

# Virus del papiloma humano.

## Aspectos virológicos e inmunitarios

A. Alba Menéndez

Instituto de Estudios Celulares y Moleculares. Galicia

### INTRODUCCIÓN

Los papilomavirus (PV) son pequeños virus de ADN de la familia *Papovaviridae* que infectan a una gran variedad de vertebrados, incluyendo al hombre. Miden 50 nm de diámetro, carecen de membrana y su cápside tiene forma icosaédrica, compuesta por 72 capsómeros (fig. 1).

A pesar de su amplia distribución, muestran un alto grado de tropismo celular, es decir, únicamente infectan epitelios secos (piel) y mucosas (orales y genitales), induciendo la formación de lesiones benignas (verrugas o papilomas) y, en determinadas condiciones y en asociación con ciertos cofactores<sup>1</sup> pueden producir carcinomas.

Harald Zur Hausen<sup>2</sup>, en 1976, fue el primero en relacionar y estudiar el virus del papiloma humano (VPH) y su participación en la carcinogénesis; posteriormente diversos estudios clínicos, epidemiológicos y moleculares lo señalan como el principal agente etiológico del cáncer cervical. Más adelante se demostró que prácticamente la totalidad de las mujeres con carcinoma cervical están infectadas con algún tipo de VPH.

### TRANSMISIÓN DE LA INFECCIÓN

La vía de transmisión de los VPH epiteliales es de persona a persona por contacto directo con áreas de la piel infectadas. Los VPH genitales se transmiten básicamente por vía sexual, y aunque se han sugerido otro tipo de vías como el instrumental y fomites, no parece que estas sean significativas. Se ha demostrado la transmisión por vía placentaria, aunque con baja frecuencia, en hijos nacidos por parto natural de pacientes portadoras del virus, produciendo papilomas laríngeos.

Correspondencia: A. Alba Menéndez.  
Instituto de Estudios Celulares y Moleculares.  
C/ Dr. Iglesias Otero, s/n.  
27004 Lugo. España.  
Correo electrónico: alfonsoalba@e-icm.net

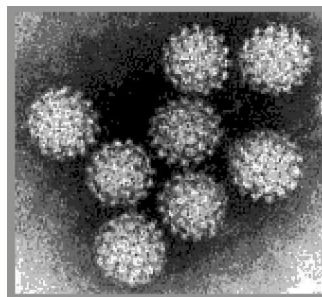
### ESTRUCTURA DEL GENOMA VÍRICO

El ADN de los VPH es circular, de doble cadena, y contiene aproximadamente 8.000 pares de bases (pb). Su genoma se puede dividir en tres zonas<sup>3</sup>: la región larga de control (LCR), la región temprana (E = *early*), y la región tardía (L = *late*) (fig. 2).

### CLASIFICACIÓN DE LOS VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

Históricamente, los PV han sido agrupados junto con los polyomavirus para formar la familia *Papovaviridae*, este término deriva de las dos primeras letras de los primeros virus agrupados (*rabbit papillomavirus*, *mouse polyomavirus* y *simian vacuolating*). Los PV y polyomavirus pueden ser distinguidos fácilmente por diferencias en el tamaño de los viriones (55 nm y 40 nm) y en el genoma (8 kp y 5 kp) respectivamente. Además, el ADN de estas dos subfamilias no hibrida y presenta características antigénicas diferentes, por lo que actualmente son considerados como subfamilias individuales de la *Papovaviridae*. La clasificación de los tipos de PV se basa en la especie de origen y el grado de homología del ADN. Se han encontrado en seres humanos más de 100 tipos, en bovinos 6, en perros 2, en conejos 2 y en caballos, chimpancés y monos *rhesus* sólo un tipo. También se han identificado en aves y en peces.

