

I/287/96
August
Protocolo 61

INSTITUTO NACIONAL DE ONCOLOGIA
SECCION BIBLIOTECA

"EFECTOS DE LA RADIOTERAPIA EN LA INMUNIDAD ESPECIFICA CONTRA
EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH) EN PACIENTES CON CARCINOMA
INVASIVO DEL CUELLO UTERINO"

HECTOR ALIRIO GONZALEZ FLOREZ DM.
Especialista en Entrenamiento
Oncología Clínica INC.

Director del trabajo de Investigación:
Oscar Orozco Diaz DM.
Medico-jefe Sección de Inmunología INC.

Codirector del trabajo de investigación:
Hector Posso Valencia. DM.
Medico- Jefe Sección de Epidemiología. INC.

Guillermo Guerra P. DM.
Docente Sección de Radioterapia INC.

Santafé de Bogotá, Colombia, 22 de Agosto de 1966

EFFECTOS DE LA RADIOTERAPIA EN LA INMUNIDAD ESPECIFICA CONTRA
EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH) EN PACIENTES CON CARCINOMA
INVASIVO DEL CUELLO UTERINO

(Informe Preliminar)

-HECTOR ALIRIO GONZALEZ FLOREZ DM.
-Sección de Inmunología - INC.
-Sección de Radioterapia - INC.

Resumen :

Es actualmente aceptado que la presencia del VPH en el cuello uterino es el principal factor de riesgo en el desarrollo de Carcinoma de cuello uterino. Con el objetivo de analizar la respuesta inmune, humoral y celular contra el VPH en relación con la radioterapia, se estudiaron 47 pacientes, entre 25 y 65 años, con diagnóstico de Carcinoma de cuello Uterino, estados II y III. Se tomaron muestras de sangre, antes, 1 y 2 meses después de la radioterapia y citologías cervicales, antes y 2 meses después de la misma.

Este es un informe preliminar dentro del número total de pacientes:110, que han ingresado a este estudio.

El VPH fué detectado en 41 pacientes (87,2%), siendo el VPH-16, el tipo más frecuente: 22(53,6%) entre los pacientes VPH positivos.

Se detectaron anticuerpos anti-VPH-16/E7 en 10/22 pacientes (VPH-16(+):45,5% .

Se apreciaron los siguientes hallazgos en relación con la radioterapia, el VPH y la inmunidad anti VPH.

1- Disminución significativa de la presencia del VPH, 2 meses después de terminada la radioterapia en relación con el estado inicial.

2- Reducción significativa del porcentaje de pacientes con anticuerpos anti VPH-16/E7, 1 y 2 meses después de terminada la radioterapia en relación con el estado inicial.

3- Reducción significativas entre las cifras de densidad optica para los anticuerpos anti-VPH-16/E7, 1 y 2 meses después de terminada la radioterapia en relación con el inicio.

4- No relación entre VPH y el estado y la respuesta clinicos.

Hasta el momento se puede concluir que la radioterapia tiene relación con la negativización del VPH y la disminución de la positividad para anticuerpos anti-VPH-16/E7, probablemente por la eliminación de las células neoplásicas, infectadas por el virus, y que la presencia del virus no es factor pronóstico del estado ni de la respuesta clínica.

INTRODUCCION

El cancer de cuello uterino es la neoplasia más común a nivel de la población femenina en Colombia (1).

Entre los factores de riesgo se tienen la iniciación de relaciones sexuales a temprana edad y la promiscuidad sexual, los cuales han conducido a la mayor frecuencia del VPH tanto en pacientes con neoplasia intraepitelial cervical (NIC) como con Carcinoma invasivo de cuello uterino (2), de tal manera que actualmente se acepta que la presencia del VPH en el cuello uterino es el principal factor de riesgo en el desarrollo de esta neoplasia, con potencialidades realmente etiológicas (3).

El VPH al integrarse dentro del genoma de las células (4), produce inmortalización y transformación de estas con producción de CA insitu y luego Carcinoma invasivo.

La mayoría de los estudios han demostrado una prevalencia del ADN-VPH en Carcinoma invasivo de cuello uterino desde el 60 al 95% de los casos, correspondiendo el mayor porcentaje al VPH-16, en alrededor del 50% de los casos, seguido del VPH-18 (10 al 20%) y otros tipos VPH-31, 33, 35, 39 y 45 (15 al 30%) (5) (6).

El tratamiento fundamental del Carcinoma de Cervix, en los estados II y III es la radioterapia, con sobrevivida a los 5 años del 50-65% y 25-35% respectivamente (7).

