

## DNA DE HPV Y ANTICUERPOS HACIA LA PROTEÍNA E7 DE HPV16 COMO FACTORES DE PRONÓSTICO EN MUJERES CON CÁNCER DE CÉRVIX SOMETIDAS A RADIOTERAPIA

María Mercedes Bravo\*, Alba Lucía Cóbbita R\*, Mónica Molano L\*, Héctor González Flórez\*, Oscar Orozco D

TRABAJO GANADOR DEL PREMIO NACIONAL DE ONCOLOGÍA EN INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS. CÁNCER 2002. Cartagena, marzo 9 de 2002.

Este trabajo fue financiado por el Instituto Nacional de Cancerología a través del proyecto de inversión USO DE SONDAS FRÍAS EN EL ESTUDIO DE LA RELACIÓN HPV Y CÁNCER DE CUELLO UTERINO.

### RESUMEN

**Introducción:** Los efectos de la infección por HPV en la sensibilidad intrínseca de la célula tumoral a la radioterapia (RT) no son claros. Anticuerpos hacia la oncoproteína viral E7 son detectados de manera consistente en pacientes con cáncer de cérvix; los cambios de los niveles de estos anticuerpos luego de la RT pueden tener valor pronóstico. El propósito de este estudio fue evaluar la presencia de DNA de HPV y los anticuerpos hacia E7 del HPV16 como marcadores potenciales de pronóstico en carcinoma de cérvix.

**Métodos:** Se incluyeron 58 pacientes con diagnóstico de carcinoma cervical, estadios FIGO IIB y IIIB. Se tomaron muestras de sangre y cepillados cervicales antes de la RT y 2 y 6-12 meses después. El DNA de HPV fue detectado por PCR, y los anticuerpos anti E7 fueron medidos por ELISA usando como blancos antigénicos una proteína recombinante de fusión MBP-E7 y dos péptidos sintéticos E7(a.a 1-20) y E7(a.a 66-85). El tiempo medio de seguimiento de las pacientes fue de 35 meses (rango: 2-65 meses). Se hizo un análisis univariado para determinar la significancia estadística de los factores relacionados con el pronóstico.

**Resultados:** Antes de la radioterapia se detectó DNA de HPV en un 81% de los casos. No se observaron asociaciones significativas entre el estado viral antes de RT y estadio FIGO, tamaño tumoral o tipo histológico. La presencia de HPV antes de la RT y la eliminación del virus después de la RT se asociaron con un mejor pronóstico: la supervivencia global a 5 años fue del 65,9 % para las pacientes positivas para HPV antes de RT versus el 36,3% para las pacientes negativas ( $p = 0,038$ ). Se observó una disminución estadísticamente significativa en la detección genérica de DNA de HPV después de la radioterapia. Después de 3 meses 19 pacientes permanecieron positivos ( $p < 0,04$ ), después de 6-12 meses, 8 pacientes aún portaban DNA de HPV ( $p < 0,04$ ). La supervivencia global fue del 36% para pacientes con persistencia viral versus el 75% para las pacientes en las que el virus fue eliminado luego de la RT ( $p = 0,002$ ).

Se detectaron anticuerpos hacia MBP-E7 en el 56,1% de pacientes, hacia E7(1-20) en el 26,3% y hacia E7(66-85) en el 31,6%. No se observaron asociaciones significativas entre presencia de anticuerpos y estadio FIGO, tamaño tumoral, tipo

\* Grupo  
Inmunología INC  
In memoriam

Recibido el 6 de mayo de 2002 y aceptado para publicación el 25 de junio de 2002.

Correspondencia: Laboratorio de Inmunología INC, Calle 1 No 9-85, Bogotá-Colombia, Fax: 57 1 334 13 60.

E-mail: mmbravo@hotmail.com.

histológico o presencia de HPV. Se observó una importante asociación entre supervivencia total y presencia de anticuerpos hacia el péptido E7 (66-85): la supervivencia de las pacientes positivas hacia este péptido fue del 33% versus el 76,9% para las negativas,  $p = 0,0001$ . El incremento de la respuesta de anticuerpos hacia este péptido también mostró una fuerte asociación con un pronóstico pobre. La supervivencia global fue del 78% para pacientes negativas todo el tiempo, del 60% para pacientes que mostraron disminución de los anticuerpos en el seguimiento, y del 33% para pacientes cuyos anticuerpos se mantuvieron estables o ascendieron en el seguimiento,  $p = 0,0003$ .

**Conclusiones:** Los niveles de anticuerpos hacia la proteína E7 de HPV16 y la detección de HPV antes del tratamiento y en el seguimiento podrían tener una utilidad clínica en el manejo diferencial de las pacientes con carcinoma de cuello uterino localmente avanzado, con miras a lograr una mayor sobrevida.

**Palabras clave:** Cáncer de cérvix, HPV, proteína E7, pronóstico, anticuerpos.

## ABSTRACT

**Background:** The effects of HPV infection on intrinsic tumor cell sensitivity to radiation therapy (RT) are not clear. Antibodies to HPV16-E7 protein are consistently detected in cervical cancer patients, the changes in the levels of these antibodies after RT thus may have prognostic implications. The aim of this study was to evaluate the antibodies to HPV16-E7 protein and the HPV status in cervical cancer patients before and after RT and to correlate these with clinicopathological parameters.

**Methods:** Cervical scrapes and sera were taken before, 2 and 6-12 months after RT from 58 patients with cervical carcinoma (FIGO stages IIB and IIIB). HPV-DNA was detected by PCR. E7 specific antibodies were measured by ELISA using as antigen MBP-E7 fusion protein and two synthetic peptides E7 (a.a. 1-20) and E7(a.a. 66-85). The median follow-up was 35 months (range 2-65 months). Univariate analysis was performed to determine statistical significance of tumor related factors.

**Results:** Before RT, HPV-DNA was detected in 81% of patients. No significant associations were observed between viral status before RT and FIGO stage, histologic type, or tumor size. The presence of HPV before RT and the virus clearance after treatment were associated with a better survival: the 5-year overall survival (OS) was 65,9% for HPV positive patients before RT versus 36,3% for HPV negatives ( $p = 0,038$ ). After RT a significant decrease in HPV detection was observed. Three months after RT, 19 patients remained positive ( $p < 10^{-4}$ ), and 8 patients after 6-12 months ( $p < 10^{-4}$ ). The OS rate was 36% for patients with viral persistence versus 75% for patients that became negative after RT ( $p = 0,002$ ). IgG to MBP-E7 was detected in 56.1% of patients, IgG to E7 (a.a. 1-20) in 26,3%, and IgG to E7(a.a. 66-85) in 31,0%. No significant associations were observed between presence of IgG to E7 before RT and FIGO stage, histologic type, tumor size, or HPV status. A strong association was observed between poor survival and presence of antibodies to peptide E7 (a.a. 66-85): the OS for patients positives to this peptide was 33% versus 76,9% for the negatives ( $p = 0,0001$ ). The increase of IgG response to this peptide was also strongly related to a poor survival; the 5-year OS rate was 78% for patients that remained negative all the time, 60% for patients that showed decrease in response during follow-up, and 33% for patients that showed an increase in the response ( $p = 0,0003$ ).

