

HERRAMIENTAS BIOTECNOLÓGICAS APLICADAS AL ESTUDIO DEL CÁNCER.

El modelo de Cáncer de Cuello Uterino y su relación con el Virus del Papiloma Humano (HPV).

BIOTECHNOLOGY TOOLS APPLIED TO CANCER RESEARCH

Orozco O¹.

RESUMEN

El Cáncer de cuello uterino es un problema de salud pública mundial, con más de 500.000 nuevos casos al año y 200.000 muertes, 80% de los cuales ocurren en países del tercer mundo. Las evidencias morfológicas, epidemiológicas y moleculares indican que la infección por el virus del Papiloma Humano (HPV) está fuertemente asociada con el desarrollo del tumor. El estudio del papel del virus es importante tanto desde el punto de vista de la comprensión del proceso carcinogénico en sí, como desde la perspectiva de la implementación de medidas que previniendo o controlando la infección viral, puedan llevar a evitar la aparición del cáncer y/o controlar su crecimiento.

Hasta hace poco, estos estudios se vieron limitados por la dificultad de obtener material viral suficiente, ya sea de las lesiones o por medio de cultivo «in vitro» de células infectadas. Los avances recientes en las técnicas inmunológicas, de ingeniería genética y de síntesis química han permitido aplicar una perspectiva biotecnológica en este modelo, lográndose un conocimiento muy importante de los mecanismos carcinogénicos virales y de la interacción virus-huésped en el ámbito de la respuesta inmune. Lo anterior ha permitido proponer por ejemplo la vacunación con fines profilácticos (evitar la infección viral primaria y por ende la aparición del tumor) o con fines terapéuticos (eliminación inmunológica de células ya infectadas y tumorales).

En nuestro laboratorio hemos empleado estas técnicas para producir anticuerpos monoclonales anti-péptidos sintéticos derivados de la secuencia de la oncoproteína E7 de HPV 16, para buscar con esta herramienta la caracterización de la proteína nativa, su detección en tejidos tumorales y entender mejor su papel en el proceso oncogénico. También hemos logrado introducir el gen de esta proteína en un vector plasmídico, expresando posteriormente el producto en bacterias y obteniendo así el material suficiente y adecuado para estudiar la respuesta inmune contra esta proteína en pacientes con cáncer cervical invasivo. Estos y otros estudios que se realizan en la actualidad en muchos centros del mundo abren

perspectivas de utilizar esta y otras oncoproteínas del virus como inmunógenos para modular la respuesta inmune anti-tumoral en las llamadas vacunas terapéuticas.

Hoy en día existe mucho interés en explorar la utilidad de proteínas de la cápside viral obtenidas en sistemas de expresión eucariotes o de otro tipo, que permiten obtener pseudocapsides virales con el plegamiento adecuado (Virus like particles o VLP). Al optar la proteína recombinante la misma estructura que la proteína natural, es posible obtener mediante inmunización una respuesta de anticuerpos neutralizantes que al menos en los modelos experimentales evita la infección y por ende el posterior desarrollo de la neoplasia. Los esfuerzos se centran en optimizar los procesos de fermentación para lograr producir de manera escalada lotes de estas VLP con la estructura y estabilidad adecuadas para la formulación de un producto útil para los estudios de campo.

Palabras claves: cáncer, Virus Papiloma Humano.

INTRODUCCIÓN.

El cáncer cervical es un problema de salud pública importante, siendo el segundo tipo de cáncer que afecta a las mujeres en el mundo. En 1990, se registraron cerca de 500.000 nuevos casos y 200.000 muertes por esta enfermedad, 80% de las cuales ocurrieron en mujeres de países del tercer mundo (Pisani, 1997).

Estudios epidemiológicos y biológicos realizados durante los últimos 20 años han llevado al reconocimiento de que ciertos tipos de virus del papiloma humano (HPV) están asociados con el desarrollo de varias neoplasias anogenitales, incluidos el cáncer escamocelular de cérvix y adenocarcinomas, carcinoma de vulva, pene y ano (Bergeron, 1992; Gaarenstroom, 1994). Actualmente, se

¹ Director. Grupo de Inmunología, Instituto Nacional de Cancerología. Santafé de Bogotá.
e-mail: oorozco@colciencias.colciencias.gov.co

conoce que por lo menos 14 tipos de HPV (16,18,31,33, 35,39,45, 51,52,54,56,58, 59,66) están asociados con displasias severas y lesiones escamosas invasivas de cérvix y por lo tanto son considerados de alto riesgo. Otros tipos virales tales como 6,11,34,40,42,43 y 44 están asociados con lesiones cervicales benignas y por consiguiente son considerados de bajo riesgo oncogénico (De Villiers, 1994). Se ha determinado que la magnitud de la asociación entre HPV y cáncer de cérvix es mayor que la asociación entre cigarrillo y cáncer pulmonar y es solo un poco menor que la asociación entre virus de la hepatitis B y cáncer de hígado en la condición de portador crónico (Franco, 1995). En concordancia con lo anterior, el grupo de trabajo de la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer concluyó que la evidencia biológica y epidemiológica es suficiente para considerar que ciertos tipos de HPV son agentes carcinógenos en humanos (IARC, 1995).

Si bien con la ayuda de la radioterapia y la cirugía con frecuencia es posible reducir dramáticamente la carga tumoral en los estadios invasivos, la recidiva a partir de células residuales es un fenómeno común y la enfermedad se vuelve resistente a todas las formas estándares de terapia, lo que se refleja en el hecho de que la tasa de supervivencia no se ha mejorado significativamente durante los últimos 20 años. Se impone entonces buscar nuevas medidas de control y tratamiento que por ejemplo permitan de una parte prevenir la infección viral para evitar el posterior desarrollo del tumor y de otra parte, lograr que en las mujeres ya infectadas y que han desarrollado el tumor sus mecanismos de defensa antiviral se vuelvan eficientes para eliminar las células infectadas y en proceso de transformación maligna.

Las dificultades de estudio propias del modelo en el cual no es posible obtener de manera eficiente material viral proveniente de las lesiones o a partir del cultivo in vitro de células infectadas, se han ido resolviendo gracias a la utilización de técnicas inmunológicas, de síntesis química y de ingeniería genética que han permitido como se verá a continuación, el conocimiento a fondo de la interacción huésped-virus para entender el proceso carcinogénico y las formas de respuesta inmune que se dan frente a la infección. La aplicación de una estrategia biotecnológica ha llevado a la formulación de medidas encaminadas a lograr la prevención de la infección viral y por ende del desarrollo posterior de la neoplasia; incluso, estas mismas estrategias están encaminadas a lograr que una vez presente la infección y el proceso neoplásico, se puedan estimular las defensas del huésped para buscar la eliminación de las células infectadas que se han transformado en malignas.

