



Salud Pública de México

ISSN: 0036-3634

spm@insp.mx

Instituto Nacional de Salud Pública

México

Berumen, Jaime; Villegas, Nicolás
Vacunas terapéuticas recombinantes contra el cáncer del cuello uterino
Salud Pública de México, vol. 39, núm. 4, julio-agosto, 1997, p. 0
Instituto Nacional de Salud Pública
Cuernavaca, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=10639407>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Vacunas terapéuticas recombinantes contra el cáncer del cuello uterino

Jaime Berumen, M.C., Dr. Sc.,⁽¹⁾ Nicolás Villegas, Q.P., Dr. Sc.⁽¹⁾

**Berumen J, Villegas N.
Vacunas terapéuticas recombinantes
contra el cáncer del cuello uterino.
Salud Publica Mex 1997;39:288-297.**

Resumen

Durante el desarrollo del cáncer cervicouterino se inducen mecanismos para evadir el sistema inmune, como son la disminución de la expresión de moléculas de antígeno mayor de histocompatibilidad I y la secreción de citocinas por las células tumorales. Como consecuencia de ello, la estimulación de linfocitos T citotóxicos (LTC) y cooperadores (TC), de células asesinas naturales (AN) y macrófagos es muy deficiente. Para inducir una respuesta inmune efectiva contra el tumor, se requiere la estimulación simultánea de múltiples componentes del sistema inmune: por vía sistémica la estimulación de LTC y TC contra epítomos del virus del papiloma humano, y en un nivel local, la inducción de la secreción de citocinas por el tumor, para aumentar el procesamiento y la presentación de blancos tumorales, así como la estimulación de los linfocitos, AN y macrófagos que infiltran el tumor.

Palabras clave: neoplasmas del cuello uterino; vacunas sintéticas/uso terapéutico; papillomavirus humano; revisión

**Berumen J, Villegas N.
Recombinant therapeutic vaccines
against invasive cervical cancer.
Salud Publica Mex 1997;39:288-297.**

Abstract

Several mechanisms to evade the immune system are induced during cervical cancer development, including the decrease of expression of class I HLA molecules and secretion of specific cytokines by tumoral cells. Consequently, the stimulation of cytotoxic (CTL) and helper (TH) T lymphocytes, as well as the natural killer (NK) cells and macrophages is very poor. The induction of immune response against tumors needs the stimulation of multiple components of the immune system: systemic stimulation of CTL and TH against Human Papilloma Virus epitopes and directly in the tumor the secretion of specific cytokines to increase the antigen processing and presentation of tumoral targets, and the stimulation of lymphocyte, NK cells and macrophages that infiltrate tumors.

Key words: cervix neoplasms; vaccines, synthetic/therapeutic use; papillomavirus, human; review

Es indudable que la detección, el diagnóstico y la erradicación de las lesiones precursoras previenen el desarrollo del cáncer invasor,¹ por lo que es necesaria la realización de campañas masivas para detectar el padecimiento en etapas iniciales. Sin embargo, los resultados de una buena campaña de detección oportuna se obtienen a largo plazo, de modo que en los países en vías de desarrollo el cáncer invasor seguirá siendo un problema importante por muchos años. Una estrategia diferente y que se puede sumar a los esfuerzos de la lucha contra esta enfermedad es invertir

en el desarrollo de vacunas terapéuticas construidas con la tecnología del ácido desoxirribonucleico (ADN) recombinante, dirigidas a estimular el sistema inmune de la enferma, contra blancos de las células tumorales.

El cáncer del cuello uterino es una enfermedad asociada a muchos factores etiológicos, pero quizá los más importantes son el virus del papiloma humano (VPH) y la acumulación de múltiples defectos del sistema inmune en el sitio del tumor.

Actualmente se conocen más de 80 tipos virales genéticamente diferentes, y sólo algunos de ellos están

(1) Laboratorio Multidisciplinario de Investigación, Escuela Militar de Graduados de Sanidad, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, México

asociados al cáncer genital, en especial los tipos VPH 16 y 18. En México, en 90% de los carcinomas cervicales se detecta algún tipo viral: el VPH 16 se encuentra en 50% de los casos; el VPH 18, en el 15%; el VPH 31, 33 y 35, en conjunto, en el 12%; y otros tipos virales, en el porcentaje restante.^{2,3*} Muñoz y Wheeler presentan una amplia información sobre la asociación del VPH y el cáncer genital.^{4,5}

Papel del sistema inmune en las infecciones genitales por el VPH y el cáncer cervicouterino

Hay evidencias importantes que indican que el sistema inmune está involucrado en la infección primaria y en la progresión maligna de las lesiones por el VPH, en especial la respuesta inmune mediada por células. Por ejemplo, las verrugas y las neoplasias asociadas al VPH ocurren con mayor frecuencia en la población con depresión de la inmunidad celular, en pacientes receptores de trasplantes de órganos, con terapia inmunosupresora, pacientes con SIDA o mujeres embarazadas.⁶ En estos pacientes, las verrugas desaparecen frecuentemente cuando la inmunosupresión disminuye o es eliminada. Sin embargo, la mayoría de los pacientes con alguna lesión neoplásica asociada al VPH no tiene deprimido el sistema inmunológico en un nivel sistémico y, más bien, se encuentran alteraciones en un nivel local, inducidas por el VPH y otros eventos en el tumor. En las etapas previas al cáncer invasor, como son el condiloma acuminado y las neoplasias preinvasoras (neoplasia intraepitelial cervical-NIC), el sistema inmunológico aún es capaz de combatir y promover la regresión o mantener al tumor localizado. Por ejemplo, durante la regresión de las verrugas genitales se presentan infiltrados locales muy importantes de células mononucleares, incluyendo linfocitos T citotóxicos (LTC), células asesinas naturales (AN) y macrófagos que invaden la epidermis y destruyen las células neoplásicas.^{7,8} Durante la evolución del tumor, las células tumorales adquieren nuevas lesiones genéticas que les confieren ventajas selectivas, para evadir cada vez un mayor número de mecanismos de control del sistema inmune, hasta que éste se hace ineficiente para combatir el tumor.

