



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**Análisis de la expresión de las moléculas
co-estimuladoras de la familia B7 en líneas celulares
derivadas de carcinoma cérvico-uterino**

Que presenta

VANIA LORENA GÓMEZ ROMERO

Para obtener el título de

BIOLOGO

Director de Tesis

Dr. José Efraín Garrido Guerrero

Asesores

Dr. Diego Julio Arenas Aranda

Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdes

M. en C. Irma Elena Dueñas García

M. en C. Laura Castañeda Partida



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.

Este trabajo se desarrolló en el laboratorio No. 1 del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN, bajo la dirección del Dr. José Efraín Garrido Guerrero y con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), mediante los fondos del proyecto 47244.

 Agradezco principalmente al DR. JOSÉ EFRAÍN GARRIDO GUERRERO por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo durante estos años y permitió la realización de este trabajo. Dr. Garrido gracias por su confianza, apoyo y firmeza... por todo y por los gratos momentos que vivimos en el laboratorio y por darme la oportunidad.

A la M. en C. Laura Castañeda y la M. en C. Irma Dueñas junto con el Dr. Luis Terrazas y el Dr. Diego Arenas por sus comentarios y aportaciones que sirvieron para la elaboración de este escrito, gracias por su tiempo y dedicación.

 Al Biol. PEDRO CHÁVEZ, gracias por todo. No solo por la paciencia y el sabio consejo de las pipetas; realmente gracias por todo...todo el apoyo que me brindaste, gracias por compartir conmigo tus conocimientos y por tus enseñanzas pero más que nada te doy las gracias por ser mi amigo. Definitivamente recibí una formación integral y espero seguir aprendiendo más... MUCHAS GRACIAS.

A la M. en C. ÁNGELES ROMERO TLALOLINI que en conjunto, me ayudó y aconsejó durante el desarrollo de este trabajo, sin ti hubiera sido más complicado... gracias por tu dedicación y preocupación hacia mi persona y trabajo, por todos esos momentos de alegría y sonrisas que nos regalaste, Angie... eres auténtica!!!

 A mis compañeros de trabajo pero más que nada a los amigos que descubrí, que después de compartir días y noches trabajando (bueno y de vez en cuando en el coffee brake), a

los que se convirtieron en mi familia, con los que reí y lloré (tanto de desesperación como de risa) y me aguantaron, MIL GRACIAS, los quiero mucho Angeles, Ekatherina, Eric, Jairo, Karen, Pedro. ¡Chicos son únicos y grandiosos!

Los verdaderos amigos son un tesoro invaluable, cuando los encuentres: cuídalos, protégelos y no los dejes ir, porque un amigo verdadero es como un hermano.

 A mis amigos, a mi gran tesoro, a mi familia, a Maru, Eka, Karen, Angie, Jairo, Peter, Lugui, Susan, Pierre, Miriam, Fer, Karussa, Cynthia, Pepe, Ivan, Carlos, Alonso, Alinne,... Ustedes me han enseñado que la amistad sincera existe. Porque me han visto llorar, gritar, caer, equivocarse, tropezar, y mil cosas más. Porque cuando he querido rendirme, han estado para evitarlo. Me siento muy afortunada y agradecida con la vida por tenerlos cerca, gracias por todo, los quiero muchísimo y definitivamente sin ustedes no lo habría logrado... ¡iiiiii GRACIAS !!!!!

A mis amigos y compañeros de clases, prácticas y demás.... Por que ustedes le dieron la gracia y sin ustedes no hubiera sido tan divertido Julieta, Carlos, Valerio, Eric, Omar, Abraham, Roman, Carmen, Edmundo, Angélica... a todos, que tengan mucho éxito.

 A mi familia... a Juan RT, Reyna, Leticia, Javier, Chayo, Irene a Mario, a Feli... a todos porque sin ustedes, no lo habría logrado, por su apoyo incondicional desde el principio. Porque me han enseñado que la unión y el cariño es lo que hace a una familia fuerte, gracias por todo su apoyo y por cuidarme, los quiero y soy muy feliz porque forman parte de mi vida.

A mi madre y padre por su amor y cariño, porque sin su sacrificio, no estaría aquí. No tengo palabras suficientes para agradecerles todo lo que han hecho por mí, porque a pesar de todo han estado a mi lado, me han ayudado, porque a pesar de todos los momentos que nos han marcado, de la distancia y la dificultad, seguimos juntos. Gracias, los amo mucho.

 A MaFer porque cuando lo necesite extendiste tu mano para no dejarme caer y al igual que tu sabes que estaré aquí, nunca te sientas sola porque yo estaré... toma mi mano y todo estará bien, te adoro pequeña... hermana eres la mejor.

Gracias a las mantas Karen, Angie y Eka... por todo... las quiero niñas. Gracias por estar aquí, por esos consejos y por esos excelentes momentos!!!

Karussa... ser mas que familia, más que una prima o una hermana, por mi gran amiga...

Maru... por ser mas que una excelente amiga, por ser como una hermana....

Susana... una excelente amiga, leal y luchadora, siempre estaré agradecida por todo...

Pierre... por estar siempre cerca, cuidarme, por ser leal y ser mi amigo por siempre...

Luigui... por ser un amigo honesto, por cuidarme... por ser un gran amigo...

Cynthia... por todos esos momentos de felicidad, eres un ejemplo a seguir...

Eka... por ser maravillosa, por se una amiga franca y sincera....

Jairo... por ser sensible, honesto y amable...por ser un amigo sincero...

Karen... por ser tan tierna y dulce, gracias por todo tu apoyo, te extraño!

Miriam...porque cuando mi vida cambio, fuiste la primera en tender una mano amiga...

A todos mis amigos, que de una forma u otra han estado cerca...GRACIAS

A mis angelitos en el cielo... a mis abuelos...

Dante... a ti amigo...a ti amor, que en una noche con la luna de testigo hiciste que todo cambiara. Gracias por estar aquí, por tomar de mi mano y devolverme la fe, la confianza y la esperanza. Gracias por ser tu... el que esta a mi lado, por tu apoyo y tu cariño, te QUIERO... te ADORO!!!

Abuelo Juan porque vives en mi corazón, muchas gracias por todo tu apoyo, sin ti no lo habría logrado...te quiero!!

= eL mOMENTO dE sER fÉLICES... eS aHORA =

INDICE

| | |
|--|-----|
| <u>AGRADECIMIENTOS</u> | I |
| <u>DEDICATORIA</u> | II |
| <u>RESUMEN</u> | III |
| <u>INTRODUCCIÓN</u> | |
| Cáncer | 2 |
| • Cáncer cérvico-uterino | 2 |
| • Características del epitelio cervical | 4 |
| Virus del Papiloma Humano | 6 |
| • Clasificación clínica | 6 |
| • Características moleculares | 7 |
| • Ciclo Replicativo de HPV | 9 |
| Sistema Inmune | 13 |
| • El cáncer y la respuesta inmune | 13 |
| ○ Antígenos relacionados con tumores | 13 |
| • Respuesta Inmune | 14 |
| ○ Inmunidad Innata | 15 |
| ○ Inmunidad Adquirida | 15 |
| ○ Inducción de respuesta Inmune Adquirida | 18 |
| • Respuesta Humoral | 18 |
| ○ Regulación de la Respuesta Humoral | 19 |
| • Respuesta Celular | 19 |
| ○ Regulación de la Respuesta Celular | 20 |
| • Proteínas co-estimuladoras | 20 |
| ○ Proteínas B7.1 y B7.2 | 22 |
| ○ Proteínas B7.H1 y B7.H2 | 24 |
| ○ Proteínas co-estimuladoras y su relación con el cáncer | 26 |
| Antecedentes Directos | 28 |
| Justificación | 30 |
| Hipótesis | 31 |

| | |
|------------------------------------|----|
| Objetivos | 33 |
| <u>METODOLOGÍA</u> | |
| Extracción de RNA | 36 |
| • Tratamiento con DNAsa | 37 |
| Síntesis de cDNA | 37 |
| RT-PCR | 38 |
| Extracción de Proteínas | 39 |
| Western blot | 40 |
| Proteína de fusión GST-B7.2 | 43 |
| • Clonación de B7.2 | 44 |
| • Transformación celular | 45 |
| • Extracción de plásmido | 46 |
| • Clonación de pGEX-4T-1 | 46 |
| • Desfosforilación y Ligación | 47 |
| • Construcción pGEX-4T-1-B7.2 | 48 |
| • Secuenciación | 50 |
| • Inducción de GST-B7.2 | 50 |
| ○ Cinética de inducción | 51 |
| ○ Extracción de proteína de fusión | 52 |
| <u>RESULTADOS</u> | |
| Extracción de RNA | 54 |
| Síntesis de cDNA | 54 |
| RT-PCR | 54 |
| Cuantificación de proteínas | 59 |
| Western blot | 59 |
| <u>DISCUSIÓN</u> | 67 |
| <u>CONCLUSIONES</u> | 73 |
| INDICE DE FIGURAS | 76 |
| INDICE DE TABLAS | 77 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS | 78 |

El cáncer cérvico-uterino (CaCU) es un problema de salud ya que es la principal causa de muerte de mujeres por tumores en México. Este padecimiento está relacionado con el estilo de vida y de manera muy importante con la presencia del virus del papiloma humano (HPV), que infecta las células basales del estrato germinativo del epitelio cervical, provocando cambios diversos en el arreglo celular, conocidos como lesiones premalignas (clasificadas como lesiones de bajo (LSIL) y de alto grado (HSIL)), cuya progresión puede generar el CaCU.

El desarrollo del CaCU depende del tipo viral y su capacidad transformante, la carga viral y la predisposición genética del hospedero así como la eficiencia de su sistema inmunológico para eliminar al virus. Aún se desconoce la razón exacta por la cual en algunos casos la infección es revertida y en otros progresa, aunque es probable que el sistema inmunológico juegue un papel importante en la eliminación del virus, evitando infecciones recurrentes y deteniendo así el proceso carcinogénico.