ASPECTOS CLÍNICOS DEL CÁNCER DE CÉRVIX.

El diagnóstico del carcinoma de cuello uterino es fundamentalmente clínico. Sus síntomas dependen del estadio de la lesión. Los programas apropiados de

detección precoz del cáncer uterino permiten que un buen número de diagnósticos se realiza antes que aparezcan los síntomas. Sin embargo, en países como el nuestro en donde estos programas no están adecuadamente implementados a pesar de que esta neoplasia es la más común entre las mujeres, la mayor parte de estas pacientes se presentan en estados avanzados con síntomas como hemorragia genital, sangrado relacionado con el coito, flujo vaginal y dolor hipogástrico. La citología cervicovaginal como método de detección ha producido una disminución del 40-80% en la incidencia y mortalidad del cáncer invasivo de cuello uterino, a través del diagnóstico temprano y el tratamiento de las lesiones tempranas y el carcinoma microinvasivo. Sin embargo este método tiene un 15% de falsos negativos y no es seguro para la detección de adenocarcinomas. La biopsia cervical confirma el diagnóstico citológico y se practica bajo colposcopia a todas las lesiones o áreas anormales, independiente del resultado de la citología. Este método de análisis colposcópico detecta el 90% de las lesiones tempranas de alto riesgo para progresar a tumor invasivo.

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE LA INFECCIÓN POR HPV.

Los estudios epidemiológicos han indicado claramente que tanto la infección por HPV como el cáncer cervical están fuertemente influenciados por el grado de actividad sexual, tanto de la mujer como de su compañero (Schiffman, 1994). La infección persistente por los tipos de alto riesgo de HPV es determinante en las lesiones escamosas intraepiteliales (LEI), consideradas como pre-neoplásicas. No obstante, se necesitan factores adicionales que contribuyan en un proceso de múltiples etapas que llevan al cáncer cervical. Las condiciones que llevan a inmunosupresión aumentan el riesgo de adquisición y progresión de las lesiones asociadas a HPV (IARC Working Group, 1995). Un número grande de estudios ha mostrado que pacientes con trasplante renal o mujeres infectadas con VIH tienen un mayor riesgo de LEI asociado a HPV.

Los estudios de epidemiología molecular utilizando la reacción de polimerización en cadena (PCR) para detectar el virus han aclarado el perfil de transmisión sexual de la infección cervical por HPV (IARC Working Group, 1995). No obstante, no todos los estudios basados en PCR han confirmado los resultados antes mencionados; los datos derivados de estos estudios indican que la asociación entre actividad sexual y prevalencia general de HPV puede ser alta (Ley et al, 1991), moderada (Hildesheim et al, 1993) o no existe (Kjaer et al, 1993). Puesto que los errores en la detección de HPV por PCR son menos probables con relación a los estudios que usan otra metodología, es probable que la variación entre los resultados se deba a diferencias en las poblaciones estudiadas. Un estudio transversal que se hizo en el nordeste brasileño mostró

evidencias en este sentido (Franco et al, 1995). Las infecciones con bajo potencial oncogénico se asociaron sólo levemente con el comportamiento sexual en mujeres menores de 40 años, mientras que la variable de comportamiento sexual es predictiva de la infección con los tipos de HPV clasificados como de alto riesgo oncogénico, sin importar la edad. Un estudio muy extenso ha mostrado que la prevalencia de tipos de HPV específicos en carcinoma cervical puede variar dependiendo del origen geográfico del espécimen (Bosch et al, 1995). El riesgo de infección por HPV parece también estar independientemente influenciado por otras variables como paridad, uso de anticonceptivos orales, hábito de fumar (Schiffman et al, 1995). No obstante, el principal factor para la infección es la edad; la mayoría de estudios indica una disminución importante en la prevalencia a partir de los 30 años; la disminución del riesgo de infección con el aumento en la edad parece ser independiente de la actividad sexual (Wheeler et al, 1993) y, al menos para algunas poblaciones, puede estar restringida a los tipos de bajo riesgo (Franco et al, 1995).

INTERACCIÓN DE HPV CON DIFERENTES CO-FACTORES.

Los mutágenos e inmunosupresores, como aquellos presentes en los constituyentes del humo del tabaco, pueden cooperar con los papillomavirus en la inducción de cánceres de manera diferente (IARC Working Group, 1995). La detección de altos niveles de estos componentes en las secreciones cervicales de fumadoras en comparación con no fumadoras (Schiffman, 1987) y la demostración de la actividad mutagénica en células cervicales, similar a la observada en tejido pulmonar (Phillips et al, 1993) señalan un papel importante de estos compuestos en la carcinogénesis cervical. La depleción inmunológica local causada por la acción del tumor o por la acción mutagénica del contenido del humo pueden favorecer la persistencia viral, contribuyendo a la transformación maligna.

Las hormonas interactúan con los genomas del papillomavirus modificando su expresión. La transformación de células primarias de ratón por HPV-16 en combinación con un oncogén activado se ha visto que es dependiente de glucocorticoides: las células se vuelven tumorogénicas en presencia de dexametasona (Pater et al, 1988). Además, estos experimentos pueden ser reproducidos en presencia de progesterona y progestinas, los componentes activos de los anticonceptivos orales (Pater et al, 1990). Estos efectos pueden ser antagonizados por el RU486, un esteroide sintético que se une al receptor de glucocorticoide y progesterona (Pater et al, 1991).

El papel que el virus Herpes Simplex (HSV) juega como co-factor no es muy claro (Becker et al, 1994). Hay evidencia experimental que muestra que segmentos de

HSV-2 (DiPaolo et al, 1990) o Herpesvirus humano 6 (Chen et al, 1994) pueden transformar células inmortalizadas por HPV. Sin embargo, estas observaciones requieren estudios más profundos. La asociación entre HPV y otros agentes de transmisión sexual como Tricomonas, Citomegalovirus, Chlamydia, Treponema y Gardenella con el desarrollo de neoplasia cervical se ha investigado en varios estudios pero hasta el momento no hay un conocimiento preciso de estas posibles asociaciones. El efecto de la dieta y el consumo de alcohol en el riesgo de tumores malignos asociados a HPV no se ha establecido hasta ahora y se requieren mayores investigaciones.

BIOLOGÍA DE LOS PAPILOMAVIRUS.

