



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

8
sej

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

UNIDAD DE INVESTIGACION EN DIFERENCIACION
CELULAR Y CANCER

ANALISIS DE LA EXPRESION DE MOLECULAS DEL
COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD
CLASE I (MHC-I) EN DOS LINEAS CELULARES DE
CANCER CERVICO-UTERINO (CaCu) CaLo E InBI Y EL
EFECTO DE LA TRANSFECCION CON LAS
MOLECULAS TRANSPORTADORAS ASOCIADAS CON
EL PROCESAMIENTO DE ANTIGENOS (TAP¹ Y TAP²)

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
ALMA DELIA CHAVEZ BLANCO

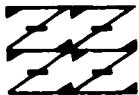
DIRECTOR DE TESIS: M. EN I.B.S.H. ALBERTO MONROY GARCIA
ASESOR DE TESIS: DR. BENNY WEISS STEIDER

MEXICO, D. F.

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

U N I V E R S I T A D
N A C I O N A L
D E M E X I C O



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A Dios por haberme dado la oportunidad de estar aquí.

A las personas que mueren y padecen de cáncer.

A mis Padres:

Lorenzo Chávez M. y Florinda Blanco G. por su sacrificio y dedicación para sacar a una familia adelante de la cual soy parte, y por haberme dado los regalos más preciados: vida, amor, comprensión y educación.

A mis Hermanos:

Beto, Enrique (manito pechocho), Ana Laura (La Chinita) y Sandra Luz (gordita feita), porque junto a ellos mi vida a sido toda una aventura y me gustaría de todo corazón, que todas las familias tuvieran el orgullo de decir, lo que en estos renglones escribo.

A Rommel:

Por su amor, amistad, dedicación y comprensión

A mis Amigos:

Con los cuales he tenido la gran oportunidad de vivir, aprender y conocer cosas nuevas. Y como mis amigos son muchísimos, no alcanzarían todas las hojas del mundo para escribir sus nombres, por lo que siempre los llevo en mi corazón junto a los buenos, chistosos y malos recuerdos que hemos pasado juntos.

A la FES Zaragoza:

Por haberme permitido llegar a una de mis más anheladas metas desde la secundaria: ser BIOLOGA.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Benny Weiss Steider por permitirme integrarme a su laboratolio en donde encamine mi vida.

A mi Asesor Alberto Monroy por su paciencia y dedicación.

A los compañeros y maestros del Laboratorios de Diferenciación Celular y Cáncer por ayudar a mi desarrollo en el laboratorio.

A los Drs. Armando Isibasi, Fco. Vianney Ortiz N, Jose Moreno del Centro Medico Nacional siglo XXI (CMN-XXI) por permitirme realizar parte de esta tesis en sus laboratorios.

Al Dr. Alvaro Osomio de la División de Investigación Básica del Instituto Nacional de Cancerología (INCAN) por permitirme realizar parte de esta tesis en el Laboratorio 1.

A Caty por su apoyo para realizar esta tesis, Enrique y Lucy del INCAN, a quienes agradezco su valiosa amistad y apoyo incondicional.

A la maestra Elina por que sus inolvidables clases de Biología en la secundaria.

A los Técnicos Don Ra y Don Jou por su valiosa ayuda para la realización de este trabajo.

INDICE

	Página
Resumen	1
Introducción	3
Marco Teórico	5
Especificidad del sistema inmune	5
A) La Vía de los Linfocitos B y la Respuesta Inmune Humoral	6
B) La Vía de los Linfocitos T y la Inmunidad Celular	7
Ontogenia de los linfocitos T	7
El Complejo Principal e Histocompatibilidad (MHC)	9
Mecanismo de Procesamiento y Presentación de antígenos por la Vía de las Moléculas Clase I del MHC	12
El Proteasoma	13
Los Transportadores Asociados al Procesamiento de Antígenos	17
Las Moléculas Chaperonas	21
Polimorfismo y Especificidad en la Presentación de Antígenos	21
Cáncer Cérvico-uterino (CaCu)	25
A) El Virus del <i>Papilloma</i> humano (HPV) en Relación al Cáncer Cérvico-uterino	25
B) Inmunidad humoral hacia CaCu	28
C) Inmunidad Celular Hacia CaCu	29
Hipótesis	33
Objetivos	34
Materia y Método	35
Resultados	44
Discusión	58
Conclusiones	65
Bibliografía	66
Apéndice	78

RESUMEN

La disminución de la expresión de moléculas clase I del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC-I) en la membrana de células de cáncer cérvico-uterino (CaCu) está estrechamente relacionada con la baja o pérdida de las moléculas Transportadoras Asociadas al Procesamiento de Antígenos 1 y 2 (TAP-1 y TAP-2). Se ha encontrado que los alelos del MHC-I más afectados son los HLA-A y HLA-B.

Las líneas de CaCu CaLo e InBl establecidas en nuestro laboratorio, presentan en su membrana niveles diferentes de expresión de sus alelos MHC-I, encontrándose bajos los alelos HLA-A11 en InBl y HLA-B27 en CaLo. En el presente trabajo se analizó la expresión global y alélica de las moléculas MHC-I, la presencia de ARNm de los Transportadores TAP-1 y TAP-2 en las líneas CaLo e InBl y el efecto de la transfección de TAP's humanos exógenos sobre la expresión de las moléculas MHC-I.

Se encontró que las líneas CaLo e InBl expresan ARNm de TAP-1 y TAP-2, lo cual muestra que la baja expresión de HLA-A11 y -B27 no son debidas a la ausencia de TAP's. Sin embargo para poder determinar si los TAP's propios de las células tenían algún defecto funcional en el transporte de péptidos, las líneas celulares CaLo e InBl se transfectaron con TAP's humanos funcionales. Obteniéndose dos poblaciones transfectadas, una para la línea CaLo y otra para la línea InBl.

Las líneas transfectadas incrementaron de manera global la expresión de moléculas clase I del MHC en la membrana. En contraste en el análisis alélico se observó que HLA-A28(-68) de CaLo y Bw6 en ambas líneas fueron incrementados notablemente en las células transfectadas en comparación con las líneas sin transfectar, mientras que los alelos HLA-A11 y -B27 no fueron afectados en ninguna de las células transfectadas. Al permeabilizar las células y teñir específicamente se observó alta retención intracelular de moléculas MHC-I tanto en CaLo como en InBl comparada con sus poblaciones transfectadas con TAP's.

Estos resultados nos hacen sugerir que la baja expresión de los alelos HLA-B27 y -A11 es debida probablemente a: 1) la deficiencia en la generación de péptidos específicos para estos alelos; 2) la interferencia

de proteínas virales asociadas al CaCu; 3) mutaciones que sufren algunos alelos de clase I en la cavidad donde unen a su péptido específico; y 4) defectos a nivel transcripcional de los diferentes alelos en las células tumorales analizadas.

INTRODUCCION

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) es uno de los principales problemas de salud en mujeres mexicanas. Cada año se registran más de 4,000 muertes por esta enfermedad (1), siendo la primera causa de muerte en la población femenina mexicana. Esta tendencia se ha mantenido desde hace varios años afectando en mayor proporción a la población femenina de 40 a 60 años (2), aunque últimamente el rango de edad en las mujeres afectadas ha bajado, es decir, se han encontrado más casos de CaCu en mujeres jóvenes.

En la actualidad, aún se debate acerca de los mecanismos celulares que conllevan a que las células normales puedan transformarse y desarrollar cáncer, así como de la existencia de mecanismos inmunológicos para llevar a cabo su rechazo.

Hoy en día se sabe que una célula tumoral puede ser eliminada si presenta en su membrana péptidos extraños que sean capaces de desencadenar una respuesta inmune contra ella. Se tienen datos de que esta activación no se da de manera natural, porque las células tumorales ponen en marcha mecanismos para evitar que se presenten en su membrana los péptidos antigenicos necesarios para la activación. Estos mecanismos van desde la ausencia de los péptidos antigenicos, hasta la interferencia de agentes extraños (ej. los virus) en el mecanismo de procesamiento y presentación de antígenos (3).

Las moléculas clase I del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC-I) desempeñan un papel muy importante en la presentación de antígenos para inducir una respuesta antitumor mediada por Linfocitos T CD8⁺. Por lo tanto, algún defecto en las vías de procesamiento y presentación de antígenos, origina la pérdida de expresión por moléculas clase I del MHC en la membrana y ayuda a las células tumorales a evadir al sistema inmune.

Se tiene demostrado por varios grupos de investigación que las células tumorales de CaCu presentan en su membrana una disminución o pérdida total de la expresión de moléculas clase I del MHC. Esta baja expresión de MHC se ha asociado con una baja o ausencia de expresión

de las moléculas transportadoras TAP-1 y TAP-2, las cuales juegan un papel muy importante en la presentación de péptidos endógenos por moléculas clase I del MHC.

En el Laboratorio de Diferenciación Celular y cáncer de la F.E.S. Zaragoza se cuenta con dos líneas celulares de CaCu: CaLo e InBl, las cuales presentan en su membrana niveles diferentes de expresión de sus alelos de moléculas clase I del MHC, al estimular la expresión de los alelos con interferon-g se encontró que solo algunos alelos aumentaban su expresión: HLA-A28 y -Bw6 en la línea CaLo y -Bw6 en la línea InBl pero los alelos HLA-B27 (CaLo) y -A11 (InBl) no aumentaron, estos alelos, solo aumentaron su expresión en presencia de péptidos específicos sintéticos, lo que sugirió una deficiencia en el aporte de péptidos para la estabilización de los alelos HLA-B27 (CaLo) y -A11 (InBl), por lo tanto los principales candidatos de este defecto fueron de los TAP's.

Por consiguiente, el presente trabajo tuvo como finalidad el analizar la expresión de las moléculas clase I del MHC de forma global y alelica en las líneas celulares CaLo e InBl, antes y después de la transfección con los genes que codifica para las moléculas TAP-1 y TAP-2.

MARCO TEORICO

Especificidad del Sistema Inmune

La sobrevivencia de un organismo depende de la habilidad para reconocer, interpretar y responder a los cambios del ambiente; Ésto es llevado a cabo por el sistema inmune, el cual ha desarrollado durante el proceso evolutivo una variedad de mecanismos para detectar e interactuar ante la presencia de un microorganismo. La piedra angular del conocimiento inmunológico es la distinción entre lo propio y lo extraño, las células del sistema inmune identifican estructuras químicas extrañas e inician una respuesta inmune dirigida a su eliminación. La propiedad del sistema inmune de reconocer y distinguir una molécula de otra y responder sólo hacia una de ellas se conoce como especificidad. Una molécula reconocida específicamente por el sistema inmune es un antígeno o inmunógeno.

La antigenicidad es propiedad primordial de macromoléculas complejas como proteínas o polisacáridos de alto peso molecular. Un antígeno tiene regiones reconocidas por el sistema inmune en forma específica e independiente, denominadas determinantes antigénicos o epitopos. La inmunogenicidad es la propiedad de un antígeno que determina la intensidad de la respuesta inmune hacia él. En términos generales, la inmunogenicidad aumenta en forma directamente proporcional a la distancia filogenética entre un organismo y el agente invasor; la respuesta inmune se clasifica como primaria o secundaria, dependiendo de que el organismo ya halla tenido contacto previo con un antígeno o no (3). En una invasión al hospedero, un patógeno puede residir tanto en espacios extracelulares o en el interior de las células.

La mutaciones de proteínas específicas que sufren las células tumorales también pueden ser detectadas por el sistema inmune. Los dos principales mecanismos para poder eliminar patógenos o células transformadas son el sistema innato y el adaptativo o específico(4).

El sistema innato está formado principalmente por células fagocitarias: monocitos-macrófagos, los neutrófilos polimorfonucleares las

células asesinas naturales (NK) y proteínas del complemento que eliminan a antígenos y células tumorales de manera inespecífica (4).

Cuando el sistema innato fracasa en su intento por detener la invasión de patógenos o de la proliferación de las células tumorales, se pone en marcha el sistema inmune adaptativo; caracterizado por la especificidad celular y la generación de memoria para contrarrestar el efecto en un segundo ataque.

Este sistema depende principalmente de dos diferentes vías las cuales son:

A) La Vía de los Linfocitos B y la Respuesta Inmune Humoral.

Esta vía se lleva a cabo por medio de la generación de anticuerpos o inmunoglobulinas que son las moléculas receptoras y efectoras de los linfocitos B (5-7). Las inmunoglobulinas son proteínas formadas por cuatro cadenas polipeptídicas: dos pesadas (H) con un peso de 50 a 70 kDa y dos ligeras (L) con un peso de 23 kDa que, en conjunto, constituyen un monómero de inmunoglobulina (3-5, 7-9).

Los anticuerpos detectan, neutralizan y eliminan a los invasores extraños, bacterias o virus por medio de las proteínas del complemento; también recubren a los patógenos (opsonización) de tal forma que puedan ser fagocitados por los macrófagos o Células Presentadoras de Antígeno (CPA) y seguir la vía de presentación por la Moléculas Clase II del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC-II) (3, 5).

Un anticuerpo es concebido como una proteína producida como el resultado de la introducción de algún antígeno y que tiene la capacidad para combinarse con el antígeno que estimulo su producción (9-10). Para su reconocimiento estos antígenos deben estar dispuestos en sitios accesibles, ya sea, en sitios extracelulares como en el suero, en forma de secreciones del patógeno ó bien el patógeno completo (bacterias y algunos virus) (4).

B) La Vía de los Linfocitos T y la Inmunidad Celular.

El sistema inmune ha tenido la necesidad de desarrollar una vía mediante la cual se pueda combatir un ataque intracelular por medio de indicaciones extracelulares.

Las células T juegan un papel muy importante en el rechazo de trasplantes, en la defensa inmune hacia células infectadas por virus y células que sufren procesos oncogénicos (11-12). Las células T tienen funciones reguladoras y efectoras en la "inmunidad celular" mediante secreciones de moléculas con gran potencial lítico (13-15).

Esta vía se basa en el hecho de que todas las proteínas de patógenos o proteínas propias de la célula que sufrieron alguna mutación, difieren de las proteínas de la célula normal y que éstas diferencias pueden ser reconocidas en cortas secuencias peptídicas que son presentadas en la membrana de la célula enferma o maligna por los linfocitos T y como consecuencia de este reconocimiento se desencadena un ataque para eliminar a la célula o células que muestran en su membrana el péptido extraño (16)

Ontogenia de linfocitos T.

Los linfocitos se desarrollan y diferencian fenotípicamente en el timo a partir de un precursor originado en la médula ósea. Al llegar al timo, dicho precursor se denomina timocito y al madurar, sale del timo como linfocito T (de aquí su nombre "linfocitos derivados del Timo"). Anatómicamente y funcionalmente, el timo se divide en dos regiones: la Corteza, donde ocurren la mayoría de los eventos de diferenciación de los linfocitos T; y la Médula donde ocurre la selección negativa.

Cuando están en Corteza los timocitos tienen en su membrana marcadores característicos; que en humanos se denominados CD1, CD2, CD5, y CD7 (Cluster of Differentiation). En fases tempranas, los timocitos no expresan CD4 o CD8 (timocitos doble negativos). En esta fase, los linfocitos tienen rearrreglos de genes para formar su receptor, el cual está formado por dos cadenas una denominada α y la otra β ; primero

se rearregla en forma aleatoria el gen de la cadena β , la cual se expresa en la superficie del timocito asociada a un polipéptido denominado gp33 y un complejo llamado CD3, el siguiente paso es el rearreglo de la cadena α .

Una vez expresadas las dos cadenas que forman el receptor en la membrana de la célula, se suprime la expresión de gp33 en la membrana y entonces coinciden la expresión del Receptor del Linfocito T (RLT) y del complejo CD3 (este complejo está formado por varias cadenas polipeptídicas conocidas como γ , δ , ϵ , ζ (2x), η . Encontrándose también expresados en la membrana dos marcadores denominados CD4 y CD8. Entonces se tienen timocitos con RLT, CD3, CD8⁺ y CD4⁺, a estas células se les denomina dobles positivas porque expresan ambos marcadores (CD8⁺ y CD4⁺) (3-5, 9).

Los linfocitos dobles positivos entran a un proceso denominado selección positiva, que depende de moléculas del MHC presentes en la superficie de las células epiteliales de la corteza timica, las cuales expresan moléculas clase I y II del MHC (*ver complejo principal de histocompatibilidad*). La selección positiva en el timo define el repertorio de linfocitos T con que ha de contar un individuo (17).

Como los rearreglos del RLT son aleatorios, surgen timocitos con RLT que pueden reconocer moléculas MHC propias (que portan péptidos propios del individuo) y extrañas. En el siguiente paso se seleccionan timocitos con un solo marcador, ya sean CD4⁺ o CD8⁺, y los timocitos dobles positivos mueren por apoptosis.

Más del 95% de timocitos no salen del timo; los timocitos resultantes pasan por un proceso denominado selección negativa que se lleva a cabo en la médula y en la cual se eliminan timocitos que pueden llegar a reconocer moléculas MHC que tienen péptidos propios del individuo para así evitar enfermedades autoinmunes (18-19).

