

PROFILAXIS Y TRATAMIENTO EN LA INFECCIÓN POR VPH Y EL CÁNCER CERVICAL

ZORAYA DE GUGLIELMO CRÓQUER, ARMANDO RODRÍGUEZ BERMÚDEZ, DAYAHINDARA VEITÍA MONSALVE, MAIRA ÁVILA HERNÁNDEZ, ANDREÍNA FERNANDES BELTRÁN, MARÍA CORRENTI DE PLATA.

INSTITUTO DE ONCOLOGÍA Y HEMATOLOGÍA (MPPPS), ESCUELA DE ANTROPOLOGÍA. UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

RESUMEN

Dada la importancia del cáncer cervical y la infección por VPH como problemas de salud pública en el mundo, diversas investigaciones se han enfocado en el desarrollo de vacunas profilácticas y terapéuticas para la prevención y/o tratamiento de esta enfermedad. Dentro de las estrategias terapéuticas, la terapia génica se proyecta como una estrategia clínica poderosa para la eliminación o regresión de las lesiones cancerosas a corto y mediano plazo. La presente es una revisión sobre los progresos de estas investigaciones.

PALABRAS CLAVE: Vacunas, virus papiloma humano, cáncer, cervical, terapia génica.

SUMMARY

Given the importance of the cervical cancer and HPV infection as a public health problem in the entire world, several studies have focused on the development of the prophylactic and the therapeutic vaccines for the prevention and for the treatment of this disease. Among the therapeutic strategies, the gene therapy is projected as a powerful clinical strategy for elimination or regression of cancerous lesions in the short and medium term. This is a review on the progress of these investigations.

KEY WORDS: Vaccines, human papillomavirus, cervical, cancer, gene therapy

Recibido: 02/04/2011 Revisado: 05/06/2011

Aceptado para publicación: 31/10/2011

Correspondencia: Laboratorio de Genética Molecular, Instituto de Oncología y Hematología. Ciudad Universitaria, Calle Minerva. Los Chaguaramos, Caracas- Venezuela. Email: zdegugli@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Desde el establecimiento de la relación etiológica entre VPH y cáncer cervical se ha hecho énfasis en la importancia de prevenir la infección mediante la educación de la población, especialmente adolescente. Por otra parte, tradicionalmente, el cáncer y lesiones asociadas han sido tratados mediante cirugía, radioterapia y quimioterapia, técnicas que presentan efectos adversos ampliamente conocidos^(1,2). Debido a ello se han realizado esfuerzos en busca de opciones curativas y preventivas eficientes menos invasivas y con efectos secundarios mínimos o nulos. Estas opciones se basan principalmente en la biología molecular y la ingeniería genética para el desarrollo de vacunas y el uso de moléculas que estimulen la respuesta inmunológica y citotóxica frente a la infección por VPH y el cáncer cervical.

VACUNAS PROFILÁCTICAS PARA PREVENIR LA INFECCIÓN POR VPH

Actualmente existen vacunas profilácticas para prevenir el contagio de infecciones por VPH, cuyo objetivo es la creación de antígenos capaces de inducir anticuerpos neutralizantes que impidan la entrada del virus a la célula huésped. Inicialmente se pensó en una vacuna con virus atenuado, pero su aplicación y evaluación en

humanos supuso un riesgo muy alto debido a la presencia de ADN viral oncogénico, además de que el crecimiento del virus en cultivos *in vitro* había sido escaso o limitado, hasta hace poco cuando un grupo de investigadores logró establecer un sistema reproducible y altamente eficiente de producción de VPH tipo 18 en queratinocitos humanos, lo que presenta un valor potencial para el establecimiento de modelos de investigación de la expresión viral *ex vivo* ^(3,4). En la década de los 90 se logró la producción *in vitro*, mediante ingeniería genética, de partículas similares al virus o VLPs (“*virus like particle*”), las cuales consisten en proteínas L1 o L1+L2 recombinantes, obtenidas a partir de la introducción de uno o ambos genes respectivamente, en cultivos de células eucariotas (levaduras, insectos o bacterias). Estas proteínas recombinantes tienen la capacidad de auto-ensamblarse para formar estructuras tridimensionales que son morfológica y antigénicamente iguales a los viriones VPH originales, pero carecen de genoma viral por lo que no pueden replicarse ni causar infección o cáncer ⁽⁵⁾.

