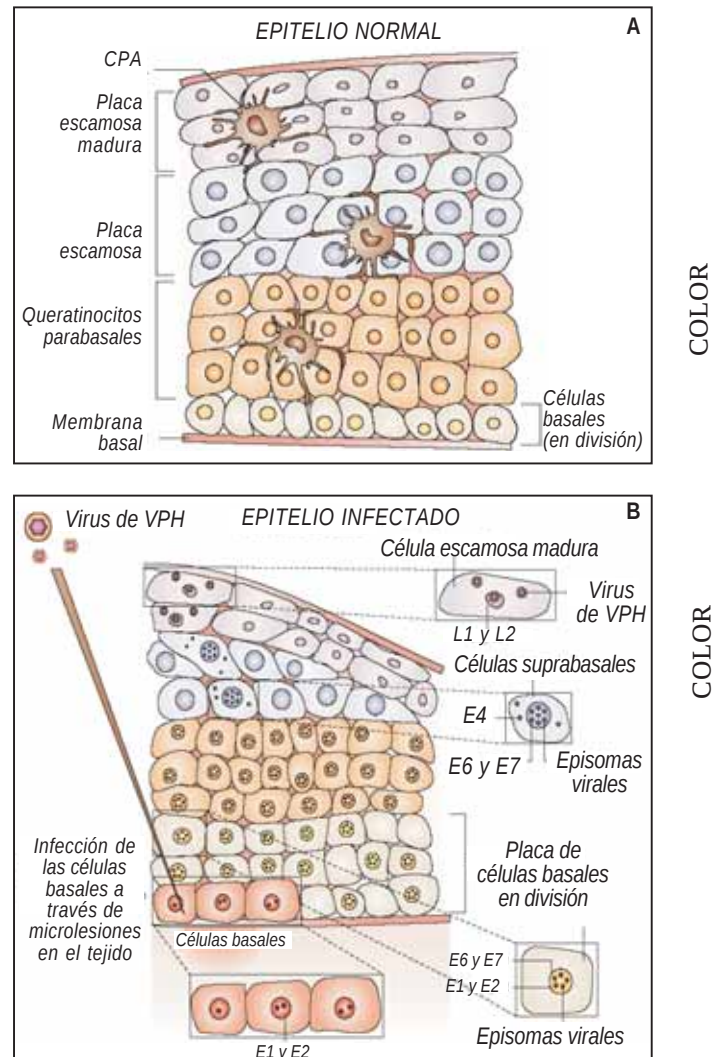


Figura 1. Historia Natural de la infección por VPH. **A.** Estructura y organización celular del epitelio normal del cervix. **B.** Características del ciclo de vida del VPH en la evasión del sistema inmune. El virus infecta las células basales del epitelio estratificado del cervix a través de lesiones que facilitan su acceso. Las proteínas virales tempranas se expresan principalmente en el núcleo de la célula infectada, mientras que las proteínas tardías, necesarias para la formación de la estructura externa de los viriones, se expresan solamente en los estratos superiores del epitelio, donde el sistema inmune es capaz de detectarlos. La tolerancia inmunológica del VPH no sólo depende de las características de las proteínas virales, sino también de la reducción en el número de células presentadoras de antígenos (CPA) que se observa en el epitelio durante la infección.

su replicación (Región Larga de Control, RLC). Aun cuando la proteína E4 se encuentra en la región temprana, se expresa en forma tardía y su principal función es la de interactuar y lisar la estructura de queratinas para la liberación de los viriones.⁷ Las proteínas tempranas, a excepción de E4, predominan en el núcleo, mientras que las proteínas tardías son más abundantes en el citoplasma (Figura 1B).⁸

El VPH infecta a las células basales del epitelio estratificado del cervix, a través de pequeñas lesiones, regiones de fácil acceso a células de reserva de la zona de transformación, donde el epitelio escamoso se une al epitelio glandular. Se replica exclusivamente en las placas inferiores del epitelio estratificado, donde se mantiene como un elemento extracromosomal (episoma) (Figura 1B). A la fecha, aún queda por determinar con exactitud el receptor implicado en la infección. Un fuerte candidato es la integrina α -6, debido a que esta molécula sólo se expresa en las células basales del epitelio.⁹ Se postula que el estrato donde ocurre la infección determina la persistencia de la infección. Es decir, la infección de las células basales persiste por más tiempo, que cuando sucede en las células de estratos superiores, donde la infección resulta transitoria.

La infección por el VPH es la más frecuente entre las enfermedades de transmisión sexual, se estima que entre 70 a 80% de las mujeres son infectadas con VPH al menos una vez en su vida.¹⁰ La prevalencia de VPH, reportada por diversos estudios, varía del 5 al 40% en las mujeres sexualmente activas en edad productiva. Se ha observado que la prevalencia de la infección por VPH es más alta entre mujeres jóvenes al inicio de su vida sexual.¹¹ Gradualmente con el transcurrir de los años, se observa una reducción en la frecuencia de la infección hasta la 4ta. o 5ta. década de la vida, donde ocurre un aumento en la prevalencia. La reducción de la prevalencia de VPH puede estar asociada a la inmunidad adquirida para la eliminación de la infección. El aumento posterior de esta prevalencia puede ser un reflejo de la pérdida de la inmunidad adquirida, como resultado de ajustes hormonales propios de la edad, que dieran lugar a la reactivación de una infección latente o la infección con un tipo viral nuevo.¹²

LA RESPUESTA INMUNE NATURAL CONTRA EL VPH

La infección por VPH puede ser subclínica o clínicamente visible. En la primera, se encuentra al DNA viral sin que el epitelio manifieste ninguna alteración morfológica. La infección se hace evidente por la presencia de coilocitos en etapa temprana (células indica-

tivas de infección por VPH); y en etapa más avanzada, por alteración en la estructura del epitelio (lesiones de bajo y alto grado).¹³

En la mayoría de los casos, la infección por VPH es eliminada por completo por la respuesta inducida del sistema inmunológico. Se ha observado que un alto porcentaje de las lesiones de bajo y alto grado presentan una regresión en forma espontánea, acompañada por una respuesta inmune celular y humoral contra antígenos específicos del virus. Conforme la lesión progresa, la capacidad para presentar una regresión disminuye. Cerca de 60% de las lesiones de bajo grado (NIC 1) presentan regresión en un periodo de un año y 90% hasta en cuatro años. De este modo, sólo 10% de las lesiones de bajo grado progresan a lesiones de grado intermedio (NIC 2), donde el riesgo de progresar a una lesión de alto grado (NIC 3) aumenta a 28%.¹⁴ Si bien aun cuando el sistema inmune sea capaz de eliminar las lesiones causadas por VPH, no se genera protección contra subsecuentes infecciones, lo que sugiere que la inmunidad adquirida por la infección previa es de corta duración.