**Conclusions:** Antibodies to peptide E7 (a.a. 66-85) and HPV-DNA status before and after RT could have prognostic significance for patients with locally advanced uterine cervical carcinoma.

**Key Words:** Cervical neoplasm, HPV, protein E7, antibodies, prognostic.

## INTRODUCCIÓN

El carcinoma de cérvix es una de las principales causas de muerte por cáncer en la mujer<sup>(1)</sup>. En nuestro medio presenta la tasa más alta de mortalidad por una neoplasia de la mujer en edad reproductiva.<sup>(2)</sup>

La radioterapia es el tratamiento no quirúrgico más importante del carcinoma de cérvix. La disponibilidad de marcadores adecuados de pronóstico que permitan una evaluación temprana de la respuesta a la radioterapia les permitiría a los clínicos identificar

pacientes con tumores radiorresistentes que deben someterse a tiempo a tratamientos alternativos. El entendimiento de la biología molecular y la radiobiología del cáncer cervical permitirá la identificación de estos marcadores y, paralelamente, de nuevas posibilidades terapéuticas.

Se ha establecido firmemente la asociación etiológica entre la infección por virus del papiloma humano (HPV) y el carcinoma de cérvix.<sup>(3,4)</sup> El genoma de este virus se detecta en más del 90% de las neoplasias cervicales.<sup>(5)</sup> Las oncoproteínas virales son codificadas por los genes E6 y E7, que son siempre retenidos y expresados en las lesiones tumorales. Estas dos oncoproteínas juegan un papel clave en la transformación maligna y actúan mediante la inhibición de las proteínas p53 y pRb, involucradas en el control del ciclo celular y la reparación del DNA.<sup>(6)</sup> E6 y E7 se constituyen entonces en blancos importantes en el desarrollo de ensayos diagnósticos y de estrategias terapéuticas.

Varios grupos científicos han analizado la respuesta serológica hacia la proteína E7 del HPV 16.<sup>(7-12)</sup> En general, una mayor respuesta de anticuerpos se detecta de manera consistente en pacientes con cáncer de cérvix, en comparación con controles sanos o pacientes con lesiones preneoplásicas, lo que parece indicar que, una vez establecida la invasión, se genera una respuesta humoral hacia la proteína E7. No obstante, no hay claridad sobre la relación que pueda tener la presencia de los anticuerpos hacia E7 en relación con las variables clinicopatológicas y el pronóstico de las pacientes con Carcinoma de cérvix. Algunos autores encuentran asociación entre presencia de anticuerpos a E7 y datos clinicopatológicos como el tamaño tumoral y el compromiso ganglionar.<sup>(13,14)</sup> En otros estudios se reporta una asociación entre la magnitud de la respuesta a E7 y el estadio y la masa tumoral.<sup>(15-18)</sup>

En relación con el valor pronóstico de estos anticuerpos, existen algunos informes que muestran una asociación entre su presencia y un pronóstico desfavorable.<sup>(12,13,19)</sup> En otras series no se les encuentra valor pronóstico.<sup>(11)</sup>

La evolución de la respuesta inmune humoral a E7 en pacientes con Carcinoma de cérvix tratadas con radioterapia y su asociación con la respuesta al tratamiento no se han explorado ampliamente. Existen algunos reportes muy limitados en número de casos, en los que se observa una disminución o

desaparición de los anticuerpos hacia E7 luego de la radioterapia, anticuerpos que tienden a incrementarse cuando se presentan recurrencias.<sup>(20-23)</sup> De otra parte, el efecto de las radiaciones ionizantes sobre el estado viral y el impacto de la presencia y la persistencia del virus en el pronóstico del cáncer de cérvix luego de la radioterapia no se conocen.

El propósito de este trabajo fue evaluar la presencia de DNA de HPV y los anticuerpos hacia E7 de HPV 16 como marcadores potenciales de pronóstico en carcinoma de cérvix. Con este fin, se obtuvieron de manera seriada suero y cepillados cervicales de pacientes con cáncer de cérvix, estadios IIb y IIIb antes de la radioterapia, 2 y 6-12 meses después del tratamiento; se analizaron las variaciones de la detección de DNA de HPV y de anticuerpos IgG hacia la proteína E7 de HPV 16. Se correlacionaron los resultados de respuesta inmune y estado viral con la respuesta al tratamiento para definir si su presencia antes del tratamiento o la persistencia en el seguimiento tiene impacto en el pronóstico luego de la radioterapia.

## METODOLOGÍA

### PACIENTES

Se incluyeron 58 pacientes con diagnóstico de carcinoma de cérvix, estadios clínicos FIGO IIB y IIIB que asistieron a tratamiento al Departamento de Radioterapia del Instituto Nacional de Cancerología en Bogotá entre agosto de 1995 y julio de 1996. Todas las pacientes recibieron tratamiento de radioterapia convencional. Se revisaron las historias clínicas y se registraron en una base de datos las características clinicopatológicas que podrían ser relevantes para el pronóstico. Después del tratamiento, las pacientes asistieron a control a la consulta externa de ginecología. Los estudios de seguimiento incluyeron examen general, revisión pélvica, citología vaginal, rayos X de tórax y ecografía abdominopélvica.

El pronóstico de las pacientes fue determinado por el intervalo libre de enfermedad y la supervivencia después del tratamiento. El intervalo libre de enfermedad se definió como el tiempo transcurrido desde el inicio del tratamiento hasta la aparición de recurrencia; la supervivencia se midió desde el inicio del tratamiento hasta la muerte por causa de la enferme-

dad. Se consideró como remisión completa la ausencia de toda lesión tumoral tres meses después de terminado el tratamiento; como enfermedad persistente o residual cuando, luego de finalizado el tratamiento, aún se observaban lesiones tumorales, y como enfermedad recurrente la reaparición de lesiones en pacientes en remisión completa. Todas las pacientes firmaron un consentimiento informado, aprobado por el comité de ética del Instituto Nacional de Cancerología.