La asociación preferente del RLT ab con una molécula clase I ó II del MHC, durante la selección positiva, determina el fenotipo del linfocito. Los timocitos que reconocen moléculas clase I del MHC permanecen y maduran como CD8⁺ mientras los timocitos que reconocen moléculas clase

II del MHC maduran como CD4⁺. Por lo tanto, en el tejido periférico, las células T pueden ser divididas en dos grandes grupos con base a la expresión mutuamente exclusiva de estas moléculas, definiéndose a los timocitos maduros con receptor CD8⁺ como Linfocitos T Citotóxicos (LTC), los cuales producen citocinas como IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IFN- γ , TNF- α y teniendo como cualidad el poder producir y secretar vesículas que llevan en su interior moléculas con gran potencial lítico y dirigirlas hacia la célula infectada o transformada (célula blanco).

Cuando el RLT reconoce en la membrana de la célula blanco al antígeno extraño (contra el cual fue educado el LTC en el Timo) unido a la molécula MHC específica, elimina a la célula blanco (13-16, 20).

Los timocitos que maduran y mantienen la expresión de CD4⁺ se conocen como linfocitos T inductores ó cooperadores (21). Los linfocitos maduros CD4⁺ después del contacto inicial con el antígeno secretan predominantemente IL-2 y se consideran indiferenciados (CD4⁺ o TH0); con el tiempo estos linfocitos se subdividen en dos poblaciones de linfocitos y se distinguen por las citocinas que producen para amplificar la respuesta contra el antígeno. Los linfocitos T CD4⁺ tipo1 (TH1) secretan principalmente IFN- γ , IL-2 y TNF- β y proliferan en respuesta a IL-2, favoreciendo así la inmunidad celular y los fenómenos inflamatorios. Los linfocitos T CD4⁺ tipo 2 (TH2) secretan IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, proliferan en respuesta a IL-2 ó IL-3 y favorecen la inmunidad humoral; ambas poblaciones secretan IL-2, IL-3 y Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (GM-CSF) (3, 19, 21).

El Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC)

Las moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC), son glucoproteínas codificadas por una región génica ubicada en los brazos cortos del cromosoma 6 humano y codifica para proteínas que se expresan en membrana celular (22), la región se denomina región HLA (Human Leukocyte Antigens), por haber sido inicialmente encontrada en los leucocitos. La nomenclatura original en humanos se basó en su

tipificación serológica; pero al secuenciar sus genes se encontró que el polimorfismo real era mayor del que los sueros tipificadores podían determinar. Las moléculas del MHC son proteínas sintetizadas en el Retículo Endoplásmico (RE) (23).

Por la estructura y de acuerdo a su función en el mecanismo de procesamiento y presentación de antígenos se han dividido en dos grandes clases:

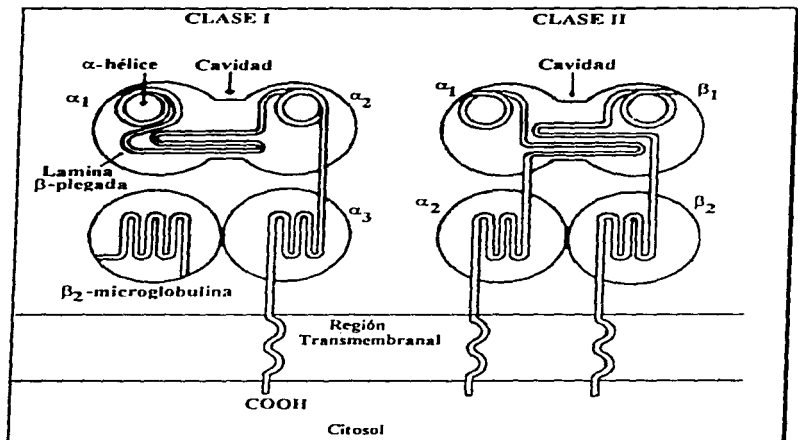
- **Clase I:** Estas moléculas consisten de 2 subunidades: una cadena pesada transmembranal altamente polimórfica con peso molecular de 45,000 kilodaltones (kDa), unida no covalentemente a una pequeña cadena soluble con peso molecular de 13,000 kDa, que es codificada en el cromosoma 15 en el humano, y es conocida como β_2 -microglobulina (β_2 -m), (22).

La cadena pesada se encuentra organizada en tres dominios globulares, a los cuales se les denominan α_1 , α_2 y α_3 , los que sobresalen de la superficie de la célula. Anclando la molécula a la membrana citoplasmática se encuentra una pequeña sección hidrofóbica y cercana a ella se encuentra una corta secuencia hidrofílica, que lleva al extremo carbono terminal hacia el citoplasma (este anclaje es por la región α_3).

Tanto la β_2 -m, como la región α_3 se ensamblan de una manera tal que recuerdan a los dominios de las inmunoglobulinas, en cuanto a su patrón de plegamiento (Fig.1). Los dominios α_1 y α_2 presentan una estructura compuesta de dos α -hélices extendidas, y que se encuentran sobrepuestas sobre una base de péptidos unidos entre sí formando una lámina β -plegada, formándose con ello una pequeña cavidad, la cual es ocupada por un péptido lineal; este péptido es el resultado del procesamiento de proteínas endógenas, y que debe ser presentado a los Linfocitos T CD8⁺ (Fig. 2).

Todas las células nucleadas expresan moléculas de clase I, y en muy poca cantidad en células del cerebro y músculo esquelético (24-26).

Figura 1. Moléculas Clase I y Clase II del Complejo principal de Histocompatibilidad. La figura muestra los dominios extracelulares y porciones transmembranales de las moléculas.



-Clase II: Las moléculas clase II del MHC comparten características con las moléculas de MHC I; son glucoproteínas transmembranales, que están conformadas por dos cadenas polipeptídicas (α y β). La cadena α tiene peso molecular de 34,000 daltones y la cadena β es de 28,000 daltones.

En base a su considerable homología secuencial con las moléculas del MHC I, se ha propuesto un modelo en el cual los dominios α_2 y β_2 , los cuales son los más cercanos a la membrana celular, asumen el patrón de plegamiento de las inmunoglobulinas. Los dominios α_1 y β_1 imitan a los dominios α_1 y α_2 de las moléculas del MHC I; dándose también la formación de una cavidad que se encuentra rodeada por dos α -hélices y una base β -plegada (Fig 1). Las moléculas de clase II se encuentran más restringidas, encontrándose asociadas especialmente a los linfocitos B, Células Presentadoras de Antígenos (CPA's) como son: Células de Lanhergans, dendríticas foliculares y macrófagos.

Su principal función en estas células o al menos la más corroborada, es la de servir como "blanco" de reconocimiento para educar a los linfocitos citotóxicos y auxiliares, para poder desencadenar una respuesta inmune hacia un antígeno específico (3, 27-28)

Mecanismo de Procesamiento y Presentación de Antígenos por la Vía de las Moléculas MHC-I

La asociación antígeno-MHC-I es resultado de la fragmentación de proteínas sintetizadas dentro de la célula tumoral o dentro de las Células Presentadoras de Antígenos, y la subsecuente asociación de péptidos con su sitio de enlace específico en la hendidura de la molécula del MHC-I (29).

El requisito para que una proteína pueda ser procesada y presentada en asociación con moléculas MHC-I, es que su localización sea principalmente en el citosol (Fig 3a); de esta manera, las proteínas vírales o mutadas que son sintetizadas en el citoplasma de una célula, son fragmentadas por un complejo multienzimático denominado proteasoma, los péptidos resultantes son translocados por las proteínas TAP-1 y TAP-2

al interior del retículo endoplásmico, donde se unen por afinidad y especificidad a las moléculas MHC-I (compuestas por las cadenas α y β -m) previamente sintetizadas (30-31).

Cuando la molécula de clase I se encuentra ensamblada junto con su péptido es llevada dentro del RE hacia el Golgi donde es englobada en una vesícula secretoria, y posteriormente transportada a la membrana citoplasmática, en donde la vesícula se fusiona con la membrana y deja expuestas y ancladas las moléculas clase I del MHC exponiendo su péptido a los linfocitos T citotóxicos (30-31).

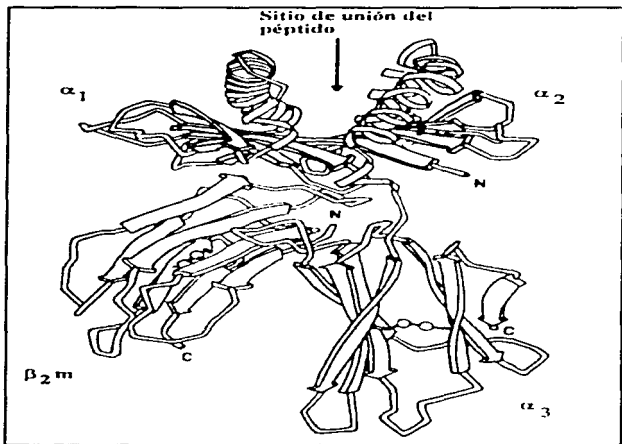
Algunos investigadores han eluido péptidos de bajo peso molecular asociados con moléculas MHC-I purificadas a partir de células infectadas con virus y han encontrado que algunos péptidos corresponden a una clase de antígenos inmunodominantes, debido a que se asocian con alelos particulares de moléculas MHC-I, es decir son capaces de inducir la activación de la respuesta inmune de forma alelo específica (29).

Como anteriormente se mencionó, en el mecanismo de proteólisis de las proteínas y transporte de péptidos al lumen del RE, intervienen proteínas que tienen un papel crucial, y cuyos genes se encuentran en la región donde de los genes que codifican para las moléculas clase II del MHC. Los productos de estos genes son conocidos como subunidades LMP-2 y LMP-7, las cuales forman parte del Proteasoma y los Transportadores Asociados al Procesamiento de Antígenos (TAP-1 y TAP-2) (32).

El Proteasoma

Recientemente, se ha determinado la estructura del proteasoma en eucariontes encontrándose que pesa aproximadamente 650 kDa y está compuesto de 28 diferentes subunidades formando una estructura cilíndrica, la cual se subdivide en cuatro regiones. Cada región está conformada por siete subunidades, las regiones centrales se conocen como subunidades β y las subunidades de las orillas como α (Fig3b); cada subunidad deriva de un gene distinto pesando entre 21-31 kDa formando un complejo cilíndrico. Se han identificado dos genes en la región del

Figura 2: Representación esquemática de una molécula Clase I humana (HLA-A2) basada en la estructura cristalográfica de rayos X, la figura muestra los dominios α_1 y α_2 formando una estructura compuesta de dos α -hélices, encontrándose sobrepuestas sobre una base de péptidos unidos entre sí formando una lámina β -plegada, formándose con ello una pequeña cavidad, la cual es ocupada por un péptido lineal. (Tomado de la Ref. (8).)



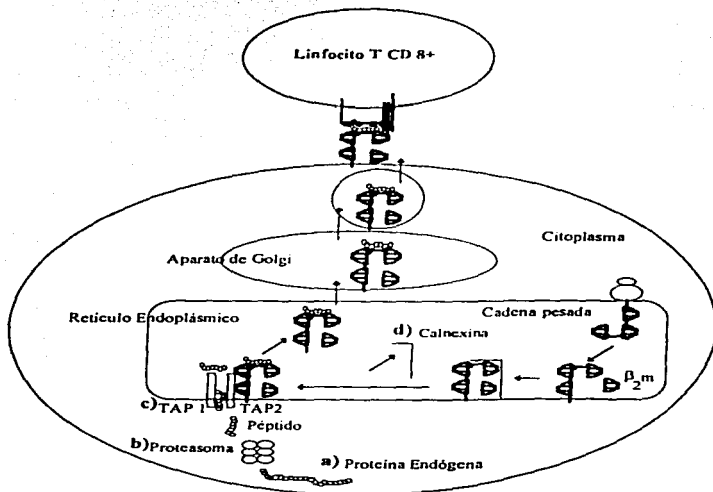
HLA-II, que codifican para dos subunidades del proteasoma conocidas como LMP-2 y LMP-7 (Complejo Polipeptídico de Baja Masa Molecular) (33).

Una de las principales funciones atribuibles a este complejo, es la degradación de proteínas citosólicas, las cuales primeramente son unidas covalentemente a una proteína pequeña llamada ubiquitina, este paso podría incrementar la eficiencia de la generación de péptidos (34). Cuando la proteína es "ubiquinada", gana acceso a la actividad proteosómica enzimática. Este complejo multienzimático degrada selectivamente a proteínas con una cadena lateral anclada a un residuo de lisina expuesta (30). En experimentos *in vitro* con IFN- γ se observan cambios en la actividad proteolítica dando lugar a la generación de péptidos con residuos ácidos en la región C-terminal y favoreciendo la generación de péptidos con región C-terminal hidrofóbica o básica (29).

La degradación de las proteínas en el centro del proteasoma es llevada a cabo por sitios específicos, por ejemplo, se ha observado en antígenos virales, que la expresión por moléculas MHC-I fue drásticamente reducida en la ausencia de LMP-2 y LMP-7 (35). Al parecer una vez que se han generado los péptidos, éstos pueden translocarse hacia los compartimentos del lumen en el RE, para ensamblarse con las moléculas del MHC clase I (36).

El ensamble de moléculas del MHC-I en el RE involucra un alto número de eventos: la degradación rápida de proteínas, el bombeo de péptidos por los TAP's y el ensamble del trímero. Se ha demostrado que el proteasoma interactúa con la membrana del RE y podría interactuar con las moléculas TAP para permitir el transporte y liberación del péptido dentro del RE (37).

Figura. 3. Procesamiento y presentación de antígenos por moléculas clase I del MHC. a) Proteína Endógena, b) Proteasoma, c) Proteínas Transportadoras asociadas al Procesamiento de Antígenos (TAP-1 y TAP-2), d) Calnexina, molécula chaperona.



Los Transportadores Asociados al Procesamiento de Antígenos: TAP-1 y TAP-2.

Se ha observado que el proceso más importante en la translocación de los péptidos citoplasmáticos al RE y al *cis*-Golgi ocurre por medio de una proteína que ha sido denominada "Transportador Asociado al Procesamiento de Antígenos" (TAP) (38). La distribución subcelular de este transportador por microscopia inmunoelectrónica y análisis confocal en RE y *cis*-Golgi es consistente con la localización de moléculas clase I del MHC listas para el ensamblaje con el péptido (39).

El transportador está formado por dos proteínas homólogas llamadas TAP-1 y TAP-2 con un peso de 76 kDa y 70kDa, respectivamente. Estas proteínas están asociadas de forma no covalente, cada proteína tiene 6 dominios transmembranales y un dominio dependiente de ATP, el cual se encuentra orientado hacia el citoplasma (Fig 4) (22, 40). Los genes que codifican para estas dos proteínas con actividad transportadora de antígenos procesados, son homólogos a la familia de genes que codifican para proteínas que median el transporte de compuestos de bajo peso molecular a través de las membranas (Familia de Transportadores ABC dependientes de ATP) (22, 29)

Después de que el péptido sale del proteasoma, es liberado cerca de los TAP's para poder ser bombeado al RE. La unión del péptido al TAP es independiente de ATP, pero en la traslocación del péptido al RE, es requerida la hidrólisis del ATP (Fig 3c) (41).

La importancia de los TAP's en la vía de procesamiento y presentación por moléculas de clase I, fue determinado mediante análisis de ensamble, transporte y presentación de antígeno en líneas celulares que carecen de TAP's (42) o que expresan formas no funcionales de TAP-1 ó de TAP-2 (43), en las cuales se observa una reducción drástica en la superficie celular de moléculas clase I del MHC, y que son defectuosas en el transporte y presentación de antígenos. Estas células al ser transfectadas con TAP's aumentan la expresión de moléculas clase I del MHC en membrana (44).

Los TAP's muestran dos diferentes tipos de selección de los péptidos para que puedan ser accesibles al MHC-I: uno es específico para la medida del péptido y el otro es específico para la secuencia del péptido (41).

Se ha demostrado en ensayos *in vitro* que este transportador muestra una preferencia a transportar péptidos de entre 8 y 15 residuos aminoacídicos, lo que concuerda con la medida de los péptidos que se unen a las moléculas de MHC-I (41). Para tratar de identificar la preferencia del transportador por un péptido determinado se ha podido indentificar el efecto del aminoácido C-terminal del péptido en su transporte, en donde se encontró que el TAP de ratón muestra preferencia por péptidos que contienen residuos C-terminales hidrofóbicos (alifáticos o aromáticos) (45); mientras que el TAP humano no muestra preferencia clara por algún residuo C-terminal en particular (46).

Algunas investigaciones se han enfocado a tratar de encontrar los sitios específicos de los péptidos para poderse unir al TAP. Otros investigadores han utilizado ensayos de unión de péptidos para medir la afinidad por el TAP de más de 250 péptidos y variantes de péptidos, en los datos obtenidos se han encontrado sitios específicos de unión: los grupos de aminoácidos hidrofóbicos en la posición 3 (P3) del péptido eran preferidos por el TAP, también los esiduos hidrofóbicos o cargados en la posición P2 (47-48).

Se han tratado de identificar algunos sitios de unión de péptidos en los TAP. Los resultados de los experimentos con péptidos fotomarcados mostraron que el TAP-1 y el TAP-2 fueron marcados por los péptidos fotoreactivos (49), sugiriéndose que el sitio de unión del péptido esta formado en conjunto por elementos de TAP-1 y TAP-2 (36). Los TAP's expresados separadamente no mostraron fotomarcado, esto indica que ambas subunidades deben estar presentes para que el sitio de unión del péptido sea funcional.