De acuerdo con la malignidad de las lesiones que producen se clasifican en: virus de bajo riesgo que producen



**Figura 1.** Microscopía electrónica del papilomavirus humano.

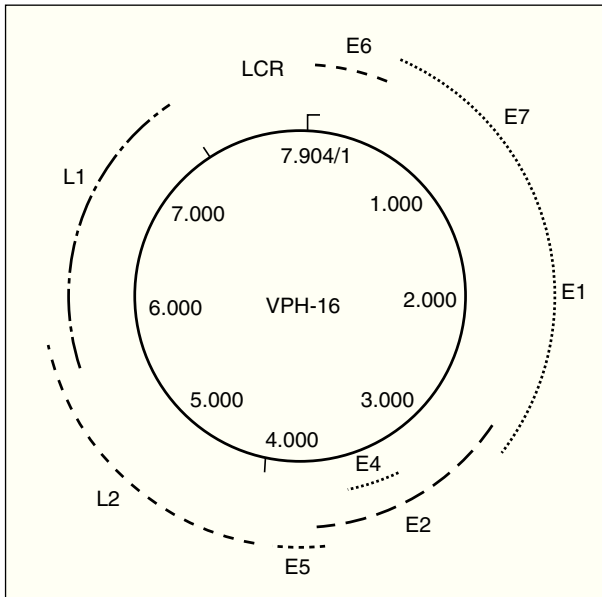


Figura 2. Mapa genético del papilomavirus tipo 16.

lesiones benignas (fundamentalmente los tipos 6 y 11 en lesiones condilomatosas, junto con los tipos 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 y 81) y virus de alto riesgo que producen lesiones precancerosas y cancerosas (VPH tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82)<sup>4</sup>.

### INTERRELACIÓN VIRUS-HUÉSPED

La interrelación entre los diferentes tipos de virus y sus huéspedes es compleja y variada. La vía de entrada en vertebrados se produce, generalmente, a través de la piel, de las mucosas o directamente por vía sanguínea. La necesidad de presencia de un receptor que permita la internalización de las partículas víricas supone la principal barrera de entrada de las mismas, y explica la naturaleza especie-específica e incluso órgano-específica de las infecciones víricas. Muchos virus utilizan los complejos mayores de histocompatibilidad (MHC) de clase I y de clase II, como receptor para su internalización, y otros utilizan diferentes moléculas de la superficie celular como CD4, receptores de quimocinas, factores de crecimiento,  $\beta_2$ -microglobulina, etc.<sup>5</sup>. En el caso del PV, no se ha encontrado un receptor celular específico que permita atajar la infección por bloqueo del mismo; sin embargo, se postula la existencia de un receptor celular para la internalización de partículas víricas, lo que tendría un gran interés como arma terapéutica, por ser un potencial punto de bloqueo de la infección. Al contrario de lo que ocurre con otras especies víricas, no parece que los receptores de superficie estén implicados en la especificidad del tejido y de la especie ni en el tropismo de los VPH<sup>6</sup>.

Una vez que el virus ha logrado internarse en la célula que le ha de servir como huésped, utilizará la maquinaria biológica de esta para desarrollar un ciclo vital que le permita su diseminación; el tiempo de replicación, su

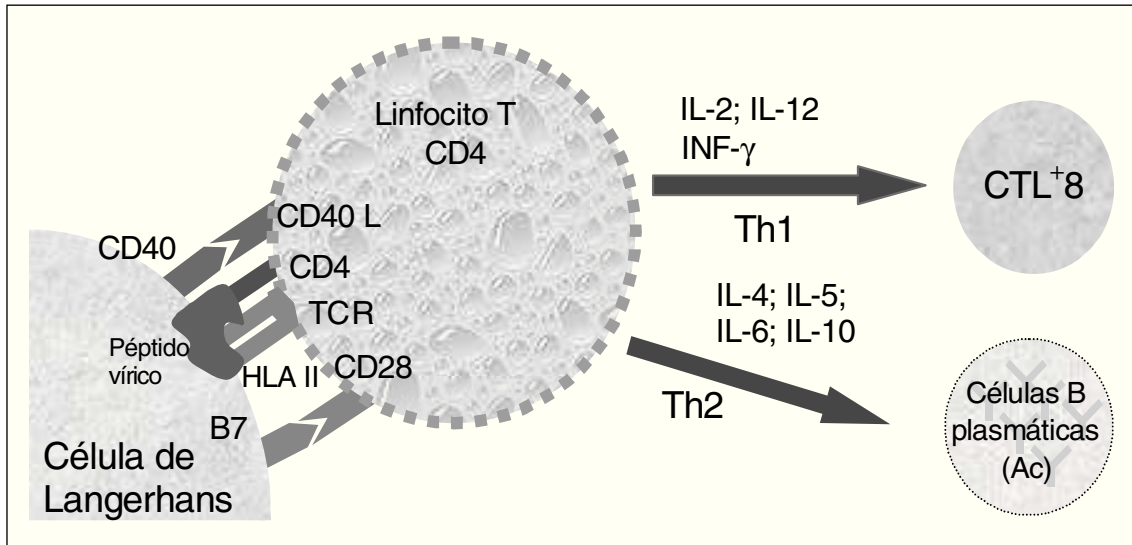
cinética, su capacidad de interactuar con proteínas celulares y la posibilidad de destrucción de su huésped dependerán no solo del tipo o subtipo de virus, sino de las interacciones con su entorno. La anteriormente comentada capacidad de bloqueo de p53 y Rb por los VPH es exclusiva de los tipos de alto riesgo y se requiere una "permisividad" inmunológica y, en muchos casos, complejos procesos de integración vírica y de interrelación con otras proteínas del ciclo celular.