Los papillomavirus son virus de doble cadena de DNA de aproximadamente 8000 pares de bases y pertenecen a la familia papovaviridae (zur Hausen, 1994). Se encuentran principalmente en el epitelio de diferentes animales, incluidos aves, reptiles y mamíferos y son altamente específicos de su huésped. En el humano se han identificado más de 70 tipos virales con base en la homología de las secuencias de DNA (De Villiers, 1994). El genoma de los HPV está dividido en 3 segmentos: una región temprana con ocho genes (E1 a E8), una tardía con 2 genes (L1 y L2) y una región no codificadora conocida como región larga de control (LCR); estos genomas son mantenidos como episomas en el núcleo de las células normales infectadas latentemente. No obstante, en la neoplasia intraepitelial cervical (NIC) y, más frecuentemente en cánceres, el genoma viral es integrado al genoma del huésped.

Corriente arriba de los marcos de lectura abierta de la región temprana existe un segmento de DNA de 900 pb que contiene el origen de replicación viral y los elementos transcripcionales respondedores que regulan la expresión de los genes de HPV. Esta es la región denominada LCR, que es modulada por factores fisiológicos como las hormonas esteroides. A esta región se unen cerca de 20 factores de transcripción como la proteína activadora (AP1), los receptores de glucocorticoides y la progesterona, el factor nuclear NF1, el factor de unión al octámero (Oct-1) y el represor de transcripción YY1 (Bauknecht et al, 1995, Ishiji et al, 1992, Sibbet et al, 1990). Por lo tanto, un conjunto muy complejo de interacción de factores es responsable de la regulación del ciclo vital del HPV. El conocimiento de los mecanismos involucrados en este proceso regulatorio puede contribuir a entender los eventos determinantes en la progresión maligna de las lesiones ligadas a HPV.

La replicación del genoma del HPV esta controlada por la proteína codificada por el gen E1. Se ha visto que los heterodímeros de E1-E2 estimulan la iniciación de la replicación (Svendrup et al, 1994).

El producto del gen E2 está involucrado en la regulación transcripcional del genoma del HPV (McBride et al, 1991). Cuando el marco de lectura de este gen es interrumpido, como en el caso de la integración del genoma viral que ocurre en las lesiones intraepiteliales y en cáncer, se observa una elevación significativa de E6 y E7, la cual se correlaciona con un aumento en la actividad de inmortalización en los cultivos celulares (Romanczuk et al, 1992).

El producto del gen E4, que se expresa como un gen tardío a pesar de su localizador en la región temprana, parece estar involucrado en la maduración y liberación de partículas virales. En keratinocitos en cultivo, la proteína E4 se encuentra asociada al citoesqueleto de queratina (Roberts et al, 1993), sugiriendo que puede estar involucrado en la liberación de viriones a las capas cornificadas del epitelio.

La proteína del gen E5 participa también en el estímulo al crecimiento y la transformación celular. Este producto es una pequeña proteína hidrofóbica unida a la membrana celular (Halbert et al, 1988), la cual es sinérgica con el factor de crecimiento epitelial (EGF) en la estimulación de la proliferación celular (Leechanachai et al, 1992, Bouvard et al, 1994). En las células que expresan E5 se aumenta el recambio y fosforilación de los receptores para EFG, lo cual posiblemente lleva a una respuesta aumentada a los estímulos extracelulares para crecimiento (Banks et al, 1993).

Los genes E6 y E7 están localizados en la parte 5' de la región temprana. Estos genes codifican unas proteínas multifuncionales que interfieren con el crecimiento celular y son transcritas por el mismo promotor, dando lugar a un mRNA policistrónico. Las proteínas codificadas por estos genes en los tipos de HPV de alto riesgo, pero no en los de bajo riesgo, están involucradas directamente en la transformación celular. Varios ensayos in vitro han mostrado que los HPV-16 y 18 pueden transformar de manera eficiente células de roedores (Vousden et al, 1988); no obstante, hay que mencionar que los genes de E6 y E7 de estos virus sólo pueden transformar células de cultivo primario en la presencia de un oncogén activo (Matlashewski et al, 1987). Otra característica importante de las proteínas E6 y E7 de los tipos de alto riesgo es su capacidad de inmortalizar keratinocitos primarios derivados de piel humana y epitelio cervical sano (Durst et al, 1987).

Las proteínas E6 y E7 pueden influir en la transcripción a partir de promotores celulares y virales (Oshima et al, 1993). La consecuencia de la actividad de estas oncoproteínas se refleja en la inestabilidad genómica que conduce a la expresión completa del fenotipo tumoral (White et al, 1994). Las proteínas E6 de los tipos de alto riesgo se unen a la proteína del gen supresor de tumores, la p53 (Werness et al, 1990). Esta asociación lleva a la degradación de la p53, dependiente de ubiquitina, con lo cual se pierde el control del ciclo celular dependiente de p53 (Huibregtse et al, 1994).

La fosfoproteína nuclear E7 se asocia con el producto del gen del retinoblastoma (pRb) (Munger et al, 1993), un gen que actúa como supresor tumoral en el control negativo del crecimiento celular. La unión de E7 de los tipos de alto riesgo con la proteína de pRb libera a ésta de su interacción con el factor de transcripción E2F, el cual queda disponible para activar la transcripción de varios genes involucrados en la progresión de las células de la fase G1 hacia la fase S del ciclo celular. Se ha visto que E7 interactúa con la ciclina A y con la quinasa 2 dependiente de ciclina, perturbando aún más la progresión del ciclo celular (Vousden et al, 1994).

Los genes tardíos (L1, L2) tienen secuencias altamente conservadas entre todos los papillomas (Bernard et al, 1994a) y codifican las proteínas de la cápside. Luego de su síntesis, estas proteínas se dirigen al núcleo, lugar donde se ensamblan las partículas virales (Zhou et al, 1991); su expresión solo se da en infecciones productivas que ocurren en keratinocitos infectados.

Como consecuencia de la expresión prolongada y continua del genoma viral, la célula infectada presenta inestabilidad cromosómica que la puede llevar al cambio total neoplásico. Aparentemente, sólo las infecciones persistentes conducen a este cambio, mientras que existe un alto número de casos en las cuales la infección es transitoria y no asociada a carcinogénesis cervical. El riesgo de la progresión de la enfermedad parece estar asociado también con la carga viral.

TIPOS Y VARIANTES DEL HPV.

En los estudios de variabilidad genómica de los HPV, a través del secuenciamiento se han descrito los diferentes tipos que se pueden ubicar en el árbol filogenético (Peyton et al, 1994). Se definen como tipos aquellos HPV que presentan secuencias nucleotídicas con menos del 90% de homología en las regiones E6, E7 y L1, comparadas con las secuencias nucleotídicas de tipos de HPV ya establecidos. Dentro de un tipo, existen ya sea subtipos con una diferencia en secuencias nucleotídicas entre el 2% y el 10% o variantes cuya diferencia de secuencias es menor al 2%. En estudios realizados a nivel mundial, se ha demostrado la presencia de diversas mutaciones en aislados clínicos, y según los patrones geográficos de agrupación observados, es evidente que el virus ha co-evolucionado con la raza humana (Chan et al, 1995, Yamada et al, 1997).

