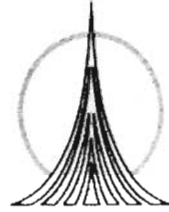




**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO.**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA.**

**EVALUACIÓN DE LAS CAPACIDADES ANTIGÉNICAS
DE PÉPTIDOS HOMÓLOGOS DERIVADOS DE LA
VARIANTE EUROPEA Y DE LA VARIANTE ASIÁTICO-
AMERICANA DE LA PROTEÍNA E6 DEL HPV16 EN EL
CONTEXTO DE HLA CLASE I.**

T E S I S
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A:
JUAN ROBERTO NUBEL RIVERA.

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. JORGE HERNÁNDEZ MONTES.
JURADO DE EXAMEN: Q.F.B. MA. DE LAS MERCEDES ZAMUDIO DURÁN.
Dr. ALBERTO MONROY GARCÍA.
Dra. Ma. TERESA CORONA ORTEGA.
M. en C. ÁNGEL GARCÍA SÁNCHEZ.

**Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer;
Laboratorio de Inmunobiología (L—326), Facultad de Estudios Superiores
Zaragoza., Universidad Nacional Autónoma de México.**

MÉXICO, D. F.

2005

m345538



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A nuestro Señor Dios Todopoderoso a Él sea la gloria y el honor por los siglos de los siglos, Amén.

A mis padres Flor y Roberto que me han ayudado y guiado, porque han sido una bendición en mi vida.

A mi hermano Rafael que ha sido un apoyo constante en mis estudios.

A mi amada Mary y Hazael, que son una parte importante en mi vida.

Al Dr. Alberto, Dra. Lourdes, M. en C. Jorge que me ayudaron en la realización de esta Tesis, gracias por haberme dado la oportunidad de ser parte de este grupo de investigación y por su sincera amistad.

A Ulises, Luis, Fernando, Mich, Juan Gabriel, Roger, Paty, Saúl, Nancy, Ángel, Noé, Paulina y a todos los miembros de la Unidad de Investigación, con quienes compartí grandes momentos. A todos mis maestros, que me enseñaron durante la carrera. A todos mis compañeros de generación y a todos los que conocí.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunobiología (L—326) de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer; Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México. Se contó con el apoyo financiero de los proyectos: CONACYT 34835-M y Dgapa-Papiit IN228404, para la realización de ésta investigación.

ABREVIATURAS.

ADN	Ácido desoxiribonucleico.
CaCu	Cáncer Cérvico-Uterino.
CPA	Célula presentadora de antígenos
CTL	Linfocito T Citotóxico.
Da	Daltones.
HGSIL	Lesión intraepitelial escamosa de alto grado.
HLA	Antígeno Leucocitario Humano.
HPV	Virus de Papiloma humano.
IFN γ	Interferón gamma.
IL-2	Interleucina 2.
LCR	Regiones Largas de Control.
LHSIL	Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado.
MHC	Complejo Mayor de histocompatibilidad.
NIC	Neoplasia Intraepitelial.
NK	Células asesinas naturales.
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
RE	Reticulo endoplásmico.
SFB	Suero fetal de bovino.
TAP	Transportadores Asociados al Procesamiento de Antígenos.
TCR	Receptor de Células T.
VAA	Variante Asiático-Americana.
VE	Variante Europea.
β 2m	Beta 2 microglobulina

ABREVIATURAS DE LOS AMINOÁCIDOS.

A	Alanina.
B	Aspargina.
C	Cisteína.
D	Aspartato.
E	Glutamato.
F	Fenilalanina.
G	Glicina.
H	Histidina.
I	Isoleucina.
K	Lisina.
L	Leucina.

M	Metionina.
N	Asparagina.
P	Prolina.
Q	Glutamina.
R	Arginina.
S	Serina.
T	Treonina.
V	Valina.
T	Triptofano.
Y	Tirosina.
Z	Glutamato.

ÍNDICE

	Página
Resumen	1
Introducción.	2
Marco teórico.	4
Cáncer cérvico-uterino.	4
Nomenclatura.	5
Virus de papiloma humano (HPV).	8
Variantes del virus de papiloma humano	16
Papel del sistema inmune en las infecciones genitales por el HPV.	23
Respuesta inmune humoral contra HPV.	23
Respuesta inmune celular contra HPV.	24
Moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad.	25
Procesamiento de antígenos.	26
Planteamiento del problema.	30
Objetivos.	31
Hipótesis.	31
Materiales y equipos.	32
Método.	33
Resultados.	37
Análisis de resultados.	51
Conclusiones.	56
Perspectiva.	56
Bibliografía.	57

RESUMEN.

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) se asocia con la infección de virus de papiloma humano (HPV) en el 99.7% de los casos. Dado que distintos tipos de HPV han demostrado tener capacidades oncogénicas diferentes, es razonable pensar que las variantes del HPV pueden tener diferentes capacidades oncogénicas. Esto sugiere que las variantes intratípicas de los HPVs pueden conferir un riesgo diferencial en la enfermedad cervical.

El presente trabajo se realizó con la finalidad de evaluar las capacidades antigénicas de péptidos homólogos derivados de la variante Europea (VE), y la variante Asiático-Americana (VAA), de la proteína E6 del HPV16, a partir de linfocitos de sangre periférica (LSP) de pacientes con CaCu utilizando técnicas de proliferación *in vitro* y citotoxicidad; fueron usados dos péptidos derivados de la VAA: KLPHLCTEL y KISEYRYYC, y sus contrapartes de la VE: KLPQLCTEL y KISEYRHYC.

Se utilizaron un total de 18 muestras de pacientes con diferentes estadios clínicos de CaCu y positivos para el alelo HLA-A0201, encontrando que linfocitos de sangre periférica desde estadios tempranos como NIC I, hasta estadios muy avanzados de la enfermedad, muestran mayores índices de proliferación con los péptidos derivados de la VAA que con los de la VE.

Además, el péptido KISEYRYYC, induce la mayor proliferación de LSP, que su contraparte Europea, la cual induce una proliferación de LSP comparable con la obtenida con el péptido derivado de la matriz de Influenza A: GILGFVFTL. El péptido KLPHLCTEL también indujo una mayor proliferación que su contraparte Europea.

La mayor capacidad de los péptidos analizados para generar una respuesta citotóxica *in vitro*, se encontró en el péptido KLPHLCTEL derivado de VAA. Esto apunta a que la VAA, es mucho más antigénica que la VE. Lo anterior sugiere que el cambio de un aminoácido en los determinantes antigénicos, otorga diferencias antigénicas entre las variantes intratípicas de las proteínas del HPV.

Estas diferencias antigénicas son importantes debido a que en México las variantes VAA y VE se encuentran en proporciones casi iguales, lo cual debe ser considerado en nuevos protocolos de inmunoterapia con el uso de epítomos adecuados del HPV.

INTODUCCIÓN.

El cáncer es una enfermedad que produce un crecimiento celular incontrolado. Dado que la naturaleza multifactorial está involucrada en la génesis del padecimiento, su alta morbilidad y mortalidad no han disminuido, en los últimos años.

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) se asocia con la infección de virus de papiloma humano (HPV). La edad promedio para el desarrollo del CaCu es aproximadamente 50 años; sin embargo, puede afectar a mujeres de hasta 20 años de edad o incluso menores. El CaCu es esencialmente una enfermedad de transmisión sexual. El riesgo está inversamente relacionado con la edad del primer contacto sexual, y directamente con el número de compañeros sexuales a lo largo de la vida.

Por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), identificaron que el CaCu, se asocia en el 99.7% de los casos de HPV. De la familia de los HPVs se han clasificado en alto y bajo grado de riesgo oncogénico. Los tipos 16 y 18 son tipos de alto riesgo, además son los tipos más comunes en México.

Se ha encontrado que diferentes HPV, han demostrado tener capacidades oncogénicas diferentes, es razonable pensar que las variantes intratípicas del HPV pueden tener diferentes capacidades oncogénicas. Esto sugiere que las variantes pueden conferir un riesgo diferencial en el desarrollo de la enfermedad cervical.

Por otro lado, en investigaciones realizadas en la década de los 80's, se descubrieron los mecanismos de la generación y presentación de antígenos restringidos al complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-I). Diferentes moléculas participan en este complejo proceso: el proteasoma, unidad multicatalítica citosólica generadora de péptidos antigénicos a partir de las proteínas sintetizadas intracelularmente; el heterodímero TAP dependiente de ATP, transportador asociado con el procesamiento de antígenos, translocando péptidos del citosol al retículo endoplasmático (RE). Diferentes moléculas chaperonas ubicadas dentro del RE como la calnexina, la calreticulina, proteínas de unión proteína – proteína como Bip, ER60 y la tapasina, estabilizan a las moléculas de MHC-I dentro del ensamblaje y cargado de péptidos dentro del RE.

La comprensión de los pasos necesarios para el reconocimiento de células tumorales por linfocitos T citotóxicos (CTLs), fue facilitado por el descubrimiento del papel fundamental del antígeno de leucocitos humanos (HLA) de clase I, en este proceso.

Las moléculas de clase I de HLA se unen a péptidos generados de proteínas endógenas por la maquinaria del procesamiento de antígenos que presentan estos péptidos en la superficie de las células a los linfocitos T.

De tal manera, en este estudio evaluamos las capacidades antigénicas de los péptidos homólogos derivados de la variante Europea (VE), KLPQLCTEL y KISEYRHYC y la variante Asiático-Americana (VAA), KLPHLCTEL y KISEYRYYC, de la proteína E6 del HPV16, a partir de linfocitos de sangre periférica (LSP) de pacientes con CaCu utilizando técnicas de proliferación *in vitro* y citotoxicidad.

Se utilizaron un total de 18 muestras de pacientes con diferentes estadios clínicos de CaCu y positivos para el alelo HLA-A0201, encontrando que linfocitos de sangre periférica desde estadios tempranos como NIC I, hasta estadios muy avanzados de la enfermedad, muestran mayores índices de proliferación con los péptidos derivados de la VAA que con los de la VE.

Además, el péptido KISEYRYYC, induce la mayor proliferación de LSP, que su contraparte Europea, la cual induce una proliferación de LSP comparable con la obtenida con el péptido derivado de la matriz de Influenza A: GILGFVFTL. El péptido KLPHLCTEL también indujo una mayor proliferación que su contraparte Europea.

La mayor capacidad de los péptidos analizados para generar una respuesta citotóxica *in vitro*, se encontró en el péptido KLPHLCTEL derivado de VAA. Esto apunta a que la VAA, es mucho más antigénica que la VE. Lo anterior sugiere que el cambio de un aminoácido en los determinantes antigénicos, otorga diferencias antigénicas entre las variantes intratípicas de las proteínas del HPV.

Estas diferencias antigénicas son importantes, dado que en México se encuentran en proporciones casi iguales, lo cual debe ser considerado en nuevos protocolos de inmunoterapia con el uso de epítomos adecuados del HPV.

EVALUACIÓN DE LAS CAPACIDADES ANTIGÉNICAS DE PÉPTIDOS HOMÓLOGOS DERIVADOS DE LA VARIANTE EUROPEA Y DE LA VARIANTE ASIÁTICO-AMERICANA DE LA PROTEÍNA E6 DEL HPV16 EN EL CONTEXTO DE HLA CLASE I.

MARCO TEÓRICO.

Cáncer Cérvico-Uterino.

El cáncer es un fenómeno de autodestrucción en personas, animales o plantas. El término cáncer deriva del vocablo latino *cancer* y su diminutivo *cancriculus*, que significa *cangrejo*, animal perteneciente a la familia de los crustáceos. La analogía del término está basada en la capacidad de fijación de los crustáceos hacia lo que los rodea. En todas las formas de cáncer hay una predisposición genética que es el resultado de una inadecuada actividad de ciertos genes. Esos genes pueden alterarse por mutación o por agresión de diferentes virus. En los cambios genéticos que causan cáncer participan dos categorías de genes: los protooncogenes / oncogenes y los genes supresores de tumor¹.

Los cambios de protooncogenes a oncogenes ocasionan que una célula normal se transforme en maligna por una sobre-expresión de los productos génicos, cambios en las bases de los nucleótidos, translocaciones cromosómicas y aumento en el número de genes. El papel normal de los genes supresores de tumor es prevenir el cáncer. La inactivación o la supresión de estos genes favorece el desarrollo del cáncer. El proceso de transformación de una célula normal a una célula cancerosa, es una secuencia de alteraciones celulares que perturban un tejido estableciendo una lesión premaligna que acaba por establecer una hiperplasia que se transforma en neoplasia y culmina con invasión y metástasis¹.

El cáncer cérvico-uterino (CaCu), es la tercera neoplasia maligna ginecológica más frecuente a nivel mundial. FIGURA 1. La edad promedio para el desarrollo de cáncer cervical es aproximadamente 50 años; sin embargo, puede afectar a mujeres de hasta 20 años de edad o incluso menores. Cerca del 1% del total de cánceres cervicales aparece en mujeres embarazadas, o que lo han estado recientemente^{1,2}.

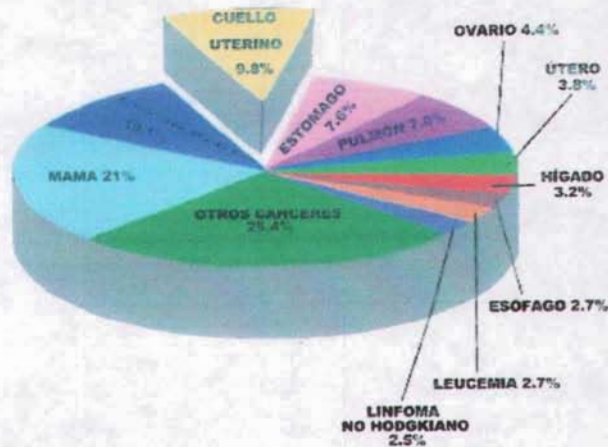


FIGURA 1. Frecuencia mundial de cáncer en la mujer. (Tomado de Apgar. Brotzman. Colposcopia Principios y prácticas. Barcelona: Masson, S.A. (2003) pp 3

Nomenclatura.

Las alteraciones del epitelio metaplásico anormal han sido motivo de numerosas clasificaciones y terminologías. Una primera nomenclatura es la que se incluyen a las displasias leve, moderada o severa que se refieren a lesiones precancerosas y que culminan con el carcinoma *in situ*, llamada clasificación Reagan. Una segunda nomenclatura para referirse a los mismos cambios se expresa como neoplasia intraepitelial (NIC) (en lengua inglesa=CIN *Cervical intraepithelial neoplasia*): NIC I: displasia leve; NIC II: displasia moderada y NIC III: displasia severa-carcinoma *in situ*, llamada clasificación Richart. Una tercera nomenclatura es la que se conoce como sistema Bethesda: 1) lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado LGSIL (*Low grade squamous intraepithelial lesion*) en donde se combinan las alteraciones celulares por el virus del papiloma humano (coilocitosis) y la displasia leve (NIC I); y 2) lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado HGSIL (*High grade squamous intraepithelial lesion*), donde se engloban las displasias moderadas (NIC II) y las displasias severas y el carcinoma *in situ* (NIC III)^{1, 2}.

La Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia ubica al carcinoma microinvasor como un estadio IA dividido en dos categorías: IA1 y IA2. FIGURA 2, TABLA 1².

El CaCu es esencialmente una enfermedad de transmisión sexual. El riesgo está inversamente relacionado con la edad del primer contacto sexual, y directamente con el número de compañeros sexuales a lo largo de la vida. El riesgo también aumenta si los varones compañeros sexuales han tenido contacto con mujeres con CaCu³.

TABLA I
CLASIFICACIÓN DE LAS ETAPAS CLÍNICAS DEL CÁNCER
DEL CÉRVIX. FIGO 1994

ETAPA	CARACTERÍSTICAS
I	Carcinoma estrictamente confinado al cervix
IA	Carcinoma visible solamente al microscopio. Cuello aparentemente sano. Los cuellos con lesión visible serán IB
IA1	Microinvasión hacia el estroma no mayor de 3 mm en profundidad ni mayor a 7 mm en extensión lateral
IA2	Microinvasión hacia el estroma entre 3 y 5 mm y lateral hasta 7 mm
IB	Tumor visible confinado al cervix o preclínico mayor a IA
IB1	Tumor limitado al cervix hasta de 4 centímetros
IB2	Tumor limitado al cervix mayor de 4 centímetros
II	El carcinoma se extiende más allá del cervix pero no llega a las paredes de la pelvis ni al tercio inferior de la vagina
IIA	No hay invasión parametrial
IIB	Si hay invasión parametrial
III	El tumor se ha extendido a las paredes de la pelvis. Por tacto rectal no hay espacio entre el tumor y la pared pélvica. El tumor se ha extendido hasta el tercio inferior de la vagina. Todos los casos con hidronefrosis o con riñón funcionalmente excluido
IIIA	No hay invasión hasta la pared de la pelvis pero si llega al tercio inferior de la vagina
IIIB	Hay extensión hasta la pared pélvica. O hay hidronefrosis o riñón excluido debido al tumor
IV	El tumor se extiende más allá de la pelvis o ha invadido hasta la mucosa de la vejiga, o del recto o de ambos
IVA	El tumor se extiende a los órganos pélvicos vecinos
IVB	El tumor se ha extendido a órganos distantes de la pelvis

Tomado de González – Merlo. Ginecología oncológica. 2º. Barcelona: Masson, S. A. (2000). p 19.

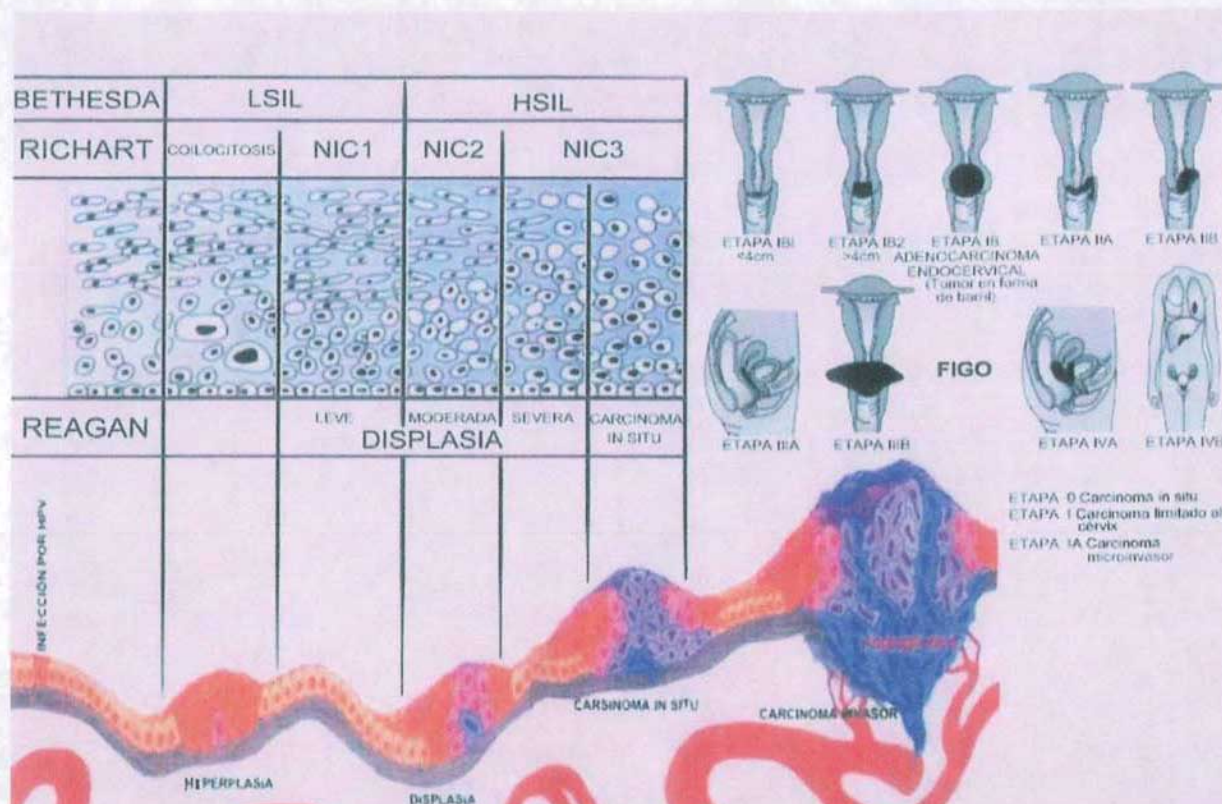


FIGURA 2. Alteraciones del epitelio metaplásico anómalo, han sido motivo de numerosas clasificaciones y terminologías. Se observan las diferentes clasificaciones con respecto a la citología clínica y su representación esquemática de los diferentes estadios clínicos. Células normales de color naranja claro, células infectadas por algún HPV de color naranja oscuro, células que han integrado el genoma del HPV de color rosa mexicano, células que han sufrido una transformación maligna de color morado, células que han sufrido una inmutación de color azul. (TOMADO de Weinber R. How cancer arises. Science (1996); 275: 32-40, PAC. Programa de actualización continua para ginecología y obstetricia. Cáncer genital femenino (2002) www.drscope.com MODIFICADO POR NUBEL 2004)

Virus de papiloma humano (HPV).