Tanto el reconocimiento de la infección vírica por la célula huésped como el tropismo específico de cada subtipo vírico van a determinar los efectos citopáticos en los tejidos específicos, de este modo, podemos distinguir infecciones latentes que no mostrarán sus efectos durante largos períodos de tiempo, e infecciones con efectos citopáticos prácticamente inmediatos. Tomando como base estos parámetros, podemos calificar el nivel inmunogénico o antigénico de cada virus que será la base del conocimiento para la construcción de vacunas profilácticas o terapéuticas.

### INMUNIDAD CELULAR E INMUNIDAD HUMORAL FRENTE AL VIRUS

La inmunidad celular está representada principalmente por las células T que actúan en el tejido local mediante un íntimo contacto célula a célula. La respuesta humoral, por el contrario, viene mediada por las células B bajo la inducción de las células T *helper*. Los productos biológicamente activos de las células B son los anticuerpos (Ac) que serán los efectores de una respuesta inmune magnificada hasta en cinco órdenes de magnitud (más de 100.000 Ac por célula B). Tanto las células T como los Ac tienen en común su actividad frente a los focos donde un antígeno extraño está presente; las diferencias radican en que, mientras las células T reconocen ese antígeno asociado a moléculas de la superficie celular (antígenos de histocompatibilidad [HLA]), los Ac lo hacen tanto frente a antígenos en superficie como frente a aquellos solubles, en este último caso con mayor especificidad. A nivel molecular, los receptores de las células T (TCR) reconocen secuencias específicas de pequeños péptidos asociados o presentados por el propio MHC, mientras que los Ac no reconocen secuencias peptídicas sino estructuras estéricas, tridimensionales, con una conformación determinada. Si bien la presentación adecuada del antígeno es esencial para la inducción de la respuesta inmunológica, mediada tanto por células T como por células B, la cinética de la unión antígeno-anticuerpo, la cantidad del mismo y su distribución serán los factores que determinen las directrices de la respuesta inmunológica. No existen evidencias que disciernan entre el tipo de respuesta T y la vía de entrada del antígeno vírico (piel, mucosas, sangre, etc.), por el contrario, en la respuesta mediada por linfocitos B genera diferencias inmunogeográficas en función de la localización, IgA en mucosas, IgE en piel o IgG e IgM en circulación periférica<sup>3,7-10</sup>.

En términos generales, tras la primera infección de las células del epitelio cervical por el VPH se desencadenan una serie de respuestas inespecíficas acompañadas de pro-



**Figura 3.** La activación de los linfocitos T CD4 requiere el reconocimiento de las moléculas de superficie que expone la célula presentadora. El péptido vírico junto con el HLA de clase II será reconocido en el contexto de los receptores de las células T (TCR) y CD4, pero hace falta un mecanismo de “seguridad” que controle el proceso de activación, por ello, es necesario que otras moléculas como CD40 y B7, presentes en la superficie de la célula presentadora, sean reconocidas por sus receptores (respectivamente CD 40 ligando y CD28) para que la activación tenga lugar. El linfocito T CD4 activado se convertirá en linfocito T *helper* de tipo 1 o de tipo 2, en función de una serie de factores tisulares locales, fundamentalmente vía de entrada del antígeno, mecanismo de procesamiento y presencia de diferentes interleucinas. La vía Th1 inducirá la maduración de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> hacia células citotóxicas efectoras.

