



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

Identificación de péptidos inmunogénicos de la
proteína L1 de HPV-16 y 18 para los alelos HLA-A
y B de pacientes con cáncer cérvico-uterino.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A:
ACOSTA ARAUJO ARTURO

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



LO MUNDANO ES
DE INFINITA DIVERSIDAD

DIRECTOR DE TESIS: DR. ALBERTO MONROY GARCIA
LABORATORIO DE INMUNOBIOLOGIA

MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 mi madre: Martha Araujo González.

Al final de esta etapa de mi educación profesional, estoy muy agradecido por el apoyo incondicional, tanto en mis momentos buenos y malos de mi vida. Gracias Mamá por el gran esfuerzo y sacrificio que realizaste para que yo pudiera continuar con mis estudios y yo lograra conseguir ser alguien en la vida. ¡Gracias!

A mis hermanos: Miguel y Ángela.

Agradezco el apoyo y el cariño que me brindaron durante todo el tiempo que tuvieron que soportarme cuando vivíamos juntos.

A mi esposa e hijo: María Elena Pérez Pantoja y David Acosta Pérez.

Agradezco infinitamente el amor que me han brindado todo este tiempo.

A mis tíos: Salvador, Ignacio, Enrique, Juan y Armando.

Agradezco el apoyo incondicional y los consejos que me dieron cuando trabajaba con ustedes en la herrería.

A mi prima: Alejandra.

Gracias por los consejos, el apoyo y el cariño que me brindaste desde que éramos niños.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE

1. Resumen.	1
2. Introducción.	3
3. Marco teórico.	6
3.1 Sistema inmune.	6
3.1.1. Principios de inmunidad.	6
3.1.2. Inmunidad innata.	6
3.1.3. Inmunidad adaptativa.	7
3.1.4. Inmunidad humoral.	8
3.1.5. Inmunidad mediada por células.	9
3.2. Procesamiento y presentación de antígenos por moléculas MHC.	10
3.2.1. Estructura de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad.	11
3.2.2. Procesamiento de antígenos.	12
3.2.3. Expresión de moléculas MHC los diferentes tejidos.	14
3.2.4. Etapas del procesamiento y presentación de antígenos por las moléculas MHC-I.	15
A) Generación de péptidos.	15
B) Translocación de péptidos del citoplasma al Retículo Endoplásmico.	18
C) Estabilización y ensamblaje de moléculas MHC-I.	20
D) Glicosilación del MHC-I y transporte a la membrana.	22
3.3. Cáncer cérvico uterino y su etiología con el virus del papiloma humano (HPV).	24
3.4 Estructura y nomenclatura del virus del papiloma humano.	26
3.5 Infección de HPV y expresión de sus genes.	28
3.6. Ciclo replicativo del virus del papiloma humano.	31
3.7. Desarrollo de vacunas terapéuticas contra cáncer cérvico-uterino basadas en péptidos sintéticos.	35
4. Planteamiento del problema.	37
5. Hipótesis.	38
6. Objetivos.	39
7. Materiales y métodos.	40
7.1 Predicción de epítopes de la proteína L1 de HPV-16 y 18.	40
7.2. Síntesis de péptidos.	41
7.3. Obtención de biopsias tumorales y muestras de sangre venosa de pacientes con neoplasias preinvasivas e invasivas.	42
7.4. Tipificación de HPV en las biopsias de tumores de cáncer cervical.	42

7.5. Obtención de linfocitos T a partir de sangre periférica de pacientes con cáncer y donadoras normales.	43
7.6. Cultivo de linfocitos T de sangre periférica de pacientes con cáncer y donadoras normales.	43
7.7. Identificación de los péptidos antigénicos de L1 de HPV-16 y 18.	44
7.8. Cosecha y conteo de linfocitos T de pacientes con cáncer y donadoras normales.	44
8. Resultados.	45
8.1. Frecuencias alélicas HLA clase I de las pacientes con cáncer cérvico uterino (CaCu) y donadoras normales.	45
8.2. Ensayos de estimulación de linfocitos T de pacientes con cáncer cervical y donadoras normales con péptidos sintéticos.	51
8.2.1. Estimulación de linfocitos T con péptidos específicos derivados de las proteínas L1 de HPV-16 y 18 para el alelo HLA-A2.	51
8.2.2. Estimulación con péptidos específicos para el alelo HLA-A24.	57
8.2.3. Estimulación de linfocitos T con péptidos específicos para el alelo HLA-B35....	60
8.2.4. Estimulación de linfocitos T con péptidos específicos para el alelo HLA-B39....	65
8.3. Homología de péptidos antigénicos de las proteínas L1 de HPV-16 y 18 encontrados en este estudio, con péptidos derivados de L1 de otros tipos de HPV....	69
9. Discusión.	72
10. Conclusiones.	77
11. Perspectivas.	78
12. Apéndice.	80
13. Referencias.	81

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

ABREVIATURAS.

MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad.
CaCu	Cáncer Cérvico-Uterino.
HPV	Virus del Papiloma Humano.
HLA	Antígeno Leucocitario Humano.
CTL	Linfocitos T Citotóxicos.
KDa	KiloDaltones.
CPA	Células Presentadoras de Antígenos.
β_2 -m	β_2 -Microglobulina.
TAP	Transportadores Asociados al Procesamiento de Antígenos.
IFN	Interferon.
Ub	Ubiquitina.
ATP	Adeniltrifosfato.
RE	Reticulo Endoplásmico.
TCR	Receptor de Células T.
HSV	Virus del Herpes Simple.
NIC	Neoplasia Intraepitelial.
RLC	Región Larga de Control.
VLP	Partícula Propia del Virus.
L	Gen de Transcripción Tardía.
E	Gen de Transcripción Temprana.
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
IP	Índice de Proliferación.
SFB	Suero Fetal de Bovino.
INFLUA-A	Matriz de Influenza-A.
Ig	Inmunoglobulina.

ABREVIATURAS DE LOS AMINOÁCIDOS.

A	Alanina.	M	Metionina.
B	Asparagina.	N	Asparagina.
C	Cistaina.	P	Prolina.
D	Aspartato.	Q	Glutamina.
E	Glatamato.	R	Arginina.
F	Fenilalanina.	S	Serina.
G	Glicina.	T	Treonina.
H	Histidina.	V	Valina.
I	Isoleucina.	W	Triptófano.
K	Lisina.	Y	Tirosina.
L	Leusina.	Z	Glutamato.

1. RESUMEN.

Los linfocitos T citotóxicos (T CD8⁺) juegan un papel importante en la respuesta inmunológica del huésped hacia células infectadas con virus, células tumorales, patógenos intracelulares y cáncer. Los linfocitos T CD8⁺, vía su receptor, reconocen péptidos de 8 a 9 aminoácidos que provienen de proteínas virales o mutadas que se sintetizan en el citosol de las células blanco, y que son presentados por moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC-I). Por otro lado, tomando en consideración que el cáncer cérvico uterino (CaCu) se asocia fuertemente con la infección del HPV, principalmente HPV-16 y 18, y que péptidos derivados de proteínas de estos virus pueden funcionar como antígenos en la activación de linfocitos T de pacientes con cáncer cervical avanzado, el presente trabajo se realizó con la finalidad de identificar a los péptidos de la proteína L1 de HPV-16 y 18 con actividad antigénica específica para moléculas MHC-I frecuentemente expresadas en la población mexicana (alelos HLA-A2, -A24, -B35 y -B39).

De acuerdo a un programa computacional de predicción por algoritmos, fueron sintetizados 24 péptidos derivados de la proteína L1 de HPV-16 y 18 que presentaron las afinidades más fuertes para los alelos HLA-A2, A24, B35 y B39. Estos péptidos fueron utilizados en la evaluación de la respuesta proliferativa de linfocitos T de sangre periférica de 32 pacientes con CaCu avanzado. Los péptidos que indujeron fuerte estimulación fueron los siguientes: P3(YLRREQMFV) derivado de la proteína L1 de HPV-16 y P15(ILFLRNVNV) derivado de la proteína L1 de HPV-18, estimulando a los linfocitos de 7 de 19 pacientes cada uno que presentaron el alelo HLA-A2. Los péptidos P4(DYKQTQLCL) y P5(FYNPDTQRL) derivados de la proteína L1 de HPV-16 estimularon a los linfocitos de 3 de 8 pacientes con CaCu que presentaron el alelo HLA-A24. El péptido P8(VPKVSGLQY) derivado de la proteína L1 de HPV-16 y el péptido P20(IPKVSAYQY) de HPV-18 estimularon a los linfocitos de 7 de 15 pacientes cada uno que presentaron el alelo HLA-B35. Finalmente, el péptido

P10(IHSMNSTIL) derivado de la proteína L1 de HPV-16 estimuló a 5 de 6 pacientes con CaCu que presentaron el alelo HLA-B39. De manera interesante, se observó que algunos de estos péptidos antigénicos estimularon de manera cruzada a los linfocitos de pacientes que presentaron positividad ya sea para HPV-16, HPV-18, HPV-16/18, con otro tipo de HPV diferente a HPV-16/18 e incluso a los linfocitos de una paciente negativa para HPV en su biopsia tumoral; de hecho se observó activación de linfocitos T de algunas donadoras normales utilizadas en este estudio. Estas respuestas pueden deberse a las homologías entre las secuencias de la proteína L1 de HPV-16 y 18 con secuencias de otros tipos de HPV. Asimismo, a través de un análisis comparativo de los péptidos de las proteínas L1 de HPV-16 y 18 que resultaron ser fuertes antígenos en las pacientes analizadas, con secuencias de las proteínas L1 de diferentes tipos de HPV's, se obtuvo que algunos de estos péptidos presentan homologías hasta de un 89% con péptidos derivados de otros tipos de papiloma humano asociados tanto con lesiones epiteliales benignas, verrugas, condiloma acuminado, epidermodisplasia verruciforme, etc. Lo cual nos permite sugerir la importancia que pueden tener estos péptidos antigénicos en el empleo de vacunas profilácticas y tratamiento de varias enfermedades producidas por diversos tipos de papiloma humano.

2. INTRODUCCIÓN.

El carcinoma cérvico-uterino (CaCu) representa la neoplasia más frecuente en México y constituye una de las principales causas de muerte de cáncer en el país (Silva *et al*, 1999). Existen varios estudios que indican que uno de los factores etiológicos más importantes asociados al desarrollo del CaCu es el virus del papiloma humano (HPV), el cual se encuentra en más del 90% de los tumores de CaCu (Keerti y Howley, 1990; Howley, 1991; Muñoz, 1997; Wheeler, 1997) El HPV es el principal factor responsable de la asociación entre cáncer de cérvix y enfermedades de transmisión sexual, pudiendo ser un agente causal de esta enfermedad. La infección por HPV parece que desempeña un importante papel en el proceso de transformación maligna del epitelio escamoso cervical (Ayala *et al*, 1991). Aproximadamente en un 53% de las neoplasias intraepiteliales hay datos que confirman la infección por HPV, y se han encontrado partículas virales (ADN o proteínas) en el 97% de los cánceres invasores (Brady *et al*, 1999).

Los pacientes con infección del HPV-16 y 18 tienen un riesgo mayor de tener una displasia severa o cáncer invasor, en relación con otros tipos de HPV. Actualmente, se llevan acabo estudios para estratificar a las mujeres en grupos de seguimiento y tratamiento basándose en la tipificación del HPV. Aparentemente, la penetración del genoma viral en la célula del epitelio induce mutaciones que se replican en generaciones celulares sucesivas, favorecidas por una serie de cofactores (factores de huésped como los tipos de antígenos de histocompatibilidad y de respuesta inmunológica), y que pueden desencadenar el fenómeno neoplásico con capacidad invasora (Alonso *et al*, 2000). Los tumores y las infecciones virales presentan un especial problema en el reconocimiento por el sistema inmune; debido a agentes etiológicos (virus u oncogenes desregulados) los cuales están ocultos en el interior de las células autólogas. Además, el mecanismo inmune humoral tales como los anticuerpos y el complemento son generalmente inefectivos contra tumores o virus intracelulares. Estos problemas pueden ser solventados por el complejo mayor de histocompatibilidad clase I

(MHC-I) via presentación de antígenos, los cuales son muy activos en la mayor parte de las células somáticas. Por este camino, los fragmentos de proteínas celulares se unen a las moléculas MHC-I y son transportadas a la superficie celular. Usualmente sólo los péptidos autólogos son presentados por las moléculas MHC-I de manera natural, y estos son ignorados por el sistema inmune. Sin embargo, cuando las células que sintetizan proteínas extrañas, como ocurre cuando una célula es infectada por un virus, las células efectoras pueden ser estimuladas (York y Kenneth, 1996).

La detección de péptidos que derivan de las proteínas intracelulares mutadas o virales en las células tumorales y que son presentadas por el MHC-I en la membrana celular es llevada a cabo por los linfocitos T citotóxicos (CTL) (Robey y Fowlkes, 1994). Los CTL son altamente específicos para reconocer a péptidos extraños. Estudios recientes han demostrado que péptidos derivados del HPV-16 son capaces de estimular CTL *in vivo* e *in vitro* en modelos de ratón. Otros péptidos son además capaces de estimular CTL humanos contra líneas celulares con cáncer cervical positivas para HPV-16 (Ressing *et al*, 1996; Castellanos *et al*, 2001). Actualmente varios protocolos de estudios inmunológicos en el CaCu se han enfocado en investigar a los péptidos sintéticos antigénicos derivados de proteínas E6 y E7 del HPV-16 y 18, y que presentan una alta actividad de unión con moléculas HLA clase I (del inglés Antígenos Leucocitarios Humanos). Estos estudios muestran que los péptidos sintéticos de las proteínas E6 y E7 son capaces de inducir activación de CTL de sangre periférica de pacientes con CaCu (Castellanos *et al*, 2001). Recientes estudios con modelos animales de enfermedades asociadas al virus del papiloma humano proponen el desarrollo de vacunas profilácticas contra HPV-16. Estos estudios han demostrado efectos protectivos generados por la inmunización con partículas propias del virus (VLPs) compuestas de la proteína principal de la cápside viral, L1. Además los experimentos aportan una inminente evidencia de respuesta en la neutralización de anticuerpos contra la proteína L1 y que es suficiente para la protección contra la enfermedad del virus del papiloma humano (White *et al*, 1999 y Suzich *et al*,

1995). Es por ello que en este estudio nos enfocamos al estímulo de linfocitos T con péptidos sintéticos derivados de la proteína L1 del HPV-16 y 18 altamente asociados con CaCu específicos para los alelos HLA-A2, A24, B35 y B39 (frecuentemente expresados en la población mexicana) en pacientes con cáncer cérvico-uterino. Estas proteínas virales constituyen la vía de entrada del virus a la célula huésped, debido a que forman parte principal de la cápside viral y tienen un papel importante en el inicio de la infección en el epitelio cervical y en la propagación de la enfermedad. Resulta factible que la identificación de péptido antigénicos de estas proteínas pueden utilizarse en protocolos de inmunoterapia profiláctica para evitar el desarrollo de esta neoplasia.

3. MARCO TEÓRICO.

3.1. SISTEMA INMUNE.

3.1.1. Principios de inmunidad.

La inmunidad (de la palabra latina *immunitas*) significa protección frente a la enfermedad infecciosa (Abbas *et al*, 1999). En comparación con la inmensa variedad de formas que presentan los organismos invertebrados, todos los vertebrados responden a un sistema básico de organización bastante uniforme y se encuadran dentro de un único tipo, los cordados. Pese a la considerable divergencia evolutiva que existe dentro del conjunto de vertebrados, entre los que se encuentran los peces sin mandíbula, los peces cartilaginosos, los peces teleósteos (provistos de mandíbula), los anfibios, los reptiles, las aves y los mamíferos, los componentes celulares y moleculares básicos de los sistemas inmunitarios previos de los gnatóstomos (especies con mandíbulas) se encuentran bien preservados. Sin embargo, la creciente especialización de los tejidos linfoides y de las funciones linfocitarias, junto con la mayor variedad de clases de inmunoglobulinas, parecen ser propios de los niveles superiores de organización. Los sistemas inmunitarios más complejos estructural y funcionalmente son los de los mamíferos (Roitt *et al*, 2000). La inmunidad es mediada por una variedad de diferentes células y moléculas, que son responsables de dos diferentes, pero interrelacionadas, formas de inmunidad: la inmunidad innata y adaptativa.

3.1.2. Inmunidad Innata.

Los sistemas de defensa con reconocimiento no clonal son llamados inmunidad innata, debido a que todas las células que se diferencian de la célula progenitora tiene la misma capacidad de respuesta, la cual no se adapta o cambia a una particular infección (Austyn *et al*, 1993). El sistema inmune innato incluye un grupo de leucocitos llamados fagocitos, el cual comprende al linaje monocito-

macrófago y a los polimorfonucleares o granulocitos (neutrófilos, basófilos y eosinófilos). Asimismo, también incluye a otro grupo de células llamadas asesinas naturales que son capaces de destruir a células infectadas con virus, a células embrionarias o células tumorales. Aunado a ello, el sistema innato también incluye megacariocitos que producen plaquetas, están involucradas en la coagulación sanguínea y en la respuesta inflamatoria, la cual frecuentemente ocurre cuando hay alguna infección, conduciendo a los síntomas clásicos de dolor, calor enrojecimiento e hinchazón. Los principales tipos celulares vistos en la respuesta inflamatoria en su fase inicial son los neutrófilos, seguidos por los macrófagos (Ratcliffe *et al*, 1998; Van Furth, 1993).

El sistema inmune innato por medio de los fagocitos es la primera línea de defensa contra muchos de los microorganismos más comunes y son tan esenciales para el control de muchas de las infecciones más comunes ocasionadas por bacterias. No obstante, estas infecciones no siempre pueden ser eliminadas (Janeway, 1994).

3.1.3. Inmunidad adaptativa.

El sistema inmune innato provee la primera línea de defensa contra muchos de los microorganismos más comunes, sin embargo, esta no siempre elimina la infección y no puede reconocer a muchos patógenos. Cuando la primera línea de defensa fracasa, entran en acción los linfocitos del sistema inmune adaptativo, compuesto por linfocitos T y B. Se caracteriza por la especificidad celular y la generación de memoria para contrarrestar el efecto del patógeno en un segundo ataque, desarrollando varias formas de defensa y que también provee un incremento en el nivel de protección de una subsecuente re-infección con el mismo patógeno (Janeway, 1994; Roitt, 1991). La activación de los linfocitos, depende críticamente de su interacción con células fagocíticas quienes además de procesar, muestran fragmentos de antígenos a los linfocitos (Abbas *et al*, 1991). Por tanto, los millones de linfocitos en el organismo pueden

dar lugar a millones de especificidades y sólo aquel linfocito que encuentra un antígeno para el cual su receptor se une, será activado a proliferar y diferenciarse a células efectoras. Por lo tanto la especificidad dada en la respuesta inmune adaptativa se basa en la teoría de la selección clonal propuesta por McFarlane Burnet. La respuesta inmune adaptativa está dada por dos vías reconocimiento antigénico llevadas a cabo por los linfocitos B y T, los cuales confieren la inmunidad humoral y celular respectivamente (Roitt, 1991).

3.1.4. Inmunidad humoral.

La respuesta inmune humoral se lleva a cabo por medio de la generación de anticuerpos (inmunoglobulinas), las cuales son producidos por las células B y son específicos de la respuesta inmune, son encontrados en los fluidos de los componentes sanguíneos, o plasma, y en fluidos extracelulares. Las inmunoglobulinas son moléculas que presentan forma de "Y", presentan sitios que son altamente variables de una molécula a otra. Están constituidas por cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas (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, proporcionando una variedad requerida para el reconocimiento de antígenos específicos.

Las regiones constantes de la cadena pesada (tronco de la Y), son codificadas por segmentos genéticos contiguos, los cuales definen las clases de los anticuerpos que determinan las propiedades funcionales, la unión de estas cadenas con una cadena ligera (κ o λ) constituye un isotipo; en el humano existen cinco tipos de isotipos de anticuerpos (IgM, IgG, IgA, IgE e IgD) los cuales tienen propiedades distintas, como en el caso de IgM, IgG3 e IgG1 que activan el complemento, y de IgM e IgG que aglutinan bacterias y precipitan antígenos solubles haciéndolos más accesibles a las células fagocíticas (Weissman *et al.*, 1993; Nossal, 1993; Abbas *et al.*, 1994; Moreno, 1996 y Janeway *et al.*, 1997).

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 posteriormente procesar y presentar a los antígenos (Figura 1) (Paul, 1993; Moreno, 1996).










	INMUNIDAD HUMORAL	INMUNIDAD MEDIADA POR CÉLULAS	
ANTÍGENO	 Bacterias extracelulares	 Microorganismos intracelulares en el macrófago	 Microorganismos intracelulares (p. ej. virus) replicándose en una célula infectada
LINFOCITOS RESPONDEDORES	 LINFOCITO B	 LINFOCITO T	 LINFOCITO T
MECANISMOS EFECTORES	Anticuerpo secretado  Eliminación de bacterias	 Activación del macrófago, muerte del microorganismo	 Lisis de la célula infectada
TRANSFERIDO POR	Suero (anticuerpos)	Linfocitos	Linfocitos

Figura 1. Tipos de inmunidad específica. En la inmunidad humoral, los linfocitos B secretan anticuerpos para eliminar a los microorganismos extracelulares. En la inmunidad mediada por células, los linfocitos T activan a los macrófagos para matar a los microorganismos intracelulares o destruir a las células infectadas (p. Ej., células infectadas por virus). Tomado de Abbas *et al*, 1999.

3.1.5. Inmunidad mediada por células.

Las células T pueden reconocer y responder a un antígeno proteico extraño solamente cuando un fragmento peptídico de la proteína extraña es presentado como un Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) en la superficie de una célula diana apropiada. Por lo tanto, la inmunidad mediada por células se dirige a las células (o a su cercanía) que llevan los antígenos extraños en su superficie, y las reacciones inmunitarias mediadas por células son de gran importancia

fisiológica para erradicar a los microorganismos o los virus que viven en el interior de las células, es decir, dentro de las Células Presentadoras de Antígeno (Abbas *et al* 1999). Las mismas bacterias, patógenos y parásitos, y otros virus, se replican dentro de la célula, por lo tanto estos patógenos no pueden ser detectados por los anticuerpos. La destrucción de estos invasores es función de los Linfocitos T, los cuales son los responsables de la respuesta inmune mediada por células (Figura 1)

Las reacciones mediadas por las células dependen de las interacciones directas entre los linfocitos T y las células presentadoras de antígeno. La acción de los linfocitos T citotóxicos es más directa. Estas células reconocen a las células infectadas con virus, los cuales se replican en el interior de las células para usar la maquinaria de síntesis de la célula. La replicación del virus eventualmente mata a la célula, liberando nuevas partículas de virus. Los antígenos derivados de la replicación del virus, no obstante, son entre tanto, mostrados en la superficie de la célula infectada, y estos son reconocidos por las células T citotóxicas. Estas células pueden tener un control sobre la infección y matar a la célula infectada antes de que la replicación viral se complete (Figura 1) (Janeway *et al*, 1997)

3.2. Procesamiento y presentación de antígenos por moléculas MHC.

Los efectos de los linfocitos T citotóxicos dependen de las interacciones con las células que contienen proteínas extrañas. En otros casos, estas células T citotóxicas reconocen blancos por detección de fragmentos de péptidos derivados de estas proteínas extrañas que se unen a moléculas de superficie. Estas moléculas de superficie exhiben péptidos antigénicos para las células T son llamadas moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC). Las células T auxiliares, en contraste, reconocen e interactúan con células B que se unen e internalizan antígenos extraños vía inmunoglobulinas de superficie.