Respuesta inmune humoral

Las infecciones virales son primariamente intracelulares, y los antígenos virales escapan al alcance de los

anticuerpos. La respuesta humoral es importante sólo para infecciones virales productivas, en las que las partículas virales salen al espacio extracelular por exocitosis o durante la lisis celular por efecto del propio virus o las células citotóxicas del paciente. En el espacio extracelular las partículas virales son atrapadas por linfocitos B con receptores (anticuerpos de membrana), específicos para algunos epitopos de las proteínas virales. Una vez en el receptor, el antígeno es internalizado por endocitosis y digerido en el lisosoma para producir pequeños péptidos que se unen a moléculas de clase II, del complejo principal de histocompatibilidad (AHL II). Posteriormente, los péptidos son presentados en la superficie celular para ser reconocidos por linfocitos T cooperadores CD4+ (Tc2). Una vez activados, los linfocitos Tc2 estimulan a los linfocitos B para producir anticuerpos neutralizantes contra las partículas virales, los cuales juegan un papel muy importante para evitar la diseminación de la infección. Las moléculas AHL II están presentes en células del sistema inmune: linfocitos B, linfocitos T activados y células profesionales presentadoras de antígenos (CPA) y algunas células epiteliales especializadas; se componen de dos cadenas, α y β , ambas codificadas en los loci AHL-DR, -DQ o -DP. El amplio polimorfismo que presentan está concentrado en la región de unión de los péptidos, lo cual permite que los diversos alelos reconozcan péptidos diferentes y, con ello, estén asociados a respuestas inmunes diferentes.

En las infecciones no productivas, como serían los casos de los NIC de alto grado (NIC-AG) y el cáncer invasor, solamente se producen proteínas tempranas del virus y no proteínas tardías, por lo que las partículas virales no se presentan en el espacio extracelular, y no se esperaría una respuesta humoral contra los antígenos virales. Sin embargo, en el suero de las pacientes con cáncer cervical frecuentemente se encuentran anticuerpos contra la proteína E7 del VPH 16 o el VPH 18.^{9,10} Igualmente, se han detectado anticuerpos contra las proteínas E2 del VPH 16 y del VPH 18,^{11,12} E4,^{13,14} y E6 del VPH 16.^{10,15} Además, se ha encontrado que los títulos de anticuerpos contra las proteínas E2, E6 y E7 aumentan con el estadio clínico y varían de acuerdo con la manera en que es tratada la enfermedad.^{16,17} No se sabe cómo se genera esta respuesta humoral, pero quizá durante la lisis de células cancerosas por linfocitos T citotóxicos, salgan antígenos virales al espacio extracelular. Por otra parte, no se conoce cuál es el papel de la respuesta inmune humoral en los tumores invasores, es decir si juega un papel en contra del tumor, quizá en colaboración con las células AN y los macrófagos, o si solamente se presenta como un efecto secundario asociado al desarrollo de la enfermedad.

* Berumen y colaboradores, datos no publicados.

De cualquier manera, estos datos sugieren que esas proteínas virales son inmunogénicas y que pueden representar blancos para el sistema inmunológico.

Respuesta inmune celular

En la respuesta celular participan, por un lado, componentes del sistema inmune y, por otro, las células blanco infectadas por el virus que tratan de evadir el sistema inmune. De éste último los LTC, linfocitos cooperadores (TC), células AN, macrófagos, CPA y las citocinas producidos por esas células. De las células blanco participan las moléculas del complejo AHL, otras moléculas coestimuladoras en la superficie de la membrana y citocinas secretadas por ellas mismas.

Respuesta inmune efectiva contra células infectadas por el VPH

En las etapas iniciales de la enfermedad, la respuesta inmune es aún efectiva porque las células infectadas por el VPH expresan todavía las moléculas de clase I del AHL. Las moléculas de clase I son proteínas de membrana involucradas en la presentación antigénica y juegan un papel importante en la respuesta inmune antitumoral.¹⁸ Estas moléculas se expresan en todas las células nucleadas y se componen de una cadena pesada polimórfica y la β_2 -microglobulina. De la cadena pesada existen los tipos A, B y C, cada una de ellas con múltiples subtipos (alelos) en la población. Las moléculas AHLI, exponen péptidos virales en la superficie celular, permitiendo que las células infectadas sean reconocidas como blancos por los LTC (CD8+), los cuales a su vez son llamados de los capilares vasculares por citocinas secretadas por las células infectadas.

En los queratinocitos infectados, las proteínas virales se encuentran en el citosol mezcladas con las proteínas celulares, y ambas son degradadas en los proteosomas, de modo que se producen pequeños oligopéptidos de 8 a 11 aminoácidos, que posteriormente son transportados al retículo endoplásmico rugoso por las proteínas transportadoras PTA1 y PTA2. Ahí se unen a las moléculas AHL (complejo mayor de histocompatibilidad -CMH- en ratones), de clase I para ser transportados a la membrana celular y ser presentados a los LTC, los cuales reconocen el complejo CMHI-péptido viral por medio del receptor de células T (RCT) específico para cada epítipo. La participación de los linfocitos Tc1 en la activación de los LTC y otras células inflamatorias es muy importante: secretan interleucina IL-2, que activa a los LTC, e interferón gamma (INF- γ), que activa a los macrófagos. Los linfocitos Tc1 pueden ser activados por las citocinas liberadas (IL-1)

por las células infectadas por el VPH o por células CPA que presentan péptidos virales en el contexto de moléculas de clase I y II. Las células de Langerhans (CD1+), con sus prolongaciones dendríticas típicas son las APC más potentes dentro del tejido epitelial y se presentan en los dos tercios inferiores del epitelio estratificado del cérvix normal. La activación de LTC y TC requiere también la interacción de moléculas accesorias coestimuladoras entre las células T y las CPA o las células epiteliales. Por ejemplo, la molécula de adhesión intracelular tipo I (MAIC-1), el antígeno de función de linfocitos tipo 3 (AFL-3) y el CD80 (B7) de las CPA interactúan con las moléculas AFL-1, CD2 y CD28, respectivamente, de las células T. La presentación de antígenos en la ausencia de estas moléculas coestimuladoras puede inducir anergia, con una falla en la inducción de la proliferación y diferenciación de las células T, lo que resulta en una tolerancia al estímulo antigénico.^{19,20}

Además, la generación de una respuesta inmune efectiva depende de la secreción de citocinas específicas que recluten y activen células inmunes en el sitio de la infección. Los queratinocitos humanos secretan constitutivamente muchas citocinas en cultivos celulares.^{21,22} Una de esas linfocinas es la interleucina 1 (IL-1), la cual induce una amplia variedad de reacciones inflamatorias e inmunológicas, tal como la producción de IL-2 por las células TC. Los mismos queratinocitos son autoestimulados por la IL-1 para proliferar,²³ sintetizar y secretar otras linfocinas incluyendo IL-6,²⁴ IL-8, el factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (FEC-GM), y el factor de necrosis tumoral (FNT- α).²⁵ Cada una de estas moléculas promueve reacciones inflamatorias o inmunológicas por mecanismos específicos. El FNT- α y la IL-1 ejercen, además, una acción antiviral por medio de la represión de la expresión de los genes virales.²⁶