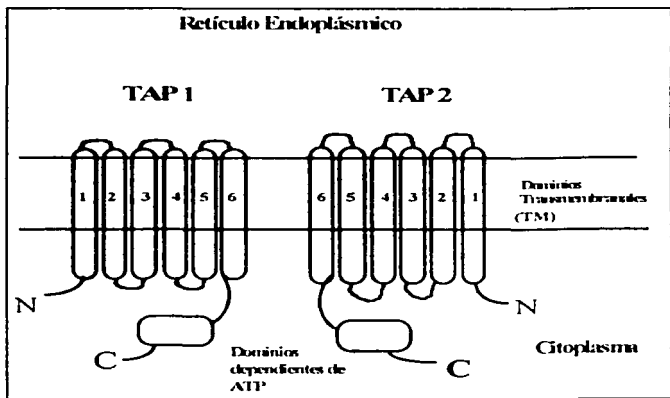
Los aminoácidos importantes de unión en los TAP's humanos (denominados "motifs") para péptidos de 9 aminoácidos han sido propuestos con base a los puntos de afinidad y que son los residuos N-

terminales y un residuo carboxilo-terminal, los cuales corresponden a los "motifs" de la mayoría de los alelos de las moléculas de Clase-I. Estos alelos de Clase-I que prefieren un aminoácido, predicen la unión con el TAP, como lo es la prolina en la posición 2 para epítopes de HLA-B7, en la cual los péptidos pueden ser preferencialmente transportados (47-50).

Recientemente se encontraron cuatro sitios de unión de péptidos los TAP's humanos, dos en el TAP-1 y dos en el TAP-2. Estos sitios de unión se encuentran localizados en regiones de las cadenas transmembranales (TM) conocidas como TM-6 y TM-5 de ambos TAP's (Fig.4) y en sus continuaciones extramembranales (51). Estos datos son consistentes con un modelo de TAP's en el cual los segmentos TM forman un poro en la membrana, lo cual ha sido observado en otros transportadores ABC, proteínas de resistencia a multidroga y en canales de cationes (52).

El péptido podría ser unido por la entrada citosólica del poro, el cual sería rodeado por los restantes segmentos TM, permitiendo que múltiples regiones entren en contacto con el péptido simultáneamente (51). Se han realizado algunos experimentos de co-inmunoprecipitaciones en donde se encuentra una asociación física de TAP-MHC-I, dándose la posibilidad de asegurar el transporte y unión de péptidos a las moléculas Clase-I (53-54). Estos estudios enfatizan la importancia de la asociación TAP-MHC-I para la maduración y expresión de moléculas clase I del MHC.

Figura 4. Moléculas Transportadoras Asociadas al Procesamiento de Antígeno TAP-1 y TAP-2. El heterodímero tiene dos sitios dependientes de ATP que están orientados hacia el citosol, cada proteína tiene seis dominios transmembrales (TM).



Las Moléculas Chaperonas

El ensamble adecuado de la cadena pesada con la β_2 -m parece ser orquestado por proteínas chaperonas residentes del RE. Mientras no hay unión con el péptido la molécula de clase I está asociada por medio de la cadena pesada a una molécula chaperona llamada Calnexina con peso de 90 kDa, la cual se asocia con las cadenas pesadas recién sintetizadas de clase I, facilitando el ensamble de la cadena pesada con la β_2 -m y ayuda a que se adquiera el plegamiento y estructura de la molécula de MHC-I.

La calnexina se disocia cuando la molécula MHC-I se une a su péptido (Fig 3d) (55). Se conocen otras moléculas chaperonas como BiP, calreticulina y algunas proteínas de choque térmico residentes del RE (56). Estas chaperonas previenen la formación de agregados de cadenas pesadas, ya que interaccionan con los carbohidratos de unión N-terminal y con las superficies hidrofóbicas expuestas de la cadena pesada deficientemente ensamblada. Se ha observado en los precipitados de TAP's-MHC-I una glucoproteína no identificada de 48 kDa (53); este dato sugiere que esta proteína adicional puede estar involucrada en el ensamble de las moléculas del MHC-I y su maduración.

Polimorfismo y Especificidad en la Presentación de Péptidos

El MHC-I ha evolucionado en términos de variabilidad entre los individuos, lo cual se muestra con un sistema altamente polimórfico basado en la presencia de alelos múltiples.

Parte del polimorfismo del MHC precede a la divergencia de las especies, lo que sugiere que es el resultado de mutaciones acumuladas a través de millones de años de evolución, pudiéndose encontrar más de 100 alelos en la población humana. Las moléculas clase I del MHC se expresan en forma codominante, uno de origen paterno y otro de origen materno, es decir, un individuo puede expresar dos moléculas de cada loci (HLA-A, -B, -C), por lo tanto, cada individuo presenta 6 alelos diferentes (22, 26).

La mayoría de los residuos polimórficos de las moléculas clase I se localizan en las α -hélices y en el piso de β -plegados que forman el nicho de unión de péptidos. Las orillas de la cavidad de la moléculas clase I del MHC se encuentran cerradas. Los nuevos avances de análisis estructurales han revelado que los residuos N- y C- terminales del péptido están cubiertos o sujetos a las orillas de la cavidad mediante puentes de hidrógeno, los cuales se encuentran en residuos de aminoácidos que son constantes en todas las formas alélicas de las moléculas MHC-I (57).

En adición a la interacciones de los extremos N- y C- terminal del péptido con los extremos de cavidad en las moléculas, las uniones alélicas específicas son conferida principalmente por numerosos puentes de hidrógeno formados en la cavidad de la molécula MHC y a lo largo del péptido. Los grupos de aminoácidos de la cavidad que forman los enlaces específicos se denominan "pockets" estas conformaciones se encuentran en el piso de la cavidad formado por las cadenas β -plegadas, y en las paredes de las α -hélices de la cavidad. Los "pockets" varían en profundidad, orientación y naturaleza química dependiendo del alelo lo que le confiere la capacidad de poder unir un péptido particular (Fig. 5) (58).

Los péptidos también presentan "motifs" que están orientados hacia la cavidad de las moléculas de clase I y son específicos para unirse a un alelo específico, los "motifs" del péptido consisten en dos o a veces más puentes de hidrógeno, sólo los péptidos con los "motifs" característicos para cada alelo y del tamaño adecuado son capaces de estabilizar la molécula clase I correspondiente.

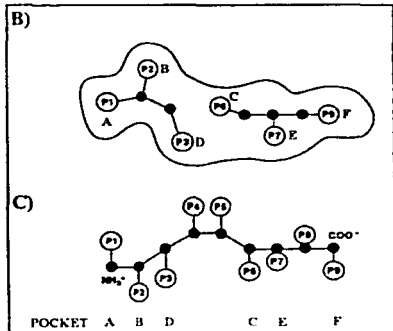
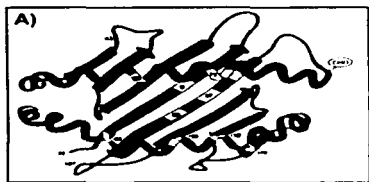
Los otros aminoácidos que forman el péptido se asocian en forma laxa, lo cual explica porqué, fuera de los "motifs", puede haber una gran variabilidad en los aminoácidos presentes en los péptidos inmunogénicos (36, 58); por lo tanto, diferentes péptidos pueden unirse a un mismo alelo de moléculas MHC y así se asegura que siempre se presenten péptidos propios, de virus o péptidos provenientes de mutaciones que sufra la célula.

Los péptidos que se unen a moléculas Clase I o Clase II del MHC pueden tener diferente tamaño: de acuerdo a análisis de cristalografía se

ha determinado que para las moléculas clase I el tamaño de los péptidos es de entre 8 y 12 aminoácidos, mientras que los péptidos que se unen a moléculas clase II son de un tamaño mayor de entre 14 y 18 aminoácidos (59).

Un aspecto fundamental del reconocimiento del antígeno por las células T auxiliares y T citotóxicas, es que el linfocito se restringe a reconocer a un sólo péptido. Estas combinaciones, asociadas con la amplia diversidad de péptidos que pueden formarse, hacen que el péptido pueda ser reconocido, sólo si está unido a un producto alélico característico del MHC. Este fenómeno es llamado Restricción por MHC, las bases moleculares del reconocimiento del antígeno restringido por MHC mediante las Células T, han sido demostradas por estudios paralelos sobre la estructura del Receptor del Linfocito T (60).

Figura 5. A) Vista superior de la cavidad de unión del péptido de una molécula HLA-A2. Los números muestran los aminoácidos "motifs". B) Representación de la conformación del péptido. La figura muestra los aminoácidos "motifs". C) Representación lateral de la orientación de las cadenas laterales del péptido SEV-9. Los residuos P1, P4 y P5 del péptido sobresalen de la cavidad y son factibles de ser reconocidos por el linfocito CD8⁺. Los círculos negros representan el esqueleto de C del péptido, y los círculos abiertos representan las cadenas laterales del péptido. A) Tomado de ref. 58; B), C) Tomado de ref. 59).



Cáncer Cérvico-Uterino (CaCu)

En México la enfermedad neoplásica que ocupa el primer lugar de mortandad es el Cáncer Cérvico-Uterino (CaCu), que además tiene una alta incidencia en mujeres jóvenes en etapa reproductiva (2).

Desde el punto de vista epidemiológico hace ya tiempo que se estableció que el carcinoma cervical es una enfermedad de transmisión sexual. La edad de inicio de la actividad sexual y el número de compañeros sexuales durante la vida son los factores de riesgo independientes más importantes para el padecimiento.

Los estudios epidemiológicos realizados en la década de los 60 y 70 fueron de gran interés porque demostraron una correlación entre la seropositividad para el virus del Herpes simple (HSV) y el carcinoma de cérvix. El entusiasmo inicial decayó cuando no pudo demostrarse la presencia de ADN viral en la mayoría de los carcinomas y por la falta de pruebas convincentes de una mayor frecuencia de cáncer en estudios prospectivos (61).

A) El Virus del *Papilloma* humano (HPV) en relación al Cáncer Cérvico-uterino.

El CaCu se encuentra asociado en el 90% de los casos a una infección de tipo viral por el HPV tipos 16 y 18 a los que se les ha denominado grupo de alto riesgo de infección (62-64). Se ha tratado de identificar la relación que existe entre las diferentes formas de evasión del sistema inmune que tienen algunos virus y su relación con la progresión de enfermedades como el cáncer (62, 65-67).

El CaCu se ha asociado con etiología viral, estudios realizados desde 1966 encuentran relación de la presencia de algunos virus con este tipo de cáncer. Recientemente, se han descrito algunas evidencias moleculares, como es la presencia de antígenos virales en células de carcinoma cérvico-uterino, lo que apoya la hipótesis, de que el desarrollo de esta neoplasia se relaciona estrechamente con la transformación celular por infección con virus (69-70)

Entre los principales agentes virales relacionados con el desarrollo de neoplasias se han encontrado: HPV, el Virus del Herpes Simple (HSV) y en menor grado el Citomegalovirus (HCMV). La mayoría de los estudios actuales consideran que el HPV es el principal agente etiológico del CaCu, además se ha propuesto un papel de sinergia entre el HSV con HPV en el desarrollo de la neoplasia (67, 69). Estudios de casos recientes muestran un mayor riesgo global de cáncer cérvico uterino en las mujeres seropositivas para el HSV (61).

De la familia de los HPV se han clasificado más de 60 tipos en el humano (HPV-1, HPV-60) de los cuales 23 pueden infectar al hombre y a la mujer, pero los que más frecuentemente se han detectado son los HPV's 11, 16, 18 y 31 que están asociados con la transformación de células epiteliales del cérvix, así como las del cuello del útero produciendo lesiones denominadas NIC (Neoplasia Intraepitelial Cervical) que pueden progresar a carcinomas, en la mayoría de las lesiones se a confirmado la etiología mediante estudios citológicos e histológicos (70-76). Los tipo 5 y 8 están comúnmente asociados con epidermodisplasias que pueden progresar a cáncer de piel (77) (Tabla 1).

Las heridas pequeñas y las abrasiones exponen a las células basales a los HPV, que son las más susceptibles a la infección en el epitelio escamoso estratificado. Los HPV se unen a diferentes tipos de células epiteliales; lo que sugiere que el tropismo no se debe a receptores de superficie de un solo tipo celular.

Los virus que pertenecen a la familia del *Papilloma* tienen una estructura compuesta por una doble cadena de ADN que contiene aproximadamente 8,000 pares de bases. El genoma viral codifica para dos clases de proteínas tempranas (en inglés: early proteins) llamadas E1 y E2, cuya función es la de regular la replicación del ADN y ARN viral; las proteínas que intervienen en la transformación celular son E4, E5, E6 y E7. Otra clase de proteínas codificadas se denominan "tardías" (en inglés: late proteins) llamadas L1 y L2, las cuales son requeridas para el ensamblaje de partículas virales infecciosas de la cápside (67, 77-78).

Tabla 1. Tipos de HPV en varias lesiones.

Tipo de lesión	Tipo de HPV
Piel	
Verrugas	1,4,10,26,29,38,41,49,57,63,85
Quiste epidermoide	60
Verruga de Carnicero	2,7
Epidermodisplasia verruciforme	2,3,10,5,8,9,12,14,15,17,19-25, 35, 47,50
Cambios bowenoides	16,34,35
Carcinoma de células epidermoides	5,8,14,17,20,41,47
Genital	
Condiloma acuminado	6,11,42,44,51,53,55,58,67
Neoplasia intraepitelial	6,11,16,18,26,30,31,33,35,39,40,42,43,45,52,52,56-59,61,62,64
Carcinoma	6,11,16,18,31,33,35,39,45,51,52,54,56,68,66
Tumores de cabeza y cuello	
Papilomatosis	2,6,7,11,32,57
Hiperplasia epitelial focal	13,32
Carcinoma	2,6,11,16,18,30

La proteína E1 se une a la ADN α -polimerasa e inicia la replicación del ADN; E2 es un factor de control transcripcional con propiedades de unión al ADN; E5 es un activador del Receptor para el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFr) y del Receptor del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGFr), inhibe la acidificación de endosomas y regula negativamente la expresión de moléculas clase I del MHC (79).

El ADN viral existe en un estado episomal en la mayoría de las verrugas y displasias del cérvix. Sin embargo, en los carcinomas el genoma viral suele integrarse a los cromosomas de la célula huésped. En la transformación maligna relacionada con el HPV, el ADN viral se integra al ADN celular, lo que resulta en la ruptura de grandes fragmentos del genoma viral, perdiéndose normalmente los genes L1 y L2 y algunos genes tempranos (E1 y E2), quedando solamente los segmentos E6 y E7 como zonas de apertura de lectura frecuentemente encontrados en carcinomas (61, 72, 79).

Los determinantes antigénicos que son compartidos por todos los HPV's probablemente están localizados en la superficie interna del virión (estructura infectante del virus) y están disponibles como inmunógenos después de la fragmentación de la capsida.

Mediante pruebas inmunoquímicas que emplean suero específico se ha demostrado el patrón de distribución del antígeno de las partículas virales. Finalmente, la detección del ARN viral en algunos tipos de cáncer y líneas celulares derivadas de CaCu hace sugerir que para que se manifieste este cáncer deben expresarse continuamente los genes virales transformantes u oncogenes del HPV; en particular E4, E6, E7 y L1 que están involucrados en la replicación del virus y en la transformación celular (74, 79).

Los mecanismos mediante los cuales los HPV por si solos o junto con otros cofactores actúan para transformar células epiteliales anogenitales no han sido definidos; sin embargo, se ha demostrado que la acción viral altera el comportamiento celular mediante la activación de genes celulares por mutación o carcinogénesis de manera similar a la producida por sustancias químicas (70).

B) Inmunidad humoral hacia CaCu.

Actualmente se tiene un progreso sustancial en el entendimiento de la inmunidad humoral hacia neoplasias relacionadas etiológicamente con HPV. Varios investigadores han confirmado la presencia de anticuerpos

contra proteínas E7 de HPV-16 y HPV-18 encontrados frecuentemente en suero de pacientes con cáncer cervical (80-82).

Paralelamente, se han detectado anticuerpos contra la proteína E2 de HPV-16 y HPV-18 (83), así como de E4 (77) y E6 (84) de HPV-16 en suero de pacientes con CaCu. La presencia en suero de anticuerpos contra la E7 del HPV-16 se asocia en forma estrecha con un mayor riesgo de cáncer cervicouterino y se correlaciona con el estadio de la enfermedad (81). Estos estudios han permitido sugerir que algunas de estas proteínas virales son inmunogénicas y pueden representar los blancos específicos de la vigilancia inmune hacia tumores relacionados con HPV (87).