CTL: reacción citotóxica de los linfocitos; HLA: antígenos de histocompatibilidad; IL: interleucina; INF: interferón.

cesos inflamatorios, quimioatracción de neutrófilos, activación de macrófagos, intervención de células *natural killer* (NK), de Ac naturales e incluso del sistema del complemento, que formarán una primera barrera defensiva de inmunidad inespecífica. La prolongación de la respuesta en el tiempo y la protección frente a futuras infecciones requiere, sin duda, mecanismos de inmunidad específica<sup>11</sup>.

A nivel del epitelio cervical existen células específicas que poseen la capacidad de actuar como presentadoras de antígenos y, aunque algunos queratinocitos desarrollan esta capacidad, son las células reticulares de Langerhans las verdaderas especialistas en el proceso de presentación antigénica. Estas células fagocitan las partículas víricas para digerirlas en endosomas y comenzar un proceso de activación que incluye la presentación en superficie de cadenas polipeptídicas del antígeno junto con los HLA de clase II, CD40 y B7 y la migración a los ganglios linfáticos locales. Estas células activadas serán reconocidas por linfocitos T CD4<sup>+</sup>, que serán activados únicamente si existe reconocimiento de todas las moléculas de superficie implicadas, los HLA de clase II a través del propio CD4, el polipéptido vírico mediante el TCR, CD40 a través de CD40-ligando y B7 mediante CD28. Los linfocitos T CD4 activados evolucionarán hacia linfocitos *helper* (Th) en el contexto local de expresión de ciertas interleucinas (IL), de modo que si predomina la de tipo IL-12, se promoverá la diferenciación hacia una vía Th1 que inducirá la activación y proliferación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos específicos (CTL<sup>+</sup>8) y la producción de IL-2 e interferón  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) fundamentalmente; por el contrario, si en el contexto local no se expresa IL-12 se promoverá la vía Th2 que inducirá

la activación y expansión de linfocitos B que evolucionarán diferenciándose en células plasmáticas productoras de Ac frente a las proteínas víricas y la expresión de IL del tipo IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, etc. Una vez activados, los linfocitos T y B deberán reconocer a las células infectadas, esta vez en el contexto del HLA de clase I, de lo contrario no se producirá el proceso de expansión clonal necesario para una respuesta inmunológica eficaz<sup>12-14</sup> (fig. 3).

Los CTL<sup>+</sup>8 tendrán la capacidad de actuar frente a la infección vírica establecida, mientras que las células B plasmáticas producen Ac que actuarán frente a los antígenos víricos de origen externo que sean expuestos durante ésta y las sucesivas infecciones por el VPH.

### MECANISMO DE EVASIÓN TUMORAL, PERSISTENCIA DE LA INFECCIÓN VÍRICA

Muchos virus son capaces de mantener infecciones a largo plazo sin efectos citopáticos, aunque con producción de viriones, bien de forma crónica o bien con reactivaciones intermitentes productivas. El patrón de infección, crónica o latente, y la aparición de brotes con efectos citopáticos va a ser totalmente dependiente de las condiciones celulares del huésped. La persistencia de la infección vírica requiere la evasión de la detección y la eliminación de las células víricas por el sistema inmune. Estos procesos de evasión pueden producirse por diferentes vías. En ciertos casos, los virus presentarán antígenos de superficie muy variables que conducen a la síntesis de un exceso de Ac no neutralizantes que pueden llegar a interferir con los que sí tienen esa capacidad de neutralización. Otro mecanismo de eva-

sión ha sido observado en ciertos tumores en los que la respuesta inmunitaria es evitada mediante la depleción de la expresión de moléculas del MHC. Este mecanismo de evasión se pone en evidencia, fundamentalmente, en aquellos tumores en los que no es posible mimetizar la presencia de antígenos de superficie, por ser necesarios para el mantenimiento del fenotipo tumoral. Los últimos estudios apuntan a la disminución de la expresión de moléculas específicas de reconocimiento inmune, los denominados *toll like receptors* (TLR), como mecanismo más eficaz para mimetizar la presencia del virus<sup>15</sup>.