3.2.1. Estructura de las Moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase I.

Las Moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) clase I consisten de una cadena peptídica pesada de 43 kDa unida en forma no covalente a una molécula más pequeña de 11 kDa, llamado β_2 -microglobulina (β_2 -m). La parte extracelular de la cadena pesada está organizada en tres dominios globulares (α_1 , α_2 y α_3), que hace protrusión desde la superficie celular; una sección hidrófoba ancla la molécula en la membrana y una secuencia corta hidrófila introduce el extremo C-terminal en el citoplasma (Figura 2) (Roitt, 1991; Janeway *et al*, 1997). La cadena pesada es codificada en el locus del MHC (cromosoma 6). La cadena pesada es extremadamente polimórfica (Parham *et al*, 1995). La proteína β_2 -m, de aproximadamente 100 aminoácidos, no está glicosilada y se codifica en el cromosoma 15. Hay aparentemente poca significancia en el polimorfismo en β_2 -m, aunque esto puede afectar la estructura clase I o la unión del péptido, por que pueden cambiar el reconocimiento de los CTL al reconocimiento de un mismo antígeno (Perarnau *et al*, 1990). La β_2 -m hace un contacto en los tres dominios de la cadena pesada (Bjorkman *et al*, 1987). La conformación de la cadena pesada depende de la presencia o ausencia de la β_2 -m. La región proximal α_3 de la cadena pesada es un dominio de inmunoglobulina que contiene un sitio de unión de la molécula cooperadora CD8 del receptor del linfocito. Los dominios α_1 y α_2 , los cuales están distantes de la membrana, interactúan con los receptores de las células T, junto con el pliegue en forma de surco que se une al repertorio de péptidos. Una lámina beta plegada forma la base de la hendidura y las paredes están hechas de dos hélices alfa (Figura 1). El polimorfismo de la cadena pesada ocurre en aquellos residuos alrededor de esta hendidura, y de esta manera, esto altera la unión del péptido específicamente a las moléculas clase I (Parham *et al*, 1995 y Bjorkman *et al*, 1987).

Por otra parte, las cadenas α y β de clase II se encuentran en el RE unidas a un polipéptido denominado cadena invariante (Ii). Esta proteína está codificada por un gen ajeno al MHC. El complejo $\alpha\beta$ -Ii es transportado a través del aparato de Golgi hasta un compartimiento endosómico o lisosómico de naturaleza ácida, en donde se disocia Ii. El complejo $\alpha\beta$ permanece en este compartimiento durante 1-3 horas, antes de alcanzar la superficie celular (Roitt *et al*, 2000).

3.2.2. Procesamiento de antígenos.

Puesto que tanto las células T CD4⁺ como CD8⁺ reconocen complejos péptido-MHC que sólo están presentes sobre la superficie de las células blanco, parece claro que la activación de las células T por el antígeno requiere de la participación de otras células llamadas células accesorias (macrófagos, células B y células dendríticas). Estas células accesorias realizan funciones importantes en la activación de células T CD4⁺. Las células accesorias son células presentadoras de antígeno (APC), es decir transforman antígenos proteicos en péptidos generados en los organelos del citoplasma mediante proteólisis (la cual se lleva a cabo en el proteasoma) antes de entrar a la vía exocítica que transporta el complejo péptido-MHC a la superficie celular, en una forma capaz de ser reconocida por las células T CD4⁺. La transformación por las APC de proteínas nativas en fragmentos peptídicos asociados al MHC, se le denomina procesamiento de antígeno (Abbas *et al*, 1999).

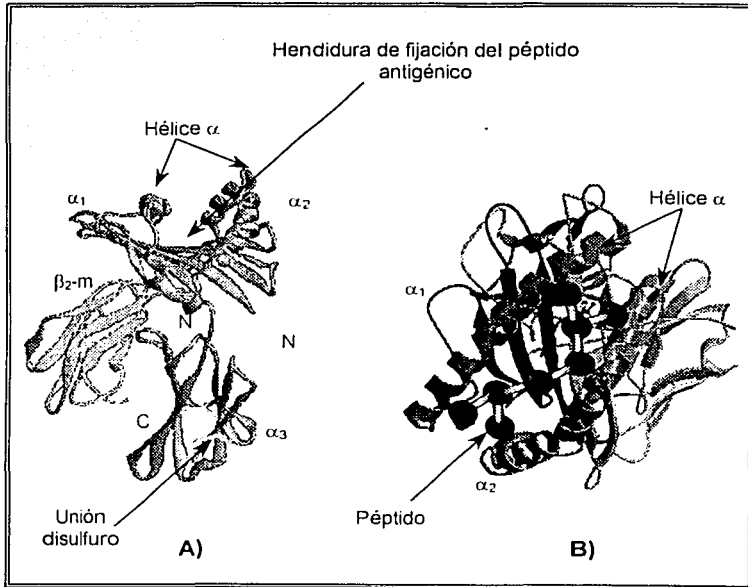


Figura 2. Estructura de la Molécula de Histocompatibilidad Clase I. A) La porción extracelular de la molécula (vista lateral) se dibujó con su extremo distal a la membrana celular en la parte superior y su porción proximal abajo. No se muestran los dominios transmembranales e intracitoplasmático. La β_2 -microglobulina y el dominio α_3 sirven de apoyo a una estructura activa formada por los dominios α_1 y α_2 . Este sitio activo consiste de una plataforma β , en donde descansan dos hélices α que forman una hendidura, en donde se ajusta el fragmento peptídico del antígeno procesado. N indica el extremo terminal y C el extremo carboxilo. B) Sitio de presentación de péptidos en una MHC de clase I (vista superior), según la interpretación de estudios cristalográficos, tal como sería visto por el receptor T. Tomado de <http://www.rcsb.org/Pdb/cgi/explore>.

3.2.3. Expresión de moléculas MHC entre los diferentes tejidos.

Las moléculas MHC-I y MHC-II, son expresadas de manera diferencial entre los diferentes tejidos: esencialmente, todas las células nucleadas expresan moléculas MHC-I, las cuales se expresan abundantemente en células linfoides; en menor cantidad en hígado, riñón; y en poca cantidad en el cerebro y músculo esquelético (Tabla 1) (Germain *et al*, 1993; Heemels *et al*, 1995; Janeway *et al*, 1997). Las moléculas clase II se encuentran más restringidas, encontrándose asociadas especialmente a los linfocitos B, células presentadoras de antígeno (CPA's), como son; Células de Langerhans, dendríticas foliculares, macrófagos y células epiteliales del timo (Tabla 1) (Unanue *et al*, 1987; Neefjes *et al*, 1992; Moreno, 1996).

TEJIDO	MHC CLASE I	MHC CLASE II
Tejidos linfoides		
Linfocitos T	+++	+
Linfocitos B	+++	+++
Macrófagos	+++	++
Células de Lanhergans	+++	+++
Células epiteliales del timo	+	+++
Otras células nucleadas		
Neutrófilos	+++	-
Hepatocitos	+	-
Riñón	+	-
Cerebro	+	-
Células no nucleadas		
Eritrocitos	-	-

Tabla 1. Expresión de moléculas MHC-I en diferentes tejidos. Tomado de Janeway *et al*, 1997.

3.2.4. Etapas del procesamiento y presentación de antígenos por las moléculas MHC-I.

Se han descrito cuatro diferentes etapas que forman parte del mecanismo de procesamiento y presentación de antígenos por medio de las moléculas MHC clase I. Las etapas son las siguientes A) generación de péptidos en el citoplasma; B) transporte de péptidos hacia el interior del retículo endoplásmico; C) estabilización y ensamblaje de las moléculas MHC-I; y D) glicosilación del complejo MHC-I/péptido y su transporte hacia la membrana celular (Figura 3).

A) Generación de péptidos.

La principal fuente de péptidos que se unen a moléculas MHC-I, deriva de proteínas sintetizadas por los ribosomas celulares. No obstante, las proteínas introducidas en el citosol, ya sean de manera artificial o durante el proceso de infección viral o bacteriana, pueden también contribuir a la generación de péptidos antigénicos para ser presentados por las moléculas MHC-I. La mayor parte de la actividad proteolítica que ocurre en el citosol, es atribuida a los proteasomas, quienes se encargan de dirigir a las proteínas citosólicas para producir péptidos de 8-10 residuos de longitud (Goldberg *et al*, 1992; Benham *et al*, 1995; Lenhner *et al*, 1996; Matsumara *et al* 1992) (Figura 3).

Un proteasoma es un complejo multicatalítico con un peso molecular entre 650 a 700 kDa (Goldberg *et al*, 1992). Basado en el coeficiente de sedimentación, este complejo es referido también como 20S. Este complejo multienzimático consiste de 28 diferentes subunidades arregladas en 4 anillos conformados por siete subunidades cada uno; las subunidades que componen a los dos anillos centrales se conocen como subunidades β y las subunidades que componen a los anillos de los extremos, son las subunidades α (Löwe *et al*, 1995; Yang *et al*, 1996) (Figura 3).

Las subunidades catalíticas más conocidas del proteasoma corresponden a dos polipéptidos de bajo peso molecular, conocidos como LMP-2 y LMP-7. Los genes que codifican a estas estructuras se encuentran localizadas dentro de la región del MHC-II, muy cercanos a los genes que codifican para los Transportadores Asociados al Procesamiento de Antígenos (TAP's); su limitada naturaleza polimórfica y su expresión inducida por el IFN- γ , son propiedades compartidas por la mayoría de los componentes que se encuentran involucrados en la presentación de antígenos. Se ha observado que los LMP's pueden alterar la actividad proteolítica del proteasoma y favorecer la generación de péptidos que se asocian a las moléculas MHC (Martínez *et al*, 1991; Niderman *et al*, 1995; Groettrup *et al*, 1996 Brown *et al*, 1991).

Otra forma de proteasoma es la 26S, constituida básicamente por el proteasoma 20S y otras subunidades adicionales, por ejemplo el activador PA28 (también referido como regulador 11S) cuyo peso molecular es de 29-31 kDa. Se ha visto que PA28 se une a un extremo del proteasoma 20S, asimismo este compete con otro regulador, el 19S, el cual también se une al proteasoma 20S para conformar el proteasoma 26S que en conjunto pesa alrededor de 1,500 kDa (Hoffman *et al*, 1994). Se ha visto que los activadores PA28 y el regulador 19S están en equilibrio dinámico con el proteasoma 20S, de hecho ambos reguladores sinergizan con las subunidades LMP-2/LMP-7 para aumentar la proteólisis conjuntamente después de la presencia de un aminoácido hidrofóbico en ausencia de la proteína blanco (Hoffman *et al*, 1994; Ustrell *et al*, 1995) (Figura 3).

La degradación de muchas proteínas celulares es iniciada por su modificación por un pequeño polipéptido llamado ubiquitina (Ub); la ubiquitina, se une mediante un enlace isopeptídico, a su sustrato y hacia otras ubiquitinas a través de los residuos de lisina (K). Este proceso requiere de ATP y de varias enzimas que activan a la ubiquitina para interactuar con el sustrato proteico: E1, enzima activadora de la ubiquitina; E2, enzima acarreadora de proteínas; y E3,

ligasa de la Ub-proteínas. De esta manera, la ubiquitina marca a las proteínas para su posterior degradación por el complejo 26S (Groettrup *et al.* 1996).

Las subunidades reguladoras del proteasoma 20S están constituidas por varias proteínas accesorias para favorecer la degradación de las proteínas blanco-ubiquitinadas: estas incluyen un receptor de Ub (Rub), el cual funciona como un sitio de unión para cadenas multiubiquitinadas y una isopeptidasa, para la reunión de residuos de ubiquitina (Hochstrasser, 1995). Además las unidades reguladoras también contienen, al menos seis distintas, pero relacionadas, proteínas de la familia de las ATPasas. Se piensa que estas ATPasas interactúan con las subunidades del proteasoma 20S. Después de la degradación de las proteínas blanco a péptidos, los péptidos deben ser protegidos del ataque de exopeptidasas citosólicas y dipeptidil-peptidasas que los hidrolizan a aminoácidos libres; se piensa que uno de los candidatos idóneos en la participación de los péptidos sean las proteínas de choque térmico (Hsp 70/90), las cuales funcionan normalmente como proteínas chaperonas que se asocian a las proteínas de reciente síntesis en el citosol y también son las responsables de promover el correcto ensamblaje de la cadena alfa y β_2 -m en el retículo endoplásmico (Tanaka *et al.*, 1997) (Figura 3).

Por otro lado, recientemente se ha descrito algunas proteasas adicionales que participan en el procesamiento de antígenos. La presencia de diferentes proteasas fue inicialmente propuesta por Elliot y colaboradores al estudiar la naturaleza de los aminoácidos que preceden al residuo amino-terminal de los péptidos que derivaban de una proteína nativa, de la cual se habían identificado 64 epítomos presentables por moléculas MHC-I. Este grupo de investigadores, observó que los péptidos obtenidos de la degradación de esta proteína, eran cortados de manera azarosa. Al no obtener una secuencia lógica de los epítomos, postularon la presencia de otras proteasas, las cuales pudieran estar participando en el citosol o en el lumen del retículo endoplásmico. Más tarde, con ayuda de la vaccinia recombinante que codifica para péptidos de 12 aminoácidos, un tamaño

inapropiado para unirse a las moléculas MHC-I, se pudo lograr la obtención de secuencias de péptidos de 9aa en las células deficientes de TAP's. Asimismo, la presencia de la dipeptidil amino-proteasa expresa simultáneamente y dirigida al interior del retículo endoplásmico, condujo un incremento en la producción de péptidos en el lumen del retículo endoplásmico (Elliot *et al*, 1995) (Figura 3).

B) Translocación de péptidos del citoplasma al retículo endoplásmico.

El proceso de translocación de los péptidos citoplasmáticos al retículo endoplásmico (RE) y al cis-Golgi ocurre principalmente por un heterodímero constituido por las proteínas denominadas Tap-1 y Tap-2 con un peso de 76 kD y 70 kD, respectivamente (Kleijmeer *et al*, 1992). Las subunidades Tap-1 y Tap-2 están asociadas de forma no covalente, cada una tiene seis dominios transmembranales y un dominio dependiente de ATP, este último se encuentra orientado hacia el citoplasma.

Después de que el péptido sale del proteasoma, éste 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 translocación del péptido al RE, es requerida la hidrólisis del ATP (Howard, 1995).

En estudios realizados *in vitro*, con membranas microsomales provenientes de células normales, se pudo demostrar que las subunidades de Tap son esenciales para translocar péptidos antigénicos al lumen microsomal para asociarse a las moléculas MHC-I, no obstante en membranas provenientes de células mutantes de Tap's no fue posible apreciar dicho transporte de péptidos (Koppelman *et al*, 1992). El tamaño de los péptidos transportados por los Tap's, también ha sido demostrado en ensayos *in vitro*, en donde se ha encontrado que los Tap's tienen una preferencia a transportar péptidos de entre 8 y 15 aminoácidos, no obstante se ha encontrado que péptidos de mayor longitud (8-33 aminoácidos) pueden ser transportados y posteriormente asociados con

moléculas HLA-B27 (Momburg *et al*, 1994). Los aminoácidos que intervienen en la unión de péptidos con los Tap's, son denominados "motifs" o aminoácidos ancla, por lo general se encuentran en las posiciones N-terminal y C-terminal de los péptidos y son específicos para cada uno de los alelos de las moléculas MHC-I. Los alelos Clase I que prefieren un aminoácido ancla o "motif", predicen la unión con el Tap, por ejemplo, la prolina es característica de la posición 2 en los epitopes de HLA-B7, en la cual los péptidos pueden ser preferencialmente transportados (Neising *et al*, 1995; van Endert *et al*, 1995) (Figura 3).

En otros estudios, se ha observado una interacción física entre el complejo Tap y el complejo cadena pesada/ β_2m , al parecer mediada por la subunidad Tap-1. La disociación del transportador con la molécula clase I coincide con la salida del complejo MHC-I/péptido del RE, y al menos *in vitro*, esta disociación puede ser inducida por la adición de péptidos. El transportador se une a complejos preensamblados únicamente, ya que no se ha detectado asociación entre cadenas pesadas libres y los Tap's. Estas observaciones sugirieron la posibilidad de un encauzamiento metabólico para el llenado de moléculas clase I con péptidos, lo cual se logra colocando a las recién sintetizadas moléculas de clase I en estrecha proximidad con el Tap-1. Recientemente se describió una proteína denominada tapasina, la cuál actúa como puente de unión entre Tap-1 y el complejo formado por β_2m /cadena alfa. Esta asociación además de conferir estabilidad, ayuda a que la implantación de péptido en la cavidad que forman los dominios α_1 y α_2 de las moléculas clase I pueda ser facilitada, y de esta manera evitar la dilución, salida del RE, o bien la degradación de los péptidos por enzimas localizadas en el RE (Vinitsky *et al*, 1997).

La generación de la mayoría de los péptidos que se asocian a moléculas MHC-I proviene de la proteólisis citosólica, para que estos a su vez sean transportados al RE por los Tap's. Sin embargo, poco se sabe acerca de cómo las proteínas son seleccionadas en el citosol para la producción de péptidos, y sobre la naturaleza las proteasas participantes en la generación de los péptidos.

En células deficientes en Tap's, se ha visto que una gran cantidad de péptidos puede ser liberada en el RE a partir de precursores de gran longitud mediante la translocación vía péptidos señal en su porción N-terminal, lo que postuló que la presencia de exopeptidasas en el interior del RE pueda ocurrir. Otros mecanismos que involucran la retrotranslocación de péptidos desde el RE al citosol y la subsiguiente captura y retrotranslocación al RE por Tap's, también han sido considerados como fuentes de péptidos para ser presentados en el contexto de moléculas MHC-I (Roelse *et al*, 1994; Snyder *et al*, 1994; Elliot *et al*, 1995) (Figura 3).

C) Estabilización y ensamblaje de moléculas MHC-I.

Las cadenas pesada y ligera del MHC-I son sintetizadas por separado en el retículo endoplásmico (RE). Después de ser transportados al RE, los péptidos se asocian con las moléculas MHC clase I. En esta unión están implicados chaperonas, como la calnexina (Figura 3). Las chaperonas facilitan y dirigen la formación del complejo cadena pesada del MHC clase I- β_2 -m-péptido, este complejo permite estabilizar la molécula MHC clase I recién formada, para ser eficientemente transportado hacia la superficie celular. Los complejos del MHC clase I sin péptido son inestables, lo que permite asegurar que sólo los complejos útiles a nivel funcional pueden interactuar con los TCR (Roitt *et al*, 2000).

El ensamblaje de las moléculas MHC-I puede proceder a través de dos diferentes caminos: I) La cadena pesada y β_2 -m se asocian, y el péptido se les une; o II) el péptido y la cadena pesada se asocian, seguidos por la β_2 -m (Townsend *et al*, 1990). Ambos intermediarios (cadena pesada/ β_2 -m y cadena pesada/péptido) son mucho menos estables que el complejo maduro (Elliot *et al*, 1991 y Boyd *et al*, 1992). Las células deficientes de β_2 -m, sólo puede usar el segundo camino, y solo en una pequeña cantidad de la cadena pesada puede llegar a ser correctamente plegada (y por tanto, probablemente, asociado al péptido) a temperatura fisiológica, así como en células que carecen de péptido y

los heterodímeros cadena pesada/ β_2 -m. Estas asociaciones son relativamente inestables a temperatura fisiológica, y con facilidad son retenidos en el RE (Van Kaer *et al*, 1992 y Baas *et al*, 1992) (Figura 3).

El proceso de ensamble puede ser facilitado por la formación de una serie de interacciones moleculares. La cadena pesada o el complejo cadena pesada/ β_2 -m esta asociado con las proteínas de chaperona del RE, y el complejo cadena pesada/ β_2 -m esta asociada con TAP antes de ser unidas al péptido. La velocidad de ensamblaje varía ampliamente en los diferentes tipos celulares y líneas celulares, y diferentes alelos del MHC-I pueden tener muy diferentes velocidades para el ensamblaje y transporte (Neefjes y Ploegh, 1988). La primera chaperona asociada a la cadena pesada es BiP en el RE. BiP (GRP78), un miembro de la familia HSP 70, es una chaperona que participa en la retención de muchas proteínas (Hass, 1991).

Calnexina es una chaperona que reside en la parte transmembranal del RE, participa en el ensamble y retención de muchas glicoproteínas transmembranales y complejos. La Calnexina tiene un dominio lectina e interactúa con muchas sustancias a través del reconocimiento de oligosacáridos parcialmente fragmentados (Ware *et al*, 1995). Sin embargo, esto no puede ser solamente el medio de reconocimiento inicial o unión estable. Porque las enzimas remueven un grupo de carbohidratos de la cadena pesada lo cual no es causa de disociación del complejo cadena pesada/calnexina (Ware *et al*, 1995 y Ou *et al*, 1993), la calnexina puede aun interactuar con la cadena pesada mutada que carece totalmente de sitios N-glicosilados (Carreño *et al*, 1995). Además del cambio y reconocimiento de carbohidratos, las uniones de calnexina son aparentemente interacciones proteína-proteína en la región transmembranal o la conexión de péptidos inmediatamente adyacentes a la membrana (Margolese *et al*, 1993). El ensamblaje *in vivo*, de las cadenas pesadas asociadas con BiP y con canelxina, evita su degradación, facilita su apropiado plegamiento, y permite o ayuda al ensamblaje con β_2 -m. El mismo péptido aumenta la estabilidad de el complejo y

permite la separación del complejo trimérico (cadena pesada/ β_2 -m /péptido) del TAP, permitiendo la salida del RE, para finalmente ser transportado hacia la superficie celular (Day *et al*, 1995; Ortiz y Hämmerling, 1991) (Figura 3).

D) Glicosilación del MHC-I y transporte a la membrana.

Después del ensamble de las moléculas MHC-I, en el RE, estas transitan a través del aparato de Golgi donde el ligando N modifica a los carbohidratos. Sin embargo cuando un péptido se disocia de la molécula MHC-I alrededor de la superficie celular, creando una molécula vacía, o cuando una molécula vacía alcanza la superficie celular, el heterodímero es inestable y rápidamente se disocia (Ortiz y Hämmerling, 1991; Rock *et al*, 1991).

Bajo las mismas circunstancias las moléculas MHC-I pueden unirse a péptidos en la superficie celular. Péptidos, particularmente secuencias optimas en altas concentraciones, pueden unirse a moléculas MHC-I vacías antes de que estas moléculas se disocien. También, las moléculas MHC-I vacías pueden ser estabilizadas por incubación a bajas temperaturas (Ljunggren *et al*, 1990), con medio de cultivo, o por incubación exógena de β_2 -m; estas moléculas pueden unirse a péptidos (Figura 3).

La vida media de las moléculas MHC-I en la superficie celular varía considerablemente, dependiendo del tipo celular y en particular el alelo clase I. Un importante determinante en la estabilidad en la molécula clase I es la velocidad de disociación del péptido (Rock *et al*, 1991; Ortiz y Hämmerling, 1991).