Se conoce que la principal causa de CaCu es el virus del papiloma humano, que pertenece a la Familia *Papovaviridae*. El nombre de esta familia se integró a partir de 3 virus con capacidades oncogénica: el virus del papiloma humano y animal (Pa), el virus del polioma de ratón (Po) y algunos virus vacuolizantes (Va), como el SV40 de monos. La familia Papovaviridae contiene 2 géneros: *Papillomavirus* y *Miopapovavirus*³.

Los virus del género *Papillomavirus* son pequeños, miden alrededor de 55 nanómetros de diámetro, ADN bicatenario, cápside de 72 capsómeros, simetría icosaédrica y no tienen envoltura. FIGURA 3. Los virus del género *Miopapovavirus* son más pequeños que los anteriores, ya que su diámetro es alrededor de 40 nanómetros; pero el resto de características son las mismas, del otro género, este género comprende los virus del polyoma tipos virus *BK*, virus *JC*, y los virus vacuolizantes como el virus *SV40*³.

El virus *JC* produce encefalitis destructiva (leucoencefalopatía multifocal progresiva: PMLE) en pacientes inmunocomprometidos. El virus *BK* es causante de infecciones muy frecuentes desde la niñez, se aísla a partir de orina; sin embargo no se ha demostrado que ocasione enfermedades graves en el hombre^{3, 4}.

Los virus de HPV son comúnmente transmitidos sexualmente. Más de 80 diferentes genotipos de HPVs han sido descritos; los tipos involucrados en la etiología de cáncer cervical son predominantemente los HPV tipos 16 y 18 y menos frecuentemente los tipos 31, 33, 35 y 45. Estos tipos de HPV son considerados virus de alto riesgo para el desarrollo de cáncer cervical, y el ADN viral de estos tipos puede ser detectado en >99.8% de todos los carcinomas cervicales. En el mundo, 50% de los tumores están relacionados al HPV tipo 16 y en una porción del 14% por el HPV 18. Sin embargo, el tipo 18 predomina en mujeres de Asia, también como en ciertos adenocarcinomas y carcinomas adenoescamosos.^{5, 6}

MODELO TRIDIMENSIONAL DEL HPV



FIGURA 3 Modelo tridimensional del HPV y fotografía de barrido electrónico del HPV. (Tomado de Henderson L. E. Three – dimensional model of HPV. The PRN notebook, vol 6 No. 6 September (2001). Physicians Research Network Inc. www.prn.org).

Recordemos que el CaCu es el segundo cáncer ginecológico más frecuente en la mujer a nivel mundial y es el principal cáncer en países en vías de desarrollo. En México es el cáncer más común en la mujer⁷⁻⁹.

La infección con tipos específicos de papilomavirus genital humano es el principal factor de riesgo para desarrollar cáncer y sus lesiones precursoras, y aunque es el principal factor no es suficiente para el desarrollo de CaCu. También se sabe que los HPV que producen cáncer cervical son sexualmente transmitidos¹³⁻¹⁹.

Más de 80 tipos diferentes de HPV han sido genéticamente secuenciados, y alrededor de 40 – 50 tipos diferentes infectan el tracto genital²⁰⁻²⁶.

Los tipos de HPV que producen cáncer cervical han sido clasificados: en bajo riesgo, (los cuales se han encontrado principalmente en verrugas genitales), y los de alto riesgo, (encontrados frecuentemente asociados con cáncer cervical invasivo y con cánceres anogenitales)^{26,27}.

En un estudio realizado a nivel mundial encontraron que de los 40 tipos que afectan el tracto genital: 15 tipos de HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82), son referidos como de alto riesgo oncogénico, para indicar la probabilidad de la progresión maligna después de la infección. De riesgo intermedio encontraron 3 HPV (26, 53, 66), y de bajo riesgo 12 HPV (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, CP6108) y de riesgo indeterminado fueron 3 HPV (34, 57, 83)²⁷.

Mediante la tipificación del papilomavirus infectante, por técnicas como hibridación, se sabe que los tipos de HPV 16, 18, 45, 31, 33, 52, 58, 35 se encuentran en el 95% de las muestras con carcinoma de células escamosas²⁷; además, en el 93% de casos de cáncer invasivo a nivel mundial el ADN de HPV encontrado es predominantemente de los tipos 16 y 18^{28,29}. También en el Estudio Biológico Internacional de Cáncer Cervical (The International Biological Study of Cervical Cancer [IBSCC]) reportó que el ADN del HPV es detectado en más del 93% de cánceres invasivos a nivel mundial.

Se han encontrado dos formas del CaCu: el adenocarcinoma y el carcinoma de células escamosas, y mientras que la infección con HPV es requerida para ambas formas de la enfermedad, la distribución es diferente. En un estudio realizado por Muñoz²⁷ en el 2003, se encontró que el 94.4% de las pacientes estudiadas tenían carcinoma de células escamosas, y el 5.6% presentaba adenocarcinoma.

El HPV16 es el tipo más frecuente involucrado en el desarrollo de carcinoma de células escamosas (50% de los casos)³⁰, mientras que el HPV16 y el 18 juegan un papel primordial en el desarrollo de adenocarcinomas. El adenocarcinoma es biológicamente más agresivo y tiene un peor diagnóstico de sobrevida que el de células escamosas^{31,32}.

Por otro lado, se sabe que el HPV codifica sólo entre 6 y 10 genes y que los demás factores necesarios para la producción de los papilomavirus, incluyendo aquellos involucrados en la transcripción viral, transducción y replicación del ADN son provistos por la célula huésped.

El genoma de todos los papilomavirus conocidos está organizado en una forma similar, e incluye marcos de lectura abierta (open reading frames [ORF]), una región

regulatoria 5' no codificante (upstream regulatory region [URR]), también llamada la region larga de control (long control region [LCR]). Esta región contiene sitios de unión para los factores de transcripción también como un origen de replicación del ADN³³.

Típicamente los genomas de los papilomavirus codifican a 8 productos en sobreempalme (ORF's) los cuales son transcritos unidireccionalmente y agrupados dentro de las funciones tempranas (E) y tardías (L)³³.

Los genes tempranos están expresados todo el tiempo dentro del ciclo viral, mientras que los genes tardíos solo son expresados durante la fase productiva en queratinocitos diferenciados³³.

En estadios tempranos de la infección por HPV se encontró que estas asociaciones proteína – proteína alteran el ambiente celular, lo que permite la retención del genoma viral y crean un estado de inestabilidad genómica, la cual ayuda a la transformación celular. Mientras que la integración del genoma viral al hospedero, no parece ser esencial para la progresión maligna puede contribuir a la desregulación de la expresión de oncoproteínas virales requeridas para la tumorigénesis³⁵.

Todos los HPVs codifican genes que pueden ser clasificados dentro de 3 grupos³³:

- 1) Proteínas regulatorias: E1 y E2 las cuales controlan la replicación y expresión viral³³.
- 2) Proteínas que controlan el crecimiento celular: E6, E7, E5 por la interacción con p105Rb, p53 y otras proteínas celulares³³.
- 3) Proteínas estructurales: L1 y L2 que son los componentes de la cápside del virión³³.

La inmortalización celular debida a los HPV está restringida a los tipos de alto riesgo, y es inducida por la asociación de las proteínas E6 y E7 con proteínas celulares, que regulan el crecimiento celular³³. La interacción de E7 con la proteína supresora de tumores Retinoblastoma (p105Rb) y la E6 con el supresor de tumores p53, juegan un papel principal en estos procesos³⁴.

La proteína E6 de los HPV de alto riesgo se une a la proteína p53 y promueve su degradación por la ruta de ubiquitina. Recientes estudios han identificado una interacción entre la E6 de HPV16 y presuntas proteínas de unión a calcio que pueden ser importantes para la actividad transformante sobre p53³⁶.

La proteína E7 de los HPV de alto y bajo riesgo tienen entre 97-110 aminoácidos de longitud. El carboxi terminal contiene motivos repetidos de C-X-X-C, requeridos para la unión al dominio de zinc. Mientras que el amino terminal tiene 2 regiones conservadas de CR 1 y 2. Estos dominios CR1 y CR2 son requeridos para la transformación de fibroblastos, inmortalización de queratinocitos, también como el bloqueo de TGFβ³⁵.

Las proteínas E2, E4 y E5 de los papilomas, son importantes en varias funciones virales, incluyendo la transcripción y replicación, interacciones con el citoesqueleto, e

inmortalización; La función de E4 es destruir la matriz del citoesqueleto; la función de E5 se localiza en los compartimientos de la membrana celular donde posiblemente interacciona con la señalización de los factores de crecimiento^{26, 31 37-41}.

Las funciones básicas de estas proteínas, además de las funciones de las oncoproteínas E6 y E7 del virus del papiloma humano de alto riesgo, se resumen en la TABLA 2 y 3. La organización del ADN del HPV y su integración dentro del ADN de la célula huésped, se explican en la FIGURA 4. Las funciones de las oncoproteínas E6 y E7 y su interacción con cada paso para permitir la inmortalización celular, se muestran en la FIGURA 5. Los controles sistémicos y de la célula huésped que interfieren con la progresión de la proliferación maligna inducida por el HPV, se marcan en la FIGURA 6. Los factores asociados y no asociados al HPV que contribuyen a la progresión maligna y los controles sistémicos y de la célula huésped que interfieren con la progresión inducida por el HPV a través de la proliferación maligna, se exponen en la FIGURA 7.

TABLA 2
FUNCIONES DE LAS PROTEÍNAS VIRALES

PROTEÍNA	FUNCIÓN
E1	Codifica a una helicasa para la replicación episomal del virus.
E2	Regula la expresión temprana de los genes y facilita la replicación del virus.
E4	Altera el citoesqueleto para facilitar la liberación del virus.
E5	Altera el pH endosomal y el reciclamiento de los receptores de EGF a la superficie celular.
E6	Inactiva la función de p53 e inhibe la apoptosis.
E7	Se une al p105Rb y reactiva la síntesis del ADN del huésped
L1	Constituye el 80% de la cápside viral
L2	Constituye el 20% de la cápside viral

TABLA 3
IDENTIFICACIÓN DE LAS FUNCIONES DE LAS ONCOPROTEÍNAS E6 Y E7 DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO DE ALTO RIESGO.

<i>ONCOPROTEÍNA VIRAL E6.</i>
Inmortalización celular.
La asociación de la proteínas E6 resulta en la degradación específica de las proteínas de la célula huésped (p53).
Efecto antiapoptótico.
Desestabilización cromosomal.
Integración e intensificación del ADN foráneo y mutagenicidad.
Activación de telomerasas.
¿Bloqueo de las funciones del interferón?

(Continua)

TABLA 6 (Continuación).

ONCOPROTEÍNA VIRAL E7.

Inmortalización celular.
Activación de las ciclinas E y A
Inactivación del retinoblastoma
Inducción de apoptosis
Inhibición de los inhibidores ciclinas dependientes de cinasas
Integración e intensificación del ADN foráneo y mutagenicidad.
¿Degradación de la tirosina cinasa BLK?
Tomado de zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. J Natl Can Inst (2000); 92: 690-94.

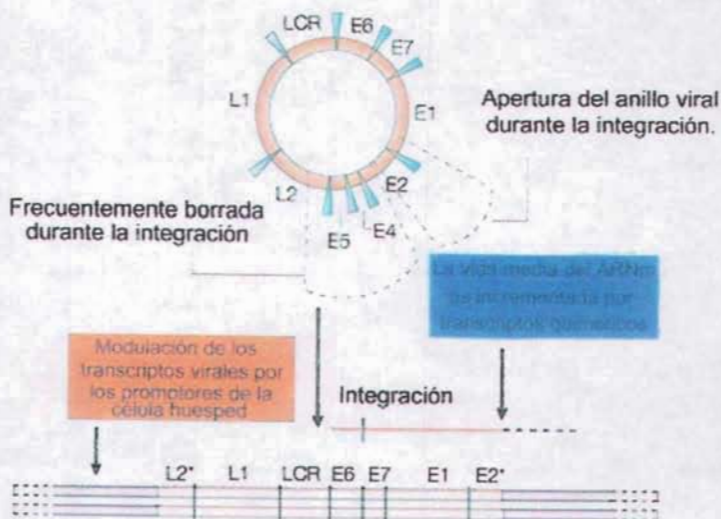


FIGURA 4.

La organización del ADN del HPV y su integración dentro del ADN de la célula huésped. El genoma del virus de papiloma humano contiene entre 6800 y 8000 pares de bases y está dividida dentro de 8 marcos de lectura abierta. E6, E7, E1, E2, E4, E5 y L1 y L2. Codificando como proteínas tempranas "E" y tardías "L". En el curso del desarrollo de cáncer el ADN viral frecuentemente llega a ser integrado dentro del ADN de la célula huésped. Generalmente el anillo viral es abierto dentro de la región de E2 interrumpiendo la continuidad del gen. La parte de E2 y los ORF's adyacentes a E2 (E4, E5 y parte de L2) son regularmente borradas después de la integración (genes parcialmente representados por un asterisco) (Tomado de zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. Nature Reviews Cancer (2002); 2: 342-50).

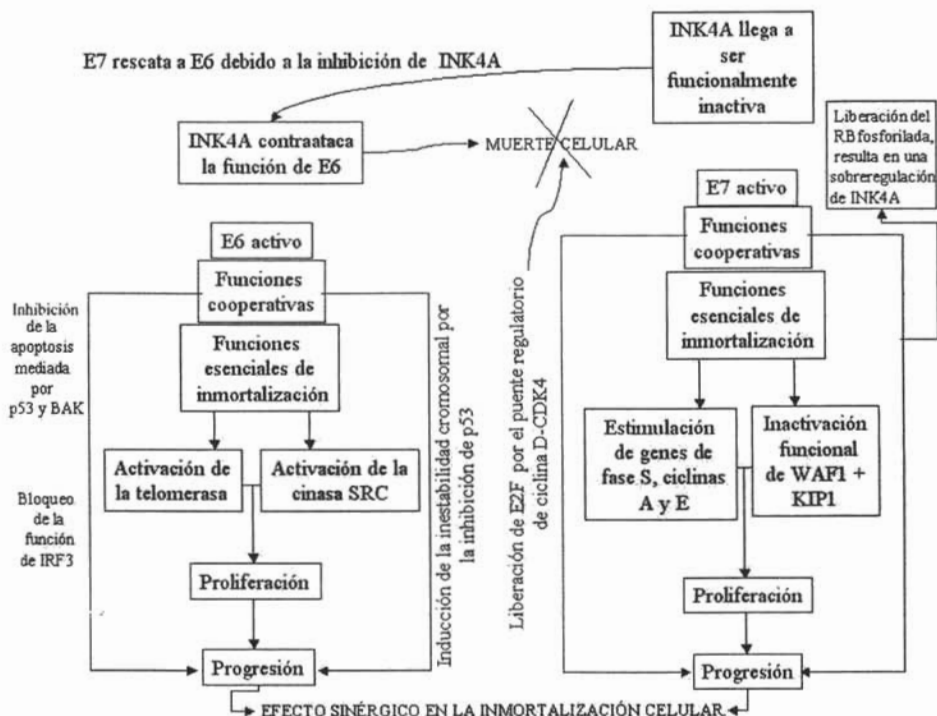


FIGURA 5

Funciones de las oncoproteínas E6 y E7 y su interacción con cada paso para permitir la immortalización celular. La función de E6 para activar la telomerasa, y la cinasa SRC e inhibición de la p53 y BAK. E7 inhibe Rb lo cual libera la E2F y resulta en la sobreexpresión de INK4A pero E7 también inactiva a INK4A. En adición E7 parece estimular las ciclinas "A y E" e inactiva a los inhibidores de la ciclina dependiente de cinasa WAF1 y KIP1. E6 y E7 sinérgica en la immortalización celular y la transformación maligna: E6 inhibe la apoptosis que está inducida por los altos niveles de E2F y E7 protege a la proteína E6 de la inhibición de INK4A. (Tomado de zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. Nature Reviews Cancer (2002); 2: 342-50).

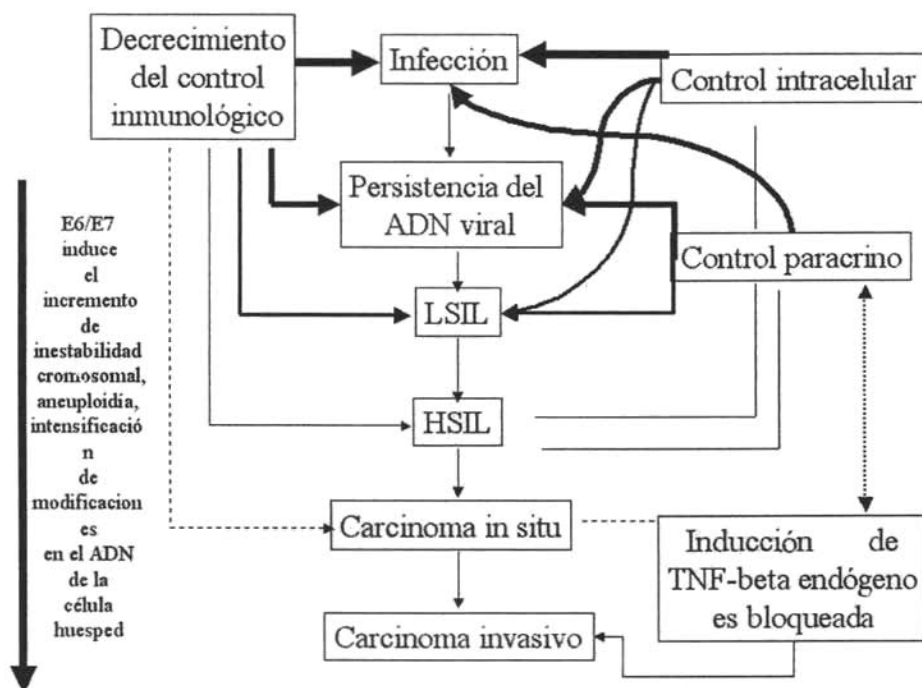


FIGURA 6

Controles sistémicos y de la célula huésped que interfieren con la progresión de la proliferación maligna inducida por el HPV. La progresión inducida por el HPV de células infectadas a lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LSIL), a lesión intraepitelial escamosa de alto grado (HSIL), a carcinoma in situ y cáncer invasivo, está determinada por la caída de los mecanismos de control. Esto incluye un control intracelular que está presumiblemente ejercido por los inhibidores de ciclina dependiente de cinasa, una cascada de señales paracrinas y una disminución del control inmunológico. El control paracrino es disparado por macrófagos y citocinas tales como el factor de necrosis tumoral (TNF) y está basado en la pérdida de la síntesis de interferón gamma (IFN γ). (Tomado de zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Reviews Cancer* (2002); 2: 342-50).

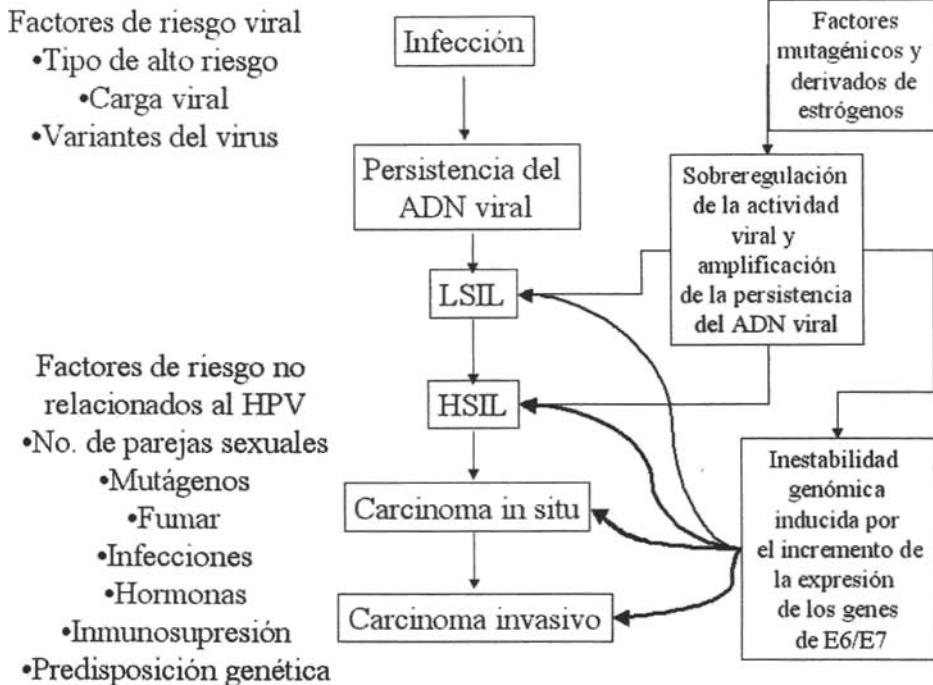


FIGURA 7

Factores asociados y no asociados al HPV que contribuyen a la progresión maligna. Los factores asociados y no asociados al HPV están descritos del lado izquierdo. Factores hormonales (estrógenos y sus derivados) activan al promotor del HPV y facilitan la inmortalización de células infectadas por el HPV. Agentes mutagénicos amplifican la persistencia del ADN viral. Los agentes mutagénicos intensifican la progresión modificando la cascada de señales celulares que controlan la persistencia del HPV, ó dirige al incremento de la expresión de los oncogenes virales. Un aumento del nivel de la expresión de los oncogenes de E6 y E7 resulta en un incremento de la inestabilidad genómica, lo que facilita la progresión de células infectadas a través de un crecimiento invasivo. (Tomado de zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. Nature Reviews Cancer (2002); 2: 342-50).

Variantes del virus de papiloma humano.