Para que las células efectoras del Sistema Inmune puedan ejercer su función apropiadamente sobre las células ya sea infectadas ó alteradas en sus funciones (tumores, por ejemplo), es necesario que sean eficientemente activadas. En el caso de los linfocitos T, la activación requiere de una primera señal antígeno-específica que se genera por la interacción del antígeno acoplado a moléculas del MHC en una Célula Presentadora de Antígeno (APC), y el receptor de la célula T (TCR). La segunda señal es inespecífica y se conoce como señal de co-estimulación; en ella participan distintas proteínas que pertenecen a la familia B7. Estas proteínas son principalmente B7.1 (CD80), B7.2 (CD86), B7.H1 y B7.H2 que se encuentran en las APCs generando la señal tras su interacción con los receptores CD28 y CTLA-4 presentes en las células T. Esta interacción regula la activación y proliferación de las células T acentuando sus funciones efectoras o bien llevándolas a anergia, cuando no se genera adecuadamente esta señal.

Se ha detectado la molécula B7.2 en la membrana de las células del estrato espinoso del epitelio cervical normal y su presencia en tejido cervical proveniente de lesiones premalignas con HPV16, se ve disminuida a nivel proteico y de mRNA, sugiriendo un mecanismo de regulación negativa de la transcripción de este gen.

En este trabajo se analizó la presencia de las proteínas co-estimuladoras B7.1, B7.2, B7.H1 y B7.H2 (por Western blot, utilizando anticuerpos específicos) y de sus correspondientes mRNAs (mediante RT-PCR), en líneas celulares derivadas de carcinoma cervical que poseen el genoma de HPV (SiHa, CaSki y HeLa) y en otras del mismo origen donde el genoma de HPV está ausente (C-33A), para así evaluar la posible relación entre la presencia ó ausencia de HPV y alguna modificación en la expresión de las mismas. Los resultados indican que la gran mayoría de las líneas celulares provenientes de CaCU expresan las moléculas B7.H1 y B7.H2, al menos a nivel de mRNA, mientras que B7.1 y B7.2 parecerían ser afectadas a nivel transcripcional por la presencia del genoma de HPV.

Resumen

Cáncer

Las primeras evidencias registradas de pacientes con cáncer fueron alrededor del año 1600 a.C. en Egipto. Posteriormente en la antigua Grecia, Hipócrates aplicó por primera vez el término carcinoma para referirse al cáncer, por su semejanza morfológica con los cangrejos (*Karkinoma*, cangrejo). Desde entonces el estudio sobre el cáncer se ha desarrollado ininterrumpidamente. La idea de que el cáncer ocurre como consecuencia del desarreglo del sistema inmunitario ha prevalecido desde hace más de 100 años y las primeras evidencias sobre la existencia de antígenos específicos de tumor surgieron a finales de la década de 1920.

Se calcula que el cuerpo de un individuo está formado por poco más de 300 distintos tipos celulares que se encuentran organizadas adecuadamente y mantienen estables sus características morfológicas y fisiológicas gracias a la operación de diversos mecanismos de regulación que finalmente favorecen el equilibrio del individuo. Cuando algún mecanismo de regulación se altera se ve afectada la actividad genómica y el equilibrio celular.

Las células cancerosas presentan en conjunto alteraciones como modificaciones de tamaño, forma y apariencia, aberraciones cromosómicas, mutaciones y muchos cambios citopatológicos bien definidos que nos permiten diferenciarlas de las células normales. Los cambios que presentan las células se ven reflejados en la síntesis de proteínas que al estar alterados los genes responsables de la síntesis de las mismas y no haber sido detectada, esta o estas alteraciones provocan que se generen cantidades anormales de proteínas normales o anormales sin actividad fisiológica definida. Este funcionamiento anormal de los genes es lo que caracteriza a las células cancerosas y la base de todas las alteraciones que pueden llegar a sufrir (Rojas Espinosa, 2006).

- **Cáncer cérvico-uterino**

Existen algunos virus relacionados con el desarrollo de cáncer, como es el caso del Virus del Papiloma Humano (HPV). Estos virus han sido denominados oncogénicos por su capacidad transformante debido a los oncogenes (ejemplo, E6 y E7) que portan (aunque hay sus excepciones). Los oncogenes son genes promotores del crecimiento celular, cuando se desregulan, éstos tienen una acción que predomina sobre la actividad del resto de los oncogenes virales. La actividad de los oncogenes normalmente está regulada por la acción de otros genes llamados anti-oncogenes o genes supresores de tumores (ejemplo p53). Cuando los anti-oncogenes son inactivados por ruptura o por mutación, los oncogenes se sobreactivan y las células normales se transforman en células cancerosas.

La Organización Mundial de la Salud calcula que actualmente hay más de dos millones de mujeres en el mundo que lo padecen. Cada año, se diagnostican alrededor de 490,000 nuevos casos de cáncer cérvico-uterino, esto significa más de 1,350 casos nuevos por día. De acuerdo con la misma fuente, cerca de 650 mujeres en todo el mundo morirán diariamente a causa de este tipo de

cáncer. Además actualmente es la primera causa de muerte en la mayoría de los países latinoamericanos donde ocurre el 80% de los casos.

En México el CaCU es la causa de fallecimiento anual de tres mil mujeres, este índice varía de acuerdo a las diversas zonas de nuestro país, siendo poblaciones como Morelos, Yucatán, Colima, Michoacán y Nayarit las que presentan las tasas de mortandad más altas debido a la falta de atención médica.

Estudios epidemiológicos han demostrado que el cáncer cérvico-uterino (CaCU) es una enfermedad multifactorial causada, aunque no exclusivamente, por el agente infeccioso transmitido por vía sexual conocido como Virus del Papiloma Humano (HPV, por sus siglas en inglés), siendo la principal Enfermedad de Transmisión Sexual a nivel mundial (Zur Hausen, y otros, 1994). Actualmente el CaCU es de las principales causas de mortandad femenina a nivel mundial, siendo el segundo tipo de cáncer que afecta a la mujer con mayor frecuencia en todo el mundo después del cáncer de mama.

El CaCU es una enfermedad que suele progresar lentamente donde existen alteraciones moleculares y celulares en el epitelio cervical. El factor esencial en el desarrollo de cáncer cérvico-uterino es la presencia del HPV; sin embargo, factores del estilo de vida de las mujeres influyen en el desarrollo del CaCU como: la conducta sexual que se considera de los principales factores de riesgo, el iniciar una vida sexual a temprana edad y tener múltiples parejas sexuales aumenta el riesgo de contraer una infección por HPV, múltiples embarazos, el consumo de tabaco, al igual que el uso prolongado de anticonceptivos orales, entre otros (Moscicki, 2004).

Es importante mencionar que la mayoría de las lesiones se inician en la zona de transición (ZT) del epitelio simple del endocérnix al epitelio estratificado del exocérnix (**Figura 1**) en donde clínicamente ocurren las infecciones (Woodworth, y otros, 1993).

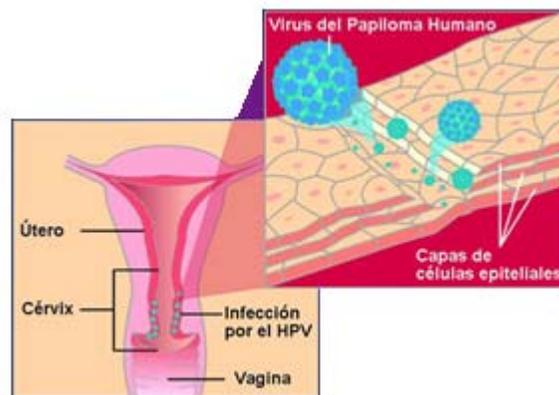


Figura 1 Zona de infección por HPV

El virus tiene la capacidad de penetrar por medio de microlesiones en la zona de transición (ZT) del epitelio cervical, esta zona se encuentra en el canal cervical donde las células llevan a cabo un proceso de transformación (Tomado y modificado de *National Cancer Institute*).

La infección por HPV se lleva a cabo en la zona de transición que es donde se une el canal cervical con la cara externa del mismo, donde se pueden formar microlesiones que puede aprovechar el HPV para integrarse al tejido y posteriormente producir una infección. Los epitelios que recubren la vagina, el cérvix, endocérvix y el endometrio, están conformados por varias capas celulares que en la capa superior normalmente se descaman o exfolian.

- **Características del epitelio cervical**

El epitelio cervical esta conformado por varias capas como el epitelio plano estratificado también conocido como pavimentoso poliestratificado no queratinizante; recubre toda la vagina y el exocérvix hasta la zona de conjugación escamocolumnar (límite con el endocérvix) y tiene la función de protección. Se han demostrado que todas las células poseen diferente tipos de queratina. Desde el punto de vista histológico, distinguimos cuatro capas, que van de la más profunda hacia la superficie y son:

| DENOMINACIÓN HISTOLÓGICA | DENOMINACIÓN CITOLÓGICA |
|-------------------------------------|-------------------------|
| Estrato germinativo | Células basales |
| Estrato espinoso profundo | Células parabasales |
| Estrato espinoso superficial | Células intermedias |
| Estrato córneo | Células superficiales |

El estrato espinoso profundo puede ser referido como estrato espinoso solamente, mientras que el estrato espinoso superficial también se conoce como estrato granuloso y a la capa más profunda o estrato germinativo también se denomina estrato basal, y es aquí donde se encuentran las células blanco para HPV.

Células basales: habitualmente no descaman, en este nivel se inicia la maduración del epitelio. Son células pequeñas de 8-10 μ , con citoplasma muy denso, escaso y núcleo grande con cromatina granular gruesa; hay distribución uniforme y relación núcleo-citoplasma 1:1. Presentan queratina (K) 5 y 8.

Células parabasales: células pequeñas de 12-30 μ , redondeadas u ovals, de citoplasma denso, cianófilo, núcleo con cromatina granular gruesa, pero uniforme en distribución. Relación núcleo-citoplasma es de 5:10. Presentan queratina (K) 5 y 8.

Células intermedias: células redondeadas o poligonales de 30-60 μ , con citoplasma hialino, transparente, habitualmente cianófilo, contienen glucógeno (el cual se tiñe de amarillo en la práctica del Papanicolaou), el núcleo es ovoide, de aspecto vesicular de 6 μ o más, la cromatina es muy fina y granular, la relación núcleo-citoplasma es de 1:20. Pueden encontrarse plegadas o extendidas. Presentan queratina (K) 4 y 14.

Células superficiales: células poligonales de 30-60 μ , con citoplasma hialino y rico en eleidina; antecesor de la queratina. Poseen un núcleo picnótico, menor de 6 μ , donde no se advierte ninguna estructura, la relación núcleo-citoplasma es semejante a las anteriores. Pueden

encontrarse plegadas o extendidas. Presentan queratina (K) 4 y 14, siendo esta última el componente principal del citoesqueleto y puede transformarse en otro tipo de queratinas (en algunos procesos patológicos), éste hecho explica porque el epitelio cérvico-vaginal puede “escamarse”.