Una vez activados, los LTC proliferan, se diferencian y participan en la lisis de las células blanco por tres caminos diferentes: a) secretan perforinas y otras proteínas que perforan la membrana celular; b) liberan sustancias que inducen la muerte celular programada (apoptosis), y c) liberan citocinas como el INF- γ , el FNT y la leucorregulina (LR) que limitan la actividad viral dentro de las células y atraen macrófagos y otros fagocitos que pueden destruir a la célula. El INF- γ y la LR inhiben la expresión de los genes virales y estimulan la expresión de las moléculas de clase I del complejo AHL en los queratinocitos humanos, lo que permite una mejor presentación de los antígenos virales y con ello una respuesta inmune aumentada.^{27,28} La LR también aumenta la transcripción de las moléculas del CMH y la sensibilidad de las células epiteliales cervi-

cales immortalizadas con el VPH16 para ser destruidas por las células AN activadas por linfocinas LAK.²⁹

Es probable que los macrófagos y las células AN representen uno de los primeros mecanismos celulares para eliminar y controlar células tumorales infectadas por el VPH. Las células AN pueden, espontáneamente, matar *in vitro* células infectadas por el virus y células tumorales sin previa sensibilización,^{30,31} por un proceso llamado muerte natural.³² Las células AN y los linfocitos citotóxicos CD8+, restringidos estos últimos a moléculas CMH clase I, lisan sus blancos celulares por mecanismos similares pero por estímulos distintos;³³ mientras que las moléculas CMH clase I en la célula blanco son importantes en la presentación del antígeno para los LTC, su presencia inhibe el efecto citotóxico de las células AN. Por el contrario, la actividad citotóxica de las AN se presenta cuando la célula blanco ha perdido la expresión de moléculas CMH clase I. Hay evidencias que sugieren que las moléculas CMH clase II también afectan la citotoxicidad de las células AN. Es bien conocido que la expresión de moléculas CMH clase II puede ser aumentada por efecto de INF- γ en una variedad de células, y el tratamiento de células blanco con esta citocina incrementa su resistencia a la lisis por células AN; la susceptibilidad puede ser recuperada con el tratamiento con anticuerpos dirigidos para moléculas CMH clase II. Sin embargo, el mecanismo por el cual estas moléculas regulan la actividad de las células AN no ha sido definido.³⁴ Los macrófagos son importantes mediadores celulares potenciales de la inmunidad anti-tumoral. Por ejemplo, se ha demostrado que las células NIH-3T3 transfectadas con el oncogén E7 del VPH 16 muestran una susceptibilidad a la citólisis por macrófagos murinos activados,^{35,36} los cuales efectúan su acción destructora por contacto directo con la célula blanco. Quizá éste sea uno de los mecanismos por los cuales el INF- γ ejerce su acción sobre las células tumorales, ya que es el factor activador de macrófagos más potente que se conoce.

Respuesta inmune deficiente contra células tumorales infectadas por el VPH

La ineficiencia del sistema inmune para combatir el tumor puede estar asociada a múltiples fallas de los componentes del sistema inmune o de las células blanco, las cuales se van acumulando durante la evolución de la enfermedad. En los pacientes no inmunodeficientes, las alteraciones locales del sistema inmune son inducidas, inicialmente por el VPH y las células tumorales. Las células blanco en etapas avanzadas utilizan cuando menos tres caminos diferentes para eva-

dir la respuesta inmune: a) la modulación de la expresión de moléculas del CMH; b) la modulación de otras moléculas de unión en la superficie celular, y c) la modulación de la secreción de citocinas celulares. Estos cambios inducen una depleción localizada de células inmunocompetentes y una disminución de su capacidad de respuesta a las linfocinas reguladoras, lo cual pudiera contribuir a la progresión tumoral de las NIC avanzadas.

Moléculas del complejo principal de histocompatibilidad. La expresión de moléculas de clase I o la beta-2 microglobulina en los queratinocitos cervicales está disminuida ligeramente en los condilomas,³⁷ importantemente en las lesiones premalignas y es muy heterogénea o está ausente en 75% de los carcinomas invasores.^{38,39} La disminución de la expresión de las moléculas de clase I ocurre en un nivel postranscripcional directamente⁴⁰ o por la pérdida de la proteína transportadora PTA-1, la cual es esencial para el transporte de los péptidos inmunogénicos hacia el retículo endoplásmico.⁴¹ La disminución de las moléculas CMH clase I en la superficie celular es un mecanismo de escape por el cual el VPH evita ser reconocido por los LTC. Un mecanismo alternativo para evadir la presentación por moléculas AHL I es la adquisición de mutaciones en los epítomos restringidos a LTC, como es el caso de una variante de la proteína E6, que no es reconocida por los LTC de individuos con el alelo AHL-B7+.⁴² La expresión de las moléculas CMH clase II normalmente está restringida a células inmunocompetentes y células APC. Sin embargo, estas moléculas se expresan de manera focal o uniforme en los queratinocitos cervicales, en 50% de las NIC de alto grado⁴³ y en 87% de los cánceres cervicales.^{38,44} No se conoce la influencia de las moléculas de clase II en la evolución de las lesiones, pero en todo caso los queratinocitos que las expresan podrían interactuar con linfocitos TC o inhibir la actividad de células AN. Por otra parte, se ha encontrado correlación entre algunos alelos de moléculas de clase II y el cáncer cervical. Por ejemplo, las mujeres con el alelo AHL-DQw3 tienen un riesgo mayor de desarrollar cáncer del cérvix^{45,46} y los pacientes trasplantados de riñón con el alelo AHL-DR7, para desarrollar cáncer de piel asociado al VPH 8.⁴⁷

Citocinas producidas por los queratinocitos cervicales neoplásicos. En forma similar a los queratinocitos normales, en la línea celular no tumorigénica SK-v derivada de una NIC y que contiene el VPH 16, se expresan y secretan constitutivamente la IL-6 y el FNT- α . Este último ejerce en forma autócrina un efecto antiproliferativo, el cual al parecer se debe a la represión de la expresión de los oncogenes virales.^{46,47,24} Igualmente, el factor

de crecimiento transformante beta (FCT-β), que es muy parecido funcionalmente al FNT-α, también se expresa en los queratinocitos humanos e inhibe en forma autócrina su crecimiento.⁴⁸ En contraste, los queratinocitos cervicales inmortalizados con el VPH 16 o el 18 y las líneas celulares derivadas de carcinomas cervicales presentan una expresión disminuida de citocinas²³ y no responden a la inhibición del ICT-β.^{49,50} Estos datos sugieren que la secreción continua de citocinas por los queratinocitos cervicales es parte de un mecanismo de inmunoprotección, y la producción de IL-6 y el FNT-α en las células infectadas por el VPH 16 pudiera representar un mecanismo de autocontrol para prevenir el crecimiento neoplásico. Por otra parte, en un estudio realizado en México se encontró que en la mayoría de los cánceres del cuello uterino explorados, había transcritos (por RT-PCR) y que la proteína (por inmunohistoquímica) de la interleucina IL-10 estaba presente en las células tumorales.* Esto sugiere que la respuesta celular tipo Tc1 puede estar inhibida, lo cual facilita el desarrollo del tumor.