Muchas infecciones víricas toman como diana a células inmunocompetentes como las CD4+T y las células de Langerhans, comprometiendo así la eliminación de la infección por la alteración de los mediadores en el montaje de la respuesta inmune. En las verrugas genitales se ha observado una disminución notable del número de células de Langerhans, con la consiguiente disminución de la capacidad de presentación antigénica. Se han constatado también importantes disminuciones en la actividad de las células NK, con funciones de inmunidad inespecífica en lesiones pretumorales y tumorales<sup>16</sup>.

## ESTRATEGIAS DE VACUNACIÓN

Existen dos consideraciones fundamentales en la elaboración y diseño de las vacunas antitumorales; por un lado, la selección de los antígenos que serán presentados y, por otro, el procedimiento mediante el cual esos antígenos estimularán la respuesta inmune. Por definición, las vacunas deben ser seguras, efectivas y potentes, de modo que requieran pocas dosis de inmunización, además deben ser estables y fáciles de manipular. Muchas de las vacunas utilizadas actualmente basan su estrategia en la utilización de virus atenuados. La incorporación de nuevas técnicas de biología molecular y los avances en el campo de los cultivos celulares han permitido el desarrollo de nuevos tipos de vacunas en los que se aplica la técnica de selección antigénica y la fabricación de partículas quiméricas, entre otras, para lograr respuestas dirigidas.

En términos generales, debemos distinguir dos líneas diferentes de vacunación en función de las poblaciones susceptibles de tratamiento. En primer lugar, se puede aplicar la estrategia clásica, consistente en tratar a la población de riesgo con vacunas profilácticas, las cuales pueden ser partículas víricas atenuadas, partículas modificadas genéticamente o las *virus-like particles* que se asemejan a cápsides víricas sin ADN. Una estrategia más moderna, dentro de esta primera línea de actuación, es la vacunación con péptidos concretos con función antigénica demostrada.

Como segunda línea de actuación distinguiremos las vacunas terapéuticas que están dirigidas a la población ya infectada, pero cuyo sistema inmune debe ser reforzado.

Los estudios preliminares demuestran la efectividad de ambos tipos de vacunas frente a la infección por el VPH. El conocimiento del genoma vírico completo, su relativa sencillez (no alcanza una decena de genes) y la elevada conservación de su genoma hacen que, *a priori*, la elaboración

de una vacuna frente a esta infección parezca sencilla. Los últimos estudios disponibles utilizan péptidos víricos con el fin de conseguir una respuesta de los linfocitos CD8+ citotóxicos que respondan frente a las células tumorales transformadas por las proteínas de los VPH de alto riesgo, en el contexto del MHC de clase I.

## Vacunas profilácticas

El objetivo principal de las vacunas profilácticas es prevenir la infección por el VPH y el desarrollo de lesiones en individuos infectados por el virus. Las vacunas que protegen de la infección por VPH están dirigidas a producir Ac neutralizantes contra proteínas estructurales L1 y L2 de la cápside vírica del VPH. El uso de proteínas de fusión L1 y L2 que inducen la producción de Ac neutralizantes, ha demostrado prevenir infecciones con el VPH<sup>17,18</sup>. Se han usado partículas sintéticas de algunos tipos de VPH que han dado mejores resultados que las proteínas de fusión. Otra estrategia para producir una respuesta inmune neutralizante contra las proteínas de la cápside vírica ha sido la producción por ingeniería genética de proteínas ensambladas incapaces de infectar por sí mismas a una célula viva (VLP), las que están compuestas solamente de las proteínas externas de membrana L1 o L1/L2; esta técnica es muy útil, ya que la producción de partículas víricas *in vitro* no es sencilla<sup>17,19</sup>.