La exposición al VPH induce una respuesta inmune específica en el huésped, tanto a nivel humoral como celular, dirigida especialmente contra las oncoproteínas tempranas E6 y E7, con diversos estudios, que demuestran que los epítopes iniciales y finales de la proteína E7 son los determinantes, especialmente a nivel de la respuesta humoral (8,9,16,17).

Hasta el momento no se ha definido exactamente la influencia de la radioterapia, en la respuesta específica inmune humoral y celular anti-VPH, con resultados variables y algunas veces contradictorios (10,11,12,13,14,15).

Es por ello que hemos decidido valorar la respuesta inmune específica contra el VPH antes y después de la radioterapia.

MATERIALES Y METODOS

Desde el inicio de su recolección han ingresado al estudio hasta la fecha 110 pacientes, de los cuales 47 se presentan en este informe, ya que los restantes no han terminado el tratamiento, ni el seguimiento y otros se han extraviado.

Se incluyeron pacientes con los siguientes criterios:

Pacientes con diagnóstico de Carcinoma invasivo de cuello

uterino, estados II y III, que ingresaran por primera vez a la radioterapia, diagnostico basado en el examen fisico, biopsia cervical y algunas ayudas diagnosticas adicionales como ecografia abdomino-pelvica, urografia excretora, cistoscopia y biopsia vesical en caso necesario, edades de 25 a 65 años, no haber recibido otra clase de tratamiento para su neoplasia. Fueron excluidos pacientes en estado de salud terminal, grado severo de desnutrición y presencia de alguna inmunodeficiencia comprobada, diferente del cancer.

A todos los pacientes se les ordenó antes de entrar al tratamiento: CH, nitrogeno ureico, y creatinina, uroanálisis, RX de torax, ecografia abdomino-pelvica.

En la consulta inicial, al paciente se le practicaba una encuesta de contenido epidemiológico, un examen fisico adecuado, se le tomaban muestras de sangre para pruebas inmunológicas humorales y celulares, citología vaginal para detección del VPH, y se programaba la dosis de radioterapia, segun el estado clinico, (teleterapia en fraccionamientos de 180 c Gy al día, 5 dias a la semana).

Antes de entrar en braquiterapia, de nuevo se solicitaban el CH, nitrogenados y uroanálisis.

El paciente era nuevamente citado al mes y 2 meses después de terminada la radioterapia para la toma de muestras de sangre, con el objeto de analizar los cambios experimentados en la

respuesta inmune. Igualmente a los 2 meses después de finalizado el tratamiento se tomaba citología vaginal para la detección del VPH.

La respuesta clínica y citológica fueron evaluadas por el servicio de Ginecología, entre 1 y 2 meses después de terminada la radioterapia.

La detección del VPH se practico por reacción en cadena de polimerasa mediante la tecnica de Elisa, para los diferentes tipos de VPH (11,16,18).

Se practicaron ensayos de anticuerpos anti-VPH-16/E7, VPH-18/E7 y VPH-11/E7, empleando proteínas recombinante, mediante la tecnica de Elisa.

Obtención y purificación de pteínas recombinantes: Se obtuvieron plásmidos recombinantes con ORFs de E7 de HPV 11,16 y 18. Se emplearon las metodologías de clonaje ya establecidas para construir los plásmidos pMAL/E7 - HPV16, pMAL/E7- HPV18, pMAL/E7- HPV11. El gen para E7 de HPV16 fué obtenido a partir del plásmido pGEX5t/E7 HPV16 previamente construido, mediante hidrólisis enzimática con BamH-I y Hind-III y clonado en pMAL. El gen E7 de HPV18 fué aislado a partir de un plásmido pGEMAZ_HPV18 (2,4Kb), este plásmido tiene un fragmento de 2,4Kb que contiene ORF E7, el cual se aisló mediante hidrólisis con Nsi-I/EcoR-I, este fragmento se clonó en el plásmido pBS, y de éste se aisló mediante

hidrólisis BamH-I y Hind-III para clonarlo finalmente en pMAL. El gen para E7 de HPV11 fué obtenido mediante amplificación por PCR a partir del genoma completo empleando los primers 5'GGGGATCCACCATGCATGGAAGACTTGTT3' y 5'GGAAGCTTTGGTTTTGGTGCAGATGGG3' que estan modificados de modo que se introducen los sitios de corte enzimatico BamH-I y Hind-III posteriormente se clonó en pMAL.