El espectro de variación puede diferir entre tipos: por ejemplo, se han descrito algunos subtipos para HPV-6, mientras que para HPV16 solo se han demostrado variantes (cambios de secuencia máxima del 2%). De hecho, para este tipo de HPV han sido identificado un considerable número de variantes genómicas en carcinomas cervicales. Por ejemplo, Chan y col. (1992)

encuentran 38 variantes, ubicadas en la región LCR, la mayoría de las cuales se diferencian por una o varias mutaciones puntuales. Icenogle y col. (1992) reportan 12 variantes ubicadas en los marcos de lectura abierta de L1 y E7. La relación entre variantes del HPV y el proceso oncogénico ha sido analizada en varios estudios y se ha observado que el predominio de algunas variantes está asociado de manera positiva con el desarrollo del cáncer y que otras variantes se asocian con la disminución del potencial oncogénico, lo que hace de gran interés la investigación de la relación de las variantes de HPV con el desarrollo de cáncer (Icenogle et al, 1992, Kitasato et al, 1994, Kaye et al, 1996). Adicionalmente, en varios estudios de inmunogenicidad, se han observado diferentes patrones de asociación entre la respuesta inmune celular, humoral y la presencia de variantes (Yaegashi et al, 1993, Chan et al, 1995, Ellis et al, 1995).

Aunque aún no existen conclusiones definitivas sobre el significado del amplio número de variantes de HPV descritas, cuya distribución en diferentes poblaciones puede fluctuar, su importancia se puede apreciar por ejemplo en el trabajo que describe una variación específica en la proteína E6 de HPV16; esta proteína, aislada de individuos con cáncer cervical que son HLA-B27, interfiere con la respuesta inmune de células citotóxicas (Ellis et al, 1995). Este hallazgo tiene implicaciones tanto en el conocimiento de la respuesta inmune celular a los HPV de alto riesgo como en el futuro desarrollo de vacunas contra este virus. Estas consideraciones refuerzan además la importancia de la calidad de la tipificación de HPV, tanto para el diagnóstico clínico de las infecciones como para los estudios epidemiológicos de gran escala.

Los estudios hechos en nuestro laboratorio han permitido definir el perfil de tipos presentes en las pacientes con cáncer de cuello uterino en Colombia (Bravo et al, 1998). Dado nuestro interés por definir la respuesta inmune contra la oncoproteína E7 de HPV16, también se ha estudiado la presencia de variantes en este gen, encontrando que hay una predominante en el 90% de los casos y que en el 10% restante, las variantes presentes tienen cambios de nucleótidos que no repercuten en la estructura primaria de la proteína (Molano et al, 1998). Se puede deducir de estas observaciones que la alta conservación de una proteína tan importante en el proceso oncogénico facilitaría el diseño de inmunógenos para los ensayos de vacunación.

PERSISTENCIA VIRAL Y PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD.

El DNA viral se puede detectar en 10-50% de mujeres asintomáticas en edad reproductiva (Schiffman et al, 1993). Sin embargo, cuando se analizan especímenes cervicales de estas mujeres en estudios de seguimiento, la mayoría de infecciones son transitorias y sólo una pequeña

proporción tiende a llevar el mismo tipo de HPV en muestras posteriores (Villa et al, 1997). También se ha visto que la persistencia es mayor en mujeres de mayor edad y que tiende a disminuir de acuerdo al lapso entre muestras.

La persistencia es mayor en mujeres con tipos de HPV de alto riesgo (Hildesheim et al, 1994), sugiriendo que únicamente las infecciones persistentes del epitelio cervical participan en el desarrollo tumoral. En estudios epidemiológicos se ha demostrado así mismo que cuando una mujer es infectada persistentemente con tipos de alto riesgo, la probabilidad de que desarrolle lesiones neoclásicas es mayor que si fuese infectada transitoriamente (Schiffman, 1995). Hoy col. (1995) han observado que la infección por HPV, detectada en visitas previas y que persiste durante el seguimiento, es predictiva del riesgo a corto plazo para que la mujer desarrolle una lesión preneoplásica. Es de anotar que en este estudio, los altos niveles de HPV (carga viral) fueron predictivos de lesión cervical persistente. Resultados similares fueron obtenidos por Remmink y col. (1995) en un estudio cuyo objetivo era evaluar el valor predictivo del genotipo de HPV para la NIC progresiva. Concluyeron que la persistencia de HPV de alto riesgo lleva a la progresión de las lesiones cervicales, la cual no se observó en ausencia del virus o en persistencia de tipos de bajo riesgo. En este estudio, el efecto de la persistencia de HPV en la progresión de la enfermedad se vio influenciado por la edad, el número de parejas y el hábito de fumar. Más recientemente, se ha demostrado que la detección persistente del DNA del HPV es mayor en cérvix de pacientes que usan anticonceptivos orales por más de dos años (Brisson et al, 1996).

En un estudio de cohorte, Franco y col. (1995) documentan la persistencia de infecciones con base en las variantes moleculares del HPV; los análisis indican que hasta el momento la misma variante molecular está presente en todos los aislados, reforzando la interpretación de la persistencia. Hasta el momento se han encontrado 5 variantes distintas de HPV-16 asociadas con persistencia pero sólo una variante de HPV-18 (Villa et al, 1997). En otro estudio se analizaron las variantes de HPV-16 por polimorfismo conformacional de cadena sencilla del fragmento LCR, amplificado por PCR y seguidos de secuencia. En este estudio, se observó que una misma variante tiende a persistir con el tiempo, lo cual puede indicar algunas ventajas biológicas importantes en la progresión de la enfermedad (Xi et al, 1995) Sin embargo, se necesitan estudios adicionales para comprobar esta interesante hipótesis.

RESPUESTA INMUNE A HPV.

La exposición a un virus generalmente induce una respuesta inmune específica en el huésped. Existen métodos de detección de infección basados en la

medición de anticuerpos circulantes en un número importante de infecciones virales; además, el estudio de esta respuesta permite hacer una mejor definición de la interacción virus-huésped. La carencia de proteínas virales naturales, debido a la falta de líneas celulares que permitan una infección productiva, ha retrasado en gran medida el desarrollo de ensayos inmunológicos para HPV. En consecuencia, el progreso en el estudio de la respuesta inmune hacia estos virus ha sido lento.

Gracias al empleo de estrategias que involucran la obtención de antígenos virales por técnicas de biología molecular y de síntesis de péptidos, se ha definido con respecto a la inmunidad humoral hacia E7 de HPV-16 y 18 que los anticuerpos hacia esta proteína se encuentran con mayor frecuencia en los pacientes con cáncer de cérvix con respecto a controles sanos (Wu, 1994). Sin embargo, la prevalencia de anticuerpos reportadas para E7 de HPV-16 varían entre el 13 y el 43% en sueros de pacientes con cáncer de cérvix y entre el 0 y el 15% para controles sanos (Sun, 1994).