En muchos tipos celulares, el complejo trimolecular no es constitutivamente internalizado, sin embargo, ligandos multivalentes pueden inducir la internalización (Matchy *et al*, 1987). El significado funcional de esta internalización no es clara. La misma molécula endocitada es reciclada en la superficie celular (Abdel *et al*, 1993) y es probablemente concebible que presente péptidos en los endosomas. El MHC-I internalizado puede ser degradado (Figura 3).

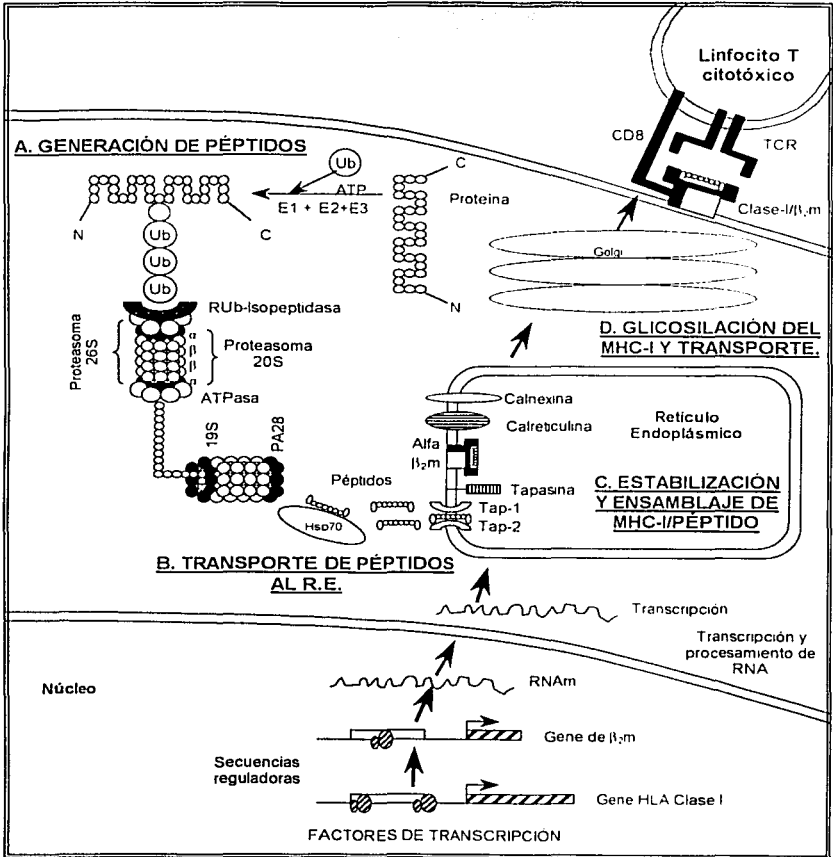


Figura 3. Etapas del procesamiento y presentación de antígenos por las moléculas MHC-I. A) Generación de péptidos en el citoplasma; B) Transporte de péptidos hacia el interior del retículo endoplasmico; C) Estabilización y ensamble de moléculas MHC-I; y D) Glucosilación del MHC-I y transporte a la membrana. Tomado y modificado por Garrido *et al*, 1993; Groettrup *et al*, 1996; Yang *et al*, 1996. Tanaka *et al*, 1997

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

3.3. CÁNCER CÉRVICO UTERINO Y SU ETIOLOGÍA CON EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (HPV).

Desde el punto de vista epidemiológico se ha establecido 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 más importantes para este padecimiento. Recientemente se han descrito otros factores como son la inmunosupresión, influencias hormonales (esteroides) que favorecen la integración de HPV's de alto riesgo y la disminución en la expresión de las moléculas HLA clase I en epitelios cervicales (Bartholonew *et al*, 1997), e infecciones con agentes sexuales transmitidos tales como la *C. Trachomatis* que ha sido asociado a neoplasias cervicales (Muñoz y Bosch, 1997).

El CaCu ha sido asociado con una etiología viral, estudios epidemiológicos realizados en la década de los 60's y 70's comienzan a correlacionar la presencia de algunos virus con esta enfermedad, en particular la seropositividad para el virus de Herpes simple (HSV) (Werness, 1995).

Posteriormente en la década de los 80's se dio un gran avance en la comprensión etiología de esta enfermedad al detectar la presencia de varios agentes virales asociados con el CaCu, entre estos encontraron: el Virus del Papiloma Humano (HPV); el Virus del Herpes Simple (HSV); y en menor grado al Citomegalovirus (HCMV). La mayoría de los estudios actuales consideran que el HPV es el principal agente etiológico del CaCu. Mediante el uso de la técnica de "reacción en cadena de la polimerasa" (PCR), que utilizando oligonucleótidos universales para la proteína L1 de todos los papilomas se ha encontrado que más del 90 % de los tumores cervicales están fuertemente asociados con la presencia de HPV (Bosch *et al*, 1995). No obstante algunos autores han detectado la presencia de HPV de casi un 100% de los tumores cervicales; esto ha sido posible mediante el uso de oligonucleótidos específicos para las proteínas E6 y

E7, ya que durante la integración de genoma viral al genoma celular, en algunos casos, se pierde un segmento de la proteína L1, el cual no es amplificado por los oligonucleótidos universales de L1 (Walboomers *et al*, 1997).

De la familia de los HPV's se han clasificado más de 80 tipos virales genéticamente diferentes, de los cuales los HPV tipo 11, 16, 18, 31, 33, 35 y 45 están asociados con la transformación de las células epiteliales del cérvix, así como las del cuello del útero, produciendo lesiones denominadas neoplasias intraepiteliales o NIC's (Tabla 2). En la mayoría de las lesiones se ha confirmado la etiología viral mediante estudios citológicos e histológicos (Seedorf *et al*, 1989; Kurman *et al*, 1998; Storey *et al*, 1990). Los HPV's tipo 5 y 8 están comúnmente asociados con epidemodisplasias que pueden progresar a cáncer de piel (Howley, 1991) (Tabla 2).

En los países con mayor frecuencia de CaCu (principalmente países subdesarrollados) se ha observado que el HPV-16 es el de mayor proporción (50%), seguido por el HPV-18 con 12%, el HPV-45 con 8%, y HPV-31 con 5% (Muñoz y Bosch, 1997). En México las proporciones son similares: el HPV-16 se encuentra en un 50% de los casos; HPV-18 en el 15% de los casos; los HPV-31, 33 y 35, en conjunto, el 21%; y otros tipos virales, en porcentaje restante (Berumen, 1995)

TIPO DE LESION	TIPO DE HPV
Piel	
Verrugas	1-4,7,10,26-29,38,41,48,49,57,63,65
Quiste epidermoide	60.
Verruga de Carnicero	2,7
Epidermodisplasia verruciforme	2,3,5,8,9,10,12,14,15,17,19-25,35,47,50
Cambios bowenoides	16,34,35
Carcinoma de células epidemioides	5,8,14,17,20,41,47
Genital	
Condiloma acuminado	6,11,42-44,51-55,58,67,74.
Neoplasia intraepitelial (NIC) bajo grado	6,11,16,18,30,31,33-35,39,40,42-45,51-52,56-59,68.
NIC alto grado	16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,68
Carcinoma cérvico-uterino	16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,68
Tumores de cabeza y cuello	
Papilomatosis	2,6,7,11,32,57
Hiperplasia epitelial focal	13,32
Carcinoma de amígdala	16,33

Tabla 2. Tipos de HPV en varias lesiones. Tomado de Howley *et al*, 1991 y Breitburd *et al*, 1996. Los tipos más frecuentes se indican en negritas

3.4 ESTRUCTURA Y NOMENCLATURA DEL VIRUS DEL PAPILOMA.

El Virus del Papiloma Humano pertenece al género *Papillomavirus* de la familia *Papovaviridae*. Los papilomavirus tienen un diámetro de 55 nm y están compuestos de 72 capsómeras, las cuales están formadas por la proteína L1 y la proteína L2; el virus presenta una estructura icosaédrica no envuelta, y contiene moléculas de doble cadena de DNA circular de aproximadamente 7,200 a 8,000 pb que se encuentran en el interior de la cápside, asociadas a proteínas tipo histona. El genoma contiene ocho marcos de lectura abierta (ORF), es decir, una

serie de bases nitrogenadas que se pueden leer en diferente secuencia, lo que conduce a la traducción de diferentes proteínas, según el marco de lectura en función. Se sabe que durante la transcripción sólo una de las hebras del DNA se encuentra en forma activa en este proceso y una región no codificada que contiene las secuencias de regulación de la transcripción y el origen de la replicación y es estrictamente epiteliotrópico (Figura 4). El genoma de HPV se compone de aproximadamente 7,904 pares de bases (Margaret *et al*, 1998; Stubenrauch y Laimins, 1999; Panduro, 2000).

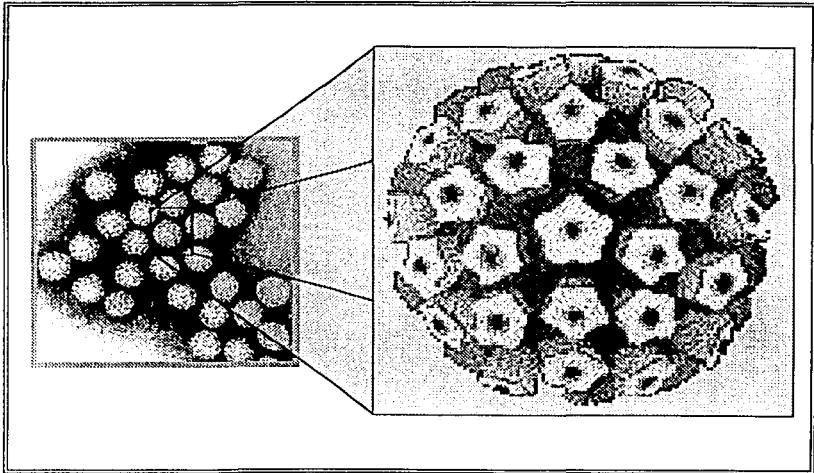
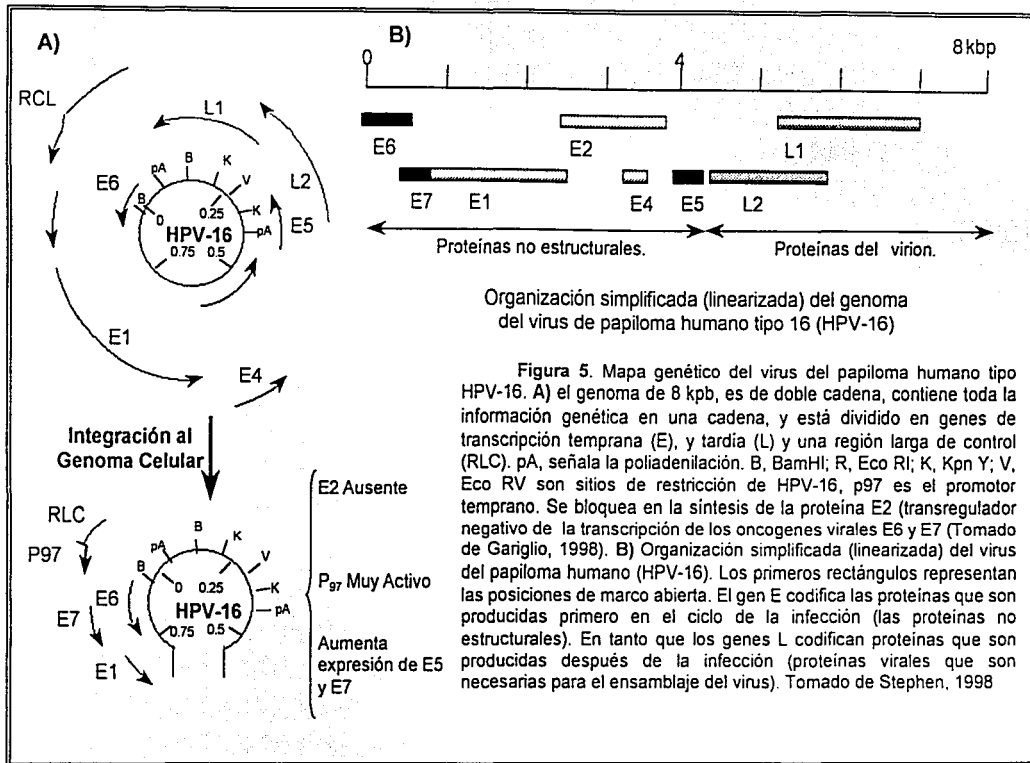


Figura 4. Diagrama del virus del papiloma humano con su forma icosaédrica desnuda. Tomado de <http://www.hon.ch/HON/P.html>

3.5 INFECCIÓN DE HPV Y EXPRESIÓN DE SUS GENES.

La organización del genoma de HPV-16, consiste de 8,000 pares de bases, y dos tipos de genes son expresados: genes de transcripción temprana (E) y tardía (L). Las proteínas de transcripción temprana participan en funciones reguladoras del ciclo celular, replicación de ADN y RNA y la activación del ciclo lítico. El marco de lectura E2 codifica para tres proteínas que funcionan como factores de transcripción. Estos factores de transcripción son reguladores intragenómicos a través de la formación de dímeros en sitios específicos de unión. La proteína E1 también tiene sitios específicos de unión al DNA y RNA, actividad de helicasa dependiente del ATP, y se conoce que ésta proteína es para la replicación viral. Se considera que la proteína E5 realiza una función importante en las primeras etapas de la infección por el HPV, pero no en la transformación maligna, pero la formación de complejos de E5 del HPV tipo 16 con receptores de membrana, como el receptor del factor de crecimiento epidérmico y el receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas, entre otros (Panduro, 2000). La proteína E4, al parecer efectúa una función esencial en la infección productiva, tal vez alterando la diferenciación normal de las células epiteliales infectadas, lo que propicia un medio favorable para la maduración viral. Las proteínas E6 y E7 de los tipos virales considerados de alto riesgo para el cáncer son oncogenes; que pueden estimular el crecimiento celular y en su conjunto participan en la inmortalización y transformación celular. La proteína E6 de estos virus tiene además la propiedad de cooperar con el oncogen ras en la inmortalización de algunas líneas celulares. Las proteínas E6 y E7 contienen secuencias específicas que le permiten unir zinc y formar estructuras de dedos de zinc (Panduro, 2000). La segunda región codifica las proteínas L1 y L2 (proteínas de la cápside viral). La primera tiene un peso molecular de 55 kd la cual constituye a la proteína de la cápside viral. En tanto que L2 consta de 75 kd y presenta más variaciones que L1 (se encuentra menos conservada) (Figura 5). La región que precede a los genes tempranos se llama región larga de control (RLC o LC) y contiene secuencias promotoras y aumentadoras de la transcripción. así como secuencias que

controlan el inicio de la replicación. Las células blanco para la infección son los queratinocitos. Durante una infección viral productiva hay una cascada en la expresión de los genes de HPV que sigue el programa de diferenciación de los queratinocitos que comienza con las células germinales epiteliales suprabasales y culmina con la liberación de los viriones de HPV cuando los queratinocitos terminan su diferenciación y son exfoliados a la piel o a la superficie de las mucosas (Figura 5). El genoma de los HPV's es mantenido extracromosomalmente en el episoma (un elemento genético autoreplicable que puede moverse dentro y fuera del cromosoma) de los queratinocitos, pero es frecuente que puede ser integrado dentro del cromosoma de los tumores asociados a HPV (Stephen Man, 1998; Seedorf *et al*, 1986). Después de la infección, los primeros genes virales están expresados con las proteínas de replicación viral, E1 y E2. Estas proteínas independientemente se unen a las secuencias originales en el URRs del virus del papiloma que consiste en secuencias ricas de A/T con baja afinidad, mientras que E2 reconoce y se une a secuencias de alta afinidad. Estas uniones de E1 y E2 facilitan la unión y permiten la formación de un complejo multimérico el cual estabiliza las uniones en las secuencias A/T. Enseguida se ensambla el complejo multimérico de E1, la proteína E2 ya no es requerida y es liberada desde su origen. E1 también presenta una helicasa y ATPasa activas, mientras que E2 no presenta una actividad enzimática. El complejo proteínico E1 también reúne enzimas de replicación celular del origen. La replicación transitoria de los genomas de HPV sólo requiere de E1 y E2 para mantenerse estable en los queratinocitos normales pero también requiere de la expresión de E6 y E7. Esto sugiere que las proteínas E6 y E7 deben modificar el medio ambiente celular para permitir el mantenimiento de los elementos extracromosomales y prevenir su rápida eliminación (Stubenrauch y Laimins, 1999) (Figura 5).



Organización simplificada (linealizada) del genoma del virus de papiloma humano tipo 16 (HPV-16)

Figura 5. Mapa genético del virus del papiloma humano tipo HPV-16. A) el genoma de 8 kbp, es de doble cadena, contiene toda la información genética en una cadena, y está dividido en genes de transcripción temprana (E), y tardía (L) y una región larga de control (RLC). pA, señala la poliadenilación. B, BamHI; R, Eco RI; K, Kpn Y; V, Eco RV son sitios de restricción de HPV-16, p97 es el promotor temprano. Se bloquea en la síntesis de la proteína E2 (transregulador negativo de la transcripción de los oncogenes virales E6 y E7 (Tomado de Gariglio, 1998). B) Organización simplificada (linealizada) del virus del papiloma humano (HPV-16). Los primeros rectángulos representan las posiciones de marco abierta. El gen E codifica las proteínas que son producidas primero en el ciclo de la infección (las proteínas no estructurales). En tanto que los genes L codifican proteínas que son producidas después de la infección (proteínas virales que son necesarias para el ensamblaje del virus). Tomado de Stephen, 1998

3.6. CICLO REPLICATIVO DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO.

El ciclo de vida de todos los virus del papiloma humano se inicia en la diferenciación celular. La infección inicial por el HPV probablemente ocurre dentro de las células germinales epiteliales o en células de desarrollo transitorio localizadas en las capas bajas del epitelio estratificado. Estas células producen células hijas las cuales al terminar su ciclo celular, migran lejos hacia la capa basal. Posteriormente el virus entra en la célula, el genoma del HPV se establece en los elementos extracromosomales del núcleo y numerosas copias son incrementadas (aproximadamente de 50 a 100 copias por célula). La célula infectada se divide, el DNA viral es distribuido entre ambas células hijas. Una de las células hijas migra lejos de la capa basal e inicia su programa de diferenciación. La otra célula hija continúa dividiéndose en la capa basal y provee un repertorio de DNA viral a otra célula que posteriormente se dividirá. Dado que la producción del virus del papiloma humano es limitado en las células suprabasales, las células en las capas basales no son lisadas por la producción del virión, por lo cual continúan proliferando (Figura 6). Esta dependencia en la proliferación permite a la célula infectada persistir en las capas basales por periodos prolongados (por varios años).

En un epitelio normal, las células de desarrollo transitorio se dividen, dando origen a células hijas que salen del ciclo celular y estas comienzan a diferenciarse. Entonces los HPV's cuentan con enzimas celulares que replican estos genomas, una mayor consecuencia de la infección del HPV es bloquear la salida del ciclo celular. Las células infectadas con HPV experimentan una última fase S en la diferenciación suprabasal, las células replican en genoma del HPV en niveles altos antes de empaquetarse nuevamente en la cápside. En los tipos de HPV de alto riesgo, el bloqueo en la salida del ciclo celular y la inducción de la fase S en la célula suprabasal son mediadas por las proteínas E6 y E7 (Figura 6).

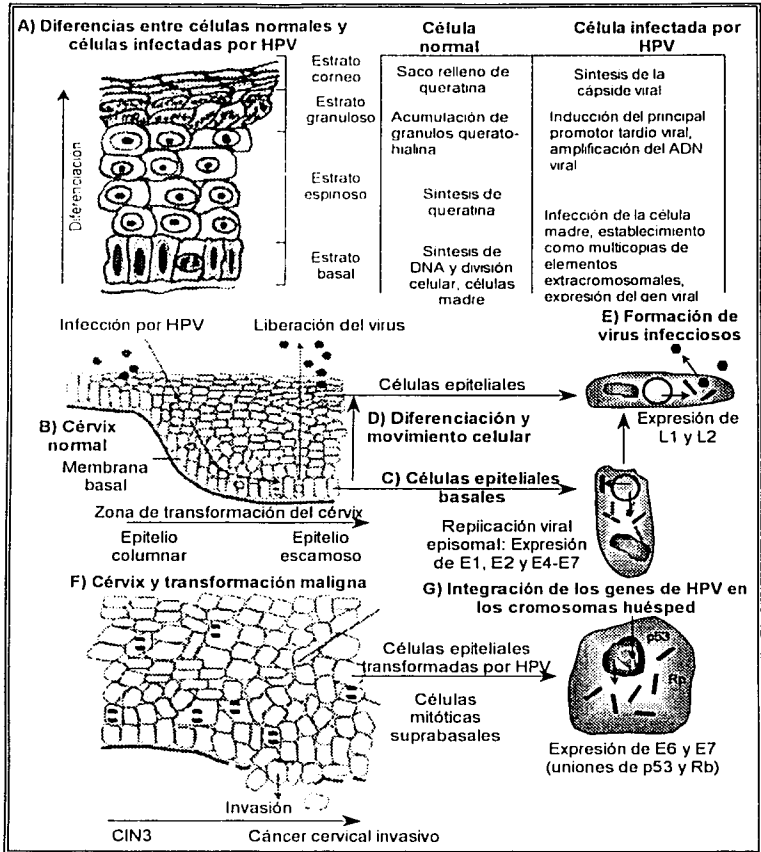
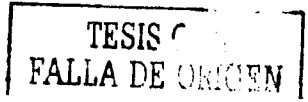


Figura 6 Infección y replicación del virus del papiloma humano (HPV) en células del epitelio cervical. **A)** Cérvix normal, zona de transformación en la cual hay una transición de epitelio columnar a epitelio escamoso; Los tipos de HPV son pobablemente más infecciosos para las células que están estrechamente relacionadas con esta asociación. **B)** El virus del HPV tiene acceso a las células del epitelio basal del cérvix via la vagina, donde estos se replican episomalmente y se expresan los genes virales (tempranos) E1, E2, E4, E5, E6 y E7. **C)** Las células basales infectadas las cuales



muestran signos de disrupción celular como resultado de la infección viral, continúan su diferenciación y migración a la superficie epitelial donde D) las células (ahora) escamosas comienzan a expresar los genes tardíos de HPV L1 y L2. Las partículas del virus infecciosas son formadas y liberadas en el lumen de la vagina. E) La infección del HPV (particularmente con los tipos de alto riesgo) pueden progresar en: 1) displasia leve inducida por HPV, 2) etapa final de neoplasia intraepitelial cervical (NIC3) y eventualmente, 3) cáncer cervical invasivo (CaCu), cuando la membrana basal es rota por las células infectadas, estas permiten una expansión local y también una metástasis lejana. F) La transformación de células epiteliales, los genes de HPV son integrados en los cromosomas de las células huésped, con la expresión de las proteínas (oncogénicas) E6 y E7, las cuales se unen a las proteínas supresoras del tumor p53 y Rb. Tomado de Stephen, 1998).