Se han realizado estudios en modelos experimentales animales y también en humanos, donde se observó una buena tolerancia a la vacunación sistémica con VLPs-L1 y la inducción de altos títulos de anticuerpos séricos, al menos 40 veces más altos que los títulos producidos en una infección natural ⁽⁶⁾. El primer gran estudio multicéntrico, doble ciego, con resultados en fase III se publicó en el año 2002, sobre una vacuna monovalente desarrollada por Laboratorios Merck® contra el VPH tipo 16 ⁽⁷⁾. Este mismo laboratorio creó otra vacuna tetravalente llamada Gardasil® sintetizada en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, basada en VLPs-L1 para tipos oncogénicos encontrados con mayor frecuencia en displasias cervicales (VPH tipos 16 y 18) y tipos no oncogénicos responsables de aproximadamente el 90 % de verrugas genitales y papilomatosis respiratoria recurrente (tipos 6 y 11), por lo cual se considera que actúa sobre

dos enfermedades hiperproliferativas distintas ⁽⁸⁾. Fue aprobada por la FDA en el año 2006 y se administra en 3 dosis distribuidas en 6 meses (0, 2 y 6 meses). Estudios de seguimiento durante 3 años y medio después de la vacunación demostraron una eficacia del 94 % en infecciones persistentes con VPH tipo 16, así como del 100 % en la prevención de lesiones intraepiteliales de alto grado asociadas a los tipos 16 y 18 y de lesiones genitales relacionadas a los tipos 6 y 11 ^(9, 10).

Laboratorios GlaxoSmithKline® desarrolló una vacuna bivalente llamada Cervarix® para VPH tipos 16 y 18, producida en células de insectos con baculovirus como sistema de expresión, que también se administra en tres dosis (0, 1 y 6 meses). Estudios realizados registran una eficacia de los 100 % para la prevención de las infecciones por los tipos de VPH involucrados, con una inmunogenicidad casi absoluta durante 4 años y medio después de la vacunación y la detección de títulos de anticuerpos de 16 a 26 veces más altos que los detectados después de una infección natural ^(5, 11, 12). Ambas vacunas (Gardasil® y Cervarix®) utilizan adyuvantes basados en aluminio, lo cual reduce la dosis requerida para inducir el pico en el título de anticuerpos y ayuda a estabilizar la vacuna durante su almacenamiento ⁽⁸⁾.

Considerando el inicio de las relaciones sexuales en la adolescencia, la FDA aprobó la vacuna Gardasil® para niñas y mujeres entre 9 y 26 años, mientras el Comité Asesor sobre Prácticas de Inmunización del Centro de Control y Prevención de Enfermedades de EE.UU. (ACIP) recomendó la administración de la vacuna en mujeres entre 11 y 26 años ⁽¹³⁾. Ha habido controversia en cuanto a la vacunación de mujeres solamente o a la inclusión de hombres. Al respecto, se ha señalado que la vacunación de niñas de 12 años pudiera reducir los casos de cáncer cervical asociados a los tipos 16 y 18 de VPH en aproximadamente 95 % y que la vacunación de niños y niñas incrementaría este

porcentaje tres puntos más ⁽¹⁴⁾. También hay que tomar en cuenta el papel potencial como vector que el hombre puede ejercer en la infección de VPH por lo que su inclusión en los programas de vacunación contribuiría al control óptimo de su transmisión ⁽¹⁵⁾.