Linfocitos T citotóxicos. Las lesiones benignas, premalignas y malignas inducidas por el VPH están infiltradas con linfocitos T principalmente CD8+.⁵¹ Sin embargo, hay evidencias que indican que estos linfocitos están muy poco activados. Por ejemplo, en estudios realizados con inmunohistoquímica, se observa que los tejidos de tumores cervicales tienen muy pocos linfocitos T con receptores para IL-2. Además, los linfocitos infiltrantes se caracterizan por la pérdida de la expresión de la granzima y, en ensayos de citotoxicidad *in vitro*, son sólo activos después de la generación de clones de células T.⁵¹ Estos datos sugieren fuertemente que los LTC no han sido activados adecuadamente contra antígenos específicos del tumor.

Células de Langerhans. La densidad de las células de Langerhans está muy reducida en los condilomas y las NICs, especialmente en las de alto grado.^{52,53} Además, se distribuyen en todo el grosor del epitelio, y muchas de ellas se observan morfológicamente alteradas, presentan dendritas acortadas y en menor número. Es posible que el epitelio infectado por el VPH no sea un medio favorable para las células de Langerhans.⁵⁴ La disminución y la alteración morfológica de estas células pudieran resultar en una presentación antigénica local inefectiva y, en consecuencia, causar una deficiencia inmunológica local, lo que favorecería una infección persistente por el VPH.^{55,56}

Células AN. En la mayoría de las lesiones pre y cancerosas inducidas por el VPH, las células AN están presentes en cantidades limitadas, su actividad está disminuida y tienen una respuesta restringida a las citocinas inmunoestimuladoras.^{5,57} En contraste, la actividad de las células AN obtenidas de la circulación de esas pacientes permanece normal. Por otra parte, las células neoplásicas de los carcinomas invasores y los queratinocitos humanos inmortalizados por el VPH 16 son resistentes a las células AN, lo cual parece estar relacionado con un factor secretado por las células tumorales,^{57,58} o quizá con la expresión de moléculas de clase II que inhiben la actividad de las AN.

Vacunas terapéuticas contra el cáncer cervicouterino

Se pueden diseñar dos clases de vacunas: las profilácticas (preventivas), que pueden proteger al huésped contra la infección por el VPH o el desarrollo de neoplasias a partir de células ya infectadas, y las terapéuticas (curativas), las cuales inducen regresión de las lesiones ya establecidas como el cáncer invasor. Las vacunas preventivas contra la infección del VPH se basan en la inducción de anticuerpos secretorios IgA contra los antígenos de la cápside viral (L1 y L2). Las vacunas terapéuticas (también las preventivas para evitar el desarrollo de neoplasias a partir de células ya infectadas) se basan en la inducción de una respuesta inmunológica mediada por células específicas contra blancos virales, blancos celulares o ambos, capaces de promover la regresión de los tumores malignos. Actualmente, no se conocen productos celulares que sirvan como blancos específicos para el sistema inmune celular; la mayoría de los sistemas de vacunación experimental están diseñados contra blancos virales, en especial contra las proteínas oncogénicas E6 y E7, que generalmente se expresan en la mayoría de los carcinomas cervicales. La estrategia general de estos sistemas se basa en la inducción sistémica de LTC, específicos contra epítomos de E6 y E7.

Sin embargo, la estimulación aislada de LTC por vía sistémica no parecería ser suficiente, porque en una gran proporción de tumores invasores la expresión de moléculas de AHLI y la secreción de algunas citocinas están muy reducidas, lo cual impide la presentación de antígenos virales en la superficie de las células tumorales y la estimulación de células inmunocompetentes en la vecindad del tumor. Esto sugiere que también sería necesaria la estimulación sistémica de linfocitos TC y del sistema inmune local, es decir, en el sitio mismo del tumor, en especial una respuesta Tc1.

* Comunicación personal del Dr. Vicente Madrid.

Vacunas sistémicas para la inducción de LTC y TC

Para la inducción sistémica de LTC se han utilizado varias estrategias: vectores recombinantes con los genes E6 y E7; las proteínas E6 y E7 recombinantes inactivas; péptidos sintéticos específicos de dichas proteínas, y homogenizados autólogos del tumor. Las proteínas E6 y E7 producidas en bacterias o en sistemas eucarióticos han sido utilizadas en modelos animales de VPH; sin embargo, no han sido muy exitosas para la prevención de tumores en animales, quizá por su bajo nivel de inmunogenicidad para estimular LTC. Las proteínas, cuando son inyectadas por vía subcutánea entran a las células por fagocitosis o endocitosis y una vez que aquellas son procesadas, los péptidos correspondientes son presentados en las superficies por moléculas de clase II del CMH, que estimulan principalmente la producción de anticuerpos.

Las vacunas basadas en péptidos son las que han dado mejores resultados en modelos animales. Los oligopéptidos (8 a 11 aminoácidos) se mezclan con adyuvante incompleto de Freund y se inyectan por vía subcutánea; directamente en la superficie celular, se unen a las moléculas de clase I vacías (1-5%), estimulando con ello los LTC específicos. Actualmente, se han identificado epítomos, específicos para moléculas CMH de clase I y II en las proteínas virales, lo cual ha contribuido a entender el papel de los linfocitos T en esas lesiones. Varios grupos han encontrado en dichas proteínas epítomos para linfocitos TC de ratón^{59,60} y humanos.⁶¹ Por ejemplo, se ha identificado un epítomo murino muy importante en la proteína E7 del VPH 16 aminoácidos (48-54), que es reconocido por los cinco alelos explorados de moléculas CMH de clase II I-A e I-E y que ayuda en la producción de anticuerpos para varios epítomos de células B simultáneamente.⁶⁰ También se han encontrado epítomos específicos para LTC murinos^{62,63} y humanos.^{64,65} Por ejemplo, se han identificado varios epítomos en las proteínas E6 y E7 del VPH 16 para LTC mediante ensayos de unión de péptidos, para moléculas de clase I H-2K^b y H-2D^b en modelos murinos y para AHL-A1, A2, A3, A11 y A24 en humanos. La inmunización de ratones con estos péptidos los hace resistentes a la producción de tumores por inoculación con células tumorígenicas transformadas por el VPH 16.⁶³ Sin embargo, este tratamiento no es suficiente para detener o inducir la regresión de tumores ya establecidos. Una explicación pudiera ser que los péptidos utilizados en estas vacunas sólo se pueden unir al 1% de las moléculas de clase I del CMH de las células localizadas en el sitio donde se administra la vacuna, y la proporción de LTC estimulados no sería lo suficientemente grande para

detener el tumor. Quizá sea necesario introducir los epítomos de LTC al citosol de las células para que sean presentados por la mayoría de las moléculas de clase I, lo cual pudiera lograrse mediante vacunas de ADN desnudo.