Para obtener las proteina recombinantes, bacterias E coli, cepa JM101, fueron transformadas con los plásmidos recombinantes y combinas a 7 grados Centigrados, diluidas 1/10 con medio LB e incubadas a 1,5 horas más para luego hacer la inducción con IPTG 0.3 mM durante 4 horas. La purificación de las proteínas recombinantes MBP-E7HPV16, MVP-E7HPV18, MBP-E7HPV11 se hizo mediante cromatografía de afinidad empleando resina de amilosa (New England Biolabs), la elución de la proteina se hizo con maltosa 10 mM. Todos los pasos de obtención y purificación de las proteínas recombinantes fueron valorados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% e inmunotransferencia.

Elisa empleando proteínas recombinantes E7 de HPV16, E7 de HPV18 y E7 de HPV11:

Para esta Elisa se acomplaron 5 ug/pozo de cada proteina de fusion diluida en PBS a placas de 96 pozos, las placas se incubaron una hora a 37 grados centigrados y toda la noche a 4 grados centigrados. Los sitios libres de la placa se

bloquearon con 200 ul de albumina bovina al 5% en PBS durante 2 horas a 37 grados centigrados. Luego de tres lavados con PBS-Tween 0,05%, los sueros fueron colocados en duplicado (diluidos 1/100 en albumina bovina al 5% en PBS). Además, para cada muestra se prepararon pozos control sin antígeno que se incubaron en condiciones similares. Las absorbancias netas y los puntos de corte se calcularon de igual manera. Los sueros que se revelaron positivos en esta prueba se analizaron nuevamente en diluciones progresivas de 1/100 a 1/3200.

Las pruebas de activación y proliferación celulares, se realizaran al grupo siguiente de pacientes, que por problemas técnicos no se pudo comenzar antes y sus resultados se expresarán en el informe final.

RESULTADOS

Cuarenta y siete pacientes se relacionan en este informe, entre los 110 que han comenzado el tratamiento.

A. Características Generales:

CUADRO No 1

Características de los pacientes

Edad	(28-65)	Mediana: 50 años
Edad Primer acto sexual	(12-31)	Mediana: 17 años
No. de Embarazos	(0-12)	Mediana: 6
Edad primer parto	(14-38)	Mediana: 19 años
No. de Parejas estables	(1 -8)	Mediana: 1
No. de Parejas casuales	(0-15)	Promedio: 1 Mediana: 0
No. Total de parejas	(1-16)	Promedio: 2,4 Mediana: 1
Tiempo enfermedad	(1-36)	Mediana: 4 meses
Estado Clínico	IIB: 23 (48,9%) IIIA: 1 (2,1%) IIIB: 23 (48,9%)	

Diagnóstico Histológico:

- CA-escamocelular - celulas grandes queratinizante e infiltrante: 23 (48,9%)
 - CA- escanocelular - celulas grandes no queratinizante, infiltrante: 23 (48,9%)
 - Adenocarcinoma: 1 (2,1%)
-

El porcentaje de pacientes con Carcinoma de cuello uterino y VPH (+), aumentó con la edad, con un $F=0,06$.

B. Estado Viral:

1- Distribución generica para todos los tipos de VPH:

VPH (-): 6 (12,8%)
VPH (+): 41 (87,2%)

Total 47 (100%)

2- Distribución por tipos de VPH:

VPH-16: 22 (46,8%)
VPH-18: 4 (8,5%)
VPH-11: 0 (0%)
Ambos(16 y 18): 2 (4,3%)
Otros tipos VPH 13 (27,6%)
VPH (-): 6 (12,8%)

Total 47 (100%)

3- Distribución por tipos entre VPH (+):

VPH-16: 22 (53,6%)
VPH-18: 4 (9,7%)
Ambos (16 y 18): 2 (4,9%)
Otros tipos VPH: 13 (31,7%)

Total 41 (100%)

C. Respuesta al tratamiento:

Respuesta Clínica:

Respuesta completa: 39 (83%)

Respuesta parcial: 1 (2,1%)

No respuesta: 4 (8,5%)

Progresión: 3 (6,4%)

47 (100%)

Respuesta Objetiva: 40 (85,1%)

No respuesta- progresiva: 7 (14,9%)

Respuesta citológica
(Papanicolau)

pap II: 34 (82,9%)

pap V: 7 (17,1%)

41 (100%)

Sin citologia vaginal: 6

**D. Relación entre estado Viral (detección de infección viral)
y Radioterapia:**

Prueba genérica para VPH:

De un total de 47 pacientes, 41 resultaron VPH(+) antes de la radioterapia, de los cuales se negativizaron 25 (61%), permaneciendo solamente 16 VPH(+) (39%), después de la radioterapia. El número de pacientes VPH(-) antes de la radioterapia: 6, se incrementó a 31 después de la radioterapia. Diferencia estadísticamente significativa. $CHI^2=25,67$, $P=0,0000004$.