Se ha propuesto que las proteínas E6 y E7 del HPV, tienen dos funciones críticas para el desarrollo de neoplasias. Primero se ha visto que la proteína E6 de los HPV's de alto riesgo para el desarrollo de CaCu (HPV-16 y 18), está asociada con la proteína p53 (proteína supresora del tumor) y es capaz de inactivarla; al regular el paso entre G1/S y G2/M. E6 recluta la proteína celular E6AP, que funciona como la ubiquitina ligasa que une p53. Este resultado de reunión en la ubiquitinización de p53 es seguida por una rápida degradación de la proteína p53, por el proteasoma 26S (Figura 7). E6 también presenta una activa función de tolerancia además de asociarse con el calcio unido a la proteína ERC-55, factor de respuesta de interferon, IRF3, y la integrina asociada a la proteína paxilina. La proteína E7 de alto riesgo de HPV se une a la familia de proteínas Rb, p107 y p130 son resultado de la activación constitutiva del factor de transcripción E2F. Segundo, la proteína E7 puede interactuar y evitar las actividades de inhibidores del ciclo celular (inhibidores cdk) que interactúan con los complejos cdk/ciclina tales como p27^{kip1} y p21^{waf1/Cip1} (Figura 7). Además E7, al igual que otras proteínas oncogénicas de virus tumorales (SV40Tag y Ad5 E1A), pueden inactivar a la proteína pRB, fosforilándola, para liberar el factor de transcripción E2F y el ciclo celular puede avanzar de G1 a S, G2 y M. En condiciones normales, en la fase M la ppRB se desfosforila por acción de una fosfatasa; entonces, la proteína pRB puede unirse nuevamente a E2F y bloquear el ciclo celular en G1 (Figura 7). Después del rompimiento del control del ciclo celular, las células epiteliales proliferantes, disminuyen los marcadores de diferenciación y son blancos de

alteraciones genéticas adicionales por convertirse en células neoplásicas (Stubenrauch y Laimins, 1999; Galloway y McDougall, 1996; Jones y Münger, 1996).

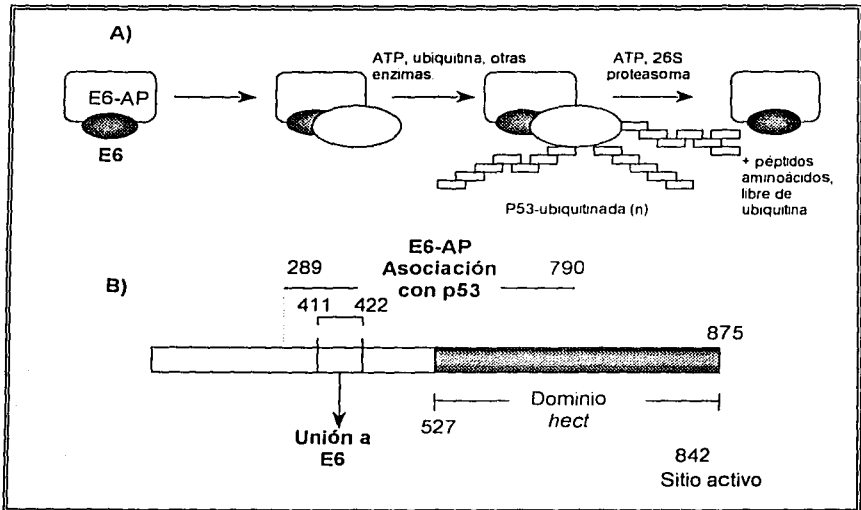


Figura 7. Inactivación de la proteína p53 mediante la proteína E6 del HPV. A) orden de los eventos que conducen a la degradación de p53 dependiente de E6. La formación de complejo E6/E6-AP precede a la asociación con p53; p53 es entonces multi-ubiquitinado, degradado por proteasoma 26S. B) Estructura/función de E6/AP. La numeración indica los segmentos importantes de unión con las proteínas E6 y p53. El dominio *hect* cataliza la ligación de las unidades de ubiquitina al sustrato. Tomado de Huibresgtse y Beaudenono, 1996.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.7. DESARROLLO DE VACUNAS TERAPÉUTICAS CONTRA CÁNCER CÉRVICO-UTERINO BASADA EN PÉPTIDOS SINTÉTICOS.

Una importante meta en la inmunoterapia contra el cáncer cervical es erradicar los residuos del tumor, seguido por una terapia convencional, y evitar la reaparición del tumor y la metástasis. Las células tumorales contienen proteínas que pueden ser utilizadas como vacunas para inducir funciones efectoras específicas por los CTL's contra estas oncoproteínas. No todos de estos problemas pueden ser solventados por las vacunas antitumor, sin embargo, es importante considerar que una de las vías más viables para inducir la estimulación de la respuesta inmune celular son las vacunas con péptidos unidas al MHC-I (Toes *et al*, 1996). Los progresos para la identificación de antígenos virales asociados al tumor permiten el desarrollo de vacunas molecularmente definidas, que contengan un mismo número de componentes esenciales, que puedan ser usados para obtener una respuesta específica de las células malignas contra dominios y subdominios de epítopes de células T (Melief *et al*, 1996).

Estudios recientes han encontrado la asociación del HPV-16 Y 18 en infecciones cervicales de bajo grado o de carcinoma cervical (CaCu). Estas observaciones sugieren la relación entre las infecciones provocadas por HPV y el desarrollo de neoplasia intra epitelial (NIC) y carcinoma cervical (Ter Harnsel *et al*, 1999)

Actualmente varios estudios inmunológicos en el CaCu se han enfocado en investigar a los péptidos antigénicos derivados de proteínas E6 y E7 del HPV-16 y 18, y que presentan una alta actividad de unión con moléculas HLA clase I. Estos estudios muestran que los péptidos sintéticos de las proteínas E6 y E7 son capaces de inducir una activación de CTL's de sangre periférica de pacientes con CaCu (Castellanos *et al*, 2001). Por otro lado, recientes estudios con modelos animales, proponen el desarrollo de vacunas profilácticas contra HPV-16. Estos

estudios han demostrado los efectos protectivos generados por inmunización de partículas propias del virus (VLPs) compuestos de la proteína mayor de la cápsida del virus, L1. Además los experimentos proveen una inminente evidencia de respuesta de la neutralización de anticuerpos contra la proteína L1 y que es suficiente para la protección contra la enfermedad del virus del papiloma humano (White *et al*, 1999 y Suzich *et al*, 1995). Asimismo, en modelos con ratones, linfocitos T citotóxicos (CTL) son capaces de reconocer proteínas codificadas por oncoproteínas virales, incluidas las involucradas en la transformación, entre los que se encuentran las proteínas del virus del papiloma humano (HPV) asociado a tumores humanos. Monroy *et al*, 1999 han identificado una fracción de péptidos de L1 asociados naturalmente a moléculas MHC clase I de una línea celular con carcinoma cervical positiva para HPV-18, estos péptidos son capaces de inducir proliferación en linfocitos T citotóxicos. En consecuencia, la identificación de péptidos derivados del virus presentados por moléculas MHC-I en la superficie celular de células tumorales humanas son de gran importancia para el desarrollo de inmunoterapia contra el tumor.

Es por ello que el presente trabajo se llevo a cabo con la finalidad de inducir estímulo en linfocitos T de sangre periférica de pacientes con CaCu y de donadoras normales con péptidos sintéticos derivados de la proteína L1 del HPV-16 y 18 altamente asociados con CaCu específicos para los alelos HLA-A2, -A24, -B35 y -B39 (frecuentemente expresados en la población mexicana). Los resultados de este estudio nos permitirán sugerir la importancia que pueden tener estos péptidos antigénicos derivados de la proteína L1 para tratamiento profiláctico del CaCu en estadios tempranos de la enfermedad.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) representa la neoplasia más frecuente en nuestro país (aproximadamente 35% de las neoplasias en la mujer), a pesar de las campañas de detección oportuna como puede ser el Papanicolaou, no se puede evitar una alta incidencia en este problema de salud. El CaCu se encuentra asociado a cerca del 99% de los tumores con el virus del papiloma humano (HPV). De aquí que varios investigadores hayan propuesto que las proteínas derivadas del HPV puedan ser candidatos importantes en la respuesta inmune contra CaCu.

En estudios recientes hechos en ratón, se ha reportado que inmunizaciones con péptidos derivados de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 han generando respuestas protectoras de linfocitos T citotóxicos específicos contra tumores inducidos en estos animales.

Por otra parte, considerando que la proteína L1 de HPV constituye la vía de entrada del virus a la célula huésped, debido a que forma parte de la cápside viral y a que tiene un papel importante en el inicio de la infección en el epitelio cervical y en la propagación de la enfermedad, este estudio se llevó a cabo con la finalidad de identificar los péptidos inmunogénicos de la proteína L1 de HPV-16 y 18 (altamente asociados con CaCu) específicos para los alelos HLA-A2, A24, B35 y B39 (de mayor frecuencia en la población mexicana) expresados en pacientes con cáncer cérvico-uterino.

5. HIPOTESIS.

Se sabe que la proteína L1 del virus del papiloma humano es predominantemente encontrada en las neoplasias preinvasoras del cérvix, y además se ha visto que el cáncer avanzado puede tener un importante papel antigénico. Además con la predicción de algoritmos se ha podido identificar los sitios más antigénicos (péptidos) de una proteína blanco. En consecuencia, los péptidos obtenidos de las secuencias de la proteína L1 de HPV-16 y 18 altamente asociados con CaCu que tengan afinidad específica para los alelos HLA-A y B de mayor frecuencia en la población mexicana, podrán ser identificados como inmunogénicos en pacientes con cáncer cervical y que presentan esos alelos.

6. OBJETIVOS.

6.1. OBJETIVO GENERAL.

Se identificará a los péptidos inmunogénicos de la proteína L1 de HPV-16 y 18 específicos para los alelos HLA-A2, A24, B35 y B39.

6.2. OBJETIVOS PARTICULARES.

a) Predecir y diseñar a los péptidos de la proteína L1 de HPV-16 y 18 con mayor afinidad hacia los alelos HLA-A2, A24, B35 y B39.

b) Obtener muestras sanguíneas de pacientes con neoplasias cervicales invasivas.

c) Analizar el haplotipo de histocompatibilidad de las muestras sanguíneas de pacientes con neoplasias cervicales.

d) Determinar el tipo de infección por el HPV en los pacientes con neoplasias.

e) Identificar a los péptidos de la proteína L1 con actividad antigénica específica.

7. MATERIALES Y METODOS.

7.1 Predicción de epítomos de la proteína L1 de HPV-16 y 18.

La predicción de los péptidos (secuencias de 9 aminoácidos) derivados de la proteína L1 HPV-16 y 18 con alta afinidad hacia moléculas HLA clase I (HLA-A2, A24, B35 y B39; alelos con mayor frecuencia antigénica en la población mexicana), reportadas recientemente por De Leo *et al*, 1997 y Wecman *et al*, 1997, se realizó mediante el uso de un programa de algoritmos vía Internet (http://bimas.dcr.t.nih.gov/cgi-bin/molbio/ken_parker_comboform), el cual se basa en utilizar los residuos de anclaje y el tamaño de los péptidos que han sido descritos para cada alelo particular (Rammensee *et al*, 1995), de tal forma que la secuencia de la proteína L1 de HPV-16 y 18 fue analizada para obtener 10 péptidos con las mayores afinidades teóricas para las moléculas MHC-I que fueron estudiadas. Los tres péptidos que presentaron los valores de afinidad más altos para cada alelo (Tabla 3), fueron sintetizados y utilizados para los ensayos de estimulación de los linfocitos T.

ALELO HLA	PÉPTIDOS L1 HPV-16	POSICIÓN	T1/2 DE DISOCIACIÓN (min.)	PÉPTIDOS L1 HPV-18	POSICIÓN	T1/2 DE DISOCIACIÓN (min.)
HLA-A2	FLAQGLKA	494-502	84 555	QLFNKPYWL	366-374	434.725
	GLQYRVFRI	93-101	139.174	SLYDTYRFV	475-483	470.519
	YLRREGMFV	275-283	133.735	ILFLRNVN	47-55	437.482
HLA-A24	DYKQTQLCL	176-184	200.000	LYHPRPLPL	21-29	240.000
	FYNPDQRL	116-124	432.000	IYNPETQRL	151-159	432.000
	KYTFWEVNL	469-477	400.000	QYPLGRKFL	523-531	300.000
HLA-B35	EPYGDLSFF	266-274	30.000	RPSDNTVYL	66-74	80.000
	VPKVSGLQY	88-96	120.000	IPKVSAYQY	123-131	120.000
	LPSEATVYL	31-38	40.000	APAENKDPY	495-503	80.000
HLA-B39	IHSMNSTIL	417-425	90.000	LHSILVYMV	29-37	45.000
	YHIFFMMSL	21-29	180.000	IHSMNSSIL	453-461	90.000
	YHAGTSRLL	61-69	90.000	YHAGSSRLL	96-104	90.000

Tabla 3. Péptidos dervados de la proteína L1 de HPV-16 y HPV-18 que presentan alta afinidad (predicha mediante algoritmos) hacia los alelos HLA clase I de mayor frecuencia en la población mexicana.

Tomando en consideración que la proteína Matriz de Influenza-A constituye una de las proteínas más antigénicas de los virus asociados con la gripe en humanos, en este trabajo se sintetizaron péptidos derivados de esta proteína para los alelos HLA-A2, A24, B35 y B39 (Tabla 4), para ser utilizados como controles positivos en la estimulación de los linfocitos T de paciente con cáncer cérvico-uterino y de donadoras normales. Algunos de estos péptidos antigénicos derivados de esta proteína ya han sido utilizados como controles positivos en la estimulación de linfocitos T de donadoras normales y de pacientes con cáncer cervical en el contexto HLA-A2 (Ressing *et al*, 1996).

ALELOS HLA	PEPTIDOS DE LA PROTEÍNA MATRIZ INFLUENZA-A	POSICIÓN.	T1/2 DE DISOCIACIÓN (min.)
HLA-A2	GILGFVFTL	58-66	550.927*
HLA-A24	LYRKLKREI VFAGKNTDL	99-107 31-39	66.000 20.000
HLA-B35	GAKEISLSY QARQMVQAM	111-119 208-216	36.000 18.000
HAL-B39	LKAEIAQRL LKNLDLENL	20-28 229-237	24.000 24.000

Tabla 4. Péptidos derivados de la proteína matriz de influenza-A que presentan alta afinidad (predicha mediante algoritmos) hacia los alelos HLA clase I de mayor frecuencia en la población mexicana. *Referido en Ressing *et al*, 1996.

7.2. Síntesis de péptidos.

Los péptidos que presentaron la mayor afinidad hacia los alelos HLA-A2, A24, B35 y B39, de acuerdo a los valores dados por el programa, fueron sintetizados de manera automática. Para su síntesis, se utilizó un sintetizador automático (Applied Biosystem 2.01, Becton Dickinson & Co Mountain View, C.A.), el cual a partir de una columna de fase sólida que contiene el aminoácido C-terminal, se incorporan los demás residuos mediante repetidos ciclos con desprotección de los aminoácidos de enlace (Fmoc) (Gauseohl *et al*, 1990). Después de desprender los péptidos de la resina por tratamiento de ácido trifluoroacético, fueron analizados por HPLC fase reversa para saber su grado de pureza. Finalmente fueron liofilizados, disueltos en solución salina de fosfatos,

filtrados en membranas de 0.22μ M y almacenados a -70 °C para su uso posterior.

7.3. Obtención de biopsias tumorales y muestras de sangre venosa de pacientes con neoplasias preinvasivas e invasivas.

Las muestras de sangre y biopsias fueron obtenidas de pacientes con cáncer cérvico-uterino avanzado (Estadios I-IV), en el Servicio de Ginecología Oncológica del Instituto Nacional de Cancerología (INCAN). Mediante colposcopia se tomó una biopsia de la lesión cervical, la cual fue trasladada en un tubo eppendorf estéril hacia el laboratorio de Inmunobiología FES- Zaragoza en donde fueron analizadas para determinar el tipo de HPV. Por otro lado, se obtuvieron estérilmente 30 ml de sangre periférica, los cuales se colectaron en dos tubos diferentes: un tubo con 20 ml de sangre periférica con heparina para la obtención de linfocitos T y en otro tubo con 10 ml de sangre periférica conteniendo ACD para la tipificación de los antígenos de histocompatibilidad (HLA clase I) mediante microcitotoxicidad en el Departamento de Transplantes del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Salud Salvador Zubiran (INCMSSZ) (De Leo *et al*, 1997; Weckman *et al*, 1997; Vargas *et al*, 1993; Gómez *et al*, 1997; Krausa *et al*, 1995).

7.4. Tipificación de HPV en las biopsias de tumores de cáncer cervical.

Con la biopsia de tejido tumoral se procedió a la extracción de ácidos nucleicos y tipificación del HPV, para ello fueron utilizadas sondas de ADN para la región tardía L1 de HPV. La amplificación del DNA se realizó mediante el uso de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y después se realizó un Southern blot para evidenciar en el gel los productos amplificados que fueron transferidos en un soporte de nylon para realizar la hibridación con sondas específicas y marcadas para detectar al DNA viral de HPV-16 y 18 en una autorradiografía (Hecht *et al*, 1995; Ting y Manos, 1990).

7.5. Obtención de linfocitos T a partir de sangre periférica de pacientes con cáncer y donadoras normales.

El tubo con los 20 ml de muestra de sangre periférica fue centrifugado a 2,000 revoluciones por minuto (RPM) durante 5 min. en una centrifuga clínica para obtener dos fases; la fase superior (plasma) fue retirada para eliminar las plaquetas, proteínas y grasa; posteriormente la fase restante (botón de celular) fue lavado y centrifugado dos veces con medio de cultivo RPMI suplementado al 10% con suero fetal de bovino (SFB), las células mononucleares fueron separadas del paquete celular a través de un gradiente de densidad con 2 ml de Ficoll-Histopaque 1.077 (marca Microlab) por cada 5 ml de paquete celular, y se centrifugó durante 20 min. a 1.2×10^3 RPM, obteniéndose tres fases; una inferior (con el paquete de eritrocitos), una intermedia de Ficoll, una banda blanca (conteniendo los linfocitos T) y una superior (sólo contenía el medio de cultivo RPMI). Posteriormente se retiró la banda blanca que contiene los linfocitos T y fueron lavados y centrifugados dos veces con medio RPMI para eliminar el exceso de Ficoll Histopaque.

7.6. Cultivo de linfocitos T de sangre periférica de pacientes con cáncer y donadoras normales.

Previamente las células mononucleares fueron cultivadas durante una hora y posteriormente las células no adherentes fueron cultivadas por triplicado en placas de 96 pozos (2.5×10^5 células por pozo) marca Costar[®] (USA), y mantenidas con 80 μ l en medio de cultivo que consistente de Iscove's Dulbecco's Modified suplementado con 10% de Suero Fetal de Bovino, 100 U/ml de penicilina, 4 mM de L-glutamina, 1 nM de Piruvato de Sodio y 20 μ M de 2-mercaptoetanol y estimuladas con 10 UI/ml de interleucina 2 recombinante humana (IL-2), excepto a los pozos que sólo contenían las células mononucleares los cuales fueron considerados como negativos (Figura 7).

7.7. Identificación de los péptidos antigénicos de L1 de HPV-16 y 18.

Las fracciones adherentes y no adherentes de las células mononucleares, fueron incubadas en presencia de los diferentes péptidos predichos para el alelo en cuestión con una concentración de 50 μ M de cada péptido y 10 μ M de β -2-Microglobulina con el fin de estabilizar la estructura de MHC-I. La actividad de los péptidos se determinó después de 4 días de estimulación con péptido. Después de los 4 días se incorporó en los cultivos timidina tritiada (1 μ Ci por pozo) durante las últimas 18 horas de cultivo, para medir la actividad de los péptidos.

7.8. Cosecha y conteo de linfocitos T de pacientes con cáncer y donadoras normales.

Después de las 18 horas de cultivo las células se lisaron por medio de congelación y descongelación a -70 °C. La cosecha de las células se realizó por medio de una cosechadora (Brandel modelo MH-12 USA), colectándose las muestras en filtros de papel (Brandel USA). Posteriormente se realizó el conteo de las células depositando los filtros en viales Mini PolyTM-Q (USA) con 2 ml de líquido de centelleo (Beckman Counter USA). El conteo se llevó a cabo durante un minuto (por vial) en un contador automático (Beckman modelo LS 6,500 USA). Como controles, en cada caso se evaluó bajo las mismas condiciones, la estimulación de linfocitos T obtenidos de donadoras normales que presentaron el mismo alelo de MHC-I en estudio. La estimulación proliferativa de los linfocitos con péptidos fue medida por el índice de proliferación (IP). El IP se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$IP = [(cpm \text{ de los linfocitos estimulados con péptido} / cpm \text{ de los linfocitos sin péptido}) - 1] \times 100$$

En donde; cpm son las cuentas por minuto.

Las muestras que presentaron un IP > 50 fueron consideradas como positivos.

8. RESULTADOS.

8.1. Frecuencias alélicas HLA clase I de las pacientes con cáncer cérvico uterino (CaCu) y donadoras normales.

En este estudio se trabajaron muestras de sangre periférica de 32 pacientes que presentaban CaCu avanzado y con diferentes estadios clínicos (Tabla 5a-c): 4 con estadio IB1, 3 con IB2, 3 con IIA, 10 con IIB, 10 con IIIB, 1 de IVA y 1 de IVB, de acuerdo con la clasificación de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia, (ver Apéndice). De estas 32 pacientes, 27 (84%) presentaron tumores caracterizados como carcinomas epidermoides; 4 (13%) con adenocarcinoma y 1 (3%) con cervicitis crónica. Sólo 15 biopsias tumorales pudieron ser analizadas para conocer el tipo de virus de papiloma humano: 8 de ellas presentaron infección con HPV-16, 2 con HPV-18, 2 con HPV-16/18, 2 positivas para HPV diferente a 16/18 y 1 negativa para HPV (Tablas 5a-c).

Por otro lado, mediante la tipificación de los haplotipos de histocompatibilidad clase I (HLA-A, B y C) de las 32 pacientes, usando ensayos de microcitotoxicidad en linfocitos de sangre periférica se observó que los alelos HLA clase I más frecuentes fueron: para el locus HLA-A, el alelo HLA-A2 se encontró expresado en 19 (59%) pacientes y el alelo HLA-A24 en 8 (25%) de las pacientes; para el locus HLA-B, los alelos más frecuentes fueron HLA-B35 en 15 (47%) de las pacientes y HLA-B39 en 6 (19%) de las pacientes; finalmente para el locus HLA-C, los alelos más frecuentes fueron HLA-Cw4 en 9 (28%) de las pacientes y el alelo HLA-Cw7 en 8 (25%) de las pacientes (Gráfico 1). Además, es importante mencionar que en las 32 pacientes analizadas, se encontró al menos uno de los alelos de mayor frecuencia en la población mexicana (HLA-A2, A24, B35 y B39) y que la frecuencia encontrada para el alelo HLA-A2 correspondió con la frecuencia reportada previamente por Vargas-Alarcón *et al*, 1999. Además se observó que la asociación alélica más frecuente fue la de HLA-A2/B35 también en un 30% de las pacientes.

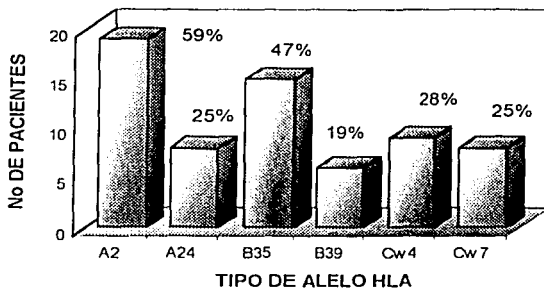


Gráfico 1. Frecuencia de los alelos HLA-A2, -A24, -B35, -B39, -Cw4 y -Cw7 en pacientes con cáncer cérvico-uterino utilizados en este estudio.