Otra explicación de la baja eficiencia de las vacunas a base de péptidos para detener el crecimiento tumoral pudiera ser que generalmente se utilizan sólo epítomos para LTC y que la estimulación de linfocitos Tc a nivel sistémico es muy pobre. Quizá es necesario utilizar conjuntamente epítomos restringidos a moléculas de clase I, y otros, a moléculas de clase II. Sin embargo, para ello es necesario tener una variedad amplia de epítomos para moléculas de clase I y otra para moléculas de clase II, específicos para alelos diferentes en la población. La utilización de las combinaciones apropiadas para cada individuo de acuerdo con su haplotipo resultaría poco práctica y costosa. Las proteínas generalmente tienen un mayor número de determinantes antigénicos para moléculas de clase II que para las de clase I. La utilización simultánea de epítomos para LTC y de las proteínas E6 y E7 completas como fuentes multialélicas de epítomos para TC pudiera solventar el problema. Los primeros pueden ser introducidos al citosol, y las segundas, a los lisosomas para que los péptidos sean presentados por las moléculas de clase II mediante vacunas de ADN desnudo.

Las vacunas de ADN recombinante consisten en una molécula híbrida, compuesta por ADN de un vector viral o un plásmido y el gen o genes de una región antigénica, como los de las proteínas E6 y E7, en el caso del VPH. Estas vacunas pueden ser introducidas en las células directamente como ADN desnudo, empaçadas dentro de la cápside viral –cuando el vector es un virus como en el caso de la vaccinia–, por medio de liposomas o utilizando soluciones de fosfato de calcio. Una vez dentro de las células, los genes recombinantes se expresan y producen las proteínas correspondientes. Una ventaja de las vacunas de ADN es que las proteínas pueden ser dirigidas a sitios específicos de la célula. Por ejemplo, si se necesita que el antígeno se sintetice en el citosol, sólo se incluye el marco de lectura del gen (ORF) delante del promotor en la construcción genética. Pero si se desea que la proteína sea secretada, se incluye antes del ORF una secuencia de un péptido líder; o si se desea mandar la proteína al lisosoma, además del péptido líder se incluye una señal de anclaje en membrana y lisosomal en el extremo 3' del ORF. Esto permite que las proteínas virales dirigidas al citosol sean procesadas por la vía de moléculas de clase I y activación de LTC, las dirigidas a los lisosomas, por la vía de moléculas de clase II y activación de TC, así como las secretadas para la producción de anticuerpos.

El virus de la vaccinia ha sido el más utilizado en modelos de VPH porque produce muy altos niveles de proteínas recombinantes dentro de la célula infectada y tiene una gran capacidad de sitios para la clonación de genes. Por ejemplo, la inoculación de ratas con el virus de la vaccinia recombinante con los genes E6 y E7 retarda o previene la formación de tumores en una proporción de animales retados con inyecciones subcutáneas de células tumorales transformadas con el VPH 16 y el oncogéneas.^{66,67} En otro trabajo se utiliza una construcción recombinante con el virus de la vaccinia y el gen E7, con un péptido líder en el extremo 5' y la secuencia de anclaje en membrana, y la señal lisosomal LAMA-1 en el extremo 3', la cual permite que la proteína sintetizada sea transportada al retículo endoplásmico y posteriormente al lisosoma. Esta vacuna activa de manera muy importante los linfocitos TC y previene la formación de tumores en ratones retados con células tumorales transformadas por el VPH 16, incluso en ratones inoculados 15 días antes de la administración de la vacuna.⁶⁸

No existen estudios con plásmidos utilizados como vectores en sistemas de vacunas contra el VPH. Sin embargo, las vacunas de ADN desnudo se han utilizado en otros sistemas con muy buenos resultados. Por ejemplo, una vacuna a base de un plásmido desnudo con el gen de una nucleoproteína del virus de la influenza es capaz de proteger ratones retados con dosis letales de este virus.⁶⁹ Las vacunas a base de plásmidos desnudos o dentro de liposomas evitarían las reacciones adversas de los vectores virales, como son la respuesta inmune contra las proteínas del vector y la falta de seguridad biológica, especialmente en pacientes inmunosuprimidos.

Actualmente en Inglaterra, Australia y Holanda, se están llevando a cabo tres protocolos de vacunas terapéuticas para estimular los LTC en pacientes con cáncer cervical avanzado, utilizando el virus de la vaccinia como vector con E6 y E7, la proteína E7 fusionada con una proteína bacteriana y péptidos específicos de E7, respectivamente. Estos estudios han demostrado la ausencia de una respuesta celular contra la proteína E7 como resultado de la infección natural (quizá por una presentación antigénica inadecuada); asimismo, que E7, administrada como vacuna, es inmunogénica en humanos y que induce una respuesta proliferativa de células T y de citotoxicidad de LTC en algunos pacientes.⁷⁰ Aunque el número de pacientes en cada uno de esos estudios es muy pequeño (seis a nueve) y todavía no se tienen resultados clínicos firmes, la sobrevida aumentada en algunos de ellos sugiere que estas vacunas pueden tener alguna utilidad.

Vacunas locales

De nada sirve estimular los LTC por vía sistémica si las células tumorales no presentan péptidos virales en la superficie; por ello, es necesario asegurar que los LTC encuentren blancos específicos en las células tumorales. Además, quizá sea importante reclutar y estimular otras células del sistema inmune involucradas en el rechazo tumoral, como son las AN y los macrófagos. Desafortunadamente no existen modelos animales con carcinomas del cuello uterino que semejen condiciones similares a las encontradas en humanos y que permitan estudiar y manipular la respuesta inmune, por lo que es necesario extrapolar los conocimientos obtenidos en otros modelos tumorales. Por ejemplo, en diversos modelos tumorales en ratones y en algunos ensayos clínicos, se han utilizado vacunas de ADN desnudo y "vacunas tumorales" para estimular el sistema inmune en un nivel local. Las "vacunas tumorales" están constituidas por células tumorales singénicas extraídas del mismo tumor y modificadas genéticamente *in vitro* para que secreten permanentemente grandes cantidades de una o varias citocinas, las cuales una vez seleccionadas y expandidas son reinyectadas a los tumores originales.