El epitelio que recubre el endocérvix, es un epitelio cilíndrico o columnar, cuyas células se encuentran dispuestas perpendicularmente a la superficie de inserción. En éste, la regeneración se lleva a cabo por las células de reserva que se encuentran por debajo de él. Con una vista de arriba-abajo o a la inversa se aprecian como un “panal de abejas” con los núcleos en posición central, rodeados de citoplasma, ligeramente hexagonal. Tanto las células columnares como las de reserva, también poseen diferentes tipos de queratina como K 5, 7, 8, 17, 18 y 19 las que tienen diferente expresión en los procesos patológicos (Figura 2).

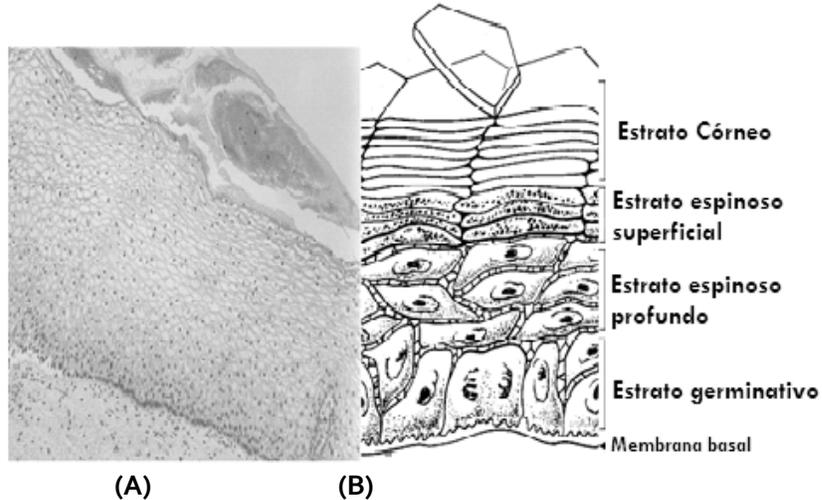


Figura 2 Organización del epitelio cervical

Se muestra un corte histológico del epitelio cervical normal (A) donde se logran observar las distintas capas y se muestra un esquema (B) demostrativo de los estratos del epitelio cervical.

La infección con HPV puede asociarse al CaCU y sus lesiones precursoras denominadas lesiones intraepiteliales escamosas o **SIL** (por sus siglas en inglés *Squamous Intraepithelial Lesion*; de acuerdo al sistema de clasificación Bethesda en 1988; Manos, y otros, 1999), las cuales se caracterizan por la invasión de células no diferenciadas, inmortalizadas y quizá transformadas dentro de los estratos del epitelio. Estas células inmortalizadas muestran cambios celulares asociados a una infección por HPV como, cambios en la relación núcleo-citoplasma de las células, hiper cromatización del núcleo, células binucleadas, cambios en la citoarquitectura, presencia de cuerpos mitóticos y de coilocitos. Las lesiones escamosas se dividen en dos grupos, lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (**LSIL**), que incluyen lesiones donde las células indiferenciadas e inmortalizadas invaden el primer tercio del epitelio, asociadas generalmente a la presencia del virus. Comprenden las lesiones consideradas como displasias leves o NICI (Neoplasia Intraepitelial Cervical I; Matsuda, 1998). Las lesiones de alto grado (**HSIL**) presentan células indiferenciadas e inmortalizadas en dos tercios o en el epitelio completo, las lesiones HSIL se han clasificado como displasias moderadas o NICII y NICIII. En las lesiones intraepiteliales se ha encontrado genoma viral en el 29-75 % de los casos de lesiones LSIL, en el 90 % de los casos de HSIL y en el 99.8 % de los carcinomas escamosos (Syrjänen 1999; Sun, y otros 2002).

Virus del Papiloma Humano

Debido a la incidencia del HPV y su actividad relacionada con el desarrollo del CaCU es considerado un factor principal para el padecimiento. Las células cervicales anormales pueden generarse por diversas causas, pero la principal es la presencia de HPV. El Virus del Papiloma Humano (HPV, por sus siglas en inglés), o Papilomavirus, es un grupo compuesto por más de 120 tipos de virus que pertenecen a la familia de Papillomaviridae. Los HPVs están asociados a distintos epitelios. Éstos se han organizado en dos grandes grupos de clasificación que son el grupo Alfa (α) y el Beta (β) de Papilomavirus (Doorbar, 2006).

Los Beta Papilomavirus están asociados principalmente a infecciones cutáneas; mientras que el grupo de Alfa Papilomavirus es el grupo más extenso y contiene los HPV que infectan mucosas y zonas ano-genitales, aunque también se encuentran algunos que provocan infecciones cutáneas. En éste último, se agrupan aquellos que están relacionados con el desarrollo de CaCU (**Figura 3**).

- **Clasificación clínica**

Existen más de 30 HPVs que afectan el área genital y se conocen como HPV genitales, y algunos tipos se han relacionado con el desarrollo de cáncer cérvico-uterino (Doorbar, 2006). Los virus se han clasificado en dos grandes grupos de acuerdo a su importancia médica relacionada con la capacidad y relación (presencia) que tienen de causar cáncer:

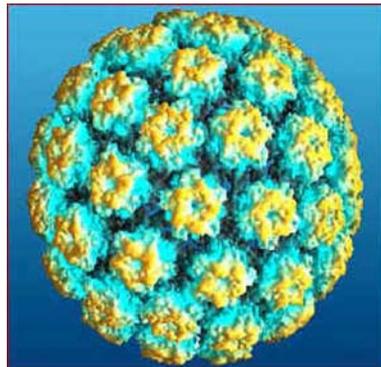


Figura 3 Virus del Papiloma Humano o HPV

Estructura general de HPV (Tomado y modificado de London Health Sciences Center, Infection, Prevention and Control)

HPV de Bajo Riesgo: hace referencia a los tipos virales cuya capacidad oncogénica es baja y por tanto el riesgo de provocar cáncer es bajo. Dentro de esta clasificación encontramos virus como los tipos 6, 11, 40, 42, 53, 54, 57 entre otros. Pueden causar cambios leves en el cuello del útero sin conducir al cáncer y suelen desaparecer con el tiempo; siendo lesiones no persistentes (el genoma

viral se mantiene de manera episomal). Por ejemplo, provocan la mayoría de las verrugas genitales o condilomas acuminados. La proporción de transmisión de las verrugas genitales a la pareja sexual es de entre el 1-2% de los jóvenes adultos con un periodo de incubación después de la exposición en promedio de tres meses, con un intervalo de tres semanas a ocho meses (Arredondo, 2003).

HPV de Alto Riesgo: son aquellos virus que se encuentran con mayor frecuencia asociados en los casos de cáncer cérvico-uterino e incluyen los tipos 16; 18, 31, 35, 39, 45, 51, 52, 56 y 59; siendo este último el más frecuente en el sureste mexicano y Centroamérica. De estos tipos el HPV 16 que se encuentra en una proporción aproximada del 50% en los casos de CaCU y el 18 en segundo lugar de frecuencia, son los más importantes a nivel mundial dado que se encuentran vinculados al cáncer cérvico-uterino. En análisis de tejido de cáncer cérvico-uterino se ha mostrado cierta correlación entre el grado de lesión y la alta concentración de este tipo de virus (HPV-16 o HPV-18), lo cual indica que la infección por este tipo de virus puede provocar cambios celulares que pueden conducir al cáncer si no son tratados. Sólo la infección persistente de HPV de alto riesgo (aquella que no desaparece durante años) aumenta el riesgo de cáncer; esto se caracteriza por la integración del genoma viral en la célula (Arredondo, 2003).

- **Características moleculares**

El genoma está compuesto de una cadena doble de DNA, con un peso molecular promedio de 5×10^6 daltons y no presentan envoltura. El genoma mide aproximadamente 8000pb (8kb) y se encuentra superenrollado covalentemente cerrado, con una cápside icosaédrica compuesta de una proteína estructural mayor y una menor.

A pesar de la homología entre los virus llegan a presentar diferencias importantes en regiones codificantes para las proteínas con capacidad oncogénica como E6 y E7 entre los distintos tipos, lo que les ha conferido una mayor capacidad transformante. Además se ha logrado identificar que el mismo tipo viral puede presentar variantes y entre las mismas tener diferencia entre la eficacia transformante, como el caso de HPV16 y sus variantes HPV16AAc (asiático-americana) y HPV16E (europea), siendo más frecuente la primera (**Figura 4**).

Son huésped-específicos y poseen la habilidad de infectar y transformar células epiteliales. El genoma se encuentra organizado en tres grandes regiones, dos regiones codificadoras de proteínas, las regiones: temprana (E) y tardía (L) y una región reguladora no codificadora (Doorbar, 2006).

Región temprana (E): esta conformada por seis marcos abiertos de lectura (*Open Reading Frame* u ORF, por sus siglas en inglés) designados como genes tempranos o "early" como E1, E2, E4, E5, E6, E7. E1 y E2 y son necesarios para la replicación viral, esta última actúa como activador de transcripción de las regiones tempranas. Las proteínas virales codificadas por los oncogenes E6 y E7, son críticas para la transformación e inmortalización celular por su habilidad para unirse e inactivar a las proteínas p53 y Rb de las células del huésped. Se conoce que las proteínas p53 y Rb son supresoras de tumores que inhiben la progresión del ciclo celular y su inactivación por las

proteínas virales codificadas en E6 y E7 lleva a la entrada no controlada de células a la fase S del ciclo celular (Arredondo, 2003).

Región tardía (L): también es conocido como "late" y contiene las regiones L1 y L2, los cuales codifican para proteínas estructurales del virus, L1 para la proteína principal de la cápside viral mientras que L2 para una proteína menor con mayor variación entre cada tipo (Arredondo, 2003).