En este estudio se contó con un grupo control de donadoras normales que expresaban en su haplotipo HLA clase I al menos uno de los alelos (HLA-A2, A24, B35 y B39) con la finalidad de realizar ensayos de estimulación de linfocitos T de sangre periférica (ver más adelante) con los péptidos derivados de la proteína L1 de HPV-16 y 18 específicos para estos alelos (Tabla 6).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PACIENTE	TIPO DE CARCINOMA	TIPO DE HPV	ESTADIO CLÍNICO	HAPLOTIPO HLA CLASE-I
1	Carcinoma Epidermoide.	NT	IIIB	A2(28), B35, Cw4 A68(28), B48, -
2	Adenocarcinoma.	NT	IIB	A3, B7, Cw3 A24, B50(21), Cw3
3	Carcinoma Epidermoide.	NT	IIB	A1, B8, Cw1 A36, B60(1), -
4	Carcinoma Epidermoide.	NT	IIIB	A24(9), B35, Cw1 A28, B15, -
5	Carcinoma Epidermoide.	NT	IB1	A2, B39, Cw3 B60, -
6	Carcinoma Epidermoide.	NT	IIB	A2, B35
7	Carcinoma Epidermoide.	NT	IIIB	A31, B35 A28, B48
8	Carcinoma Epidermoide.	HPV-16/18	IB2	A1, B8, A24(9), B44(12)
9	Carcinoma Epidermoide.	HPV-18	IIA	A2, B65(14), Cw7 A33(19), B50(21), Cw8
10	Carcinoma Epidermoide.	HPV-16	IB2	A2, B38(16), - B60(40), Cw3
11	Carcinoma Epidermoide.	HPV-16	IIA	A3, B38 A11, B35, Cw4.
12	Carcinoma Epidermoide.	HPV-18	IVB	A2, B35, Cw4.
13	Adenocarcinoma	HPV-16	IB1	A2, B65(14), Cw8 A28, B39(16), Cw7

Tabla 5a. Datos clínicos y haplotipos de histocompatibilidad HLA clase I de las pacientes con cáncer cérvico-uterino, atendidas en el INCAN. NT; no tipificada.

PACIENTE	TIPO DE CARCINOMA	TIPO DE HPV	ESTADIO CLÍNICO	HAPLOTIPO HLA CLASE-I
14	Carcinoma Epidermoide.	HPV-16	IIA	A2, B39(16), Cw7 B41
15	Carcinoma Epidermoide.	HPV-16	IIIB	A2, B35, Cw10 A31, B38
16	Carcinoma Epidermoide.	HPV-16	IIIB	A2, B7, CW7 A23, B51 CW3
17	Carcinoma Epidermoide.	NT	IV A	A2, B48, CW7 A28, B51, CW3
18	Carcinoma Epidermoide.	HPV-(+)	IB2	A2, B35, CW4 A23, B50, CW6
19	Carcinoma Epidermoide.	NT	IIIB	A2, B41, CW9 A28, B62
20	Carcinoma Epidermoide.	NT	IIIB	A24, B46 A28, B48
21	Carcinoma Epidermoide.	NT	IIIB	A31, B35 CW10 A28, B15
22	Carcinoma	HPV-(+)	IIIB	A2, B35 A28, B60
23	Carcinoma adenoescamoso poco diferenciado.	HPV(-)	IIIB	A2, B35 A24, B45
24	Carcinoma Epidermoide.	HPV-16	IIIB	A1, B35 A29, B44.
25	Carcinoma Epidermoide.	HPV-16	IIIB	A28, B35, CW4 A24
26	Carcinoma Epidermoide.	HPV-16/18	IIIB	A30, B18, CW7 A28, B38(16) (B39)

Tabla 5b. Datos clínicos y haplotipos de histocompatibilidad HLA clase I de las pacientes con cáncer cérvico-uterino, atendidas en el INCAN.

PACIENTE	TIPO DE CARCINOMA	TIPO DE HPV	ESTADIO CLÍNICO	HAPLOTIPO HLA CLASE-I
27	Carcinoma Epidermoide.	NT	IIB	A2, B42, CW7 A30
28	Cervicitis crónica.	NT	IIB	A2, B35, CW4 B49, CW7
29	Carcinoma Epidermoide.	NT	IIIB	A2, B50, CW2 B27.
30	Adenocarcinoma poco diferenciado.	NT	IB1	A3, B13, CW4 A30, B35, CW6
31	Carcinoma Epidermoide.	NT	IB1	A2, B35, CW3 A24, B40, CW4
32	Carcinoma Epidermoide.	NT	IIB	A2, B35, Cw4 A24, B27, Cw2.

Tabla 5c. Datos clínicos y haplotipos de histocompatibilidad HLA clase I de las pacientes con cáncer cérvico-uterino, atendidas en el INCAN. NT; no tipificada.

DONADORA	HAPLOTIPO HLA CLASE-I
1	A2 A29(19), B44(12)
2	A2, B48, Cw7 A24(9), B62(15), Cw1
3	A1, B8, Cw7 A2, Cw4
4	A2, B51(5) A3, B13, Cw0
5	A1, B8, Cw7 A24(9), B35, Cw4
6	A24, B48 A23, B35, Cw4
7	A3, B62(15), Cw3 A24(9), B48
8	A1, B35, Cw2 A30(19), B18, Cw5
9	A28, B35, Cw4 A3, B39
10	A28, B35, Cw4 A3, B39
11	A2, B62, Cw1 A26, B38
12	A2, B62, Cw1 A24, B61, Cw3

Tabla 6. Haplotipo de histocompatibilidad HLA clase-I de las donadoras Normales obtenidas del Departamento de Transplantes del INCMSSZ.

8.2. Ensayos de estimulación de linfocitos T de pacientes con cáncer cervical y donadoras normales con péptidos sintéticos.

8.2.1. Estimulación de linfocitos T con péptidos específicos derivados de las proteínas L1 de HPV-16 y 18 para el alelo HLA-A2.

Con la finalidad de evaluar la respuesta proliferativa de linfocitos T de sangre periférica de pacientes con cáncer cérvico-uterino y donadoras normales que expresaban el alelo HLA-A2 en su haplotipo HLA clase I, 1×10^5 linfocitos T fueron cultivados con $50 \mu\text{M}$ de cada uno de los péptidos sintéticos predichos de las proteínas L1 de HPV-16 y 18 (Tabla 3) y de la proteína M de influenza (Tabla 4) específicos para este alelo. La estimulación de linfocitos T inducida con los péptidos sintéticos fue considerada como positiva cuando esta se encontraba con un índice de proliferación (IP) ≥ 50 , tal como lo considera Rensing *et al*, 1996. El péptido que indujo una mejor proliferación en pacientes con CaCu fue: P3(YLRREQMFV) derivado de la proteína L1 de HPV-16, ya que se observó un mayor estímulo en 7 de 19 pacientes con un 37% de frecuencia (Gráfico 2-5 y Tabla 7). El péptido P15(ILFLRNVNV) derivado de la proteína L1 de HPV-18 también indujo estímulo en 7 de 19 pacientes (37%). Esta frecuencia de estímulo fue comparable a la observada por el péptido control de Influenza-A P25(GILGFVFTL) (Gráfico 2-5 y Tabla 7). Cabe destacar que el índice de proliferación (IP) más alto se observó en los linfocitos de la paciente número 14 con el péptido P15 derivado de HPV-18, mostrando un IP de 1250, muy similar al inducido por el péptido P25 de Influenza-A, en las pacientes 13 y 14 cuyas biopsias mostraron positividad a la infección con HPV-16, con un IP de 1200 y 1600 respectivamente (Gráfico 3). Por otro lado, se observó que los linfocitos T derivados de la paciente número 10 positiva para HPV-16; la paciente número 22 (positiva para HPV diferente a 16 y 18); y la paciente número 23 (negativa para HPV) respondieron a los péptidos derivados de HPV-16 y 18, al igual que a los péptidos de Influenza-A (Gráfico 4).

Por otra parte, al analizar la proliferación de los linfocitos T de donadoras normales que expresaron el alelo HLA-A2 se observó que los péptidos derivados de la proteína L1 de HPV-16: P2(GLQYRVFRI) y P3(YLRREQMFV) indujeron una proliferación fuerte en la donadora normal número 12 con un IP de 178 y 102 respectivamente (Gráfico 6 y Tabla 7); y los péptidos derivados de la proteína L1 de HPV-18: P14(SLYDTYRFV) y P15(ILFLRNVNV) indujeron un estímulo fuerte en la donadora 11 con un IP de 115 y 104 respectivamente. Mientras tanto, el péptido control de Matriz de Influenza-A P25(GILGFVFTL), indujo estímulo en 4 de las 6 donadoras normales (67%) que presentaban el alelo HLA-A2, en donde el estímulo más fuerte se observó en los linfocitos de la donadora número 3 con un IP de 120 (Gráfico 6 y Tabla 7).

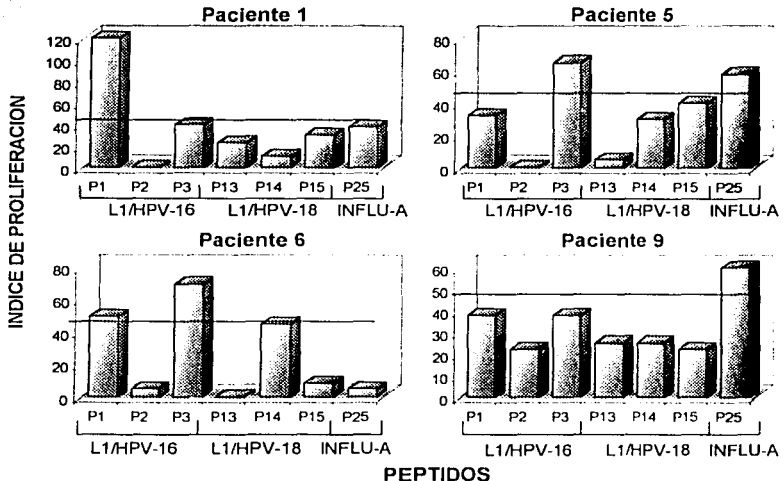
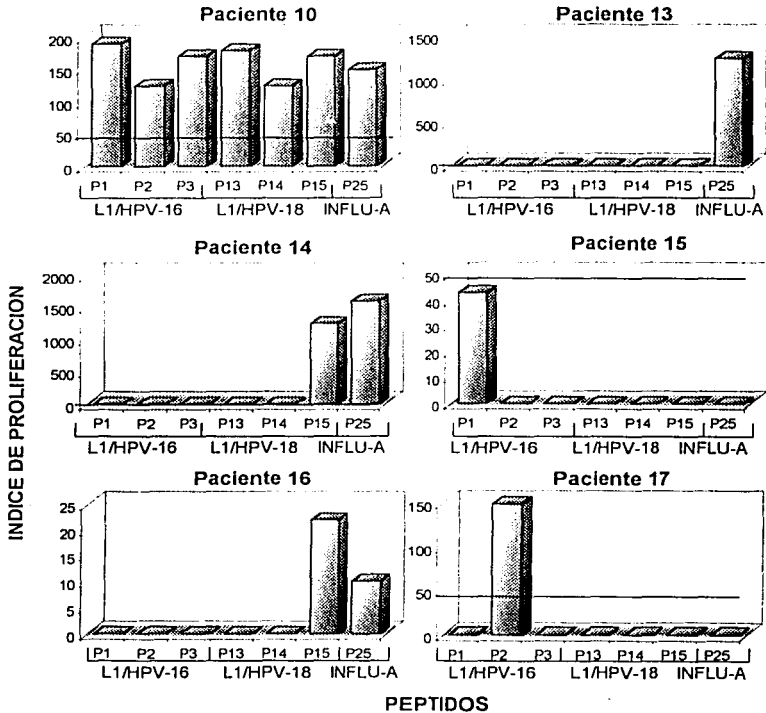


Gráfico 2. Proliferación de linfocitos T de sangre periférica de pacientes con CaCu y con el alelo HLA-A2. Los linfocitos de cada una de las pacientes fueron cultivados en ausencia o en presencia de los diferentes péptidos específicos para el alelo HLA-A2. Péptidos de la proteína L1 del HPV-16: P1(FLLQAGLKA); P2(GLQYRVFRI); P3(YLRREQMFV). Péptidos de la proteína L1 del HPV-18: P13(QLFNKPYWL); P14(SLYDTYRFV); P15(ILFLRNVNV); y péptido de la proteína de Matriz de Influenza-A: P25(GILGFVFTL). La proliferación fue evaluada a los siete días de cultivo mediante la incorporación de timidina trititada. Los cultivos en los cuales se obtuvieron IP superiores a 50, fueron considerados como positivos.



PEPTIDOS

Gráfico 3. Proliferación de linfocitos T de sangre periférica de pacientes con CaCu y con el alelo HLA-A2. Los linfocitos de cada una de las pacientes fueron cultivados en ausencia o en presencia de los diferentes péptidos específicos para el alelo HLA-A2. Péptidos de la proteína L1 del HPV-16: P1(FLLQAGLKA); P2(GLQYRVFRI); P3(YLRREQMFV). Péptidos de la proteína L1 del HPV-18: P13(QLFNKPYWL); P14(SLYDTYRFV); P15(ILFLRN NVN); y péptido de la proteína de Matriz de Influenza-A: P25(GILGFVFTL). La proliferación fue evaluada a los siete días de cultivo mediante la incorporación de timidina tritiada. Los cultivos en los cuales se obtuvieron IP superiores a 50, fueron considerados como positivos.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

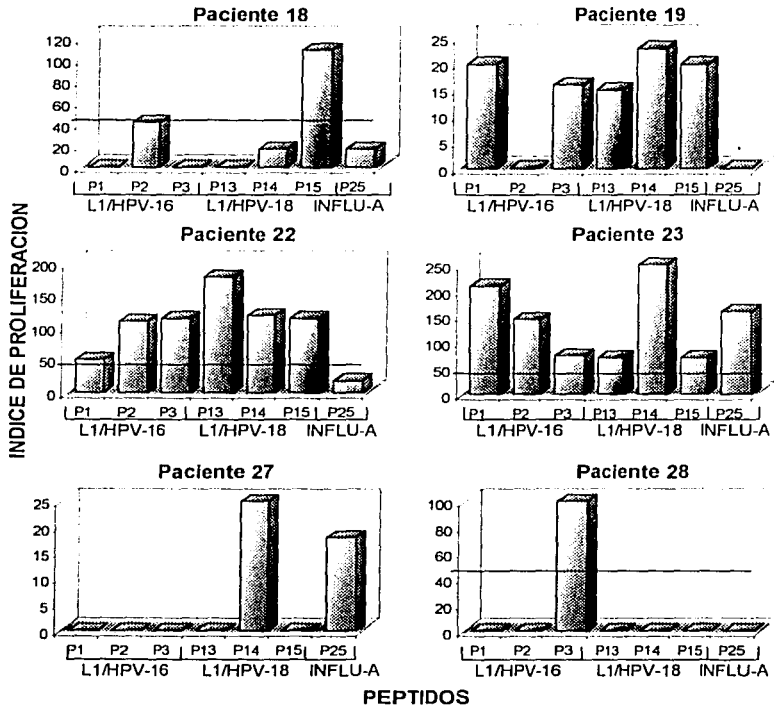
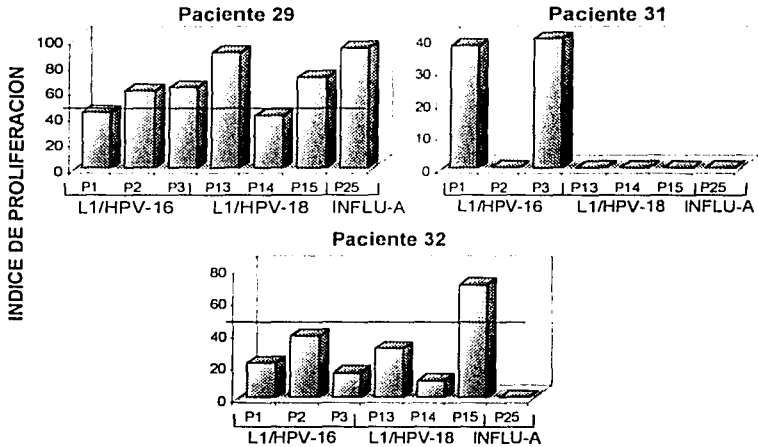


Gráfico 4. Proliferación de linfocitos T de sangre periférica de pacientes con CaCu y con el alelo HLA-A2. Los linfocitos de cada una de las pacientes fueron cultivados en ausencia o en presencia de los diferentes péptidos específicos para el alelo HLA-A2. Péptidos de la proteína L1 del HPV-16: P1(FLLQAGLKA); P2(GLQYRVFRI); P3(YLRREQMFV). Péptidos de la proteína L1 del HPV-18: P13(QLFNKPYWL); P14(SLYDTYRFV); P15(ILFLRNVNV); y péptido de la proteína de Matriz de Influenza-A: P25(GILGFVFTL). La proliferación fue evaluada a los siete días de cultivo mediante la incorporación de timidina tritiada. Los cultivos en los cuales se obtuvieron IP superiores a 50, fueron considerados como positivos.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



PEPTIDOS

Gráfico 5. Proliferación de linfocitos T de sangre periférica de pacientes con CaCu y con el alelo HLA-A2. Los linfocitos de cada una de las pacientes fueron cultivados en ausencia o en presencia de los diferentes péptidos específicos para el alelo HLA-A2. Péptidos de la proteína L1 del HPV-16: P1(FLLQAGLKA); P2(GLQYRVFRI); P3(YLRREQMFV). Péptidos de la proteína L1 del HPV-18: P13(QLFNKPYWL); P14(SLYDYTRFV); P15(ILFLRNVNV); y péptido de la proteína de Matriz de Influenza-A: P25(GILGFVFTL). La proliferación fue evaluada a los siete días de cultivo mediante la incorporación de timidina tritiada. Los cultivos en los cuales se obtuvieron IP superiores a 50, fueron considerados como positivos.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

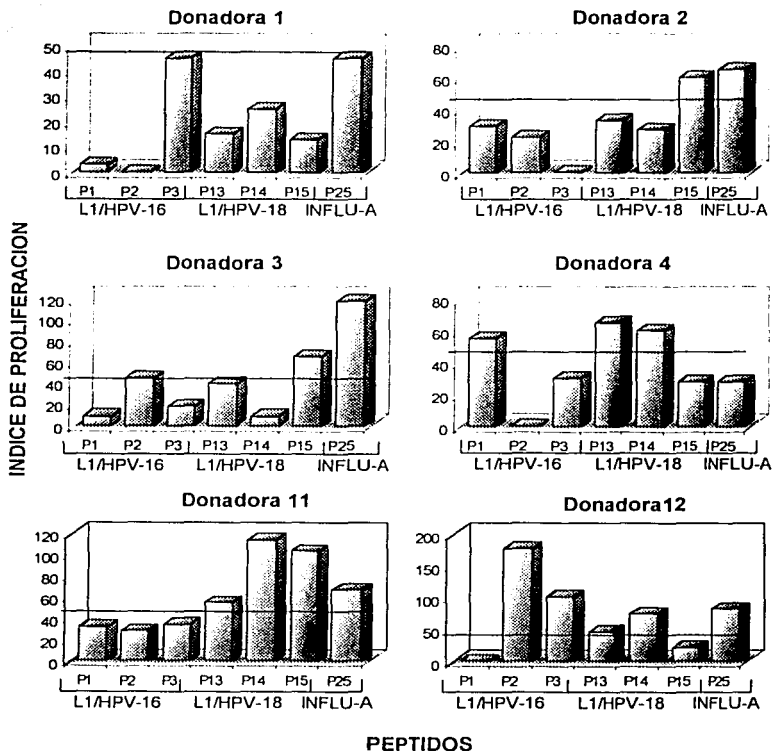


Gráfico 6. Proliferación de linfocitos T de sangre periférica de mujeres donadoras y con el alelo HLA-A2. Los linfocitos de cada una de las donadoras fueron cultivados en ausencia o en presencia de los diferentes péptidos específicos para el alelo HLA-A2. Péptidos de la proteína L1 del HPV-16: P1(FLQAGLKA); P2(GLQYRVFRI); P3(YLRREQMFV). Péptidos de la proteína L1 del HPV-18: P13(QLFNKPYWL); P14(SLYDTYRFV); P15(ILFLRNQNV); y péptido de la proteína de Matriz de Influenza-A: P25(GILGFVFTL). La proliferación fue evaluada a los siete días de cultivo mediante la incorporación de timidina tritiada. Los cultivos en los cuales se obtuvieron IP superiores a 50, fueron considerados como positivos.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

8.2.2. Estimulación con péptidos específicos para el alelo HLA-A24.

Los péptidos P4(DYKQTQLCL) y P5(FYNPDTQRL) derivados de la proteína L1 de HPV-16, estimularon cada uno a 3 de 8 (38%) de las pacientes con CaCu. El mismo número de pacientes fue estimulado con el péptido control de Influenza-A P27(VFAGKNTDL) específico para el alelo HLA-A24 (Gráfico 7-8 y Tabla 7). Cabe destacar que el péptido P4 indujo un estímulo fuerte en la paciente número 8 (positiva para HPV-16/18) con un IP de 500 (Gráfico 8). La paciente número 23 cuya biopsia fue negativa para HPV, presentó estimulación de linfocitos T con todos los péptidos de HPV-16 y 18, incluyendo al péptido control, destacando los péptidos derivados de la proteína L1 de HPV-18: P16(LYHPRPLPL), P17(IYNPETQRL) y P18(QYPLGRKFL) que indujeron un estímulo fuerte con un IP de; 150, 145 y 225 respectivamente (Gráfico 8). En las donadoras normales que presentaron este alelo, el péptido de Influenza-A P27(VFAGKNTDL) indujo una respuesta proliferativa fuerte en 3 de 4 (75%) de las donadoras, destacando las donadoras 5 y 7 con un IP de 100 en cada una (Gráfico 9 y Tabla 7).