Algunas de las estrategias que se basan en la utilización de vectores virales o plásmidos para amplificar la presentación de antígenos a linfocitos T han sido de gran utilidad. Por ejemplo, la transfección de tumores con genes de CMH clase I⁷¹ y/o cADN de INF- γ ⁷² han llevado a un incremento de la expresión de moléculas CMH clase I y, en algunos casos, al rechazo del tumor.⁷² La transfección del gen del antígeno coestimulador B7 en células tumorales que expresan E7 induce la regresión tumoral mediada por LTC en ratones inmunizados con líneas de células singénicas no tumorigénicas transfectadas con E7;^{73,74} sin embargo, la proteína E7 sola, en ausencia de la segunda señal (B7-CD28), no es inmunogénica.⁷⁰

La inyección de vacunas tumorales o de ADN desnudo con genes para citocinas directamente en el tumor permite tener concentraciones muy elevadas de las citocinas en la vecindad del mismo, con un mínimo de efectos secundarios en el nivel sistémico, lo que a su vez posibilita estimular la respuesta inmune local contra el tumor. Se han introducido varios genes de citocinas en tumores con resultados variables en la inmunogenicidad y la actividad tumoricida.⁷⁵ El FNT- α , el INF- γ , la IL-2 y la IL-12 son las citocinas que más se han utilizado en este tipo de ensayos; sin embargo, lo que ha dado mejores resultados ha sido la utilización del FEC-GM. Se ha reportado que la in-

yección de células de melanoma murino transfectadas con este gen e inactivadas por radiación, inducen el rechazo tumoral mediado por linfocitos T CD8+ y CD4+. ⁷⁶

En muchos tumores quizá sea más efectiva la inducción de varias citocinas al mismo tiempo por medio de vectores virales o plasmídicos con múltiples promotores, o la construcción de citocinas quiméricas mediante la clonación de varios cADN en un solo marco de lectura con regiones espaciadoras entre ellos.

Conclusión

El cáncer del cuello uterino es una enfermedad multifactorial en la que se presentan varios defectos del sistema inmune en un nivel local. Además, en las mujeres con este padecimiento existe un gran polimorfismo tanto en las moléculas de AHL I y II, el tipo de VPH y la respuesta inmune local. Para inducir una respuesta inmune efectiva que detenga o destruya las células tumorales se requiere quizá la estimulación conjunta de múltiples componentes del sistema inmune: por vía sistémica, la estimulación de LTC y TC contra epítomos del VPH, y en el nivel local, la inducción de la secreción de citocinas por el tumor, para aumentar el procesamiento y presentación de blancos tumorales y la estimulación de los linfocitos que infiltran el tumor. Por lo tanto, para lograr una respuesta inmune efectiva se requiere de la construcción de múltiples vacunas terapéuticas cada una de ellas para estimular una vía inmune definida. En el diseño de vacunas terapéuticas, también es necesario considerar el polimorfismo en las moléculas AHL, el VPH y los defectos del sistema inmune. Para el tratamiento de las enfermas con cáncer será necesario contar con una batería amplia de vacunas terapéuticas, de tal manera que la terapéutica específica para cada paciente se pueda diseñar a la medida, de acuerdo con el tipo de AHL, VPH y los defectos del sistema inmune.

Referencias

1. Nelson JH, Averette HE, Richart RM. Dysplasia, carcinoma *in situ*, and early invasive cervical carcinoma. CA- Cancer J Clin 1984;34:306-327.
2. Berumen J, Casas L, Segura E, Amezcua JL, García-Carrancá A. Genome amplification of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical carcinomas is related to the retention of E1/E2 genes. Int J Cancer 1994;56:640-645.
3. Berumen J, Unger ER, Casas L, Figueroa P. Amplification of human papillomavirus types 16 and 18 in invasive cervical cancer. Hum Pathol 1995;26:676-681.

4. Muñoz N, Bosch FX. Cervical cancer and human papillomavirus: Epidemiological evidence and perspectives for prevention. Salud Publica Mex 1997;39(4):274-282.
5. Wheeler CM. Preventive vaccines for cervical cancer. Salud Publica Mex 1997; 39(4):283-287.
6. Benton C, Shahidullah H, Hunter J. Human papillomavirus in the immunosuppressed. Papillomavirus Rep 1992;3:23-26.
7. Tay SK, Jenkins D, Singer A. Natural killer cells in cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus infection. Br J Obstet Gynaecol 1987; 94:901-906.
8. Fierlbeck G, Schiebel U, Muller C. Immunohistology of genital warts in different stages of regression after therapy with interferon t. Dermatologica 1989; 179:191-195.
9. Muller M, Viscidi RP, Sun Y, Guerrero E, Hill PM, Shah F *et al.* Antibodies to VPH-16 E6 and E7 proteins as markers for VPH-16 associated invasive cervical cancer. Virology 1992;187:508-514.
10. Nindl I, Benitez-Bribiesca L, Berumen J, Farmanara N, Fisher S, Gross G L *et al.* Antibodies against linear and conformational epitopes of the human papillomavirus (VPH) type 16 E6 and E7 oncoproteins in sera of cervical cancer patients. Arch Virol 1994;137:341-353.
11. Lentinen M, Leminen A, Kuoppala T, Tiikkainen M, Lehtinen T, Lehtovirta P *et al.* Pre- and post-treatment serum antibody responses to VPH-16 E2 and HSV 2 ICP8 proteins in women with cervical carcinoma. J Med Virol 1992;37:180-186.
12. Dillner J. Antibody responses to defined VPH epitopes in cervical neoplasia. Papillomavirus Rep 1994;5:35-41.
13. Kanda T, Onda T, Zanma S, Yasugi T, Furano A, Watanabe S, Kawana T *et al.* Independent association of antibodies against human papillomavirus type 16 E1/E4 and E7 proteins with cervical cancer. Virology 1992;190:724-732.
14. Onda T, Kanda T, Zanma S, Yasugi T, Watanabe S, Kawana T *et al.* Association of antibodies against human papillomavirus 16 E4 and E7 proteins with cervical cancer positive for human papillomavirus DNA. Int J Cancer 1993; 54:624-628.
15. Ghosh AK, Smith NK, Stacey SN, Glew SS, Connor ME, Arrand JR *et al.* Serological response to HPV-16 in cervical dysplasia and neoplasia: Correlation of antibodies to E6 with cervical cancer. Int J Cancer 1993; 53:591-596.
16. Viscidi RP, Sun Y, Tsuzaki B, Bosch FX, Muñoz N, Shah KV. Serologic response in human papillomavirus-associated invasive cervical cancer. Int J Cancer 1993;55:780-784.
17. Dillner J. Disappearance of antibodies to HPV-16 E7 after treatment for cervical cancer. Lancet 1993; 341:1594.
18. Tanaka K, Yoshioka T, Biebnerrich C, Jay G. Role of major histocompatibility complex class I antigens in tumor growth and metastasis. Ann Rev Immunol 1988;6:359-380.
19. Waldmann H, Cobbold S. Immunol. Today 1993;14:247-251.
20. Bal V, McIndoe A, Denton C, Hudson D, Lombardi G, Lamb J. Eur J Immunol 1990;20:1893-1897.
21. Barker JNWN, Milra RS, Griffiths CEM, Dixit VM, Nickoloff BJ. Keratinocytes as initiators of inflammation. Lancet 1991;337:211-214.
22. Luger TA, Schwarz T. Evidence for an epidermal cytokine network. J Invest Dermatol 1990;95:100S-104S.
23. Ristow HJ. A major factor contributing to epidermal proliferation in inflammatory skin diseases appears to be interleukin 1 or a related protein. Proc Natl Acad Sci U S A 1987;84:1940-1944.
24. Kirnbauer R, Kock A, Schwarz T, Urbanski A, Krutmann J, Borth W *et al.* IFN- β 2, B cell differentiation factor 2, or hybridoma growth factor (IL-6) is expressed and released by human epidermal cells and epidermoid carcinoma cell lines. J Immunol 1989;142:1922-1928.
25. Woodworth CD, Simpson S. Comparative lymphokine secretion by cultured normal human cervical keratinocytes, papillomavirus-immortalized, and carcinoma cell lines. Am J Pathol 1993;142:1544-1555.