La vacunación a edad temprana ha generado preocupación en padres, investigadores y especialistas de la salud debido a la necesidad de hablar con los niños sobre sexualidad y enfermedades de transmisión sexual, a las cargas de vacunación que ya reciben los niños, a la posibilidad de que la inmunización conlleve a la adopción de conductas sexuales riesgosas y a dudas sobre la seguridad de las vacunas ⁽¹²⁾. Algunos investigadores han señalado como riesgo de la vacunación la posible selección de tipos no incluidos en las vacunas o el incremento en la prevalencia de tipos de VPH oncogénicos poco frecuentes, lo cual solamente se sabrá con el tiempo después que la vacunación en masa sea efectiva. Otras debilidades de la vacuna profiláctica contra el VPH es que únicamente protege contra tipos específicos, dejando por fuera una amplia gama de tipos virales que, aunque poco frecuentes, también están presentes, y que se han reportado resultados contradictorios respecto a la existencia de protección cruzada. Además, la vacuna es preventiva (no cura infecciones o lesiones existentes) y hay un bajo porcentaje de cáncer de útero y de lesiones precursoras en las que no se ha establecido asociación con el VPH, existiendo otros factores asociados al desarrollo de este cáncer, como la exposición a mutágenos, la susceptibilidad genética, el estado hormonal y el estado inmunológico ^(15,16); tampoco se conoce la duración de la protección que provee la vacuna, por lo que pudiera ser necesaria la administración de una dosis de recuerdo ^(7,17).

Es importante tomar en cuenta el alto costo de las vacunas mencionadas, sin embargo, esto no es comparable a las pérdidas humanas o al gasto público generado por los tratamientos para las lesiones asociadas a la infección por

VPH. En este sentido, la ACIP ha recomendado que se introduzca la vacuna contra VPH en los programas nacionales de vacunación de los distintos gobiernos del mundo. Es importante tener en cuenta que aún con la globalización de la vacunación preventiva, los esquemas de despistaje deben proseguir debido al carácter multifactorial del cáncer cervical, a que únicamente 2 de los 15 tipos oncogénicos de VPH están incluidos en la vacuna y a que inicialmente los programas de vacunación abarcarán mujeres en un rango limitado de edades, previéndose que al menos durante 2-3 décadas las mujeres no vacunadas sexualmente activas permanecerán en riesgo para la enfermedad ^(18,19).

VACUNAS TERAPÉUTICAS Y TERAPIA GÉNICA PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER CERVICAL

Otra línea en el estudio del cáncer cervical ha proseguido en la implementación de vacunas terapéuticas y/o terapia génica para su curación. Las vacunas terapéuticas están constituidas por péptidos homólogos a las proteínas virales, indicadas en el tratamiento de displasias y cáncer invasivo de cuello uterino o como terapia adyuvante en recidivas o metástasis ⁽¹⁷⁾. También se han desarrollado vacunas de ADN, las cuales se consideran estables, seguras, pueden ser preparadas en grandes cantidades y administrarse repetidamente sin efectos adversos considerables; además, el ADN tiende a conservarse en las células receptoras, garantizando la expresión a largo plazo del antígeno codificado y reforzando el mantenimiento de la memoria inmunológica. Sin embargo, generalmente la respuesta inmune generada a partir de ADN solo es débil, por lo que se ha probado el efecto adyuvante de varias moléculas, así como la combinación de genes específicos ⁽²⁰⁾. Así, se han desarrollado vacunas basadas en ADN desnudo, en vectores virales o bacterianos, en células tumorales y en células dendríticas modificadas. En el año 1999, un grupo de investigadores desarrolló y probó la vacuna TA-GW basada en la fusión de

proteínas L2 y E7 de VPH tipo 6 con el adyuvante *alhydrogel* para el tratamiento de condilomas, reportando inmunogenicidad y la curación de aproximadamente 62 % de las lesiones 8 semanas después de la vacunación, sin efectos adversos considerables ⁽²¹⁾.

En el 2002, Kaufmann y col. ⁽²²⁾ realizaron uno de los primeros estudios multicéntricos y multinacionales con una vacuna recombinante, TA-HPV consistente en el virus atenuado de vaccinia genéticamente modificado para expresar las proteínas E6 y E7 de VPH tipos 16 y 18. El protocolo incluyó dos vacunas en pacientes con cáncer cervical en estadio temprano y se observó la inducción de respuesta humoral y mediada por células, con bajos efectos secundarios y/o tóxicos.