En las lesiones que no se presenta regresión, se postula que el sistema inmune es incapaz de generar una respuesta adecuada contra el VPH, lo cual está asociado principalmente a estados de inmunodepresión, como la que se presenta en individuos infectados con VIH o receptores de trasplantes.¹⁵ Se ha propuesto que la respuesta inmune mediada por células o anticuerpos contra los antígenos de VPH es muy débil, incluso durante la fase productiva de la infección. Sin embargo, la gran mayoría de las lesiones por VPH son eventualmente eliminadas por mecanismos desconocidos. Se sugiere que la inmunidad celular está fuertemente implicada en este proceso. La importancia indiscutible de la inmunidad celular en el control de la infección por VPH surge del hecho de que la mayoría de las regresiones espontáneas de las lesiones premalignas están infiltradas con células T CD4+ y CD8+ activadas.¹⁶

Es claro que en algunos casos el sistema inmune es incapaz de reconocer a los viriones y activar una respuesta adecuada contra el VPH. A este respecto, se han propuesto posibles explicaciones relacionadas con las características del ciclo de vida del virus, el cual está estrechamente relacionado con la diferenciación del epitelio del cervix. El virus infecta las células basales, donde se replica para mantener un número constante de copias del genoma viral. Es en las células basales y parabasales donde se inicia la expresión de las proteínas tempranas: E1 y E2, implicadas en la replicación y control de la transcripción; E5, E6 y E7, oncogenes transformantes cuyo papel principal en esta

etapa del ciclo consiste en promover la proliferación celular e inhibir la apoptosis (Figura 1B). Si bien, las proteínas o antígenos virales tempranos que se expresan son altamente inmunogénicas, estos antígenos virales no son presentados en forma adecuada al sistema inmune, debido a que sus niveles de expresión son bajos y se localizan principalmente en el núcleo.⁸

De diversas formas la expresión de los oncogenes virales E5, E6 y E7 contribuye en forma sustancial para que el sistema inmune no se active. Las células infectadas por virus producen interferón (IFN) como uno de los primeros mecanismos de defensa, lo que permite a la célula infectada responder ante la infección. Sin embargo, la expresión de E6 y E7 en las células infectadas reduce la expresión de citocinas como el interferón alfa (IFN- α) y Beta (IFN- β), así como también los genes que responden a IFN.^{17,18} Este efecto solamente se ha observado en los VPHs de alto riesgo y en ciertos VPHs de bajo riesgo, como el VPH6, donde el tratamiento con IFN no tiene efecto.¹⁹ Otros mecanismos por los que VPH altera al sistema inmune incluyen la inhibición de la expresión de la IL-18 (citocina muy importante en la activación de los linfocitos T cooperadores), como consecuencia de la expresión de E6.²⁰ Por otra parte, E5 reduce la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I.²¹ Este efecto imposibilita a los linfocitos T citotóxicos para reconocer a las células infectadas. Las células asesinas naturales tampoco pueden reconocerlas, debido a que la reducción de los niveles de IL-18 disminuye la efectividad de una respuesta celular de este tipo.

La reducción en la expresión de moléculas de adhesión en las células epiteliales también se relaciona con la respuesta inmune inadecuada. Como es el caso de células infectadas con E6 del VPH16, donde la reducción en los niveles de E-caderina se asocia con una disminución en el número de células presentadoras de antígenos (CPA) presentes en el epitelio cervical.²²

A medida que se inicia la diferenciación celular, también se activa la expresión de las proteínas tardías; L1, L2 y E4. Los viriones se forman en las placas superiores del epitelio, donde con ayuda de E4 son liberados sin causar la destrucción de la célula. Sin embargo, en este nivel no se encuentran células presentadoras de antígenos (CPA) que activen la respuesta inmune. De esta forma, aunque las proteínas de la cápside son altamente inmunogénicas y se expresan en abundancia, son invisibles para el sistema inmune. Se debe enfatizar que en este tipo de infección no existe una fase virémica que cause la generación de señales de peligro, como son los mediadores de inflamación. Del mismo modo, tampoco se liberan antígenos que permitieran la activación

de las células presentadoras de antígenos locales, tales como las células dendríticas.

VACUNAS CONTRA EL VPH

El hecho de que la infección persistente por el VPH es la causa principal del CaCU proporciona una oportunidad excepcional para el diseño de una vacuna que prevenga el desarrollo del cáncer. La prevención primaria del CaCU puede efectuarse a través del control de las infecciones genitales con VPHs de alto riesgo. Actualmente dos tipos de vacunas se encuentran en desarrollo: las vacunas profilácticas, dirigidas a la prevención de la infección por VPH y las vacunas terapéuticas, cuyo principal objetivo es inducir la regresión de las lesiones premalignas o la remisión de CaCU avanzado.

Vacunas profilácticas: VLPs

El objetivo principal de las vacunas profilácticas consiste en inducir la generación de anticuerpos neutralizantes de la infección. Estos anticuerpos actúan sobre la estructura externa de los viriones, inhibiendo su unión con las células epiteliales durante el contacto sexual, lo que reduce el número de células infectadas.

Por muchos años fue difícil el desarrollo de una vacuna profiláctica dirigida contra el VPH, ya que la producción de las proteínas virales de la cápside sólo ocurre en un epitelio que haya entrado en su programa de diferenciación. Por este motivo, en los cultivos celulares típicos los viriones no se producen, de tal forma que no se cuenta con antígenos para la generación de vacunas. Con el desarrollo de nuevas tecnologías se logró la generación y purificación de los viriones, los cuales se obtuvieron a partir de la infección con VPH de cultivos celulares que simulan un epitelio en diferenciación, llamados "cultivos organotípicos".²³ Si bien, a través de esta metodología obtienen partículas virales, el número de viriones generado es mínimo, lo que no resulta suficiente para su uso como antígenos en el desarrollo de una vacuna.

Aun con la obtención de los viriones, quedan aspectos que debían considerarse. Como en toda vacuna, el antígeno debe estar atenuado o modificado, de tal forma que permita al sistema inmune generar una respuesta sin ocasionar daño alguno al organismo. Aunque los viriones podrían ser atenuados, éstos contendrían a los oncogenes virales, lo cual seguramente haría imposible su uso como una vacuna profiláctica. Por ello el desarrollo de las vacunas contra VPH se ha basado principalmente en las proteínas estructurales

L1 y L2, las cuales son inmunogénicas y no poseen capacidad oncogénica.

Mediante la tecnología de DNA recombinante se ha logrado la expresión de las proteínas L1 y L2 en diferentes sistemas celulares.²⁴ La expresión en células eucariontes (levaduras y células de insecto) resultó ser el mejor de los sistemas, dado que en ellas la proteína L1 expresada se ensambla y se pliega por sí sola, generando partículas con una estructura morfológica semejante al virus, por lo que han sido llamadas partículas parecidas a los virus (VLPs) (Virus Like Particles) (Figuras 2A y B).²⁵ L1 es la única proteína requerida para la producción de estas partículas, de modo que las VLPs no poseen potencial oncogénico y resultan ser una excelente opción para ser utilizadas como vacuna. Si bien, la estructura original del virus está constituida principalmente por las proteínas L1 y en menor grado L2; los ensayos con VLPs generados a partir de L1 y L2 no muestran diferencias en los nive-

les de anticuerpos generados, con respecto a las VLPs constituidas exclusivamente por L1.²⁶