Se conoce poco acerca de los factores implicados en la progresión hacia la enfermedad clínica, y debido a la gran cantidad de tiempo que se necesita para que esta se desarrolle, la vacunación profiláctica es menos atractiva para el cáncer cervical que para las infecciones por el VPH no oncogénicas, que son las que desarrollan lesiones rápidamente. Hay varias consideraciones respecto a la utilización de este tipo de vacunas, ya que no está claro si la infección es debida a partículas víricas libres o a partículas que permanecen encerradas en las células escamosas, las cuales protegen de la acción de los Ac. También deben realizarse vacunas dirigidas contra los VPH específicos o contra un grupo de virus, ya que hay casos de infecciones mixtas, además de que la mayoría de las infecciones por el VPH son asintomáticas y/o clínicamente no detectables. La identificación de individuos apropiados para la aplicación de las vacunas profilácticas se realiza principalmente por ensayos serológicos, pero es difícil identificar a los individuos no infectados, ya que hay varios factores que influyen en estos resultados; más aún, debido a que estas infecciones se producen en las mucosas, es necesario producir vacunas que induzcan inmunidad de tipo IgA, pero que a la vez sea una inmunidad persistente en virtud de que es necesaria la persistencia de la infección del VPH para que se desarrolle un cáncer invasivo<sup>20</sup>.

## Vacunas terapéuticas

El objetivo principal de este tipo de vacunas es inducir la inmunidad celular específica que permita la regresión de lesiones establecidas o la regresión de tumores malignos. Las vacunas terapéuticas que se han utilizado han sido vacunas basadas en vectores, vacunas tumorales y vacunas basadas en péptidos<sup>21</sup>. En las primeras se utilizan vectores

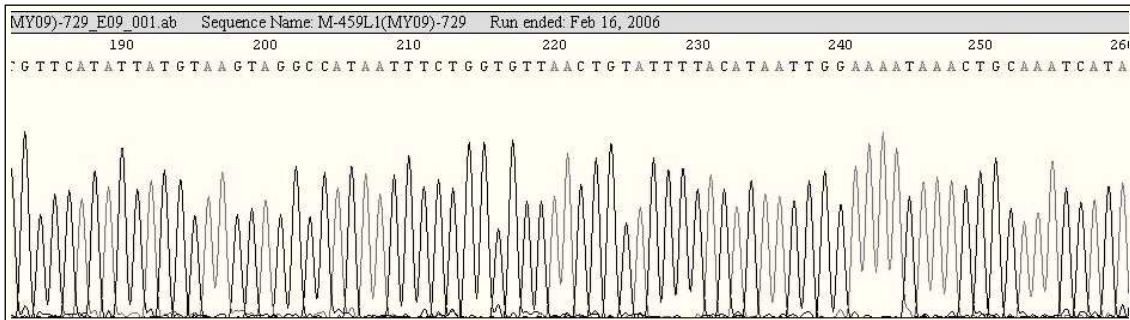


Figura 4. Secuencia de ADN correspondiente al virus del papiloma humano tipo 81.

víricos como el *vaccinia virus*, el cual tiene una gran capacidad de inserción genética y promueve la producción de grandes cantidades de proteínas recombinantes<sup>22</sup>. Las vacunas tumorales consisten en la transfección de células tumorales con genes como el MHC-I, moléculas coestimuladoras, citocinas como el INF- $\gamma$  y factores de crecimiento. En cuanto a las vacunas basadas en péptidos, en sistemas murinos se han evaluado péptidos que contienen epítomos para la reacción citotóxica de los linfocitos (CTL), los que protegen de la producción de tumores dirigidos contra el VPH-16. En seres humanos ya se han identificado péptidos específicos de E6 y E7 restringidos a CTL y presentados por los alelos HLA-A más comunes<sup>23</sup>. La continua búsqueda de acarreadores eficientes y epítomos importantes para MHC-I y MHC-II ayudará al futuro desarrollo de vacunas con péptidos específicos.

## MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

La detección de ADN del VPH mediante técnicas de biología molecular, independientemente del método utilizado, se basa en la especificidad de la complementariedad entre los ácidos nucleicos. Una secuencia de ADN tiene la capacidad de hibridar específicamente con otros ADN o ARN de modo tan específico, que a una determinada temperatura solamente se formarán híbridos si el 100% de las bases son complementarias. El modo de detección de estos híbridos, la composición de las sondas de ADN y la existencia o no de amplificación de la señal marcarán las diferencias entre las diferentes técnicas de detección<sup>24,25</sup>.

### Hibridación en solución: captura de híbridos

Este método utiliza sondas de ARN que tienen la capacidad de hibridar con el ADN vírico en solución y ser detectados mediante métodos luminiscentes. Los modernos métodos comerciales como el denominado Hybrid Capture II®, a diferencia de las versiones anteriores que estaban consideradas como subóptimas, tienen una adecuada relación entre sensibilidad y especificidad si se establecen límites de señal lumínica. La utilización de una mezcla de sondas de alto riesgo, que en la última versión incluye 13 tipos, y otra para el grupo de bajo riesgo, que incluye 5 tipos, permite

la detección del ADN de estos tipos víricos. Tiene como ventaja la posibilidad de semi-cuantificar la carga vírica, aunque esta cuantificación solamente indica un número de copias víricas y no puede ser corregida en función del número de células obtenidas en la toma. El inconveniente principal es que no permite distinguir entre los diferentes tipos víricos ni la presencia de infecciones múltiples, y varios estudios refieren características inespecíficas debidas a una reacción cruzada entre las sondas de alto riesgo y ciertos tipos víricos de bajo riesgo.

### Sistemas basados en la reacción en cadena de la polimerasa

Al igual que la captura de híbridos, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utiliza pequeñas sondas de ADN que localizarán específicamente secuencias de ADN vírico y se denominan cebadores o *primers*. La diferencia fundamental con otras técnicas radica en la amplificación en cadena de la región de interés que luego puede ser visualizada por diferentes técnicas (ELISA, electroforesis, detección láser, etc.) con gran eficacia. En este método se combinan, por una parte, la especificidad de la unión de los dos *primers* y, por otra, la sensibilidad que resulta del proceso de amplificación (detección real de 10 copias de ADN vírico entre un millón de células).

### Secuenciación del ADN

La secuenciación de ADN, es decir, la obtención de la secuencia de nucleótidos que conforman una determinada región del ADN vírico, constituye sin duda el patrón de referencia para cualquiera de las técnicas anteriores. Mediante este método se puede amplificar o clonar cualquier fragmento del ADN vírico y determinar su composición nucleotídica; de este modo, enfrentándola a la base de datos que contiene todas las secuencias conocidas del VPH podemos determinar ante qué tipo subtipo o variante nos encontramos. Su principal inconveniente es el coste y la necesidad de contar con laboratorios de alto nivel que dispongan de esta metodología. La ventaja, aparte de suponer una tipificación directa e inequívoca, es que permite distinguir variantes y polimorfismos víricos que en este momento se están considerando una variable de riesgo de transformación neoplásica de gran importancia, además de detectar la presencia de nuevos tipos víricos (fig. 4).