En el 2004, Gutiérrez y col. ⁽²³⁾ evaluaron el efecto de la vacuna recombinante MVAE2, consistente en el virus atenuado de la vaccinia y el gen E2 del VPH, en lesiones intra-epiteliales escamosas de alto y bajo grado. El tratamiento consistió en la administración de seis dosis, una por semana, inyectadas directamente en el cuello del útero. En los resultados del tratamiento se monitoreó la reducción de las lesiones por colposcopia y análisis histológico y se determinó la respuesta inmunológica mediante la medición de anticuerpos contra MVAE2 y el análisis de la actividad de linfocitos citotóxicos contra las células cancerosas con papilomavirus oncogénicos. La presencia del virus fue determinada con el método captura de híbridos (Digene[®]).

Después del tratamiento se logró la eliminación de lesiones pre-cancerosas e incluso cancerosas (cáncer *in situ*), con un grado de efectividad de 95 % en las primeras y 40 % en las segundas. Todas las pacientes desarrollaron anticuerpos contra la vacuna y una respuesta citotóxica específica contra células transformadas por el VPH. Estos resultados fueron comparados con los obtenidos en un grupo similar de pacientes tratadas con criocirugía, técnica con la que se logró eliminar las lesiones de bajo grado en todas las pacientes; sin embargo, no se observó desarrollo de actividad citotóxica contra

las células cancerosas. En cuanto a la detección del virus, no hubo evidencia en el 50 % de la muestra después del tratamiento y en el 50 % restante solo se detectó el 10 % de la carga viral original. Las evaluaciones de la vacuna MVAE2 en mujeres con cáncer de cuello uterino se encuentran en la fase III, consistente en un estudio multicéntrico aplicado en 250 pacientes con cáncer *in situ*; se ha probado en el Hospital Juárez de la Secretaría de Salud de México y se espera su lanzamiento al mercado una vez culminen los análisis de la mencionada fase de evaluación ⁽²³⁾.

Esta vacuna también se probó en hombres para el tratamiento de condilomas uretrales observándose la estimulación de la respuesta inmune contra el VPH y la regresión de las lesiones en el 93 % de los casos, 4 semanas después de la terapia. Estas evaluaciones se encuentran en fase II. Hasta los momentos, los resultados obtenidos son promisorios y muestran que la vacunación terapéutica local con MVAE2 es una herramienta eficaz para la estimulación de la respuesta inmune frente a la infección por VPH y la presencia de células transformadas por el virus, así como la regresión de lesiones cancerosas de alto y bajo grado ⁽²⁴⁾.

Distintos investigadores han resaltado la utilidad potencial del uso de pistolas genéticas en la administración de vacunas basadas en ADN como parte de la estrategia de sistemas antigénicos para el control del cáncer y de enfermedades infecciosas, proyectándose como una herramienta importante en la inmunoterapia antígeno específica ⁽²⁵⁾. En el caso particular del cáncer uterino, Kim y col. (2008) en un modelo murino, utilizaron una pistola de Helio para dispensar micro partículas de oro cubiertas con ADN E6 de VPH tipo 16 unido a un regulador de expresión de moléculas clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (calreticulina humana). Observaron un incremento en la respuesta inmunológica celular y humoral, así como en el efecto antitumoral, a partir del aumento del procesamiento y la presentación de antígenos a células T, con la regresión de tumores, la potenciación de la memoria antígeno específica

y la supervivencia prolongada de los ratones vacunados. Los autores resaltan los posibles beneficios clínicos de esta estrategia terapéutica en humanos, que pudiera incluir la coadministración de moléculas con otras propiedades, por ejemplo, ADN codificador de proteínas anti-apoptóticas o antiangiogénicas^(20,26).