VPH-16:

De un total de 22 pacientes VPH-16(+) antes de la radioterapia, 19 se negativizaron (86,4%) y solamente 3 permanecieron positivos después de la radioterapia (13,6%). Diferencia estadísticamente significativa: $\text{CHI}^2 = 20,5$, $P = 0,0000061$.

Relación entre Estado Viral y Respuesta clínica:

No hubo relación significativa entre la presencia del VPH, en general, ni antes, ni después de la radioterapia, y la respuesta clínica al tratamiento ($\text{CHI}^2 = 0,19$ Mantel y Haensel, $P = 0,66$). Sin embargo se presentó relación significativa entre la presencia del VPH-16 y la respuesta clínica al final del tratamiento: de 34 pacientes con respuesta clínica completa, 32 eran VPH(-) (94,6%) y 2 VPH(+) (5,4%), $P = 0,03$.

Relación entre Estado Viral y Estado Clínico:

No se presentó relación entre el Estado Viral, en general, de los pacientes ni antes, ni después de la radioterapia y el Estado Clínico. $\text{CHI}^2(\text{Mantel y Haensel}) = 0,07$. $P = 0,79$.

E. Estado Inmunológico:

Relación entre VPH-16 y sus Anticuerpos:

No todos los pacientes VPH(+) tenían anticuerpos anti VPH y viceversa (Cuadro No.2).

CUADRO No. 2

Relación entre VPH-16 y sus Anticuerpos			
VPH-16	Anticuerpos		Anti VPH-16/E7
	+	-	
VPH-16 22(52,7%) (+)	+	10 (45,5%)	12 (54,8%)
VPH-16 19(46,3%) (-)	-	7 (36,8%)	12 (63,2%)
41 (100%)		17 (41,5%)	24 (58,5%)

Relación entre anticuerpos anti VPH y respuesta a la radioterapia:

Al relacionar el estado de anticuerpos anti VPH-16/E7, se encontró que el porcentaje de pacientes con presencia de anticuerpos disminuía significativamente, tanto al mes, como a los 2 meses de terminada la radioterapia, respecto al estado inicial y entre el primero y el segundo mes post-radioterapia. Así entre 23 muestras analizadas, positivas y negativas para VPH, 10 eran positivas tanto para VPH como para sus anticuerpos al inicio del tratamiento y experimentaron los siguientes cambios: (Cuadro No.3)

CUADRO No. 3

Anticuerpos y Radioterapia				
Tiempo		0	1 mes	2 meses
Numero	+	10	8	5
Anti- VPH-16/E7	-	0	2	5

P: 0-1 = 0,0007

0-2 = 0,0039

1-2 = 0,0005

Relación entre Densidad optica (DO) para anticuerpos anti VPH-16/E7 y respuesta a la radioterapia:

Se apreció que la DO disminuía significativamente, al comparar las cifras antes de la radioterapia, con aquellas al mes y 2 meses después de finalizada:

Así al comparar las cifras de densidad optica antes de la radioterapia con aquella al mes de terminada la radioterapia, se encontraron 17 numero de pares con una DO promedio, que descendió de 1,2138 á 0,5413 (P=0,000. Prueba T para muestras pareadas).

Igualmente al comparar las cifras de DO ants de la radioterapia, con aquellas a los 2 meses de terminada la radioterapia se encontraron 18 numero de pares, con un DO que descendió de 1,1662 a 0,4833 (P=0,000. Prueba T para muestras pareadas).

Tendencia de DO para anticuerpos anti VPH-16/E7 en relación con el tratamiento:

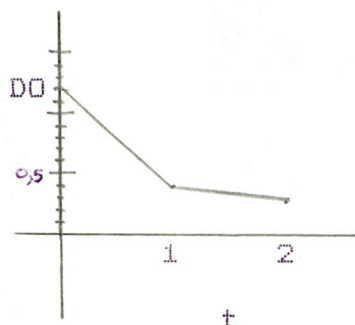


Figura. 1

Relación entre Estado Viral y anticuerpos anti VPH-16/E7:

No hubo relación entre la presencia viral y la presencia de anticuerpos, anti (VPH-16/E7) ni antes, ni después del tratamiento (Cuadro No.2)

De 22 pacientes VPH-16(+) al comienzo, 10 tuvieron anticuerpos y 12 no. De 19 pacientes VPH-16(-) al comienzo, 7 tuvieron anticuerpos y 12 no, $\text{CHI}^2=0,06$. $P=0,81$.

Se observó que a mayor Densidad Optica para anticuerpos VPH-16/E7 antes de la radioterapia, había mayor reducción de ésta al final del tratamiento $P= 0,0004$.