#### ESPECÍMENES CLÍNICOS

Se obtuvieron muestras de suero de 57 pacientes y cepillado cervical de 58 pacientes antes de iniciar el tratamiento; dos meses después de finalizado el tratamiento se obtuvieron muestras de suero y cepillado cervical de 54 pacientes, y entre los 6 y 12 meses después del tratamiento se obtuvieron muestras de 42 pacientes. Los sueros fueron almacenados a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Para los cepillados cervicales, las células fueron removidas del aplicador de algodón por agitación en el medio de transporte (5 ml de PBS, 0,005% de Timerosal); luego se centrifugaron a 3.000 gr por 10 minutos. El precipitado celular fue resuspendido en 1 ml de TRIS-HCL 10 mM pH 8,3 y almacenado a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### DETECCIÓN Y TIPIFICACIÓN DE DNA DE HPV EN CEPILLADOS CERVICALES

10  $\mu\text{l}$  de cada suspensión celular de los cepillados cervicales fueron amplificados por PCR, se emplearon los iniciadores genéricos GP5+ y GP6+ siguiendo la metodología descrita por Roda Husmann.<sup>(24)</sup> Las líneas celulares SiHa y HeLa se emplearon como controles positivos. La tipificación se realizó por hibridización en formato de ensayo inmunoenzimático siguiendo la metodología descrita por Jacobs.<sup>(25)</sup>

#### EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA MBP-E7/HPV16

El gen E7 del HPV 16 fue aislado a partir del plásmido pBR322-HPV16 mediante el empleo de las enzimas de restricción Nsi-I y Pst-1. El fragmento resultante de 313 pares de bases fue clonado en el vector pGEM4Z para generar los sitios de restricción (BamHI/Hind III) para un clonaje direccional en el

vector de expresión procariótica pMAL. El plásmido recombinante obtenido pMAL-E7/HPV16, que contiene el promotor LAC y un gen fusionado que codifica la proteína de unión a maltosa y la proteína E7 de HPV16 (MBP-E7/HPV16), fue transfectado en *E. COLI* JM101. La expresión de la proteína recombinante fue inducida por adición de IPTG 0,5mM por 4 horas. La proteína recombinante se purificó mediante cromatografía de afinidad en una columna de resina-amilosa. La proteína fue eluida con maltosa 10 mM.

#### ELISA EMPLEANDO LA PROTEÍNA RECOMBINANTE E7 DE HPV16

Se acoplaron en placas de 96 pozos, 5  $\mu\text{g}$ /pozo, de la proteína MBP-E7/HPV16 diluida en tampón fosfato salino pH 7,2 (PBS); las placas se incubaron toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . Los sitios libres de la placa se bloquearon con albúmina bovina al 5% en PBS durante 2 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . Luego de un lavado con PBS-Tween 20 0,05%, los sueros se colocaron en duplicado (diluidos 1/100 en albúmina bovina al 5% en PBS). Después de 5 lavados con PBS-Tween, se agregaron 100  $\mu\text{l}$  de conjugado anti-IgG humana peroxidasa, se incubó una hora a  $37^{\circ}\text{C}$ , después se lavó 5 veces con PBS-Tween, y la reacción se reveló por adición de 100  $\mu\text{l}$  de ABTS 0.1% en tampón citrato/fosfato 50mM, peróxido de hidrógeno al 0,03%. Se midió la D.O. a 405 nm. Para calcular la absorbancia neta, para cada suero el promedio de D.O. de los pozos con PBS (sin proteína) fue restado del promedio de los pozos con proteína. Cada suero fue considerado como positivo o negativo empleando un punto de corte de 0,309, previamente determinado con base en los valores de D.O. de un grupo de 35 niños.

#### ELISA EMPLEANDO PÉPTIDOS SINTÉTICOS

La identificación de las epítopes B en la proteína E7 de HPV 16 y la metodología para la ELISA con los péptidos para la detección de anticuerpos se describieron previamente.<sup>(9)</sup> Los péptidos sintéticos correspondientes en secuencia a las regiones a.a. 1-20 (MHGDTPTLHEYMLDLQPETT) y a.a. 66-85 (RLCVQSTHVDIRTLEDLLMG) de la proteína se obtuvieron en el Instituto de Inmunología del Hospital San Juan de Dios. Los péptidos se sintetizaron por el método de síntesis múltiple de péptidos en fase sólida descrito por Houghten.<sup>(26)</sup> Se acoplaron 2  $\mu\text{g}$ /pozo de

cada péptido diluido en PBS en placas de 96 pozos y se incubó durante la noche a 4°C. Los sitios libres restantes fueron bloqueados con gelatina al 0,2% en PBS durante 1 hora. La placa se lavó una vez con PBS Tween. Se colocaron los sueros diluidos 1/20 en PBS-gelatina y se incubó una hora. Después de 5 lavados con PBS-Tween se agregaron 100 µl de anti-IgG humana acoplada a peroxidasa diluida en PBS-gelatina. Los siguientes pasos fueron similares a los del ELISA con proteína recombinante. Las absorbancias netas y los puntos de cortes se calcularon del mismo modo. Para el péptido 1-20, el punto de corte fue 0,121 y, para el péptido E7(66-85), 0,145.

#### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El programa SPSS se usó para el análisis estadístico de los resultados. Se empleó la prueba de X<sup>2</sup> para comparar las frecuencias de anticuerpos hacia E7 y de DNA viral en relación con las variables clínico-patológicas, tamaño tumoral, tipo histológico, estadio FIGO y edad. Se empleó la prueba exacta de Fisher cuando fue necesario. Las curvas de supervivencia se calcularon con el método de Kaplan Meyer y las diferencias entre grupos se analizaron por la prueba log-rank. El intervalo libre de enfermedad se definió como el tiempo transcurrido desde el inicio del tratamiento hasta la aparición de recurrencia. La supervivencia total se midió desde el inicio del tratamiento hasta la muerte debida a la enfermedad. Para todos los análisis estadísticos se consideró una diferencia significativa cuando p fue menor que 0,05.

## RESULTADOS

#### CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA ANALIZADA

Las características de las pacientes analizadas se muestran en la tabla 1. La edad media de las pacientes fue de 49 años (rango 28-66). En estadio IIB se clasificaron 25 pacientes, y en estadio IIIB 33; con respecto a la histología, 54 fueron carcinomas escamocelulares y 4 adenocarcinomas, un 29% presentaron un tamaño tumoral menor de 5 cm.

**Tabla 1.**  
**Características de las pacientes analizadas**

Característica	n (%)
Estadio FIGO	
IIB	25 (43,1)
IIIB	33 (56,9)
Histología	
Carcinoma escamocelular	54 (93,1)
Adenocarcinoma	4 (6,9)
Edad	
≤40	13(22,4)
>40	45(77,6)
Tamaño tumoral	
≤ 5 cm	16(29,1)
> 5 cm	39(70,9)

#### PREVALENCIA DE HPV EN LOS CEPILLADOS CERVICALES

Antes de la radioterapia se detectó DNA de HPV en un 81% (47/58) de los casos. Las prevalencias observadas para los tipos específicos fueron: 51,7% (30/58) para HPV16, 5,2% (3/58) para HPV 18, 10,3% (6/58) para HPV31/33, 3,4% (2/58) para HPV 52/58, y 10,30% (6/58) para otros tipos. Como se muestra en la figura 1, se observó una disminución estadísticamente significativa en cuanto a la detección genérica de DNA de HPV después de la radioterapia. Después de 3 meses, 34,5% (19/55) permanecieron positivos ( $p < 10^{-4}$ ); después de 6-12 meses, 17,8% (8/45) portaban DNA de HPV ( $p < 10^{-4}$ ). En tumores positivos para HPV16 se observó la misma tendencia ( $p < 10^{-4}$ ).