Esta vacuna fue combinada con las proteínas E7 y L2 de VPH, observándose igualmente efectos terapéuticos significativos contra células tumorales expresando E6/E7, además de generar una potente respuesta específica contra antígenos L2, protegiendo así frente a infección con pseudoviriones; tales resultados resaltan los beneficios clínicos potenciales de esta vacuna⁽²⁶⁾.

Ahn y col. (2004)⁽²⁷⁾ realizaron en ratones la inyección intra-tumoral directa de una vacuna adenoviral portadora de la secuencia E7 de VPH tipo 16 y de la interleucina 12 (IL-12) como adyuvante, la cual induce la respuesta inmune celular para protección contra la formación de tumores. Observaron la regresión parcial o total de los tumores, así como inmunidad a largo plazo contra la recurrencia de la malignidad; este efecto fue mucho mayor con la vacuna completa que con la inyección de alguno de los componentes por separado. La IL-12 es una de las citocinas más usadas en la terapia génica contra el cáncer cervical, debido a su efecto en la inhibición del crecimiento tumoral, así como de metástasis experimentales, dependiente de la activación de células NK. Sin embargo, Sin y col. (2009)⁽²⁸⁾ reportaron que una vacuna basada en ADNc de E7 de VPH tipo 16 y de IL-12 perdía su efecto antitumoral e inmunoprotector cuando se le combinaba con óxido nítrico (usado y conocido por su efecto adyuvante en protocolos rutinarios de vacunación), lo que pone en evidencia un efecto inmunosupresor de dicho compuesto en el sistema empleado.

Otra línea de investigación para el tratamiento del cáncer cervical mediante terapia génica, está probando con éxito moléculas anti sentido como la ribozima R434 (cuya actividad catalítica ha destruido específicamente el ARNm de E6 y

E7 del VPH tipo 16 e impide el crecimiento de las células inmortalizadas en presencia del virus), oligonucleótidos anti sentido (AS-ODN) que hibridan con los mensajeros virales bloqueando su traducción y los ARN interferentes (ARNi)⁽²⁹⁻³¹⁾.

Tanto la tecnología anti sentido como la ARNi son de silenciamiento genético; la segunda, basada en ARN de doble cadena, ha mostrado ser más potente que la primera, basada en ARN de cadena sencilla, y se ha convertido en una forma eficiente de bloqueo de genes intracelulares en la terapia anti cáncer⁽³²⁾. Se ha señalado que el uso de esta tecnología en el tratamiento del cáncer cervical es posible debido a que a la vez que E6 y E7 secuestran las actividades de las proteínas p53 y pRb en las malignidades inducidas por VPH, generalmente se conservan copias de los genes *p53* y *pRb* silvestres, lo cual le confiere un carácter reversible a tal malignidad considerando que la reducción de la expresión de E6 y E7 en células transformadas por VPH pudiera restablecer la actividad de los supresores tumorales endógenos y así prevenir la proliferación de dichas células⁽³³⁾.

También se ha demostrado que la tecnología ARNi contra los genes E6 y E7 induce la senescencia, la apoptosis o la inhibición del crecimiento de células cancerígenas en modelos celulares⁽³³⁻³⁶⁾, incrementa el efecto quimioterapéutico del cisplatino, el cual puede, entonces, ser usado en menor concentración con la consecuente disminución de sus efectos negativos⁽³⁷⁾ y destruye o suprime el crecimiento de tumores en ratones inyectados directamente con moléculas cortas de ARNi (ARNsi) contra E6/E7^(36,38) particularmente, la inducción de apoptosis o senescencia en células tumorales ha sido efectiva a partir de la introducción del regulador transcripcional E2 y la reducción o inhibición de la expresión de E6 y E7⁽³⁴⁾. Al nivel molecular, se observó que el silenciamiento de E6 indujo la acumulación de proteína p53 celular y la transactivación del gen de control del ciclo celular *p21*⁽³⁹⁾. Por otra parte, se ha evidenciado la especificidad de la técnica al encontrar que el ARNi E6 del VPH tipo 16 no fue eficiente en el

silenciamiento del gen *E6* de células infectadas con otros tipos virales⁽³⁶⁾. Estos hallazgos destacan la utilidad de esta técnica como herramienta para la investigación de los mecanismos involucrados en el establecimiento y desarrollo de la malignidad, así como para la creación de terapias para su curación.