Relación entre anticuerpos anti VPH-16/E7 y la respuesta Clínica:

No hubo relación entre la presencia de anticuerpos anti VPH-16/E7 y la respuesta clínica. De 38 pacientes positivos y negativos para anticuerpos, antes de la radioterapia y que

presentaron respuesta clinica completa, 23(60,5%) fueron negativas para anticuerpos y 15(39,5%) positivos. De 7 pacientes sin respuesta o progresión al tratamiento 4(57,1%) fueron negativos y 3 positivos (42,8%) $P= 0,8$.

F. Estado Hematologico:

No se presentó relación significativa entre el grado de linfopenia al final de la radioterapia y la dosis total de esta en puntos A y B, ni entre el diferencial de linfocitos entre las cifras antes, y después de la radioterapia y la dosis total de radioterapia.

No se detectó relación significativa entre la respuesta clinica y el diferencial de linfocitos entre las cifras antes y despues de la radioterapia, aunque en relación con el nivel diferencial leucocitos entre las cifras antes y después de la radioterapia, se obtuvo un $P= 0,055$.

DISCUSION

Este es el primer estudio prospectivo que relaciona la radioterapia con el estado del virus del Papiloma humano y la respuesta inmune específica contra el virus, específicamente contra la proteína oncogénica E7.

Igualmente es el primer estudio que utiliza la técnica Elisa para la detección del VPH en citologías del cuello uterino y en la valoración de la respuesta inmune específica contra el VPH, habiéndose obtenido resultados óptimos que se presentaran en el informe final, similares a la prueba de Southern Blot.

Elisa es una prueba técnica y fácilmente reproducible con resultados semicuantitativos, ventaja que no presenta la técnica de Southern blot, lo cual la hace mucho más utilizable en aplicaciones clínicas.

En este estudio se observó que nuestras pacientes inician relaciones sexuales a una edad relativamente temprana, tienen un número medio de hijos, pero no son promiscuas sexualmente.

Se corroboró la alta asociación entre el virus del papiloma humano y el Carcinoma de cuello uterino, (VPH+:87,2%), siendo el VPH-16 el tipo más común (53,6%) entre la población VPH(+).

Hasta el momento, de este informe, se puede evidenciar:

1- la relación entre la radioterapia y la disminución de la positividad del VPH, en los pacientes expuestos a tal tratamiento, en el 61% de los casos.

Este hallazgo podría ser secundario a una acción directa deleterea de la radioterapia sobre el virus, que alteraría la estructura del ADN viral, dejándolo incapaz de replicarse o ser la consecuencia de la destrucción de las células neoplásicas por parte de la radioterapia, ya que las células neoplásicas e infectadas por el VPH son más sensibles a su acción deleterea, apareciendo en la citología al final del tratamiento, solamente células normales, ya que las células infectadas, pueden estar localizadas en la capa basal del epitelio y no descamar, siendo importante determinar si este hallazgo continúa en el tiempo. También es posible que la negatividad al VPH al final del tratamiento esté relacionado con erradicación total de las células neoplásicas infectadas. Pero no se observó asociación entre el estado genérico del VPH y la respuesta clínica al tratamiento.

Tampoco se observó relación entre la presencia del VPH y el estado clínico, siendo posible que el virus tenga importancia en la iniciación del proceso al immortalizar y transformar las células normales, pero también influyen otros factores en la evolución de la enfermedad.

Esto podría corroborarse por la no relación entre presencia de anticuerpos anti VPH y estado clínico en diferentes estudios. Algunos autores no han encontrado relación entre la seropositividad a la proteína E7 del VPH-16 y el estado de la enfermedad (18,), es decir que la presencia de anticuerpos previa al tratamiento no permite predecir el curso clínico de la enfermedad (19). Otros reportes han sugerido que los títulos de anticuerpos aumentan de acuerdo con el estado tumoral y que podrían ser un marcador de presencia de metástasis (8,20).

La presencia del VPH no es un factor pronóstico del estado clínico de la enfermedad ni de la respuesta clínica de la radioterapia, por lo cual hay que preguntarse si se justifica o no realizar la prueba de detección viral en citologías, cuando la paciente ya tiene cáncer de cuello uterino diagnosticado, teniéndose que responder que no de manera rutinaria. No ocurriría lo mismo en el periodo post-tratamiento, durante el cual si la paciente está curada, se comportaría como una paciente normal y la presencia del VPH aumentaría el riesgo de una recidiva del cáncer cervical, de padecer otro cáncer en el área anogenital y de contaminación viral a otra persona a través de relaciones sexuales. Entonces consideramos que esta prueba (RCP-Elisa) se debe realizar en el seguimiento de pacientes en respuesta completa, desde el punto de vista anterior.