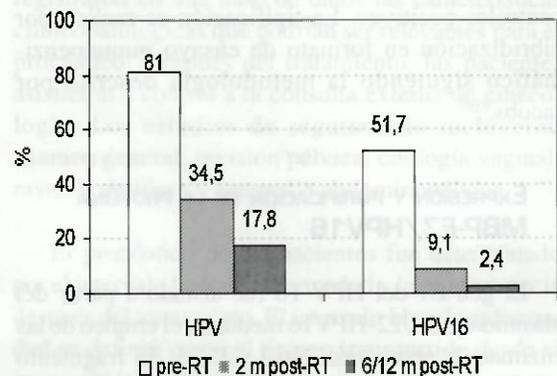


Figura 1. Prevalencia de DNA de HPV en cáncer de cérvix antes y después de la radioterapia.

No se encontraron asociaciones significativas entre el estado viral antes de la radioterapia y la edad, el estadio FIGO, el tipo histológico y el tamaño de la lesión (datos no mostrados). Se observó una mayor prevalencia de DNA de HPV en pacientes que tuvieron una respuesta completa al tratamiento (42/47; 89,4%), en comparación con las pacientes que presentaron respuesta parcial, mínima o no respuesta (5/11; 55,6%); esta diferencia no fue significativa ( $p < 0.056$ ). Lo mismo se observó en pacientes con tumores positivos para HPV 16; se encontró una mayor prevalencia de HPV16 antes de la radioterapia en las pacientes que presentaron respuesta completa (27/30; 90%), en comparación con las pacientes que presentaron respuesta parcial, mínima o no respuesta (3/7 42.9%) esta diferencia no fue significativa ( $p = 0.069$ ).

### PREVALENCIA DE ANTICUERPOS HACIA E7/HPV16

Las prevalencias de anticuerpos hacia E7 antes de la radioterapia y durante el seguimiento para los tres antígenos se muestran en la figura 2. La seropositividad hacia la proteína recombinante permaneció estable durante el seguimiento. Sin embargo, la media de las absorbancias observadas mostró un claro descenso tres meses después de terminada la terapia: 2,64 antes de la RT, 1,68 tres meses después ( $p < 10^{-3}$ ), y permaneció constante 1,63 después de 6-12 meses. Cuando se emplearon los péptidos sintéticos, la proporción de pacientes con una respuesta positiva de anticuerpos tendió a disminuir pero no se alcanzaron diferencias significativas; tampoco se apreciaron cambios significativos en la absorbancia promedio luego de la RT.

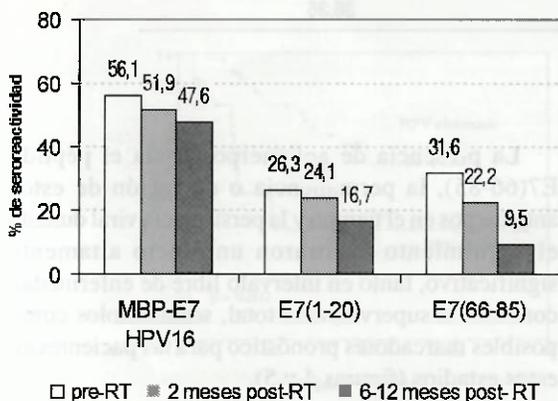


Figura 2. Prevalencia de anticuerpos hacia E7-HPV16 antes del tratamiento y durante el seguimiento

No se observaron asociaciones significativas entre la presencia de anticuerpos hacia E7 antes del tratamiento y la edad, el estadio FIGO, el tamaño de la lesión o el estado viral para ninguno de los antígenos empleados (datos no mostrados). No obstante, como se puede observar en la figura 3, una mayor prevalencia de anticuerpos hacia el péptido E7(66-85) se observó en pacientes que presentaron respuesta parcial, mínima o ninguna respuesta al tratamiento (7/9; 77,8%) en comparación con pacientes que tuvieron una respuesta completa (11/48 22,2%). Esta diferencia fue altamente significativa ( $p < 0,003$ ).

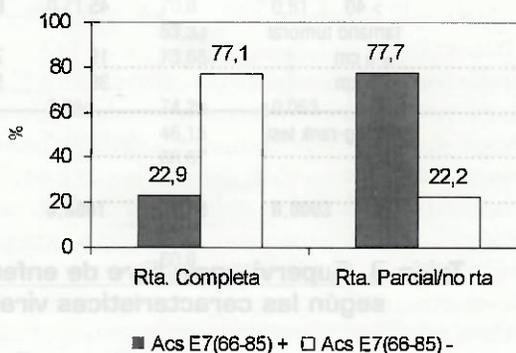


Figura 3. Asociación entre presencia de anticuerpos a E7(66-85) antes de RT y la respuesta al tratamiento.

### PARÁMETROS DE PRONÓSTICO EN GARCINOMA AVANZADO DE CÉRVIX

Luego de un seguimiento promedio de 35 meses (rango 2-65,07), 24 pacientes presentaron enfermedad recurrente y 22 fallecieron. El tiempo promedio de recurrencia fue de 14,9 meses, y el de fallecimiento, de 21,1 meses. En el análisis univariado, las variables clinicopatológicas analizadas: estadio FIGO, histología, edad y tamaño tumoral, mostraron tener un efecto significativo en la supervivencia libre de enfermedad. Lo mismo se observó para la supervivencia total, exceptuando el tipo histológico (tabla 2).

Con respecto a las características virales, la presencia de HPV antes del tratamiento y la eliminación del virus en el seguimiento mostraron una asociación significativa con un pronóstico favorable. No se observó asociación entre el tipo viral presente en el tumor y la supervivencia (tabla 3).

**Tabla 2. Supervivencia libre de enfermedad (RFS) y supervivencia total (OS) según las características clinicopatológicas del tumor. Análisis univariado.**

Característica	n	60 meses RFS (%)	p*	60 meses OS (%)	p*
Estadio FIGO					
IIB	25	72,00	<b>0,028</b>	84,0	<b>0,05</b>
IIIB	33	48,48		59,4	
Histología					
Ca. escamocelular	54	62,9	<b>0,03</b>	71,7	0,07
Adenocarcinoma	4	00,0		50,0	
Edad					
≤ 40	13	38,4	<b>0,05</b>	46,1	<b>0,03</b>
> 40	45	64,4		77,3	
Tamaño tumoral					
≤ 5 cm	19	73,68	<b>0,04</b>	87,5	<b>0,02</b>
> 5 cm	39	51,28		60,5	

P\*, log-rank test

**Tabla 3. Supervivencia libre de enfermedad (RFS) y supervivencia total (OS) según las características virales del tumor. Análisis univariado.**