Sin embargo, el papel potencial de inmunoglobulinas específicas hacia HPV-16 o HPV-18 como indicadores de infecciones relacionadas al virus o como signo de inicio de cáncer, ha sido controvertido, ya que la variedad de estos resultados puede ser debida a los diferentes tipos de antígenos estudiados, los diferentes métodos de detección empleados, la selección de las muestras usadas, la edad de la paciente, el nivel de estrógeno/progesterona, el hábito de tabaquismo y la cantidad de muestra de inmunoglobulina sérica hacia HPV. Otro factor que influye es que la recurrencia de la enfermedad a menudo se relaciona con tipos adicionales de HPV, implicando que múltiples virus residen de forma local y que virus adicionales pueden contribuir a una nueva enfermedad y por tanto, a la expresión de otros antígenos. Debido a estas variaciones, los resultados serológicos deben ser interpretados con precaución (85-86).

C) Inmunidad Celular hacia CaCu

La respuesta inmune mediada por células, ha sido demostrada en lesiones de piel con infección de HPV 5 y 8 (84) y en respuesta linfoproliferativa *in vitro* (87-88).

El entendimiento de la inmunidad mediada por células hacia infecciones de HPV ha sido facilitado por la identificación de epitopes provenientes de HPV que se unen a las moléculas Clase I y II del MHC

(87). Por otro lado varios grupos han identificado epitopes para linfocitos T CD4⁺ en proteínas de HPV (89).

Al encontrarse muy relacionada la presencia de HPV con neoplasias cervicales, y aunque el desarrollo de malignización es probablemente multifactorial, se ha tratado de identificar la relación que tiene este tipo de virus con la interferencia en el procesamiento y presentación de antígenos en el contexto de Moléculas clase I del MHC para poder evadir al sistema inmune.

Estudios enfocados hacia la respuesta inmune local, en tejido cervical infectado, han demostrado una disminución en el número de células presentadoras profesionales en verrugas producidas por infección con HPV; Además se ha demostrado que la densidad de células de langerhans y macrófagos es reducida en comparación con el tejido normal de pacientes con Ca Cu y que esta anomalía parece estar correlacionada con el estadio de la enfermedad

Se han encontrado alteraciones muy significativas en la expresión de la moléculas de clase I y clase II en lesiones intraepiteliales de cérvix así como en carcinomas y que la prevalencia de HPV tipo 16 y 18 se incrementa con la severidad de la lesión (90-92). Una característica importante observada en estudios realizados en tumores primarios y sus propias metástasis es la disminución de moléculas clase I del MHC en la membrana celular y de células inmunocompetentes infiltrantes conforme aumenta el estadio invasivo del tumor (93).

También se han publicado que en cáncer cérvico uterino algunos alelos de moléculas clase I son más afectados en su expresión que otros, lo cual es atribuible a que posiblemente los alelos regulados negativamente en las células neoplásicas presentan antígenos que pueden ser reconocidos por el sistema inmune (89, 94).

Se han dado a conocer estudios de diferentes tipos de cáncer en donde se encuentra que la pérdida de expresión de moléculas clase I del MHC está relacionada con la pérdida de expresión de TAP-1 y esto a su vez con el grado de malignidad (95).

En algunos caso el TAP-1 muestra mutaciones (un cambio de un aminoácido: Arg por Gln) y que al ser transfectada la línea celular con un TAP-1 normal se observa un restablecimiento de moléculas clase I en la membrana celular (96). También se ha reportado en cáncer de prostata bajas cantidades de ARNm para el TAP-2 (97).

También se han encontrado otros tipos de carcinomas humanos en donde se ha detectado una baja expresión de ARNm para las proteina TAP-1 y TAP-2 junto con la baja expresión de las subunidades del proteasoma LMP-2 y LMP-7 (98).

En carcinomas cervicales se ha publicado que la baja expresión o pérdida total de moléculas de clase I del MHC se encuentra estrechamente relacionada con la baja expresión o pérdida de TAP-1 y que en la mayoría de los casos esta regulación negativa es selectiva hacia algún alelo en particular encontrándose normalmente los alelos del HLA -B y -A y menos afectados los alelos -C, y que la pérdida de expresión de TAP-1 y de MHC-I es más notoria conforme aumenta el grado de agresividad de la enfermedad (99-101), también se ha observado que la regulación negativa de la expresión de moléculas clase I del MHC en carcinomas cervicales aparentemente es controlada post-transcripcionalmente, y esto se ha tratado de relacionar con el papel que pueda llevar cabo el HPV-16 (102).

Por otro lado, en el laboratorio de Diferenciación Celular y Cáncer de la F.E.S. Zaragoza se cuenta con dos líneas celulares de Carcinoma Cérvico-uterino denominadas CaLo e InBl las cuales fueron derivadas de dos diferentes pacientes, CaLo se estableció de un carcinoma epidermoide de CaCu estadio clínico IIB e InBl de un carcinoma epidermoide de CaCu estadio clínico IVA (103); y mediante pruebas moleculares se ha encontrado la presencia de Papilomavirus 18 en ambas líneas. Asimismo, a estas líneas se les tiene tipificado su haplotipo de histocompatibilidad Clase I (Tabla 2).

Tabla 2. Haplótipo de histocompatibilidad MHC-I en las líneas de CaCu CaLo e InBl.

Línea celular	Alelos expresados de HLA-I
CaLo	HLA-A26 HLA-A28 (-A68) HLA-B27 HLA-B78 HLA-Bw6 HLA-Bw4 HLA-Cw1 HLA-Cw5
InBl	HLA-A11 HLA-Aw33 HLA-B48 HLA-B39 HLA-Bw6 HLA-Cw3 HLA-Cw4

HIPOTESIS

Es conocido que la baja expresión de moléculas clase I del MHC en cáncer cérvico-uterino (CaCu), está estrechamente relacionada con la pérdida o deficiencia en la expresión de las moléculas Transportadoras Asociadas al Procesamiento de Antígenos (TAP-1 y TAP-2), las cuales proveen de péptidos a las moléculas clase I del MHC para su ensamble y presentación.

Por otro lado, se cuenta con las líneas de CaCu CaLo e InBI que tienen una expresión alélica diferencial de sus moléculas clase I del MHC en membrana, en donde los alelos HLA-B27 en CaLo y HLA-A11 en InBI son pobremente detectados, y su expresión es incrementada en presencia de péptidos sintéticos y a una temperatura de 26°C, sugiriendo una deficiencia en el aporte de péptidos mediado por TAP's. En consecuencia se espera poder incrementar la expresión de las moléculas clase I del MHC y en particular la de los alelos B27 (CaLo) y A11 (InBI) en la membrana celular mediante el uso de TAP's humanos funcionales.

OBJETIVO GENERAL

Analizar la expresión de moléculas clase I del MHC en las líneas celulares de CaCu CaLo e InBI antes y después de la transfección con las Moléculas Transportadoras Asociadas al Procesamiento de Antígeno TAP-1 y TAP-2

OBJETIVOS PARTICULARES

Analizar la expresión de los TAP's en las líneas celulares CaLo e InBI.

Determinar el papel de los TAPs humanos funcionales exógenos sobre la expresión de moléculas Clase I del MHC en las líneas CaLo e InBI.

MATERIAL Y METODO

Cultivo de Líneas Celulares

Las líneas celulares se cultivaron de manera individual en botellas de 175 cm² (Nunclon, Dinamarca) con 200 ml de medio RPMI-1640 suplementado con Suero Fetal de Bovino (SFB) (Apéndice 1) Los cultivos celulares se mantuvieron en una incubadora (Forma Scientific, Ohio USA) al 5% de CO₂, temperatura de 37°C y una atmósfera de humedad a punto de rocío (104), estas condiciones se utilizaron siempre para todos los cultivos.

Obtención de Medio Condicionado de Híbridomas (MC)

Los anticuerpos utilizados para la detección de moléculas clase I del MHC fueron obtenidos a partir del Medio Condicionado (MC) por el cultivo de los híbridomas PA2.1, A11.1M, B27 M1 y SFR8-B6 (American Tissue Cell Culture, Tabla 3). El híbridoma W6/32, que reconoce la porción constante de todas las moléculas clase I del MHC, fue donado por el Dr. Gerld Moldehauer del Centro de Investigación en Cáncer en Heidelberg, Alemania. Los híbridomas se cultivaron de manera individual en botellas de 175 cm² (Nunclon, Dinamarca) con 200 ml de medio RPMI-1640 suplementado con SFB. Bajo las condiciones antes descritas

Después de 4 o 5 días de cultivo se efectuó la resiembra, centrifugando a 500 g. La suspensión celular durante un tiempo de cinco minutos. Una vez realizado esto, se colectó el MC en un recipiente estéril y ámbar para evitar el paso de la luz. Los botones celulares fueron resuspendidos con el medio de cultivo, se cuantificó la viabilidad celular con azul de tripano (Sigma, USA), (el cual tiene la propiedad de teñir las células que han sufrido ruptura de su membrana plasmática), y un hemocitómetro. Se sembraron aproximadamente de 1x10⁶ a 2x10⁶ células vivas en botellas de 175 cm² (Nunclon, Dinamarca) (105).

TABLA 3. Alelos presentes en las líneas celulares CaLo e InBl.

HIBRIDOMA	ALELO QUE RECONOCE	LINEA CELULAR
W6/32	PORCION CONSTANTE DE LAS MOLECULAS MHC-I	CaLo e InBl
PA2.1	HLA-A28 (-68)	CaLo
A11.1M	HLA-A11	InBl
B27.M1	HLA-B27	CaLo
SFR8-B6	Bw6	CaLo e InBl

*el anticuerpo PA2.1 cruza con el alelo HLA-A68

Criopreservación de las Líneas Celulares

Con la finalidad de preservar de manera indefinida las líneas celulares de CaCu, hibridomas y los clones transfectados de las líneas celulares se procedió a realizar la técnica de criopreservación. Esta se llevo a cabo colectando las células que se encontraban en fase de crecimiento exponencial. Las células se colectaron en un vial de criopreservación (Nalgene, USA) a una densidad de $1-2 \times 10^6$ cels/ml en 1 ml de medio de congelación (Apéndice 2). Después de que las células entran en contacto con el medio de congelación los viales se colocaron a -70°C y posteriormente fueron congelados a -190°C en nitrógeno líquido (105).

Transfección de la Línea CaLo e InBI con TAP-1 y TAP-2 utilizando el Método de Fosfato de Calcio.

La preparación del ADN para la transfección se realizó de la siguiente manera: se colocaron en un tubo cónico de 15 ml 119 µl de agua estéril en seguida se colocaron 100 µl de plásmido pCDM8 que contenía el ADNc (ADN complementario) de TAP-1 y TAP-2 junto con el gen de resistencia para Neomicina G-418.

Enseguida se adicionaron 31 µl de CaCl₂ 2M (Apéndice 3) y 250 µl de Solución amortiguadora de HBSP 2X (Apéndice 4), y lentamente se llevó a cabo una mezcla suave.

La mezcla se dejó precipitar durante 15 min a temperatura ambiente y al final de este tiempo la solución se tornó ligeramente turbia.

A continuación el precipitado fue mezclado por pipeteo suave y se adicionó de manera lenta en la caja de cultivo que contenía las células. La transfección se llevó a cabo con un número aproximado de 3×10^5 células adheridas al sustrato. Las células se incubaron con este medio durante 4 h. Después de los primeros 10 min de incubación, se examinaron las células en un microscopio invertido para detectar un fino precipitado visible encima de las células.

Después de lavar a las células con medio RPMI-1640, se colocaron en medio suplementado (Apéndice 1) durante 48 h en una incubadora con las condiciones de humedad, CO₂ y temperatura antes descritas. Después para seleccionar las células que incorporaron el plásmido se cultivaron en medio suplementado (Apéndice 1) adicionándose el antibiótico Geneticina (G-418) (Apéndice 5) (106).

Obtención y Transferencia de ARNm para TAP-1 Y TAP-2

Para detectar el nivel de expresión de TAP-1 y TAP-2 en las células, se utilizaron las células CaLo e InBI sin transfectar y transfectadas con TAP's. La línea celular HeLa se utilizó como control positivo de la expresión de TAP's.

La extracción de ARNm se realizó con ayuda de un kit ARNid[®] PLUS (BIO Inc,USA) , se colectaron 2×10^7 células de cada línea, a cada botón celular se le agregó 0.5 ml de solución de lisis conteniendo tiocionato de guanidina y se resuspendió. En seguida se le agregó 0.5 ml de una solución de fenol ácido y se agitó en un vortex. Se le adicionó 0.5 ml de cloroformo-isoamílico y se resuspendió fuertemente, se colocó la mezcla en hielo durante 15 min .

Pasado este tiempo se centrifugó por 20 a 2500 g a una temperatura de 4°C. Se recuperó con cuidado la fase superior acuosa en la cual se encuentra el ARN disuelto. Se adicionó nuevamente medio volumen de cloroformo-isoamílico, se centrifugó medio minuto y se recuperó la fase superior. Se adicionaron 20 μ l de Matriz para ARN, se resuspendió con una agitación vigorosa en vórtex y se incubó a temperatura ambiente por 10 min.

Transcurrido el tiempo se centrifugó un minuto a 2500 g y se desechó el sobrenadante. Al botón de matriz se le adicionaron 500 μ l de solución de lavado, se resuspendió la matriz y se centrifugó a 2500 g. Se eliminó el sobrenadante repitiéndose 2 lavados más.

Terminando los lavados se resuspendió la matriz en 30 μ l-100 μ l de agua estéril tratada con Dietil Pirocarbonato (DEPC) (Apéndice 6). Se incubó a 56°C por 10 min, se centrifugó para recuperar la fase acuosa, se repitió el lavado con agua recuperándose la fase acuosa nuevamente y finalmente se procedió a cuantificar a 260 y 280 nm el ARN y proteínas respectivamente. (106).

Se tomaron de 20 a 30 μ g de ARN preparado en Solución amortiguadora para ARN (Apéndice 7), y se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% con formaldehído (Apéndice 8) utilizando Solución Amortiguadora de Electroforesis (RB) 1X (Apéndice 9) preparado en agua tratada con DEPC. También se incluyeron en la electroforesis los pesos moleculares control. Terminada la electroforesis, se observó el patrón de bandeo del gel a través de un proyector de luz UV.

Se colocó el gel en una cámara adecuada, sobre 3 tiras de papel Whatman humedecidas previamente 10 min en Solución Amortiguadora de

Citratos (SSC) 2X (Apéndice 10), se eliminaron las burbujas de aire que se forman entre el gel y el papel, se colocó una membrana de nylon sobre el gel previamente humedecida con agua durante 5 min y se eliminaron las burbujas de aire.

Se colocaron encima 4 pedazos de papel Whatman y papel absorbente necesario (una altura aproximada de 4 cm). Se colocó una placa de vidrio sobre los papeles absorbentes y un peso de 500 g. Se dejó la transferencia durante toda la noche. Terminada la transferencia, se removió el papel absorbente y el filtro. Sobre el nylon se marcó con un lápiz la posición de los carriles, se lavó la membrana con SSC 2X, se dejó secar entre dos papeles filtros secos.

Se horneó durante 2 h a 80°C, después se procedió a prehibridar con solución de hibridación (Apéndice 11) de 2-4 h a 42°C.

Marcaje y Preparación de sondas

Se colocaron 25 ng de la ADNc, en baño de maria hasta hervir durante 10 min, de inmediato se pasaron a hielo, se agregó 1 µl de cada uno de los nucleótidos: dATP 10 mM, dGTP 10 mM, y dTTP 10mM; 20 µl de solución de *primers* (secuencias iniciadoras de la polimerización); 5µl de α-dCTP (P^{32}) y el agua suficiente para completar 49µl.

Enseguida se adicionó la enzima Klenow, se mezcló y centrifugó 10 segundos, se dejó incubar durante 2 h a 37°C. Terminado el tiempo de incubación se eliminan los nucleótidos y la marca no incorporada, la mezcla se pasó por una columna de Sephadex G-50 (Apéndice 12) preparado con Amortiguador T.E (Apéndice 13), la muestra obtenida al final de la columna se llevó a 100 µl con Amortiguador TEN (Apéndice 14) se hirvió durante 10 min.

El resultante se agregó a las membranas donde previamente se transfirió el ARN, dejándose hidridar toda la noche a 42°C. Después se lavó la membrana 2 veces a 42°C con SSC2X/SDS 0.1% durante 15 min, otras 2 veces a 65°C con SSC 1X/SDS 0.1% durante 15 min, y una vez a 65°C con SSC 0.1X/SDS 0.1% durante 15 min (Apéndice 15). Finalmente

se envolvieron en una membrana plastica *Kleen pack* y se expuso en un cassette con una película autoradiográfica X-OMAT Kodak (Sigma, USA) durante 24 h a -70°C . Transcurrido este tiempo se reveló la película (105).

Controles positivos

Para tener un patrón normal de la expresión de moléculas clase I del MHC se utilizaron como controles positivos células epiteliales de cérvix normal. Para ello, se obtuvieron biopsias de histerectomías realizadas en el Hospital General de Zona Troncoso (I.M.S.S.). Las biopsias se disgregaron con una solución de Verseno (Apéndice 16) y se sembraron en botellas de 175cm² (Nuncion, Dinamanrca) con medio suplementado (104).

Control Negativo

Se utilizó la línea celular linfoblástica denominada T2, la cual fue derivada por fusión de una línea celular mutante linfoblastoidea denominada LCL 721.174, la cual tiene una delección en la región clase II del MHC y por lo que carece de expresión de los TAP's, por lo tanto, normalmente no tiene expresión de MHC-I en la membrana; pero expresa a 26°C algunos alelos (HLA-A2) (44), la línea se cultivó en medio suplementado (Apéndice 1) y con las condiciones antes mencionadas de cultivo para todas las líneas celulares.