Otras moléculas en experimentación para la terapia génica contra el cáncer de cérvix son las citocinas, las cuales poseen efecto inmunorregulador que promueve la maduración, activación y migración de las células efectoras de la respuesta inmune al sitio de la neoplasia. De especial interés son los interferones, la interleucina 2 o IL-2 (que activa los linfocitos T, las células NK, los macrófagos y la liberación de otras citocinas) y la ya mencionada en este trabajo IL-12 (cuyo efecto antitumoral individual o en combinación con *E6* y *E7* depende de la activación de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos y de las células NK en el sitio de inmunización). La administración intra-tumoral de estas moléculas ha reducido significativamente el avance de tumores asociados al VPH e inhibió la formación de tumores recurrentes después de ser eliminados por cirugía^(40,41). Podemos como conclusión que si bien se ha estimado el impacto que pudiera

tener la vacunación preventiva en la transmisión de la infección por VPH y el desarrollo de cáncer uterino y lesiones precursoras, es importante tomar en cuenta la existencia de otros factores que pudieran determinar o influir en el desarrollo de esta patología, así como los casos existentes previos a la vacunación profiláctica, por lo que el efecto de vacunas preventivas en la prevalencia del cáncer cervical pudiera implicar varias décadas. Frente a estas limitaciones de las vacunas preventivas, existen vacunas terapéuticas basadas principalmente en recursos moleculares y terapia génica que están siendo evaluadas actualmente y que pudieran convertirse en una herramienta efectiva para el tratamiento del cáncer de cérvix y lesiones de bajo y alto grado, contribuyendo conjuntamente con las vacunas preventivas a un mayor control de esta patología. En tal sentido, los estudios realizados hasta la fecha en relación al efecto de la terapia génica sobre el cáncer de cérvix, la proyectan como una herramienta útil y específica en la activación de la respuesta inmune a corto y largo plazo, la reducción de metástasis, la regresión e incluso, eliminación de tumores, cuando se le aplica sola o en combinación con terapias de rutina (quimioterapia y radioterapia) y cirugía.

REFERENCIAS

1. American Cancer Society. Chemotherapy: What it is how it helps? Disponible en: URL: http://www.cancer.org/docroot/ETO/content/ETO_1_2X_Chemotherapy_What_It_Is_How_It_Helps.asp.
2. Instituto Nacional del Cáncer. Efectos de la quimioterapia. Disponible en: URL: <http://www.cancer.gov/espanol>.
3. Castellsagué X, Albero G, Martí D, Plà Farnós M, Ortega P, Belloví C. Prevención primaria: vacunas frente a VPH para la prevención del cáncer de cuello uterino. En: De Sanjosé S, García A, editoras. Virus de papiloma humano y cáncer: epidemiología y prevención. 4ª Monografía de la Sociedad Española de Epidemiología. Madrid: EMISA; 2006.p.107-130.
4. Wang HK, Duffy A, Broker T, Chow L. Robust production and passaging of infectious HPV in squamous epithelium of primary human keratinocytes. Genes Dev. 2009;23: 181-194.
5. Muñoz N, Reina J, Sánchez G. La vacuna contra el virus del papiloma humano (VPH): una gran arma para la prevención primaria del cáncer de cuello uterino. Colomb Med. 2008;39(2):196-204.
6. Lowy D, Frazer I. Prophylactic human papillomavirus vaccines. J Nat Cancer Inst. 2003; 31:111-116.
7. Brull P, Carrera R. Vacunas VPH para la prevención del cáncer de cérvix. Ginecol Obstet Clin. 2005;6(3):129-