Característica	n	60 meses RFS (%)	p*	60 meses OS (%)	p*
HPV status					
Positivo	47	63,8	<b>0,03</b>	65,9	<b>0,038</b>
Negativo	11	36,3		45,4	
Tipo de HPV					
HPV18	3	0,0	0,125	0	0,17
HPV no determinado	6	50,0		50,0	
HPV 31,33, 35,52,58	8	75,0		75,0	
HPV16	30	70,0		73,3	
Perfil de detección de HPV					
HPV eliminado	36	75,0	<b>0,002</b>	75,00	<b>0,002</b>
HPV persistente	11	27,2		36,36	

P\*, log-rank test

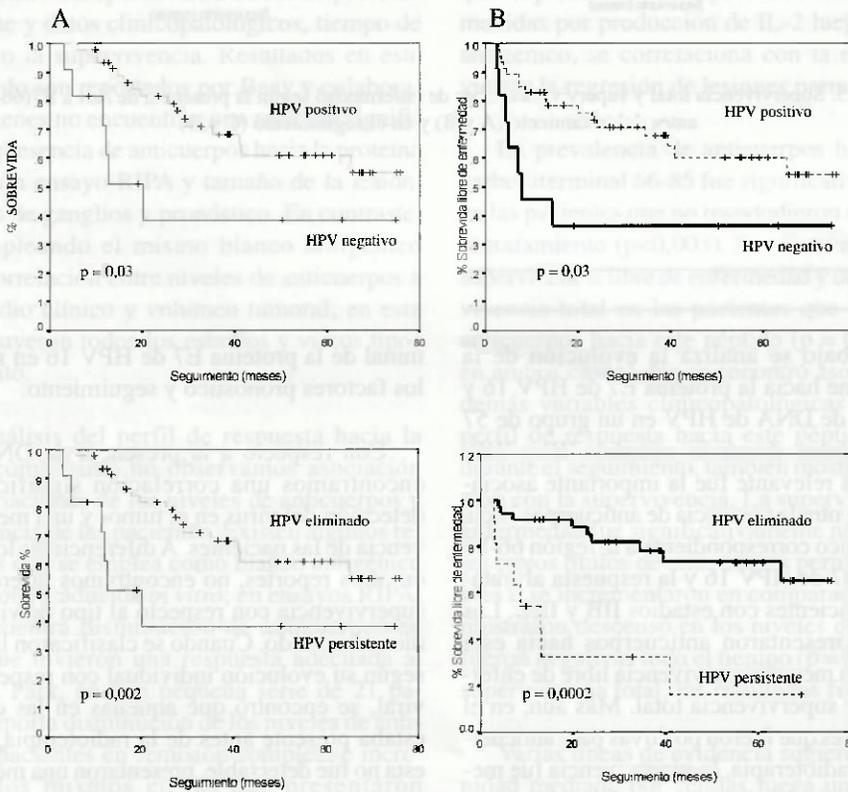
En relación con la respuesta de anticuerpos hacia la proteína E7 se observó una muy fuerte correlación entre un pronóstico pobre y la presencia de anticuerpos al péptido E7(66-85); la permanencia y/o elevación de estos anticuerpos en el tiempo también mostró importante asociación con la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia total. Las respuestas de anticuerpos hacia la proteína MBP-E7 o hacia el péptido E7(1-20) no tuvieron efecto en la supervivencia libre de enfermedad ni en la supervivencia total (tabla 4).

La presencia de anticuerpos hacia el péptido E7(66-85), la permanencia o elevación de estos anticuerpos en el tiempo y la persistencia viral durante el seguimiento mostraron un efecto altamente significativo, tanto en intervalo libre de enfermedad como en la supervivencia total, señalándolos como posibles marcadores pronóstico para las pacientes en estos estadios (figuras 4 y 5).

**Tabla 4. Sobrevida libre de enfermedad (RFS) y sobrevida total (OS) seg6n las presencia de anticuerpos a E7. An6lisis univariado.**

Característica	n	60 meses RFS (%)	p*	60 meses OS (%)	p*
Acs a MBP-HPV16-E7					
Positivos	32	59,58	0,84	62,5	0,78
Negativos	25	60,00		64,0	
Acs a E7 1-20					
Positivos	15	46,67	0,14	46,67	0,068
Negativos	42	64,2		69,05	
Acs a E7 66-85					
Positivos	18	27,78	<b>0,0001</b>	33,3	<b>0,0001</b>
Negativos	39	74,36		76,92	
Perfil de respuesta a MBP-HPV16/E7					
Negativos	20	65,00	0,71	70,0	0,51
En aumento/estables	15	53,3		53,33	
En disminuci3n	19	68,4		73,68	
Perfil de respuesta a E7(1-20)					
Negativos	35	71,4	0,064	74,29	0,063
En aumento/estables	13	38,46		46,15	
En disminuci3n	6	66,7		66,67	
Perfil de respuesta a E7(66-85)					
Negativos	37	78,38	<b>0,0001</b>	78,38	<b>0,0003</b>
En aumento/estables	12	25,0		33,3	
En disminuci3n	5	40,0		60,0	

P\*, log-rank test



**Figura 4. Supervivencia total y supervivencia libre de enfermedad seg6n el estado viral antes del tratamiento (A y B) y en el seguimiento (C y D)**

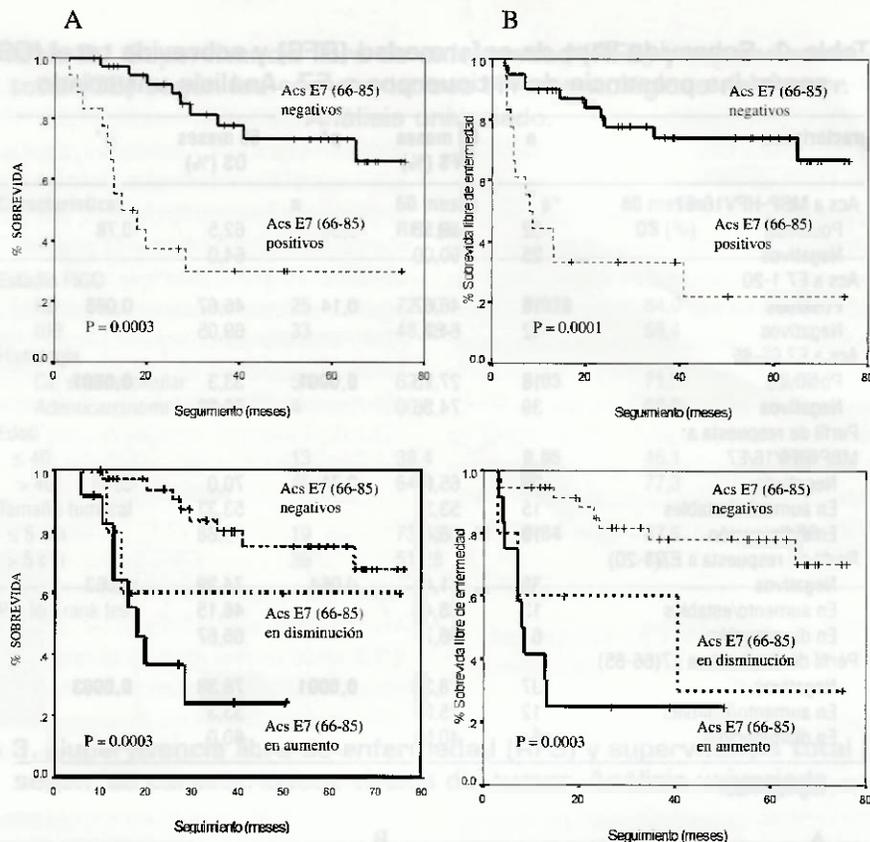


Figura 5. Supervivencia total y supervivencia libre de enfermedad según la presencia de Acs a E7(66-85) antes del tratamiento (A y B) y en el seguimiento (C y D)