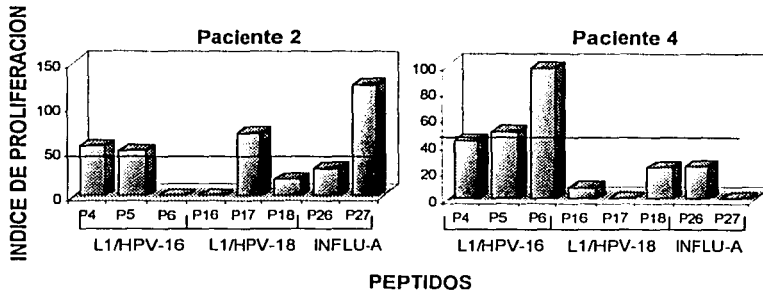
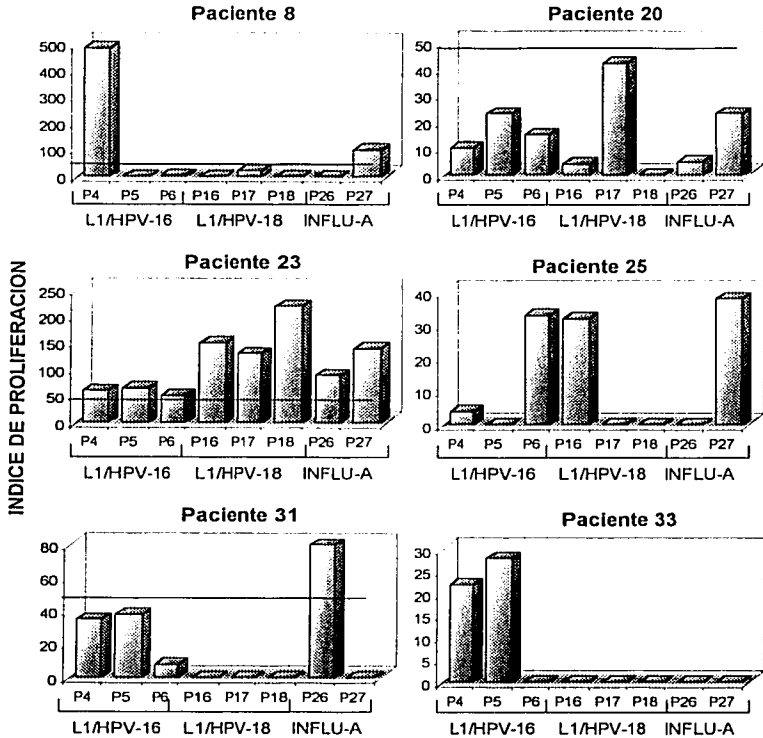


Gráfico 7. Proliferación de linfocitos T de sangre periférica de pacientes con CaCu y con el alelo HLA-A24. Los linfocitos de cada una de las pacientes fueron cultivados en ausencia o en presencia de los diferentes péptidos específicos para el alelo HLA-A24. Péptidos de la proteína L1 del HPV-16: P4(DYKQTQLCL); P5(FYNPDTQRL); P6(KYTFWEVNL). Péptidos de la proteína L1 del HPV-18: P16(LYHPRPLPL); P17(IYNPETQRL); P18(QYPLGRKFL); y péptido de la proteína de Matriz de Influenza-A: P26(LYRKLKREI); P27(VFAGKNTDL). La proliferación fue evaluada a los siete días de cultivo mediante la incorporación de timidina tritiada. Los cultivos en los cuales se obtuvieron IP superiores a 50, fueron considerados como positivos.



PEPTIDOS

Gráfico 8. Proliferación de linfocitos T de sangre periférica de pacientes con CaCu y con el alelo HLA-A24. Los linfocitos de cada una de las pacientes fueron cultivados en ausencia o en presencia de los diferentes péptidos específicos para el alelo HLA-A24. Péptidos de la proteína L1 del HPV-16: P4(DYKQTQLCL); P5(FYNPDTQRL); P6(KYTFWEVNL). Péptidos de la proteína L1 del HPV-18: P16(LYHPRPLPL); P17(IYNPETQRL); P18(QYPLGRKFL); y péptido de la proteína de Matriz de Influenza-A: P26(LYRKLKREI); P27(VFAGKNTDL). La proliferación fue evaluada a los siete días de cultivo mediante la incorporación de timidina tritlada. Los cultivos en los cuales se obtuvieron IP superiores a 50, fueron considerados como positivos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

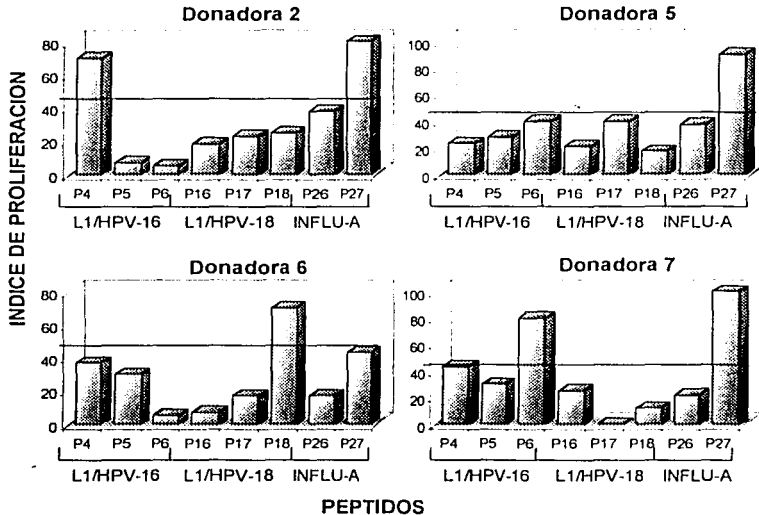


Gráfico 9. Proliferación de linfocitos T de sangre periférica de mujeres donadoras y con el alelo HLA-A24. Los linfocitos de cada una de las donadoras fueron cultivados en ausencia o en presencia de los diferentes péptidos específicos para el alelo HLA-A24. Péptidos de la proteína L1 del HPV-16: P4(DYKQTQLCL); P5(FYNPDTQRL); P6(KYTFWEVNL). Péptidos de la proteína L1 del HPV-18: P16(LYHPRPLPL); P17(IYNPETQRL); P18(QYPLGRKFL); y péptido de la proteína de Matriz de Influenza-A: P26(LYRKLKREI); P27(VFAGKNTDL). La proliferación fue evaluada a los siete días de cultivo mediante la incorporación de timidina tritiada. Los cultivos en los cuales se obtuvieron IP superiores a 50, fueron considerados como positivos.

PEPES CON
PALLA DE ORIGEN

8.2.3. Estimulación de linfocitos T con péptidos específicos para el alelo HLA-B35.

La mayor estimulación inducida a los linfocitos T de pacientes con el alelo HLA-B35 fue dada por los péptidos P7(EPYGDSLFF) y P8(VPKVSGQLQY) derivados de la proteína L1 de HPV-16, y los péptidos P20(IPKVSAYQY) y P21(APAENKDPY) derivados de la proteína L1 de HPV-18, cada uno en 7 de 15 (47%) de las pacientes (Gráficos 10-13 y Tabla 7); mientras que el péptido control de Influenza-A P28(GAKEISLSY) estimuló a los linfocitos de 6 de 15 (40%) de las pacientes, destacando las pacientes 22 y 24 con IP de 200 (Gráficos 11 y 12 y Tabla 7). En el caso de las donadoras normales, el mayor estímulo de los linfocitos T fue inducido principalmente por el péptido P7(EPYGDSLFF), el cual indujo una respuesta proliferativa fuerte en 2 de 3 donadoras normales (Gráfico 14 y Tabla 7) al igual que el péptido control P29(QARQMVQAM) de Influenza-A en las mismas donadoras (Gráfico 14 y Tabla 7).

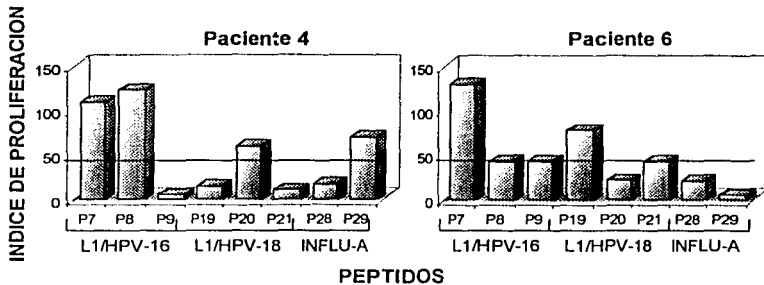


Gráfico 10. Proliferación de linfocitos T de sangre periférica de pacientes con CaCu y con el alelo HLA-B35. Los linfocitos de cada una de las pacientes fueron cultivados en ausencia o en presencia de los diferentes péptidos específicos para el alelo HLA-B35. Péptidos de la proteína L1 del HPV-16: P7(EPYGDSLFF); P8(VPKVSGQLQY); P9(LPSEATVYLY). Péptidos de la proteína L1 del HPV-18: P19(RPSDNTVYLY); P20(IPKVSAYQY); P21(APAENKDPY); y péptido de la proteína de Matriz de Influenza-A: P28(GAKEISLSY); P29(QARQMVQAM). La proliferación fue evaluada a los siete días de cultivo mediante la incorporación de timidina triliada. Los cultivos en los cuales se obtuvieron IP superiores a 50, fueron considerados como positivos.

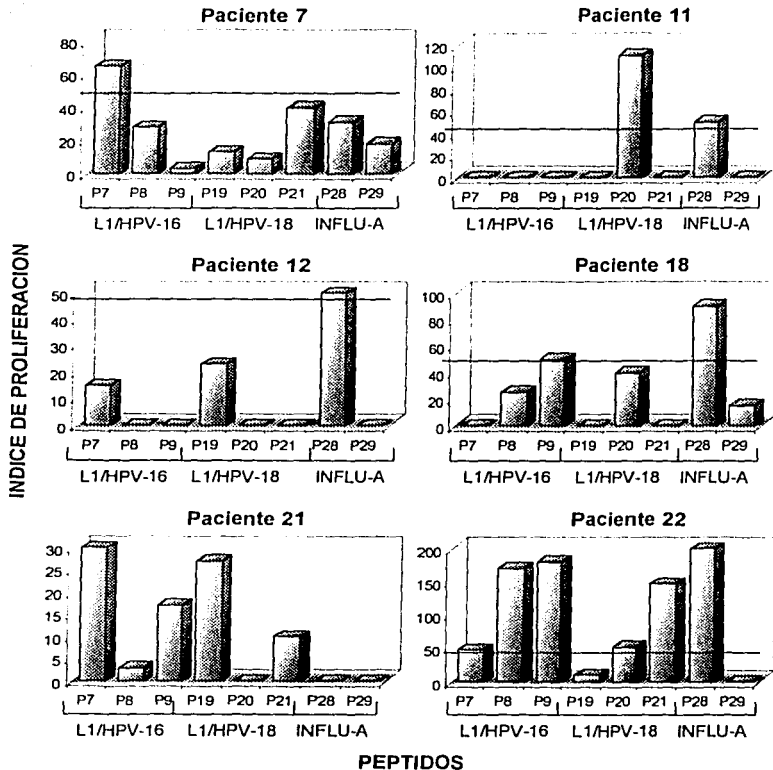
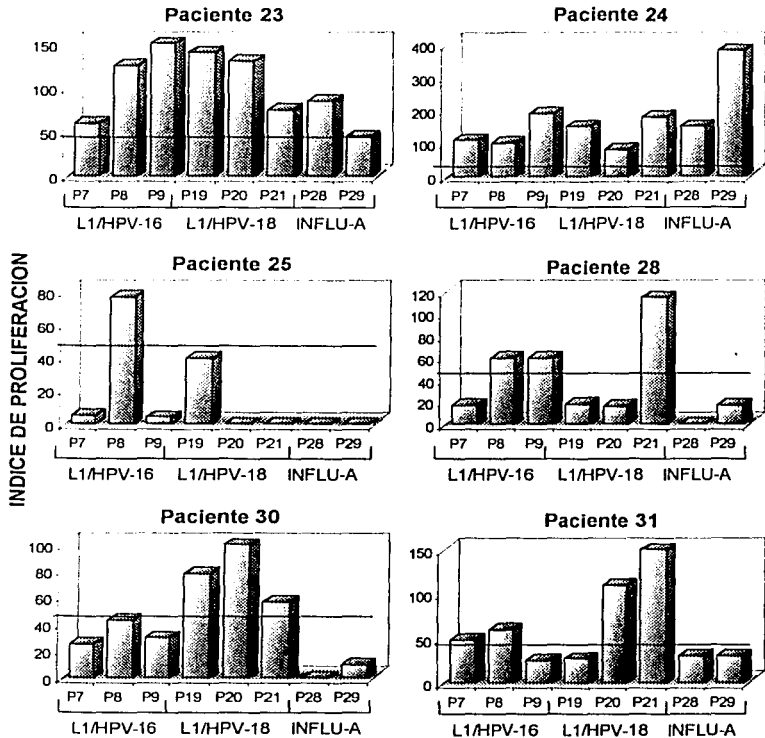


Gráfico 11. Proliferación de linfocitos T de sangre periférica de pacientes con CaCu y con el alelo HLA-B35. Los linfocitos de cada una de las pacientes fueron cultivados en ausencia en presencia de los diferentes péptidos específicos para el alelo HLA-B35. Péptidos de la proteína L1 del HPV-16: P7(EPYGDLSLFF); P8(VPKVSGSLQY); P9(LPSEATVYL). Péptidos de la proteína L1 del HPV-18: P19(RPSDNTVYL); P20(IPKVSAYQY); P21(APAENKDPY); y péptido de la proteína de Matriz de Influenza-A: P28(GAKEISLSY); P29(QARQMVQAM). La proliferación fue evaluada a los siete días de cultivo mediante la incorporación de timidina tritiada. Los cultivos en los cuales se obtuvieron IP superiores a 50, fueron considerados como positivos.



PEPTIDOS

Gráfico 12. Proliferación de linfocitos T de sangre periférica de pacientes con CaCu y con el alelo HLA-B35. Los linfocitos de cada una de las pacientes fueron cultivados en ausencia o en presencia de los diferentes péptidos específicos para el alelo HLA-B35. Péptidos de la proteína L1 del HPV-16: P7(EPYGDSLFF); P8(VPKVSGLQY); P9(LPSEATVYL). Péptidos de la proteína L1 del HPV-18: P19(RPSDNTVYL); P20(IPKVSAYQY); P21(APAENKDPY); y péptido de la proteína de Matriz de Influenza-A: P28(GAKEISLSY); P29(QARQMVQAM). La proliferación fue evaluada a los siete días de cultivo mediante la incorporación de timidina tritiada. Los cultivos en los cuales se obtuvieron IP superiores a 50, fueron considerados como positivos.

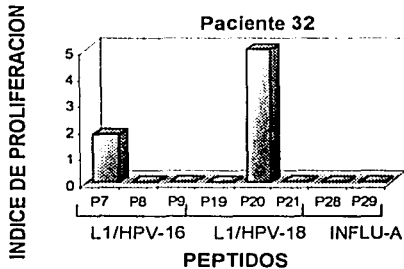
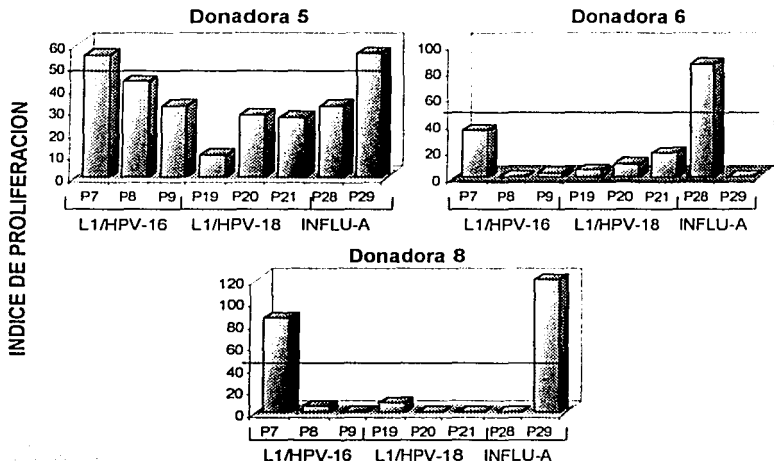


Gráfico 13. Proliferación de linfocitos T de sangre periférica de pacientes con CaCu y con el alelo HLA-B35. Los linfocitos de cada una de las pacientes fueron cultivados en ausencia o en presencia de los diferentes péptidos específicos para el alelo HLA-B35. Péptidos de la proteína L1 del HPV-16: P7(EPYGDSLFF); P8(VPKVSGLQY); P9(LPSEATVYL). Péptidos de la proteína L1 del HPV-18: P19(RPSDNTVYL); P20(IPKVSAYQY); P21(APAENKDPY); y péptido de la proteína de Matriz de Influenza-A: P28(GAKEISLSY); P29(QARQMVQAM). La proliferación fue evaluada a los siete días de cultivo mediante la incorporación de timidina tritiada. Los cultivos en los cuales se obtuvieron IP superiores a 50, fueron considerados como positivos.

FALLA DE ORIGEN



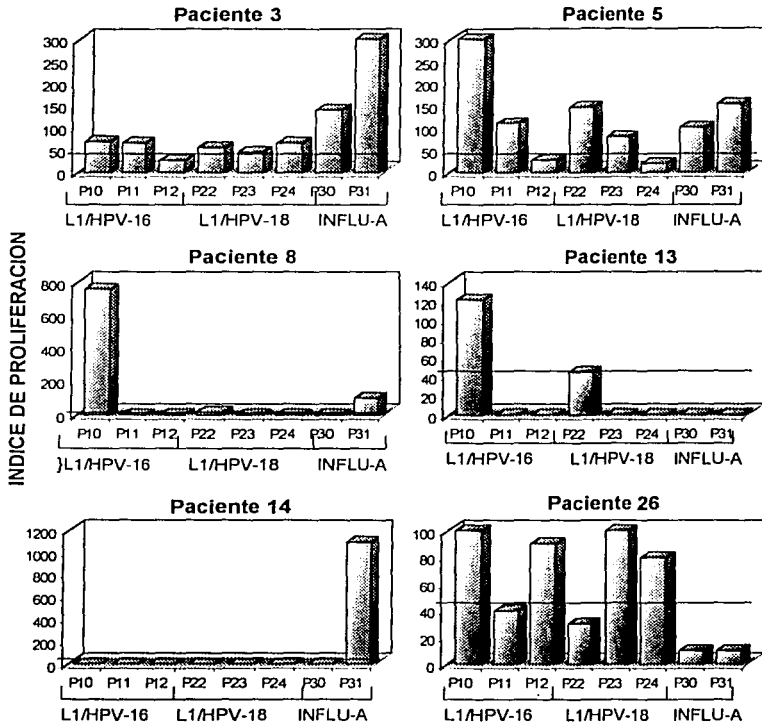
PEPTIDOS

Gráfico 14. Proliferación de linfocitos T de sangre periférica de mujeres donadoras y con el alelo HLA-B35. Los linfocitos de cada una de las donadoras fueron cultivados en ausencia o en presencia de los diferentes péptidos específicos para el alelo HLA-B35. Péptidos de la proteína L1 del HPV-16: P7(EPYGDSLFF); P8(VPKVSGSLQY); P9(LPSEATVYL). Péptidos de la proteína L1 del HPV-18: P19(RPSDNTVYL); P20(IPKVSAYQY); P21(APAENKDPY); y péptido de la proteína de Matriz de Influenza-A: P28(GAKEISLSY); P29(QARQMVQAM). La proliferación fue evaluada a los siete días de cultivo mediante la incorporación de timidina tritiada. Los cultivos en los cuales se obtuvieron IP superiores a 50, fueron considerados como positivos.

ESTE CON
FALLA DE ORIGEN

8.2.4. Estimulación de linfocitos T con péptidos específicos para el alelo HLA-B39.

La principal respuesta proliferativa de los linfocitos T en pacientes con CaCu que presentaban el alelo HLA-B39, fue dada por el péptido P10(IHSMNSTIL) derivado de la proteína L1 de HPV-16, este péptido indujo un estímulo fuerte en 5 de 6 (83%) de las pacientes. Es importante destacar que el mayor estímulo dado por este péptido se observó en los linfocitos de la paciente número 8 (positiva para HPV16 y 18), observándose un IP de 700 (Gráfico 15). Asimismo, los linfocitos T de la paciente 26 con positividad para HPV-16/18, fueron estimulados con los péptidos P10(IHSMNSTIL) y P12(IHAGTSRLL) de HPV-16 y los péptidos P23(IHSMNSSIL) y P24(IHAGSSRLL) de HPV-18, con IP's de 110 por los péptidos P10 y P23 y de 80-98 por los péptidos P12 y P24. Además es interesante mencionar que la homología entre los péptidos P10 y P23 y los péptidos P12 y P24 fue de 89% (8 de 9 aminoácidos compartidos). Por otro lado, el péptido control de Influenza-A P31(LKNDLLENL) indujo estímulo en 67% de las pacientes, destacando la paciente número 14 (positiva para HPV-16 en su biopsia) en donde se observó un estímulo fuerte con un IP de 1, 100 (Gráfico 15 y Tabla 7). En el caso de las donadoras normales el péptido P23(IHSMNSSIL) derivado de la proteína L1 de HPV-18 produjo una fuerte estimulación en las 2 donadoras normales estudiadas (Gráfico 16 y Tabla 7).



PEPTIDOS

Gráfico 15. Proliferación de linfocitos T de sangre periférica pacientes con CaCu y con el alelo HLA-B39. Los linfocitos de cada una de las donadoras fueron cultivados en ausencia o en presencia de los diferentes péptidos específicos para el alelo HLA-B39. Péptidos de la proteína L1 del HPV-16: P10(IHSMNSTIL); P11(YHIFQMSL); P12(YHAGSTRLL). Péptidos de la proteína L1 del HPV-18: P22(LHSILVYMV); P23(IHMNSSIL); P24(YHAGSSRLL); y péptido de la proteína de Matriz de Influenza-A: P30(LKAEIAQRL); P31(LKNDLLENL). La proliferación fue evaluada a los siete días de cultivo mediante la incorporación de timidina tritiada. Los cultivos en los cuales se obtuvieron IP superiores a 50, fueron considerados como positivos.

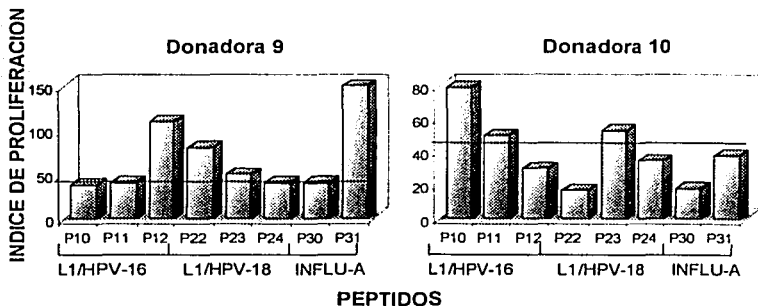


Gráfico 16. Proliferación de linfocitos T de sangre periférica de mujeres donadoras y con el alelo HLA-B39. Los linfocitos de cada una de las donadoras fueron cultivados en ausencia o en presencia de los diferentes péptidos específicos para el alelo HLA-B39. Péptidos de la proteína L1 del HPV-16: P10(IHSMNSTIL); P11(YHIFQMSL); P12(YHAGSTSRL). Péptidos de la proteína L1 del HPV-18: P22(LHSILVYMV); P23(IHMNSSIL); P24(YHAGSSRLL); y péptido de la proteína de Matriz de Influenza-A: P30(LKAEIAQRL); P31(LKNDLLENL). La proliferación fue evaluada a los siete días de cultivo mediante la incorporación de timidina triliada. Los cultivos en los cuales se obtuvieron IP superiores a 50, fueron considerados como positivos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TIPO DE PROTEÍNA	PEPTIDOS	PACIENTES		DONADORAS NORMALES	
		Estim.	Total	Estim.	Total
HLA-A2					
HPV-16	P1(FILQAGLKA)	5	19	1	6
	P2(GLDYRVFRI)	6	19	1	6
	P3(YLRREQMFV)	7	19	1	6
HPV-18	P13(QLFNKPYWL)	4	19	2	6
	P14(SLYDTYRFV)	4	19	3	6
	P15(ILFRNVNV)	7	19	3	6
INLFU-A	P25(GILGFVFTL)	7	19	4	6
HLA-A24					
HPV-16	P4(DYKQTQLCL)	3	8	1	4
	P5(FYNPDTQRL)	3	8	0	4
	P6(KYTFWEVNL)	2	8	1	4
HPV-18	P16(LYHPRPLPL)	1	8	0	4
	P17(IYNPETQDL)	2	8	0	4
	P18(QYPLGRKFL)	1	8	1	4
INFLU-A	P26(LYRKLKREI)	2	8	0	4
	P27(VFAGKNTDL)	3	8	3	4
HLA-B35					
HPV-16	P7(EPYGDSLFF)	7	15	2	3
	P8(VPKVSGLQY)	7	15	0	3
	P9(LPSEATVYL)	5	15	0	3
HPV-18	P19(RPSDNTVYL)	4	15	0	3
	P20(IPKVSAYQY)	7	15	0	3
	P21(APAENKDPY)	7	15	0	3
INFLU-A	P28(GAKEISLSY)	6	15	1	3
	P29(QARQMVQAM)	2	15	2	3
HLA-B39					
HPV-16	P10(IHSMNSTIL)	5	6	1	2
	P11(YHIFQMSL)	2	6	1	2
	P12(YHAGTSRLL)	1	6	1	2
HPV-18	P22(LHSILVYMV)	2	6	1	2
	P23(IHSMNSSIL)	2	6	2	2
	P24(YHAGSSRLL)	2	6	0	2
INFLU-A	P30(LKAEIAQRL)	2	6	0	2
	P31(LKNDLLENL)	5	6	1	2

Tabla 7. Frecuencias de pacientes y donadoras normales estimuladas (Estim.) con los péptidos antigénicos de la proteína L1 de HPV-16 y 18 específicos para los alelos HLA-A2, -A24, -B35 y -B39.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

8.3. Homología de péptidos antigénicos de las proteínas L1 de HPV-16 y 18 encontrados en este estudio, con péptidos derivados de L1 de otros tipos de HPV.