2. Respuesta Humoral:

La presencia de anticuerpos contra la proteína temprana E7 representa la respuesta más importante en pacientes con Carcinoma invasivo de cuello uterino, asociado al VPH con títulos altos en alrededor del 50% de los pacientes, comparado con un porcentaje bajo (0-15%) en pacientes normales (5,16,17,21,22), aunque un mayor porcentaje de estos pacientes está infectado por el virus y solamente una mínima parte va a desarrollar Carcinoma Cervical invasivo (23).

El ADN - VPH se hace indetectable en la mayoría de mujeres infectadas, pero son posibles la latencia y la reactivación (23), y junto con otros factores tener potencialidad de transformar las células epiteliales normales en malignas.

Orozco y colaboradores (9) en un estudio entre 249 pacientes encontraron que los anticuerpos contra la proteína VPH-16/E7 (Epitopes 1 y 12, aminoácidos 1 a 20 y 66 a 85 respectivamente), fueron más prevalentes en el grupo de pacientes con Carcinoma de cuello uterini (26,2%), que en el grupo de pacientes controles (10,4%) $P < 0,05$. Igualmente otros autores han descrito hallazgos similares (16,17,21,22,24).

Este estudio demuestra la asociación entre la radioterapia y la respuesta inmune basada en anticuerpos contra el VPH-16/E7, con disminución progresiva del porcentaje de pacientes

con anticuerpos positivos 1 y 2 meses después de la radioterapia en comparación con el estado inicial, lo cual podría ser secundario a la eliminación del antígeno viral como consecuencia de la destrucción de las células neoplásicas infectadas, lisis del virus por parte de la radioterapia o por la inmunosupresión creada por ésta (11) con disminución del número de linfocitos y la producción de anticuerpos, pero en su contra está el hecho que a los 2 meses post-radioterapia, tiempo de la última evaluación humoral, la linfopenia era muy posible que hubiese desaparecido.

Sería importante observar el comportamiento del estado de los anticuerpos anti-VPH posteriormente a través del tiempo, en relación con la presencia o no del virus y el nivel de linfocitos.

La misma tendencia se apreció con la densidad óptica para anticuerpos anti-VPH, con decrecimientos estadísticamente significativos en relación con el tratamiento radioterápico instaurado.

No se evidenció relación entre la presencia del virus y la presencia de anticuerpos anti-VPH-16/E7, ya que de 22 pacientes VPH-16 (+) solamente el 45,5% experimentaron producción de anticuerpos, y el 36,8% de los 19 pacientes VPH (-) fueron positivos para la aparición de anticuerpos. La

prevalencia de anticuerpos reportada para la proteina E7 del VPH-16 se situa entre el 13 y el 43% de los pacientes afectados de cancer de cuello uterino (9,25).

Es claro que solamente un subgrupo de pacientes, con carcinoma invasivo de cuello uterino, presenta producción de anticuerpos contra la proteina E7 del VPH, siendo necesario dilucidar este fenómeno y sus causas.

Varios estudios han demostrado que existe poca correlación entre la presencia del ADN viral y la seropositividad contra la proteina E7, reportandose un numero importante de casos positivos para anticuerpos anti VPH-E7, que son negativos para el virus (18,26,27).

En otros reportes se ha demostrado la asociación significativa entre la serologia E7 y la presencia del VPH-16 en el tumor (8,28).

La presencia de anticuerpos anti VPH, por si misma, no es un indicativo que el paciente esté infectado por el VPH en determinado momento, como tampoco es un factor pronostico de la respuesta clinica.

Pero si la densidad optica para los anticuerpos anti VPH-16/E7 experimenta aumento en un paciente VPH-16(+), se puede afirmar que la infección no está controlada.

Como por ejemplo en un paciente, que se ha visto antes de iniciar el tratamiento, que en presencia del virus produce anticuerpos y el nivel de estos ha ido descendiendo durante o después de la radioterapia, un ascenso significaría reinfección o reactivación del mismo tipo de VPH.

Los resultados disímiles podrían ser el resultado de las diferentes fuentes antigénicas empleadas (peptidos sintéticos, proteínas de fusión, proteínas obtenidas post-traducción in vitro), o a las características no uniformes de las muestras analizadas (antes o después del tratamiento, estado clínico, calidad de la muestra), aunque en este no hubo relación entre estados viral y clínico y la calidad de las muestras fue adecuada en cerca del 100% para la presencia del ADN-VPH.

Es fundamental, aclarar a través de estudios prospectivos, las aparentes contradicciones en el comportamiento de los anticuerpos en relación con el estado viral y el tratamiento, ya que hasta el momento los estudios realizados no son concluyentes, ni claros (29,30).