Los papilomavirus han coevolucionado con los humanos por los últimos 200,000 años y por ello se asocian con nuestra especie múltiples tipos de HPV e incluso de variantes de estos tipos. De hecho el genoma del HPV16 puede ser dividido dentro de varios linajes filogenéticos, determinados por la sustitución del nucleótido. Las variantes se encuentran en regiones geográficas específicas y en asociaciones étnicas³¹.

Dado que diferentes tipos de HPV han mostrado que tienen capacidades oncogénicas diferentes, es razonable pensar que las variantes también pueden tener diferencias oncogénicas⁴³.

Las variantes intratípicas han sido mucho más estudiadas para HPV16^{36, 44-51}. Además se ha evaluado la asociación de variantes específicas de HPV16 con la persistencia viral y con el desarrollo de HSIL^{42, 52, 53}.

Las variantes de papilomavirus mucoso-genital, en particular las variantes de HPV16, muestran una fuerte evidencia de agrupamientos geográficos, la cual ha sido tomada como una evidencia de una evolución o coevolución de las variantes con los humanos^{31, 36, 42, 46}.

Las variantes No – Europeas del HPV16 están involucradas con un alto riesgo del desarrollo de cáncer cervical^{7, 54}.

Estudios realizados por Villa⁵⁵ en el 2000, sugiere que la alta incidencia de cáncer invasivo presente en África y comunidades en América Latina puede estar asociado con la presencia de variantes del HPV16 diferentes a la del prototipo (Europea)⁷.

Esto sugiere que las variantes intratípicas pueden conferir un riesgo diferencial en la enfermedad cervical. Algunas variantes de HPV han sido asociadas con HSIL, cáncer invasivo y las más agresivas con cáncer cervical^{19, 30, 42, 52, 54-59}.

La presencia de variantes No - Europeas en adenocarcinomas es del 75% y en carcinomas de células escamosas es del 47%. Puede ser debido a que en estudios que han evaluado las variantes de HPV16 (el riesgo de carcinoma de células escamosas y sus lesiones precursoras, [lesiones de alto y bajo grado]), han observado un incremento en el riesgo de padecer la enfermedad, asociada con variantes No - Europeas de HPV16^{42, 43, 54-57}.

La distribución de las variantes de HPV16 fueron encontradas en agrupaciones geográficas. Dentro de los 5 continentes, se muestran en la TABLA 4, FIGURAS 8-10.

Las variantes Africanas (Af1 y Af2) comprenden cerca del 92% de los especímenes de África y de 0 a 9% en las otras regiones, mientras que la variante Europea fue encontrada en la mayoría de los especímenes en todas las regiones diferentes a África, teniendo el 60% en el sur de Asia al 93% en Norte América⁶⁰.

La variación geográfica también fue observada dentro de la variante Europea. Una subclase de la variante Europea, la E-350G fue comúnmente encontrada en Europa y a través de América, pero en el Suroeste de Asia y África fue encontrada la subclase E-350T⁶⁰.

TABLA 4
DISTRIBUCIÓN DE LAS VARIANTES DE HPV16 A NIVEL MUNDIAL

Tipo de variante	No. (%) de los especímenes.					Total No.
	Europa	Norte América	Centro y Sur América	Suroeste de Asia	África	
E-350T	20 (40.0)	16 (53.3)	56 (24.6)	19 (54.3)	5 (7.8)	116
E-350G	22 (44.0)	12 (40.0)	119 (52.2)	2 (5.7)	1 (1.6)	156
As	1 (2.0)	1 (3.3)	0 (0.0)	9 (25.7)	0 (0.0)	11
AA	7 (14.0)	0 (0.0)	45 (19.7)	2 (5.7)	0 (0.0)	54
Af1	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (2.2)	0 (0.0)	39 (60.9)	44
Af2	0 (0.0)	1 (3.3)	3 (1.3)	3 (8.6)	19 (29.7)	26
Total	50	30	228	35	64	407

Variantes de HPV16 en cáncer cervical.

Distribución de clases por Continente

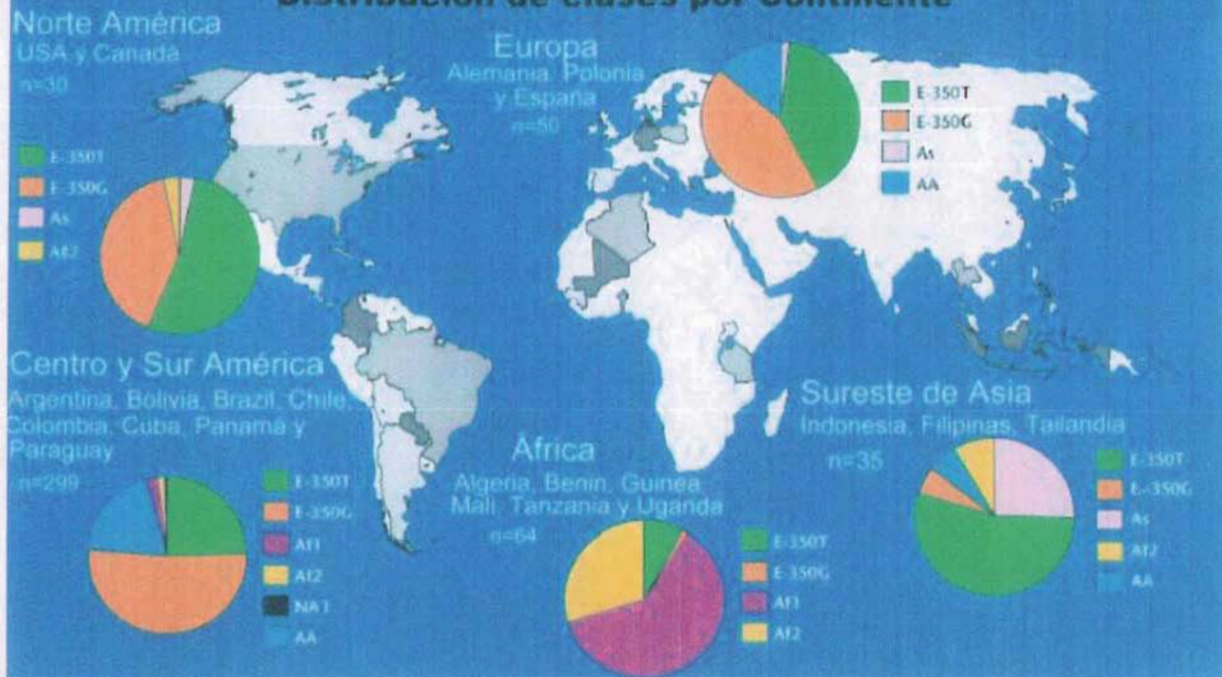


FIGURA 8. Distribución de las variantes de HPV16 en cáncer cervical a nivel mundial. Variante Europea (E), variante Asiática (As), variante Africana (Af), variante Asiático - Americana (AA), variante Norte Americana (NA1). Los lugares del estudio están en gris en el mapa (Tomado de Yamada T, Manos M, Peto M. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. J Virol (1997); 71: 2463-72).

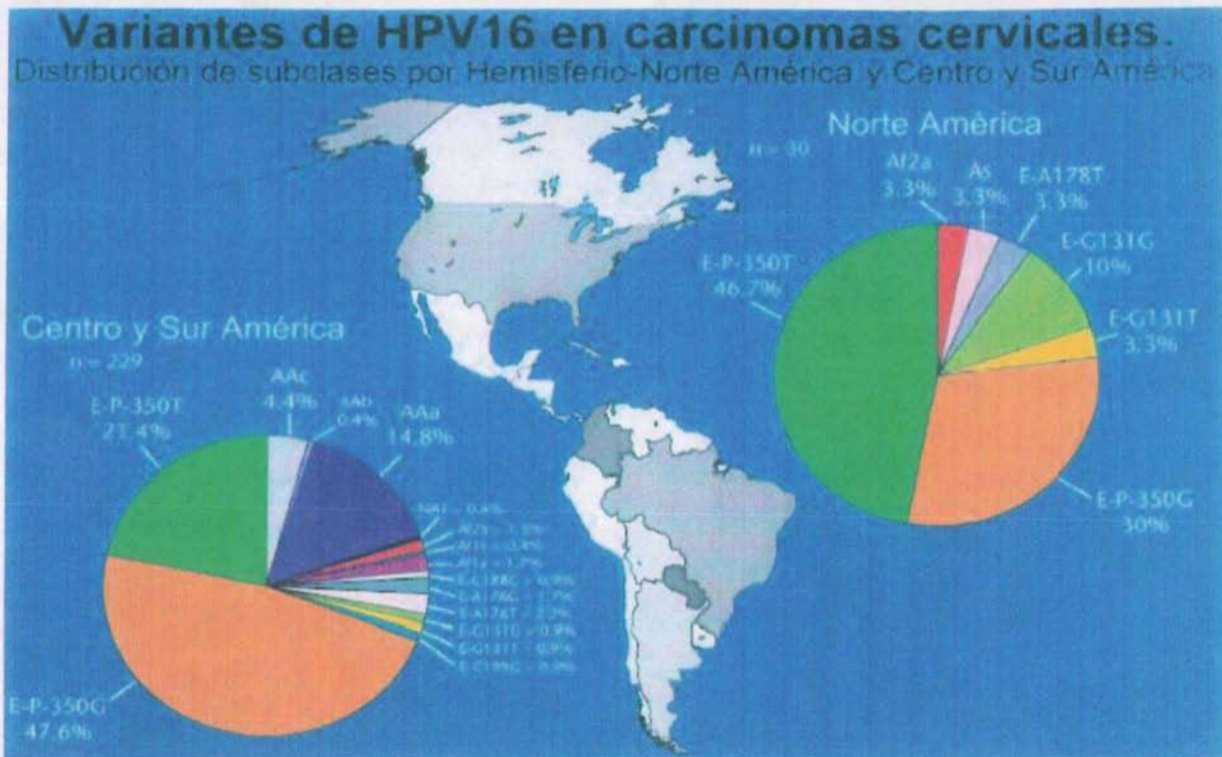


FIGURA 9. Distribución de las variantes de HPV16 en cáncer cervical por hemisferio. Variante Europea (E), variante Asiática (As), variante Africana (Af), variante Asiático - Americana (AA), variante Norte Americana (NA1). Los lugares del estudio están en gris en el mapa (Tomado de Yamada T, Manos M, Peto M. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. J Virol (1997); 71: 2463-72).

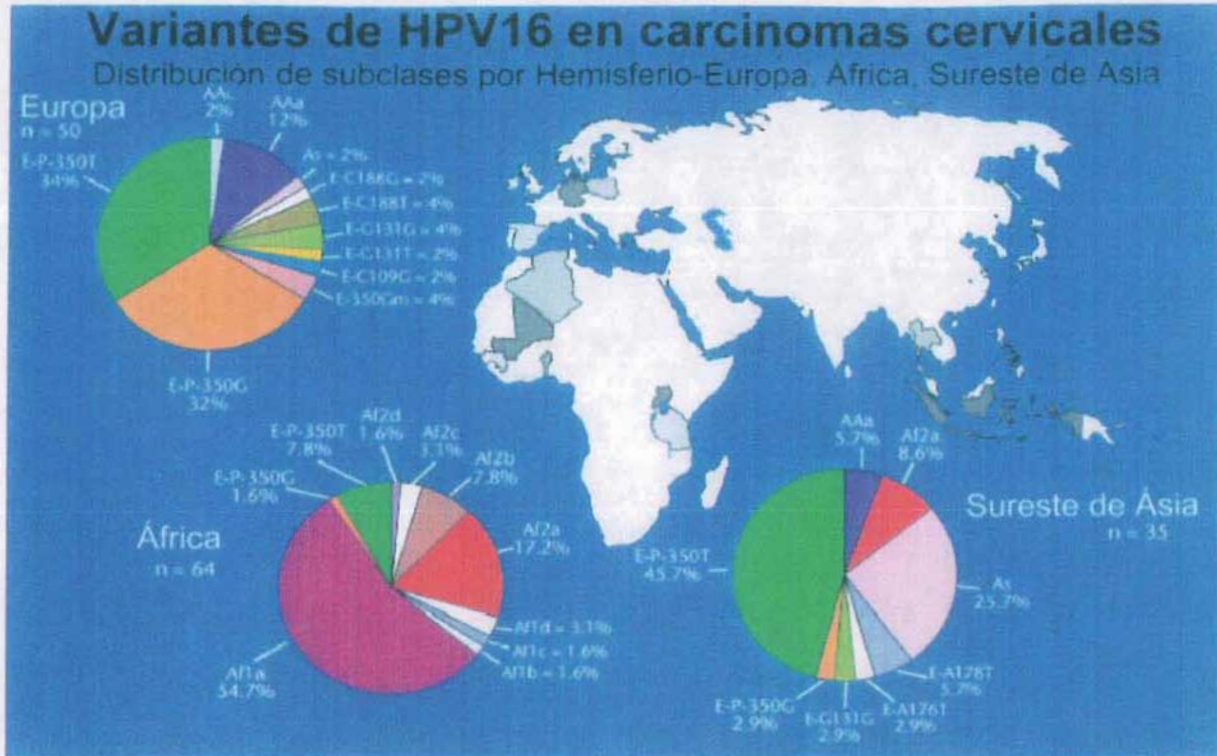


FIGURA 10. Distribución de las variantes de HPV16 en cáncer cervical por hemisferio. Variante Europea (E), variante Asiática (As), variante Africana (Af), variante Asiático - Americana (AA), variante Norte Americana (NA1). Los lugares del estudio están en gris en el mapa (Tomado de Yamada T, Manos M, Peto M. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol* (1997); 71: 2463-72).

Las variantes Af1 y Af2 se encuentran en su mayoría en África,

La variante Asiática es encontrada en el sureste de Asia,

La variante Asiático-Americana es encontrada específicamente en Centro y Sur América y en Europa, solo en España. Esta distribución puede ser debida a la conquista de América, sin embargo el origen de la variante AA no es claro⁶⁰.

Aunque la distribución geográfica de los diferentes tipos de variantes puede estar influenciada por varios factores incluyendo: coevolución, migración y mezcla de razas^{29, 42, 43, 60}, las asociaciones geográficas no son absolutas³¹.

Recientemente se reportó que la prevalencia de la VAA es mucho más alta en México con aproximadamente 45.7% de todos los cánceres invasivos^{7, 42}.

En un estudio realizado en México por Lizano⁵⁷ en 1997, el 75% de adenocarcinomas son positivos para HPV16 y HPV18, y fueron infectados con una variante No - Europeas (NE) del HPV encontrado⁴³.

Una alta incidencia de todos los CaCu en México son atribuidos a la VAA del HPV16, pues la evidencia sugiere que es más oncogénica que la VE, incluyendo su asociación con mujeres jóvenes y la alta asociación con CaCu de riesgo oncogénico. La frecuencia de la VAA del HPV16 puede también contribuir a la alta incidencia de CaCu en mujeres Mexicanas.

Estudios preliminares, han sugerido que las variantes de HPV16 pueden mostrar asociación con lesiones y neoplasia cervical de diversos grados de progresión^{19, 43, 54, 55, 59}. Esto puede ser parcialmente explicado porque algunas infecciones de HPV16 progresan de HSIL a cáncer mientras que otras no⁴³.

Se ha encontrado que existe diferencia epidemiológica de las variantes de HPV16, dado que el riesgo de cáncer cervical es de 11 veces más con las variantes No-Europeas (NE) que con las VE⁴³.

La edad promedio de las pacientes Mexicanas con la VAA fue de 46.2 años mientras que en las pacientes con la VE fue de 53.9, esto es, 7.7 años de diferencia. La VAA y la VE fueron detectadas en frecuencia similar en carcinoma de células escamosas, pero solo la VAA fue detectada en adenocarcinomas (50%)⁴².

El porcentaje de pacientes Mexicanas con cáncer cervical mostró que el 45.7% son positivas para la variante Asiático-Americana^{42, 60}.

La alta oncogenicidad observada con la variante Asiático-Americana, puede ser debida al incremento de la actividad neoplásica de los oncogenes E6/E7 que tienen una replicación viral más eficiente ó una mejor estimulación de los genes de expresión temprana^{42, 60}.

Las mujeres con la variante Asiático-Americana del HPV16 tienen 4.5 veces más riesgo de desarrollar una lesión neoplásica intraepitelial de alto grado que las mujeres con la variante Europea de HPV16⁴².

Las mujeres con la variante Asiático-Americana del HPV16 tienen 4.5 veces más riesgo de desarrollar una lesión neoplásica intraepitelial de alto grado que las mujeres con la variante Europea de HPV16⁴².

La evidencia sugiere que la VAA confiere nueve veces más riesgo que la VE para padecer cáncer cervical. La VAA está asociada con mujeres 8 años más jóvenes y con tumores más agresivos comparados con las mujeres que tienen la VE. El número de copias virales de ADN de la VAA es mucho más alta que la VE en CaCu, sugiriendo una mejor replicación de la VAA⁶¹.

Se ha encontrado variaciones genética entre las variantes de HPV16 en los genes de E6, E7, L1, E5, E2 y en las regiones largas de control (LCR)⁴². La variación de secuencias ó mutaciones después de la infección puede modificar las funciones de las proteínas como se observa para la mutación de L1 que afecta el ensamble viral y algunas variantes de la proteína E6 que mejoran en su habilidad para inmortalizar células y degradar la p53^{42, 62}.

La transcripción de los oncogenes de E6/E7 de HPV derivados de la VE son controladas por la proteína E2 y están frecuentemente sobre-regulada por la destrucción del gen E2 durante la integración viral. En contraste del gen E2 es retenido totalmente en muchos carcinomas positivos a la VAA⁶¹.

Se sabe que la proteína E2 de los HPV está involucrada en la regulación de los genes de expresión temprana, con la proteína E1 en la replicación del genoma viral. La disrupción del gen de E2 durante la integración del genoma viral ha sido propuesto como un mecanismo de la progresión para el avance de una lesión preinvasiva a cáncer cervical invasor, y ha sido repetidamente mostrado que la integración destruye el gen E2, de tal manera la liberación del control de E2 incrementa la expresión de E6 y E7^{63, 64, 65}.

Las diferencias en la regulación viral de la transcripción de los oncogenes de E6/E7 por la proteína E2 puede estar también involucrada en la alta oncogenicidad de la VAA⁶¹.

El gen E2 de la VAA contiene múltiples cambios en los nucleótidos, ocasionando que las células infectadas tengan una alta carga viral además de retener los genes E1/E2⁶⁵. También las variaciones del gen E2 pueden afectar la actividad transformante debido a la afinidad por los factores de la transcripción celulares²⁹.

Las variaciones de la secuencia de las proteínas de HPV puede afectar el potencial carcinogénico, tal como para el HPV16 E5, que puede alterar la actividad transformante, afectando la interacción con la subunidad de la H⁺-ATPasa la EGFR de 16 KDa, u otras proteínas celulares^{29, 66-68}.

Papel del sistema inmune en las infecciones genitales por el HPV.

Existen evidencias que indican que el sistema inmune está directamente involucrado en la respuesta a la infección primaria y en la progresión maligna de las lesiones por el HPV. Por ejemplo, se ha encontrado que en pacientes con inmunosupresión, el desarrollo de verrugas o neoplasias asociadas al HPV ocurren con alta frecuencia. De hecho este problema se detecta frecuentemente en pacientes que reciben transplantes de órganos, con terapia inmunosupresora, en pacientes con SIDA e incluso mujeres embarazadas⁶⁹.

No obstante, cuando la inmunosupresión disminuye o es eliminada, las verrugas a menudo desaparecen; en contraste, en la mayoría de estos pacientes que tienen lesiones neoplásicas, presentan alteraciones a nivel local probablemente inducidas por el HPV, a pesar de que su sistema inmune es normal. En las etapas previas al cáncer invasor, como son las neoplasias preinvasoras (NIC's) o el condiloma acuminado, el sistema inmunológico aún es capaz de combatir y promover la regresión o mantener el tumor localizado. Se ha encontrado que en los sitios de las lesiones producidas por HPV, existe un importante infiltrado celular compuesto por células mononucleares, incluyendo linfocitos T citotóxicos, células asesinas naturales y macrófagos que invaden la epidermis y destruyen las células neoplásicas^{70, 71}.

Respuesta inmune humoral contra HPV.

Las infecciones de tipo viral son primariamente intracelulares, por lo que los antígenos virales escapan al alcance de los anticuerpos. La respuesta humoral es importante sólo para infecciones virales productivas, en las que las partículas virales salen al espacio extracelular por exocitosis o durante la lisis celular por efecto del propio virus o las células citotóxicas del paciente. En las infecciones no productivas, como ocurre en los casos de NIC avanzados y el cáncer invasor, solamente se producen proteínas tempranas del virus y no proteínas tardías, por lo que las partículas virales no se presentan en el espacio extracelular, en consecuencia se esperaría una baja respuesta humoral contra los antígenos virales⁴².

A pesar de ello, varios investigadores se han enfocado en demostrar la presencia de anticuerpos dirigidos a las proteínas virales del HPV, tanto de la cápside como de transcripción temprana. Con relación a las proteínas de la cápside, se sabe que la principal proteína que la constituye es la L1, la cual comprende a más del 80% de las proteínas del virión. Existen estudios en los cuales se demuestra que la infección con HPV, puede ser prevenida en conejos y bovinos al ser inmunizados con la proteína L1 y la proteína L2 desnaturalizada. No obstante, aún no se sabe de que manera estas inmunizaciones, mediante exposición a mucosas, neutralizan al virus que solamente infecta a células epiteliales⁷²⁻⁷⁴.