Las VLPs han demostrado ser capaces de generar protección contra tipos específicos de papilomavirus en diversos modelos animales.²⁷ La vacunación con VLPs genera altos niveles de anticuerpos específicos contra la proteína L1 correspondiente, lo que proporciona protección contra subsecuentes infecciones. Además, se ha observado que la administración del suero de animales inmunizados genera una protección transitoria contra la infección, en animales sin inmunizar. Los anticuerpos neutralizantes presentes en el tracto genital provienen del plasma o bien son sintetizados por células plasmáticas localizadas en el tracto genital. Si bien en modelos animales los títulos altos de anticuerpos se mantienen en un nivel suficiente a lo largo del ciclo menstrual, en humanos no sucede lo mismo. Durante el ciclo menstrual se observa una ligera reducción en los títulos de anticuerpos durante el periodo de ovulación. Esto indicaría que la vacuna contra el VPH tendría una menor eficiencia durante la fase ovulatoria.²⁸

Estudios referentes a la forma de inoculación han demostrado que la inoculación nasal y oral con VLPs genera altos niveles sistémicos de anticuerpos.^{29,30} De igual forma, se observó que la inoculación intramuscular con VLPs de VPH16 induce la generación de anticuerpos en secreciones cervicales. Al comparar la inoculación oral contra intramuscular, se observó que a través de ambos métodos se obtiene una buena producción de anticuerpos circulantes, siendo la IgG el anticuerpo más abundante en el plasma, mientras que los anticuerpos más frecuentes en secreciones cervicales fueron las IgG e IgA.³⁰

Tipos virales incluidos en las vacunas

Un aspecto clave en el desarrollo de la vacuna del VPH es el número de tipos de VPHs que se deben incluir como inmunógenos. A través de los diferentes estudios epidemiológicos realizados a la fecha, se ha podido conocer la distribución de los VPHs en el CaCU. Los datos de estudios recientes indican que una vacuna bivalente, que incluya tanto antígenos de VPH16, como de 18, podría prevenir hasta 70% de tumores cervicales, mientras que una vacuna pentavalente (VPH16, 18, 45, 31 y 33) podría prevenir hasta 85% de los carcinomas cervicales.³¹

Algunos autores han propuesto que en el diseño, también debería de considerarse la diferente prevalencia de variantes intra-tipo de VPH, según la población a la que la vacuna va dirigida. Se sabe que ciertas variantes están asociadas con una mayor o menor onco-

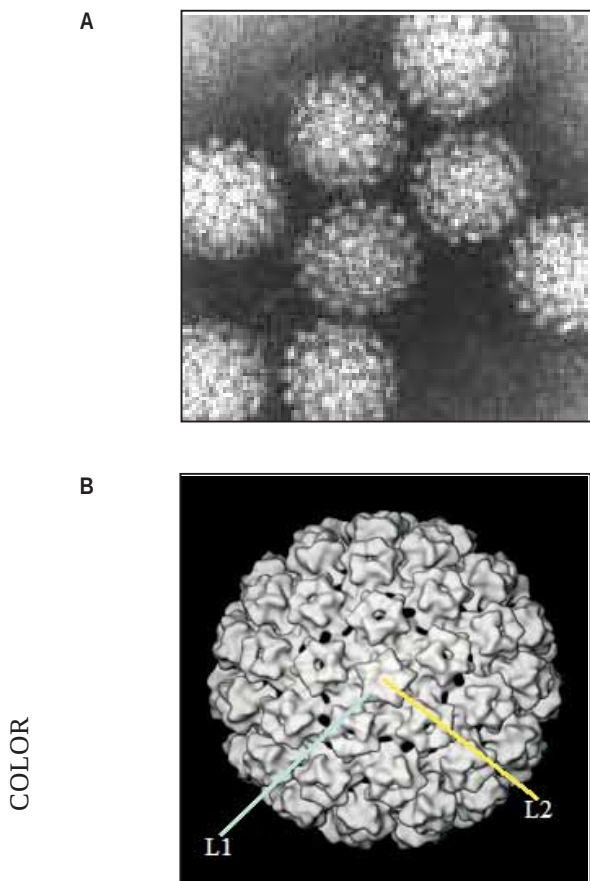


Figura 2. A. Micrografía electrónica de viriones del virus del papiloma bovino. B. Estructura de una VLP del VPH. Reconstrucción tridimensional de una VLP constituida por L1 y L2.

genicidad y que la distribución de estas variantes prevalece en poblaciones bien definidas.³²⁻³⁶ Si bien el gen L1 es sumamente conservado entre los VPHs, las diferencias que existen con respecto a los aislados de referencia, podrían repercutir en la respuesta de una vacuna diseñada contra una variante específica. Sin embargo, el estudio realizado con diferentes VLPs contruidos a partir de L1 de distintas variantes de HPV16 ha demostrado que los anticuerpos generados presentan una protección cruzada, lo que indicaría que estas VLPs pertenecen a un serotipo único.³⁷ La propuesta sería que la vacunación con VLPs genere anticuerpos que confieran un grado similar de protección contra todas las variantes del tipo viral del que fue diseñado.

Pruebas clínicas en desarrollo

Actualmente dos compañías farmacéuticas: GlaxoSmithKline (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgium) y Merck & Co. (Whitehouse Station, NJ), están implicadas en el desarrollo e investigación de vacunas profilácticas contra VPH. Cada compañía ha desarrollado una vacuna, basada en VLPs con características diferentes entre sí. GSK propone una vacuna bivalente, que incluye una mezcla de VLPs ensambladas a partir de las proteínas L1 de VPH16 y VPH18 (20 µg de VLPs de L1 de VPH16 y 20 µg de VLPs de L1 de VPH18). Estas partículas se generan en células de insecto *Spodoptera frugiperda* Sf-9 a partir de un baculovirus recombinante.³⁸

Por otra parte, Merck ha desarrollado dos vacunas, una monovalente con VLPs compuestas de L1 de VPH16 y una tetravalente, con una mezcla de VLPs con L1 de VPH16, 18, 6 y 11 (20 µg VPH6, 40 µg VPH11, 40 µg VPH16 y 20 µg VPH18); estas partículas se sintetizan en *Saccharomyces cerevisiae*.³⁹

Los estudios clínicos fase I para analizar la seguridad, la inmunogenicidad y el grado de tolerancia de estas vacunas, fueron satisfactorios. Los resultados mostraron una respuesta inmune serológica homogénea con un alto índice de protección contra infecciones persistentes en mujeres infectadas, además de mínimos efectos colaterales.³⁸