En trabajos previos realizados por nuestro grupo, empleando de la técnica ELISA usando 14 icosapeptidos sobrelapados que cubren la secuencia total de la proteína E7/HPV16, se definió que las principales regiones de la proteína reconocidas por las pacientes con Cáncer invasivo eran las reportadas por los péptidos E7(1-20)-11.3% y E7(66-85)-12.5%. En estos trabajos, ninguno de los controles sanos (sin neoplasia y/o infección por HPV detectable) presentó reactividad con estos péptidos. Para verificar la especificidad de estas reactividades, los sueros de estas pacientes también fueron analizados por inmunotransferencia, empleando como antígeno la proteína recombinante GST-E7 de HPV16, obtenida, caracterizada y expresada en nuestro laboratorio mediante el clonamiento del gen en el vector plasmídico y la posterior inducción de su expresión en *E. coli* (Cómbita, 1996). En este caso, un 28.2% de las pacientes con cáncer invasivo y ninguna del grupo control fueron positivas, confirmándose con la proteína recombinante la reactividad hacia los péptidos sintéticos E7(1-20) y E7(66-85) en las pacientes con cáncer invasivo.

En la segunda fase de este trabajo, una vez normalizada la técnica de ELISA para la detección de anticuerpos anti-E7 empleando proteínas de fusión, se determinó la prevalencia de anticuerpos anti-E7 de HPV-16 en pacientes con cáncer de cérvix, neoplasia intraepitelial cervical y controles, empleando los péptidos sintéticos 1-20 y 66-85 (que representan epítopes B de E7 de HPV-16) y la proteína recombinante MBP-E7/HPV-16; también se analizó la reactividad hacia las proteínas recombinantes MBP-E7/HPV-18 y E7/HPV-11. El ensayo con proteína de fusión MBP-E7/HPV-16 fue mucho más sensible (35% vs 1%) que el ensayo basado en los péptidos (13% vs 3%) para discriminar entre pacientes con cáncer invasivo y controles. Esta diferencia probablemente se deba a la

existencia de epítopes adicionales en la proteína de fusión que no están representadas en los péptidos sintéticos empleados. Respecto a la especificidad del ELISA basado en la proteína recombinante MBP-E7/HPV-16, los ensayos hechos con las proteínas recombinantes MBP-E7 de HPV-11 y HPV-18 indican que no hay reacciones cruzadas entre estas proteínas. Al analizar la correlación entre presencia de anticuerpos hacia E7 de HPV-16 y el pronóstico de las pacientes con Cáncer invasivo usando modelos de regresión Cox para estados iniciales (I y II) y avanzados (III y IV), encontramos una correlación significativa entre presencia de anticuerpos hacia E7(66-85) y un peor pronóstico de la enfermedad ($p=0.043$).

Si bien es claro que sólo un subgrupo de pacientes con cáncer invasivo presenta anticuerpos hacia la proteína E7, el significado clínico de esta respuesta está por definirse. La relación entre estadio tumoral y presencia de anticuerpos no ha sido estudiada extensivamente. Algunos autores no encuentran relación entre seropositividad a E7 de HPV-16 y estadio de la enfermedad (Ghosh, 1993) o se reporta correlación entre seropositividad y presencia de neoplasia cervical, pero la presencia de anticuerpos previa al tratamiento no permite predecir el curso clínico de la paciente; la medición de anticuerpos hacia E7 no tendría entonces un significado pronóstico (Gaarenstroom, 1994). En otros reportes se sugiere que los títulos de anticuerpos aumentan de acuerdo al estado tumoral y muestran variaciones según la respuesta al tratamiento de la enfermedad; incluso, se argumenta que podrían ser un marcador de presencia de metástasis (Wu, 1994; Onda, 1993).

Respecto a la correlación entre serología para E7 y presencia del DNA viral en el tumor tampoco existe un consenso. En varios estudios se ha demostrado que existe poca correlación entre presencia de DNA viral y seropositividad a E7. Se reporta un número importante de casos positivos para anticuerpos anti-E7 que son negativos para presencia de virus en el tumor (7,9,10). En otros reportes se demuestra asociación significativa entre serología para E7 de HPV-16 y tumores asociados a HPV-16 (Wu, 1994, Kanda, 1990). Esta variedad en los resultados puede deberse en gran medida a las diferentes fuentes antigénicas empleadas (péptidos sintéticos, proteínas de fusión, proteínas obtenidas post-traducción *in vitro*); también influyen las características no uniformes de las muestras analizadas (sí se colectaron antes o después del tratamiento, sí el estadio era inicial o avanzado, el sitio de toma de muestra, la calidad de la misma, etc.). Por estas razones los resultados de serología para HPV deben interpretarse con cautela, y respecto a E7 de HPV-16 no hay conclusiones definitivas y no es claro el significado que tiene para una paciente con cáncer de cérvix ser o no seropositiva para E7.

Existen muy pocos estudios de cinética de respuesta humoral a E7 en pacientes sometidas a tratamiento. Dillner (1993) reporta el análisis de sueros pre y post-tratamiento tomados a intervalos regulares en un período de seis meses de 28 pacientes con diagnóstico de cáncer de cérvix. Empleando un ensayo de ELISA con un péptido sintético correspondiente a la región 6-35 de E7 de HPV-16 como antígeno, encontró 5 pacientes altamente positivos, en tres de los cuales los niveles de anticuerpos declinaron durante el tratamiento, en otros dos estos desaparecieron en un año. En este corto reporte no se hace alusión al tipo de tratamiento de los pacientes ni al estadio inicial, tampoco se refiere a la sobrevida. Los estudios que realizamos actualmente, utilizando péptidos sintéticos y proteínas recombinantes de E7 de HPV16 nos han permitido entender como evoluciona la respuesta inmune antiviral en pacientes con cáncer invasivo antes y durante el año siguiente a la radioterapia. Prolongando estas observaciones en el tiempo, esperamos encontrar en esta evolución las características de las pacientes que no responden adecuadamente a este tratamiento (la sobrevida global a 5 años es de solo el 35%), para entender además de los aspectos radiobiológicos, los aspectos inmunológicos que sirvan como factores de pronóstico de estas pacientes.

ESTRATEGIAS PARA LA PREVENCIÓN DE LA INFECCIÓN VIRAL

A pesar de los recientes avances en los sistemas de propagación de HPV, en cultivos xenográficos en ratón y cultivos de raft, el estudio de la localización, estructura y función de las proteínas L1 y L2 en la cápside fueron solo bien conocidas hasta el desarrollo de las VLPs (Schiller y Poden, 1995).