Citofluorometría de Flujo

Para analizar la expresión de moléculas MHC-I y sus alelos en las líneas de CaCu se realizó la técnica de citofluorimetría de flujo. Después de despegar a las células se centrifugaron a 500 g por 10 min, después se lavaron con 10 ml Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS) pH 7.2 (Apéndice 17), se resuspendieron 5 ml en PBS suplementado con SFB (Apéndice 18), la viabilidad celular se cuantificó con azul de tripano.

Para los ensayos de detección de moléculas clase I del MHC se utilizaron 500,000 células, las cuales se sembraron en placas de 96 pozos

(Nunclon, Dinamarca), se centrifugó la placa a 500 g durante 5 min y se eliminó el sobrenadante por medio de vacío, enseguida se agregaron 100 µl del medio condicionado producido por los diferentes hibridomas y que reconoce a los diferentes alelos.

Se incubó durante 30 min a una temperatura de 4°C. Una vez que transcurrió este tiempo se centrifugó a 500 g realizándose dos lavados con 100 µl de PBS-al 2% de SFB. A cada botón celular se le adicionó una solución que contenía 1mg/ml del anticuerpo secundario que estaba marcado con isotiocianato de fluoresceína, este anticuerpo reconoce la región Fc del anticuerpo primario.

Después de incubar 30 min a 4°C: se centrifugó a 500 g y se lavó dos veces más, adicionándose al final 300 µl a cada pozo de yoduro de potasio (Apéndice 19) diluido en PBS al 2% de SFB.

Finalmente se leyeron las muestras con ayuda de un Facs (Beckton Dickinson, U.S.A.). Para calibrar el Facs se utilizaron las líneas celulares sólo incubadas con el anticuerpo secundario. Para analizar la expresión en membrana del total de moléculas MHC-I se utilizó el anticuerpo monoclonal W6/32, el cual reconoce a todos los alelos de MHC-I, (A, B y C). Para el análisis alélico se utilizaron los anticuerpos monoclonales específicos. Los ensayos de citometría de flujo se realizaron 8 veces, cada vez se utilizaba un duplicado, para tener una análisis cuantitativo.

Técnica de Inmunocitoquímica

En esterilidad y cámara húmeda, se sembraron 50,000 células contenidas en 80 µl de medio suplementado con SFB (Apéndice 1), en un portaobjetos tratando de formar un extendido uniforme sobre el portaobjetos sin escurrir por las orillas. Se dejó adherir durante de 6 a 10 h en un ambiente al 5% de CO₂ y 37°C.

Cuando las células estuvieron adheridas al portaobjetos se les eliminó el medio y se lavaron con PBS pH 7.2 a temperatura ambiente, después se fijaron en acetona a -20°C durante 10 min, se dejaron secar.

a temperatura ambiente 2 min y se guardaron a -70°C , los para posteriores.

Las células no adherentes (T2), se dejaron secar en una cámara seca a 40°C el tiempo necesario, después se fijaron con acetona. Para empezar la técnica de inmunocitoquímica se descongelaron las placas y se colocaron 10 min a temperatura ambiente. Se lavaron con PBS, las células se permeabilizaron con $80\mu\text{l}$ de tritón (Apéndice 20) (detergente que nos permite solubilizar la membrana de las células) durante 30 min a temperatura ambiente.

Transcurrido el tiempo se lavaron con PBS, enseguida se bloqueó con $80\mu\text{l}$ de peroxidasa endógena (Apéndice 21) (para eliminar enzimas que pudieran degradar nuestro epitopo) durante 5 min a temperatura ambiente, las placas se lavaron con agua destilada y con PBS. Se bloqueó con Amortiguador de Coulter-SBF (Apéndice 22 y 23) a 37°C 30 min .

Transcurrido el tiempo se decantó el exceso de Amortiguador de Coulter-SFB, y se colocaron $80\mu\text{l}$ del anticuerpo primario (Apéndice 24) durante 17 h a una temperatura de 4°C . Después se dejó a temperatura ambiente durante 1 h. Se lavaron las laminillas con PBS, después se incubaron con $100\mu\text{l}$ del anticuerpo secundario (Apéndice 25) a 37°C 60 min . Por otro lado, transcurridos los primeros 30 min de la incubación con el anticuerpo secundario; se preparó en condiciones frías y protegido de la luz el complejo ABC (Apéndice 26), cuando terminó el tiempo de incubación con el anticuerpo secundario se lavaron las laminillas con PBS, enseguida se adicionaron $75\mu\text{l}$ del complejo ABC y se incubó a 37°C por 30 min .

Se lavó con PBS y se procedió con el revelado con Diamino Bencidina (DAB) (previamente disuelta en su amortiguador Apéndice 27 y 28), de la siguiente manera se colocaron en cada laminilla $100\mu\text{l}$ de $\text{DAB-H}_2\text{O}_2$ (Apéndice 29) durante 30 segundos a temperatura ambiente observándose un tono café en las placas, enseguida se eliminó el exceso de DAB por decantación sobre papel absorbente, las placas se lavaron con PBS. Posteriormente se procedió con la contratinción utilizando

Hematoxilina de Harris durante 30 segundos, se eliminó el exceso de colorante con agua corriente de la llave. Después de la contratinción se llevó a cabo la deshidratación en alcoholes graduales de 30%, 50%, 70%, 90% 100%, 1:1 (Xilol:alcohol), 2 min cada uno, se pasaron a Xilol puro 5 min para aclarar y finalmente se montaron con resina. Los ensayos de inmunocitoquímica se realizaron 6 veces con la finalidad de poder realizar un análisis cualitativo en la expresión de moléculas clase I.

RESULTADOS

Las líneas de CaCu CaLo e InBI expresan ARNm de TAP-1 y TAP-2.

Con la finalidad de saber si las líneas CaLo e InBI expresaban ARNm de las subunidades de TAP's, se realizó un análisis de ARNm, dando por resultado que ambas líneas expresaron las subunidades TAP-1 y TAP-2 de manera similar al control (HELA). El cultivo con 100 U de INF- γ durante 48 h, permitió un incremento en la expresión de ARNm para ambos TAP's (Fig 6).

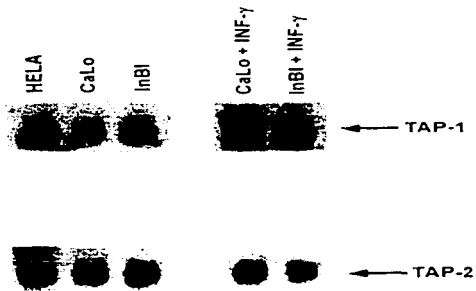


Figura 6. Expresión de ARNm para las proteínas TAP-1 y TAP-2 en las líneas CaLo e InBI.

La transfección con TAP's afectó parcialmente la expresión de moléculas clase-I en las líneas de cáncer cérvico-uterino CaLo e InBI.

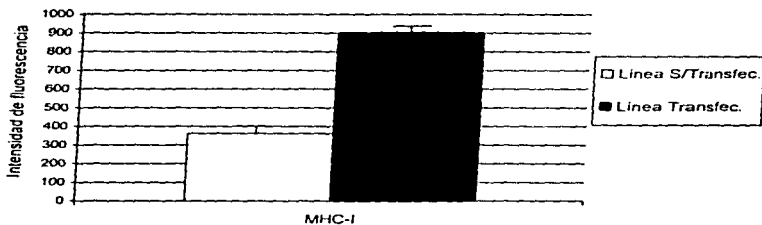
Con el propósito de evaluar el efecto de los TAP's sobre la expresión de moléculas MHC-I en las líneas celulares CaLo e InBI, se llevó a cabo la transfección de ambas líneas con las subunidades de TAP's (TAP-1 y 2) por medio del plásmido pCDM8. Cabe mencionar que los insertos de ADNc que codifican para las subunidades de TAP-1 y TAP-2, han sido utilizados en el reestablecimiento de la expresión de moléculas MHC-I en la línea celular linfoblástica T2, la cual carece de ambas subunidades de TAP's (44).

De las células transfectadas se lograron seleccionar dos poblaciones resistentes al antibiótico G-418: una población para la línea CaLo y una para la línea InBI.

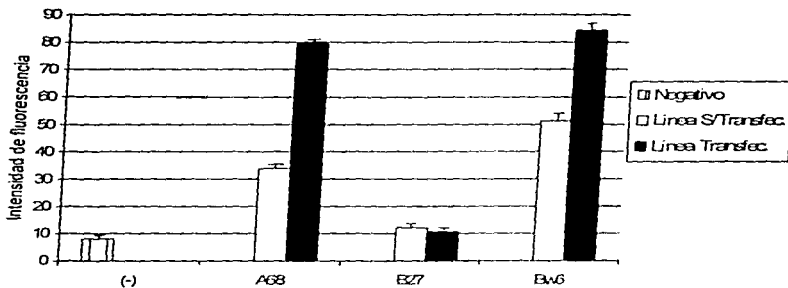
A) Expresión de moléculas Clase I del MHC en CaLo y CaLo transfectadas.

El análisis de citometría de flujo utilizando el anticuerpo W6/32 en CaLo y CaLo transfectada, permitió observar un aumento en la expresión de moléculas clase I del MHC, la línea transfectada aumento en un 148% con respecto a la línea sin transfectar (Graf.1).

El análisis de la expresión de los diferentes alelos HLA-A, B en CaLo permitió observar un incremento diferencial, ya que para el caso del alelo A68 se observó un aumento del 134% en la línea transfectada con respecto a la línea no transfectada; mientras que para el alelo-Bw6 la expresión sólo aumentó en un 64%. El alelo B27 no presentó cambio en la expresión en la línea transfectada comparada con la no transfectada (Graf. 2).



Gráfica 1. Expresión total de moléculas del MHC-I en la membrana de CaLo y CaLo transfectada con TAP's utilizando el anticuerpo monoclonal W6/32.



Gráfica 2. Expresión de moléculas del MHC-I de algunos los alelos en la membrana de la línea celular CaLo y CaLo transfectada con TAP's.

En adición al análisis por citometría de flujo se realizaron ensayos de inmunocitoquímica, en donde al detectar el total de moléculas clase I del MHC mediante el anticuerpo W6/32, se encontró que aproximadamente el 50% de las células sin transfectar mostraban tenue tinción al revelarse con DAB, y aproximadamente 15% mostraban fuerte tinción, y el resto eran negativas (Fig. 7).

Dado que una gran proporción de células de la línea CaLo resultaron con tinción débil o fueron negativas, se procedió a la permeabilización de las células con tritón al 0.1% con la finalidad de poder detectar moléculas clase I del MHC a nivel intracelular. De esta manera, se pudo constatar que la mayoría de las células presentaban una tinción tenue alrededor del núcleo (Fig. 8).

En la población de células CaLo transfectadas con TAP-1 y TAP-2, se observó que en la membrana un 60% de las células mostraban tinción y el restante mostraba una tinción tenue (Fig. 9). Al permeabilizar las células CaLo transfectadas, se observó una tinción tenue en la región periférica al núcleo en el 80% de las células y el resto de las células mostraron tinción fuerte en esa región, lo que indica que aún después de la transfección se encuentran retenidas una cantidad considerable de moléculas clase I MHC en algún lugar de los compartimientos por donde las moléculas viajan (RE y Golgi) (Fig. 10).

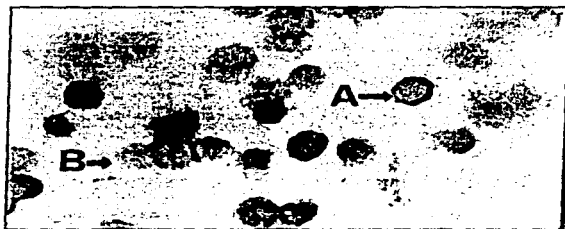


Figura 7. Expresión de moléculas del MHC-I en la membrana de las células CaLo [40X]. La tinción fuerte solo se observó en algunas células (A), y en la mayoría de las células no se observó tinción (B)



Figura 8. Expresión de moléculas del MHC-I en células de la línea CaLo Permeabilizada [40X]. Obsérvese que la mayoría de las células presentan tinción intracelular alrededor del núcleo (A)



Figura 9. Expresión de moléculas del MHC-I en la línea CaLo transfectada con TAP-1 y TAP-2 [40X] Obsérvase el aumento considerable de tinción en la mayoría de las células

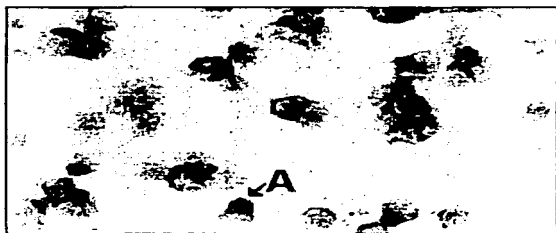


Figura 10. Expresión de moléculas del MHC-I en células permeabilizadas de la línea CaLo transfectada con TAP-1 y TAP-2 [40X] En algunas de las células transfectadas aun se encontro tinción intracelular (A)

B) Expresión de moléculas Clase I del MHC en InBI y InBI transfectada con TAP's.

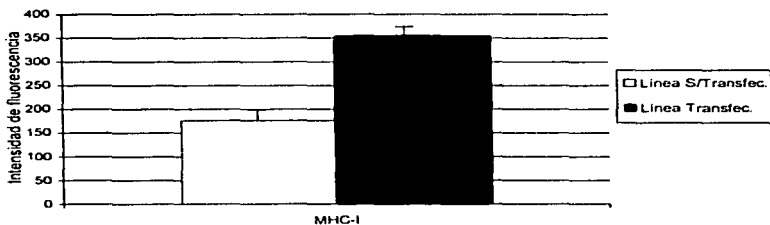
La expresión total de moléculas del MHC-I en la membrana de las células InBI transfectadas, mostró un aumento del 101% en relación a la células sin transfectar (Graf. 3).

Al analizar la expresión de los alelos HLA-A11 y -Bw6 mediante citometría de flujo, se observó que el alelo A11 no mostró cambios en su expresión aún después de las transfección, mientras que el alelo Bw6 tuvo un aumento del 42% en la línea transfectada con respecto a la línea sin transfectar (Graf. 4).

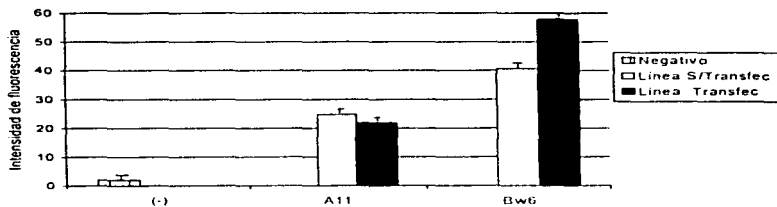
Al igual que en la línea CaLo, en la línea InBI e InBI transfectada también se realizaron ensayos de Inmunoquímica. En la línea no transfectada se observaron muy pocas células con tinción (aproximadamente el 20%) dividiéndose entre las que presentaban una marcada tinción (10%) y el resto débil, mientras que la gran mayoría de las células no mostraron tinción (Fig. 11).

Al realizar la inmunocitoquímica con células permeabilizadas se encontró que la mayoría de las células mostraron una tinción tenue, y una pocas una tinción fuerte alrededor del núcleo (Fig. 12).

En la línea InBI transfectada con TAP-1 y TAP-2, se observó un notable aumento de la tinción en membrana de aproximadamente el 90%, y el restante presentó tinción tenue (Fig 13). Al permeabilizar las células InBI transfectadas, se detectó que un gran porcentaje de las células seguía mostrando tinción fuerte alrededor del núcleo (Fig 14).



Grafica 3. Expresión de moléculas del MHC-I de la línea InBI antes y después de la transfección con TAP-1 y TAP-2.



Grafica 4. Expresión de los alelos HLA-A11 y -Bw6 en la membrana de la línea InBI e InBI transfectada con TAP's.



Figura 11. Expresión de moléculas del MHC-I en la línea InBl [40X]
Tinción en membrana (A). La mayoría de las son células negativas (B)

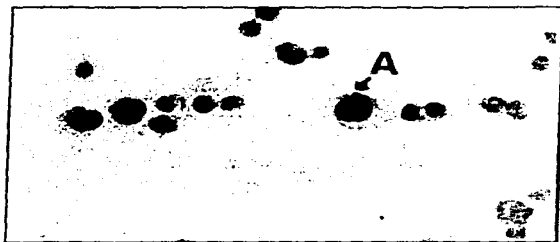


Figura 12. Expresión intracelular del MHC-I en la línea InBl [40X]
Obsérvese la retención intracelular en la mayoría de las células(A)

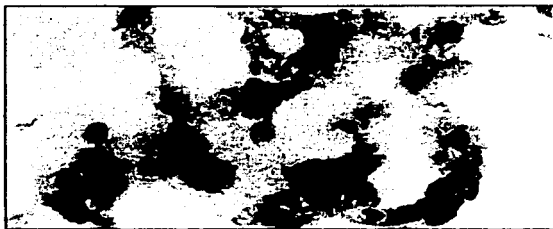


Figura 13. Expresión de moléculas del MHC-I en la línea InBI transfectada con TAP-1 y TAP-2 [40X] Obsérvase el aumento de tinción en la membrana citoplásmica en comparación con la línea sin transfectar

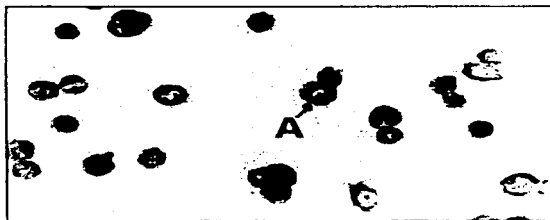


Figura 14. Expresión intracelular del moléculas MHC-I en la línea InBI transfectada con TAP-1 y TAP-2 [40X] Obsérvese la tinción intracelular (A).