Los primeros resultados en fase clínica II de Cervarix, la vacuna bivalente contra el VPH16 y 18 (GSK), se obtuvieron de un estudio controlado doble ciego al azar en 1,113 mujeres entre 15 y 25 años de 32 instituciones de EUA, Canadá y Brasil. La vacuna fue administrada en tres dosis por inyección intramuscular a los meses 0, 1 y 6; las pruebas de detección de ADN de HPV fueron realizadas a los meses 0, 6, 12 y 18. En el análisis por protocolo de este estudio, la eficacia de la

vacuna fue de 95% para eliminar las infecciones incidentes de VPH16; 91% contra VPH18 y 92% contra VPH16 y 18; con 100% de eficiencia para combatir infecciones persistentes de VPH16 y 18. La correlación con el diagnóstico citológico muestra que la eficiencia para eliminar la infección cervical persistente con VPH16 y 18 en muestras con citología normal fue de 95%, mientras que en muestras con anormalidades citológicas, la eficiencia fue menor (92%).⁴⁰ Los resultados posteriores de estas pacientes seguidas durante 4.5 años mostraron que en las pacientes vacunadas los títulos de anticuerpos se mantuvieron cerca de 14 a 17 veces por encima de los detectados en las infecciones naturales por VPH. A este tiempo, la protección contra infecciones persistentes de VPH16 y 18 continuó siendo de 100%, con una protección semejante contra las neoplasias del cervix asociadas a los mismos tipos virales. Un hallazgo muy importante de este estudio fue la protección cruzada observada contra infecciones incidentes de tipos virales no incluidos en la vacuna, VPH45 (94.2%) y VPH31 (54.5%), relacionados filogenéticamente con los tipos VPH18 y 16, respectivamente. Dado que la proporción de cáncer de cervix atribuible a los VPH16 y 18 es de 70%, la eficiencia sumada de esta vacuna para eliminar infecciones persistentes de VPH45 y 31, ampliaría su rango de acción sobre 80% de los tumores de cervix.⁴¹

Por su parte, la eficacia de las vacunas monovalente y tetravalente de Merck ha sido analizada en estudios independientes. Los primeros resultados con la vacuna profiláctica VLP L1 VPH16 fueron obtenidos en un estudio controlado con placebo doble ciego al azar en un grupo de 2,392 mujeres. La vacuna fue administrada en tres dosis (0, 2 y 6 meses) vía intramuscular. Al séptimo mes de la administración de la vacuna, los niveles de anticuerpos obtenidos fueron 145 veces mayores en los individuos vacunados comparados con el grupo control. De igual forma que con la vacuna GSK, se obtuvo 100% de protección contra infecciones persistentes y displasias relacionadas con VPH.³⁹ A los 3.5 años de seguimiento de estas pacientes, aunque la vacuna no muestra una eficacia total contra infecciones persistentes de VPH16 (95%), presenta 100% de protección contra lesiones del cervix de alto grado.⁴²

Con el objetivo de ampliar el espectro de protección contra el VPH, Merck desarrolló la vacuna tetravalente Gardasil. Esta vacuna incluye a los VPHs 16, 18 y a los VPHs no oncogénicos 6 y 11, que son los tipos más frecuentes asociados a verrugas anogenitales.⁵ En modelos animales se ha demostrado que la vacunación con VLPs de múltiples tipos de papilomavirus no reduce la respuesta específica que cada antígeno induce por separado.⁴³ Los resultados preliminares mostraron

una buena tolerancia con altos niveles de anticuerpos neutralizantes. La fase clínica II para analizar la eficacia de esta vacuna se realizó en un grupo de 552 mujeres de 16 a 23 años originarias de Brasil, Europa y Estados Unidos. La comparación del grupo vacunado contra placebo a los dos años de seguimiento demostró que la vacuna reduce significativamente la incidencia combinada de las infecciones persistentes por los tipos incluidos en la vacuna, con 90% de eficacia. La vacuna fue 100% eficaz para prevenir el desarrollo de lesiones cervicales asociadas a los tipos virales 6, 11, 16 y 18. El impacto de esta vacuna sobre la incidencia de verrugas genitales aún no se ha determinado.⁴⁴ Actualmente estos resultados se encuentran en evaluación para su aprobación por la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos) y su comercialización (<http://www.fda.gov>). Los expertos esperan que la agencia realice su decisión en junio del 2006.

Actualmente el estudio fase III (FUTURA II) que está en desarrollo, pretende reclutar más de 25,000 mujeres y hombres, de 16 a 26 años de edad, provenientes de diferentes países como Brasil, Colombia, Dinamarca, Finlandia, Islandia, México, Noruega, Perú, Polonia, Singapur, Suecia, Inglaterra y Estados Unidos.⁴⁵

Esta medida permitirá evaluar el efecto de la vacuna Gardasil en diferentes grupos étnicos y condiciones sociodemográficas. El uso de esta vacuna estará dirigido a prevenir la mayoría de las lesiones de CaCU, así como a disminuir la frecuencia de verrugas genitales. A su vez, se está desarrollando un estudio a tres años en hombres homosexuales y heterosexuales de 16 a 26 años de edad, con el fin de determinar la eficacia de Gardasil para reducir la incidencia de verrugas genitales, así como de displasias y cáncer anal.⁴⁶

GSK, por su parte, desarrolla en forma paralela un estudio multicéntrico fase III en cerca de 28,000 mujeres, para evaluar la eficacia de Cervarix. A su vez, GSK piensa desarrollar una vacuna tetravalente que incluya solamente tipos de VPH oncogénicos.⁴⁷

Por otro lado, el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH) ha desarrollado una vacuna de VLPs contra el VPH16. El objetivo del grupo de investigadores a cargo de esta vacuna no es la comercialización; sin embargo, sus ensayos han mostrado una buena tolerancia con altos niveles de anticuerpos neutralizantes. Sus investigaciones se han enfocado en pruebas clínicas conducidas de forma independiente en América Central.³⁸

Vacunas terapéuticas

Las vacunas terapéuticas, a diferencia de las vacunas profilácticas, tienen como objetivo la activa-

ción de la respuesta inmune celular para eliminar lesiones ya establecidas o inclusive células cancerosas. De este modo, pretenden contribuir al tratamiento de cáncer invasor, funcionar como terapia adyuvante para prevenir la recurrencia o metástasis, eliminar lesiones de bajo grado, así también lesiones hiperproliferativas benignas, como es el caso de las verrugas genitales.

Las estrategias para vacunación terapéutica básicamente pretenden activar a la inmunidad celular, que se sabe indispensable en los procesos de regresión de las lesiones. Cabe mencionar que la vacunación profiláctica con VLPs, además de generar altos niveles de anticuerpos neutralizantes, puede inducir una respuesta inmune celular específica contra la proteína L1.⁴⁸ Sin embargo, estas proteínas virales (L1 y L2) no se expresan en las células basales, ni en las células indiferenciadas de las lesiones premalignas o cáncer.⁸ Por lo tanto, es poco probable que la respuesta inmune celular generada por estas vacunas profilácticas elimine las lesiones establecidas.

El mayor obstáculo para el desarrollo de una vacuna terapéutica es que las determinantes inmunológicas para la persistencia viral o regresión no se han definido. Las proteínas virales no estructurales E1, E2, E5, E6 y E7 podrían ser los antígenos apropiados para el desarrollo de vacunas terapéuticas. Sin embargo, como resultado de la integración del genoma viral al celular, E1 y E2 no se expresan constitutivamente en los carcinomas. Por otro lado, aunque la proteína E5 se expresa en diferentes grados de lesión por VPH, posee una inmunogenicidad limitada. Por lo tanto, la mayoría de los esfuerzos para desarrollar una vacuna terapéutica se han encaminado al empleo de las proteínas E6 y E7 o péptidos derivados de éstas. E7 es un buen candidato, ya que su secuencia se conserva entre los VPHs, se ha caracterizado inmunológicamente y es de las proteínas virales más abundantes en las lesiones.⁸ En contraste, la proteína E6 presenta una estructura muy variable entre los VPHs.⁴⁹

Las proteínas E6 y E7 también han sido utilizadas en el desarrollo de vacunas profilácticas basadas en VLPs. Estas vacunas han sido denominadas quimeras, debido a que su estructura está constituida por secuencias de proteínas no estructurales (E6 y E7), así como de las proteínas estructurales L1 y L2. La inmunización con este tipo de vacuna, además de generar altos niveles de anticuerpos neutralizantes, presenta una protección antitumoral mediada por linfocitos citotóxicos.⁵⁰ Por tal motivo, se ha propuesto para ser utilizado como terapia para inducir la regresión de tumores o lesiones premalignas.