En contraste a las formas de agregados insolubles de la proteína L1 cuando son expresados en bacterias, las VLPs han sido generadas usando varios sistemas de expresión eucarióticos incluyendo Baculovirus, vaccinia virus, Semliki Forest virus, sugiriendo que la formación del virion puede ser dependiente de factores presentes sólo en células eucarióticas. Cualquiera de los factores celulares que estén involucrados en la propiedades de plegamiento de los monómeros de L 1 o en los últimos pasos del proceso del autoensamblaje están aún sin determinar (Schiller y Poden, 1995).

Diferentes grupos han mostrado que la expresión de L 1 de los virus del papilloma (VP) en células eucariotes puede resultar en el autoensamblaje de partículas semejantes a virus, las cuales son morfológicamente similares a los viriones nativos indicando que los elementos estructurales de la mayoría, sino de todos, los capsómeros son compuestos de L1 (Hagensee et al, 1994). Cuando la proteína L2 es co-expresada con L1 en células eucarióticas esta es incorporada en las cápsides en un radio de

aproximadamente 1 por 30 moléculas de L1. En ambos casos las VLP formados de L1/L2 son morfológicamente indistinguibles.

Estudio en los primeros eventos de la infección.

Las VLPs han sido empleadas en el estudio de los eventos tempranos de la infección por VP. Se ha observado que la presencia de VLPs compuestas de BPV L1 ó L1/L2 inhiben de fibroblastos por viriones de BVP. (Ronden et al, 1994). Esto sugiere que las VLPs tienen alta afinidad por el mismo receptor de superficie celular que los viriones y que la L2 no es requerida para esta interacción. Por otro lado, las VLPs HPV 11 ó HPV 16 también pueden inhiben la infección por BPV, implicando que los VP comparten un receptor de superficie celular común y los eventos posteriores durante la infección (Muller et al, 1995).

En otros estudios se observó también que las VLPs HPV 11, 33 y viriones de BPV se unen a una gran variedad de líneas celulares del epitelio, mesenquimales y de origen neuronal derivadas de un amplio rango de especies, sugiriendo así que al receptor de la superficie celular para PVs es ampliamente expresado y evolutivamente conservado (Volpers et al, 1995, Touze y Coursagnet, 1998). El tropismo de muchos virus es determinado por la distribución de la especie o tejido de su receptor, en el caso de HPV, es sorprendente que la especificidad parece ser determinada por algún evento post-unión en el ciclo infeccioso, sin embargo los estudios anteriores, no descartan la posibilidad que en adición a un receptor primario ampliamente distribuido, un receptor secundario podría estar involucrado en la unión del virus.

Vacunas basadas en VLPs

Por varias razones, las VLPs son los candidatos más atractivos para el desarrollo de vacunas profilácticas contra infecciones genitales de HPV, primero estas son seguras, a diferencia de los viriones, esas carecen de potencial oncogénico del genoma viral; pueden ser generadas y purificadas fácilmente a partir de células de insectos o levaduras. Por último, las VLPs de PV presentan los epítopes conformacionales del virion requeridos para la generación de anticuerpos neutralizantes, los cuales se correlacionan bien con la protección en vacunas virales profilácticas (Muñoz et al, 1995; Sasagawa et al, 1995 ; Robbins et al, 1995).

En ensayos de neutralización realizados en conejos inmunizados con VLPs recombinantes de HPV 11 y BPV, se observó que estos generaron títulos de anticuerpos neutralizantes similares a los generados contra los viriones auténticos. Muchos de estos los apítopes neutralizantes fueron tipo-conformacional, ya que los títulos de anticuerpos inducidos por VLPs denaturados o desambladas, o por proteínas de la cápside producidas en bacterias fueron menores que los títulos inducidos por las VLPs ensambladas (Robbins et al, 1995). En otros estudios, se

observó que VLPs L1 sola L1/L2 producen similares títulos de neutralización, indicando que L1 tiene epítopes neutralizantes inmunodominantes (Rose et al, 1994, Kirnbauer et al, 1992). Además, la inmunización con VLPs induce una fuerte respuesta proliferativa de células T y anticuerpos, aún cuando las VLPs fueron inyectadas en ausencia de adjuvante, sugiriendo que su naturaleza polivalente y particular puede facilitar la presentación al sistema inmune (Hiñes et al, 1998 ; Dupuy et al, 1997).

Estudios en modelos animales han demostrado que la inmunización con VLPs conduce a un tipo específico de protección contra la infección de VP experimental. VLPs L1 y/o L1/L2 de CRPV, pero no de BPV protegen conejos domésticos de retos experimentales, además la transferencia pasiva de inmunoglobulinas de conejos inmunizados con VLPs de CRPV protegieron a conejos ingenuos contra subsecuentes retos con CRPV experimentales, indicando que la infección fue medida por anticuerpos neutralizantes, si esta suposición es correcta estos resultados proporcionan un importante soporte para la factibilidad de vacunas profilácticas basadas en VLPs contra HPV genitales. Basados en los resultados de antigenicidad e inmunogenicidad de VLPs de VP en estudios de animales, es probable que las pruebas humanas de vacunas profilácticas podrían ser una promesa en un futuro cercano (Schiller y Roden, 1995).

Para hacer una decisión informada del número de tipos de VLPs a incluir en una vacuna para HPV de amplio espectro, es importante evaluar la probabilidad de que la protección podría ser tipo específica. Con base a los análisis de tipo animal es probable que las VLPs de diferentes tipos de HPV, tales como 16 y 18 podrían inducir una protección cruzada (Schiller y Roden, 1995), sin embargo , es posible que estos grados de protección cruzada puedan ser generados por tipo más cercanamente relacionados, tales como HPV 16 y 31 ; HPV 18 y 45 ó HPV 6 y 11 (Rose et al, 1994). Sin embargo, una eficiente neutralización de la infección en modelos de ratones xenográficos por anticuerpos contra VLPs de HPV11 pero no para HPV 6, habla en contra de esta posibilidad.

Ensayos serológicos basados en VLPs

La detección serológica de la infección de HPV no ha llegado a ser la rutina ya que los ensayos previos basados en proteínas tempranas o cápsidas denaturadas carecen de la suficiente sensibilidad o especificidad. Recientemente, el desarrollo de ELISAS basadas en VLPs para HPV han demostrado la utilidad de anticuerpos anti-virion como marcadores de la infección de HPV. Los resultados de un ensayo de ELISA basados en VLPs para HPV 16 demostró que el 59% de mujeres con infección frecuente de HPV 16 generó una respuesta IgG sistémica detectable, en contraste a un 6% de mujeres negativas para DNA HPV 16 (Schiller y Roden, 1995). Así las

ELISAS basadas en VLPs abren una nueva área de investigación en los estudios de epidemiología y de historia natural. La habilidad de las ELISAS para valorar la extensión de la infección de muestras en sangre fácilmente colectadas podría tener implicaciones en la salud pública.