- 133.
8. Schiller J, Lowy D. Prospects for cervical cancer prevention by human papillomavirus vaccination. *Cancer Res*. 2006;66(21):10229-10233.
 9. Mao C, Koutsky L, Ault K, Wheeler C, Brown D, Wiley D. Efficacy of Human Papillomavirus-16 Vaccine to prevent cervical intraepithelial neoplasia. A randomized controlled trial. *Obstet Gynecol*. 2006;107(1):18-27.
 10. Villa L, Costa R, Petta C, Andrade R, Ault K, Giuliano A, et al. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: A randomized double-blind placebo controlled multicentre phase II efficacy trial. *Lancet Oncol*. 2005;6:271-278.
 11. Harper D, Franco E, Wheeler C, Ferris D, Jenkins D, Schuind A, et al. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: A randomized controlled trial. *Lancet*. 2004;364:1757-1765.
 12. Kahn J. Vaccination as a prevention strategy for human papillomavirus-related diseases. *Journal Adolesc Health*. 2005;37(6):S10-16.
 13. Food and Drug Administration (2006). FDA News: FDA licenses new vaccine for prevention of cervical cancer and other diseases caused by human papillomavirus.
Disponible en: URL: <http://www.fda.gov/bbs/topics/NEWS/2006/NEW01385.html>
 14. Taira A. Evaluating human papillomavirus vaccination programs. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(11):1915-1923.
 15. Tirado-Gómez L, Mohar-Betancourt A, López-Cervantes M, García-Carrancá A, Franco-Marina F, Borges G. Factores de riesgo de cáncer cérvico-uterino invasor en mujeres mexicanas. *Salud Pública Mex*. 2005;47(5):342-350.
 16. Del Amo J, Gonzalez C, Losana J, Clavo P, Muñoz L, Ballesteros J, et al. Influence of age and geographical origin in the prevalence of high risk human papillomavirus in migrant female sex workers in Spain. *Sex Transm Infect*. 2005;81:79-84.
 17. Diestro Tejeda M, Serrano Velasco M, Gómez Pastrana F. Cáncer de cuello uterino. Estado actual de las vacunas frente al VPH. *Oncología*. 2007;30(2):42-59.
 18. Giuliano A. Human papillomavirus vaccination in males. *Gynecol Oncol*. 2007;107(supl):24-26.
 19. Stanley M. Human papillomavirus vaccines versus cervical cancer screening. *Clin Oncol*. 2008;20(6):388-394.
 20. Kim JW, Hung CF, Juang J, Woo T, Armstrong DK, Pai SI, et al. Comparison of HPV DNA vaccines employing intracellular targeting strategies. *Gene Ther*. 2004;11:1011-1018.
 21. Lacey C, Thompson H, Monteiro E, O'Neill T, Davies M, Holding F. Phase IIA safety and immunogenicity of a therapeutic vaccine, TA-GW, in persons with genital warts. *J Infect Dis*. 1999;179:612-618.
 22. Kaufmann A, Stern P, Rankin E, Sommer H, Nuessler V, Schneider A, et al. Safety and immunogenicity of TA-HPV, a recombinant vaccine virus expressing modified human papillomavirus (HPV)-16 and HPV 18 E6 and E7 genes, in women with progressive cervical cancer. *Clin Cancer Res*. 2002;8:3676-3685.
 23. Gutierrez C, Tinoco A, Navarro T, Lopez M, Risco R, Calzado P, et al. Therapeutic vaccination with MVA E2 can eliminate pre-cancerous lesions (CIN 1, CIN 2, and CIN 3) associated with infection by oncogenic human papillomavirus. *Hum Gene Ther*. 2004;15(5):421-431.
 24. Albarran-Carvajal A, de la Garza A, Cruz Quiroz B, Vazquez E, Diaz I, Mendez E, et al. MVA E2 Recombinant vaccine in the treatment of Human Papillomavirus infection in men presenting intra-urethral flat condyloma: A Phase I/II Study. *Biodrugs*. 2007;21(1):47-59.
 25. Kim D, Hoory T, Monie A, Ting J, Hung CF, Wu T. Enhancement of DNA vaccine potency through co-administration of CIITA DNA with DNA vaccines via gene gun. *J Immunol*. 2008;180:7019-7027.
 26. Kim D, Gambhira R, Karanam B, Monie A, Hung CF, Roden R, et al. Generation and characterization of a preventive and therapeutic HPV DNA vaccine. *Vaccine*. 2008;26(3):351-360.
 27. Ahn WS, Bae SM, Kim TY, Kim TG, Lee JM, Nam Koong S, et al. A therapy modality using recombinant IL-12 Adenovirus plus E7 protein in a Human Papillomavirus 16 E6/E7-associated cervical cancer animal model. *Hum Gene Ther*. 2004;14(15):1389-1399.
 28. Sin JI. Suppression of anti-tumour protective cytotoxic T lymphocyte responses to a human papillomavirus 16 E7 DNA vaccine by co-infection of IL-12 complementary DNA: Involvement of nitric oxide in immune suppression. *Immunology*. 2009;128:707-717.
 29. Álvarez Salas L. Ácidos nucleicos terapéuticos contra cáncer cervical: una alternativa viable. *Cinvestav*. 2006;11:44-48.
 30. Hamada K, Sakaue M, Alemany R, Zhang W, Horio Y, Roth J. Adenovirus-mediated transfer of HPV 16 E6/E7 antisense RNA to human cervical cancer cells. *Gynecol Oncol*. 1996;63(2):219-227.
 31. Hall A, Alexander K. RNA interference of human