Vacunas basadas en vectores

Los vectores vivos virales o bacterianos se han utilizado como medios de transporte para generar una fuerte respuesta inmune con mínima toxicidad. Algunos virus modificados en su constitución genética han sido utilizados como medios de transporte de antígenos específicos. La vacuna generada a partir del virus de la vaccinia, construida para expresar formas modificadas de las proteínas E6 y E7 (llamada TA-HPV), genera una fuerte actividad citotóxica antitumoral.⁵¹ Los ensayos en pruebas clínicas fase I y II indican que algunos pacientes con lesiones de alto grado y cáncer cervical invasor desarrollan respuesta inmune de células T después de la vacunación.⁵² Otros estudios han empleado a los adenovirus modificados como vectores para la expresión de las proteínas E6 o E7 de VPH16, demostrando un aumento de la respuesta inmune celular contra dichos antígenos y actividad antitumoral.⁵³ El uso de vectores virales no solamente se basa en la expresión de formas modificadas de proteínas virales. El virus de la encefalitis equina venezolana replica el RNA de interés en el citosol de la célula infectada. Las características citopáticas del virus reduce el riesgo de integración de E6 y E7 al genoma celular. Los resultados con esta vacuna en modelos murinos muestran 67% de eliminación de tumores.⁵⁴

BACTERIAS CON PATOGENICIDAD ATENUADA

El uso de bacterias atenuadas como medio de transporte de antígenos es una herramienta promisorio para el desarrollo de vacunas terapéuticas. *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Shigella* y *E. coli*, son algunos de los vectores bacterianos más empleados en la inmunoterapia contra el CaCU. Estos vectores pueden transportar plásmidos o partículas virales que contienen genes de interés o proteínas virales, los cuales al ser fagocitados por las CPA facilitan la presentación de los antígenos virales a los complejos mayor de histocompatibilidad I y II. Después de ser fagocitada por los macrófagos, *L. monocytogenes* produce una enzima (listeriolisina O) que permite su escape hacia el citoplasma evitando la degradación enzimática. Esto permite que los antígenos presentes sean presentados al CMH clase I y II.⁵⁵ Recientes estudios han demostrado que la vacunación oral o intraperitoneal de ratones con bacterias recombinantes de *L. monocytogenes* que contienen al gen E7 del VPH16, es capaz de prevenir y erradicar tumores que expresan E7.⁵⁶ El bacilo de Calmette-Guerin (BCG; *Mycobacterium bovis* atenuado) es otro ejemplo de bacterias utilizadas para el transporte

de E7 y L1 de VPH16. Este sistema induce una respuesta inmune humoral, con un alto índice de citotoxicidad específica contra E7.⁵⁷

PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS

La identificación y caracterización de epítopes murinos (H-2Db) y humanos (HLA-A.2) para VPH16 ha permitido el desarrollo de vacunas contra el CaCU basadas en péptidos.^{58,59} Las vacunas basadas en péptidos son relativamente fáciles de preparar y baratas. Se ha demostrado que los péptidos de E7 de VPH16 y 18 activan la respuesta citotóxica; sin embargo, su eficiencia en la regresión de tumores es mínima.⁶⁰ En un estudio realizado por Munderspach, *et al.* (2000) en pacientes con neoplasia intraepitelial de alto grado, vacunados por un péptido de E7 de VPH16, se reportó una reducción parcial de las lesiones.⁶¹ Un problema que se presenta en el uso de esta metodología es que los epítopes de estos péptidos estarán restringidos a moléculas específicas del CMH, de modo que la protección estaría limitada a un grupo de pacientes con ciertas características inmunológicas y esta terapia no podría aplicarse a la población abierta.

Por otra parte, se han evaluado algunas vacunas basadas en la unión de fragmentos de proteínas virales. Como es el caso de TG-GW, la cual contiene fragmentos de E7 y L2 del VPH6. Éstas ya han sido probadas como tratamiento clínico para verrugas genitales con buenos resultados.⁶² Su versión para el tratamiento de lesiones premalignas es TA-CIN, la cual contiene proteínas de fusión de L2/E6/E7 del VPH16. En modelos murinos se ha observado que esta vacuna induce una respuesta inmune de células T CD8+ y protege contra el desarrollo de tumores.⁶³ En pacientes, el uso de TA-CIN induce una respuesta inmune tanto humoral como mediada por células.⁶⁴ Los resultados obtenidos en estas vacunas pueden ser mejorados a través del uso de adyuvantes que potencian el efecto observado. Algunos de ellos, como la proteína HSP65 (proteína de choque térmico) fusionada con E7 de VPH16 causa la regresión de tumores que expresan E7 en ratones; este efecto es dependiente de linfocitos CD8+, pero independiente de CD4+.⁶⁵ Actualmente esta vacuna se encuentra en pruebas clínicas con Stressgen Biotechnology para su uso en el tratamiento de displasias anales asociadas con VPH, mientras que el Instituto Nacional de Cancerología de los Estados Unidos está probando su eficiencia en el tratamiento de CaCU.

VACUNAS BASADAS EN DNA

Las vacunas de DNA desnudo, además de ser estables y fáciles de aplicar, permiten una óptima expresión de antígenos involucrados en la respuesta inmune. El DNA puede mantenerse en forma episomal, o bien, integrarse al genoma celular, lo que permite la expresión del antígeno por un largo periodo. Sin embargo, debido a la baja inmunogenicidad de las vacunas de DNA, se han empleado células dendríticas (CD) como sus transportadoras, para aumentar el potencial de acción de las vacunas.⁶⁶ Con este mismo objetivo, se han realizado mezclas de vacunas de DNA de E7 con interleucinas y moléculas coactivadores de linfocitos T CD8+.⁶⁷ Asimismo, se han empleado proteínas antiapoptóticas (Bcl-2 y Bcl-xL), para aumentar la respuesta inmune contra E7 en tumores y la supervivencia de las CDs.⁶⁸ Los resultados de las pruebas clínicas fase I y II con una vacuna de DNA de VPH16 (ZYC101), han demostrado que esta vacuna incrementa la respuesta inmune contra sus epítopes y es capaz de causar la resolución de displasias de alto grado en un periodo de seis meses.⁶⁹

TERAPIA CELULAR

Las células dendríticas tienen un papel muy importante en la presentación de antígenos a través del complejo mayor de histocompatibilidad clase I. Su empleo como vacuna terapéutica consiste en el transporte de proteínas o péptidos de los oncogenes E6 y/o E7, además de que estas células pueden ser transfectadas con ácidos nucleicos que codifican para ciertos antígenos. En algunos estudios se ha observado que las CDs autólogas que contienen E7 del VPH16 y 18, inducen en los pacientes una respuesta inmune antitumoral mediada por células T.⁷⁰