Sistemas de expresión en Baculovirus / células de insectos.

El sistema de expresión de baculovirus en células de insectos, hacen parte, con la expresión de *Escherichia coli*, en levadura *Sacharomyces cerevisiae* y células de los mamíferos CHO (Chinese Hamster Ovarion), de los cuatro sistemas de expresión más comúnmente utilizados para la expresión de proteínas. Este sistema permite una expresión elevada de las proteínas de interés con las modificaciones postraduccionales de las células eucariotes. Sin embargo, la principal restricción reside en el proceso de glicosilación por la cual la adición de residuos de azúcar son incompletos.

Los baculovirus forman una familia de virus patógenos para los artrópodos y principalmente para los insectos de la orden epidóptera. Por el contrario, estos no son patógenos ni para los vertebrados, ni para las plantas. Sin embargo, los baculovirus son capaces de fijarse sobre las células hepáticas y liberar su genoma.

Los baculovirus tienen la forma de bastones envueltos, de 45mm de diámetro y de 300 nm de largo. El baculovirus más empleado para la expresión de proteínas recombinantes en la *Aotographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV), cuyo genoma esta constituido de DNA de doble cadena superenrollado de 80 a 200 Kpb (Summers et al, 1987).

Durante la infección de la célula de un insecto por el baculovirus, dos tipos de partículas virales son producidas : las partículas virales extracitoplasmáticas que permiten la infección de célula a célula y partículas virales que contienen oclusiones que son resistentes al medio exterior y que permiten la transferencia de la infección de un individuo a otro. Las partículas virales con las oclusiones son producidas durante la fase tardía de la infección. Los viriones son envueltos en una matriz cristalina constituida de una proteína de 29kDa, la poliedrina, que se acumula en el núcleo de las células infectadas (Summers et al, 1987).

El gen que codifica para la poliedrina es fuertemente expresado pero no es esencial para la infección o para la replicación del virus, de esta manera un gen extranjero puede ser clonado en el lugar de la poliedrina. Debido al tamaño grande del genoma del baculovirus, este no permite el clonaje directo de un gen extranjero, por tanto, el clonaje debe hacerse por intermedio de un plásmido de transferencia, el plásmido pBlue Bac III, a través de un proceso de recombinación homologa.

El plásmido de transferencia contiene el promotor de la poliedrina, el gen de interés X y el gen lac Z, los cuales están flanqueados por las secuencias de recombinación (rec) idénticas a las situadas sobre el genoma de baculovirus silvestre. El plásmido pBlue Bac III porta igualmente el gen amp^R que codifica para la resistencia a la ampicilina y la secuencia colE1 que permite la selección y la replicación del plásmido en *E. coli*.

El plásmido de transferencia recombinante y el DNA del baculovirus silvestre linearizado (Bac-N-Blue, invitrogen) son contransfectados dentro de la célula del insecto (Sf9 ó Sf21) provenientes de tejido de ovario de larvas de lepidoptere *Spodoptera frugiperda*). La recombinación

entre pBlue-N-Blac y el vector de transferencia ocurre entre los sitios rec, la activación de la B-Galactosidasa por la recombinación, facilita en presencia de X-Gal, la visualización de las células infectadas por un baculovirus recombinante (células azules).

Las células infectadas por el baculovirus recombinante no presenta más los cristales de poliedrinam (ooc-), contrariamente a las células infectadas por el baculovirus silvestre (ooc+). Por otra parte, la morfología diferente de las células infectadas con el baculovirus recombinante permite (Diámetro celular aumentado, incremento del tamaño del núcleo, apariencia vesicular de las células) diferenciar y purificar las células recombinantes (Summers et al, 1987).

BIBLIOGRAFÍA.