En humanos, se ha demostrado la presencia de anticuerpos específicos o de reacción cruzada contra partículas parecidas a virus (virus like particles, VLP). Se ha encontrado que el 50-60% de las mujeres infectadas con HPV, tienen anticuerpos contra VLP de HPV16. A diferencia de otros tipos de HPV, HPV16 tiene varios subtipos y serológicamente presentan reacción cruzada³⁶.

La respuesta inmune mediada por células, ha sido demostrada en primera instancia en lesiones de piel con infección de HPV 5 y 8⁷⁵, y en respuesta linfo-proliferativa *in vitro*^{76, 77}. Como resultado de estos estudios, se ha podido describir que en la respuesta inmune celular contra lesiones producidas por los HPV's, participan varias células efectoras, entre las cuales destacan, las células asesinas naturales, macrófagos, células presentadoras de antígeno, linfocitos T citotóxicos, linfocitos T cooperadores o auxiliares y citocinas producidas por esas células.

Es probable que los macrófagos y las células NK representen uno de los primeros mecanismos celulares para eliminar y controlar células tumorales infectadas por el HPV. Las células NK, pueden de manera espontánea, matar *in vitro* a células infectadas por el virus y células tumorales sin previa sensibilización por un proceso llamado muerte natural⁷⁸. Las células NK están presentes en muchas lesiones producidas por HPV y NIC's, no obstante, se ha encontrado que células HPV positivas, provenientes de cáncer cervical y células humanas de epitelios cervical inmortalizadas, poseen propiedades similares a la de displasia cervical, ya que son resistentes a células NK⁷⁹. De igual manera, en pacientes con displasias cervicales y lesiones precancerosas, también se ha encontrado una disminuida actividad de células NK.

Los macrófagos también son importantes mediadores de la respuesta inmune celular antitumoral; se ha encontrado que células NIH-3T3 transfectadas con el oncogen E7 de HPV-16 son susceptibles de ser lisadas por macrófagos de ratón activados⁸⁰.

Por otro lado, las células de Langerhans, que son células especializadas de tejido epitelial y muestran una morfología dendrítica. Bajo condiciones normales, ellas son las células presentadoras de antígeno con mayor eficiencia. En lesiones verrucosas producidas por HPV, en áreas de condilomas y NIC's, se ha encontrado que las células de Langerhans se encuentran disminuidas de manera acentuada en relación con la epidermis normal⁸¹.

La generación de una respuesta inmune efectiva, depende en gran medida de la secreción de citocinas, las cuales reclutan y activan a las células efectoras en el sitio de la infección. Las células cervicales normales, secretan de manera constitutiva muchas linfocinas en cultivos celulares⁸².

Una de esas linfocinas es la interleucina-1, la cual induce una amplia variedad de reacciones inflamatorias e inmunológicas, tal como la producción de IL-2 por linfocitos T cooperadores. Los mismos queratinocitos, son auto estimulados con IL-1 a proliferar, como resultado de ello, estos sintetizan y secretan otras linfocinas incluyendo a la IL-6, IL-8 y GM-CSF y TNF- α ⁸³.

Cada una de estas citocinas ejercen efectos en reacciones inflamatorias o inmunológicas por mecanismos específicos, por ejemplo, el TNF- α y la IL-1 ejercen, además, una acción antiviral por medio en la represión de la expresión de genes virales. A diferencia de los queratinocitos normales, las células cervicales inmortalizadas y líneas de carcinoma, presentan una disminuida secreción de linfocinas⁸⁴.

Por otra parte, los linfocitos T cooperadores participan de manera muy importante en la respuesta inmune celular, ya que las diferentes subpoblaciones que los constituyen

(Th1 y Th2), producen citocinas con actividad específicas para activar o suprimir la respuesta inmune. Por ejemplo los Th1 secretan IL-2 e IFN- γ , que participan como los principales mediadores de la inmunidad celular contra microorganismos intracelulares y dirigen la defensa del huésped mediada por fagocitos. Las células Th2 secretan IL-4, IL-5 e IL-10, citocinas que suprimen la inmunidad mediada por células; por lo que Th2 es responsable de la respuesta independiente de la fagocitosis. De esta manera la respuesta inmune celular antitumoral es inducida por citocinas de linfocitos Th1 e inhibida por los Th2. De hecho en neoplasias intraepiteliales se ha encontrado una gran proporción de linfocitos T CD3+ asociado con la expresión de TNF- α , IL-6, e IL-10 en el 60% de estas lesiones⁸⁵.

Los linfocitos T citotóxicos, que reconocen péptidos antigénicos presentados por moléculas MHC-I en la membrana de células infectadas con virus del HPV, son activados en presencia de IL-2 secretada por los linfocitos Th1, de tal manera que son capaces de producir la lisis de las células blanco mediante tres caminos diferentes⁸⁶.

- a) secretan perforinas y otras proteínas como las granzimas, que perforan la membrana celular;
- b) liberan sustancias que inducen la muerte celular programada (apoptosis) de las células blanco;
- c) liberan citocinas como IFN γ , el TNF y la Leucoregulina (LR) que limitan la actividad viral dentro de las células, atrayendo a macrófagos y otros fagocitos que pueden destruir a la célula.

El IFN γ y la LR inhiben la expresión de los genes virales y estimulan la expresión de moléculas MHC-I⁸⁶.

Moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad.

La presentación de antígenos está dada por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), que son glicoproteínas que se expresan en la membrana celular y son el producto de un conjunto de genes altamente polimórficos, los cuales se localizan en el brazo corto del cromosoma 6 en el humano,⁸⁷ esta región ha sido denominada HLA (Human Leukocyte Antigens), por haber sido inicialmente encontradas en los leucocitos humanos⁸⁸.

La estructura que presentan estas proteínas ha sido dilucidada a partir del análisis cristalográfico por rayos X y se han clasificado en dos grandes grupos: 1) HLA de clase I (HLA-I). Coinciden de una cadena polipeptídica pesada de un peso molecular de 45,000 daltones (Da); unida no covalentemente a una pequeña proteína con un peso molecular de 12,000 Da; conocida como $\beta 2$ - microglobulina ($\beta 2m$)^{89,90}.

2) HLA de clase II (HLA-II). Son glicoproteínas transmembranales (similares al HLA-I), están conformadas por dos cadenas polipeptídicas: una cadena denominada alfa (α) con peso molecular de 34,000 Da y una cadena beta (β) con peso de 28,000 Da.

Las moléculas de HLA-I y HLA-II, son expresadas de manera diferencial entre los diferentes tejidos: esencialmente, todas las células nucleadas expresan moléculas de HLA-I, las cuales se expresan abundantemente en células linfoides; en menor cantidad en hígado, pulmón, riñón, y en muy poca cantidad en el cerebro y músculo esquelético⁹⁰.

Las moléculas de HLA-II se encuentran más restringidas, encontrándose asociadas especialmente a los linfocitos B, células presentadoras de antígenos (CPA's) como: células de Lanhergans, dendríticas foliculares, macrófagos y células epiteliales del timo. FIGURA 11 Y 12

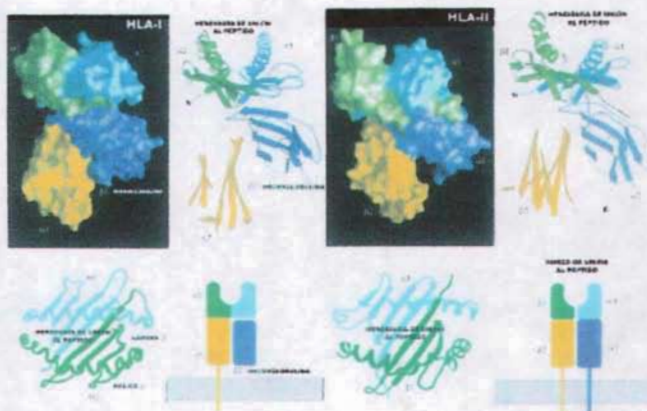


FIGURA 11 Y 12. Moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I y II. Vista cristalográfica de las moléculas HLA-I y HLA-II y representación esquemática. (Tomado de Janeway C. A. jr. Inmunobiología. 4° ed. Barcelona. Masson, S. A.; (2000) p 112-113

Procesamiento de antígenos.

Se han descrito 4 diferentes etapas que forman parte del mecanismo del procesamiento de antígenos, por medio de la molécula de HLA-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 ensamble de moléculas de HLA-I, y glicosilación del complejo HLA-I / péptido y su transporte a la membrana celular.

A).- Generación de péptidos en el citoplasma.

La principal fuente de péptidos que se unen a moléculas de HLA-I, derivan de proteínas sintetizadas por los ribosomas celulares⁹¹.

No obstante, las proteínas introducidas en el citosol, ya sea 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 moléculas de HLA-I. La mayor parte de la actividad proteolítica que ocurre en el citosol, es atribuida a las proteasomas, quienes se encargan de digerir a las proteínas citosólicas para producir péptidos de 8 – 10 residuos de longitud⁹¹.

El proteasoma es un complejo multicatalítico con un peso molecular entre 650 a 700 kDa, tiene una estructura cilíndrica que 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 dos anillos de los extremos, son las subunidades α ^{91,92}.

Las subunidades catalíticas más conocidas del proteasoma corresponden a dos polipéptidos de bajo peso molecular, conocidos como LMP-2 y LMP-7. Ambas pertenecen a la familia de las subunidades β . Se ha observado que los LMP's pueden alterar la actividad proteolítica del proteasoma y favorecer la generación de péptidos que se asocian a moléculas MHC. La degradación de muchas proteínas celulares es iniciada por su modificación con un polipéptido pequeño 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). De esta manera, la ubiquitina marca a las proteínas para su posterior degradación por el complejo proteasoma⁹³.

Las subunidades reguladoras del proteasoma están constituidas por varias proteínas accesorias para favorecer la degradación de las proteínas blanco-ubiquitinadas: éstas incluyen a un receptor de Ub (Rub), el cual funciona como un sitio de unión para cadenas multiubiquitinadas; y una isopeptidasa, para la reutilización de residuos de ubiquitina⁹⁴.

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 protección de los péptidos sean las proteínas de choque térmico (Hsp 70/90), las cuales normalmente funcionan 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 $\beta 2m$ en el retículo endoplásmico⁹⁵.

B).- Translocación de péptidos del citoplasma al retículo endoplásmico.

El proceso de translocación de los péptidos citoplasmáticos al RE y al cis-Golgi ocurre principalmente por un heterodímero constituido por proteínas denominadas "Transportadores Asociados al Procesamiento de Antígenos" (Tap's). El transportador heterodimérico está formado por dos proteínas homologas llamadas Tap-1 y Tap-2 con un peso de 76 kD y 70kD, respectivamente. Estas proteínas están asociadas de forma no covalente, cada proteína tiene 6 dominios transmembranales y un dominio dependiente de ATP, este último se encuentra orientado hacia el citoplasma^{87,96}.

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 traslocación del péptido al RE, es requerida la hidrólisis del ATP⁹⁷.

C).- Estabilización y ensamblaje de moléculas MHC-I.

Este proceso es mediado por interacciones transitorias con chaperonas moleculares que residen en el lumen del RE, tal como BiP, GRP94 y Calnexina. La chaperona mejor caracterizada por su participación en los eventos de ensamblaje de moléculas MHC-I es la calnexina, una proteína de membrana residente en RE con un peso de 88 kDa.

Otra chaperona denominada BiP, se ha visto que tiene similar actividad que calnexina, actuando específicamente con la cadena pesada de las moléculas MHC-I^{98,99}. La calreticulina es una proteína de 46kD encontrada en el lumen del RE, tiene alto grado de homología a la calnexina y tiene alta afinidad por iones calcio que se localizan en el RE. Se asocia sólo con los dímeros formados por la cadena pesada y β 2m. La Tapasina es una glicoproteína transmembranal de 428 aminoácidos con un glicano unido a asparragina. La región hidrofóbica que forma el dominio transmembranal, contiene un residuo de lisina el cual puede estar involucrado en la interacción con otras proteínas, por ejemplo Tap-1. Cada molécula de tapasina puede unir un dímero formado por la cadena alfa y β 2m, y probablemente una molécula de calreticulina asociada¹⁰⁰.

D).- Transporte de los complejos MHC-I /péptido a la superficie celular.

Cuando la molécula de clase I se encuentra ensamblada junto con su péptido, es transportada desde el RE hacia el aparato Golgi, donde es englobada en una vesícula secretoria y posteriormente transportada a la membrana citoplasmática para fusionarse con ella y dejar expuestas y ancladas a las moléculas clase I del MHC que expondrán su péptido para ser reconocido por los linfocitos T citotóxicos¹⁰¹. FIGURA 13

Por consecuencia, se sabe que las proteínas reguladoras del ciclo viral que transforman a la célula huésped, pueden ser degradadas por el proteasoma y seguir una ruta de procesamiento de antígenos "Proteasoma-TAP" y ser expresadas por el contexto de MHC-I, por tal motivo, el sistema inmune puede ser capaz de reconocer a estos péptidos como extraños y despertar una respuesta inmune.

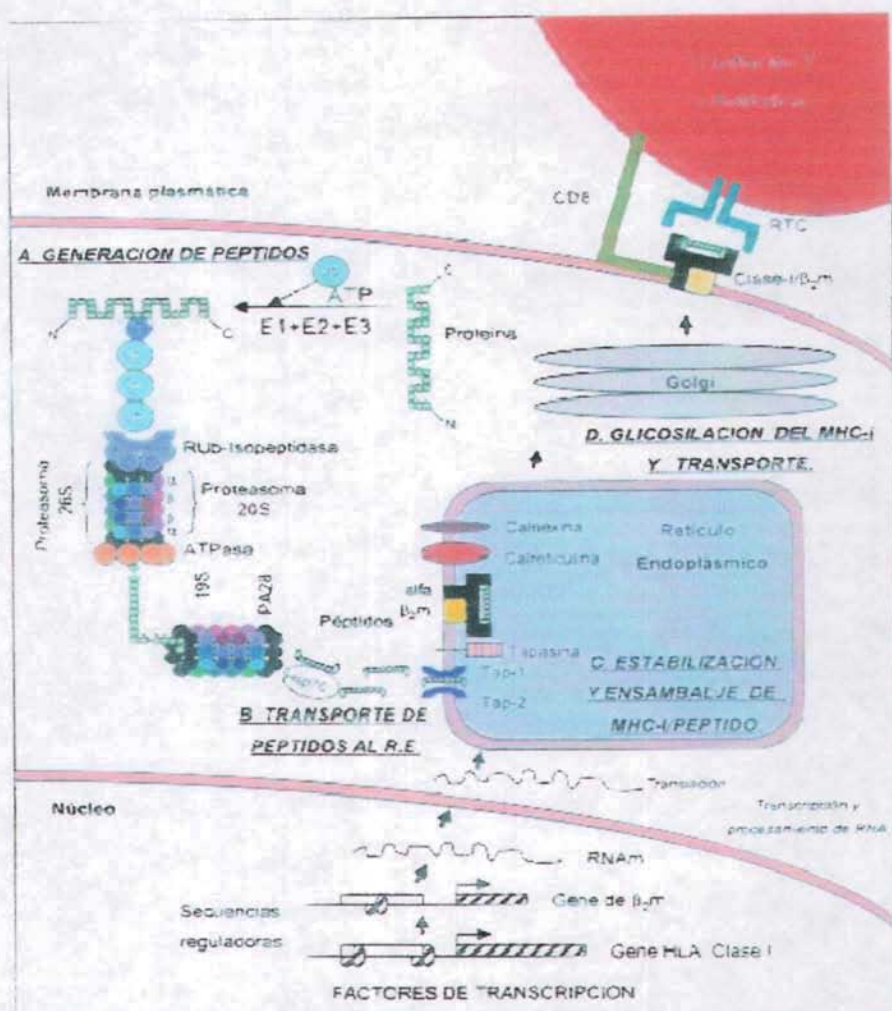


FIGURA 13 Etapas del procesamiento de antígenos por la molécula de HLA-I. A) Generación de péptidos en el citoplasma. B) Transporte de péptidos hacia el interior del retículo endoplásmico, C) Estabilización y ensamblaje de moléculas HLA-I y D) Glicosilación del HLA-I y el transporte a la membrana. (Tomado de Garrido F, Cabrera T, Concha A. Natural history of HLA expression during tumor development. *Immunol Today* (1993); 14: 491-99. Groettrup M, Sosa A, Kuckelkorn U. Peptide antigen production by the proteasome: complex provides efficiency. *Immunol Today* (1996); 9: 429-35. Yang Y, Sempé P, Peterson PA. Molecular mechanisms of class-I major histocompatibility complex antigen processing and presentation. *Immunol Res* (1996); 15: 208-33. Tanaka K, Tanahashi N, Tsurumi CH. Proteasomes and antigen processing. *Adv Immunol* (1997); 64: 1-38. Modificado por Monroy - García A. Estudio de la actividad estimuladora de péptidos presentados por moléculas MHC-I de células tumorales de carcinoma cérvico uterino sobre linfocitos T de sangre periférica. D. F: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM; (1999) p. 10-32, 42-51. Tesis doctoral.)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Casi un cuarto de todos los cánceres cérvico-uterinos en México, son atribuidos a la variante Asiático-Americana del virus del papiloma humano tipo 16. La evidencia sugiere la variante Asiático-Americana del HPV16 confiere nueve veces más riesgo oncogénico que la variante Europea; además, la variante Asiático – Americana está asociada con mujeres 8 años mas jóvenes y con tumores más agresivos. Por lo tanto es de vital importancia el estudio es las variantes intratípicas del HPV16, dado que a nivel mundial estas variantes no son tan frecuentes como en México.

A pesar de las campañas de prevención y detección temprana no ha sido posible disminuir las tasas de morbilidad y mortandad a niveles deseables; por tal motivo, es necesaria la búsqueda de alternativas para el combate del cáncer cérvico-uterino. En este sentido, la inmunoterapia consiste en la estimulación del organismo humano por medio de la inmunización con antígenos apropiados para producir una respuesta profiláctica o terapéutica.

De hecho, se sabe que las proteínas reguladoras del ciclo viral del HPV16, pueden ser degradadas por el proteasoma y seguir una ruta de procesamiento de antígenos “Proteasoma-TAP” y ser expresadas por el contexto de HLA-I, por tal motivo, el sistema inmune puede ser capaz de reconocer a estos péptidos como extraños y despertar una respuesta inmune.

De tal manera, en este estudio se evaluó la capacidad antigénica de péptidos sintéticos derivados de la variante Europea (KLPQLCTEL y KISEYRHYC), y de la variante Asiático-Americana (KLPHLCTEL y KISEYRYYC), de la proteínas E6 del virus de papiloma humano tipo 16, para generar una fuerte respuesta inmune en linfocitos T citotóxicos “in Vitro”.

Finalmente, tomando en consideración los resultados obtenidos, este trabajo de investigación, revela la importancia que tienen las variantes Asiático-Americanas del HPV16, además que los péptidos estudiados se encuentran expresados y mantienen LSP de memoria en estadios tempranos como NIC I, hasta estadios muy avanzados de la enfermedad, lo cual es de gran trascendencia para poderlos proponer en la asignación de protocolos de vacunación a favor de estas pacientes infectados con algún tipo de HPV de las familias A9 y A7del árbol filogenético del HPV. Dentro de la familia A9 se encuentra el HPV16 y dentro de la familia A7 se encuentra el HPV18

OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la capacidad antigénica de péptidos homólogos derivados de la variante Europea (VE) y de la variante Asiático – Americana (VAA) de la proteína E6 de HPV16.

Objetivos particulares.

Determinar la afinidad de los péptidos homólogos derivados de la VE y de la VAA, por la molécula de HLA-A0201

Determinar el tipo de papilomavirus infectante en las pacientes donadoras.

Determinar la capacidad antigénica de los péptidos homólogos derivados de la VE y de la VAA.

Determinar la capacidad citotóxica de linfocitos de sangre periférica (LSP) de pacientes estimulados *in vitro* con péptidos homólogos derivados de la VE y de la VAA de la proteína E6 de HPV16.

HIPÓTESIS.

Los péptidos homólogos derivados de la variante Europea y de la variante Asiático – Americana de la proteína E6 de HPV16, con un tiempo medio de disociación igual (según programas computacionales de predicción algorítmica), con respecto a la unión de la molécula de HLA-A0201, presentarán diferentes capacidades antigénicas, debido a que el cambio mínimo en las secuencias les conferirá a los LSP la capacidad de reconocer con mayor intensidad a sólo uno de los dos péptidos relacionados de la variante Europea o de la variante Asiático – Americana.

MATERIALES Y EQUIPOS.