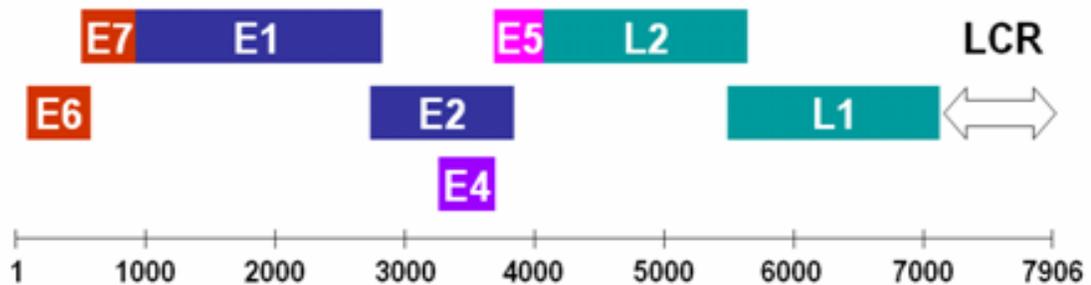


Figura 4 Organización genómica del Virus del Papiloma Humano

El genoma de HPV esta conformado por una doble cadena DNA circular. En este esquema se muestran de forma lineal las distintas regiones en que se encuentra organizado el genoma de HPV, con un peso total aproximado de 8kb de forma general, LCR corresponde a la región larga de control (*Large Control Region*, Tomado y modificado de Institut de recherches cliniques de Montréal).

Región reguladora: es conocida como Región Larga de Control o LCR, es un segmento de DNA de entre 400-1000pb adyacente a los segmentos de replicación viral. No codifica para proteínas ya que carece de las secuencias promotoras y potenciadoras críticas que regulan la replicación y transcripción viral mediante productos génicos virales y celulares. Contiene una compleja organización de superposición de sitios para el reconocimiento de diferentes inhibidores y activadores de la transcripción. Incluyen a la proteína activadora 1 (AP1), al factor 1 de transcripción específico de queratinocitos (KSF) y el factor nuclear 1 (NF1), así como factores de transcripción codificados para cada región temprana. Regula la transcripción de las regiones temprana y tardía y controla la producción de proteínas virales y partículas infecciosas.

Debido a la importancia de las proteínas virales y su participación en la expresión y desarrollo del CaCU; a continuación, se presenta a manera de resumen, un cuadro donde se mencionan las funciones principales de cada una de las proteínas virales, que hasta el momento se conocen. Resaltando su participación durante el ciclo replicativo y su integración al genoma celular (Zur Hausen, y otros, 1994).

| PROTEINA | FUNCION |
|----------|---------|
|----------|---------|

| | |
|----|--|
| E1 | <p>Ayuda a mantener el genoma viral en forma episomal en etapas tempranas de la infección.</p> <p>Facilita la correcta segregación de los genomas celulares durante la división celular.</p> <p>Actúa como una DNA helicasa durante la replicación del genoma viral.</p> |
| E2 | <p>Coopera con E1 para mantener el genoma en forma episomal.</p> <p>Facilita la correcta segregación de los genomas celulares durante la división celular.</p> <p>Regula la replicación del genoma viral junto con E1 y regula la transcripción de genes virales (E6, E7) y de genes celulares.</p> |
| E4 | <p>Interactúa con las citoqueratinas para liberar a los viriones generados.</p> |
| E5 | <p>Se une a la subunidad de ATPasa⁺ de los endosomas, inhibiendo su acidificación.</p> <p>Inhibe el correcto ensamblaje del MHC-I (HPV16).</p> <p>Permite el reciclamiento del EGFR, favoreciendo el crecimiento celular.</p> <p>Inhibe la transcripción de la cadena pesada del MHC-I (BPV-1).</p> |
| E6 | <p>A través de E6-AP marca a p53 para su degradación.</p> <p>Inhibe Bak y Bax, necesarios para el inicio de la apoptosis.</p> <p>Activa la telomerasa. Inhibe la degradación de las cinasas de la familia Src.</p> |
| E7 | <p>Se une a Rb, liberando al factor E2F, permitiendo la entrada al ciclo S del ciclo celular. Activa y se une a complejos AP-1.</p> <p>Activa histonas desacetilasas en genes celulares específicos para inhibir su transcripción, tales como interferones (Park, y otros, 2001).</p> |
| L1 | <p>Es una proteína de expresión tardía. Proteína principal de la cápside viral, se encuentran cerca de 360 copias por virion.</p> |
| L2 | <p>Proteína de expresión tardía. Proteína menor de la cápside viral, se encuentran cerca de 12 copias por virion.</p> |

- **Ciclo Replicativo de HPV**

Los HPVs son huésped-específicos y requieren de queratinocitos capaces de diferenciarse por completo para lograr su éxito y supervivencia, siendo las células blanco de los mismos las células basales del epitelio. Infechan a las células del estrato basal del epitelio cervical y su ciclo replicativo se encuentra íntimamente asociado al proceso de diferenciación de dicho epitelio.

El ciclo del HPV inicia cuando los viriones atraviesan, mediante una microabrasión un epitelio escamoso inmaduro como el epitelio cervical, y se alojan en un sitio potencial de infección como la zona de transformación hasta llegar a la capa basal, en la cual ocurre la adhesión; dicha unión requiere de iones ambientales que reducen la repulsión electrostática y el proceso es dependiente de energía y temperatura, llevan a la penetración de los viriones a las células en

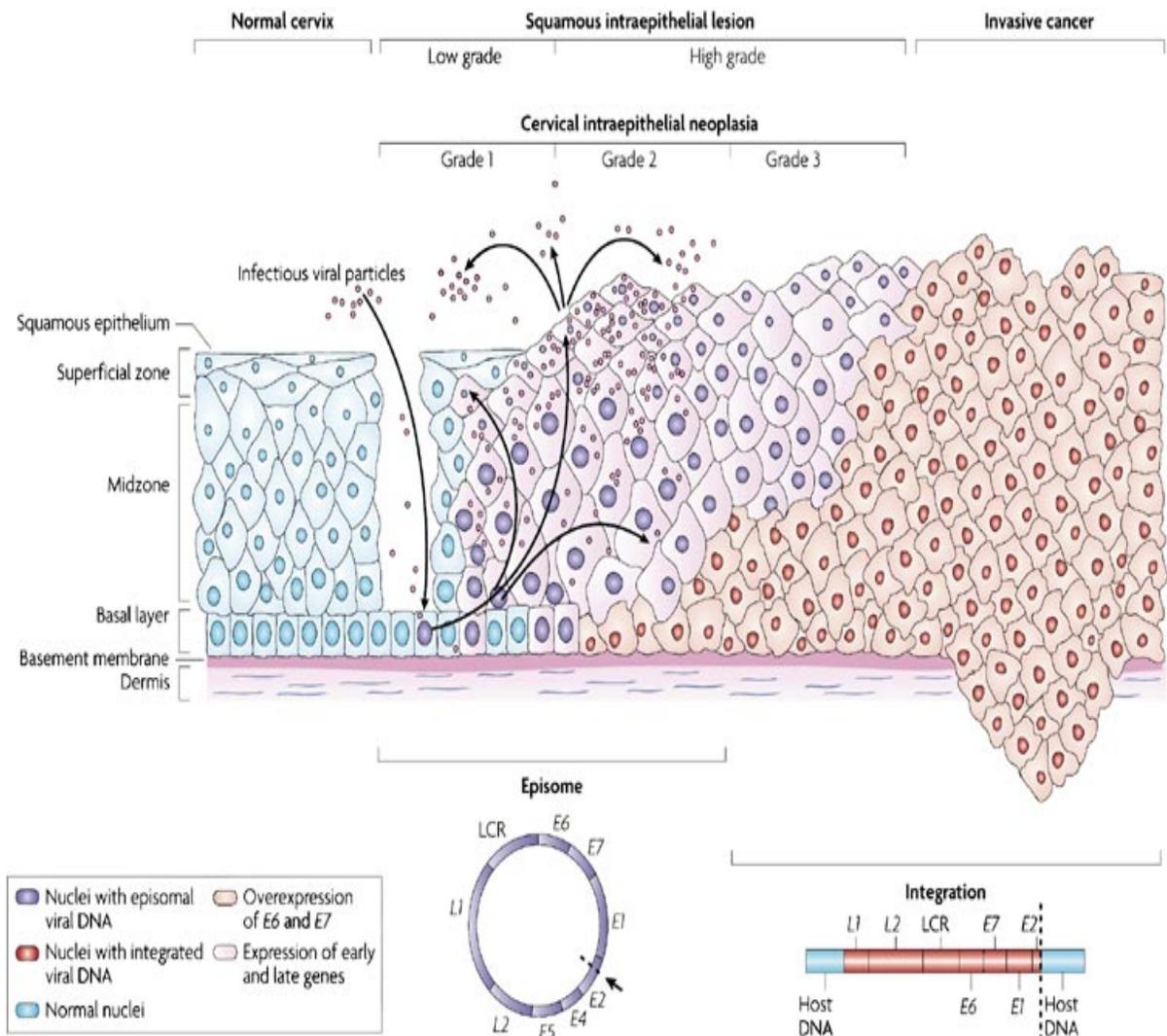
proliferación; dicha penetración en la célula blanco es un proceso dependiente de energía y se sabe que con algunos HPV (por ejemplo HPV33) ocurre por vía endocítica.

La liberación de las partículas virales de los endosomas al citoplasma está íntimamente conectada con el proceso de desprendimiento de la cápside el cual ocurre después de la penetración; y cuando la cápside viral es completamente o parcialmente removida, el genoma viral es expuesto generalmente como complejos con nucleoproteínas. Posteriormente se inician ya sea el proceso de replicación o de transcripción. Se sabe que la replicación inicial del HPV tiene lugar dentro de las células basales (y parabasales) del epitelio escamoso (Syrjänen, 1999).

Posteriormente ocurre la replicación del genoma viral hasta alcanzar un bajo número de copias. Dicho proceso permite el mantenimiento del genoma viral de forma episomal en el estrato basal; en esta etapa son indispensables las proteínas virales E1, E2 y probablemente E5. Una vez que las células del estrato basal comienzan su diferenciación, pierden la capacidad de dividirse y ocupan los estratos suprabasales. En esta etapa cambia el patrón de expresión viral, transcribiéndose predominantemente los ORFs E6 y E7. Estos codifican para dos oncoproteínas que inducen la proliferación, la inmortalización y eventualmente, la transformación maligna de las células del epitelio cervical al modificar la regulación del ciclo celular y la diferenciación normal de los queratinocitos.