Actualmente ha tomado gran importancia el uso de la transferencia adoptiva de células T. Esta metodología es una nueva estrategia de tratamiento, que consiste en la activación y expansión *in vitro* de los linfocitos T citotóxicos del paciente contra antígenos específicos y su reintroducción al paciente como una medida terapéutica.⁷¹ En modelos preclínicos, este tipo de terapia ha demostrado resultados satisfactorios en la eliminación de tumores VPH16.⁷² Sin embargo, el principal obstáculo para el uso de esta terapia consiste en los bajos niveles de linfocitos T citotóxicos contra antígenos tumorales presentes en los pacientes con cáncer. Para abordar este problema se están realizando pruebas con linfocitos T (aislados de sangre periférica) transfectados con receptores específicos para epítopes virales, lo cual elimina la necesidad de aislar

células T específicas contra antígenos tumorales. La transferencia de receptores de células T por medio de retrovirus, aumenta el número de células T específicas contra el tumor.⁷³ Aunque ésta parece ser una estrategia prometedora, queda por determinar los efectos en la autoinmunidad y los efectos secundarios de su uso.

CONCLUSIONES

La mayoría de las mujeres infectadas con VPH eliminan la lesión. Sin embargo, en algunos casos existe un prolongado periodo de latencia desde el inicio de la infección hasta la progresión de la lesión, lo que indica que el VPH es capaz de evadir el sistema inmunológico. De este modo, la activación temprana de la respuesta inmune contra el VPH es indispensable para prevenir el establecimiento de una infección persistente y sus consecuencias, objetivo que las vacunas profilácticas pretenden alcanzar. Se considera que en el transcurso del 2006, tanto la vacuna bivalente de GSK como la tetravalente de Merck tendrán su registro listo para su comercialización. Actualmente, los ensayos clínicos en fase III se están llevando a cabo con ambas vacunas en diferentes regiones del mundo. Entre otras cosas, estos estudios pretenden determinar el impacto de la vacunación en países con una alta incidencia de cáncer cervico-uterino, como es el caso de México. La implantación posterior de estas vacunas a estas poblaciones merece consideraciones especiales. Se sabe que en países en vías de desarrollo una de las fallas importantes en la detección oportuna del cáncer de cervix está en la deficiente cobertura en los programas de tamizaje. Las mujeres que no tienen acceso a estos programas, muy posiblemente tampoco lo tendrían a la vacunación, por lo que la vacuna no tendría el impacto esperado en la reducción de la incidencia de cáncer en estos grupos de alto riesgo. De este modo, es importante que los sistemas de salud den prioridad a programas que permitan no sólo el acceso de la vacuna a poblaciones sin recursos, sino que generen una cultura en donde la gente entienda la importancia de la vacunación. A su vez, es necesario diseñar el modelo de difusión idóneo que permita el acceso a una vacuna de este tipo, de acuerdo con las diversas características socioculturales de las poblaciones.

Ciertos hallazgos muestran que estas vacunas, además de proteger contra los tipos virales específicos, también pueden proteger, aunque con menor eficiencia, contra tipos relacionados filogenéticamente (VPH 31, 45 y 52). Aunque esto amplía su rango de acción, no protege contra los otros tipos de VPH

implicados en cáncer. De esta manera, estas vacunas no eliminarían el riesgo al desarrollo de cáncer cérvico-uterino, inducido por tipos de VPH menos frecuentes, pero también de alto riesgo. Es importante hacer hincapié que en ninguna de las pruebas clínicas con vacunas profilácticas se evitó la infección, pero sí se ha logrado eliminar a las infecciones persistentes y a un significativo porcentaje de las incidentes. Es claro entonces que una vacuna de este tipo no podría reemplazar a la prueba de Papanicolaou como método de detección oportuna del cáncer cérvico-uterino. Esto indica que los programas de detección oportuna de cáncer no deben de ser modificados con la introducción de estas vacunas. Los efectos de las vacunas en la disminución de la incidencia del cáncer cérvico-uterino determinarán en un futuro a largo plazo si en las mujeres vacunadas la periodicidad recomendable de las pruebas de tamizaje pudiera extenderse.

Aun con los prometedores hallazgos acerca de las vacunas profilácticas contra VPH, aún quedan varios puntos por establecer. Los estudios actuales determinan que la protección se ha mantenido por lo menos durante 4.5 años. El seguimiento posterior definirá si se requiere de refuerzos para mantener títulos eficientes de anticuerpos protectores. Con respecto a la edad óptima de vacunación, el rango de edad en que hasta ahora se muestra la mayoría de los resultados es de 16 a 23 años. Sin embargo, ciertos estudios revelan que el título de anticuerpos neutralizantes inducidos por la vacuna Gardasil es significativamente mayor en el grupo de niños de 10 a 15 años de edad, que en el de adolescentes de 16 a 23 años.⁷⁴ Este hallazgo es importante puesto que la vacuna sería de mayor beneficio si se administra antes del inicio de la vida sexual activa. A este respecto, también se debe considerar que las características socioculturales influyen en la edad de inicio de la vida sexual, lo que podría indicar que en las diferentes regiones la edad óptima de vacunación pudiera variar. De igual forma resulta importante conocer si la vacunación induce alguna respuesta positiva en mujeres que ya hayan sido expuestas a infecciones con VPH o inclusive que ya presenten alguna lesión por VPH.

Por su parte, los estudios que actualmente se llevan a cabo en hombres mostrarán si el impacto en la disminución de infecciones por VPH es mayor al vacunar tanto a hombres como a mujeres.⁴⁷

El efecto real de una vacuna profiláctica contra el VPH sólo se conocerá a fondo dentro de varios años, en donde la eficacia de la misma repercuta en la disminución de la incidencia de cáncer cérvico-uterino en el grupo de mujeres vacunadas.