Torundas con alcohol 70%.
Ligadura.
Agujas vacutainer.
Porta-agujas vacutainer (capuchón).
Tubos vacutainer con anticoagulante ACD.
Jeringas con aguja de 3, 5, 10, 20 mL
Centrífuga para análisis clínicos marca Solbad S. A.
Centrífuga congelante con rotor para placas de cultivo marca Hettich zentrifugen.
Tubos cónicos estériles 17x120 mm marca Falcon.
Tubos cónicos estériles 40x125 mm marca Falcon.
Tubos estériles de estireno 12x75mm, marca Elkay.
Tubos 25x110 marca Pyrex.
Pipetas de 1, 2, 5 mL marca Bellco.
Micropipetas graduables con capacidad máxima de 20, 200, 1000 μ L marca Gilson.
Puntas para micropipeta marca Corning incorporate.
Micropipeta multicanal de 20 – 200 μ L marca Wheaton.
Micropipeta repetidora de 50 y 250 μ L marca Robbins.
Incubadora con atmósfera de CO₂ marca Forma Scientific.
Campanas de flujo laminar marca Veco.
Citómetro de flujo FACScalibur marca Beckton Dickinson .
Contador de centelleo marca Beckman
Contador Geiger.
Cosechadora marca Brandel
Papel filtro de fibra de vidrio marca Brandel.

Kit de tipificación de HLA marca lambda inc.
Placas de cultivo de 24 y 96 pozos de poliestireno marca Corning incorporate. de fondo plano y cóncavo.
Filtros de membrana esterilizante de 0.20 μ m marca Corning incorporate.
Cajas de cultivo de poliestireno de 3, 6, 10 cm de diámetro marca Corning incorporate.
Anticuerpos monoclonales primarios para detectar HLA
Anticuerpos monoclonales secundarios con fluoresceína para detectar anticuerpos monoclonales primarios.
Medios de cultivo estériles: RPMI 1640, DMEM, de Iscove complementado, medio de congelación.
Reactivos estériles: Amortiguador salino de fosfatos (PBS), suero fetal de bovino inactivado por calor (SFB), 2 mercaptoetanol, piruvato de sodio, solución de aminoácidos no esenciales, Ficoll-Histopaque, mezcla de penicilina-estreptomina para cultivos celulares, amortiguador de lisis, solución desarrolladora, colorante azul tripano, solución de timidina tritiada (³H₂), solución de cromato de sodio (⁵¹Cr), solución de bromuro de etidio, dimetilsulfóxido,
Refrigerador, congelador, ultracongelador, contenedor para nitrógeno líquido. Autoclave. Microscopio, estereoscopio. Cámara de Neubauer. Microscopio de fluorescencia.
Líneas celulares: T2, K562, CasKi, HeLa.

MÉTODO.

PÉPTIDOS USADOS EN EL ESTUDIO.

Los péptidos usados en este estudio se enlistan en la **Tabla 5**; los datos de tiempo de disociación medio fueron obtenidos del programa de predicción de algoritmos *bimas* (http://www.bimas.dcert.nih.gov/cgi-bin/molbio/ken_parker_comboform), el cual se basa en los residuos de anclaje y el tamaño de los péptidos que han sido descritos para cada alelo particular¹⁰², de tal forma que las secuencias de la proteína E6 de HPV16 en su variante Europea y su variante Asiático – Americana fueron analizadas para obtener este par de péptidos homólogos.

TABLA 5
PÉPTIDOS USADOS EN EL ESTUDIO.

Secuencia	Alelo de HLA	Tipo de HPV	Proteína	Posición	T½ de disociación	No. del péptido
KLPQLCTEL	HLA-A2	HPV16	E6	18	74.768	1
KLPHLCTEL	HLA-A2	HPV16VAA1	E6	18	74.768	4
KISEYRHYC	HLA-A2	HPV16	E6	79	53.914	3
KISEYRYYC	HLA-A2	HPV16VAA1	E6	79	53.914	5
TLGIVCPIC	HLA-A2	HPV16	E7	7	2.037	7
GILGFVFTL	HLA-A2		Matriz de influenza.	58	2666	17 o INFL
YMLDLQPETT	HLA-A2	HPV16	E7	11	184.028	38

Letras en negrita muestran donde se encuentran los cambios en los aminoácidos de las VE y VAA.

Se conoce que el alelo más estudiado es el alelo HLA-A0201 por ser el alelo más frecuente en la población mundial¹⁰³⁻¹⁰⁵, por lo cual los péptidos fueron restringidos a la molécula HLA-A0201.

Además, estos péptidos fueron utilizados debido al parecido de sus secuencias con otros péptidos que anteriormente demostraron antigenicidad, entre ellos destacan los péptidos ISEYRYYC de la proteína E6 del HPV16; TLGIVCPIC y YMLDLQPETT de la proteína E7 del HPV16; los péptidos KLPDLCTEL, ELTEVFAPA y KTLELDEV de la proteína E6 del HPV 18 y los péptidos FLNTLSFVC y TLQDIVLHL de la proteína E7 del HPV18^{55, 106, 107}.

Los péptidos 7, 17, y 38, son usados como controles positivos de proliferación.

El tiempo de disociación medio sirve como un indicador indirecto de la estabilidad con la molécula de HLA-A0201: esto es, a mayor tiempo, mayor estabilidad.

Los péptidos fueron sintetizados por Invitrogen, USA, y usados como fue indicado.

OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA.

Se obtuvo en un tubo con anticoagulante ACD sangre de paciente o donadores, y se centrifugaron a 2500 Fuerzas Centrífigas Relativas (FCR) por 6 minutos, se separó el plasma y se guardó en un tubo de plástico de cinco mililitros.

Se tomó con una pipeta graduada el restante del plasma y paquete celular, transfiriendolo a un tubo cónico de cincuenta mililitros y se homogenizaron con una cantidad 1:1 de amortiguador de fosfatos (PBS), en tubos de vidrio para contener quince mililitros y colocaron alrededor de dos a tres mililitros de Histopaque™ (Ficoll-Hypaque de Sigma), se agregó gota a gota el homogenizado sin romper la interfase.

Se centrifugaron a 250 FCR por veinticinco minutos, al mismo tiempo se inactivó el plasma autólogo a 56°C por 35 minutos en baño de agua. Transcurrido el tiempo se recolectó la capa de leucocítica formada, se colocó en un tubo y lavaron 2 veces con la solución de PBS.

Después del segundo lavado se resuspendió el botón celular en dos mililitros con medio de cultivo Iscove complementado y con antibióticos. Se contaron en la cámara de Newbauer el número de leucocitos obtenidos.

TÉCNICA DE PROLIFERACIÓN IN VITRO.

Las células polimorfonucleares (PMN) obtenidas anteriormente, se incubaron en una placa de cultivo de 96 pozos de fondo plano marca Corning, a una densidad de 2×10^5 células por 100 μ L en medio Iscove's complementado y 20% de plasma autólogo, por pozo.

Se añadieron 100 μ L del péptido correspondiente por triplicado e incubaron por siete días a 37°C con atmósfera del 5% de CO₂. Cuidando la viabilidad de los leucocitos, al sexto día se retiraron 100 μ L de medio de cultivo y se agregaron 100 μ L de medio de Iscove, también se agregaron 20 μ L de timidina tritiada, (1 μ Ci) e incubaron por doce horas a 37°C con atmósfera de CO₂.

Se cosecharon los linfocitos sobre una tira de papel filtro de fibra de vidrio, con ayuda de una cosechadora marca Brandel, USA. Al día siguiente se colocaron los núcleos de los linfocitos retenidos en los círculos de papel, en los tubos correspondientes, se agregaron 2 mL de líquido de centelleo y se leyó en el contador de centelleo.

TIPIFICACIÓN DE LOS HAPLOTIPOS DE HLA DE CLASE I.

Se empleó el kit Fluorebeads de One Lambda, Inc. Se siguieron las indicaciones en el inserto del fabricante. Como parte final se colocaron dos gotas (aproximadamente cuatro microlitros) por pozo en una placa Terasaki que contiene los antisueros correspondientes y complemento, a temperatura ambiente.

Se dejaron protegidos de la luz una hora. Transcurrido el tiempo se adicionaron 5 μ L/pozo de solución FluoroQuench. Finalmente, se evaluaron en un microscopio de fluorescencia y se anotaron los resultados en las hojas de tipificación previstas.

TIPIFICACIÓN DE HPV INFECTANTE EN LAS BIOPSIAS DE PACIENTES DONADORAS.

Las biopsias obtenidas de las pacientes donadoras se lavaron con PBS 1X (Phosphate Buffer Saline), se fragmentaron y se colocaron en un tubo Eppendorf con 400 μ L de buffer de lisis, y se almacenaron a -70 °C hasta su utilización.

Se descongelaron y se adicionó 5 μ L de proteinasa K (10 μ g/mL, SIGMA USA) y se incubaron toda la noche a 37 °C. Se homogenizó y se agregaron 40 μ L de Tris-Base 1M, pH 9.4, 400 μ L de una solución de fenol saturado en agua y se agitó vigorosamente.

Se centrifugó 10 minutos a 11600g, se extrajo la fase acuosa y se transfirió a un nuevo tubo, se agregó un volumen igual de cloroformo:alcohol isoamílico (25:1), se agitó vigorosamente y se centrifugó por 10 minutos a la misma velocidad. se extrajo la fase acuosa y se transfirió a un nuevo tubo, donde se adicionó la mitad del volumen de acetato de amonio 7.5M se homogenizó, posteriormente se agregaron 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío y se mezcló por inversión.

Se centrifugó durante 10 minutos a 7200g a 4 °C, el botón se lavó con etanol al 75% v/v, y se volvió a centrifugar conforme a las condiciones anteriores. Se dejó secar a temperatura ambiente el botón, se disolvió con agua ultrapura libre de DNAsas y RNAsas en un volumen 1:4, se incubó 30 min a 56 °C. Se centrifugó a 2300g por 10 min a 4 °C, el sobrenadante obtenido fue cuantificado por espectrofotometría.

El HPV de las muestras de ADN tumoral fue tipificado mediante PCR, utilizando los oligonucleótidos MY09 y MY11 descritos por Manos en 1989. y utilizando una digestión enzimática con la enzima de restricción RsaI, se obtuvo un patrón de corte, que se comparó contra los patrones de corte de líneas celulares positivas para HPV16 o HPV18 (CasKi y HeLa respectivamente) sobre un gel de agarosa.

ENSAYO DE CITOMETRÍA DE FLUJO.

Se colocaron las células que se les realizó el estudio en placas de 96 pozos de fondo cóncavo, se colocó la placa en baño de hielo. Se lavaron las células con 100 μ L de una solución de PBS 1x (Phosphate Buffer Saline) al 2% de SFB (Suero Fetal de Bovino). Se agregaron 90 μ L de PBS 1x 2% SFB, 10 μ L de anticuerpo primario. Se colocó la placa en baño de hielo y dejó 30 minutos. Transcurrido el tiempo se lavaron dos veces (centrifugó, retiró medio, lavó, resuspendió).

Se agregó el anticuerpo 2° 1 μ L por pozo y 99 μ L de PBS 1x 2% SFB, y se dejaron reposar en baño de hielo por 15 minutos. Transcurrido el tiempo lavó dos veces (centrifugó, retiró medio, lavó, resuspendió).

Después del segundo lavado agregaron 100 μL de PBS 1x 2% SFB, resuspendieron y transfirieron a tubos 12x75mm de estireno y colocaron 200 μL de PBS 1x 2% SFB más. Se leyeron en un citómetro de flujo.

ENSAYO DE CITOTOXICIDAD.

Se estimularon los linfocitos de sangre periférica por dos semanas de con el péptido correspondiente. Un día anterior al ensayo de citotoxicidad se incubó la línea celular T2 con péptido y sin péptido, en una placa de 24 pozos, y preparó la línea celular K562 en condiciones óptimas. Se contaron con azul tripano los linfocitos y líneas celulares.

Los linfocitos se ajustaron a una cantidad conocida y se sembraron en una placa de 96 pozos de fondo cóncavo en dilución seriada para tener tres concentraciones de células, por triplicado. El volumen final fue de 50 μL . Cocultivaron por 1 hr. con 50 μL de las células K562 (20 por cada célula blanco que se colocaron después).

Se marcaron las células T2 con 10 μCi de ^{51}Cr por 2 horas; transcurrido el tiempo, lavaron y contaron con azul tripano. Se ajustó el número deseado a 100 μL para una relación de linfocitos: T2 de entre 100:1 hasta 10:1, y cocultivaron en los pozos de linfocitos y K562, para un volumen final de 200 μL , durante cuatro horas. Pasado el tiempo, centrifugó la placa y colectaron 100 μL de medio sobrenadante de cada pozo y transfirieron a microtubos, para fueron colocados en el contador de centelleo. Para cada tratamiento fue media la liberación espontánea de cromio (células T2 incubadas sin linfocitos efectoras) y la liberación total (células T2 lisadas con SDS al 5%). El porcentaje de citotoxicidad se determinará mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Citotoxicidad} = (\text{LExp} - \text{LEsp} / \text{LTot} - \text{LEsp}) \times 100, \text{ donde}$$

LExp= Liberación experimental de cromio

LEsp= Liberación espontánea de cromio

LTot= Liberación total de cromio.

RESULTADOS.

ESTABILIZACIÓN DE LA MOLÉCULA DE HLA-A2 EN CÉLULAS T2.

Para conocer la estabilidad experimental de estos péptidos y determinar la concentración necesaria para utilizar en el cultivo celular, se realizó una curva dosis respuesta, que fue evaluada mediante la técnica de citometría de flujo.

Utilizando células T2, la cual presenta moléculas HLA-A0201 vacías, que fueron cargadas con péptidos a diferentes concentraciones, para conocer la estabilización de la molécula de HLA-A0201. FIGURA 14.

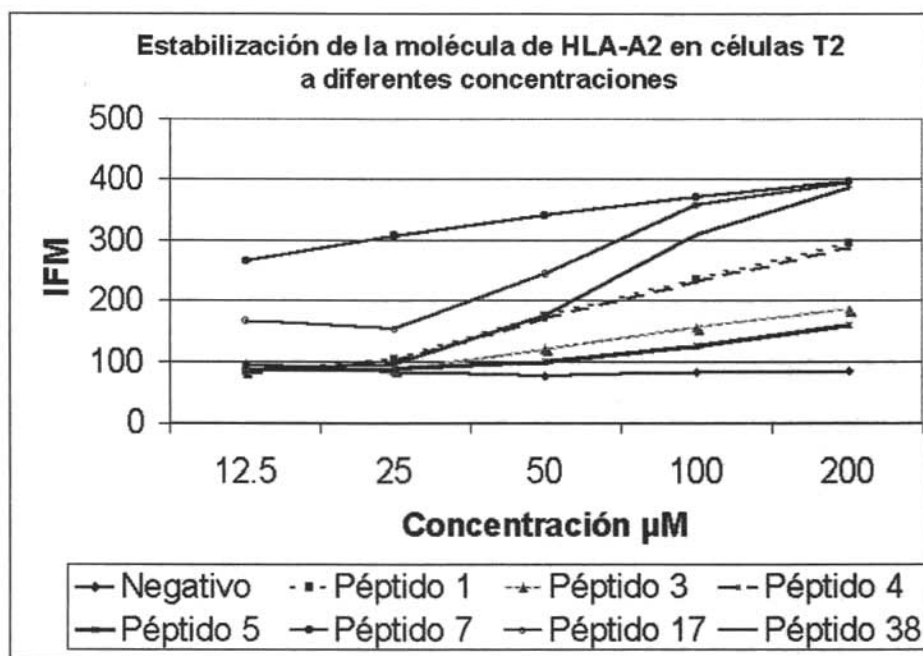


FIGURA 14. Índice de fluorescencia media (IFM) de los péptidos usados en el estudio, a diferentes concentraciones.

Péptido 1) KLPQLCTEL	Péptido 3) KISEYRHYC	Péptido 7) TLGIVCPIC
Péptido 4) KLPHLCTEL	Péptido 5) KISEYRYYC	Péptido 17 o INFL) GILGFVFTL
	Péptido 38) YMLDLQPETT	

Los péptidos 1, 4, 3, 5 y 38 tuvieron una concentración óptima de 50 µM, dado que en análisis anteriores utilizando concentraciones de péptido a 50 y 200 µM, mostraban similares proliferaciones, mientras que los péptidos 7, y 17 tuvieron una concentración óptima de 25 µM.

TIPIFICACIÓN DE LOS HAPLOTIPOS DE HLA DE CLASE I

Los leucocitos de sangre periférica provenientes de muestras de pacientes con CaCu fueron tipificadas para conocer su haplotipo de HLA-I. Los resultados de la tipificación de HLA de clase I se resumen en las FIGURAS 15-17. El haplotipo, la edad, y el estadio clínico de las pacientes donadoras se resumen en la TABLA 6.

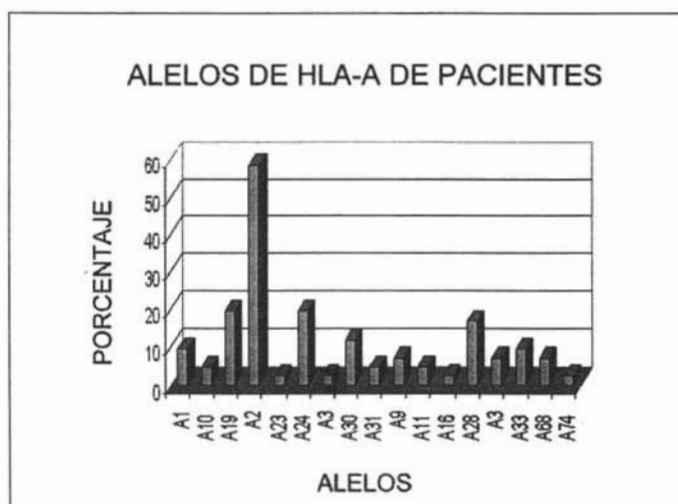


FIGURA 15. Frecuencias de los alelos de HLA-A en las pacientes. Los alelos con mayor frecuencia fueron: HLA-A2, -24, -A19, -A28 y -A30.

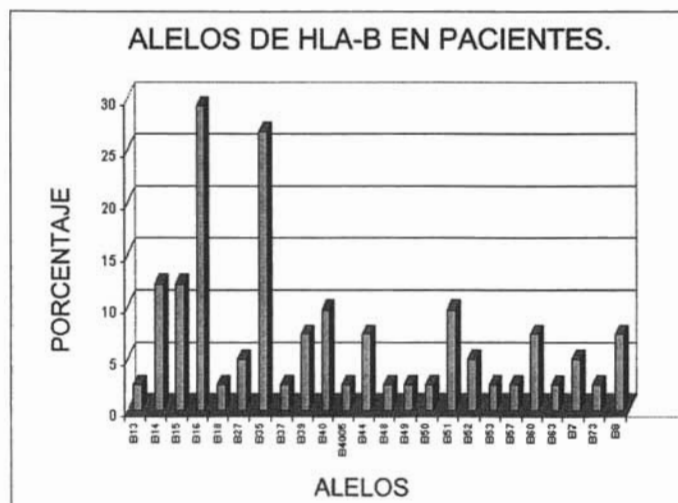


FIGURA 16. Frecuencias de los alelos de HLA-B en las pacientes. Los alelos de HLA-B de mayor frecuencia fueron: HLA-B16, -B35, -B14, -B40 y -B15. (HLA-B39 es un subclase del tipo HLA-B16)

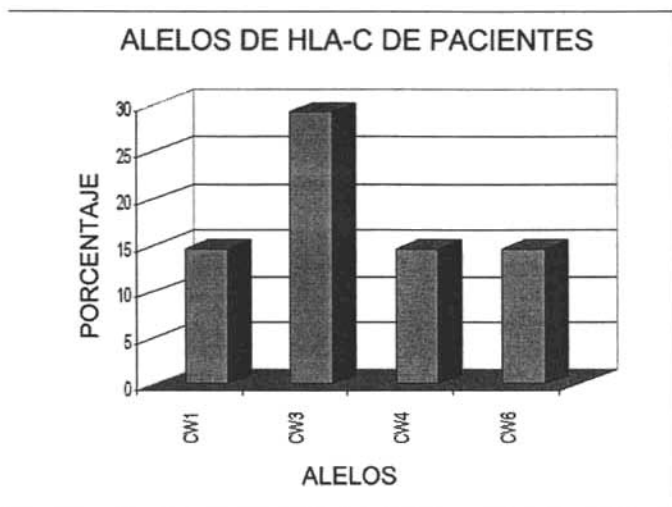


FIGURA 17. Frecuencias de los alelos de HLA-C en las pacientes. El alelo de HLA-C de mayor frecuencia en el estudio fue: HLA-CW3

TABLA 6

CLAVE	EDAD (AÑOS)	ESTADIO CLÍNICO	ALELOS DE HLA CLASE I				
			A2	A33	B51	B53	CW4
1	43	IIIB	A2	A33	B51	B53	CW4
2	47	IIB	A2	A68	B15	B70	CW4
3	ND	LSIL	A2	A33	B14	B16	
4	19	LSIL	A2	A33	B14	B16	
5	44	NIC-I	A2	A68	B35	B40	CW3
6	23	LSIL	A23	A33	B39	B35	CW4
7	46	IIIB	A2	A3	B15	B7	CW1
8	34	IIIB	A2	A1	B52	B8	CW3
9	30	IIIB	A2	A68	B16	B50	CW3
10	48	IVA	A2	A19	B51	B27	
11	55	IIA	A9	A30	B51	B16	CW6
12	54	IIIA	A1	A11	B8	B40	CW3
13	43	IB	A19	A28	B35	B15	CW3
14	66	IIB	A10	A24	B16		
15	55	IB	A2	A26	B16	B35	CW1
16	33	IB	A2	A16	B60		
17	66	IIA	A2	A24	B60	B48	CW3
18	ND	ND	A3	A28	B7	B49	
19	ND	ND	A2	A74	B15	B40	CW3
20	36	ND	A2	A24	B15	B16	CW1
21	28	NIC-I	A2	A3	B14	B73	
22	34	IIB	A2	A9	B44	B35	CW4
23	ND	IIB	A24	A30	B44		
24	ND	IIB	A2		B35	B4005	CW6
25	43	IIB	A31	A19	B16		CW1
26	ND	ND	A1	A19	B8	B60	
27	ND	IIB	A2	A19	B35		CW4
28	ND	IIIB	A24	A19	B27		
29	49	IIIB	A9	A30	B14	B16	
30	20	NIC-I	A10	A19	B18		CW1
31	29	LSIL	A30	A31	B62	B13	CW4
32	32	LSIL	A2	A11	B44	B39	CW3
33	24	LSIL	A19	A30	B51	B14	CW6
34	34	NIC-I	A24	A28	B16	B35	CW6
35	42	NIC-I	A24	A28	B35	B37	CW3
36	40	NIC-III	A2		B35		CW3

(continua)

TABLA 6 (continuación)

37	39	NIC-I	A2	A28	B16	B40	CW6
38	42	NIC-I	A1	A24	B39	B57	CW6
39	44	NIC-I	A2	A28	B16	B63	
40	32	NIC-I	A2	A28	B52		CW3
41	32	NIC-I	A2	A24	B35		CW3
42	41	IIIB	A2	A28	B7	B49	
43	55	IB	A2		B17	B16	CW6
44			A2	A24	B35		CW1
45	55	IIB					
46			A2		B35	B51	CW6

TABLA 6 Relación de edad, estadio clínico y alelo de HLA clase I. El rango de edades varia de 19 hasta 66 años con una edad promedio de 42.5 años en contrando que este rango medio se encuentran la mayoría de los estadios avanzados.