La proteína E6 interactúa con las proteínas E6AP y p53, dando como resultado la degradación proteolítica de ésta última; por lo tanto, inhibiendo su actividad. Por otra parte, la proteína E7 se une a la proteína celular pRB, lo cual permite la liberación del factor de transcripción E2F y como consecuencia, la transcripción y traducción de proteínas necesarias para la replicación del DNA celular (McBride, 2006). En las células diferenciadas del estrato escamoso, el genoma viral se replica hasta alcanzar casi 1000 copias por célula (**Figura 5**). La expresión de los ORFs L1 y L2, así como el ensamblaje de la cápside con el genoma viral correspondiente, ocurre en los estratos espinoso y superficial del epitelio. Los viriones completos se encuentran únicamente en los estratos superficiales y su liberación ocurre a través de la exfoliación del epitelio (McBride, y otros, 1991).

En la mayoría de los CaCU HPV positivos el genoma viral se integra al genoma de la célula hospedera, rompiéndose el ORF de E1 y/o E2 (McBride y otros. 1991). Lo anterior da como resultado la expresión constitutiva de los ORFs E6/E7 por la ausencia de la proteína reguladora E2, lo cual contribuye al desarrollo de cáncer (Muñoz, 2006).



Nature Reviews | Cancer

Figura 5 Ciclo Replicativo de HPV

Durante el proceso de infección encontramos dos formas de integración del genoma de HPV dentro de la célula, de forma episomal (*episome*) que se marca con color morado; mientras, que la integración del genoma en el genoma celular (*integration*) que se marca de color rojo y como va avanzando a lo largo del estrato epitelial conforme las células van madurando. Lo que se encuentra de color azul hace referencia a las células no infectadas. Este esquema muestra las infecciones persistentes y no persistentes que se pueden presentar de forma simultánea en el tejido (Tomado y modificado de Woodman y otros 2007).

El inicio de toda infección permite que el DNA viral se encuentre de forma episomal, que no se encuentra integrado al genoma del hospedero, el DNA de HPV se mantiene en las células pero sin integrarse; esta condición se encuentra en pacientes que presentan una infección productiva o

con partículas virales de HPV abundantes (Dell, 2001). Otra alternativa para las infecciones presentadas por HPV son aquellas conocidas como infecciones no persistentes o no productivas donde el DNA es integrado al genoma del hospedero y donde no hay producción de partículas virales maduras, pero donde se lleva a cabo la transformación celular ya que al integrarse HPV requiere la activación de los factores celulares para su replicación y transcripción. La integración del genoma de HPV al genoma celular aparentemente es el último paso para transformar las células hospederas a células cancerosas inmortalizadas capaces de invadir otros tejidos (Thorland, y otros, 2000).

Una infección productiva por un HPV de alto riesgo aunada a factores estimulantes del desarrollo del CaCU, puede llevar a la generación de células transformadas. La mayoría de las enfermedades son multifactoriales que dan como resultado cambios genéticos y fisiológicos que son acumulados por periodos largos de tiempo (latencia) y que permiten la pérdida progresiva del control del crecimiento normal de la célula (Syrjänen, 1999). Se ha aplicado el término de "latencia" para designar la presencia de HPV durante un periodo variable, aunque el promedio es de ocho meses dentro de células normales y el término "normales" se ha definido como la no presencia de cambios citológicos, morfológicos o colposcópicos que evidencien la enfermedad.

Aún no es claro si el sistema inmune del hospedero puede hacer un reconocimiento a este nivel o si bien el reconocimiento inmune requiere del incremento del número de partículas virales para ser estimulado. Con el tiempo, las células transformadas, adquieren una variedad de nuevas propiedades (en comparación con células normales), como cambios en el crecimiento celular y en su estructura; decremento en la regulación del ciclo celular, disminución en el requerimiento de factores de crecimiento externos y un crecimiento independiente del anclaje.

Todos estos cambios celulares durante la transformación celular así como la infección con HPV en sí misma, generan cambios en los mecanismos de defensa naturales que posee el ser humano, como lo es el sistema inmunológico (Ortiz Sánchez, y otros, 2007).

Sistema Inmunológico

- **El cáncer y la respuesta inmune**

Cáncer, tumor y neoplasia son términos utilizados generalmente como equivalentes. Las neoplasias se han clasificado en benignas y malignas; las primeras presentan un grado de proliferación limitada, permanecen localizadas en su sitio de aparición y se rodean por una cápsula de tejido fibroso mientras que las neoplasias malignas, muestran alto grado de crecimiento, no están encapsuladas y pueden invadir otros tejidos. El desarrollo de este tipo de neoplasias generalmente es denominado cáncer y pueden formar tumores sólidos como en el caso del CaCU de tipo diseminado o sistémico como las leucemias.

Entre los años de 1940 y 1950, se observó que tumores inducidos en ratones por agentes químicos o virales portaban antígenos capaces de inducir protección en animales singénicos transplantados posteriormente con células del mismo tumor, estableciendo la posibilidad de considerar la participación de la respuesta inmunitaria, lo que implica la existencia de antígenos tumorales y su reconocimiento por el sistema inmunológico (Rojas Espinosa, 2006).

- **Antígenos relacionados con tumores**

Existen dos clases de antígenos relacionados con los tumores: los antígenos específicos de tumor y los antígenos asociados al tumor. Los antígenos específicos de tumor son aquellos que no se encuentran en las células normales del mismo tipo y corresponden, casi siempre, a antígenos virales. Las células cancerosas que expresan antígenos específicos de tumor o antígenos alterados, pueden ser identificadas como células extrañas por el sistema inmune para luego ser eliminadas como se eliminan las células de los trasplantes alogénicos y xenogénicos. Desafortunadamente, no todas las células cancerosas expresan y exhiben antígenos específicos de tumor o antígenos alterados y en estos casos, los tumores son más difíciles de detectar y eliminar a través de la respuesta inmunitaria (Rojas Espinosa, 2006).

Antígenos específicos tumorales. Tumores inducidos por carcinógenos químicos. En general, los tumores que se inducen químicamente, aun cuando pueden ser morfológicamente indistinguibles, expresan antígenos diferentes; además, dos tumores inducidos en el mismo hospedero y con el mismo carcinógeno, usualmente exhiben antígenos diferentes y particulares.

Antígenos de diferenciación. Algunos portados por las células tumorales corresponden a antígenos presentes en las células normales durante su etapa de diferenciación.

Antígenos embrionarios. Existen antígenos en el embrión normal que desaparecen cuando el embrión madura. Algunos de estos antígenos reaparecen asociados con algunos tumores.

En los tumores sólidos e infecciones por virus la inmunidad celular se considera de máxima importancia, siendo una de las respuestas más efectivas contra los virus la que realiza la inmunidad celular. Esta respuesta es mediada por los linfocitos T citotóxicos (CTL) que de forma general son CD8+ (expresan el receptor CD8 en su superficie) y juegan un papel muy importante en la eliminación de células infectadas por virus y cuya actividad es regulada principalmente por los linfocitos T cooperadores o CD4+, los que se dividen en dos subpoblaciones de linfocitos T cooperadores (Th1 y Th2, por sus siglas en inglés) y son antagonistas entre sí en cuanto a la función de las citocinas que secretan.

- **Respuesta Inmune**

El equilibrio del organismo depende del sistema inmunológico, cuya función es la defensa de nuestro cuerpo ante cualquier agente patógeno. La penetración de un material antigénico en un individuo sano induce en éste una respuesta inmune, de manera inmediata conocida como inmunidad innata o natural y una tardía que requiere de algunos días para ponerse de manifiesto e incluye la producción de anticuerpos y de linfocitos (**Figura 6**). Las células y los anticuerpos resultantes tienen la propiedad de reaccionar específicamente con el antígeno inductor de su producción, de aquí también los términos de inmunidad específica o adquirida. La capacidad del individuo para responder a la estimulación antigénica depende de varios factores, como el funcionamiento adecuado de su sistema inmunitario.

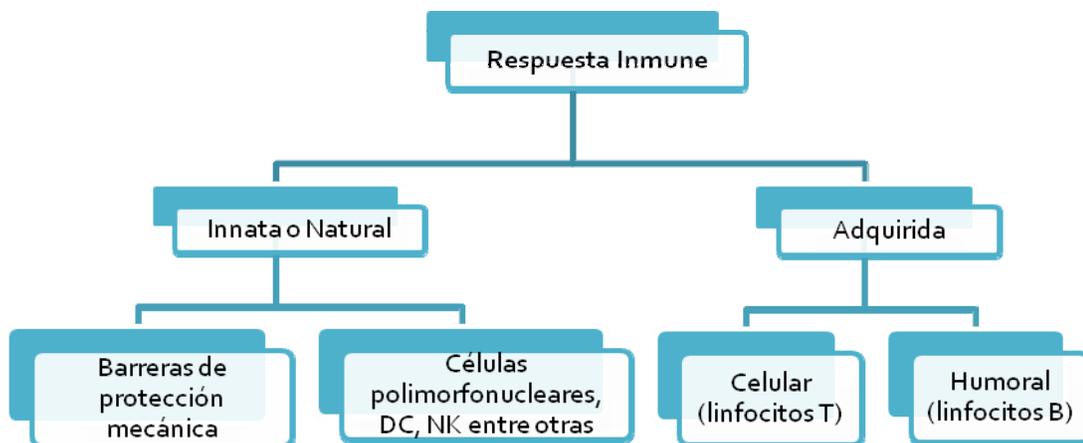


Figura 6 Esquema de la Respuesta Inmunológica y sus tipos

○ Inmunidad Innata

Es la barrera natural y no requerir del contacto previo con el patógeno funcionando de forma natural. Incluye los factores genéticos, raciales, hormonales, celulares y humorales, además de factores como la edad, mecanismos de protección química (acidificación del medio, mecanismos tóxicos como derivados de O₂), mecanismos biológicos (flora intestinal) y las barreras de protección mecánica. De manera inicial la respuesta inmunológica genera cambios corporales como el aumento de temperatura corporal, una respuesta inflamatoria, entre otros. Dentro de las barreras de protección la piel y las mucosas, tienen la función primaria de barrera física aunque poseen mecanismos bactericidas y fungicidas, como lo son las secreciones sebáceas (capaces de inhibir y matar diversos hongos). Las mucosas al igual que los epitelios queratinizados (epitelio cervical), constituyen mecanismos eficientes de protección natural, funcionando como barreras de protección mecánica ya que poseen cilios y están recubiertas de moco, el cual contiene sustancias con actividad microbicida (Rojas Espinosa, 2006)

La respuesta natural tiene algunos tipos celulares que actúan como la primera defensa básica del organismo ante la presencia de agentes infecciosos como las células polimorfonucleares con funciones fagocíticas como neutrófilos, células dendríticas (DC), células asesinas naturales o NK (*Natural Killer* por sus siglas en inglés) entre otras, que circulan en la sangre y las DCs que se encuentran en los epitelios de forma inmadura y forman parte de la respuesta primaria del organismo. Participan en la respuesta vascular y exudativa de los tejidos del organismo ante una agresión, teniendo por función la de neutralizar, diluir y limitar al agente patógeno; la activación de éstas se da gracias a factores quimiotácticos, derivados de los tejidos lesionados tras el proceso de infección (Abbas, 1991).