REFERENCIAS

1. World Health Report 2004. Changing History Statical annex. World Health Organization, <http://www.who.int/whr/2004/en/index.htm>.
2. Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas RHNM. Dirección General de Epidemiología SSA. México. 2002.
3. Bosh FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55(4): 244-65.
4. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324(1): 17-27.
5. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. *N Engl J Med* 2003; 348(6): 518-27.
6. Franceschi S. The IARC commitment to cancer prevention: the example of papillomavirus and cervical cancer. *Recent Results. Cancer Res* 2005; 166: 277-97.
7. Roberts S, Ashmole I, Rookes SM, Gallimore PH. Mutational analysis of the human papillomavirus type 16 E1/E4 protein shows that the C terminus is dispensable for keratin cytoskeleton association but is involved in inducing disruption of the keratin filaments. *J Virol* 1997; 71(5): 3554-62.
8. Middleton K, Peh W, Southern S, Griffin H, Sotlar K, Nakahara T, et al. Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *J Virol* 2003; 77(19): 10186-201.
9. Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K, McMillan NA. Identification of the alpha-6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol* 1997; 71(3): 449-56.
10. Crum CP, Abbott DW, Quade BJ. Cervical cancer screening: from the papanicolaou smear to the vaccine era. *J Clin Oncol* 2003; 21(Suppl. 10): 224-30.
11. Lau S, Franco EL. Management of low-grade cervical lesions in young women. *CMAJ* 2005; 173(7): 771-4.
12. Herrero R, Castel PE, Schiffman M, Bratti MC, Hildesheim A, Morales J, Alfaro M, Sherman ME, Wacholder S, Chen S, Rodríguez AC, Burk RD. Epidemiologic profile of type specific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis* 2005; 191: 1796-1806.
13. Bollmann M, Bankfalvi A, Trosic A, Speich N, Schmitt C, Bollmann R. Can we detect cervical human papillomavirus (HPV) infection by cytomorphology alone? Diagnostic value of non-classic cytological signs of HPV effect in minimally abnormal Pap tests. *Cytopathology* 2005; 16(1): 3-6.
14. Moscicki AB, Shiboski S, Broering J, Powell K, Clayton L, Jay N, et al. 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.
15. Ferenczy A, Coutlee F, Franco E, Hankins C. Human papillomavirus and HIV coinfection and the risk of neoplasias of the lower genital tract: a review of recent developments. *CMAJ* 2003; 169(5): 431-4.
16. Coleman N, Birley HD, Renton AM, Hanna NF, Ryait BK, Byrne M, et al. Immunological events in regressing genital warts. *Am J Clin Pathol* 1994; 102(6): 768-74.
17. Nees M, Geoghegan JM, Hyman T, Frank S, Miller L, Woodworth CD. Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and up regulate proliferation-associated and NF-kappaB-responsive genes in cervical keratinocytes. *J Virol* 2001; 75(9): 4283-96.
18. Duffy CL, Phillips SL, Klingelutz AJ. Microarray analysis identifies differentiation-associated genes regulated by human papillomavirus type 16 E6. *Virology* 2003; 314(1): 196-205.

19. Garcia-Millian R, Santos A, Perea SE, Gonzalez-Cabanas R, Valenzuela C, Arana M. Molecular analysis of resistance to interferon in patients with laryngeal papillomatosis. *Cytokines Cell Mol Ther* 1999; 5(2): 79-85.
20. Cho YS, Kang JW, Cho M, Cho CW, Lee S, Choe YK, et al. Down modulation of IL-18 expression by human papillomavirus type 16 E6 oncogene via binding to IL-18. *FEBS Lett* 2001; 501(2-3): 139-45.
21. Ashrafi GH, Tsirimonaki E, Marchetti B, O'Brien PM, Sibbet GJ, Andrew L, et al. Campo MS. Down-regulation of MHC class I by bovine papillomavirus E5 oncoproteins. *Oncogene* 2002; 21(2): 248-59.
22. Matthews K, Leong CM, Baxter L, Inglis E, Yun K, Backstrom BT, et al. Depletion of Langerhans cells in human papillomavirus type 16-infected skin is associated with E6-mediated down regulation of E-cadherin. *J Virol* 2003; 77(15): 8378-85.
23. McLaughlin-Drubin ME, Christensen ND, Meyers C. Propagation, infection, and neutralization of authentic HPV16 virus. *Virology* 2004; 322(2): 213-9.
24. Hagensee ME, Yaegashi N, Galloway DA. Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins. *J Virol* 1993; 67(1): 315-22.
25. Sasagawa T, Pushko P, Steers G, Gschmeissner SE, Hajibagheri MA, Finch J, et al. Synthesis and assembly of virus-like particles of human papillomaviruses type 6 and type 16 in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Virology* 1995; 206(1): 126-35.
26. Roden RB, Yutzy WH 4th, Fallon R, Inglis S, Lowy DR, Schiller JT. Minor capsid protein of human genital papillomaviruses contains subdominant, cross-neutralizing epitopes. *Virology* 2000; 270(2): 254-7.
27. Kimbaurer R. Papillomavirus-like particles for serology and vaccine development. *Intervirology* 1996; 39(1-2): 54-61.
28. Nardelli-Haeffliger D, Wirthner D, Schiller JT, Lowy DR, Hildesheim A, Ponci F, et al. Specific antibody levels at the cervix during the menstrual cycle of women vaccinated with human papillomavirus 16 virus-like particles. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95(15): 1128-37.
29. Rose RC, Lane C, Wilson S, Suzich JA, Rybicki E, Williamson AL. Oral vaccination of mice with human papillomavirus virus-like particles induces systemic virus-neutralizing antibodies. *Vaccine* 1999; 17(17): 2129-35.
30. Nardelli-Haeffliger D, Lurati F, Wirthner D, Spertini F, Schiller JT, Lowy DR, et al. Immune responses induced by lower air-way mucosal immunization with a human papillomavirus type 16 virus-like particle vaccine. *Vaccine* 2005; 23(28): 3634-41.
31. Muñoz N, Bosch FX, Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, Hammouda D, et al. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int J Cancer* 2004; 111(2): 278-85.
32. Lizano M, Berumen J, Guido MC, Casas L, Garcia-Carranca A. Association between human papillomavirus type 18 variants and histopathology of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89(16): 1227-31.
33. Berumen J, Ordonez RM, Lazcano E, Salmeron J, Galvan SC, Estrada RA, et al. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93(17): 1325-30.
34. De la Cruz-Hernandez E, Garcia-Carranca A, Mohar-Betancourt A, Duenas-Gonzalez A, Contreras-Paredes A, Perez-Cardenas E, et al. Differential splicing of E6 within human papillomavirus type 18 variants and functional consequences. *J Gen Virol* 2005; 86(Pt 9): 2459-68.
35. De Boer MA, Peters LA, Aziz MF, Siregar B, Cornain S, Vrede MA, et al. Human papillomavirus type 18 variants: Histopathology and E6/E7 polymorphisms in three countries. *Int J Cancer* 2005; 114(3): 422-5.
36. Calleja-Macias IE, Kalantari M, Huh J, Ortiz-Lopez R, Rojas-Martinez A, Gonzalez-Guerrero JF, et al. Genomic diversity of human papillomavirus-16, 18, 31, and 35 isolates in a Mexican population and relationship to European, African, and Native American variants. *Virology* 2004; 319(2): 315-23.
37. Touze A, El Mehdaoui S, Sizaret PY, Mouglin C, Munoz N, Coursaget P. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 16 variants affects yield of virus-like particles produced in an insect cell expression system. *J Clin Microbiol* 1998; 36(7): 2046-51.
38. 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 Institute* 2001; 93(4): 284-92.
39. 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(21): 1645-51.
40. Harper DM, Franco EL, Wheeler C, Ferris DG, Jenkins D, Schuind A, et al. HPV Vaccine Study Group. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomized controlled trial. *Lancet* 2004; 364(9447): 1757-65.
41. Harper DM, Franco EL, Wheeler CM, Moscicki AB, Romanowski B, Roteli-Martins CM, et al. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomized control trial. *Lancet* 2006; 367(9518): 1247-55.
42. 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.
43. Roden RB, Hubbert NL, Kimbaurer R, Christensen ND, Lowy DR, Schiller JT. Assessment of the serological relatedness of genital human papillomaviruses by hemagglutination inhibition. *J Virol* 1996; 70(5): 3298-3301.
44. 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 randomized double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *Lancet Oncol* 2005; 6(5): 271-8.
45. Lehtinen M, Idanpaan-Heikkilä I, Lunnas T, Palmroth J, Barr E, Cacciatore R, et al. Population-based enrolment of adolescents in a long-term follow-up trial of human papillomavirus vaccine efficacy. *Int J STD AIDS* 2006; 17(4): 237-46.
46. Geipert N. Vaccinating men for HPV: new strategy for preventing cervical cancer in women? *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 630-1.
47. Merck's HPV vaccine shines in Phase III trials. *IAVI Rep* 2005; 9(4): 23.
48. Ohlschlager P, Osen W, Dell K, Faath S, Garcea RL, Jochmus J, et al. Human papillomavirus type 16 11 capsomeres induce 11-specific cytotoxic T lymphocytes and tumor regression in C57BL/6 mice. *J Virol* 2003; 77(8): 4635-45.
49. Zehbe I, Wilander E, Delius H, Tommasino M. Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res* 1998; 58: 829-33.
50. Schafer K, Muller M, Faath S, Henn A, Osen W, Zentgraf H, et al. Immune response to human papillomavirus 16 L1E7 chimeric virus-like particles: induction of cytotoxic T cells and specific tumor protection. *Int J Cancer* 1999; 81(6): 881-8.
51. 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(16): 1485-94.