TIPIFICACIÓN DE HPV INFECTANTE EN LAS BIOPSIAS DE PACIENTES DONADORAS.

Se observan los patrones de corte de los productos tratados con enzimas de restricción (signo +), el signo (-) es el patron de corte sin enzima de restricción; la línea celular HeLa como control positivo para HPV18 y la línea celular CasKi como control positivo para HPV16. Se muestra un resultado representativo de la tipificación del HPV infectante en las biopsias de las pacientes donadoras, donde se comparan los patrones de corte del ADN de las biopsias de las pacientes con los patrones de corte de las líneas celulares, de tal manera si los patrones son idénticos a alguna de las dos líneas celulares, se concluye que es del mismo tipo viral de la línea celular. FIGURA 18



FIGURA 18. Se observan los patrones de corte de los productos tratados con enzimas de restricción (signo +), el signo (-) es el patron de corte sin enzima de restricción. PM son los pesos moleculares.

PROLIFERACIÓN *IN VITRO* DE LSPs

Para determinar la capacidad antigénica de los péptidos homólogos derivados de la VE y de la VAA, se realizó una proliferación *in vitro* a LSP estimulados con los péptidos homólogos.

De las 46 pacientes analizadas, 28 pacientes tuvieron el alelo HLA-A0201, de las cuales se utilizaron 18, debido a que se contaba una cantidad adecuada de leucocitos de sangre periférica (LSP), con la calidad necesaria para realizar el estudio de proliferación *in vitro*. Las pacientes a las cuales se les realizó el ensayo de proliferación *in vitro* fueron reenumeradas.

El índice de proliferación (IP), encontrando que los LSP de las pacientes 1 y 2 muestran un reconocimiento por el péptido 5 KISEYRYYC, y de manera casi insignificante contra el péptido 1 KLPQLCTEL. El control de IL-2 que muestra la viabilidad de los LSP, muestra para las dos pacientes altos niveles de proliferación. El péptido control de la matriz de influenza-A (GILGFVFTL) para ambos casos es alto. FIGURA 19 Y 20.

Para las pacientes 3 y 5, se observa una baja respuesta de proliferación debida a los péptidos 3 KISEYRHYC y 38 YMLDLQPETT, indicando una respuesta contra la VE. Para ambos casos el control de IL-2 es alto. FIGURA 21 Y 22.

En la pareja de pacientes 8 y 9, sus LSP responden para los mismos péptidos, 5 KISEYRYYC, 7 TLGIVCPIC, 17 GILGFVFTL, y 38 YMLDLQPETT, además del control de IL-2, pero no con la misma intensidad. Cabe destacar que aunque el tipo infectante de HPV no es del tipo 16 o 18, existe una respuesta que suponemos que es del tipo cruzado, entre varios tipos de papiloma dentro de la familia A9 y A7 del árbol filogenético en los cuales se encuentran el tipo 16 y el tipo 18. FIGURA 23 Y 24.

Los LSP de la paciente 11 reconocen un par de los péptidos homólogos VE y VAA, aunque se observa una mayor respuesta para la VAA; además en el otro par de los péptidos homólogos, se observa únicamente respuesta para la VAA. Los péptidos controles son ampliamente reconocidos. Para la paciente 15, muestran un comportamiento semejante, excepto por el péptido 17 GILGFVFTL. Por lo demás el control de proliferación (IL-2) es alto para ambos casos. FIGURA 25 Y 26.

El caso de las pacientes 4 y 6, es muy similar al caso anterior, ya que aunque son reconocidos el par de péptidos homólogos 3 KISEYRHYC y 5 KISEYRYYC, derivados de la VE y VAA, sólo uno estos péptidos es más fuertemente reconocido. Los péptidos controles son altos para ambos casos, al igual que el control de IL-2. FIGURA 27 Y 28.

Para las paciente 7 y 10 se observa un reconocimiento de los péptidos 1 KLPQLCTEL y 5 KISEYRYYC, aunque en el caso de la paciente 7, el péptido 1 KLPQLCTEL es muy débilmente reconocido, aunque también mostró una baja actividad contra el péptido 3 KISEYRHYC. Estos datos nos sugieren algún tipo de respuesta cruzada, dado a que el HPV infectante es de tipo 18 y los péptidos provienen de la secuencia de HPV16. Los péptidos controles no mostraron una respuesta, que puede ser debido al tipo de HPV infectante, dado a que los péptidos usados son derivados del virus de HPV tipo 16. El control de proliferación muy alto. FIGURA 29 Y 30.

Para la paciente 13, los dos pares homólogos son reconocidos; para el par de péptidos homólogos 1 KLPQLCTEL y 4 KLPHLCTEL, el péptido 4 KLPHLCTEL es 2.33 veces mas reconocido que el péptido 1 KLPQLCTEL; para el par de péptidos homólogos 3 KISEYRHYC y 5 KISEYRYYC, el péptido 5 KISEYRYYC es 1.08 veces mas reconocido que el péptido 3 KISEYRHYC. Para la paciente 16 el comportamiento es similar al de la paciente 13. FIGURA 31 Y 32.

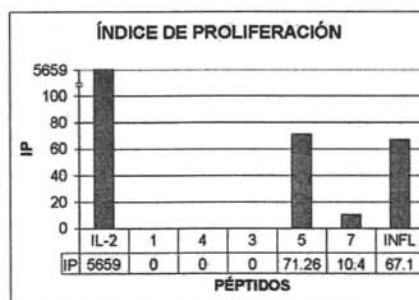
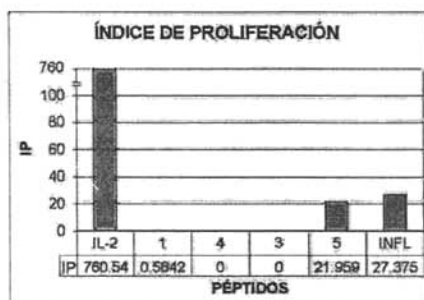
La paciente 14 responde a los dos pares de péptidos homólogos de la VAA y VE, aunque se observa una mayor respuesta para la VAA. Además aunque el péptido control (38 YMLDLQPETT), es muy alto, el control de Influenza A GILGFVFTL no es reconocido. El control de IL-2 es alto. Para la paciente 12, como caso contrario, ningún péptido responde, sugiriendo que la probabilidad del tipo de HPV infectante no esté relacionado con la familia A9 o A7, dado a que ninguna secuencia de los peptidos fue reconocida. FIGURA 33 Y 34.

La respuesta de los pacientes 17 y 18 con respecto al péptido 1 KLPQLCTEL es muy similar, además que este péptido es el único reconocido del par homólogo. Con respecto al otro par homólogo, la paciente 17 no muestra respuesta, pero para la paciente 18, responden de manera casi similar pero un poco más la variante europea como se muestra en el péptido 3 KISEYRHYC. El péptido control 38 YMLDLQPETT es reconocido, y el control de proliferación IL-2 es alto. FIGURA 35 Y 36.

Con respecto al donador 1, el reconocimiento contra los péptidos homólogos de la VE y VAA es insignificante, los controles son altos a excepción de péptido de influenza esto puede ser debido a que otros epítopes de la proteína M1 de influenza A pudiera ser de mayor relevancia en diferentes estratos o sectores de la población mexicana, a causa de posibles cambios en las secuencias de las variantes de este tipo. Por el donador 2, cuyo HLA no incluye al alelo HLA-A2, no hay reconocimiento de ningún péptido, esto se debe a que los péptidos son específicos contra el alelo HLA-A2, solo el control de IL-2 se muestra alto. FIGURA 37 Y 38.

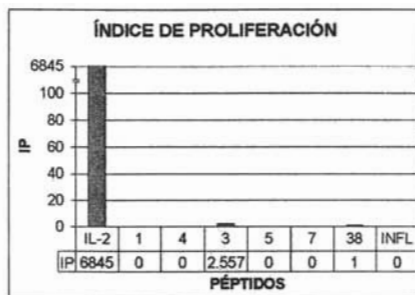
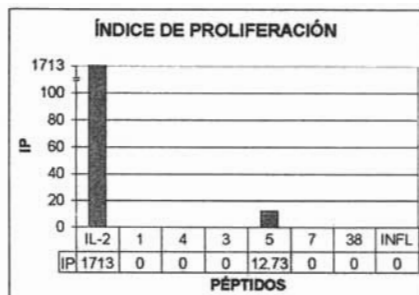
Promediando los índices de proliferación de las 18 pacientes, se observa que el péptido 4 (KLPHLCTEL), derivado de la variante Asiático-Americana de la proteína E6 de HPV16 es 1.59 veces mas reconocido y que el péptido 1 (KLPQLCTEL), derivado de la variante Europea de la proteína E6 de HPV16, lo que le confiere al péptido 4 (KLPHLCTEL) mayor antigenicidad.

El péptido 5 (KISEYRYYC) derivado de la VAA es 2.26 veces más reconocido y que el péptido 3 (KISEYRHYC), derivado de la VE, lo que le confiere al péptido 5 (KISEYRYYC) mayor antigenicidad. Por tanto la VAA es mucho más inmunogénica que la variante Europea de la proteína E6 de HPV16 confirmando lo reportado por Berumen⁴² 2001, Yamada³⁶ 1995, Casas⁶⁵ 1999. Lo anterior sugiere que el cambio de un aminoácido otorga diferencias antigénicas entre las variantes de las proteínas del HPV, además sólo un péptido ya sea de la variante Europea o Asiático-Americana es reconocido con mayor intensidad por el linfocito T citotóxico. FIGURA 39.



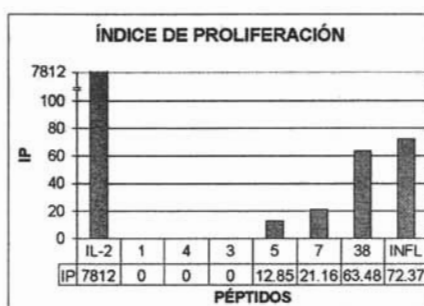
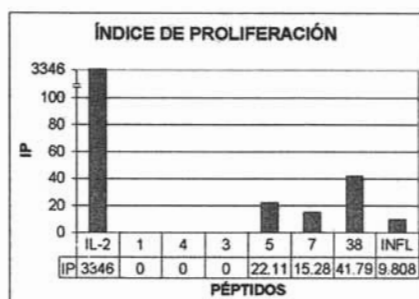
PACIENTE 1		PACIENTE 2	
HLA-A2, -A33, -B51, -B53, -CW4		HLA-A2, -A68, -B15, -B70, -CW4	
HPV16		HPV16	
Péptido 1) KLPQLCTEL	Péptido 3) KISEYRHYC	Péptido 7) TLGIVCPIC	
Péptido 4) KLPHLCTEL	Péptido 5) KISEYRYYC	Péptido 17 o INFL) GILGFVFTL	
Péptido 38) YMLDLQPETT			

FIGURA 19 Y 20 Índices de proliferación de LSP estimulados con péptidos homólogos derivados de la VE y de la VAA de la proteína E6 del HPV16



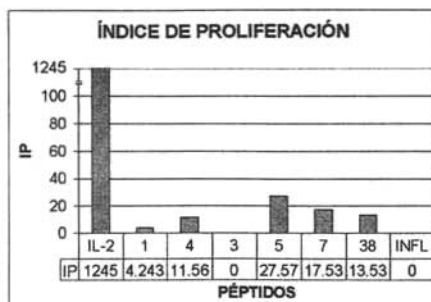
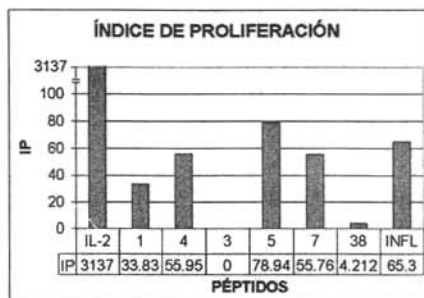
PACIENTE 5				PACIENTE 3			
HLA-A2, -A33, -B14, -B16				HLA-A2, -A68, -B35, -B40, -CW3			
HPV NO DETERMINADO				HPV NO DETERMINADO			
Péptido 1) KLPQLCTEL		Péptido 3) KISEYRHYC		Péptido 7) TLGIVCPIC			
Péptido 4) KLPHLCTEL		Péptido 5) KISEYRYYC		Péptido 17 o INFL) GILGFVFTL			
				Péptido 38) YMLDLQPETT			

FIGURA 21 Y 22 Índices de proliferación de LSP estimulados con péptidos homólogos derivados de la VE y de la VAA de la proteína E6 del HPV16



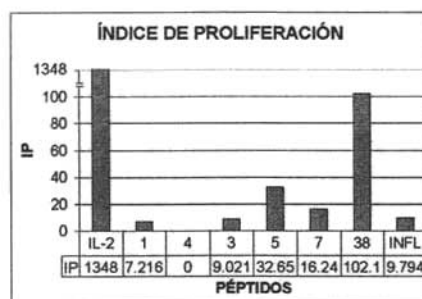
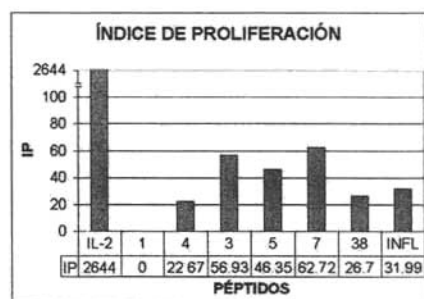
PACIENTE 8				PACIENTE 9			
HLA-A2, -A68, -B50, -CW3				HLA-A2, -A19, -B51, -B27			
HPV DIFERENTE AL 16 O 18				HPV DIFERENTE AL 16 O 18			
Péptido 1) KLPQLCTEL		Péptido 3) KISEYRHYC		Péptido 7) TLGIVCPIC			
Péptido 4) KLPHLCTEL		Péptido 5) KISEYRYYC		Péptido 17 o INFL) GILGFVFTL			
				Péptido 38) YMLDLQPETT			

FIGURA 23 Y 24 Índices de proliferación de LSP estimulados con péptidos homólogos derivados de la VE y de la VAA de la proteína E6 del HPV16



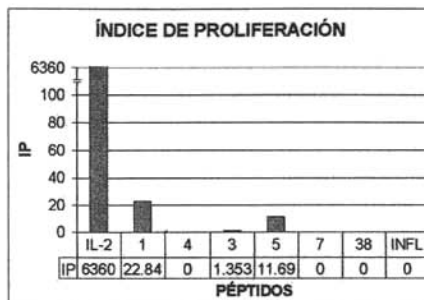
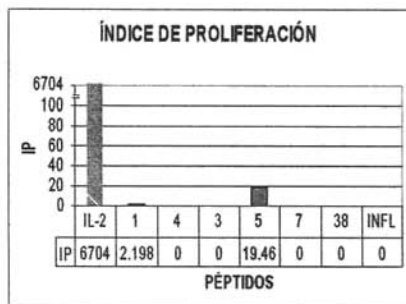
PACIENTE 11		PACIENTE 15	
HLA-A2, -A28, -B7, -B49		HLA-A2, -B35, -B5, -CW6	
HPV 39		HPV NO DETERMINADO	
Péptido 1) KLPQLCTEL	Péptido 3) KISEYRHYC	Péptido 7) TLGIVCPIC	
Péptido 4) KLPHLCTEL	Péptido 5) KISEYRYYC	Péptido 17 o INFL) GILGFVFTL	
	Péptido 38) YMLDLQPETT		

FIGURA 25 Y 26 Índices de proliferación de LSP estimulados con péptidos homólogos derivados de la VE y de la VAA de la proteína E6 del HPV16



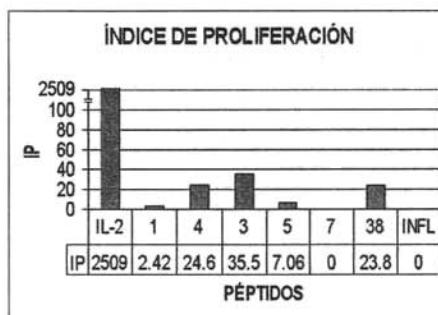
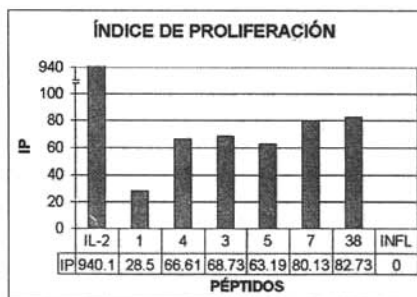
PACIENTE 4		PACIENTE 6	
HLA-A2, -A33, -B14, -B16		HLA-A2, -A3, -B15, -B7, -CW1	
HPV NO DETERMINADO		HPV DIFERENTE AL 16 O 18	
Péptido 1) KLPQLCTEL	Péptido 3) KISEYRHYC	Péptido 7) TLGIVCPIC	
Péptido 4) KLPHLCTEL	Péptido 5) KISEYRYYC	Péptido 17 o INFL) GILGFVFTL	
	Péptido 38) YMLDLQPETT		

FIGURA 27 Y 28 Índices de proliferación de LSP estimulados con péptidos homólogos derivados de la VE y de la VAA de la proteína E6 del HPV16



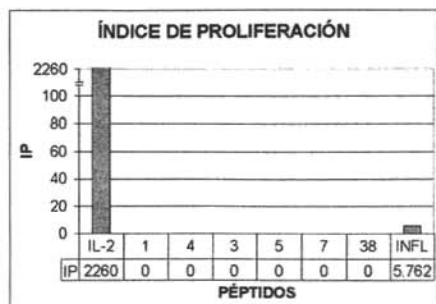
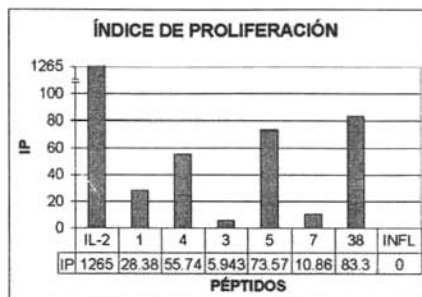
PACIENTE 7				PACIENTE 10			
HLA-A2, -A1, -B52, -B8, -CW3				HLA-A2, -A26 -B16, -B35, -CW1			
HPV18				HPV18			
Péptido 1) KLPQLCTEL		Péptido 3) KISEYRHYC		Péptido 7) TLGIVCPIC			
Péptido 4) KLPHLCTEL		Péptido 5) KISEYRYYC		Péptido 17 o (INFL) GILGFVFTL			
				Péptido 38) YMLDLQPETT			

FIGURA 29 Y 30 Índices de proliferación de LSP estimulados con péptidos homólogos derivados de la VE y de la VAA de la proteína E6 del HPV16



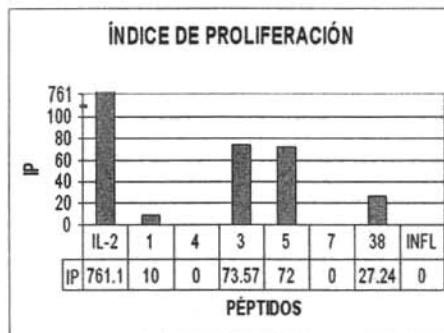
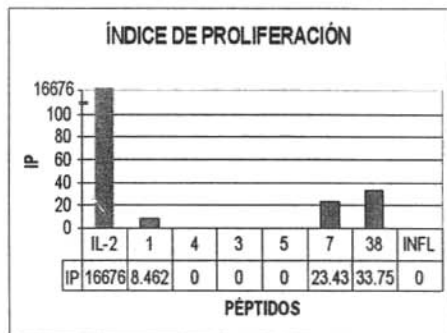
PACIENTE 13				PACIENTE 16			
HLA-A2, -A33, -B14, -B16				HLA-A2, -A24, -B6, -B35			
HPV16 VAA				HPV NO DETERMINADO			
Péptido 1) KLPQLCTEL		Péptido 3) KISEYRHYC		Péptido 7) TLGIVCPIC			
Péptido 4) KLPHLCTEL		Péptido 5) KISEYRYYC		Péptido 17 o (INFL) GILGFVFTL			
				Péptido 38) YMLDLQPETT			