Las células NK tienen la habilidad de lisar a sus células blanco y además son una fuente temprana de citocinas inmunoreguladoras. La activación de la citotoxicidad de las células NK depende del balance de señales inhibitorias y activadoras, así como de varias moléculas de adhesión y co-estimulación (Garrido, y otros, 1993). Estas células tienen una variabilidad no restringida al Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) para reconocer y lisar a una amplia variedad de células infectadas por virus y células tumorales. Estas células pueden reconocer y lisar a los queratinocitos transformados con HPV y se han encontrado en infiltrados inmunes que invaden y destruyen el tejido neoplásico (Herrington, 1995).

○ Inmunidad Adquirida

Los órganos linfoides incluyen al timo y a la médula ósea (la bolsa de Fabricio en aves), y es aquí donde las células linfoides específicamente, los linfocitos adquieren el grado de diferenciación y maduración que requieren para el adecuado desempeño de sus funciones inmunológicas. Las células linfoides participan en la inducción, expresión y regulación de las respuestas inmunitarias adquiridas. Los linfocitos T y B, macrófagos, y otras células presentadoras de antígeno o APC (*Antigen Presenting Cell*) como las células de Langerhans, células dendríticas o DC (*Dendritic cells*) al igual que las NK (*Natural Killer*) y las células NKT (*Natural killer T cells*) entre otras, constituyen

la población celular activa en la respuesta del organismo ante alguna infección y permiten la defensa del mismo.

Existen marcadores de diferenciación presentes en la superficie de los leucocitos y otras células, que sirven para identificar su estirpe celular y su grado de diferenciación, maduración y activación. Estas moléculas son conocidas con las siglas CD provenientes de "*cluster of differentiation molecules*" ("grupo de diferenciación"). Su identificación ha sido posible gracias al uso de anticuerpos monoclonales que interaccionan con epitopes particulares de estas moléculas complejas; actualmente se han descrito alrededor de 130 moléculas CD y pueden ser particulares de ciertas líneas celulares, o bien compartidas por varias células; algunas se expresan sólo en células activadas y a muchas se les reconoce además alguna función como moléculas de reconocimiento (receptores) ligadas a mecanismos de transducción de señales.

Las poblaciones celulares más importantes en el desarrollo de la respuesta inmune adquirida corresponden principalmente a los linfocitos T (respuesta celular) y B (respuesta humoral) junto con las células NK y las células DC.

Células Dendríticas (DC). Forman parte de un conjunto de células (acesorias) indispensables para la inducción de la respuesta inmune; son consideradas como las células presentadoras de antígeno más eficientes ya que estimulan respuestas específicas de los linfocitos T después del contacto con el antígeno. Expresan en su membrana altos niveles de antígenos MHC II y MHC I, tienen la capacidad de presentar antígenos procesados y no procesados; producen interleucinas (IL) importantes para la estimulación de la respuesta proliferativa y productiva de las células T como IL-1, IL-2, IL-6 e IL-18. Poseen moléculas co-estimuladoras como B7-1 y B7-2.

Células *Natural Killer* (NK). Están funcionalmente relacionadas con las células Tc, son capaces de matar células tumorales de manera inespecífica y no restringida por el Complejo Principal de Histocompatibilidad, ejercen su efecto citolítico principalmente a través de perforinas (enzimas granulares que producen poros en la membrana de la célula blanco), de granzimas y otras hidrolasas y de citocinas como la linfoxina (TNF- β) y el factor citotóxico de las células NK, causando en conjunto la muerte de las células blanco tanto por necrosis como por apoptosis.

Células linfoides. Entre las células linfoides se encuentran distintas poblaciones celulares que están relacionadas con la respuesta inmunológica de manera directa. Estas poblaciones celulares son principalmente los linfocitos B, los linfocitos T y otras células de gran importancia (**Figura 7**).

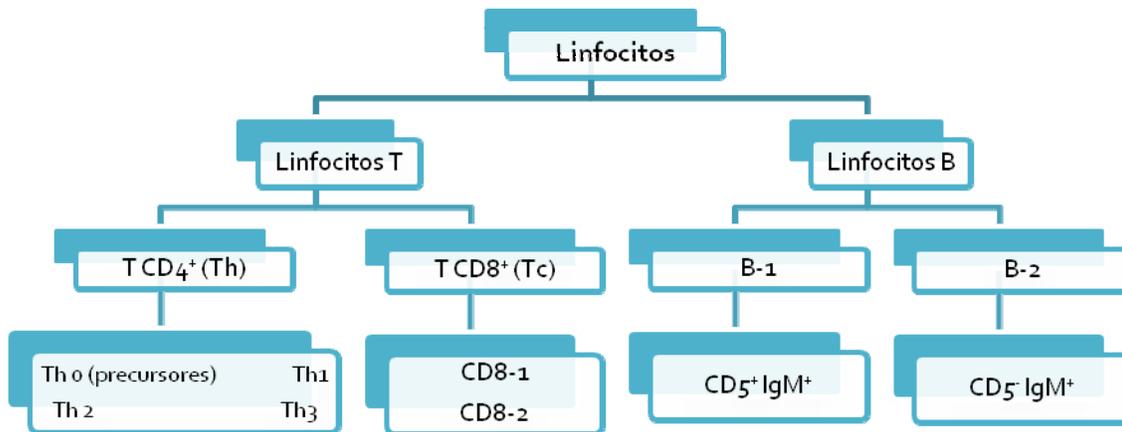


Figura 7 Células Linfoides

Linfocitos B. Los linfocitos B son las principales células que participan en la respuesta inmune (respuesta humoral). Se le reconocen dos subpoblaciones dentro conocidas como células B tipo 1 (B-1) y células B tipo 2 (B-2). Las B-1 constituyen del 4 al 36% del total de las células B y el resto corresponde a las B-2. Los tipos B-1 participan de manera importante en la inmunidad innata al secretar anticuerpo IgM o naturales, fueron identificadas por la expresión de $CD5^+$, aunque se han encontrado algunas que no la expresan ($CD5^-$) y no requieren de la activación de las células T. Las B-2 son los tipos más abundantes, exhiben el patrón $CD5^-/IgM^+$, reconocen antígenos dependientes de T; es decir, son regulados en su función por citocinas derivadas de las células T.

También funcionan como células captadoras, procesadoras y presentadoras de antígeno, principalmente de antígenos solubles. Los linfocitos B exhiben moléculas o antígenos de diferenciación, siendo algunos exclusivos de los linfocitos B y comparten algunos con otros tipos celulares. Por ejemplo, la molécula $CD34$, se presenta en etapas tempranas del proceso de maduración mientras que, hay antígenos como $CD40$ que aparecen tempranamente y se mantienen a lo largo de la vida de los linfocitos B. Entre las moléculas que pueden llegar a expresar en su membrana se encuentran las moléculas $B7.1$ ($CD80$) y $B7.2$ ($CD86$).

Linfocitos T. La participación de las células T en la respuesta inmune es conocida como inmunología celular (dentro de la inmunología adquirida). Éstas presentan la molécula al Receptor de la célula T o TCR (*T Cell Receptor*, por sus siglas en inglés); la molécula $CD3$ (complejo tetramolecular asociado a TCR y relacionado con la transducción de señales) y la molécula $CD2$. De acuerdo a las moléculas de expresión encontramos dos subpoblaciones:

Linfocitos T $CD4^+$: también son conocidos como células T cooperadoras (*T helper o Th*). Presentan receptores TCR con cadenas alfa y beta ($T\alpha\beta$). Presentan dos subpoblaciones principales claramente definidas en función de las citocinas que producen y de su actividad predominante ($Th1$ y $Th2$). Tanto $Th1$ como $Th2$ juegan un papel importante en la inmunidad celular y humoral respectivamente. La inmunidad mediada por células es regulada por citocinas. Las citocinas que de manera más importante están asociadas con el desarrollo de una respuesta inmune celular

antiviral son la Interleucina 2 (IL-2) y el Interferon gama (IFN- γ) que son secretados por los linfocitos Th₁, los 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 se piensa que suprimen la inmunidad mediada por células, por lo que Th₂ es responsable de la defensa independiente de la fagocitosis. Así, una respuesta inmune celular antitumoral es inducida por citocinas de los linfocitos Th₁ e inhibida por los Th₂, generando una acción de inmunosupresión (Gaarenstroom, y otros, 1994).

Linfocitos T CD8⁺: también conocidos como células T citotóxicas (CTL) presentan dos subpoblaciones conocidas como tipo 1 y tipo 2. Las primeras tienen capacidad citotóxica, mientras que las tipo 2, se ha propuesto que podrían tener un efecto regulador sobre las primeras, aunque esta propuesta no ha sido totalmente aceptada.

Los linfocitos reconocen a los antígenos a través de receptores específicos que reconocen porciones discretas o epitopes que son presentados por las APC. Dependiendo de los linfocitos T, la respuesta resultante será de tipo celular, humoral o citotóxica. La participación de las distintas poblaciones de linfocitos T determina el tipo de respuesta que se ha de generar ante un antígeno ya que su actividad es muy distinta. Los linfocitos TCD₄⁺ con sus respectivas subpoblaciones Th₁ y Th₂, dependiendo de la producción de citocinas de cada una, son los responsables de la respuesta celular y humoral, respectivamente aunque no de manera arbitraria. Las Th₁ son responsables de la activación de macrófagos, destrucción de células tumorales, etc. Mientras que las Th₂ son cooperadoras de los linfocitos B, ayudan a la producción de anticuerpos (Ab), al igual que las Th₁ pero de forma más discreta.