- Banks L, Matlashewski G.** 1993. Papillomavirus Rep. 4: 1-4.
- Bauknecht T, Jundt F, Herr I, Oehler T, Delius H, Shi Y, Ángel P, zur Hausen H.** 1995. J. Virol. 69: 1-12.
- Becker T M, Wheeler C M, McGough N S, Parmenter C A, Jordán S W, Stidley C A, McPherson R S, Bergeron C, Barrasso R, Beaudenon S, Flamant P, Croissant O, Orth G.** 1992. Am. J. Surg. Pathol. 16:641-649.
- Bernard HU, Chan SY, Delius H.** 1994. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 186: 33-53.
- Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansens AM, Peto J, Shiffman MH, Bouvard V,
- Brisson J, Bairati I, Morin C, Portier M, Bouchard C, Christen A, Bernard P, Roy M, Meisels A.** 1996. J. Infect. Dis. 173: 794-799.
- Chan SY, Delius H, Halpern AL, Bernard HU.** 1995. J. Virol. 69: 3074-3083.
- Chan SY, Ho L, Ong ChK, Chow V, Villa L, Luande J, Mgaya HN, Bernard HU.** 1992. J. Virol. 66: 2057-2066.
- Chen M, Popescu N, Woodworth C, Berneman Z, Corbellino M, Lusso P, Ablashi D V, DiPaolo J A.** 1994. J. Virol. 68: 1173-1178.
- De Villiers E M.** 1994. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 186: 1-12.
- Dillner J.** 1993. Lancet. 34:1594.
- DiPaolo J A, Woodworth C D, Popescu N C, Koval D L, López V, Doniger J.** 1990. Virol. 177: 777-779.
- Dorin M H.** 1994. JAMA 271: 1181-1188.
- Durst M, Dzarlieva-Petrusevska R T, Boukamp P, Fusenig N E, Gissmann L.** 1987. Oncogene 1: 251-256.
- Ellis J R M, Keating P J, Baird J, Hounsell E F, Renouf D V, Rowe M, Hopkins D, Duggan-Keen M F, Bartholomew J S, Young L S, Stern P L.** 1995. Nature Med. 1: 464-470.
- Franco E L, Villa L L, Ruiz A, Costa M C.** 1995. J. Infect. Dis. 172: 756-763.
- Gaarenstroom K N, Melkert P, Walboomers J M M, van den Brule A J C, van Bommel P J F, Meijer C E L M** 1994. Int. J. Gynecol. Cancer 4:73-78.
- Ghosh A, Smith N, Stacey S, Glew S, Connor M, Arrand J.** 1993. Cancer. 53:1-6.
- Halbert C L, Galloway D A.** 1988. J. Virol. 62: 1071-1075.
- Hildesheim A, Gravitt P, Schiffman M H, Kurman RJ, Barnes W, Jones S, Tchabo J-G.** 1993. Sex. Trans. Dis. 20: 279-285.
- Hildesheim A, Schiffman M H, Gravitt P E, Glass A G, Greer C E, Zhang T, Scott B Fh Rush B B, Ho L, Chan S Y, Burk R D, Das B C, Fujinaga K, Icenogle J P, Kahn T, Kiviat N, Lancaster W,** Virol. 67: 6413-6423.
- Huibregtse J M, Sherffner M, Howley P M,** 1994. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 59: 237-245.
- IARC Working Group.** 1995. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risk Chem. Man 64.
- IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.1995a.** Human Papillomaviruses. 64: 35-86.
- Icenogle J P, Laga M, Miller D, Manoka A T, Tucker RA, Reeves W C.** 1992. J. Infect. Dis. 166: 1210 - 1216.
- Ishiji T, Iace MJ, Parkkinen S, Anderson RD, Haugen TH, Cripe TP, Xiao JH, Davidson I, Chambón P, Turek LP.** 1992. EMBO J. 11: 2271-2281.
- Kanda T, Onda T, Zanma S, Yasugi T, Furuno A, Watanabe S, Kawana T, Sugase M, Mann VM, Loo de Lao, Brenes M, Brinton L, Rawls J, Green M.** 1990. Cáncer Res. 50 :7815-9.
- Kaye J N, Starkey W G, Kell B, Biswas Ch, Raju S, Best J M, Cason J.** 1996. J. Gen. Virol. 77: 1139 - 1143.
- Kitasato H, Delius H, zur Hausen H, Rosi F, de Villiers E M.** 1994. J. Gen. Virol. 75: 1157-1162.
- Kjaer S K, Devilliers E M, Caglayan H, Svare E, Haugegard B J, Engholm G, Christensen R B, Moller K A, Poli P, Jensen H, Vestergaard B F, Lynge E, Jensen O M.** 1993. Br. J. Cáncer 67: 830-837.
- Lee J H.1996. Gynecol Oncol 62: 49-54.
- Leechanachai P, Banks L, Moreau F, Matlashewski G.** 1992. Oncogene 7: 19-25.
- Ley C, Bauer H M, Reingold A, Schiffman M H, Chambers J C, Tashiro C J, Manos M M.** 1991. J. Natl.Cancer Inst. 83: 997-1003.
- Matlashewski G, Gu Z M, Storey A, Banks L.** 1994. Virology 203: 73-80.
- Matlashewski G, Schneider J, Banks L, Jones N, Murray A, Crawford L.** 1987. EMBO J. 6: 1741 - 1746.
- McBride A A, Romanczuk H, Howey P M.** 1991. J. Biol. Chem. 266: 18411-18414.
- Munger K, Phelps W C.** 1993. Biochim. Biophys. Acta 1155: 111-123.
- Nelson M A, Wymer J, Clements N.** 1996. Cáncer Lett, 103: 115-121.
- Onda T, Kanda T, Zanma S, Yasugi T, Watanebe S, Kawana T.** 1993. Int. J. Cáncer. 54: 624-628.
- Oshima J, Steinmann KE, Campisi J, Schlegel R.** 1993. Oncogene 8: 2987-2993.
- Pater A, Bayatpour M, Pater M M.** 1990. Am. J. Obstet. Gynecol. 162: 1099-1103.
- Pater M M, Hughes GA, Hyslop D E, Nakshátri H, Pater A.** 1988. Nature (Lond) 335: 832-835.
- Pater M M, Pater A.** 1991. Virology 183: 799-802.
- Peyton C L, Wheeler CM.** 1994. J. Infect. Dis. 170: 1089-1092.
- Phillips D H, Ni SJM.** 1993. IARC Sci. Publ. 124: 327-330.

- Remmink A J, Walboomers J M M, Risse E J K, Meijer C J L M, Kenemans P.** 1995. *Int. J. Cáncer* 61: 306-311.
- Roberts S, Ashmole I, Johnson G D, Krider J W, Gallimore P H.** 1993. *Virology* 197: 176-187.
- Romanczuk H, Howley P M.** 1992. *Proc. Nati. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 3159-3163.
- Schiffman M.** 1994. In "Human Pathogenic Papillomaviruses" (H. zur Hausen, Ed.), pp. 55-81.
- Schiffman M H.** 1995. *J. Nati. Cáncer Inst.* 87: 1345-1347.
- Schiffman M H, Bauer H M, Hoover R N, Glass A G, Cadell D M, Rusch B B, Scott D R, Sherman M E, Kurman R J, Wacholder S.** 1993. *J. Nati. Cáncer Inst.* 85: 958-964.
- Schiffman M H, Kiviat N B, Burk R D, Shah K V, Daniel R W, Lewis R, Kupers J, Manos M, Scott D, Sherman M E, Kurman R J, Stoler M H, Glass A G, Rusch B B, Mielzynska I, Lorincz A T.** 1995. *J.Clin. Microbiol.* 33: 545-550.
- Sibbet G J, Campo M S.** 1990. *J. Gen. Virol.* 71: 2699-2707
- Sun Y, Shah K, Muller M, Munoz N, Bosch X, Viscidi R.** 1994. *J. Clin. Microbiol.* 2216-2220.
- Svendrup F, Khan S A.** 1994. *J. Virol.* 68: 505-509.
- Vousden K H, Doniger J, DiPaolo J A, Lory D R.** 1988. *Oncogene Res.* 3: 167-175.
- Vousden K H. 1994. In «Human Papillomaviruses and Cervical Cáncer» (PL Stern and MA Stanley, Eds.), pp. 92-115. Oxford University Press, New York.
- Werness B A, Levine A J, Howley P M.** 1990. *Science* 248: 76-79.
- Wheeler C M, Parmenter C A, Hunt W C, Becker T M, Greer C E, Hildesheim A, Manos M M.** 1993. *Sex. Transm. Dis.* 20: 286 - 89
- White A, Livanos E M, Tlsty T D.** 1994. *Genes Dev.* 8: 666-677.
- Wu T. 1994. *Curr. Biol.* 4: 746-754. 6.
- Xi L F, Demers G W, Koutsky L A, Kiviat N B, Kuypers J, Watts D H, Holmes K K, Galloway D A.** 1995. *J. Infecí. Dis.* 172: 747-755.
- Yaegashi N, Xi L, Batra M, Galloway D A.** 1993. *J. Infecí. Dis.* 168: 743-747.
- Yamada T, Manos MM, Munoz N, Wheeler C M.** 1997. *J. Virol.* 71: 2463-2472
- Zhou J, Doorbar J, Sun X-Y, Crawford L V, McLean C S, Frazer I H.** 1991. *Virology* 185: 625-32.