En el análisis de inmunocitoquímica de células epiteliales de cérvix normal utilizadas como control positivo para la expresión total de moléculas clase I del MHC se observó una fuerte tinción y de manera homogénea en la membrana de todas las células (Fig. 15), lo que indica que el epitelio normal de cérvix expresa de manera constitutiva moléculas MHC-I en su membrana. En el análisis intracelular de moléculas clase I en el epitelio normal no se detectó tinción interna cercana al núcleo (Fig. 16).

Como control negativo de la expresión de moléculas MHC-I en membrana celular, se realizó una tinción en la membrana de las células de la línea T2 utilizando el mismo anticuerpo, encontrándose efectivamente que las células fueron negativas para la tinción (Fig. 17).



Figura 15. Expresión de moléculas del MHC-I en la membrana de células de epitelio cervical [40X]. Observese la tinción homogénea en la mayoría de las células cerca de la membrana (A).



Figura 16. Expresión de moléculas del MHC-I en epitelios normales permeabilizados, obsérvese que no se detectó tinción intracelular [40X]

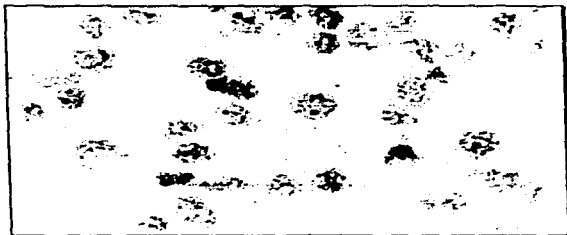


Figura 17. Ausencia de tinción para las moléculas del MHC-I en la línea T2 [40X].

Como control de técnica se utilizó un anticuerpo que reconoce filamentos de vimentina los cuales forman parte del citoesqueleto de la mayoría de los diferentes tipos celulares, este anticuerpo se utilizó para detectar el estado de conservación del epitelio en tejido y para determinar si la técnica de inmunocitoquímica se realizó adecuadamente. La tinción obtenida por este anticuerpo nos permite constatar que las condiciones de tinción fueron las adecuadas (Fig. 18 y 19)



Figura 18. Control de técnica de Inmunoquímica. tinción de filamentos de vimentina en la línea CaLo [40X]

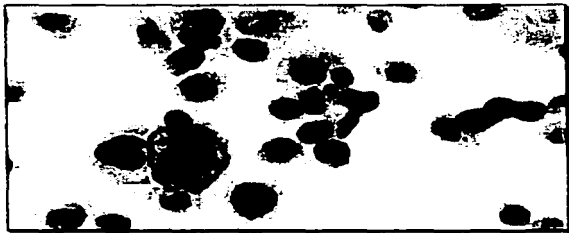


Figura 19. Control de técnica de Inmunocitoquímica, tinción de filamentos de vimentina en la línea InBl [40X].

DISCUSION

Las moléculas clase I del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC-I) juegan un papel muy importante en la respuesta inmunológica mediada por Linfocitos T Citológicos (LTC) para eliminar a células infectadas con virus y células neoplásicas, por lo tanto algún defecto en la vía de procesamiento y presentación de antígenos por moléculas MHC-I conduce a una respuesta inmunológica deficiente que ayuda a las células neoplásicas a evadir el sistema inmune (16).

En el Cáncer Cérvico-uterino (CaCu) se ha reportado que la baja expresión de moléculas MHC-I en membrana celular se encuentra asociada a la baja expresión o pérdida de una o ambas subunidades Transportadoras de Antígenos (TAP-1 y TAP-2) (95, 96, 99, 100), y que esta baja expresión es más acentuada en alelos de tipo HLA-A y -B, sobre todo en tumores con estadios clínicos avanzados (99, 100).

Las líneas de CaCu CaLo e InBI que provienen de tumores avanzados presentan una expresión diferencial de moléculas MHC-I en su membrana celular; se ha visto que los alelos B27 en CaLo y A11 en InBI no incrementan su expresión en presencia de IFN- γ (modulador positivo de la expresión de MHC-I) en relación a otros alelos expresados en estas mismas líneas celulares, los cuales sí responden a la estimulación con IFN- γ (107).

Además, se ha encontrado en trabajos previos, que estas líneas celulares incrementan en su membrana la expresión de los alelos HLA-B27 (CaLo) y HLA-A11 (InBI) al ser semipermeabilizadas e incubadas con péptidos sintéticos específicos para estos alelos, lo que no sucedió al estimular sólo con IFN- γ . Por lo tanto, se sugirió un probable defecto en el aporte de péptidos específicos dentro del Reticulo Endoplasmico (RE) para estabilizar a estos alelos.

Con base a los datos mencionados anteriormente se postuló que los candidatos idóneos para explicar la ineficiente aportación de péptidos serían los TAP's. En consecuencia, el primer objetivo de este trabajo fue el de detectar la presencia de las subunidades de TAP.

En efecto, su presencia pudo constatare mediante un análisis de ARNm para TAP-1 y TAP-2 en ambas líneas. No obstante, a pesar de que estas subunidades si son expresadas, desconocíamos su correcta funcionalidad. Hailei y otros investigadores han reportado en líneas celulares provenientes de tumores pulmonares, que a pesar de encontrarse el ARNm para ambos TAP's las líneas presentan deficiencia en la expresión de alelos particulares de clase-I del MHC debido a una mutación puntual en la secuencia de TAP-1, lo que ocasiona un transporte deficiente de péptidos específicos (96, 100).

Para evaluar si las deficiencias de expresión encontradas en los alelos B27 y A11 eran debidas a un probable defecto funcional de los TAP's, se llevó a cabo la transfección de ambas líneas con TAP's funcionales. La funcionalidad de los TAP's humanos exógenos se demostró por el incremento de la expresión global de moléculas clase I del MHC (detectado por citometría de flujo con el Anticuerpo W6/32), en ambas líneas celulares, lo que indico que estos TAP's aumentan el abastecimiento de péptidos para el ensamblaje y presentación de moléculas clase I del MHC en membrana

Esto fue corroborado por las tinciones de inmunocitoquímica, en las cuales las líneas sin tranfectar mostraron una gran mayoría de células con tinción pobre o negativa (predominantemente en INBI) y después de la transfección todas las células de ambas líneas fueron positivas en membrana. Esto nos permite sugerir que si se encuentran deficiencias a nivel de TAP's para el abastecimiento de péptidos y, por tanto, para la eficiente expresión de moléculas clase I del MHC en la membrana de la mayoría de las células

La negatividad en la expresión de moléculas clase I en la membrana de la mayoría de las células observadas por analisis inmunocitoquímico utilizando el anticuerpo W6/32, nos sugiere que las líneas CaLo e INBI están constituidas por un grupo heterogéneo celular. Esta hipótesis se apoya en el hecho de que en trabajos previos realizados en clones obtenidos de estas líneas, se encontraron diferentes niveles de expresión

de moléculas clase I del MHC, ya sea entre los diferentes clones y con respecto a la línea original.

En estudios futuros será de gran importancia el analizar la expresión del ARNm y de las proteínas TAP's en los diferentes clones y discernir su papel sobre la expresión de moléculas clase I del MHC.

La pérdida de la expresión de moléculas clase I del MHC en células malignas se relaciona con el proceso de inmunoselección inherente a la respuesta inmunológica evocada en el tumor primario, en donde dependiendo del estado de transformación celular sólo algunas células con ciertas características pueden evadir al sistema inmune (94, 108).

Cabe mencionar que la línea InBI, la cual mostró una expresión menor de moléculas clase I del MHC en su membrana, proviene de un tumor metastásico de estadio clínico IVA y la línea CaLo que mostró una mayor cantidad de células con tinción (tenue o fuerte) para las moléculas clase I del MHC fue derivada un estadio clínico IIB (estadio más temprano que InBI). Estos datos son compatibles con los reportados por otros investigadores en donde se encuentra una estrecha relación entre la agresividad del tumor de CaCu y la pérdida de expresión de moléculas MHC-I (90, 92, 96, 97, 109).

En este trabajo, al comparar cualitativamente la expresión en membrana de moléculas clase I del MHC de las líneas CaLo e InBI contra cultivos primarios de epitelios normales de cérvix se observó una gran diferencia, ya que todas las células epiteliales normales presentaron una tinción homogénea y fuerte, mientras que las líneas presentaban muy pocas células positivas, esto nos da un indicio de la heterogeneidad celular de las líneas. Otro dato importante observado fue que al permeabilizar los epitelios normales no se detectó tinción intracelular para las moléculas clase I del MHC.

Por otro lado, en células tumorales y células infectadas con virus, también se ha reportado que existe un alto grado de retención de moléculas clase I del MHC como consecuencia del bloqueo del transporte de péptidos o por la degradación de moléculas clase I del MHC debido algunas veces a proteínas virales de expresión temprana (110).

En nuestro trabajo, mediante el análisis de tinción por inmunocitoquímica en células sin transfectar permeabilizadas con tritón, se pudo detectar una gran cantidad de moléculas clase I del MHC intracelularmente, siendo más acentuado en la línea InBI que en CaLo.

No obstante, aún después de la transfección con TAP's, se siguió observando retención intracelular de las moléculas MHC-I en ambas líneas siendo más acentuada la retención en la línea InBI, esto puede ser atribuible a que no todos los alelos están siendo estabilizados adecuadamente con péptidos, puesto que en los análisis de citometría de flujo las líneas celulares transfectadas con TAP's funcionales únicamente mostraron aumento de los alelos A28 y Bw6 (en CaLo) y del alelo Bw6 (en InBI); pero los alelos B27 de CaLo y A11 de InBI, que se esperaba aumentarían su expresión, no fueron modificados. Este dato contrasta con los resultados previamente obtenidos al utilizar péptidos sintéticos específicos para A11 y B27; en donde sí fue detectable un incremento considerable de estos alelos en la membrana de las células.

Lo anterior nos permite sugerir la existencia de varios eventos que podrían conducir a la retención intracelular de moléculas MHC-I en las células de las líneas CaLo e InBI, de entre los cuales serían:

- 1- Deficiencias en la generación y bombeo de péptidos poco afines a los alelos A11 y B27.
- 2- La intervención de proteínas virales que retienen a las moléculas en RE y Golgi.
- 3.- La regulación negativa de la expresión de alelos que presenten péptidos inmunogénicos.

Con respecto al primer punto, se sabe que el proteasoma es el principal componente enzimático para el procesamiento de antígenos citosólicos y juega un papel muy importante en la producción de péptidos que se unen a moléculas clase I del MHC (111).

Se ha visto que deficiencias en la expresión de las principales subunidades enzimáticas de los proteasomas conocidas como LMP-2 y LMP-7 están correlacionadas con una pérdida de péptidos antigénicos y la regulación negativa de expresión de moléculas MHC-I. Se ha reportado en

ratones "Knock out" (animales en los que por técnicas de recombinación homóloga se inhibe la expresión de un gene en particular) para el gene LMP-2 no se disminuye la expresión de moléculas clase I del MHC en la membrana, pero el número de linfocitos T CD8+ específicos para un péptido inmunogénico del virus de la influenza es disminuido (112).

De igual manera en ratones "Knock out" para el gene LMP-7 se ha observado que el número de linfocitos T CD8+ permanece sin cambios, pero se observa un decremento de entre el 55-90% en la expresión de moléculas clase I del MHC lo que es consistente con una deficiencia en la producción de péptidos antigénicos (113), pudiendo estar correlacionada de manera alelo específica (114).

Asimismo, se ha encontrado que las moléculas clase I de células con deficiencia en los TAP's presentan en su cavidad péptidos de secuencias señal, los cuales son altamente hidrofóbicos (115). Este fenómeno también fue encontrado en previos trabajos realizados por nuestro grupo, en donde por medio de técnicas de elución de péptidos se ha reportado la deficiencia de péptidos hidrofílicos en los perfiles cromatográficos de péptidos aislados de los alelos A11 y B27 (116).

Los péptidos con características hidrofílicas juegan un papel muy importante en el reconocimiento y estimulación de linfocitos T (117). El hecho de que los alelos B27 y A11 se encuentren con una baja expresión y que además sus péptidos muestren un perfil hidrofóbico nos hace pensar que estos alelos puedan ser los candidatos idóneos para ser blanco en una respuesta inmune antitumor.

Esto coincide con lo mencionado por otros investigadores en relación al papel que pueden jugar los productos del locus HLA-A y -B con respecto a que puedan ser más relevantes para la presentación de péptidos inmunogénicos en la generación de la respuesta inmune (93, 100, 107, 108).

En relación a la interferencia de proteínas virales que tienen relación con el desarrollo de cáncer, se sabe que la mayoría de estas proteínas son de expresión temprana y pueden inhibir o bloquear la presentación de moléculas clase I del MHC (110).

Algunos ejemplos son los *Adenovirus* tipo 2, 5 y 12, los cuales producen proteínas como la glucoproteína transmembranal E3/19K la cual se une a la cadenas pesadas recién sintetizadas previniendo así el transporte y expresión de los antígenos clase I en la membrana de las células infectadas (118). En experimentos de transformación celular se ha visto que el adenovirus tipo 12 es capaz de desregular negativamente la expresión de TAP's y de LMP's (119).

Otros tipos de virus como los *Citomegalovirus* humanos (HCMV) y murinos retienen y degradan a las moléculas clase I del MHC en el Golgi, también interfieren en la síntesis de cadenas pesadas de MHC-I (120). Se ha encontrado una proteína de los HCMV, la UL18, está proteína secuestra a la β_2m , evitando que se una a la cadena pesada del MHC-I (121), la proteína US11 de HCMV se une a las cadenas pesadas y las saca del RE para que sean degradadas en en citosol (122).

Los virus de *Herpes* también interfieren en la presentación de antígenos clase I: se ha encontrado una proteína denominada ICP47 la que interfiere con los TAP's y no permite que éstos puedan trasladar péptidos hacia el interior del RE (120-123).

En relación al papel que pudiera jugar el virus del *Papilloma Humano* (HPV) en el escape inmunológico de las células tumorales de CaCu se tiene muy poca información, pero se ha reportado que las proteínas E5 y E7 del HPV pueden regular negativamente la expresión de moléculas Clase I (124-125) y como las líneas celulares CaLo e InBI muestran infección con HPV-18, es posible una participación del HPV en la retención intracelular de moléculas Clase I del MHC.

La expresión alélica diferencial entre las moléculas clase I del MHC observada en CaLo e InBI, permite sugerir que la baja expresión de los alelos B27 y A11, puede relacionarse con que éstos alelos sean capaces de despertar una respuesta inmune antitumor y, por lo tanto, se desregule su expresión en membrana; ya que se ha observado que en líneas de melanoma, los alelos que se expresan en mayor proporción pudieran estar presentando péptidos irrelevantes (no inmunogénicos) para el rechazo tumoral, mientras que los alelos que se encuentran en baja expresión

(desregulados) son los responsables de presentar algún péptido antigénico (126).

La baja selectiva de algún alelo de las moléculas MHC-I se ha reportado en aproximadamente 10% de las líneas de melanoma(127), y esto también se ha relacionado con deleciones encontradas en el cromosoma 6 donde es codificada la cadena pesada de la moléculas MHC-I, también se ha observado una baja selectiva alélica o completa de las moléculas MHC-I en tumores metastáticos de CaCu comparados con lesiones primarias (95, 99).

Finalmente, la baja expresión de algunos alelos del MHC-I encontrada en las líneas de CaCu CaLo e InBI y su ineficiente inducción a través de la transfección de transportadores de péptidos observada en este trabajo, hace sugerir que varios son los factores que pueden influir en la desregulación de la expresión de moléculas MHC-I de manera selectiva para evadir la respuesta inmune celular del huésped.

En consecuencia el dirigir los esfuerzos en identificar el papel de virus de papiloma en este fenómeno, así como el de analizar la frecuencia de alelos afectados en una población de pacientes con CaCu, ayudará a comprender varios aspectos biológicos que giran en torno a la inmunidad celular contra el CaCu. Las respuestas a estos cuestionamientos, permitirán dirigir estrategias hacia la prevención, protección y tratamiento de pacientes con CaCu a través de la terapia génica o de inmunoterapia a base de péptidos.