Es igualmente importante relacionar la sobrevida libre de enfermedad y global con el comportamiento inmunológico del paciente.

En relación con los hallazgos hematológicos, los datos obtenidos no evidenciaron la asociación existente entre la dosis total de radioterapia y el grado de linfopenia, explicable como efecto colateral por la acción de la radioterapia sobre los linfocitos tanto B como T, pero es probable que con un mayor número de pacientes se advierta tal asociación.

En los linfocitos B hay mayor daño durante la fase de inducción, que durante la fase productora de anticuerpos (11).

El principal factor involucrado en la disminución de la formación de anticuerpos es la destrucción de las células de inducción, capaces de trasladar la información genética productora de anticuerpos a las células productoras de anticuerpos (10,11). Los linfocitos son las células de inducción, mientras los plasmocitos son las células productoras directas de anticuerpos.

Sin embargo la radioterapia localizada, a pesar de la linfopenia producida de las células B y T, no afecta la respuesta inmune contra bacterias y virus por que los pacientes tratados no parecen ser más susceptibles (11).

Se apreció relación muy cerca de la significancia ($P=0,055$) entre el grado de leucopenia y la respuesta clínica a la

radioterapia, con mayores porcentajes de respuesta clínica completa a mayor grado de leucopenia, dentro de determinado rango, deducible del efecto superior de la radioterapia a dosis mayores, lo cual acarrea más efectos colaterales como leucopenia y linfopenia (10).

Como conclusión es preciso afirmar que este estudio no solamente corrobora la asociación entre VPH y Carcinoma de cuello uterino, sino que también dilucida algunos aspectos de la influencia de la radioterapia sobre la inmunidad específica contra el virus del papiloma humano, ya que estudios anteriores se referían más que todo a los aspectos de la inmunidad no específica.

Se evidenció la acción benéfica de la radioterapia sobre la presencia del VPH, al disminuir su positividad, correlacionado con la disminución de los niveles de anticuerpos anti VPH o la negativización de éstos.

La presencia del virus no es un factor pronóstico para predecir el estado clínico ni la respuesta al tratamiento.

Es fundamental investigar prospectivamente, durante periodos de tiempo más prolongados, el comportamiento del VPH y sus anticuerpos después de finalizado el tratamiento.

Consideramos que en el informe final aclararemos algunas de las controversias existentes en éste.

ABSTRACT

" Immune radiotherapy effects against Human papillomavirus (HPV) in cervical cancer patients" (Preliminary inform).

This is a prospective estudy, undertaken to analize homoral and cellular inmune response against Human Papillomavirus in relation to radiotherapy.

Forty seven patients were studied, with ages between 25 and 65, cervical cancer diagnosis, and II - III clinical stages. Blood was drawn before, 1 and 2 months after radioterapy and cervical citology before and 2 months after it.

This is a preliminary inform among 110 patiens, entered to this research.

HPV was detected in 41 patients (87,2%), HPV-16 serotype was the most common: 22 (53,6%) in the HPV positive patients group.

HPV-16/E7 antibodies were detected in 10/22 HPV-16(+): 45,5%.

The following findings were evidenced:

1- Positive HPV patients significant decrease, 2 months after finishing radiotherapy in relation to initial state.

2- Significant reduction of patients with antibodies against HPV-16/E7 protein, 1 and 2 months after finishing radiotherapy in relation to beginning.

3- Significant decrease of HPV-16/E7 protein optic density, 1 and 2 months after ending radiotherapy in relation to beginning.

4- No relationship between HPV and clinical stage and response.

It is concluded to this date, radiotherapy has relationship with decrease of HPV and HPV-16/E7 antibody positiveness, probably because of destruction of neoplastic cells, and that VPH positiveness is not a pronostic factor of clinical stage nor clinical response.

REFERENCIAS

- 1- Instituto Nacional de Cancerología. Bogotá - Colombia.
Registro de incidencia de cánceres. 1995.
- 2- International agency for research on cancer. Human papillomaviruses. Vol 64, 58 - 65, 1995.
- 3- Muñoz N. et al. The causal link between Human papillomaviruses and invasive cervical cancer. Int J. Cancer 52: 743-49, 1992.
- 4- Sarria A. et al: Aspectos moleculares de los papiloma virus humanos y su relación con el cáncer cervicouterino. Rev inv Clin: 45: 85-92, 1993.
- 5- Bosh F. X. et al: The epidemiology of HPV and cervical cancer. Abstracts of: HPV vaccines and their potential use in the prevention and treatment of cervical neoplasia. 5-6 Verger du Lac. France, 1994.
- 6- Muñoz N. et al: HPV and cervical cancer. A multicentre case-control study. Abstract 13th Int papillomavirus conf Amsterdam. Netherlands 8-12 Oct 1994.
- 7- Cameron R. Malignancies of the uterine cervix. Practical oncology. 1st ED 364-76, 1994.