26. Kyo S, Inoue M, Hayasaka N, Inoue T, Yutsudo M, Tnizawa O *et al.* Regulation of early gene expression of human papillomavirus type 16 by inflammatory cytokines. *Virology* 1994;200:130-139.
27. Nickoloff BJ, Basham TY, Merigan TC, Morhenn VB. Antiproliferative effects of recombinant interferons on cultured human keratinocytes. *Lab Invest* 1984;51:697-701.
28. Woodworth CD, Lichti U, Simpson S, Evans CH, Dipaolo J. Leukoregulin and t-interferon inhibit human papillomavirus type 16 gene transcription in human papillomavirus immortalized human cervical cells. *Cancer Res* 1992;52:456-463.
29. Furbert-Harris PM, Evans CH, Woodworth CD, Dipaolo JA. Loss of leukoregulin up-regulation of natural killer but not lymphokine-activated killer lymphocytotoxicity in human papillomavirus 16 DNA-immortalized cervical epithelial cells. *J Natl Cancer Inst* 1989;81:1080-1085.
30. Kasahara T, Djeu JY, Dougherty SF, Oppenheim JJ. Capacity of human large granular lymphocytes (LGL) to produce multiple lymphokines: Interleukin-2, interferon, and colony stimulating factor. *J Immunol* 1983;131:2379-2385.
31. Gildlund M, Orn A, Pattengal PK, Jansson M, Wigzell H, Nilsson K. Natural killer cells kill tumour cells at a given stage of differentiation. *Nature* 1981;292:848.
32. Ortaldo JR, Mason AT, O'shea JJ. Receptor-induced death in human natural killer cells: Involvement of CD16. *J Exp Med* 1995;181:339-344.
33. Henkart PA. Lymphocyte-mediated cytotoxicity: Two pathways and multiple effector molecules. *Immunity* 1994;1:343-346.
34. Jiang YZ, Couriel D, Mavroudis DA, Lewalle P, Malkovska V, Hensel NF *et al.* Interaction of natural killer cells with MHC class II: Reversal of HLA-DR1-mediated protection of K562 transfectant from natural killer cell-mediated cytotoxicity by brefeldin-A. *Immunology* 1996;87:481-486.
35. Banks L, Moreau F, Voudsen K, Pim D, Matlashewski G. Expression of the human papillomavirus E7 oncogene during cell transformation is sufficient to induce susceptibility to lysis by activated macrophages. *J Immunol* 1991;146:2037-2043.
36. Denis M, Chadee K, Matlashewski GJ. Macrophage killing of human papillomavirus type 16-transformed cells. *Virology* 1989;170:342-345.
37. Viac J, Soler C, Chardonnet Y, Euvrard S, Schmitt D. Expression of immune associated surface antigens of keratinocytes in human papillomavirus-derived lesions. *Immunobiology* 1993;188:392-402.
38. Cromme F, Meijer C, Snijders P, Uytendinck A, Kenemans P, Helemanhorst T *et al.* Analysis of MHC class I and II expression in relation to presence of HPV genotypes in premalignant and malignant cervical lesions. *Br J Cancer* 1993;67:1372-1380.
39. Connor ME, Stern P. Loss of MHC class I expression in cervical carcinomas. *Int J Cancer* 1990;46:1029-1034.
40. Keating PJ, Cromme FV, Duggan-Keen M, Snijders PJ, Walboomers JM, Hunter RD *et al.* Frequency of downregulation of individual HLA-A and B alleles in cervical carcinomas in relation to TAP-I expression. *Br J Cancer* 1995;146:944-952.
41. Cromme F, Airey J, Heemels M, Ploegh HL, Keating PJ, Stern PL *et al.* Loss of transporter protein, encoded by the Tap-I gene, is highly correlated with loss of HLA expression in cervical carcinomas. *J Exp Med* 1994;179:335-340.
42. Ellis JRM, Keating PJ, Baird J, Hounsell EF, Renouf DV, Rowe M *et al.* The association of an HPV 16 oncogene with HLA-B7 has implications for vaccine design in cervical cancer. *Nat Med* 1995;1:464-469.
43. Coleman N, Stanley M. Analysis of HLA-DR expression on keratinocytes in cervical neoplasia. *Int J Cancer* 1994;56:314-319.
44. Glew SS, Duggan KM, Cabrera T, Stern PL. HLA class II antigen expression in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Cancer Res* 1992;52:4009-4016.
45. Wank R, Thomassen C. High risk of squamous cell carcinoma of the cervix for women with HLA-DQw3. *Nature* 1991;352:723-725.
46. Apple RJ, Erlich HA, Klitz W, Manos MM, Becker TM, Wheeler CM. HLA DR-DQ associations with cervical carcinoma show papillomavirus-type specificity. *Nature Genet* 1994;6:157-162.
47. Bavinck JNB, Gissmann L, Claas FHJ, Van Dder Woude FJ, Persijn CG, Ter Schegget J *et al.* Relation between skin cancer, humoral responses to human papillomaviruses, and HLA class II molecules in renal transplant recipients. *J Immunol* 1993;151:1579-1586.
48. Malejczyk J, Malejczyk M, Urbanski A, Kock A, Jablonska S, Orth G *et al.* Constitutive release of IL6 by human papillomavirus type 16 (HPV 16)-harboring keratinocytes: A mechanism augmenting the NK-cell-mediated lysis of HPV-bearing neoplastic cells. *Cell Immunol* 1991;136:155-164.
49. Malejczyk J, Malejczyk M, Kock A, Urbanski A, Majewski S, Hunzelmann N *et al.* Autocrine growth limitation of human papillomavirus type 16-harboring keratinocytes by constitutively released tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 1992;149:2702-2708.
50. Pietschmann JA, Stein RW, Moran E, Yaciuk P, Schlegel R, Lyons RM *et al.* TGF-beta1 inhibition of c-myc transcription and growth in keratinocytes is abrogated by viral transforming proteins with pRB binding domains. *Cell* 1990;61:777-785.
51. Woodworth CD, Notario V, Dipaolo JA. Transforming growth factors beta 1 and 2 transcriptionally regulate human papillomavirus HPV type 16 early gene expression in HPV-immortalized human genital epithelial cells. *J Virol* 1990;64:4767-4775.
52. Braun L, Durst M, Mikumo R, Crowley A, Robinson M. Regulation of growth in human papillomavirus-transformed keratinocytes by transforming growth factor-beta: Implications for the control of papillomavirus infection. *Mol Carcinog* 1992;6:100-111.
53. Ghosh AK, Moore M. Tumour-infiltrating lymphocytes in cervical carcinoma. *Eur J Cancer* 1992;11:1910-1916.
54. Viac J, Guerin-Reverchon Y, Chardonnet Y, Bremond A. Langerhans cells and epithelial cell modification in cervical intraepithelial neoplasia: Correlation with human papillomavirus infection. *Immunobiology* 1990;180:328-338.
55. Hughes RG, Norval M, Howie SEM. Expression of major histocompatibility class II antigens by Langerhans cells in cervical intraepithelial neoplasia. *J Clin Pathol* 1988;41:253-259.
56. Fink-Puches R, Smolle J. Langerhans cells in epithelial skin tumors: A quantitative immunohistological and morphometric investigation. *In Vivo* 1993;7:213-216.
57. Morelli AE, Sananes C, Di PG, Paredes A, Fainboim L. Relationship between types of human papillomavirus and Langerhans cells in cervical condyloma and intraepithelial neoplasia. *Am J Clin Pathol* 1993;99:200-206.
58. Lehtinen M, Rantala I, Toivonen A, Luoto H, Aine R, Lauslahti K *et al.* Depletion of Langerhans cells in cervical HPV infection is associated with replication of the virus. *Apmis* 1993;101:833-837.
59. Malejczyk J, Malejczyk M, Majewski S, Orth G, Jablonska S. NK-Cell activity in patients with HPV 16-associated anogenital tumors: Defective recognition of HPV 16-harboring keratinocytes and restricted unresponsiveness to immunostimulatory cytokines. *Int J Cancer* 1993;54:917-921.
60. Evans CH, Flugelman AA, Dipaolo JA. Cytokine modulation of immune defenses in cervical cancer. *Oncology* 1993;50:245-251.
61. Comerford SA, McCance DJ, Dougan G, Tite JP. Identification of T- and B-Cell epitopes of the E7 protein of human papillomavirus type 16. *J Virol* 1991;65:4681-4690.
62. Tindle RW, Fernando GJ, Sterlin JC, Frazer IH. A "Public" T-helper epitope of the E7 transforming protein of human papillomavirus 16 provide cognate help for several E7 B-cell epitopes from cervical cancer-