Muñoz y Bosch (1997), han encontrado homologías fuertes entre las secuencias de algunos tipos de HPV de alto y bajo riesgo para el desarrollo de cáncer de cuello uterino, por lo que en este trabajo se realizó un análisis para averiguar si los péptidos derivados de la proteína L1 de HPV-16 y 18 específicos para los alelos HLA-A2, -A24, -B35 y -B39 que indujeron mayor antigenicidad (IP \geq 50) en pacientes con CaCu y donadoras normales, compartían homologías entre ellos y otros tipos de HPV asociados con lesiones benignas y malignas (Tabla 8). De este análisis se encontró que el péptido P1(FLLQAGLKA) de la secuencia 494-503 de la proteína L1/HPV-16 específico para el alelo HLA-A2 comparte 6 de 9 aminoácidos con el péptido FLFQAGLQH de la secuencia 493-502 de la proteína L1 del HPV-5; HPV-5 se asocia con epidermodisplasia verruciforme y carcinoma de células epidermoides (Tabla 8).

El péptido P4(DYKQTQLCL) de la secuencia 176-184 de la proteína L1/HPV-16 y con especificidad para el alelo HLA-A24, comparte 7 aminoácidos con el péptido DYKQTQLFI secuencia 164-172 de la proteína L1 del HPV-57 asociado con verrugas y papilomatosis; y también comparte 8 de 9 aminoácidos con el péptido DYKQTQLCM secuencia 173-181 de la proteína L1 del HPV-74 que se asocia con el desarrollo de condiloma acuminado. En tanto que el péptido P5(FYNPDTQRL) de HPV-16 y P17(IYNPETQRL) de HPV-18, específicos para este mismo alelo, mostraron un 78% de homología, compartiendo 7 de 9 aminoácidos entre ellos (Tabla 8).

Los péptidos específicos para HLA-B35, P8(VPKVGLQY) y P20(IPKVSAYQY) así como los péptidos P9(LPSEATVYL) y P19(RPSDNTVYL) mostraron homología del 67% entre ellos ya que compartieron 6 de los 9 aminoácidos de sus secuencias (Tabla 8).

Por otra parte, como ya mencionado previamente, los péptidos P12(YHAGTSRLL) de HPV-16 y P24(YHAGSSRLL) de HPV-18 así como los péptidos P10(IHSMNSTIL) de HPV-16 y P23(IHSMNSSIL) de HPV-18 con especificidad para el alelo HLA-B39, presentaron una homología del 89% entre ellos, compartiendo 8 de los 9 aminoácidos de sus secuencias (Tabla 8). Finalmente, es interesante mencionar que el péptido P10(IHSMNSTIL) de secuencia 417-425 de la proteína L1 de HPV-16 y con especificidad para el alelo HLA-B39, compartió 5 de 9 aminoácidos con el péptido INAMNSSLL secuencia 416-424 de la proteína L1/HPV-5 asociado con epidermodisplasia verruciforme y carcinoma de células epidemoides; 6 de 9 aminoácidos con el péptido INAMNSGIL secuencia 401-409 de la proteína L1/HPV-38 asociado con verrugas; y 8 de 9 aminoácidos con el péptido IHSMNSSIL con secuencia 77-85 de la proteína L1/HPV-45 asociado con NIC y CaCu. (Tabla 8).

Este análisis nos permite resaltar la homología que tienen algunos péptidos inmunogénicos de la proteína L1 de HPV-16 (virus de alto riesgo para el desarrollo de CaCu), con secuencias de la proteína L1 de varios HPV's de bajo riesgo como son los tipos 5, 38, y 74 (asociados con lesiones benignas tales como verrugas, papilomas y condilomas) y el HPV-45 (asociado con NIC) (Tabla 8), lo que sugiere que entre estos tipos de papiloma existen secuencias antigénicas (epítopes) que pueden ser compartidas de manera parcial o total y que pueden tener efecto inmunogénico tanto en pacientes con CaCu como en donadoras normales que presenten lesiones benignas producidas por HPV's. Esto nos puede sugerir la importancia que pueden tener estos péptidos antigénicos en el tratamiento de varias enfermedades producidas por varios tipos de papilomas en el humano.

PEPTIDO	POSICIÓN	%HOMOLOGÍA	PROTEÍNA	TIPO DE LESIÓN ASOCIADA
FLLQAGLKA FLFQAGLQH	494 - 503 493 - 502	67%	L1/HPV-16 (P1/HLA-A2) L1/HPV-5	CaCu. Epidermodisplasia verruciforme, Carcinoma de células epidermoides.
DYKQTQLCL DYKQTQLFI	176 - 184 164 - 172	78%	L1/HPV-16 (P4/HLA-A24) L1/HPV-57	CaCu. Verrugas y papilomatosis.
FYNPDTQRL IYNPETQDL	116-124 151-159	78%	L1/HPV-16 (P5/HLA-A24) L1/HPV-18 (P17/HLA-A24)	CaCu CaCu
DYKQTQLCL DYKQTQLCM	176 - 184 173 - 181	89%	L1/HPV-16 (P4/HLA-A24) L1/HPV-74	CaCu. Condiloma acuminado.
VPKVSGLQY IPKVSAYQY	88-96 66-74	67%	L1/HPV-16 (P8/HLA-B35) L1/HPV-18 (P19/HLA-B35)	CaCu CaCu
LPSEATVYL RPSDNTVYL	31-39 66-74	67%	L1/HPV-16 (P9/HLA-B35) L1/HPV-18 (P19/HLA-B35)	CaCu CaCu
IHSMNSTIL INAMNSSLL	417 - 425 493 - 502	56%	L1/HPV-16 (P10/HLA-B39) L1/HPV-5	CaCu. Epidermodisplasia verruciforme, Carcinoma de células epidermoides.
IHSMNSTIL INAMNSGIL	471 - 425 401 - 409	67%	L1/HPV-16 (P10/HLA-B39) L1/HPV-38	CaCu. Verrugas
IHSMNSTIL IHSMNSSIL	417-425 453-461	89%	L1/HPV-16 (P10/HLA-B39) L1/HPV-18 (P23/HLA-B39)	CaCu CaCu
YHAGTSRLL YHAGSSRLL	61-69 96-104	89%	L1/HPV-16 (P12/HLA-B39) L1/HPV-18 (P24/HLA-B39)	CaCu CaCu
IHSMNSTIL IHSMNSSIL	471 - 425 77 - 85	89%	L1/HPV-16 (P10/HLA-B39) L1/HPV-45	CaCu. NIC, CaCu.

Tabla 8. Péptidos antigénicos de la proteína L1 de HPV-16 específicos para los alelos HLA-A2, -A24, -B35 y B39 de alta frecuencia en México, y su homología con péptidos derivados de la proteína L1 de varios tipos de papiloma humano asociados con lesiones epiteliales.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

9. DISCUSIÓN

Las moléculas MHC-I juegan un papel importante en la inmunidad adquirida ya que presentan en la membrana de las células blanco (células infectadas por virus o células tumorales), péptidos antigénicos (de 8 a 10 aminoácidos de longitud) derivados de proteínas virales y oncoproteínas, con la finalidad de ser reconocidos por los linfocitos T citotóxicos (Lehner *et al*, 1996; Janeway *et al*, 1997; Moreno *et al*, 1996). Se sabe que el cáncer cérvico-uterino tiene una fuerte asociación con la infección de HPV, principalmente con los tipos HPV-16 y 18, que en conjunto se han encontrado presentes en alrededor del 75% de los tumores (Stephen, 1998), lo cual hace factible que proteínas derivadas de estos virus (ya sea de transcripción temprana E1, E2, E4, E5, E6 y E7, o de transcripción tardía L1 y L2) puedan ser procesadas y presentadas en forma de péptidos por las moléculas MHC-I en la membrana de las células infectadas por estos virus. Por otro lado, las proteínas virales de transcripción tardía L1 y L2 constituyen la cápside de los HPV en una proporción de 9 a 1 aproximadamente, y juegan un papel importante en el proceso de infección de las células del epitelio cervical (Stubenrauch y Laimins, 1999; Shepherd *et al*, 1996). Se ha observado que péptidos derivados de estas proteínas en forma de partículas propias del virus (VLPs), son capaces de generar efectos protectivos mediados por linfocitos T citotóxicos en modelos animales (Sapp *et al*, 1996; Suzich *et al*, 1995). Lo cual sugiere, que de manera eventual estas proteínas puedan ingresar a la vía del procesamiento antigénico y péptidos derivados de ellas ser presentados por moléculas I MHC-I (Rock *et al*, 1991).

La identificación de los péptidos antigénicos que se asocian a las moléculas MHC-I se ha basado principalmente en dos estrategias: a) extracción y caracterización bioquímica de los péptidos asociados naturalmente a las moléculas MHC-I y b) estudios de unión con péptidos sintéticos. En el estudio de la identificación de los péptidos antigénicos derivados de proteínas del virus de papiloma humano, la primer estrategia ha sido poco desarrollada, debido a la gran

cantidad de material celular que se requiere para la obtención de una cantidad considerable de moléculas MHC-I para poder disociar y posteriormente caracterizar los péptidos que se unen a ellas. Al respecto, pocos estudios han sido citados en la literatura: por ejemplo, en uno de ellos, se ha descrito la elusión natural de un péptido endógeno derivado de la proteína E6 de HPV-16 a partir de células infectadas con el virus de vaccinia recombinante portando la información de E6 de HPV-16 (Bartholomeu *et al* 1994); recientemente en nuestro laboratorio, se logró identificar a un péptido antigénico derivado de la proteína L1 de HPV-18, el cual se obtuvo de la elución natural de moléculas MHC-I obtenidas de una línea celular de cáncer cérvico-uterino (Monroy *et al*, 1999). Por otra parte, la estrategia de unión de péptidos sintéticos a alelos particulares del MHC-I (en especial HLA-A2) ha sido ampliamente utilizada para la identificación de péptidos antigénicos derivados principalmente de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 (Ressing *et al*, 1994; Kast *et al*, 1994). Sin embargo, existen pocos estudios en relación a la identificación de péptidos antigénicos derivados de la proteína L1 de HPV-16; se ha reportado que péptidos de 15 aminoácidos de longitud, derivados de la proteína L1 de HPV-16, fueron capaces de inducir respuestas proliferativas de linfocitos T citotóxicos y auxiliares de pacientes con displasia cervical y de donadoras normales (Shepherd *et al*, 1996). En el presente trabajo, se utilizaron 24 péptidos sintéticos (de 9 aminoácidos de longitud) derivados de la proteína L1 de HPV-16 y 18 específicos para los 4 alelos HLA clase I más frecuentemente expresados en la población mexicana (HLA-A2, -A24, -B35 y -B39), con la finalidad de identificar a los péptidos con mayor capacidad antigénica a través de ensayos de estimulación de linfocitos T de sangre periférica de pacientes con CaCu avanzado.

En nuestros resultados encontramos que de los 24 péptidos sintéticos de L1 de HPV-16 y 18 utilizados, 7 de ellos mostraron una fuerte actividad antigénica, al estimular al mayor número de pacientes con cáncer cervical analizados y con los índices de proliferación más altos, en la mayoría de los casos comparables con los inducidos por los péptidos control derivados del virus de Influenza. Cabe mencionar que en la literatura consideran ensayos positivos de

estimulación a IP's ≥ 10 (Ressing *et al*, 1996), en nuestro caso, empleamos un IP ≥ 50 (inducción \geq al 50% de la población inicial), con lo cual se pudo clasificar de manera más correcta la inducción proliferativa de los linfocitos T producida con los péptidos sintéticos como lo sugiere Nakagawa *et al*, 1996.

La estimulación de linfocitos T observada en las pacientes con CaCu no fue correlacionada con el estadio clínico de los tumores, ni con su tipo histológico, ni con el tipo de infección de HPV presente en las biopsias tumorales, de hecho se encontró que en algunas pacientes que presentaban infección con HPV-16, u otro tipo viral, ó negativas para HPV, respondían fuertemente a los péptidos de L1 derivados tanto de HPV-16 como de HPV-18. Por ejemplo, nosotros obtuvimos que 10 pacientes fueron positivas para DNA de HPV-16 en sus biopsias, 8 con HPV-18, 2 fueron positivos para HPV diferente a HPV-16/18 y 1 fue negativa para HPV (Tabla 5a-c). De las pacientes que presentaron positividad para HPV-16, las pacientes 10, 11, 14 y 24 (Gráfico 3, 11, y 12) mostraron una respuesta proliferativa con al menos uno de los péptidos de la proteína L1 de HPV-18. Asimismo las pacientes número 8 y 26 que presentaron DNA positivo para HPV-16 y 18, demostraron tener una alta respuesta proliferativa con al menos uno de los péptidos derivados de la proteína L1 de HPV-16 y 18 (Gráficos 8 y 15). Estos últimos casos se explican por el hecho de que estos pacientes presentaron el DNA de ambos tipos de HPV integrado al DNA en las células tumorales. No obstante, para explicar la respuesta cruzada de linfocitos T provenientes de pacientes con un determinado tipo de infección con HPV y que responden a péptidos derivados de otro tipo diferente de HPV, Alonso *et al* 2000, menciona que no necesariamente las lesiones cervicales son causadas por un solo tipo viral, sino que a menudo se pueden presentar como una infección viral mixta productiva provocando lesiones intraepiteliales de alto grado, la cual se identifican con frecuencia en el material histopatológico. Esta misma observación puede ser aplicada en el caso de la paciente número 22, la cual presentó infección de HPV diferente a HPV-16/18 en la biopsia, y su linfocitos respondieron a los péptidos derivados de la proteína L1 de HPV-16 y 18 (Gráficos 4 y 11). Además hay que

considerar que entre los diferentes tipos de HPV existen secuencias homólogas, y que péptidos derivados de ellas pueden inducir respuestas proliferativas en linfocitos T independientemente del tipo de lesión que produzcan (Muñoz y Boch. 1997) (Tabla 8). Este hecho también podría explicar las respuestas proliferativas de linfocitos T encontradas en algunas donadoras normales, puesto que la posible exposición a lesiones benignas como son las verrugas comunes pudiera inducir respuesta inmune celular.

De igual manera, en el caso de los linfocitos de la paciente con DNA negativo para HPV en su biopsia (paciente número 23), los cuales respondieron fuertemente al estímulo con los péptidos de la proteína L1 de HPV 16 y 18 (Gráficos 4, 8 y 12) con afinidad a los alelos HLA-A2, -A24 y -B35, nos podría sugerir que esta paciente presenta o presentó alguna infección producida por alguno de los tipos de HPV, no necesariamente asociados con el desarrollo de CaCu.

Por otra parte, de los péptidos antigénicos identificados en nuestro estudio, resalta el péptido P10(IHSMNSTIL) derivado de HPV-16 con afinidad al alelo HLA-B39. Éste péptido estimuló a 5 de 6 pacientes y a 1 de 2 donadoras normales; de las 5 pacientes, 3 presentaron infección con HPV-16 y 2 con HPV-16/HPV-18. Cabe destacar que este péptido presentó alta homología con secuencias de otros tipos virales: por ejemplo con el péptido P23(IHSMNSSIL) derivado de HPV-18 presentó una homología del 89% (compartiendo 8 de 9 aminoácidos); asimismo con otros tipos de HPV tales como HPV 5 INAMNSSLL (56%), HPV-38 INAMNSGIL (67%) y HPV-45 IHSMNSSIL (89%), todos ellos asociados con lesiones epiteliales benignas y malignas (Tabla 8). Por lo tanto, estas secuencias pueden considerarse como de alta antigenicidad y en consecuencia el péptido P10(IHSMNSTIL) pudiera ser un fuerte candidato para ser empleado en el desarrollo de vacunas profilácticas y terapéuticas de pacientes con lesiones producidas por esta gama de HPV's.

Tomando en consideración que en nuestro estudio los alelos HLA clase I utilizados (HLA-A2, A24, B35 y B39) se encuentran en casi la totalidad de las pacientes con CaCu, en donde por lo menos uno de estos alelos fue expresado en los haplotipos de las pacientes, nos permite sugerir que la identificación de epitopes de las proteínas L1 de HPV-16 y 18 para estos alelos, pudiera tener gran validez en la generación de vacunas con potencial profiláctico, utilizando de manera individual o combinada (cockteles) a los péptidos con fuerte actividad antigénica y con amplio espectro para lesiones producidas por diferentes tipos de HPV's.

10. CONCLUSIONES.

✕ De los 24 péptidos evaluados, los más antigénicos fueron: P3(YLRREQMFV) de L1 de HPV-16 y P15(ILFRNVNV) de L1 de HPV-18 para pacientes con el alelo HLA-A2; P4(DYKQTQLCL) y P5(FYNPDTQRL) de L1 de HPV-16 para pacientes con el alelo HLA-A24; P8(VPKVSGQLQY) de L1 de HPV-16 y P20(IPKVSAYQY) de L1 de HPV-18 para pacientes con el alelo HLA-B35; y el péptido P10(IHSMNSTIL) de L1 de HPV-16 para pacientes con el alelo HLA-B39.

✕ La estimulación de linfocitos T de pacientes con cáncer cérvico-uterino avanzado, con péptidos sintéticos derivados de las proteínas L1 de HPV-16 y 18, indica que en estos pacientes existe la presencia de linfocitos T de memoria hacia los péptidos que indujeron su estímulo.

✕ La estimulación de linfocitos T de las pacientes con CaCu con los péptidos antigénicos de L1 de HPV-16 y 18 no fue correlacionada con el tipo de infección de HPV presente en las biopsias tumorales ni con el estadio clínico del tumor.

✕ Tomando en consideración que en nuestro estudio los alelos HLA clase I utilizados (HLA-A2, A24, B35 y B39) se encuentran en casi la totalidad de las pacientes con CaCu, en donde por lo menos uno de estos alelos fue expresado en los haplotipos de las pacientes, nos permite valorar que la identificación de epitopes (péptidos antigénicos) de las proteínas L1 de HPV-16 y 18 para estos alelos es una etapa importante en la generación de vacunas profilácticas contra el cáncer cérvico-uterino.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

11. PERSPECTIVAS.

En el presente trabajo utilizamos 24 péptidos sintéticos de 9 aminoácidos de longitud derivados de la cápside viral de la proteína L1 de HPV-16 y 18 para evaluar su actividad antigénica en linfocitos T de pacientes con CaCu avanzado con positividad a HPV-16, HPV-18, a HPV-16/18 y a otro tipo de HPV deferente a HPV-16 y 18. La identificación de 7 péptidos con fuerte antigenicidad para linfocitos T de pacientes que expresaban al menos un alelo HLA de los analizados en este estudio (HLA-A2, A24, B35 y B39) se considera como un hallazgo muy importante, ya que estos péptidos cortos permitirán realizar investigaciones a futuro sobre su empleo de manera individual o combinada (cócteles) en la generación de vacunas con potencial profiláctico.

Otro aspecto interesante por investigar más ampliamente es el alto grado de homología que presentaron algunos péptidos de la proteína L1 de HPV-16 con secuencias de las proteínas L1 de HPV-18 y de otros tipos de HPV's. Esto ofrece un amplio espectro en el tratamiento o profilaxis de lesiones producidas por diferentes tipos de HPV. Por otro lado, analizamos el efecto de péptidos en pacientes que expresaban al menos uno de los alelos HLA-A y B más frecuentemente expresados en la población mexicana. Consideramos importante analizar la respuesta proliferativa de linfocitos T con péptidos sintéticos con afinidad para alelos de locus HLA-C, particularmente HLA-Cw4, el cual se expresa en aproximadamente 50% de la población mexicana, puesto que se abriría aún más la posibilidad de que por lo menos unos de estos alelos sea expresado en los haplotipos de pacientes que presenten CaCu y ampliar más el rango de pacientes que puedan ser tratados con estos péptidos sintéticos en estadios tempranos de la enfermedad.

En nuestro trabajo logramos identificar que el péptido P10(IHSMNSTIL) que pertenece a la cápside viral de la proteína L1 de HPV-16 y con afinidad al alelo HLA-B39, el cual demostró ser un péptido altamente antigénico. Mediante el uso

de este péptido de manera sintética, se demostró la alta respuesta proliferativa de los linfocitos T de sangre periférica en pacientes con CaCu avanzado con positividad a HPV-16 y HPV-16/18; además de esto, se logró observar una alta homología con otros tipos de HPV asociados con lesiones epiteliales benignas y malignas. Por ello, sería interesante realizar ensayos de citotoxicidad con este péptido en células tumorales, ya que estas secuencias pueden considerarse como de alta antigenicidad. En consecuencia, el péptido P10(IHSMNSTIL) pudiera ser un fuerte candidato para ser empleado en el desarrollo de vacunas profilácticas y terapéuticas de pacientes con lesiones producidas por esta gama de HPV's.