CONCLUSIONES

- El hecho de que los TAP's funcionales exógenos afectara la expresión de los alelos HLA-A28 y HLA-Bw6 en la línea CaLo y HLA-Bw6 en la línea InBI, nos permite sugerir que la desregulación de los alelos HLA-B27 en CaLo y HLA-A11 en InBI no es debida a la deficiencia en el transporte de péptidos por los TAP's.
- La tinción intracelular detectada por inmunocitoquímica mediante el uso del anticuerpo monoclonal W6/32, en las líneas celulares CaLo e InBI nos sugiere retención de moléculas clase I del MHC a nivel de RE, *cis* o *trans* Golgi, ya que son sitios en donde también se encuentran moléculas clase I del MHC.
- La presencia de diferentes patrones de tinción para la expresión de moléculas clase I del MHC en la membrana de las líneas CaLo e InBI nos sugiere que ambas líneas están constituidas de poblaciones celulares heterogéneas.
- De acuerdo a los resultados obtenidos, se suriere la posibilidad de que en las líneas existan varios mecanismos que afecten selectivamente el procesamiento y la presentación de moléculas clase I del MHC, pudiendo ser entre ellos: 1) Deficiencias en la generación de péptidos inmunogénicos debida a defectos en los proteasomas; 2) Retención de moléculas Clase I del MHC debida a proteínas virales; 3) Regulación negativa de algunos alelos a nivel de Transcripción. 4) Mutaciones específicas en el sitio de unión del péptido en las moléculas clase I del MHC.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Lazcano P. E. C., Najera A. P., Alonso de R. P., Buiatti E., Hernández A. M. 1994. Programa de detección Oportuna de Cáncer Cervical en México. I. Diagnóstico situacional. *Rev. Inst. Nal. Cancerología*. 42, 3, 123-140.
- 2.- Meneses-G. F., Cos-A. Ma. T. 1994. Evaluación de las actividades de detección y seguimiento del Cáncer Cérvicouterino en población bajo cobertura de la Secretaría de Salud. Mexico, 1992. *Rev. Inst. Nal. Cancerología*. 40., 4, 168-177.
- 3.- Moreno R. J. 1996. Respuesta Inmune y Mecanismos de Autoinmunidad. Ed. Limusa, México, pp: 40-45
- 4.- Abbas A.K., Andrew H.L., Jordan S. P. 1994. Cellular and Molecular Immunology. 2a. Ed. Saunders Company. U.S.A. pp 40-37
- 5.- Paul, W.E. 1993. Fundamental Immunology 3a. Ed. Raven Press. N.Y. U.S.A. pp. 809-813.
- 6.- Roitt, I.M. 1991. Essential Immunology. 7th Blackwell Scientific Publications. U.S.A. pp 35-64.
- 7.- Janeway, C. A. Jr., Travers, P. 1994. Immunobiology: the Immune System in Health and Disease. Ed. Current biology limited. New York, U.S.A. pp:4:1-4:46
- 8.- Weissman Y.L., Max D. C. 1993. Formación y Desarrollo del Sistema Inmunitario. *Investigación y Ciencia*. Nov:12-25.
- 9.- Nossal G. 1993. Sistema Inmunitario entre la vida y la muerte. *Investigación y Ciencia*. Nov: 9-12.
- 10.- Stites P.D., Stobo J.D, Fudenberg H.H., Wells, V.J. 1985 Inmunología Básica y Clínica. Ed. El manual moderno. S.A. México, pp. 842-845.
- 11.- Doherty P.C., Sam H., Raip A. Tripp. 1994. CD8⁺ T-Cell To viruses. *Curr. Opi. Immunol.* 7 :547-552.
- 12.- Greenberg, P.D. 1991. Adoptive T cell Therapy of tumors: mechanisms operative in the recognition and elimination of tumor cells. *Adv. Immunol.* 49: 281-285.

- 13.- Chau-Ching Liu, Wals C.M., John D. Y. 1995. Perforin: structure and function. *Immuno. Today* .18:4 194-201
- 14.- Berke Gideon. 1995. The CTL's Kiss of Death. *Cell*. 81: 9-12.
- 15.- Squier M. KT., John J. C. 1994. Cell-mediated cytotoxic mechanisms. *Curr. Opin. Immunol.* 6:447-452.
- 16.- Berke, G. 1994. The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: Molecular and Cellular Aspects. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 735-773.
- 17.- Jameson C.S., Kristin A. H., Michael J.B. 1995. Positive selection of thymocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 13: 93-126.
- 18.- Austyn M. J. and Kathryn J. Wood. 1993. Principles of Cellular and Molecular Immunology. Ed. Oxford University Press. 50-57.
- 19.- Robey E., B.J. Fowlkes. 1994. Selective events in T cell development: thymic selection. *Annu. Rev. Immunol.* 12:265-705.
- 20.- Peralta Z.O., Sánchez M. T., Barrera R. R., Madrid M. V. 1995. Estructura y función del receptor de antígeno de linfocitos T y su papel en enfermedades infecciosas. *Rev. Invest. Clin* 48 69-79.
- 21.- Robey E.A. Fowlkes B. J. Gordon, J.W., Kioussis D., von Boehmer h., Ramsdell F., Axel R. 1991. Thymic selección in CD8 transgenic mice supports an instructive model for commitment to a CD4 or CD8 lineage. *Cell*. 64, 99-107.
- 22.- York I A., Rock K. L. 1996. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 369-396.
- 23.- Brodsky M. F., Lyeme E. Guagliardi. 1991. The biology of antigen processing and presentation. *Annu. Rev. Immunol.* 9: 707-744.
- 24.- Germain Ronald N., David H. Margulies. 1993. The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annu. Rev. Immunol.* 11: 403-50
- 25.- Heemels M.-T., Ploegh H. 1995. Generation, translocation, and presentation of MHC Class I-Restricted Peptides. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 463-491.

- 26.- Germain R.N. 1994. MHC-Dependent antigen processing and peptide: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell*. 76: 287-299.
- 27.- Unanue, E. R., Allen P.M. 1987. The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science*. 236: 551-57.
- 28.- Neefjes L. J., Ploegh H. L. 1992. Intracellular transport of MHC class II molecules. *Immunol. Today*. 5: 179-184.
- 29.- Lehner J. Paul., Peter Creswell. 1996. Processing and delivery of peptides presented by MHC class I molecules. *Curr. Opin. Immunol.* 8: 59-57.
- 30.- Benham A. Tulp A. Neefjes J. 1995. Synthesis and assembly of MHC-peptide complex. *Immunol. Today*. 16: 17-25.
- 31.- Uebel S., Meyer T.H., Kraas W., Kienle S., Jung G., Wiesmüller K-H., Tampé R. 1995. Requirements for peptide binding to the human transporter associated with antigen processing related by peptide scans and complex peptide libraries. *J. Biol. Chem.* 270: 18512-18516.
- 32.- Goldberg A.L., Rock K.L. 1992. Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature*. 357: 375-379.
- 33.- Löwe J., Stock D., Jap B., Zwickl P., Baumeister W., Huber R. 1995. Crystal structure of the 20S Proteasome from the Archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science*. 268: 533-539.
- 34.- Niederman G., Butz S., Ihlenfeldt H.G., Grimm R., Lucchiarri M., Hoshützky H., Jung G., Maier B., Eichmann K. 1995. Contribution of proteasome mediated proteolysis to the hierarchy of epitopes presented by major histocompatibility complex class I molecules. *Immunity*. 2: 289-299.
- 35.- Groettrup M., Sosa A., Kuckelkorn U., Kloetzel P-M. 1996. Peptide antigen production by the proteasome: complex provides efficiency. *Immunol. Today*. 9: 429-435
- 36.- Androlewicz M.J. Ortmann B, van Endert P.M., Spies T, Cresswell P. 1992. Characteristics of peptide and class II β_2m binding to the transporters associated with antigen processing (TAP-1 and TAP-2). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 12716-12720.

- 37.- Rivett A.J., Palmer A., Kenecht E. 1992. Electronic microscopic localization of the multicatalytic proteinase complex in rat liver and cultured cells. *J. Histochem. Cytochem.* 40: 1165-1172.
- 38.- Neefjes J.J., Momburg F., Hämmerling G.J. 1993. Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter. *Science*. 261: 769-771.
- 39.- Kleimeer J.M., A. Jelly., H.J. Geuze., J.W. Slot., Townsed A., J. Trowsdale. 1992. Location of MHC encoded transporters in the endoplasmic reticulum and *Cis-golgi*. *Nature*. 357:342-344.
- 40.-Trowsdale J., Hanson I., Mockridge I., Beck S., Townsend A., Kelly A. 1990. Secuences Encoded in the class II region of the MHC related to the 'ABC' superfamily of transporter *Nature*. 348: 741-744.
- 41.- Howard J.C. 1995. Supply and transport of peptides presented by class I MHC molecules. *Curr Opin. Immunol.* 7: 69-76
- 42.- Momburg F., Neefjes J.J., Hammerling G.J. 1994. Peptide Selection by MHC-encoded TAP transporters. *Curr. Opin. Immunol.* 6: 32-37.
- 43.- Monaco J.J. 1992. Major Histocompatibility complex-linked transport proteins and antigen processing. *Immunol. Res.* 11: 125-35.
- 44.- Hosken A.N., Michael J. Bevan. 1990. Defective presentation of endogenous antigen by a cell line expressing class I molecules. *Science*. 248: 387-370.
- 45.- Schumacer T.N.M., Kantesaria D.V., Heemels M.-T., Asthon-Rickardt P.G., Shepherd J.C., Fruh K., Yang Y., Peterson P.A., Tonegawa S., Ploegh H.L. 1994. Peptide length and sequeince specificity of the mouse TAP1/TAP2 translocator. *J. Exp. Med.* 179: 533-540.
- 46.- Momurg F., Roelse J., Howard J.C., Butcher G.W., Hammerling G.W., Neefjes J.J. 1994. Selectivity of MHC-encode peptide transporters from human, mouse and rat. *Nature*. 367: 648-651.
- 47.- van Enderst P. M., Riganelli D., Greco Giulia., Fleischhauer K., Sidney J., Sette A., Bach J-F. 1995. The Peptide-binding motif for the human Transporter Associated with Antigen Processing. *J. Exp. Med.* 182. 1883-1895.

- 48.- Androlewicz J. M., Peter Cresswell. 1996. How selective is the transporter associated with antigen processing?. *Immunit.*, 5: 1-5.
- 49.- Nijenhuis M., Schmitt S., Armandola E.A., Obst R., Brunner J., Hammerling G.J. 1996. Identification of a contact region for peptide on the TAP-1 chain of the transporter associated with antigen processing. *J. Immunol.* 158, 2186-2195.
- 50.- Neisig A., Roelse J., Sijts A.J.A.M., Ossendorp F., Feltkamp M.C.W., Kast W.M., Melief C.J.M., Neefjes J.J. 1995. Major differences in transporter associated with antigen presentation (TAP)- dependent translocation of MHC class I-presentable peptides and the effect of flanking sequences. *J. Immunol.* 154: 1273-1279.
- 51.- Nijenhuis M. and Günter J. Hammerling. 1996. Multiple regions of the Transporter Associated with Antigen Processing (TAP) contribute to its peptide binding site. *J. Immunol.* 157: 5467-5477.
- 52.- Catterall, W.A. 1994. Molecular properties of a superfamily of plasma-membrane cation channels. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6: 607-650.
- 53.- Ortman B., Androlewicz M., Cresswell P. MHC class I/β₂ microglobulin complexes associated with TAP transporters before peptide binding. *Nature.* 368:864-867.
- 54.- Suh W-K, Cohen-Doyle M.F., Früh K., Wang K., Peterson P.A., Williams D.B. Interaction of MCH class I molecules with the transporter associated with antigen processing. *Science.* 264: 1322-1326.
- 55.- Vassilakos A., Cohendoyle M. F., Peterson P.A., Jackson M. R., Williams D.B. 1996. The molecular chaperone calnexin facilitates folding and assembly of class I histocompatibility molecules. *EMBO J.* 15: 1495-1506.
- 56.- Li Z., Srivastava, P.K. 1993. Tumor rejection antigen gp96/grp94 is an ATPase: implications for protein folding and antigen presentation. *EMBO J.* 12: 3143-3151.
- 57.- Williams D. B., Aikaterini Vassilakos and Woong-Kyung Guh. 1996. Peptide presentation by MHC class I molecules. *Cell Biology.* 6: 276-273.

- 58.- Falk K., Rötzchke O., Stevanovic S, Jung G. Rammensee H.-G. 1991 Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from molecules HLA-A2. *Nature*. 351:290-296.
- 59.- Engelhard H.V., 1994. Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 181-207.
- 60.- Serice F. Robert. 1996 Close-Up of a Killer. *Science*. 274: 176-177.
- 61.- Werness A. Bruce. 1995. Cáncer cervicouterino: en busca de una etiología infecciosa. *Contemporary Oncology*, Julio/Agosto: 13-21.
- 62.- García -Carrancá A., Gariglio P. 1993. Aspectos moleculares de los papilomavirus humanos y su relación con el cancer cérvico-uterino. *Rev. Inv. Clin.* 45: 85-92
- 63.- Lazcano P. Eduardo C., Najera A. P., Alonso de R. P., Buiatti E., Hernández A. M. 1996. Programa de Detección Oportuna de Cáncer Cervical en México. II Propuesta de reorganización. *Rev. Inst. Nat. Can.* 42: 141-158.
- 64.- Salmerón C.J., Lazcano P. Eduardo C., Hernández A. M. Programa de Detección Oportuna de Cáncer Cervical en México. 1996. Una alteARNtiva organizacional. *Rev. Inst. Nat. Can.* 42: 159-165.
- 65.- Pardoll M. Drew. 1993. Cancer vaccines: perspectivas clinical. *Immunol. Today*. 14:310-316.
- 66.- Moore M. 1995. Natural immunity to tumor -theoretical prediction and biological observations. *Br. J. Cancer* 52: 147- 151.
- 67.- Tzzy- Chou Wu. 1994. Immunology of the papilloma virus in relation to cancer. *Curr. Opin. Immunol.* 6: 746-754.
- 68.- Seedorf J., Scheindr H., Shah K., 1986. Detection of papilomavirus Antigen and DNA in Cells and tissues. in "Viral Etiology of Cervical Cancer" 21 Branbury Report. Col. Spring Harbor Lab. pp 247.
- 69.- King, L.A., Tase, T. Twiggs, L.B., 1989 Prognostic significance of the presence of human Papillomavirus ADN in pacientes with invasive carcinoma of the cervix. *Cancer*. 63:897-900.
- 70.- Kaur P., McDougall J.K., Cone R. 1989. Inmortalization of primary human epithelial cell by cloned cervical carcinoma ADN containing human

- papillomavirus Type 16 E6/E7 open reading frames. *J. Gen. Virol.* 70:1261-1266.
- 71.- Pfister H. 1987. Papillomaviruses: General description, taxonomy and classification. In: the papovaviridae. Ed. Salzman NP, Howley P.M., New York Plenum, 1-38.
- 72.- Matlashewski G. 1989. The cell biology of human Papillomavirus transformed cells. *Anticancer Res.* 9:1447-1456.
- 73.- Storey A., Osborn K. Crawford L. 1990. Co-transformation by human Papillomavirus type 6 and 11. *J. Gen. Virol.* 71: 165-171.
- 74.- Seedorf K., Oltersdorf P., Kramer G., Rowekamp W. 1986. Identification of early proteins of the human Papillomavirus type (HPV-16) and type 18 (HPV-18) in cervical carcinoma cells. *EMBO J.* 6:139-145.
- 75.- Kurman R.J., Schiffman M.H. Lancaster W.D. 1988. Analysis of individual human Papillomavirus types in cervical neoplasia. A possible role for type 18 in rapid progression. *Am. J. Obstet, Gynecol.* 159:293-296.
- 76.- Wright T.C., Richart R.M. 1989. Review. Role of human Papillomavirus in the pathogenesis of genital tract warts and cancer. *Gynecologic. Onc.* 37:151-164.
- 77.- Howley P. M. 1991. Role of the human papillomaviruses in human cancer. *Cancer Res.* 51:5019-5022.
- 78.- Villa L.L., Brentani R. R. 1990. Human papillomavirus up date. *Int. J. Cancer* 48: 163-166.
- 79.- Tindle R.W. 1996. Human papillomavirus vaccines for cervical cancer. *Current Opin Immunol.* 8: 643-650.
- 80.- Onda T., Kanda T., Zanma S. Yasugi T., Watanabe S. Kanawa T. Ueda K., Yoshikawa H., Taketani Y., Yoshiike K. 1993. Association of the antibodies Against Human Papillomavirus 16 E4 and E7 Proteins with Cervical Cancer Positive for Human Papillomavirus ADN. *Int. J. Cancer.* 54:624-628.
- 81.- Jochmus K.I., Scheneider A. Braum R., Kimming R., Koldovsky U., Scheneweis K.E., Seedorf K., Glasmann L. 1989. Antibodies Against the Human Papillomavirus type 16 Early proteins in Human Sera: Correlation

- of Anti-E7 Reactivity with Cancer Cervical. *J. Natl Cancer Inst.* 81: 1698-1704.
- 82.- Viscidi R.P., Sun Y., Tsuzaki B., Bosch F. X., Muñoz N., Shan K. V. 1993. Serologic Response in Human Papillomavirus-Associated invasive Cervical Cancer. *Int. J. Cancer*, 55:780-784
- 83.- Diller J., Lenner P., Lehtinen M., Eklund C., Heino C., Wilkud F., Hallmans G., Stendahl A. 1944. A Population-based Seroepidemiological Study of Cervical Cancer. 1994. *Cancer Res*, 54: 134-141.
- 84.- Ghosh A.k., Smith N.K., Stacey S.N., Glew S.S., Connor M.E., Arrand J.R., Stern P.L., 1993. Serological Response to HPV-16 in Cervical Dysplasia and Neoplasia: Correlation of antibodies to E6 with Cervical Cancer. *Cancer Res* 53: 591-596.
- 85.- Devesa, S. S., Young, J. L. Jr., Brinton, L.A., Fraumeni, J.F., Jr. 1989. Recent trends in cervix uteri cancer. *Cancer* 64:2184-90.
- 86.- Dillner J., Dillner L., Robb J., Willems J., Jones Y., Lancaster W., Smith R., Lerne rR. 1989. A synthetic peptides defines a serologic AgA response to Human Papillomavirus- encoded nuclear antigen expressed in virus carrying cervical neoplasia. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 3838-3941.
- 87.- Chambers M.A., Wei Z, Coleman N, Nash A.A., Stanley M.A. 1994. Natural presentation of human papillomavirus type 16 E7 protein to immunocompetent mice results in antigen-specific sensitization or sustained unresponsiveness. *Eur. J. Immunol* 24: 738-745.
- 88.- Stele J.C., Stankovic T, Gallimore P.H. 1993. Production and characterization of human proliferative T-cell clones Specific for human Papillomavirus type 1 E4 protein. *J. Virol.* 67: 2799-2806.
- 89.- Boon T. 1994. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 337-365.
- 90.- Cromme F.V., Meijer C.J.L.M., Kenemans P., Helmerhorst T., Stern P.L., van den Brule A.J.C., Walboomers J.M.M. 1993. Analysis of MHC class I and II expression in relation of presence of HPV genotypes in premalignant and malignant cervical lesions. *Br. J. Cancer.* 67:1372-1380.