- 8- Wu T. Immunology of HPV in relation to cancer. Curr Biol 746-54, 1994.
- 9- Bravo MM, Orozco O. et al. Respuesta Humoral antiproteína sintéticos y proteína recombinante. Rev Col Ginec Obstetr 46: 33-40, 1995.
- 10- Rubin FH, Cassarett G. W. Hematopoietic tissue and blood. Clinical Radiation Pathology. Saunders Company: 778 -84 1968.
- 11- De Vita V, Hellman S, Rosemberg S: Principles of Radiation therapy. Adverse effects. Basic principles of cancer. 4th ED. 267-68, 1993.
- 12- Lehtinem M. et. al. Pre and post treatment serum antibody responses to HPV-16/E2 and HSV-2-ICPB proteins in women with cervical carcinoma: J of Med Virology: 37: 180-86, 1992.
- 13- Mc Credie J A et al. Antibodie dependent cellular citotoxicity in cancer patients lac of pronostic value. Br Cancer: 41: 880-85, 1980.
- 14- Mc Credie J A et al. Effects of Operative and radiotherapy on antibodies dependent cellular citotoxicity. Cancer: 44: 99-105, 1979.
- 15- Stratton R M et al. Antibody cell mediated citotoxicity in treated and non treated cancer patients. Cancer: 40: 1045-51, 1977.

- 16- Kornack V. et al. Synthetic peptides derived from E7 region of HPV as antigens in Elisa. J of Gen Virol: 71: 2709-17, 1990.
- 17- Muller M. et al. Identification of seroreactive region of the HPV-16/E4-E6-E7-L1. J of Gen Virol: 71: 2709-17, 1990.
- 18- Ghosh A. et al. Serological Responses to HPV-16 in cervical displasia and neoplasia. Correlation of antibodies to E6 with cervical cancer. Int J Cancer: 53: 1-6, 1993.
- 19- Gaarenstroom K. et al. Pronostic significance of serum antibodies to HPV-16/E4-E7 proteins in cervical cancer. Cancer. 74: 2308-18, 1994.
- 20- Onda T. et al. Association of the antibodies against HPV-16/E4-E7 proteins with cervical cancer positive for HPV-DNA. Int J Cancer. 54: 624-28, 1993.
- 21- Dillmer J. et al. Antibody responses to defined HPV epytopes in cervical neoplasia. Papillomavirus report. Vol.5, No. 2, 35-41, 1994.
- 22- Sasagawa T. et al. Identification of antibodies against HPV-16/E6-E7 in patients with cervical neoplasia. Jpn J Cancer Res. 83: 705-13, 1992.
- 23- Schiffman M H. National History studies of HPV and cervical neoplasia. 7 V du lac. France Dec/94.

- 24- Inglis SC. Rationale for the development of therapeutic vaccine against cervical neoplasia. Abstracts of: HPV vaccines in cervical neoplasia. 25 V. du lac France. Dec/1994.
- 25- Sun Y et al. Comparison of Elisa and radioimmunoprecipitation assay with in vitro translate proteins for detection of serum antibodies to HPV-16/E6-E7 proteins. J Clin Microbiol. 2216-20, 1994.
- 26- Mann VM. et al. Occurrence of IgA and IgG antibodies to cases and controls. Cancer Res. 50: 7815-19, 1990.
- 27- Nindl I. et al. Antibodies against linear and conformational epitopes of the HPV-16/E6-E7 oncoproteins in sera of cervical cancer patients. Arch virol. 137:341-53, 1994.
- 28- Kanda T. et al. Independent association of antibodies against HPV-16/E1-E4-E7 proteins with cervical cancer. Virology 190:724-32, 1992.
- 29- Dillner J. Disappearance of antibodies to HPV-16/E7 after treatment for cervical cancer. Letter. Lancet 34:1594, 1993.
- 30- Chee Y. et al. Immunologic diagnosis and monitoring of HPV-16 in cervical cancer patients. Gynecol Oncol. 57:226-31, 1995.

- I/287/96
- EFECTOS DE RADIACION
 - Radioterapia
 - INMUNIDAD
 - VIRUS DEL PAPILOMA
 - HUMANO
 - CARCINOMA
 - CUELLO UTERINO.

Instituto Nacional de Cancerología



INC002595