## BIBLIOGRAFÍA

- Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003;348:518-27.
- Zur Hausen H. Papillomaviruses in human cancers. *Mol Carcinog*. 1988;1:147-50.
- Samorski R, Gissmann L, Osen W. Codon optimized expression of HPV 16 E6 renders target cells susceptible to E6-specific CTL recognition. *Immunol Lett*. 2006;107:41-9.
- Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et al; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003;348:518-27.
- Apple RJ, Becker TM, Wheeler CM, Erlich HA. Comparison of human leukocyte antigen DR-DQ disease associations found with cervical dysplasia and invasive cervical carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1995;87:427-36.
- Müller M, Gissman L, Cristiano RJ, Sun XY, Frazer IH, Jenson AE, et al. Papillomavirus capsid binding and uptake by cells from different tissues and species. *J Virol*. 1995;69:948-54.
- Lamikanra A, Pan ZK, Isaacs SN, Wu TC, Paterson Y. Regression of established human papillomavirus type 16 (HPV-16) immortalized tumors in vivo by vaccinia viruses expressing different forms of HPV-16 E7 correlates with enhanced CD8(+) T-cell responses that home to the tumor site. *J Virol*. 2001;75:9654-64.
- Bontkes HJ, de Gruijl TD, Walboomers JM, van den Muysenberg AJ, Gunther AW, Scheper RJ, et al. Assessment of cytotoxic T-lymphocyte phenotype using the specific markers granzyme B and TIA-1 in cervical neoplastic lesions. *Br J Cancer*. 1997;76:1353-60.
- Saito M, Okubo M, Hirata R, Takeda S, Maeda H. Association of human leukocyte antigen and T cell message with human papillomavirus 16-positive cervical neoplasia in Japanese women. *Int J Gynecol Cancer*. En prensa. 2007.
- Dell K, Koesters R, Gissmann L. Transcutaneous immunization in mice: induction of T-helper and cytotoxic T lymphocyte responses and protection against human papillomavirus-induced tumors. *Int J Cancer*. 2006;118:364-72.
- Manickam A, Sivanandham M, Tourkova IL. Immunological role of dendritic cells in cervical cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2007;601:155-62.
- Passmore JA, Morroni C, Shapiro S, Williamson AL, Hoffman M. Papanicolaou smears and cervical inflammatory cytokine responses. *J Inflamm (Lond)*. 2007;4:8.
- Lenz P, Lowy DR, Schiller JT. Papillomavirus virus-like particles induce cytokines characteristic of innate immune responses in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2005;35:1548-56.
- Jin HS, Park EK, Lee JM, NamKoong SE, Kim DG, Lee YJ, et al. Immunization with adenoviral vectors carrying recombinant IL-12 and E7 enhanced the antitumor immunity to human papillomavirus 16-associated tumor. *Gynecol Oncol*. 2005;97:559-67.
- Hasan UA, Bates E, Takeshita F, Biliato A, Accardi R, Bouvard V, et al. TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. *J Immunol*. 2007;178:3186-97.
- Zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *JNCI*. 2000;92:690-8.
- Hofmann KJ, Neeper MP, Markus HZ, Brown DR, Müller M, Jansen KU. Sequence conservation with the major capsid protein of human papillomavirus (VPH) type 18 and formation of VPH-18 virus-like particles in *Sacharomyces cerevisiae*. *J Gen Virol*. 1996;77:465-8.
- Heino P, Diller J, Schwartz S. Human papillomavirus type 16 capsid proteins produced from recombinant Semliki forest virus assemble into virus like particle. *Virology*. 1995;214:349-59.
- Heino P, Diller J, Schwartz S. Human papillomavirus type 16 capsid proteins produced from recombinant Semliki forest virus assemble into virus like particle. *Virology*. 1995;214:349-59.
- Hagensee ME, Yaegashi N, Galloway DA, et al. Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins. *J Virol*. 1993;67:315-22.
- Ruffin MT, Ogaily MS, Johnston CM, Gregoire L, Lancaster WD, Brenner DE. Surrogate endpoint biomarkers for cervical cancer chemoprevention trials. *J Cell Biochem*. 1995;23:113-24.
- Feltkamp MC, Smit HL, Viesboom MP, Minnaar RP, de Jongh BM, Drijfhout JW, et al. Vaccination with cytotoxic T lymphocytes epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16 transformed cells. *Eur J Immunol*. 1993;23:2242-9.
- Boursnell ME, Rutherford E, Hickling JK, Rollinson EA, Munro AJ, Rolley N, et al. Construction and characterisation of a recombinant vaccinia virus expressing human papillomavirus proteins for immunotherapy of cervical cancer. *Vaccine*. 1996;14:1485-94.
- Baay MF, Weyler J, Vermorken JB. The value of human papillomavirus detection in primary cervical cancer screening. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2004;25:665-9.
- Giovannelli L, Lama A, Capra G, Giordano V, Arico P, Ammatuna P. Related articles, detection of human papillomavirus DNA in cervical samples: analysis of the new PGMV-PCR compared to the hybrid capture II and MY-PCR assays and a two-step nested PCR assay. *J Clin Microbiol*. 2004;42:3861-4.