- 91.- Glew S. S., Connor E. M., Snijders P. J. F., Stanbridge C. M., Buckley C. H., Walboomers J. M.M., Meijer C.J.L.M., Stern P. L. 1993. HLA Expression in pre-invasive cervical neoplasia in relation to human papilloma virus Infection. *Eur. J. Cancer*, 29: 1963-1970.
- 92.- Glew S. S., Duggan-Keen M., Cabrera T., Stern P. L.. 1992. HLA Class II Antigen expression in human papillomavirus- associated cervical cancer. *Cancer Research*, 52: 4009-40016.
- 93.- Carina G.J.M., Hilders M., Morgado M. I., Nooyen Y., and Jan F.G. 1995. Altered HLA expression by metastatic cervical carcinoma cells as a factor in impaired immune surveillance. *Gynecologic Oncology*. 57: 366-375
- 94.- Connor M. E., Stern P. L. 1990. Loss of MHC Class I Expression in Cervical Carcinomas. *Int. J. Cancer*. 46: 1029-1034.
- 95.- Kaklamanis L., Leek R., Koukourakis M., Gatter K. C., Harris A. L..1995. Loss of transporter in antigen processing 1 transport protein and major histocompatibility complex class I molecules in metastatic versus primary breast cancer. *Cancer Research*. 55: 5191-5194
- 96.- Hailei L. C., GrabrilovichD., Tamper R., Girgis K. R., Nadai S., Carbone D. P. 1996. A functionally defective allele of TAP-1 results in loss of MHC class I antigen presentation in a human lung cancer. *Nature Genetics*. 13: 210-213.
- 97.- Sanda, M.G., Restifo, N.P., Waish, J.C. 1995. Molecular characterization of defective antigen processing in human prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 85: 280-285.
- 98.- Restifo P., Nicholas, Esquivel F., Kawakam Y., Yewdell J. W., Mùle J. J., Rosenberg S. A., Bennink J. R. 1993 Identification of human cancer deficient in antigen processing. *J. Exp. Med.* 177: 265-272.
- 99.- Cromme F.V., van Bommel P.F.J., Walboomers J.M.M., Gallee M.P.W., Stern P.L., Kenemans P., Helmerhorst Th.J.M., Stukart M.J., Meijer C.J.L.M., 1994. Differences in MHC and TAP-1 expression in cervical cancer lymph node metastases as compared with the primary tumours. *Br. J. Cancer*. 69: 1176-1181.

- 100.- Keating P.J., Cromme F.V., Duggan-Keen M., P.J.F. Sniders, Walboomers J.M.M., Hunter R.D., Dyer P.A., Stern P.L. 1995. Frequency of down-regulation of individual HLA-A and -B alleles in cervical carcinomas in relation to TAP-1 expression. *Br. J. Cancer.* 72: 405-411.
- 101.- Cromme, F.V., Airey, J., Heemels, M.-T., Ploegh, H.L., Keating, P.J., Stern, P.L. Meijer, C.J.L.M., Walboomers, J.M.M. 1993. Loss of transporter protein, encoded by the TAP-1 gene, is highly correlated with loss of HLA expression in cervical carcinomas. *J. Exp. Med.* 179: 335-340
- 102.- Cromme, F.V., Snijders, P.J.F., van den Brule, A.J.C., Kenemas, P., Meijer, C.J.L.M., Walboomers, J.M.M. 1993. MHC class I expression in HPV 18 positive cervical carcinomas is post-transcriptionally controlled and independent from c-myc overexpression. *Oncogene.* 8: 2969-2975.
- 103.- Monroy, G.A., Rangel C.R., Rocha, Z.L., Trejo, B.C., Dario, M.R., Weiss S.B. 1992. Establecimiento de siete estirpes celulares provenientes de biopsias de cérvix normal y con cáncer cérvico uterino y sus diferentes contenidos y localizaciones de desmogleina 1. *Oncologia.* 7: 69-78.
- 104.- Monroy G.A., Mora G.M. L. 1994. Manual para cultivo *in vitro* de células tumorales. Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer. F.E.S. Zaragoza U.N.A.M.
105. Monroy, G. A., Mora G. L., Marure L.R. Flores B.F., Hernandez M. J. 1995. 1er. Curso Práctico de Técnicas Básicas Para el cultivo in vitro de Células. Manual de Técnicas Proliferación y Diferenciación celular. Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. U.N.A.M.
- 106.- Rebeca L.M., Fabián F.B., Jorge H.M. 1995. Manual de técnicas: 2° curso practico de técnicas básicas de Biología Molecular. Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza U.N.A.M.
- 107.-Monroy G.A., Ortiz N.F.V., Isibasi A.A., Chacón S.R., HeARNndez M.J., Flores B.F., Mora G. Ma.L., Alvarez C.R., Chavez B.A.D., Weiss S.B. 1997. Differential class I MHC allelic expression on cervical cancer cells infected with human Papillomavirus type 18. Sometido a revision

- 108.- Hilders G.J.M.C., Houbiers, G.A. Jos., Krul J.T.E., Fleuren G.J. 1994. The expression of Histocompatibility-related Leukocyte Antigens in the Pathway to cervical Carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.* 101: 5-12.
- 109.- Garrido, F., Cabrera, T., Concha, A., Glew, S., Ruiz-Cabello, F. Stern L.P. 1993. Natural history of HLA expression during tumor development. *Immunol. Today.* 14: 491-499.
110. Ehrlich Rachel. 1995. Selective Mechanisms utilized by Persistent and Oncogenic Viruses to Interfere with Antigen Processing and Presentation. *Immunol. Res.* 14:77-97
- 111.- Groettrup, M., Soza, A., Kuckelkorn, U., Kloetzel, P-M. 1996. Peptide antigen production by the proteasome: complexity provides efficiency. *Immunol. Today.* 17:429-434.
- 112.- Van Kaer L, Ashton-Rickard P.G., Eichelberg M., Gaczynska M., Nagashima K., Rock K.L., goldberg A.L., Doherty P.C. Tonegawa S. 1994. Altered peptidase and viral-specific T cell response in LMP mutant mice. *Immununity.* 1: 533-541.
- 113.- Fehling H.J., Swat W., Laplace C., Kühn R., Rajewsky K., Müller U., von Bohemer A. 1994. MHC class I expression in mice lacking the proteasome subunit LMP-7. *Science.* 265: 1234-1237.
- 114.- van Endert, P.M. 1996. Peptide Selection for Presentation by HLA Class I: A role for the Human Transporter Associated with Antigen Processing?. *Immunol Res.* 15: 256-279.
- 115.- Buchmeier m.J. zinkeARNgel R.M. 1992. Immunodominant T cell epitope from signal sequence. *Science,* 257: 1142-1144.
- 116.- Chacón Salinas Rommel. 1996. Obtención de péptidos a partir de moléculas del complejo Mayor de Histocompatibilidad clase I y Análisis de su expresión alélica en dos líneas celulares de carcinoma de cérvix humano. Tesis de Licenciatura en Biología, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Octubre
- 117.- Gao, L., Walter, J., Travers, P., Stauss, H., Chain, B.M., 1995. Tumor-associated E6 protein on human Papillomavirus type 16 contains an unusual H-2Kb - restricted cytotoxic T cell epitope. *J. Immuno.,* 155: 5519-5526.

- 118.- Burget H.G. , Kvist S. 1985. An adenovirus type 2 glycoprotein blocks cell surface expression of human histocompatibility class I antigens. *Cell*. 41: 987-997.
- 119.- Rotem-Yehudar R., Groettrup M., Soza A., Kloetzel, M P., Ehrlich R. 1996. LMP-associated Proteolytic Activities and TAP-dependent peptide transport for class I MHC molecules are suppressed in cell lines transformed by the highly oncogenic adenovirus 12. *J. Exp. Med.*, 183: 499-514.
- 120.- del Val Hengel H. 1992. Cytomegalovirus prevents antigen presentation by blocking the transport of peptide-loaded major histocompatibility complex class I into the medial-golgi compartment. *J. Exp. Med.* 176: 729-738.
- 121.- Wiertz E.J.H.J., Jones R.T., Sun L., Bogoy M., Geuze J.H., Ploegh L. H. 1996. The human Cytomegalovirus US11 gene product Dislocates MHC class I Heavy Chains from the Endoplasmic Reticulum to the cytosol. *Cell*. 84: 769-779.
- 122.- Hill A., Jugovic P. 1995. Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. *Nature*. 375: 411-415.
- 123.- Fröh K., Kawangseog A. 1995. A viral inhibitor of transporter for antigen presentation. *Nature*, 375: 415-418.
- 124.- Tindle Robert W. 1996. Human papillomavirus vaccines for cervical cancer. *Curr. Opin. Immunol.* 8:643-650.
- 125.- Bauer s., Heeg K., Wagner H., Lipford B.G. 1995. Identification of H-2Kb binding and immunogenic peptides from human papilloma virus tumor antigens E6 and E7. *Scand. J. Immunol.* 42: 317-323.
- 126.- Ferrone Soldano and Francesco M. M. (1995). Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: Molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance. *Immunology Today*. Vol:16 No. 10.
- 127.- Marincola, F.M. Shamamian, P. et al. 1994. Loss of HLA Haplotype and B locus Down-regulation in melanoma cells Lines. *J. Immunol.* 1153:1225-1237.

APENDICE

1.- Medio RPMI suplementado con Suero Fetal de Bovino (SFB): 90 ml de medio RPMI-1640 (Microlab, México) + 10 ml de SFB (HyClone, USA) homogeneizar, y manejar todo en esterilidad.

El SFB fue previamente desactivado a 56°C por 30 min.

2.- Medio de congelación: 9 ml de SFB (HyClone, USA) + 1 de Dimetil sulfoxido (DMSO) (Sigma, USA). Usarse fresco.

3.- CaCl_2 2M: 22.198g de CaCl_2 disolver en 100 de Agua esteril. Esterilizado por filtración con una membrana de 0.22 μm , guardar en alicuotas a -20°C.

4.- Solución amortiguadora HBSP 2X: 1.5 mM Na_2HPO_4 + 10mM KCl + 280mM NaCl + 12mM glucosa + 50mM hepes pH 7.0. Preparar 100 ml de amortiguador HBSP 2X y esterilizar por filtración en una membrana de 0.22 μm . Guardar en alicuotas de 5 ml a -20°C.

5.- RPMI-1640+geneticina: 900 μg de geneticina G418 por cada ml de medio suplementado con SFB.

6.- Agua con Dietilpirocarbonato (DEPC): tratar 1 lt. de Agua al 0.2% de DEPC durante 24 h a 37°C, al siguiente día se esteriliza por autoclave a 20 lb. por 15 min.

7.- Solución Amortiguadora para ARN: 50% de glicerol+0.4% de azul de bromofenol+0.4 de xileno cianol, preparar 10 ml.

8.- Gel de agarosa al 1% para ARN: Para 25 ml de agarosa colocar 0.2505 g. de agarosa+18.02 ml. de agua.+ 2.5 ml. amortiguador de corrida para ARN 10X + 4.47 ml de formaldehido, disolver la agarosa por ebullición.

**ESTA TESTIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

9.- Solución Amortiguadora de Electroforesis para ARN 10X (RB): MOPS 20.93g + Acetato de Sodio 0.41g + EDTA 1.861g., ajustar pH 7.0 y se lleva a 500 ml. con agua tratada con DEPC esterilizar por autoclave o filtrando por membrana. Para preparar 1X: tomar 100ml de esta solución + 900 ml de Agua con DEPC.

10.- Solución Amortiguadora de Citratos SSC 20X: Disolver 175.3 gr. de NaCl + 88.2 gr. de Citrato de Sodio en 800 ml de agua. Se ajusta a pH 7.0 y se afora a un lit. y se esteriliza en autoclave.

11.- Solución de hibridación: 6.25 ml de SSC 20X + 1 ml. Reactivo de Denhardt 50X + 0.25ml. SDS al 0.1% + 300µl de esperma de salmón + 4.75 de H₂O + 12.5 de formamida al 100%.

12.- Sephadex G-50: Lavar con suficiente agua destilada 5 g. de Sephadex G-50 para eliminar dextrán. Se guarda la resina en un frasco de 100 ml. con 80 ml. de amortiguador TE, esterilizar a 20 lb. durante 15 min. y se guarda a tem ambiente.

13.- Amortiguador T.E.: Tomar 5 ml de una solución 1 M, pH 8 de TrisHCl + 1 ml de EDTA 0.5 M, llevar a 500ml con agua esteril.

14.- Amortiguador TEN: 100 ml conteniendo 0.1 M de Tris-HCl pH 8.0, 0.01 M EDTA pH 8, 0.1 M NaCl.

15.- SDS al 0.1%: A 100ml de la solución SSC se le agregan 0.01g de SDS. Para pesar el SDS usar cubrebocas guantes y bata.

16.- Verseno: Tris Base 3.04 g + 8.00g NaCl + 0.40g KCl + 0.20 EDTA disolver en 800 ml de agua destilada. Ajustar pH 7.7 aforar a 100ml.

17.- Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS) 10X: 40g NaCl + 1g KCl + 5.75g Na_2HPO_4 + 1g KH_2PO_4 , disolver en 400 ml de agua destilada. Ajustar pH 7.2 , aforar a 500ml. PBS 1X: Tomar 100 ml de soln. 10X y llevar a 1 litro, esterilizar en autoclave.

18.- PBS al 2% de SFB: 9.8 ml de PBS 1X pH 7.0 + 200 μ l de SFB desactivado.

19.- 10 mg de Yoduro de Propidio en 1 ml de agua esteril bidestilada. preparar 10 ml. Almacenar protegido de la luz a 4°C.

20.- Tritón : Tris 0.5N pH 7.2 al 0.1% de tritón.

21.- Peroxidasa endógena: peróxido al 3% (0.5 ml de H_2O_2 + 4.5 ml de Agua destilada) tomar 1 ml de esta solución y agregar en 4 ml de Metanol absoluto, preparar al instante y en frío.

22.- Amortiguador de Coulter: 0.847g de NaCl + 0.373g K_2HPO_4 + 0.115g KH_2PO_4 , disolver en 80 ml de agua destilada, ajustar a pH 7.2 y se afora a 100 ml.

23.- La solución de SFB-amortiguador de Coulter (SFB-Coulter):1 ml de SFB + 4 ml de Amortiguador de Coulter, preparar 40ml y guardar en alícuotas a -20°C.

24.- La dilución del anticuerpo primario es de 1:20 ó 1:50 en SFB- Coulter.

25.- La dilución del anticuerpo secundario es de 1:100 en SFB- Coulter.

26.- Complejo Avidina-Biotina (Complejo ABC):1 ml de SFB-Coulter + 10 μ l de Avidina + 10 μ l de Biotina, preparar al instante, cubierto de la luz y mantenerse en hielo.

27.- Amortiguador para la diaminobencidina (Bu-DAB): 0.192 Na_2HPO_4 + 0.092 NaH_2PO_4 + 0.590 NaCl en 80 ml de agua destilada, ajustar a pH 7.0, aforar a 100 ml.

28.- Diaminobencidina: Disolver 10 mg de diaminobencidina en 10 ml de Bu-DAB (Apéndice 26a), guardar en alícuotas de 2 ml a -70°C .

29.-Solución de revelado DAB- H_2O_2 : 2 ml de DAB + 15 μl de Peróxido al 3%. El peróxido y la combinación de estas solución se preparan al instante, en frío y sin luz.