## DISCUSIÓN

En este trabajo se analiza la evolución de la respuesta inmune hacia la proteína E7 de HPV 16 y de la presencia de DNA de HPV en un grupo de 57 pacientes con cáncer de cérvix, estadios IIB y IIIB. El hallazgo más relevante fue la importante asociación observada entre la presencia de anticuerpos hacia el péptido sintético correspondiente a la región 66-85 de la proteína E7 de HPV 16 y la respuesta al tratamiento de las pacientes con estadios IIB y IIIB. Las pacientes que presentaron anticuerpos hacia este péptido tuvieron menor supervivencia libre de enfermedad y menor supervivencia total. Más aún, en el grupo de pacientes que fueron positivas para anticuerpos antes de la radioterapia, la supervivencia fue mejor en las que los niveles de anticuerpos disminuyeron durante el seguimiento. Éste es el primer estudio de respuesta de anticuerpos hacia la porción carboxiter-

minal de la proteína E7 de HPV 16 en relación con los factores pronóstico y seguimiento.

Con respecto a la presencia de DNA de HPV, encontramos una correlación significativa entre detección del virus en el tumor y una mejor supervivencia de las pacientes. A diferencia de lo que sucede en otros reportes, no encontramos diferencias en la supervivencia con respecto al tipo de virus oncogénico observado. Cuando se clasificaron las pacientes según su evolución individual con respecto al DNA viral, se encontró que aquellas en las que el virus estaba presente antes de la radioterapia, y luego de esta no fue detectable, presentaron una mejor supervivencia en comparación con aquellas en las que el virus persistió. Este resultado sugiere el posible empleo de la detección del HPV en el seguimiento de estas

pacientes como marcador de enfermedad residual subclínica.

La prevalencia de anticuerpos hacia la proteína E7 se ha reportado en 12-70% de pacientes con cáncer de cérvix.<sup>(8)</sup> Los porcentajes encontrados varían, dependiendo del método de detección (western blot, ELISA, radioinmunoprecipitación, RIPA), el tipo de blanco antigénico empleado (proteína recombinante, péptidos, proteína traducida *in vitro*) y de las secuencias analizadas. En este trabajo se encontró una seropositividad hacia E7 de HPV16 del 56,1% empleando la proteína recombinante MBP-E7-HPV16; ésta es superior a la reportada por otros autores que emplearon proteínas recombinantes.<sup>(12,27,28)</sup> Lo anterior se debe, en gran parte, a que se empleó la técnica de ELISA, que es mucho más sensible que la inmunotransferencia empleada en los estudios anteriores. A pesar de que este fue el antígeno con el que se logró una mayor detección de anticuerpos, resultado predecible dada la presencia de un mayor número de determinantes antigénicos presentes en la proteína recombinante en comparación con los péptidos sintéticos, no encontramos una asociación entre seropositividad hacia la proteína recombinante y datos clinicopatológicos, tiempo de recurrencia o la supervivencia. Resultados en este mismo sentido son reportados por Baay y colaboradores,<sup>(14)</sup> quienes no encuentran una relación significativa entre presencia de anticuerpos hacia la proteína E7 total en un ensayo RIPA y tamaño de la lesión, compromiso de ganglios y pronóstico. En contraste, Park<sup>(13)</sup>, empleando el mismo blanco antigénico encuentra correlación entre niveles de anticuerpos a E7 con estadio clínico y volumen tumoral; en esta serie se incluyeron todos los estadios y varios tipos de tratamiento.

En el análisis del perfil de respuesta hacia la proteína recombinante no observamos asociación entre las variaciones de los niveles de anticuerpos y la supervivencia de las pacientes. Existen algunos reportes en los que se emplea como blanco antigénico la proteína total traducida *in vitro*; en ensayos RIPA, Chee<sup>(15)</sup> encuentra disminución de anticuerpos en pacientes que tuvieron una respuesta adecuada al tratamiento. Park, en una pequeña serie de 21 pacientes,<sup>(18)</sup> reporta disminución de los niveles de anticuerpos en pacientes en remisión completa e incremento de los mismos en las que presentaron progresión.

Varios autores han reportado la presencia de una región inmunodominante en el extremo amino terminal de la proteína E7<sup>(9,21,28,29)</sup>; ésta ha sido la región más comúnmente empleada en los estudios de seroreactividad de pacientes con carcinoma de cérvix y en los estudios de pronóstico y seguimiento. En este trabajo, al emplear como blanco antigénico el péptido aminoterminal E7,<sup>(1-20)</sup> la prevalencia de anticuerpos observada fue del 26,3%, en concordancia con otros estudios en los que se emplea este péptido.<sup>(30,31)</sup> No se observó asociación entre reactividad hacia E7<sup>(1-20)</sup> antes del tratamiento y datos clinicopatológicos o supervivencia. Al igual que nosotros, Viladiu<sup>(19)</sup> no detecta asociación entre seropositividad a E7<sup>(1-20)</sup> y pronóstico.

En este estudio, al igual que en nuestros trabajos previos,<sup>(9)</sup> encontramos una asociación importante entre presencia de anticuerpos hacia la región E7(66-85) y el carcinoma de cérvix. Otros autores han descrito la presencia de anticuerpos hacia esta región en pacientes con carcinoma de cérvix.<sup>(29)</sup> También se han descrito respuestas de proliferación de linfocitos T hacia esta región.<sup>(32-35)</sup> Se ha observado que la presencia de respuestas T hacia esta región, medidas por producción de IL-2 luego del estímulo antigénico, se correlaciona con la eliminación del virus y la regresión de lesiones premalignas.<sup>(35-36)</sup>

La prevalencia de anticuerpos hacia el péptido carboxiterminal 66-85 fue significativamente mayor en las pacientes que no respondieron adecuadamente al tratamiento ( $p < 0,003$ ). Se observaron una mejor supervivencia libre de enfermedad y una mayor supervivencia total en las pacientes que no presentaron anticuerpos hacia este péptido ( $p = 0,0001$  LR test, en ambos casos). No se encontró asociación con las demás variables clinicopatológicas estudiadas. El perfil de respuesta hacia este péptido, presentado durante el seguimiento, también mostró fuerte asociación con la supervivencia. La supervivencia libre de enfermedad fue significativamente menor en pacientes cuyos títulos de anticuerpos permanecieron estables o se incrementaron en comparación con las que mostraron descenso en los niveles de anticuerpos o fueron negativas todo el tiempo ( $p = 0,0001$ ). Para la supervivencia total, los resultados fueron similares.