FIGURA 31 Y 32 Índices de proliferación de LSP estimulados con péptidos homólogos derivados de la VE y de la VAA de la proteína E6 del HPV16



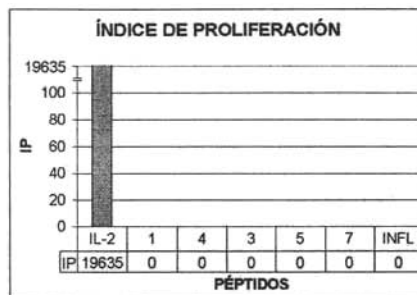
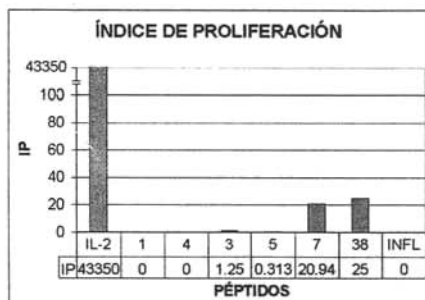
PACIENTE 14		PACIENTE 12	
HLA-A2, -A1, -B52, -B8, -CW3		HLA-A2, -A26, -B16, -B35, -CW1	
HPV NO DETERMINADO		HPV NO DETERMINADO	
Péptido 1) KLPQLCTEL	Péptido 3) KISEYRHYC	Péptido 7) TLGIVCPIC	
Péptido 4) KLPHLCTEL	Péptido 5) KISEYRYYC	Péptido 17 o INFL) GILGFVFTL	
	Péptido 38) YMLDLQPETT		

FIGURA 33 Y 34 Índices de proliferación de LSP estimulados con péptidos homólogos derivados de la VE y de la VAA de la proteína E6 del HPV16



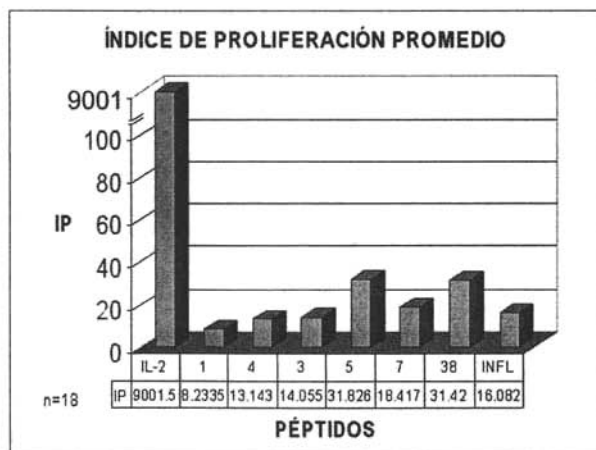
PACIENTE 17		PACIENTE 18	
HLA-A2, -A1, -B16, -B35		HLA-A2, -A19, -B14, -B16	
HPV NO DETERMINADO		HPV NO DETERMINADO	
Péptido 1) KLPQLCTEL	Péptido 3) KISEYRHYC	Péptido 7) TLGIVCPIC	
Péptido 4) KLPHLCTEL	Péptido 5) KISEYRYYC	Péptido 17 o INFL) GILGFVFTL	
	Péptido 38) YMLDLQPETT		

FIGURA 35 Y 36 Índices de proliferación de LSP estimulados con péptidos homólogos derivados de la VE y de la VAA de la proteína E6 del HPV16



DONADOR 1		DONADOR 2	
HLA-A2, -A33, -B7, -CW1		HLA-A33, -B44, -B41, -CW6	
Péptido 1) KLPQLCTEL	Péptido 3) KISEYRHYC	Péptido 7) TLGIVCPIC	
Péptido 4) KLPHLCTEL	Péptido 5) KISEYRYYC	Péptido 17 o INFL) GILGFVFTL	
	Péptido 38) YMLDLQPETT		

FIGURA 37 Y 38 Índices de proliferación de LSP estimados con péptidos homólogos derivados de la VE y de la VAA de la proteína E6 del HPV16

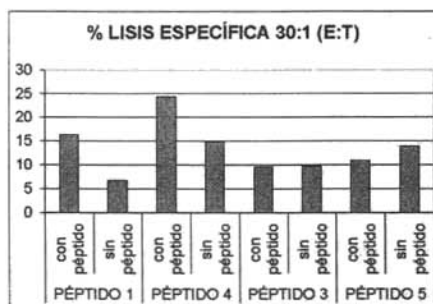


Péptido 1) KLPQLCTEL	Péptido 3) KISEYRHYC	Péptido 7) TLGIVCPIC
Péptido 4) KLPHLCTEL	Péptido 5) KISEYRYYC	Péptido 17 o INFL) GILGFVFTL
	Péptido 38) YMLDLQPETT	

FIGURA 39 Índices de proliferación promedio de LSP de las 18 pacientes donadoras estimulados con péptidos homólogos derivados de la VE y de la VAA de la proteína E6 del HPV16

ENSAYO DE CITOTOXICIDAD.

Tomando en consideración los índices de proliferación de las 18 pacientes, observamos que la VAA es mucho más antigénica que la VE, para determinar la capacidad citotóxica de linfocitos de sangre periférica (LSP) de pacientes estimulados *in vitro* con péptidos homólogos derivados de la VAA y la VE de la de la proteína E6 de HPV16, se realizó un ensayo de citotoxicidad con los LSP de la paciente 13 que fue tipificada con la variante Asiático-Americana. Donde se observa que el péptido 4 muestra una mayor citotoxicidad que su secuencia prototipo. FIGURA 40.



Péptido 1) KLPQLCTEL	Péptido 3) KISEYRHYC	Péptido 7) TLGIVCPIC
Péptido 4) KLPHLCTEL	Péptido 5) KISEYRYYC	Péptido 17 o INFL) GILGFVFTL
	Péptido 38) YMLDLQPETT	

FIGURA 40. Ensayo de citotoxicidad *in vitro*. LSP estimulados con péptidos homólogos derivados de la variante Europea y de la variante Asiático-Americana de la proteína E6 del HPV16, fueron capaces de lisar mayormente a células T2 cargadas con péptidos KLPHLCTEL derivados de la VAA que con el péptido KLPQLCTEL derivados de la VE

ANÁLISIS DE RESULTADOS.

El cáncer de cérvix (CaCu), es la tercera neoplasia maligna ginecológica más frecuente a nivel mundial, con la tendencia a ser la segunda causa de muerte. FIGURA 1. La edad promedio para el desarrollo de CaCu es aproximadamente 50 años; sin embargo, puede afectar a mujeres de hasta 20 años de edad o incluso menores^{5,6}.

El CaCu es el principal cáncer en países en vías de desarrollo^{7,8}. En México, es el cáncer ginecológico más común en la mujer después del de mama^{9,13,14,21-27}.

Mediante técnicas como hibridación y PCR, se conoce que los tipos de HPV: 16, 18, 45, 31, 33, 52, 58, 35 se encuentran en el 95% de las muestras con carcinoma de células escamosas²⁷, y el ADN de estos HPV encontrados es predominantemente de tipo 16 y 18 encontrados en el 93% de casos de CaCu^{29,108}.

Dado que diferentes tipos de HPV han mostrado que tienen capacidades oncogénicas diferentes, es razonable pensar que las variantes también pueden tener diferencias oncogénicas.⁴³ La incidencia en cáncer cervical en diferentes comunidades puede estar asociada con la distribución de variantes virales específicas^{7,19,30,42,52,54-59,92}.

Aunque la distribución geográfica de los diferentes tipos de variantes puede estar influenciado por varios factores incluyendo: coevolución, migración y mezcla de razas^{29,30,42,60}, las asociaciones geográficas no son absolutas.³¹ La variante Asiático-Americana (VAA) de HPV16 ha sido reportado en muestras con cáncer invasivo en Centro y Sur América, España y Asia^{7,60}.

La prevalencia de la VAA es mucho más alta en México, con aproximadamente 45.7% de todos los CaCu.^{42,7} La evidencia sugiere que es más oncogénica la VAA que la variante Europea (VE), incluyendo su asociación con mujeres jóvenes y la alta asociación con CaCu de riesgo oncogénico⁶¹.

Dado que la sobre-expresión de las proteínas oncogénicas E6 y E7 de los HPVs de alto riesgo³³, en células del epitelio cervical infectadas por el virus y en células tumorales desarrolladas durante la enfermedad, han llevado a proponer que éstas pueden ser las proteínas blanco idóneas para servir como antígenos tumorales^{109,110}.

Por otra parte, debido a que los linfocitos T citotóxicos son los efectores primarios para la eliminación de células infectadas con algún virus y células tumorales, a través del reconocimiento de péptidos presentados por moléculas del antígeno leucocitario humano (HLA) de clase I, varios grupos de investigación como el nuestro, han dirigido sus esfuerzos para identificar a los péptidos antigénicos derivados de las proteínas E6 y E7 del HPV16 y 18 con la capacidad de estimular los Linfocitos T citotóxicos restringidos a moléculas HLA-A0201. Debido a que el alelo HLA-A0201, es el más frecuente en la población mundial^{55,103-107}.

El presente trabajo se realizó con la finalidad de evaluar las capacidades antigénicas de los péptidos homólogos derivados de la variante Europea y la variante Asiático-Americana de la proteína E6 del HPV16, a partir de linfocitos de sangre periférica (LSP) de pacientes con cáncer cérvico-uterino con diferentes estadios clínicos, utilizando técnicas de proliferación *in vitro* y citotoxicidad.

Los alelos de las pacientes estudiadas, coinciden con lo informado por De Leo¹⁰³ en 1997 y Wecman¹⁰⁵ en 1997.

Se obtuvieron dos pares de péptidos derivados de la VE y VAA, usando un programa de predicción algorítmica BIMAS, se identificó cuales teóricamente estabilizan mejor a la molécula de HLA-A0201.

Para comprobar esta estabilización de la molécula de HLA-A0201, se realizó la curva dosis respuesta, en la que se observa que los dos pares de péptidos homólogos derivados de la VE (KLPQLCTEL y KISEYRHYC), y de la VAA (KLPQLCTEL y KISEYRHYC) mostraron un comportamiento semejante a lo descrito por el programa BIMAS. Siendo semejantes la información teórica y experimental.

Pero los datos suministrados por el programa BIMAS con respecto a los péptidos 7 TLGIVCPIC, 17 GILGFVFTL y 38 YMLDLQPETT son diferentes a la estabilización experimental. El programa BIMAS nos dice que el péptido 7 TLGIVCPIC es el que menos estabilizaría a la molécula HLA-A0201, pero experimentalmente es el que más fuertemente estabiliza a la molécula HLA-A0201. Por el contrario el péptido derivado de la matriz de influenza A GILGFVFTL, el programa BIMAS nos indica que es el que mejor estabiliza a la molécula HLA-A2, pero experimentalmente no lo es.

Hemos observado que se repitió un comportamiento, en el cual son reconocidos los dos péptidos homólogos. Sin embargo, la respuesta siempre es mayor para uno de los dos péptidos, ya sea de la VAA ó VE. Como por ejemplo, el caso de la paciente 11, que fueron reconocidos el par de péptidos homólogos 1 y 4 (KLPQLCTEL y KLPHLCTEL respectivamente), pero el péptido 4 es 1.65 veces mas reconocido que el péptido 1. También, hemos observado que la especificidad a solo un péptido del par homólogo es variable y puede ser debido a la capacidad del HLA y TCR propios de las pacientes para reconocer y presentar estos péptidos sin importar este cambio sutil en la secuencia de aminoácidos, dado a que las secuencias de éstos péptidos homólogos derivados VAA y VE, mantienen los aminoácidos anclas, y el cambio se encuentra en el centro o casi el centro de la secuencia, otorgando diferentes capacidades antigénicas, porque recordemos que aunque se reconocieran los dos péptidos solo uno era mas fuertemente reconocido que el otro^{62, 111-113}.

La falta de respuesta en algunas pacientes contra el péptido 17 derivado de la matriz de influenza-A (GILGFVFTL), puede ser debido a que otros epítopes de la proteína M1 de influenza A pudieran ser de mayor relevancia en diferentes estratos o sectores de la población mexicana, a causa de posibles cambios en las secuencias de las variantes de este tipo¹¹⁴.

Lamentablemente, no se contó con la biopsia necesaria para el análisis del tipo de HPV infectante, en algunas pacientes, lo único que podemos hacer es presuponer el porque algunos ensayos las respuestas no son tan fuertes o son nulas, lo que creemos es algún tipo de reacción cruzada.

Esta respuesta cruzada puede deberse a que los HPV incluidos en este estudio no están tan alejados en el árbol filogenético del HPV; Así, el HPV16 pertenece a la familia A9 y el HPV39 pertenece a la familia A7, en la que también se encuentra el HPV18, con lo que presumimos que estas familias, al estar emparentadas pueden tener una respuesta cruzada. Comparando las secuencias de los péptidos en este estudio observamos que: El péptido 1 KLPQLCTEL y 4 KLPHLCTEL tienen una secuencia similar con el péptido KLPDLCTEL de la proteína E6 del HPV18. Es por esto que en algunos pacientes con HPV18 mostraron actividad contra los péptidos derivados de la proteína E6 del HPV16. Corroborando nuestra hipótesis sobre la respuesta cruzada en algunas pacientes.

Se realizaron un ensayos de proliferación y de citotoxicidad utilizando LSP estimulados con péptidos derivados de la VE y VAA, obtenidos de una misma paciente. En el ensayo de proliferación *in vitro* observamos que los dos pares homólogos son reconocidos, el par de péptidos homólogos 1 KLPQLCTEL y 4 KLPHLCTEL, el péptido 4 es 2.33 veces más reconocido que el péptido 1, el par de péptidos homólogos 3 KISEYRHYC y 5 KISEYRYYC, el péptido 5 es 1.08 veces más reconocido que el péptido 3. Por otro lado en el un ensayo de citotoxicidad sobre células T2. La citotoxicidad mostrada por el péptido 4 derivado VAA es mayor con respecto a su secuencia prototipo, no se encuentra citotoxicidad en el par de péptidos homólogos 3 y 5. Relacionando estos resultados con los obtenidos en la proliferación *in vitro*, se confirma la activación de los LSP y la citotoxicidad de los mismos con respecto al par homólogo 1 y 4 (KLPQLCTEL y KLPHLCTEL respectivamente), siendo el péptido 4 mucho más antigénico.

Con respecto de péptidos homólogos 3 KISEYRHYC y 5 KISEYRYYC, sí se encuentra un reconocimiento por los LSP mostrado por el índice de proliferación *in vitro*, pero no se encuentran citotoxicidad, puede ser debido a que hay muy pocas clonas que reconocieron a estos péptidos que al activarse secretan al medio citocinas como IL-2 para una estimulación autocrina o paracrina, pero que pudieron estimular a células vecinas de manera inespecífica, este fenómeno pudo ocurrir por la naturaleza genética de la paciente. Se puede concluir con estos datos que el péptido 4 es mucho más antigénico y que produce un número de alto de clonas capaces de reconocerlo, produciendo memoria inmunológica.

Para demostrar que efectivamente el péptido KLPHLCTEL derivado de VAA, era reconocido por los linfocitos T citotóxicos, por un efecto de memoria inmunológica, la biopsia fue secuenciada para comprobar la existencia de la variante en la biopsia, y así confirmar que la respuesta inmune obtenida se debía a una respuesta de memoria. El resultado indicó que efectivamente contenía ADN viral del HPV16 VAA, con lo que se puede reafirmar de que este péptido puede llegar a ser presentado³⁶.

Promediando los índices de proliferación de las 18 pacientes, se observa que el péptido 4 (KLPHLCTEL), derivado de la VAA es 1.59 veces más reconocido y que el péptido 1 (KLPQLCTEL), derivado de la VE, lo que le confiere al péptido 4 (KLPHLCTEL) mayor antigenicidad.

El péptido 5 (KISEYRYYC) derivado de VAA es 2.26 veces más reconocido y que el péptido 3 (KISEYRHYC), derivado de la VE, lo que le confiere al péptido 5 (KISEYRYYC) mayor antigenicidad. Por tanto la VAA es mucho más inmunogénica que la variante Europea de la proteína E6 de HPV16 confirmando lo reportado por Berumen⁴² 2001, Yamada³⁶ 1995, Casas⁶⁵ 1999. Lo anterior sugiere que el cambio de un aminoácido otorga diferencias antigénicas entre las variantes de las proteínas del HPV, además sólo un péptido ya sea de la variante Europea o Asiático-Americana es reconocido con mayor intensidad por el linfocito T citotóxico.

Datos interesantes provienen de los péptidos controles que se emplearon: el péptido 7, 17 y 38 (TLGIVCPIC, GILGFVFTL y YMLDLQPETT). Los péptidos 7 y 38 pueden ser usados como controles de memoria o ser estudiados para conocer su capacidad inmunogénica y citotóxica, y pueden ser empleados en vez del péptido 17, dado que no toda la población mexicana responde ante este péptido¹¹⁴. Tomando en cuenta esto, y observando los resultados, el péptido 7 es 58.82% reconocido por todas las pacientes, el péptido 17 es reconocido 44.44% y el péptido 38 es 58.82% reconocido por todas las pacientes estudiadas^{28, 115, 16}.

El codón de E6 de los residuos 10 y 14 muestran un reemplazo de aminoácidos en dos posiciones cada uno. Una posible explicación para la concentración de cambios puede ser un punto antigénico selectivo en la región. El HPV16 E6 puede ser un blanco selectivo de ambas respuestas humoral y celular¹¹⁶⁻¹¹⁹.

La relevancia inmunológica de la región de E6 amino terminal está fundamentada por la demostración de un procesamiento endógeno de péptidos restringidos a HLA-A0201 (KLPQLCTEL, de la proteína E6), similares al encontrado en el péptido 4 KLPHLCTEL derivado de la VAA, también como el solapamiento del péptido RPRKLPQL, también de la proteína E6, pero con especificidad al alelo HLA-B7^{116, 117}.

Con esto podemos sustentar que efectivamente para la paciente 13, sí se expresaba la proteína E6 de la VAA, y también que los resultados encontrados en algunas pacientes en las cuales respondían contra los dos péptidos homólogos, se debía posiblemente a que la respuesta inmune celular esté modificada por factores del huésped tal como la presentación de moléculas de HLA, proteínas virales como E6 y E7 o una combinación de ambos.

La causa de esta asociación puede ser explicada por las diferencias de la regulación de la transcripción del virus por diferentes variantes, en la actividad biológica de las proteínas codificantes de las variantes de HPV16 que intensifican la actividad transformante E6/E7, o la habilidad del huésped para generar una respuesta inmune contra epítopes específicos de la variante del virus. Esto último efecto mediado a través del antígeno leucocitario humano HLA presentando antígenos virales^{62, 111, 42, 117} es el que hemos observado en este trabajo.

Además, también se confirma que la variantes de HPV son más antigénicas, ya que aparte de su relación con el riesgo de carcinoma de células escamosas y sus precursores: lesiones de alto grado, en la cual se han observado un incremento de riesgo de padecer la enfermedad, asociada con variantes no-europeas de HPV16^{30, 42, 54-56}. También, se sabe que la presencia de variantes no-europeas en adenocarcinomas es del 75% que en carcinomas de células escamosas 47%.⁵⁷ Con esto se confirma la antigenicidad de las variantes.

En un estudio realizado con la subclase de la variante Europea, se encontró que la E-350G, resultante de un cambio de leucina por valina puede influenciar la respuesta por la presentación de los péptidos y/o su inmunogenicidad. Esto nos permite sugerir que con el cambio de un aminoácido la presentación y el reconocimiento son afectados¹²⁰.

Finalmente, observamos que el cambio de un aminoácido otorga diferencias antigénicas entre la VE y la VAA de la proteína E6 del HPV16, además sólo un péptido, ya sea de la VE o de la VAA, es reconocido con mayor intensidad por el linfocito T, revelando la importancia que tiene la variante Asiático-Americana, dado que, en México la VAA y la VE se encuentran en proporciones casi iguales. Además que los péptidos estudiados se encuentran expresados y mantienen LSP de memoria en estadios tempranos como NIC I, hasta estadios muy avanzados de la enfermedad, lo cual debe ser considerado en nuevos protocolos de inmunoterapia con el uso de epítomos adecuados del HPV a favor de estas pacientes infectados con algún tipo de HPV de las familias A9 y A7del árbol filogenético. Dentro de la familia A9 se encuentra el HPV16 y dentro de la familia A7 se encuentra el HPV18.

CONCLUSIONES.

Pacientes con cáncer cérvico-uterino (CaCu), mantienen linfocitos T CD8⁺ de memoria específicos contra péptidos antigénicos derivados de la proteína E6 del HPV16, en el contexto de HLA-A0201.

El péptido derivado de la variante Asiático-Americana (KISEYRYYC), induce la proliferación de LSP comparable con el efecto obtenido con el péptido control de influenza A. Su contraparte Europea (KISEYRHYC), no indujo una proliferación significativa de los LSP aun cuando sólo difieren de un aminoácido.

Un comportamiento semejante tiene el péptido de la variante Asiático-Americana de la proteína E6 del HPV16 (KLPFLCETL), que induce una proliferación mayor en los LSP que su contraparte Europea (KLPQLCTEL).