12. APÉNDICE.

CLASIFICACIÓN POR ESTADIOS DE LA FIGO	
Carcinoma Preinvasor Estadio 0	Carcinoma in situ y carcinoma intraepitelial.
Carcinoma invasor Estadio I	Carcinoma limitado al cérvix (la extensión al cuerpo puede ser ignorada). IB1: Lesiones clínicas de tamaño no mayor a 4 cm. IB2: Lesiones clínicas de tamaño mayor a 4 cm.
Estadio II	Carcinoma se extiende más allá de cérvix pero no se extiende a la pared pélvica; el carcinoma compromete la vagina, sin alcanzar el tercio inferior. IIA: No invade parametrios. IIB: invade claramente los parametrios sin llegar a la pared pélvica.
Estadio III	El carcinoma se extiende más allá de la pared pélvica: en el examen rectal no hay espacio libre de cáncer entre el tumor y la pared pélvica; el tumor compromete el tercio inferior de la vagina; todos los casos con hidronefrosis o riñón no funcionante deben ser incluidos, a menos que se conozca que se debe a otras causas. IIIB: Extensión a la pared pélvica, o hidronefrosis o riñón no funcionante.
Estadio IV	El carcinoma se extiende más allá de la pelvis verdadera, o compromete clínicamente la mucosa de la vejiga o del recto. IVA: Extensión del crecimiento a órganos adyacentes. IVB: Extensión a órganos distantes.

Nota: sólo se muestran los estadios clínicos presentados en la tabla 5a-c.
Tomado de Harris y Briton 1980.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

13. REFERENCIAS.

- * Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pober J. S. 1991. Cellular and Molecular Immunology. *W. B. Saunders Company*. U. S. A. pp 417.
- * Abbas, A. K., Lichtman, A.H., and Pober, J.S. 1994. Cellular and Molecular Immunology 2^{da}. Ed. *WB Saunders Company, Philadelphia*, U.S.A. pp. 252.
- * Abbas, AK, Lichtman AH, and Pober JS. 1999. Inmunología Celular y Molecular. 2^a Edición. Ed. *Mc Graw-Hill/Interamericana*. España. pp.4,9,128-130,310.
- * Abdel Motal UM, Zhou X, Joki A, Siddiqi AR, Srinivasa BR, Stenvall K, Dahmen J, Jondal M. 1993. Major histocompatibility complex class I-binding peptides are recycled to the cell surface after internalization. *Eur. J. Immunol.* 23:3224-29.
- * Alonso RP, Lazcano PEC, Hernández AM. 2000. Cáncer Cérvico-Uterino. Diagnóstico, Prevención y Control. Ed. *Médica Panamericana*. México. pp. 57-66.
- * Austyn M. J. And Kathryn J. Wood. 1993. Principles of Cellular and Molecular Immunology, Ed. *Oxford University Press*. 50-57.
- * Ayala-Hernández JR, De la Huerta-Sánchez R, Morales-Canfield F. 1991. Cáncer cérvico-uterino. Etapa clínica III. Tratamiento combinado de radioterapia y quimioterapia. *Ginecol Obstet. Mex.* 59:238-242.
- * Bartholomew JS, Glenville S, Sakar S, Burt DJ, Stanley MA, Ruiz CF, Chengang J, Garrido F, Stern PL. 1997. Integration of high-risk human papillomavirus DNA is linked to the downregulation of class I human leucocyte antigen by steroid hormones in cervical tumor cells. *Cancer Res.* 57:937-942.
- * Bass EJ, van Santen H-M, Kleijmeer MJ, Geuze HJ, Peters PJ, Ploegh HL. 1992. Peptide-induced stabilization and intracellular localization of empty class I complex. *J. Exp. Med.* 176:147-56.
- * Benham A, Tulp A, Neeffjes JJ. 1995. Synthesis and assembly of MHC-peptide complex. *Immunol. Today.* 16:17-25.
- * Berumen J, Unger ER, Casas L, Figueroa P. 1995. Amplification of human papillomavirus types 16 and 18 in invasive cervical cancer. *Hum. Pathol.* 26:676-81.
- * Bjorkman PJ, Saper MA, Wiley DC. 1987. Structure of human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329:506-12.
- * Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kerman R, Shah KV. 1995. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biology study on cervical cancer (IBSCC) study group. *J. Natl. Cancer Inst.* 87:796-802.

- * Boyd LF, Kozlowki S, Margulies DH. 1992. Solution binding of an antigenic peptide to a major histocompatibility complex class I molecule and the role of β_2 -microglobulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:2242-46.
- * Brady C, Duggan KMF, Davidson JA, Varley JM, Stern PL. 1999. Human papillomavirus type 16 E6 variants in cervical carcinoma: relationship to host genetic factors and clinical parameters. *J. Gen. Virol.* 80:3233-3240.
- * Breitburd F, Ramoz N, Salmon J, Orth G. 1996. HLA control in the progression of human papillomavirus infections. *Sem. Cancer Biol.* 7:359-371.
- * Brown MG, Driscoll J, Monaco JJ. 1991. Structural and serological similarity of MHC-linked LMP and proteasome complexes. *Nature.* 353:355-57.
- * Carreño BM, Schreiber KL, McKean DJ, Siroynowski I, Hansen TH. 1995. Aglycosylated and phosphatidylinositol-anchored MHC class I molecules are associated with calnexin. Evidence implicating the class I-connecting peptide segment in calnexin association. *J. Immunol.* 154:5173-80.
- * Castellanos MRMD, Robert LH, and Mitchell AM. 2001. Synthetic peptides induce a Cytotoxic response against human papillomavirus type-18. *Gynecol. Oncol.* 82:77-83.
- * Day PM, Esquivel F, Lukszo J, Benink JR, Yewdell JW. 1995. Effect of TAP on the generation and intracellular trafficking of peptide-receptive major histocompatibility complex class I molecules. *Immunity* 2:137-47.
- * De Leo C, Catelan N, López M, González N, Weckmann AL, Melin-Aldana H, Vargas AG, Bordes J, Alarcon SD, Granados J, Ramirez E, Lisker R. 1997. HLA class I and class II alleles and haplotypes in mexican mestizos established from serological typing of 50 families. *Hum. Biol.* 69:809-818.
- * Elliot T, Cerundolo V, Elvin J, Townsed A. 1991. Peptide-induced conformational change of the class I heavy chain. *Nature* 351:402-6.
- * Elliot T, Willis A, Cerundolo V, Townsed A. 1995. Processing of major histocompatibility class I-restricted antigens in the endoplasmic reticulum. *J. Exp. Med.* 181:1481-91.
- * Galloway, D. A., McDougall J. K. 1996. The disruption of the cell cycle checkpoints by papillomavirus oncoproteins contributes to anagenital neoplasia. *Sem. Cancer Biol.* 7:309-315.
- * Gariglio P, Luis B-B, Berumen J, Alcocer JM, Tamez R and Madrid V. 1998. Therapeutic uterine-cervix cancer vaccines in humans. *Arch. Med. Res.* 29:279-84.
- * Garrido F, Cabreara T, Concha A, Glew S, Ruiz-Cabello F, Stern LP. 1993. Natural history of HLA expression during tumor development. *Immunol. Today.* 14:491-99.
- * Gauseohl H, Kraft M, Boulin M, Frank RW. 1990. In "Proceedings of the 11 th American Peptide Symposium", ESCOM, Leiden. pp. 125-130.

- * Germain RN, Margulies TH. 1993. The biochemistry and cell biology of antigen precessing and precentation. *Ann. Rev. Immunol.* 11:403-50.
- * Golberg AL, Rock AL. 1992. Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature.* 357:375-379.
- * Gómez-Casado E, Vergas AG, Martínez LJ, Pérez BM, Granados J, Layrisse Z, Montoya F, Varela P, Amaiz VA. 1997. Generation of the HLA-B35, -B5, -B16 and -B15 group of alleles studied by intron 1 and 2 sequence analysis. *Immunogenetics.* 46:469-476.
- * Groettrup M, Suza A, Eggers M, Kuehn L, Dick TP, Schild H, Rammensee HG, Koszinowski UH, Kloetzel PM. 1996. A role for the proteasome regulkator PA28 alfa in antigen presentation. *Nature.* 381:166-168.
- * Haas I. 1991. BiP-a heat shock protin involved in immunoglobulin chain assembly. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 167:71-82.
- * Harris RWC and Brinton LA. 1980. Charasteristics of woman with dysplasia or carcinoma in situ of the uterine cervix. *J. Cancer.* 42:359-369.
- * Hecht JL, Kadish AS, Jiang GJ, Burk RD. 1995. Genetic characterization of the human papillomavirus (HPV) 18 E3 gene in clinical specimens suggests the presence of a subtype with decreased oncogenic potential. *Int. J. Cancer.* 60:369-376.
- * Heemels MT, Ploegh H. 1995. Generation, translocation amd presentation of MHC class I restricted peptides. *Ann. Rev. Biochem.* 64:463-91.
- * Hochstrasser M. 1995. Ubiquiting proteasomes, and the regulation of intecellular protein degradation. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 7:215-23.
- * Howard JC. 1995. Supply and transport of peptides presented by class I MHC molecules. *Curr. Opin. Immunol.* 7:69-76.
- * Howley P M. 1991. Role of the human Papillomeviruses in human cancer. *Cancer Res.* 51:5019-5022.
- * Huijbregtse JM and Beaudenon SL. 1996. Mechanism of HPV E6 proteins in cellular transformation. *Sem. Cancer Biol.* 7:317-326.
- * Janeway, Jr. CA, and Travers P. 1994. Immunology the Immune system in health and disease. Ed. *Curr. Biol. Limit.* New York, U.S.A. pp 4:1-4:46.
- * Janeway CA and Travers P. 1997. Immunobiology the immune system in health and disease. Ed. *Curr. Biol. Limit.* New York, USA. pp. 254.
- * Jones DL, Münger K. 1996. Interactions of the human papillomavirus E7 protein with cell cycle regulators. *Sem Cancer Biol.* 7:327-337.

- * Kast WM, Brandt RM, Sidney J, Drijfhout JW, Kubo RT, Grey HM, Melif CJ and Sette A. 1994. Role of HLA-A motifs in identification of potential CTL epitopes in human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins. *J. Immunol.* 152:3904-3912.
- * Keerti VS, and Howley PM. 1990. Papillomaviruses. Chapter 59 pp: 1651-1676. In *Virology 2^a Ed. Edited by Fields B. N., Knipe, D. M. Raven Press.*
- * Kleijmeer M, Kelly A, Geuze HJ, Slot JW, Townsend A, Trowsdale J. 1992. Location of MHC-encoded transporters in the endoplasmic reticulum and cis-Golgi. *Nature.* 357:342-44.
- * Koppelman B, Zimmerman DL, Walter P, Brodsky FM. 1992. Evidence for peptide transport across microsomal membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:3908-12.
- * Krausa P, Brywka M, Savage D, Hui KM, Bunce M, Ngai JLF, Teo DLT, Ong YW, Barouch D, Alksop CEM, Hill AVS, McMichael AJ, Bodmer JG, Browning MJ. 1995. Genetic polymorphisms with HLA-A*02, significant allelic variation revealed in different populations. *Tissue Antigens.* 45:223-231.
- * Kurman RJ, Schiffman MH, Lancaster WD. 1988. Analysis of individual human papillomavirus types in cervical neoplasia. A possible role for type 18 in rapid progression. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 159:293-96.
- * Lehner JP, Creswell P. 1996. Processing and delivery of peptides presented by MHC class I molecules. *Curr. Opin. Immunol.* 8:57-59.
- * Ljunggren H-G, Stam NJ, Öhlen C, Neefjes JJ, Höglund P, Heemels M-T, Bastin J, Schumacher TNM, Townsend A, Kärre K, Ploegh HL. 1990. Empty MHC class I molecules come out in the cold. *Nature* 346:476-80.
- * 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.* 268:533-39.
- * Matchy P, Trunh A, Gennaro D, Hoffstein S. 1987. Endocytosis and de novo expression of major histocompatibility complex encoded class I molecules: kinetic and ultrastructural studies. *Eur. J. Cell Biol.* 45:126-36.
- * Matsumara M, Fremont DH, Peterson PA, Wilson IA. 1992. Emerging principles for recognition of peptide antigens by MHC class I molecules. *Science.* 257:927-34.
- * Martínez CK and Laimins LA. 1991. A keratinocyte-specific transcription factor, KRF-1, interacts with AP1 to activate expression of human papillomavirus type 18 in squamous epithelial cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 88:91.
- * Margaret FDK, Brown DM, Stacey NS and Stern LP. 1998. Papillomavirus vaccines. *Front. Bios.* 3:1192-1208.

- * **Margolese L, Waneck GL, Suzuki CK, Degen E, Flavell RA, Williams DB.** 1993. Identification of the region on the class I histocompatibility molecule that interacts with the molecular chaperone, p88 (calnexin, IP90). *J. Biol. Chem.* 268:17959-66.
- * **Melief C, Offringa R, Toes R, Kast M.** 1996. Peptide-based cancer. *Curr. Opin. Immunol.* 8:651.
- * **Momburg F, Neeffjes Hammerling GJ.** 1994. Peptide selection by MHC-encoded TAP transporters. *Curr. Opin. Immunol.* 6:32-7.
- * **Monroy GA, Ortiz-Navarrete VF, Mora-García ML, Flores BF, Diaz QA, Isibasi AA, Trejo BC, Chacón SR, Hernández MJ, Granados AJ, De Leo C, Weiss SB.** 1999. Identification of peptides presented by HLA class I molecules on cervical cancer cells with HPV-18 infection. *Immunol. Letters.* 67:167-177.
- * **Moreno RJ.** 1996. Respuesta inmune y mecanismos de autoinmunidad. Ed. *Limusa.* México. pp 112-115.
- * **Muñoz N. and Bosch FX.** 1997. Cervical cancer and human papillomavirus: Epidermiological evidence and perspectives for prevention. *Salud púb. Méx.* 39:274-282.
- * **Nakagawa M, Daniel P, Sepideh F, Amrit J, Anna-Barbara M, Alison J, Joan F & Joel M.** 1996. T-cell proliferative response to human papillomavirus type 16 peptides:relationship to cervical intraepithelial neoplasia. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 3:205-210.
- * **Neisig A, Roelse J, Sijts AJAM, Osendorp F, Feltkamp MCW, Kast WM, Melief CJM, Neeffjes JJ.** 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.* 154:1273-79.
- * **Neeffjes JJ, Ploegh HL.** 1988. Allele and locus-specific differences in cell surface expression and the association of HLA class I heavy chain with β_2 -microglobulin: differential effects of inhibition of glycosylation on class I subunit association. *Eur. J. Immunol.* 18:801-10.
- * **Neeffjes JJ, Smit L, Gehrmann M, Ploegh HL.** 1992. The fate of the three subunits of major histocompatibility complex class I molecules. *Eur. J. Immunol.* 22:1609-14.
- * **Niederman G, Butz S, Ihlenfeldt HG, Grimm R, Lucchiani M, Hoschützky 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.* 2:289-99.
- * **Nossal G.** 1993. Sistema inmunitario entre la vida y la muerte. *Invest. cien.* Nov: 9-12.
- * **Ortiz NV and Hammerling GJ.** 1991. Surface appearance and instability of empty H-2 class I molecules under physiological conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:3594-97.

- * Ou WJ, Cameron PH, Thomas DY, Bergeron JJ. 1993. Association of folding intermediates of glycoproteins with calnexin during protein maturation. *Nature*. 365:771-76.
- * Panduro A. 2000. *Biología Molecular en la Clínica*. Ed. McGraw-Hill Interamericana. México. pp. 131-134.
- * Paul WE. 1993. *Fundamental Immunology*. 3a Edición. Ed. Raven Press. N.Y. USA. pp 1122-1128.
- * Perham P, Adams EJ, Arnett KL. 1995. The origins of HLA-A, B, C polymorphism. *Immunol. Rev.* 143:141-80.
- * Perenau B, Siegrist CA, Gillet A, Vincent C, Kimura S, Lemonnier FA. 1990. β_2 -microglobulin restriction of antigen presentation. *Nature* 346:751-54.
- * Rammensee H. G., Stefan S. T. F. 1995. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics*. 41: 178-228.
- * Ratcliffe DR, Nolin SL, Cramer EB. 1988. Neutrophil interaction with influenza-infected epithelial cell. *Blood*. 72:142-149.
- * Rensing ME, Willemien JVD, Esteban C, Alessandro S, Remco MPB, Marrigje H, Jacqueline DHA, Geziena MTS, W. Bram ter H, Gert JF, Baptist JT, Martin WK and Cornelis JMM. 1996. Occasional memory cytotoxic T-cell responses of patients with human papillomavirus type 16-ppositive cervical lesions against a human leukocyte antigen-A*0201-restricted E7-encoded epitope. *Cancer Res*. 56:582-588.
- * Robey E, Fowlkes BJ. 1994. Selective events in T cell developed. *Annu. Rev. Immunol.* 12:675-705.
- * Rock KL, Gramm C, Benacerraf B. 1991. Low temperature and peptides favor the formation of class I heterodimers on RMA-S cells at the cell surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4200-4.
- * Rock KL, Gamble S, Rothstein L, Gramm C, Benacerraf B. 1991. Dissociation of β_2 -microglobulin leads to the accumulation of a substantial pool of inactive class I MHC heavy chains on the cell surface. *Cell* 65:611-20.
- * Roelse J, Gromme M, Momburg F, Hammerling GJ, Neefjes. 1994. Trimming of TAP-translocated peptides in the endoplasmic reticulum and in the cytosol during recycling. *J. Exp. Med.* 180:1591-97.
- * Roitt IM. 1991. *Essential Immunology*. 7th. Blackwell Scientific Publications. U.S.A. pp 35-64.
- * Roitt IM, Brostoff J, Male D. 2000. *Inmunología*. 5^a edición. Ed. Harcourt. Madrid. pp. 177-118, 206.
- * Sapp M, Volpers C, Streeck RE. 1996. Synthesis, properties and applications of papillomavirus-like particles. *Intervirolgy*. 39:49.

- * Sedorf J, Scheindr H, Shah K. 1986. Detection of papillomavirus Antigen and DNA in Cell and tissues in "Viral Etiology of Cancer Cervical" 21 Branbury Report. *Col. Spring Harbor Lab.* pp 247-248.
- * Shepherd PS, Rowe JA, Cridland CJ, Coletrart T, Wilson P and Luxton CJ. 1996. Proliferative T cell responses to human papillomavirus type 16 L1 peptides in patients with cervical dysplasia. *J. Gen. Virol.* 77:593-602.
- * Silva B, Vargas AG, Zuñiga RJ, Rodríguez ST, Hernández MB, Torres LA, Granados J. 1999. Genetic features of Mexican Women presdisposing to cancer of the uterine cervix. *Human Pathol.* 30:626-628.
- * Snyder HL, Yewdell JW, Bennink JR. 1994. Trimming of antigenic peptides in early secretory compartment. *J. Exp. Med.* 180:2389-94.
- * Stephen M. 1998. Human Cellular Immenu Responses Against Human Papillomaviruses in Cervical Neoplasia. *Molec. Med.* 3:1-19.
- * Storey A, Osborn K, Crawford L. 1990. Co-transformation by human papillomavirus type 6 and 11. *J. Gen. Virol.* 71:165-171.
- * Stubenrauch F and Laimins LA. 1999. Human Papillomavirus Life Cycle: Active and Latent Phases. *Cancer Biol.* 9: 379-386.
- * Suzich JA, Ghim SJ, Palmer-Hill FJ, White WI, Tamura JK, Bell JA, Newsome JA, Jenson AB, Schlegel R. 1995. Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the developed of viral mucosal papillomas. *Proc Natl Acad Sci. USA* 92:11553.
- * Tanaka K, Tanahashi N, Tsuruni CH, Yokota K, Shibara N. 1997. Proteasome and antigen processing. *Adv. Immunol.* 64:1-38.
- * Ter Harnesel B, Smedts F, Kuijpers J, Van MR, Costerhuis W, and Quint W. 1999. Relationship between human papillomavirus type 16 in the cervix and intraepithelial neoplasia. *Obstet. Gynecol.* 33:46-50.
- * Ting Y, Manos M. M. 1990. Detection and typing of genital human papillomaviruses. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Acad. Press. Inc. pp:356-367.
- * Toes R, Blom R, Offringa R, Kast M, Melief C. 1996. Enhanced tumor outgrowth after peptide vaccination. Functional deletion of tumor-specific CTL induced by peptide vaccination can lead to the inability to reject tumor. *J. Immunol.* 156:3911-13.
- * Townsend A, Elliot T, Cerundolo V, Foster L, Barber B, Tse A. 1990. Asseby of MHC class I molecules analyzed in vitro. *Cell.* 62:285-95.
- * Ustrell V, Realini C, Pratt G and Rechsteiner M. 1995. Human lymphoblast and erythrocyte multicatalytic porteases: defferential peptidase activities and responses to the 11S regulator. *FEBS letters.* 376:155-158.

- * Unanue ER, Allem PM. 1987. The basis for the immunoregulation role of macrophages and other accessory cells. *Science*. 236:551-57.
- * Van Enderd PM, Riganelli D, Greco, Giulia, Fleschhauer K, Sidney J, Sette A, Bach JF. 1995. The peptide-binding motif for the human transporter associated with antigen processing. *J. Exp. Med.* 182:1883-95.
- * Van Furth R. 1993. Cell Biology of Molecular Phagocytes. In: Hematopoietic Growth Factor and Molecular Phagocytes. R. Van Furth . Ed. Basel:Karger. pp. 1-9.
- * Van Kaer L, Ashton-Rickardt PG, Ploegh HL, Tonegawa S. 1992 TAP1 mutant mice are deficient in antigen presentation, surface class I molecules, and CD-8⁺ T cell. *Cell* 71:1205-14.
- * Vargas-Alarcón G., Martínez L. J., Granados J., Díaz C. N., Gómez C. E., Alcocer V. J., Amaiz V. A. 1996. A new HLA-B35 (B*3516) allele found in a Mexican family of Nahua ascent. *Hum. Immunol.* 45:148-151.
- * Vinitzky A, Antón LC, Snyder HL, Orłowski M, Bennink JR, Yewdell JM. 1997. The generation of MHC class I associated peptides is only partially inhibited by proteasome inhibitors: involved of non proteasomal proteases in antigen processing?. *J. Immunol.* 159:554-64.
- * Ware FE, Vassilakalos A, Peterson PA, Jackson MR, Lehman MA, Williams DB. 1995. The molecular chaperone calnexin binds Glc₁Man₉GlcNAc₂ oligosaccharide as an initial step in recognizing unfolded glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 270:4697-704.
- * Weckman AN, Vargas AG, López M, González N, De Leo C, Castelan N, Bordes J, Alarcón SD, Granados J, Ramírez E, Lisker R. 1997. Frequencies of HLA-A and HLA-B alleles in a México city mestizo sample. *Am. J. of Hum. Biol.* 9:1-5.
- * Weissman YL, Max DC. 1993. Formación y desarrollo del sistema inmunitario. *Invest. cien.* Nov: 12-25.
- * Werness A, Bruce. 1995. Cancer cervico-uterino: en busca de una etiología infecciosa. *Contem. Oncol.* Jul/agos. 13-21.
- * Wheeler CM. 1997. Preventive vaccines for cervical cancer. *Salud Púb. Méx.* 39:283-287.
- * White WI, Wilson SD, Palmer-Hill FJ, Woods RM, Ghim SJ, Hewitt LA, Goldman DM, Burke SJ, Jensen AB, Koenig S, and Suzich JA. 1999. Characterization of a major neutralizing epitope on human papillomavirus type 16 L1. *J. of Virol.* 73:4882-4889.
- * Yang Y, Sempé P, Peterson PA. 1996. Molecular mechanisms of class-I major histocompatibility complex antigen processing and presentation. *Immunol. Res.* 15:208-33.
- * York Ian A. & Kenneth L. Rock. 1996. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu. Rev. Immunol.* 14:369-96.