○ Inducción de respuesta Inmune Adquirida

La respuesta inmune es el resultado de interacciones celulares y de moléculas como las APCs que capturan material antigénico y lo fagocitan para lograr procesarlo. Los epitopes resultantes del proceso se acoplan a moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad MHC-I (clase I) o MHC-II (clase II) y así son transportados hasta la membrana de las APCs donde pueden ser reconocidas por las células T específicas (aquellas que tienen el receptor complementario del epítopo presentado). Mientras procesan el antígeno, las APC producen y liberan citocinas como IL-1, IL-6 e IL-12, entre otras. La IL-1 junto con otras moléculas co-estimuladoras de las APCs, inducen la síntesis de IL-2; que funciona como factor de proliferación de las células T y células B. Dependiendo de la célula T que reconozca al antígeno se inducirá la respuesta celular o humoral.

● Respuesta Humoral

Es destacada la participación de los linfocitos B y la colaboración en conjunto de los linfocitos cooperadores Th₁ y Th₂. Los antígenos capturados por los linfocitos B pueden ser antígenos secretados por microorganismos o liberados por macrófagos y células dendríticas durante el procesamiento del antígeno. Los antígenos interiorizados pueden ser manejados por dos vías de

procesamiento y los péptidos antigénicos, asociados a moléculas MHC clase I o II, pueden ser presentados a las células T específicas. Las células T reconocen los epitopes presentados por las células B y se activan, las células activas se dividen y producen citocinas como IL-2 y IL-4 que estimulan a las células B. Junto con la interacción de las moléculas B7 y CD40 en las células B con CD28 y CD40L en las células T, producen en las células B señales de proliferación, en tanto que otras citocinas las inducen para la producción de anticuerpos (Ab) y a presentar los cambios en el isotipo del anticuerpo producido (Rojas Espinosa, 2006).

○ Regulación de la Respuesta Humoral

La respuesta de las células T dependientes de células B requiere que las células Th envíen la señal necesaria a las células B inmaduras. Esta señal es enviada a manera de citocinas solubles y por el ligando CD40L (*membrane-bound CD40 ligand*) seguido del reconocimiento del Antígeno por las células T presentado por moléculas MHC II en las células B.

Ensayos realizados en ratones transgénicos arrojaron datos interesantes donde se propone que las señales co-estimuladoras de la familia B7 son esenciales para que se generen anticuerpos contra los antígenos, indicando que las señales co-estimuladoras de B7 son más importantes y necesarias para la respuesta humoral ya que se realizaron también ensayos en los que se bloquearon miembros de la familia B7 y la capacidad para generar células Tc fue normal (Ronchese, y otros, 1994). También se han realizado ensayos donde se ha identificado que la co-estimulación por B7 es requerida para la producción óptima de anticuerpo. En conjunto estos datos indican que la respuesta humoral requiere más la co-estimulación por B7 que para la diferenciación, citotoxicidad y producción de citocinas por las células T (Harris, 1999).

● Respuesta Celular

La inmunidad celular no requiere la participación de anticuerpos y está relacionada con la eliminación del antígeno de vida intracelular (bacterias o virus) y la detección y destrucción de células cancerosas entre otras. Se lleva a cabo con la participación de distintos tipos celulares (NK, DC, linfocitos T y B) a través de sus productos solubles (citocinas). Los linfocitos reaccionan al contacto con el antígeno presentado por las APCs produciendo citocinas.

Los linfocitos T CD4⁺ y sus subpoblaciones se distinguieron gracias a las citocinas producidas permitiendo su clasificación en Th1 que produce IL-2, Interferon gamma (IFN-γ) e IL-12 y participa en la regulación de la respuesta celular, mientras que las Th2 producen IL-3, IL-5, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13. La respuesta celular se puede clasificar en tipo 1 por la secreción de citocinas por las células Th1 (IL-2, IFN-γ e IL-12), y en respuesta tipo 2 que se refiere a una respuesta celular reducida acompañada de un incremento en las funciones de las células B y de la producción de sus respectivas citocinas.

○ Regulación de la Respuesta Celular

Como se ha podido observar las células T son elementos importantes en la activación y regulación de la respuesta inmune. La actividad de las células T depende de la interacción del antígeno con el receptor de las células T que brinda una señal a las mismas para activarlas, pero puede ser insuficiente y llevar al linfocito T a un estado de anergia (incapacidad de reconocimiento).

La activación de los linfocitos T, además de la señal brindada por el TCR tras la interacción con el antígeno, requiere una segunda señal co-estimuladora derivada de la célula presentadora de antígeno provocando la activación de la célula T. La estimulación generada en presencia del TCR da como resultado un incremento en la producción del receptor de IL-2 conocido como IL-2R, la transcripción de citocinas y la proliferación de las células T (Harris, 1999).

El antígeno se encuentra unido a moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad a manera de fragmentos pequeños de péptidos que son reconocidos en conjunto por APC que presentan al antígeno, el cual es reconocido por el complejo (TCR)/CD3 generando una primera señal de respuesta específica hacia el antígeno. La segunda señal es conocida como señal co-estimuladora, encargada de incitar a las células T en conjunto con el Antígeno, dicha señal es provista por las APCs que se unen a receptores de las moléculas co-estimuladoras particulares presentes en las células T, activándolas (Arlene, y otros, 2006).

• Proteínas co-estimuladoras

Las moléculas co-estimuladoras más aceptadas pertenecen a la familia B7. Son proteínas presentes en las células presentadoras de antígeno, son proteínas transmembranales tipo I con dominios extracelulares IgV e IgC (superfamilia de inmunoglobulinas (Ig)), poseen una región hidrofóbica transmembranal y un dominio citoplasmático. Dentro de las proteínas más conocidas se encuentran B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) que se expresan en varias APCs, también se encuentran a B7.H1 (PD-L1) y B7.H2 (ICOS-L) entre otras (Carreno, y otros, 2002).

Regulan la actividad de las células T activándolas o inhibiéndolas, desencadenando una cascada de señales necesarias para el reconocimiento de éstas con sus receptores específicos presentes en la superficie de las células T favoreciendo la comunicación entre las mismas y así iniciar la respuesta celular ante el Antígeno.

Por tanto, con base a su función pueden dividirse en dos: aquellas que activan e incrementan la función de las células T y aquellas que son co-inhibidores debido a que suprimen la respuesta celular. Un mismo ligando puede tener las dos funciones dependiendo del receptor al que se ha unido en la superficie celular.

| NOMBRE LIGANDO | NOMBRE RECEPTOR | FUNCIÓN |
|----------------|-----------------|-----------|
| B7.1/CD80 | CD28 | Activador |

| | | |
|--------------|--------|-----------|
| B7.2/CD86 | | |
| B7.1/CD80 | | |
| B7.2/CD86 | CTLA-4 | Inhibidor |
| B7.H2/ICOS-L | ICOS | Activador |
| B7.H1/PDL-1 | PD-1 | Inhibidor |

La señal co-estimuladora depende de una interacción específica receptor-ligando. La ruta más estudiada conlleva a los receptores CD28 y CTLA-4 (*Cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4*) los cuales comparten aproximadamente el 30% de homología y se encuentran en la superficie de las células T.

La interacción de CD28 favorece la proliferación de las células T y la secreción de citocinas como la IL-2 y la prevención de la inducción de anergia, mientras la interacción con CTLA-4 se ve reflejada en la inhibición de la respuesta celular, dicha molécula no se encuentra en la superficie de las células T expresada de manera constitutiva sino que a medida que aumenta la actividad celular aumenta su expresión (Harris, 1999).

CD28 es expresado en todas las células TCD4⁺ y alrededor del 50% de las células T CD8⁺ humanas, se expresa constitutivamente y sus niveles aumentan tras la activación de las células T. La expresión de CTLA-4 en células T activas es sólo del 2-3% en comparación con CD28. Estos receptores interactúan con las moléculas B7.1 y B7.2 (Figura 8).

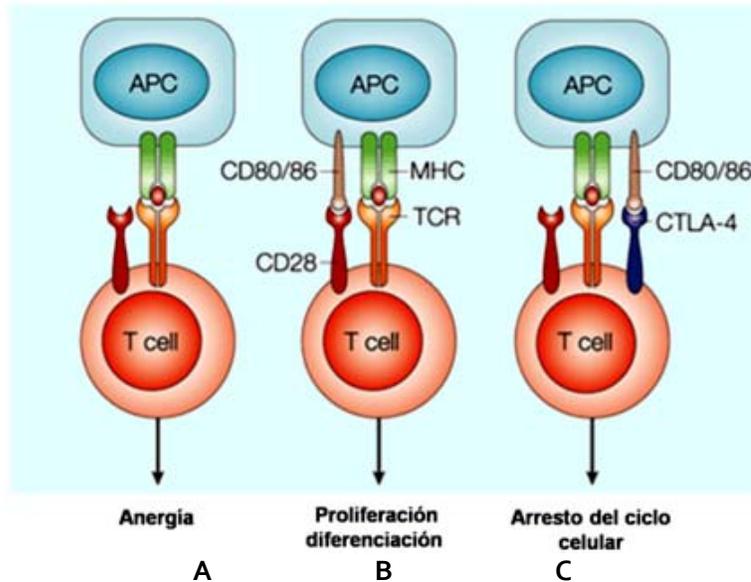


Figura 8 Interacción de proteínas co-estimuladoras

Participación de las proteínas co-estimuladoras en la activación de los linfocitos T. A) Representa el estado de anergia, B) Proliferación, diferenciación, C) Arresto en el ciclo o inhibición de la actividad celular.

○ **Proteínas B7.1 y B7.2**

B7.1 y B7.2 son las principales proteínas pertenecientes a la familia B7 y son las más estudiadas en cuanto a su función estimuladora y su participación en la activación de los linfocitos T. También son conocidas como CD80 y CD86 respectivamente (**Figura 9**). Presentan cierta homología estructural y de organización genómica entre si, son expresadas en células T y B activas y llegan a estar ausentes en aquellas que no están activas; además se expresan en la mayoría de las células presentadoras de antígeno (Jellis, y otros, 1995).

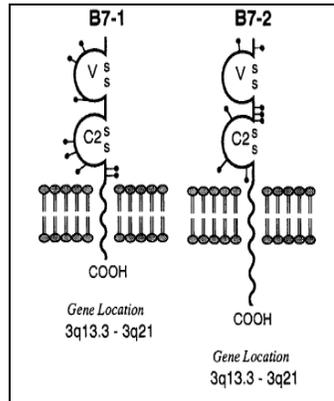


Figura 9 Estructura básica de B7.1 y B7.2

B7.1/CD80 tiene un peso molecular de 60kDa, posee una región transmembranal y un dominio citoplasmático de 19 aa. Esta región está asociada al citoesqueleto intracelular formando complejos con actina, lo que permite la localización de B7.1 en un solo lugar (*capping*).