Lo anterior sugiere que el cambio de un aminoácido otorga diferencias antigénicas entre las variantes de las proteínas del HPV, además sólo un péptido, ya sea de la variante Europea o de la Asiático-Americana, es reconocido con mayor intensidad por el linfocito T.

La antigenicidad de los péptidos estudiados no está relacionada con la afinidad teórica o experimental por la molécula de HLA-A0201.

La capacidad de los péptidos analizados para generar una respuesta citotóxica *in vitro*, se encuentra en el péptido KLPFLCTEL derivado de la variante Asiático-Americana de la proteína E6 del HPV16.

Esto sugiere que la variante Asiático-Americana de la proteína E6 del HPV16, es mucho más inmunogénica que la variante Europea.

PERSPECTIVAS.

Es conveniente ampliar el número de muestras de pacientes HPV16⁺, HLA-A0201⁺, para corroborar el comportamiento de los péptidos variante Asiático-Americana y de la variante Europea de la proteína E6 del HPV16.

Asimismo sería conveniente contar con un grupo control de mujeres sanas, HLA-A0201⁺, comprobando la nula persistencia del HPV, mediante técnicas como: Papanicolaou, colposcopia, hibridación, etc.

Aumentar el número de ensayos de citotoxicidad, con lo que se pudiera corroborar lo encontrado en este proyecto de investigación.

BIBLIOGRAFÍA.

- 1) PAC. Programa de Actualización Continua para ginecología y obstetricia. Cáncer genital femenino 2002. www.drscope.com.
- 2) González – Merlo. Ginecología oncológica. 2°. Barcelona: Masson, S. A. (2000). p 1-19, 121-136, 141-168.
- 3) Koneman, M. D. Diagnostico microbiológico. Texto y atlas color. 5° ed. Buenos Aires: Panamericana, S, A; (1999). p 1186-1188.
- 4) Brooks G. F. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg 17° D.F. Manual Moderno, S. A.; (2002). p 399-413.
- 5) Torres – Cosme J. L., Tapia – Yañez J. R. Mortalidad por cáncer cérvico uterino en México: 1979 – 1999. Perinatol. Reprod. Hum. (2002); 16: 35-42
- 6) Henderson L. E. Three – dimensional model of HPV. The PRN notebook, vol 6 No. 6 September (2001). Physicians Research Network Inc. www.prn.org
- 7) González M, Lavidá MA, Puerto M. Molecular variation of HPV type 16 E6 among Mexican women with LSIL and invasive cancer. J Clin Virol (2004); 29: 95-98.
- 8) Howley PM. Papillomavirinae: The viruses and their replication. Fields virology 3° ed. Philadelphia: Lippincott-Raven. (1996). p 2045-2076.
- 9) Ferlay J, Bray F, Pisani P. Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, version 1.0. Lyon: IARC Press. IARC Cancer Base No. 5. (2001)
- 10) Muñoz N. HPV and cervical cancer. The epidemiology of cervical cancer and human papillomavirus. France: IARC Scientific (1992): 251-62.
- 11) Bosch FX, Lorincz A., Muñoz N. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. J. Clin. Pathol (2002); 55: 244-55
- 12) Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J. Pathol. (1999); 189: 12-9
- 13) Shiffman MH, Bauer HM, Hoover Rn. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes must cervical intraepithelial neoplasia. J Natl Cancer Inst. (1993); 85: 958-64.
- 14) Kjaer SK, vander Brule AJC, Bock JE. Human papillomavirus-the most significant risk determinant of cervical intraepithelial neoplasia. Int J Cancer (1996); 65: 601-6
- 15) Koutsky L, Holmes KK, Critchlow CW. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. N Engl J Med (1992); 327: 1272-78.
- 16) Zur Hausen H, Viruses in human cancers. Science (1991); 254: 1167-73.
- 17) Eluf J, Booth M, Muñoz N. Human papillomavirus and invasive cervical cancer in Brazil. Br. J. Cancer (1994); 69: 114-19.
- 18) The Merck manual [monograph on CD-ROM] 10°. Madrid: Harcourt, S. A. (1999)
- 19) Zehbe I, Voglino G, Delius H. Risk of cervical cancer and geographical variations of human papillomavirus 16 E6 polymorphisms. Lancet (1998); 352: 1441-2.
- 20) de Villiers EM, Human pathogenic papillomavirus type: an update. Current Top Micro & Immunol (1994); 186: 1-12.
- 21) de Villiers EM. Taxonomic classification of papillomaviruses. Papillomavirus Rep (2001); 12: 57-63.
- 22) Jacobs MV, de Roda AM, van der Brule AJC. Group-specific differentiation between high- and low-risk human papillomavirus genotypes by general primer-

- mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes. *J Clin Microbiol* (1995); 33: 901-5
- 23) van der Brule AJC, Pol R, Franssen-Daakmeijer N. GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. *J Clin Microbiol* (2002); 40: 779-87.
 - 24) Davies P, Komegay J, Iftner T. Current methods of testing for human papillomavirus. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* (2001); 15: 677-700.
 - 25) Gravitt PE, Peyton CL, Apple RJ. Genotyping of 27 human papillomavirus type by using L1 consensus PCR products by a single-hybridization, reverse line blot detection method. *J Clin Microbiol* (1998); 36: 3020-27.
 - 26) Roberts S, Ashmole I, Johnson GD. Cutaneous and mucosal human papillomavirus E4 proteins from interment filament-like structures in epithelial cells. *Virology* (1993); 197: 176-87.
 - 27) Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* (2003); 348: 518-26
 - 28) Bosch FX, Manos MM, Muñoz N. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer. A worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst* (1995); 87: 796-802.
 - 29) Eriksson A, Herron JR, Yamada T. Human papillomavirus type 16 variant lineages characterized by nucleotide sequence analysis of the E5 coding segment and the E2 hinge region. *J Gen Virol* (1999); 80: 595-600.
 - 30) Hildesheim A, Schiffman M, Bromley C. Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* (2001); 93: 315-18.
 - 31) Myers G, Lu H, Calef C. Heterogeneity of papillomaviruses. *Cancer Biol* (1996); 7: 349-58.
 - 32) Gravitt P. HPV: The ultimate cancer initiator? *HPV Today* (2003); 3: 1-4.
 - 33) Hubert WG, Laimins LA. The action of E6 and E7 of human papillomavirus in cellular immortalization and transformation. *Monogr Virol Basel Karger* (2001); 23: 44-63.
 - 34) Howley PM. Papillomavirinae: The viruses and their replication. *Fields virology* 3^o ed. Philadelphia: Lippincott-Raven. (1996). P 2045-2076.
 - 35) Laimins LA. Regulation of transcription and replication by human papillomavirus. *Washington: American Society for Microbiology* (1998) p 201-233.
 - 36) Yamada T, Wheeler CM, Halpern AL. Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States population characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments. *J Virol* (1995); 69: 7743-53.
 - 37) Doorbar J, Ely S, Sterling J. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* (1991); 352: 824-827.
 - 38) Ham J, Dostatni N, Gauthier JM. The papillomavirus E2 protein: a factor with many talents. *Trends Biochem Science* (1991); 16: 440-444.
 - 39) McBride AA, Romanczuk H, Howley PM. The papillomavirus E2 regulatory proteins. *J Biol Chem* (1991); 266: 18411-14.
 - 40) Pim D, Collins M, Banks L. Human papillomavirus type 16 E5 gene stimulate the transforming activity of the epidermal growth factor receptor. *Oncogene* (1992); 7: 27-32.

- 41) McBride A, Myers G. The E2 proteins. In human papillomavirus. A compilation and analysis of nucleic and amino acid sequence. Los Alamos National Laboratory (1996) p III 15-II 31.
- 42) Berumen J, Ordóñez R. S, Lazcano E. Asian – American variant of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J. Nat. Can. Inst.* (2001); 93: 1325-30.
- 43) Hildesheim A, Wang SS. Host and viral genetic and risk of cervical cancer: a review. *Virus Res* (2002); 89: 229-240.
- 44) Chan S, Ho L, Ong C. Molecular variants of human papillomavirus type 16 from four continents suggest ancient pandemic spread of the virus and its coevolution with humankind. *J Virol* (1992); 66: 2057-2066.
- 45) Bavin PJ, Walker PG, Emery VC. Sequence microheterogeneity in the long region control of clinical isolates of human papillomavirus type 16. *J Med Virol* (1993); 39: 267-272.
- 46) Ho L, Chang S, Burk R. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *J Virol.* (1993); 67: 6413-23.
- 47) Pushko P, Sasagawa T, Cusick J. Sequence variation in the capsid protein genes of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol* (1994); 75: 911-16.
- 48) Smits HL, Traanberg KF, Krul MR. Identification of an unique group of human papillomavirus type 16 sequence variants among clinical isolates from Barbados. *J Gen Virol* (1994); 75: 2457-62.
- 49) Ku JL, Kim WH, Park HS. Establishment and characterization of 12 uterine cervical carcinoma cell lines: common sequence variation in the E7 gene of HPV-16-positive cell lines. *Inter J Cancer* (1997);72: 313-20.
- 50) Terry G, Ho L, Cuzick J. Analysis of E2 amino acid variants of human papillomavirus type 16 and 18 and their associations with lesion grade and HLA DR/ DQ type. *Inter J Cancer* (1997); 73: 651-55.
- 51) Tornesello M, Buonaguro FM, Meglio A. Sequence variations and viral genomic state of human papillomavirus type 16 in penile carcinomas from Ugandan patients. *J Gen Virol* (1997); 78: 2199-208.
- 52) Londesborough P, Ho L, Terry G. Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities. *Int J Cancer* (1996); 69: 364-8.
- 53) Xi L, Demers GW, Koutsky LA. Analysis of human papillomavirus type 16 variants indicates establishment of persistence infection. *J Infect Dis* (1995); 172: 747-55.
- 54) Xi LF, Koutsky LA, Galloway DA. Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* (1997); 89: 796-802.
- 55) Villa LL, Sichero L, Rahal P. Molecular Variants of human papillomavirus type 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol* (2000); 81: 2959-68.
- 56) Matsumoto K, Yoshikawa H, Nikagawa S. Enhanced oncogenicity of human papillomavirus type 16 (HPV16) variants in Japanese population. *Cancer Lett* (2000); 156: 159-65.

- 57) Lizano M, Berumen J, Guido MC. Association between human papillomavirus type 18 variants and histopathology of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* (1997); 89: 1227-31
- 58) Hecht J, Kadash A, Jiang G. Genetic characterization of the human papillomavirus (HPV) 18 E2 gene in clinical specimens suggest the presence of a subtype with decreased oncogenic potential. *Int J Cancer* (1995); 60: 369-76.
- 59) Zehbe I, Wilander E, Delius H. Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res* (1998); 58: 829-33.
- 60) Yamada T, Manos M, Peto M. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol* (1997); 71: 2463-72.
- 61) Ordóñez RM, Espinosa AM, Sánchez DJ. Enhanced oncogenicity of Asian-American human papillomavirus 16 is associated with impaired E2 repression of E6/E7 oncogene transcription. *J Gen Virol* (2004); 85: 1433-44.
- 62) Stoppler MC, Ching K, Stoppler H. Natural variants of the human papillomavirus type 16 E6 protein differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation. *J Virol* (1996); 70: 6987-93.
- 63) DiPaolo JD, Popescu N, Alvarez L. Cellular and molecular alterations in human epithelial cells transformed by recombinant human papillomavirus DNA. *Crit Rev Oncog* (1993); 4:337-360.
- 64) Schwarz E, Freese UK, Gissmann L. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* (1985); 314:111-114.
- 65) Casas L, Galvan SC, Ordóñez RM. Asian-American variants of human papillomavirus type 16 have extensive mutation in the E2 gene and are highly amplified in cervical carcinomas.
- 66) Burk RD, Terai M, Gravitt PE. Distribution of Human papillomavirus type 16 and 18 variants in squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the cervix. *Cancer Res* (2003); 63: 7215-20.
- 67) Garrido F, Cabrera T, Concha A. Natural history of HLA expression during tumor development. *Immunol Today* (1993); 14: 491-99.
- 68) Groettrup M, Sosa A, Kuckelkorn U. Peptide antigen production by the proteasome: complex provides efficiency. *Immunol Today* (1996); 9: 429-35.
- 69) Benton C, Shahidullah H, Hunter J. Human papillomaviruses. *Papillomavirus Rep* (1992); 3: 23-26.
- 70) Tay SK, Jenkins D, Singer A. Natural killer cells in cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus infection. *Br J Obstet Gynaecol* (1987); 94: 901-906.
- 71) Fierlbeck G, Schiebel U, Muller C. Immunohistology of genital warts in different stages of regression after therapy with interferon. *Dermatologica* (1989); 179: 191-95.
- 72) Suzich JA, Ghim SJ, Palmer H. Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. *Proc Natl Acad Sci* (1995); 92: 1153-57.
- 73) Jensen KU, Rosolowsky M, Shultz LD. Vaccination with yeast-expressed cottontail rabbits from CRPV-induced papilloma formation. *Vaccine* (1995); 13: 1509-14.

- 74) Kimbauer R, Chandrachud LM, O'Neal BW. Virus-like particles of bovine papillomavirus type 4 in prophylactic and therapeutic immunization. *Virology* (1996); 219: 37-44.
- 75) Ghosh AK, Smith N, Stacey SN. Serological response to HPV-16 in cervical dysplasias and neoplasia: correlation of antibodies to E6 with cervical cancer. *Int J Cancer* (1993); 53: 591-96.
- 76) Steele JC, Stankovic T, Gallimore PH. Production and characterization of human proliferative T cell clones specific for human papillomavirus type 1 E4 protein. *J Virol* (1993); 67: 2799-806.
- 77) Chambers MA, Wei Z, Coleman N. Natural presentation of human papillomavirus type 16 E7 protein to immunocompetent mice result in antigen-specific sensitization or sustained unresponsiveness. *Eur J Immunol* (1994); 24: 738-45.
- 78) Gildlund M, Orn A, Pattengal PK. Natural killer cells kill tumour cells at a given stage of differentiation. *Nature* (1981); 292: 848.
- 79) Evans CH, Flugelman A, Dipaolo JA. Cytokine modulation of immune defenses in cervical cancer. *Oncology* (1993); 50: 245-51.
- 80) Banks L, Moreau F, Vousden K. Expression of the human papillomavirus E7 Oncogene during cell transformation is sufficient to induce susceptibility to lysis by activated macrophages. *J Immunol* (1991); 146: 2037-42.
- 81) Lehtinen M, Rantala I, Toivonen A. Depletion of langerhans cells in cervical HPV infection is associated with replication of the virus. *Apmis* (1993); 101: 833-37.
- 82) Barker JN, Milra RS, Griffiths CE. Keratinocytes as initiators of inflammation. *Lancet* (1991); 337: 211-14.
- 83) Ristow HJ. A major factor contributing to epidermal proliferation in inflammatory skin diseases appears to be interleukin-1 or a related protein. *Proc. Natl Acad Sci USA* (1987); 84: 1940-44.
- 84) Woodworth CD, Lichti U, Simpson S. Comparative lymphokine secretion by cultured normal human cervical keratinocytes, papillomavirus-immortalized, carcinoma cell lines. *Am J Pathol* (1993); 142: 1544-55.
- 85) Crowley P, Bell MC, Bull R. Cytokine expression by T cells isolated from cervical intraepithelial neoplasia lesion. 12th international papillomavirus conference. Abstracts book. (1993). p. 7
- 86) Woodworth CD, Lichti U, Simpson S. Leukoregulin and interferon gamma inhibit human papillomavirus type 16 gene transcription in human papillomavirus immortalized human cervical cells. *Cancer Res* (1992); 52: 456-63.
- 87) York IA, Rock KL. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* (1996); 14: 369-96.
- 88) Brodsky M. F., Lyeme E. The biology of antigen processing and presentation. *Annu. Rev. Immunol.* (1991); 9: 707-44.
- 89) Bjorkman P. J., Saper M. A. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA – A2. *Nature* (1987); 329: 506-12.
- 90) Janeway C. A. jr. *Inmunobiología*. 4^o ed. Barcelona. Masson, S. A; (2000) p.115-159.
- 91) Goldberg A. L., Rock K. L. Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature* (1992); 357: 375-379.
- 92) Orlowski M., Cardozo C. Evidence for the presence of five distinct proteolytic components in the pituitary multicatalytic components cleaving bonds on the

- carboxyl side of branched chain and small neutral amino acids. *Biochemistry* (1993); 32: 1563-73.
- 93) Niederman G., Butz S. Contribution of proteasome mediated proteolysis to the hierarchy of epitopes presented by major histocompatibility complex class I molecules. *Immunity*. (1995); 2: 289-99.
 - 94) Deveraux Q., Ustrell V. A 26S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *J. Biol. Chem.* (1994); 269: 7059-61.
 - 95) Tanaka K, Tanahashi N, Tsurumi CH. Proteasomes and antigen processing. *Adv Immunol* (1997); 64: 1-38.
 - 96) Trowsdale J, Hanson I, Mockridge I. Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the ABC superfamily of transporter. *Nature* (1990); 348: 741-44
 - 97) Howard J. C. Supply and transport of peptides presented by class I MHC molecules. *Curr. Opin. Immunol* (1995); 7: 69-76.
 - 98) Sugita M., Jackman R. M. Cytoplasmic tail – dependent localization of CD1b antigen presenting molecules to MHCs. *Science* (1996); 273: 349-52.
 - 99) Noessner E., Parham P. Species – specific differences in chaperone interaction of human and mouse histocompatibility complex class I molecules. *J. Exp. Med.* (1995); 181: 327-37.
 - 100) Ortmann B., Copeman J. A critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I – TAP complexes. *Science* (1997); 277: 1306-9.
 - 101) Uebel S., Meyer T. H. Requirements for peptide binding to the human transporter associated with antigen processing related by peptide scans and complex peptide libraries. *J. Biol. Chem.* (1995); 270: 18512-16.
 - 102) Rammensee HG, Stefan STF, MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* (1995); 41: 178-228.
 - 103) de Leo C, Catelan N, López M. HLA class I and class II alleles and haplotypes in Mexican mestizos established from serological typing of 50 families. *Hum Biol* (1997); 69: 809-18.
 - 104) Silva B, Vargas G, Zuñiga R. Genetic features of mexican women predisposing to cancer of the uterine cervix. *Human Pathol.* (1999); 30: 626-28.
 - 105) Weckman A, Granados J, Cardiel M. Immunogenetics of mixed connective tissue disease in a Mexican mestizo population. *Clin Exp Rheum.* (1999); 17: 91-4.
 - 106) Kast WM, Brandt R, Sidney J. Role of HLA-A motifs in identification of potential CTL epitopes in human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins. *J Immunol* (1994); 152: 3904-12.
 - 107) Alexander M, Salgaller ML, Celis ESA. Generation of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes from peripheral blood of cervical cancer patients by in vitro stimulation with a synthetic human papillomavirus type 16 E7 epitope. *Am J Obstet Gynecol* (1996); 175: 1586-93.
 - 108) Bosch FX, Muñoz N, de Sanjose S. Human papillomavirus and other risk factors for cervical cancer. *Biomed & Pharma* (1997); 51: 268-275.
 - 109) Da Silva DM, Elben GL, Fausch SC. Cervical cancer vaccines: emerging concepts and developments. *J Cell Phy* (2001); 186: 169-82.
 - 110) Galloway DA. Papillomavirus vaccines in clinical trials. *Reviews. The Lancet* (2003); 3: 469-75.

- 111) Veress G, Szarka K, Dong XP. Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol* (2000); 80: 1035-43.
- 112) Park JS, Hwang ES, Lee CJ. Mutational and functional analysis of HPV-16 URR derived from Korean cervical neoplasia. *Gynecol Oncol* (2000); 74: 23-9.
- 113) Ellis JR, Keating PJ, Baird J. The association of an HPV16 oncogene variant with HLA-B7 has implications for vaccine design in cervical cancer. *Nature (Medicine)* (1995); 1: 464-70.
- 114) Acosta-Araujo Arturo. Identificación de péptidos antigénicos de la proteína L1 de HPV-16 y 18 para los alelos HLA-A y B de pacientes con cáncer cérvico-uterino. D. F: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM; (2002) p 72-77. Tesis de licenciatura.
- 115) Münger K, Phelps WC, Bubb V. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol* (1989); 63: 4417-21.
- 116) Bartholomew JS, Stacey SN, Coles B. Identification of a naturally processed HLA A02011-restricted viral peptide from cells expressing human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *Eur J Immunol* (1994); 24: 3175-3179.
- 117) Ellis JR, Etherington I, Galloway D. Antibody response to HPV16 virus-like particles in women with cervical intraepithelial neoplasia infected with a variant HPV16. *Lancet* (1997); 349: 1069-70.
- 118) Stacey SN, Eklund C, Jordan D. Scanning the structure and antigenicity of HPV 16 E6 and E7 oncoproteins using anti-peptide antibodies. *Oncogene* (1994); 9: 635-45.
- 119) Viscidi RP, Sun Y, Tsuzaki B. Serologic response in human papillomavirus-associated invasive cervical cancer. *Int J Cancer* (1993); 55: 780-84.
- 120) Brady CS, Duggan MF, Davidson JA. Human papillomavirus type 16 E6 variants in cervical carcinoma: relationship to host genetic factors and clinical parameters. *J Gen Virol* (1999); 80: 3233-40.