- papillomavirus type 18 E6 and E7 induces senescence in Hela cells. *J Virol.* 2003;77(10):6066-6069.
32. Mao ChP, Hung ChF, Wu TC. Immunotherapeutic strategies employing RNA interference technology for the control of cancers. *J Biomed Sci.* 2007;14:15-29.
 33. Webster K, Parish J, Pandya M, Stern P, Clarke A, Gaston K. The HPV 16 E2 protein induces apoptosis in the absence of other HPV proteins and via a p53-dependent pathway. *J Biol Chem.* 2000;275:87-94.
 34. Butz K, Ristriani T, Hengstermann A, Denk C, Scheffner M, Hoppe-Seyler F. siRNA targeting of the viral E6 oncogene efficiently kills human papillomavirus-positive cancer cells. *Oncogene.* 2003;22:5938-5945.
 35. Peralta-Zaragoza O, Reyes-Roman F, Lagunas-Martinez A, Bermudez-Morales V, Madrid-Marina V. Selective repression of HPV-16 E6 and E7 oncogenes by RNA interference in cervical cancer cells. *FEBS Journal.* 2005;272 (s1):A4-046P.
 36. Niu X, Peng Z, Duan W, Wang H, Wang P. Inhibition of HPV 16 E6 oncogene expression by RNA interference *in vitro* and *in vivo*. *Int J Gynecol Cancer.* 2006;16(2):743-751.
 37. Putral L, Bywater M, Gu W, Saunders N, Gabrielli B, Leggatt G, et al. RNA Interference against human papillomavirus oncogenes in cervical cancer cells results in increased sensitivity to cisplatin. *Mol Pharmacol.* 2005;68(5):1311-1319.
 38. Fujii T, Saito M, Iwasaki E, Ochiya T, Takei Y, Hayashi S. Intra-tumor injection of small interfering RNA-targeting human papillomavirus 18 E6 and E7 successfully inhibits the growth of cervical cancer. *Int J Oncol.* 2006;29(3):541-548.
 39. Jiang M, Milner J. Selective silencing of viral gene E6 and E7 expression in HPV-positive human cells using small interfering RNAs. *Methods Mol Biol.* 2005;292:401-420.
 40. Frechtel G. El ARN de interferencia. *Bioquimia.* 2005;30(4):99-100.
 41. Bubenik J, Miky Romana, Vonka V, Mendoza L, Imova J, Smahel M, et al. Interleukin-2 and dendrite cells as adjuvant for surgical therapy of tumors associated with human papillomavirus type 16. *Vaccine.* 2003;(9-10):891-896.