52. Kaufmann AM, Stern PL, Rankin EM, Sommer H, Nuessler V, Schneider A, 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(12): 3676-85.
53. Liu DW, Tsao YP, Kung JT, Ding YA, Sytwu HK, et al. Recombinant adeno-associated virus expressing human papillomavirus type 16 E7 peptide DNA fused with heat shock protein DNA as a potential vaccine for cervical cancer. *J Virol* 2000; 74(6): 2888-94.
54. Velders MP, McElhiney S, Casseti 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(21): 7861-7.
55. Villanueva MS, Sijts AJ, Pamer EG. Listeriolysin is processed efficiently into an MHC class I-associated epitope in *Listeria monocytogenes*-infected cells. *J Immunol* 1995; 155(11): 5227-33.
56. 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; 102(6): 629-37.
57. Jabbar IA, Fernando GJ, Saunders N, Aldovini A, Young R, Malcolm K, et al. Immune responses induced by BCG recombinant for human papillomavirus L1 and E7 proteins. *Vaccine* 2000; 18(22): 2444-53.
58. Feltkamp MC, Smits HL, Vierboom MP, Minnaar RP, de Jongh BM, Drijfhout JW, 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(9): 2242-9.
59. Rensing ME, Sette A, Brandt RM, Ruppert J, Wentworth PA, Hartman M, 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(11): 5934-43.
60. Rensing ME, van Driel WJ, Brandt RM, Kenter GG, de Jong JH, Bauknecht T, et al. Detection of T helper responses, but not of human papillomavirus-specific cytotoxic T lymphocyte responses, after peptide vaccination of patients with cervical carcinoma. *J Immunother* 2000; 23(2): 255-66.
61. Muderspach L, Wilczynski S, Roman L, Bade L, Felix J, Small LA, 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(9): 3406-16.
62. Lacey CJ, Thompson HS, Monteiro EF, O'Neill T, Davies ML, Holding FP, et al. Phase IIa safety and immunogenicity of a therapeutic vaccine, TA-GW, in persons with genital warts. *J Infect Dis* 1999; 179(3): 612-8.
63. van der Burg SH, Kwappenberg KM, O'Neill T, Brandt RM, Melief CJ, Hickling JK, et al. Pre-clinical safety and efficacy of TA-CIN, a recombinant HPV-16 L2E6E7 fusion protein vaccine, in homologous and heterologous prime-boost regimens. *Vaccine* 2001; 19(27): 3652-60.
64. de Jong A, O'Neill T, Khan AY, Kwappenberg KM, Chisholm SE, Whittle NR, et al. Enhancement of human papillomavirus (HPV) type 16 E6 and E7-specific T-cell immunity in healthy volunteers through vaccination with TA-CIN, an HPV16 L2E7E6 fusion protein vaccine. *Vaccine* 2002; 20(29-30): 3456-64.
65. Chu NR, Wu HB, Wu T, Boux LJ, Siegel MI, Mizzen LA. Immunotherapy of a human papillomavirus (HPV) type 16 E7-expressing tumour by administration of fusion protein comprising *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin (BCG) hsp65 and HPV16 E7. *Clin Exp Immunol* 2000; 121(2): 216-25.
66. Hung CF, Cheng WF, He L, Ling M, Juang J, Lin CT, et al. Enhancing major histocompatibility complex class I antigen presentation by targeting antigen to centrosomes. *Cancer Res* 2003; 63(10): 2393-8.
67. Leachman SA, Tigelaar RE, Shlyankevich 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(18): 8700-8.
68. Kim TW, Hung CF, Ling M, Juang J, He L, Hardwick JM, et al. Enhancing DNA vaccine potency by coadministration of DNA encoding antiapoptotic proteins. *J Clin Invest* 2003; 112(1): 109-17.
69. Garcia F, Petry KU, Muderspach L, Gold MA, Braly P, Crum CP, et al. ZYC101a for treatment of high-grade cervical intraepithelial neoplasia: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol* 2004; 103(2): 317-26.
70. Ferrara A, Nonn M, Sehr P, Schreckenberger C, Pawlita M, Durst M, et al. Dendritic cell-based tumor vaccine for cervical cancer II: results of a clinical pilot study in 15 individual patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003; 129(9): 521-30.
71. Rapoport AP, Stadtmauer EA, Aquí N, Badros A, Cotte J, Chrisley L, et al. Restoration of immunity in lymphopenic individuals with cancer by vaccination and adoptive T-cell transfer. *Nat Med* 2005; 11(11): 1230-7.
72. Feltkamp MC, Vreugdenhil GR, Vierboom MP, Ras E, van der Burg SH, Schegget J, et al. Cytotoxic T lymphocytes raised against a subdominant epitope offered as a synthetic peptide eradicate human papillomavirus type 16-induced tumors. *Eur J Immunol* 1995; 25(9): 2638-42.
73. Scholten KB, Schreurs MW, Ruizendaal JJ, Kueter EW, Kramer D, Veenbergen S, et al. Preservation and redirection of HPV16E7-specific T cell receptors for immunotherapy of cervical cancer. *Clin Immunol* 2005; 114(2): 119-29.
74. Nolan T, Block SL, Reisinger KS, et al. 2005. Comparison of the immunogenicity and tolerability of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus (HPV) (types 6, 11, 16, 18) L1 virus-like particle (VLP) vaccine in male and female adolescents and young adult women. Presented at European Society of Pediatric Infectious Diseases May 2005.

Reimpresos:

Dr. Erick de la Cruz-Hernández

Instituto Nacional de Cancerología
Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer.

Laboratorio de Biología Molecular del VPH
Av. San Fernando 22.
Col Sección XVI.
14080. México, D.F.
Tel.: (+52-55) 56 28 04 00, Ext. 133
Correo electrónico: qcerick2000@yahoo.com

Recibido el 26 de enero de 2006.

Aceptado el 4 de julio de 2006.

www.medigraphic.com