Varias líneas de evidencia sugieren que la inmunidad mediada por células juega un papel preponderante en el control tanto de infecciones por HPV como de las neoplasias asociadas a HPV.<sup>(37)</sup> La

inmunidad celular es regulada por citoquinas que son secretadas por los linfocitos T ayudadores (LTh). En general, los linfocitos Th pueden clasificarse en Th1 y Th2 con base en los diferentes tipos de citoquinas que secretan. Los linfocitos Th1 son las células efectoras más importantes en inflamación y se asocian con una reacción vigorosa de hipersensibilidad retardada y baja producción de anticuerpos. El fenotipo Th2 se asocia a producción de ciertos isotipos de anticuerpos, particularmente IgG<sub>1</sub> e IgE. Se postula que la protección mediada por linfocitos en las infecciones virales y en el control de los tumores es mediada por linfocitos Th1 y es deteriorada por una respuesta Th2. Una respuesta Th1, con producción de IFN $\gamma$  e IL-2, es probablemente el componente principal de la inmunidad celular contra las infecciones por HPV y las neoplasias asociadas. Evidencia en este sentido la encontramos en el trabajo de Tsuki,<sup>(35)</sup> quien demuestra que la producción de IL-2 en respuesta a péptidos de E7 está disminuida en pacientes con lesiones de alto grado o cáncer cervical, en comparación con controles sanos. Kadish<sup>(34)</sup> y De Grujil<sup>(36)</sup> reportan una asociación entre respuesta celular (medida por linfoproliferación y producción de IL-2, respectivamente) hacia esta región y eliminación del virus o regresión de las lesiones. Clerici<sup>(38)</sup> demuestra que la producción de IL-2 (citoquina tipo 1) por leucocitos de sangre periférica estimulados con un antígeno de influenza o con aloantígenos es menor en pacientes con enfermedad avanzada asociada a HPV, comparada con la de pacientes con enfermedad localizada o controles sanos. En contraste, la producción de IL-4 e IL-10 (citoquinas tipo 2) en respuesta a mitógenos fue elevada en el grupo con enfermedad avanzada. En este trabajo encontramos que la presencia y la persistencia de una respuesta de anticuerpos hacia la porción carboxiterminal de la proteína E7 se asocian de manera altamente significativa con un pronóstico desfavorable; bien pudiera ser éste el estigma de una producción defectiva de citoquinas tipo 1 y una producción aumentada de citoquinas tipo 2.

Existe muy poca información acerca de los efectos de la radioterapia en la expresión del HPV. Santin<sup>(39)</sup> analizó el efecto de dosis altas de radiación gamma (1.250-10.000 cGy) en la cinética de la expresión de las oncoproteínas E6 y E7, así como de moléculas MHC clase I, en dos líneas celulares que portan el HPV16 (CaSki y SiHa). Encontró que altas dosis de radiación pueden inducir una estimulación significativa de E6 y E7, así como de moléculas MHC clase I en estas líneas irradiadas. Al analizar la cinética de

esta estimulación de E6 y E7, se observó una elevación persistente de las oncoproteínas en todo el rango de dosis, pero en el día 6 el aumento fue significativamente mayor con dosis bajas y subletales, resultado que apoya el concepto de que durante el proceso de reparación, luego del daño subletal por la radiación, se establecen clones radiorresistentes en los que permanece el HPV y que pueden expresar altos niveles de oncoproteínas. Estos efectos, por sí mismos, sugieren que la RT puede aumentar la inmunogenicidad tumoral total, que de incrementar una respuesta celular, permitiría un control tumoral. En contraste con este probable efecto benéfico, la irradiación tumoral subletal, al estimular la transcripción de las oncoproteínas, también puede conferir una ventaja de crecimiento a células tumorales resistentes a la radiación. El hecho de encontrar una respuesta elevada de anticuerpos hacia E7(66-85) en las mujeres que tienen más probabilidad de recaída puede indicarnos que la RT llevó a una mayor expresión de E6 y E7, que se estimuló una respuesta inmune que, en estas pacientes, favoreció de alguna manera una respuesta TH2 que no va a generar un efecto adyuvante en la eliminación del tumor. En ese mismo sentido la asociación entre persistencia de HPV en los cepillados cervicales después de radioterapia y una menor supervivencia podría estar indicando la presencia de esos clones radiorresistentes que estarían expresando las oncoproteínas virales.

En conclusión, los resultados del presente estudio sugieren que tanto la medición de los niveles de anticuerpos hacia la proteína E7 de HPV 16 como la detección de DNA de HPV antes del tratamiento y en el seguimiento podrían tener una utilidad clínica en el manejo diferencial de las pacientes con carcinoma de cuello uterino localmente avanzado, con miras a lograr una mejor supervivencia.

Con base en los conocimientos disponibles de la patogénesis del carcinoma cervical avanzado, es factible diseñar tratamientos basados en vacunas terapéuticas que rompan la tolerancia periférica y en modificadores biológicos de la respuesta que permitan que el sistema inmunológico del paciente haga un *switch* de una respuesta Th2 (anticuerpos) a una respuesta Th1 (celular) y, de otro lado, se incremente la expresión de moléculas del MHC clase I en las células tumorales, de manera que sean reconocidas por las células presentadoras de antígeno y eliminadas gracias a la presencia de los efectores adecuados.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Grupo de Radioterapia del Instituto Nacional de Cancerología por su colaboración en la selección de las pacientes a estudiar, y a los doctores Manuel E. Patarroyo y Fanny Guzmán, de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia, por la síntesis de los péptidos empleados.

Este trabajo fue financiado por el Instituto Nacional de Cancerología a través del proyecto de inversión USO DE SONDAS FRÍAS EN EL ESTUDIO DE LA RELACIÓN HPV Y CÁNCER DE CUELLO UTERINO.