- associated human papillomavirus genotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:5887-5891.
63. Altmann A, Jochmus KI, Frank R, Gausepohl H, Moebius U, Gissmann L *et al*. Definition of immunogenic determinants of the human papillomavirus type 16 nucleoprotein E7. *Eur J Cancer* 1992;28:236-333.
64. Stauss HJ, Davies H, Sadovnikova E, Chain B, Horowitz N, Sinclair C. Induction of cytotoxic T lymphocytes with peptides in vitro: Identification of candidate T-Cell epitopes in human papillomavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:7871-7875.
65. Feltkamp MC, Smits HL, Vierboom MP, Minnaar RP, De Johgh BM, Brijfhout 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;23:2242-2249.
66. Kast WM, Brandt R, Drijfhout JW, Melief CJ. Human leukocyte antigen-A2.1 restricted candidate cytotoxic t-lymphocyte epitopes of human papillomavirus type-16 E6-protein and E7-protein identified by using the processing-defective human cell line-T2. *J Immunother* 1993;14:115-120.
67. Kast W, Brandt R, Sidney J, Drijfhout JW, Kubp RT, Grey HM *et al*. Role of HLA-A motifs in identification of potencial CTL epitopes in human papillomavirus type 16 E6 and E7 Proteins. *J Immunol* 1994;152:3904-3912.
68. Meneguzzi G, Gerni C, Kieny MP, Lathe R. Immunization against human papillomavirus type 16 tumor cells with recombinant vaccinia viruses expressing E6 and E7. *Virology* 1991;181:62-69.
69. Gao L, Chain B, Sinclair C, Crawford L, Zhou J, Morris J *et al*. Immune response to human papillomavirus type 16 E6 gene in a live vaccinia vector. *J Gen Virol* 1994;75:157-164.
70. Lin K, Guarnieri FG, Staveley-O'Carroll KF, Visidi RP, Levitski H, Pardoll DM *et al*. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Res* 1996;56:21-26.
71. Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dwarki VJ *et al*. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 1993;259:1745-1748.
72. Tindle R. Human papillomavirus vaccines for cervical cancer. *Curr Opin Immunol* 1996;8:643-650.
73. Tanaka K, Isselbacher K, Khnoury G, Jay G. Reversal of oncogenesis by the expression of a Major Histocompatibility Complex class I gene. *Science* 1984; 228:26-30.
74. Watanabe Y, Kuribayashi K, Miyatake S, Nishihara K, Nakayama E, Taniyama T *et al*. Exogenous expression of mouse interferon r cDNA in mouse neuroblastoma C 1300 cells results in reduced tumorigenicity by augmented anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86: 9456-9460.
75. Chen L, Ashe S, Brady WA, Hellstrom I, Hellstrom KE, Ledbetter JA *et al*. Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4. *Cell* 1992;71:1093-1102.
76. Chen L, McGowan P, Ashe S, Johnston J, Li YW, Hellstrom Y *et al*. Tumor immunogenicity determines the effect of B7 costimulation on T cell-mediated tumor immunity. *J Exp Med* 1994;179:523-532.
77. Pardoll D. New strategies for enhancing the immunogenicity of tumors. *Curr Opin Immunol* 1993;5:719-725.
78. Dranoff G, Jaffe E, Lazenby A, Golumbek P, Levitsky H, Brose K *et al*. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90: 3539-3543.