## REFERENCIAS

1. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. *Int J Cancer* 1993;54:594-606.
2. Medina R. Atlas de mortalidad por cáncer en Colombia 1990. Instituto Nacional de Cancerología 1994;1: 76-7.
3. Human papillomavirus IARC Mon. Eval Carcinog. *Risk Hum* 1995; 64.
4. Muñoz N, Bosch FX, De San José S, Shah KY. The role of HPV in the etiology of cervical cancer. *Mutat Res* 1994;305:293-301.
5. Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J. Prevalence of HPV in cervical cancer, a world wide perspective. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:796-802.
6. Zur hausen H. Molecular Pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific human papillomavirus types. *Curr Topics in Microbiol and Immunol* 1994;186:131155.
7. Wu T. Immunology of the human papilloma virus in relation to cancer. *Curr Biol* 1994;746754.
8. Sun Y, Shah K, Muller M, Muñoz N, Bosch X, Viscidi R. Comparison of ELISA and radio-immunoprecipitation Assay with in vitro translated proteins for detection of serum antibodies to HPV type 16 E6 and E7 proteins. *J Clin Microbiol* 1994;2216-2220.
9. Bravo MM, Combata AL, Mesa M, Varela A, Orozco O, Martinez G. Respuesta humoral anti proteína E7 del virus del papiloma humano tipo 16 definida mediante el uso péptidos sintéticos y proteína recombinante. *Rev Col Ginec Obstetr* 1995;46:33-40.
10. Gosh A, Smith N, Stacey S, Glew S, Connor M, Arrand J et al. Serological responses to HPV16 in cervical dysplasia and neoplasia: correlation of antibodies to E6 with cervical cancer. *Int J Cancer* 1993;53:1-10.
11. Gaarenstroom K, Kenter G, Bonfrer J, Korse C, Gallee M, Hart A et al. Prognostic significance of serum antibodies to human papillomavirus type 16 E4 and E7 peptides in cervical cancer. *Cancer* 1994;74:2308-2313.
12. Kanda T, Onda T, Zanma S, Vasugi T, Furuno A, Watanabe S et al. Independent association of antibodies against human papillomavirus type 16 E1/E4 and E7 proteins with cervical cancer. *Virology* 1992;190:724732.
13. Baay MFD, Duk JM, Burger MPM, Walboomers J, Schegget J, Gronier et al. Antibodies to human papillomavirus type 16 E7 related to clinico-pathological data in patients with cervical carcinoma. *J Clin Pathol* 1995; 48:410-414.
14. Baay MF, Duk JM, Groenier KH, Burger MP, De Bruijn HW, Hollema X et al. Cervical cancer and papilloma virus. *Cancer Immunol Immunother* 1997;44(4):211-215.
15. Chee Y, Nam Koong S, Kim D, Kim S, Park J. Immunologic diagnosis and monitoring of human papillomavirus type 16 in cervical cancer patients. *Gynecol Oncol* 1995;57:226-231.
16. Viscidi RP, Sun Y, Tsuzaki B, Bosch FX, Muñoz N, Shah KY. Serologic response in Human Papillomavirus associated invasive cervical cancer. *Int J Cancer* 1993;55:780-84.
17. Fisher SG, Benitez L, Stockfleth E, Muller M, Wolf H, Perez F et al. The association of human papillomavirus type 16 E6 and E7 antibodies with stage of cervical cancer. *Gynecol Oncol* 1996;61:73-78.
18. Park JS, Park DS, Kim CJK, Ahn HK, Um SJ, Park SN et al. HPV 16 related proteins as the

- serologic markers in cervical neoplasia. *Gynecol Oncol* 1998;69:47-55.
19. Viladiu P, Bosch FJ, Castellsague X, Muñoz N, Escriba JM, Hamsikova E et al. Human papillomavirus DNA and antibodies to human papillomavirus 16 E2, L2, and E7 peptides as predictors of survival in patients with squamous cell cervical cancer. *J Clin Oncol* 1997;15: 610-619.
  20. Dillner J. Disappearance of antibodies to HPV16 E7 after treatment for cervical cancer. *Lancet* 1993;34:1594.
  21. Muller M, Viscidi RP, Sun Y, Guerrero E, Hill PM, Shah F et al. Antibodies to HPV16 E6 and E7 proteins as markers for HPV16-associated invasive cervical cancer. *Virology* 1992; 187:508-514.
  22. Baay M, Duk J, Burger M, De Bruijn H, Stolz E, Herbrink P. Follow-up of antibody responses to human papillomavirus type 16 E7 in patients treated for cervical carcinoma. *J Med Virol* 1995;45:342-347.
  23. Park JS, Park DS, Kim CJK, Ahn HK, Um SJ, Park SN et al. HPV 16 related proteins as the serologic markers in cervical neoplasia. *Gynecol Oncol* 1998;69:47-55.
  24. De Roda A, Walboomers J, Van Den Brule A, Meuer C, Snijders P. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 1995;76:1057-62.
  25. Jacobs MY, Husman AM, Van Den Brule AJC, Snijders PJF, Meijer CJ, Walboomers JMM. Group-specific differentiation between high and low human papillomavirus genotypes by general primer-mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes. *J Clin Microbiol* 1995;33(4):901-905.
  26. Houghten R. General method for the rapid solid phase synthesis of large numbers of peptides: Specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proc Natl Acad Sci* 1985;82:5131-5135.
  27. Jochmus L, Schneider A, Braun R, Kimming R, Koldovsky U, Schneweis KE et al. Antibodies against the human papillomavirus type 16 early protein in Human sera: correlation of anti E7 reactivity with cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 1989;81:1698-1704.
  28. Suchánková A, Ritterová L, Jrcmar M, Krchnak V, Vagner J, Jochmus I et al. Comparison of ELISA and western-blotting for human papillomavirus type 16 E7 antibody determination. *J Gen Virol* 1991;72:2577-2581.
  29. Sasagawa T, Inoue M, Tanizawa O, Yutsudo M, Hakura A. Identification of antibodies against human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins in sera of patients with cervical carcinoma. *Jpn. J Cancer Res* 1992;83:705 -713.
  30. Krchnak V, Vagner J, Suchankova A, Krcmar M, Ritterova L, Vonka V. Synthetic peptides derived from E7 region of human papillomavirus type 16 used as antigens in ELISA. *J Gen Virol* 1990;71:2719-2724.
  31. Dillner J. Mapping of linear epitopes of human papillomavirus type 16. The E1, E2, E4, E5, E6 and E7 open reading frames. *Int J Cancer* 1990;46:703-711.
  32. De San Jose S, Hamsikova E, Muñoz N, Bosch J, Hofmannova V, Gili M et al. Serological response to HPV 16 in CIN-III and cervical cancer patients. Case control studies in Spain and Colombia. *Int J Cancer* 1996;66:70-74.
  33. Hamsiková E, Novak J, Hofmannová V, Muñoz N, Bosch FX, De San José S et al. Presence of antibodies to seven human-papillomavirus-type-16 derived peptides in cervical-cancer patients and healthy controls. *J Infect Dis* 1994;170:1424-31.
  34. Kadish A, Rommey S, Ledwidge R, Tindle R, Fernando G, Zee S et al. Cell-mediated immune responses to E7 peptides of HPV type 16 are dependent on the HPV type infecting the cervix whereas serological reactivity is not type specific. *J Gen Virol* 1994;75:2277-2284.
  35. Tsukui T, Hildesheim A, Schiffman MH, Lucci j RD, Contois D, Lawler P et al. Interleukin 2