Su expresión es casi exclusiva del tejido linfoide, se expresan en células como las células de Langerhans, monocitos y linfocitos B activados. B7.1 (CD80) está ausente en APCs inactivas mientras que B7.2 (CD86) se expresa constitutivamente en estas células aunque en bajos niveles pero es rápidamente regulada tras la presentación antigénica. Esto sugiere que CD86 inicia la respuesta inmune y CD80 la amplifica y regula (Najafian, y otros, 2003).

Las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase II inducen la expresión de CD86 y CD28, con la activación simultánea de CD40 y CD40L. CD40 es una glicoproteína de 48 kDa que pertenece a la superfamilia de los receptores del factor de necrosis tumoral. En humanos, CD40 está compuesta por un dominio extracelular de 171 aminoácidos, un dominio transmembranal de 22 aminoácidos, y una terminación citoplasmática de 62 aminoácidos. CD40 se expresa generalmente en las células APC y en algunas células no linfoideas como los fibroblastos y los queratinocitos (Gaspari, y otros, 1996).

La importancia de B7.1 (**Figura 10**) y B7.2 en la respuesta inmunológica contra las neoplasias malignas es ilustrada por estudios donde la expresión de MHC clase II en ausencia de B7.1 y B7.2 limita la activación de linfocitos T CD4+, a niveles tales que se promueve la progresión tumoral (Schwarz, y otros, 2001). Las razones por las que el tumor crece en presencia de linfocitos es desconocido. Se ha sugerido que la respuesta inmune destruye células menos "dañinas", lo cual favorece a un fenotipo maligno de células tumorales, que el sistema inmune es suprimido por un estímulo carcinogénico, que el tumor produce factores supresores que inhiben la activación linfocitaria y/o que el tumor escapa del reconocimiento inmunológico a través de la pérdida de moléculas co-estimuladoras.

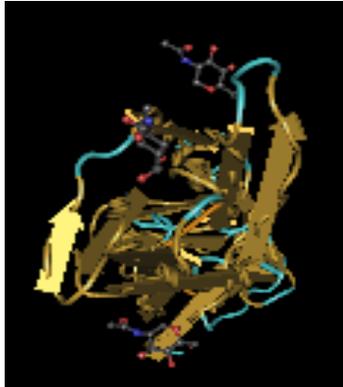


Figura 10 Estructura molecular de B7.1

La proteína B7.2/CD86 es una glicoproteína con 329aa y un peso de 80 kDa, presenta un dominio citoplasmático más grande que el de B7.1. Posee un 25% de homología con B7.1 y ambas se expresan en las células APC, en linfocitos T y en linfocitos B de humanos.

B7.2 es codificada por 8 exones (Figura 11) y existen variantes que carecen de algunos. El exon 1 y 2 contienen la región 5' no traducible, el exon 3 codifica para un péptido que lleva a la proteína a exportarse a la membrana celular. Los exones 4 y 5 codifican para los dominios de interacción con su receptor. El exon 6 codifica para el dominio intramembranal, anclando la proteína en la membrana celular. Los exones 7 y 8 codifican para la región carboxilo de la proteína (Jellis, y otros, 1995).

En este dominio se encuentran sitios importantes para la fosforilación de B7.2 generando el inicio de la transducción de señales hacia el interior del núcleo. Esta señalización induce el encendido de la producción de IL-2 por parte de la APC, además de la sobreproducción de la misma. La IL-2 producida por la APC, es importante para inducir la proliferación de otras células del sistema inmunológico y de ellas mismas.

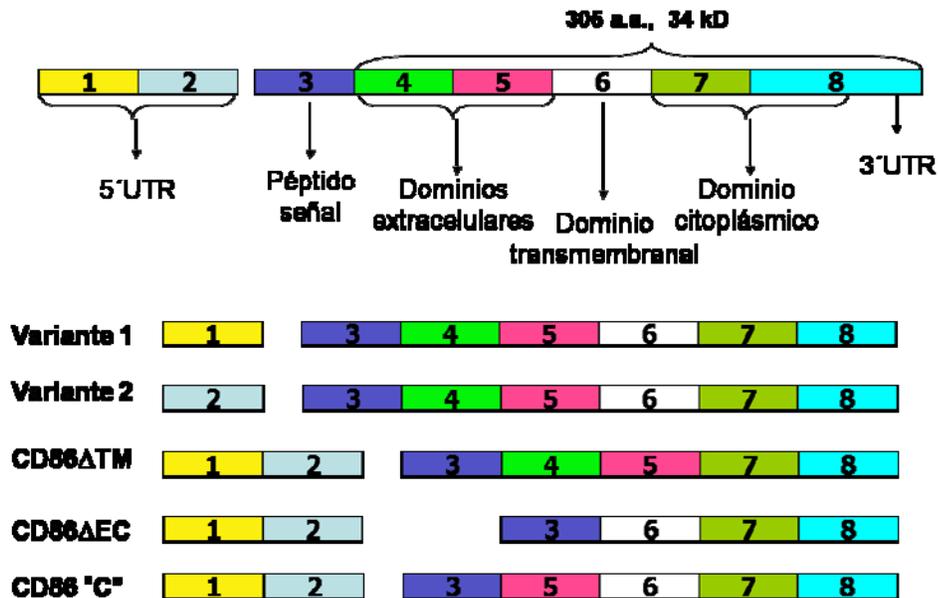


Figura 11 Estructura general del gen de B7.2 y variantes

Este esquema muestra las distintas regiones o genes que pueden presentar B7.2 dando origen a sus variantes y las diferencias entre las mismas.

Mientras que la producción de la citocina IL-4 regula positivamente la expresión de B7.2, la IL-10 inhibe su expresión en monocitos (Ding, y otros, 1993). Se ha visto que la IL-10 previene la expresión de B7.1 y B7.2 sobre macrófagos, además de inhibir ICAM-1 en monocitos y en células dendríticas (Greenfield, y otros, 1998).

Los receptores específicos CD28 y CTLA-4 son complementarios. CD28 es un receptor que se expresa constitutivamente en células T, como consecuencia del ensamblaje de éste con alguno de los ligandos (B7.2 ó B7.1) y se genera una potente señal estimuladora hacia las células T. Esta activación da como resultado la inducción de la transcripción de IL-2.

El receptor CTLA-4 no se expresa de forma constitutiva y no es detectable en células T inmaduras o células T vírgenes (*T cell naive*) pero sus transcritos se detectan tras la activación de las células T. Tiene una función represora, inhibiendo la actividad de las células T, su función se ve regulada gracias a la interacción o reconocimiento específico del antígeno por el receptor de células T en las células T y llega a presentar homodímeros.

○ **Proteínas B7.H1 y B7.H2**

Se han encontrado nuevas moléculas como B7.H2 y B7.H1 y son consideradas miembros de la familia de B7 ya que se ha demostrado que tienen funciones similares a las proteínas de dicha familia como B.7 y B7.2.

B7.H2 es una molécula inducible por citocinas proinflamatorias como el interferon- γ (INF γ) y TNF (Liu, y otros, 2001). Se ha visto que cuando B7.H2 se expresa en células tumorales, se incrementa la destrucción de células cancerosas por linfocitos T CD8+. B7.H2 también es conocida como ICOS-L debido a que interactúa con la molécula presente en la membrana de células T llamada ICOS.

En humanos se ha logrado detectar la presencia de mRNA en muchas células de origen no linfóide como en corazón y cerebro, entre otros. B7.H2 también se expresa de forma constitutiva en células B no estimuladas, en monocitos y DCs, así como en diversas células APC no-profesionales, como los fibroblastos y células endoteliales (Greenwald, 2005).

La expresión de B7.H2 en células B es regulada positivamente por la expresión del Factor de Necrosis Tumoral (TNF- α), mientras que cuando ICOS es estimulado por esta vía en las células T tras la activación por la interacción con el receptor de las células T, se incrementa su proliferación y producción de citocinas, aunque preferentemente se estimulan funciones efectoras en las células T (Wang, 2004).

El receptor ICOS, es homólogo a CD28 y CTLA-4 y tiene un peso de 55-65kDa cuando es aislado de células T activadas. Se encuentra en su mayoría glicosilado y formando homodímeros, aunque

como monómero no glicosilado tiene un peso menor a 20kDa. La respuesta inmune activada por la vía de ICOS, no es tan eficiente como la activada la vía CD28/CTLA-4. Por ejemplo, la activación de los linfocitos T CD4+ por la vía ICOS estimula pobremente la producción de IL-2 (crítica para la activación); aunque para la producción de IL-10 y otras citocinas es más eficiente que la ruta de CD28. ICOS puede favorecer o incrementar la inducción de citocinas Th1 pero más eficiente para las tipo Th2, como IL-4 e IL-5 (Wang, 2004).

La vía B7.H2/ICOS favorece la producción de citocinas y la diferenciación de las células T. Puede tener la capacidad de incrementar los niveles de citocinas Th1 y Th2 durante una estimulación primaria y durante la función efectora de la respuesta de células T. Las células T CD4+ producen más IFN- γ y menos IL-4 e IL-10 cuando ésta vía es bloqueada y genera señales críticas para la producción de inmunoglobulinas. De hecho, la producción de IL-10 se ve favorecida cuando existen niveles altos de expresión de B7.H2 (Greenwald, 2005). La expresión del IFN- γ induce la expresión de B7.H2 en células B y monocitos e induce la expresión del receptor específico en fibroblastos. Esta vía parece tener un papel importante en la respuesta inmune humoral.

Su participación en la respuesta humoral se ha observado en la diferenciación de células B y en la expresión de tipos específicos de inmunoglobulinas, así como en el desarrollo de células B de memoria. Histológicamente se ha encontrado en los centros germinales de las células T; esto permite un estímulo para las células B y la maduración de anticuerpos, en las placas de Peyer y los nódulos linfáticos. Se ha demostrado que la B7.H2 es necesaria para la respuesta de las células T dependientes de células B (Kurosawa, y otros, 2003).

La proteína B7.H1 tiene como receptor en la membrana plasmática de las células a la proteína PD-1, por lo que a menudo a B7.H1 se le conoce como el ligando de PD-1 (PD-1L). B7.H1/ PD-1L tiene un peso molecular de 50-55kDa y es miembro de la familia de proteínas co-estimuladoras, participa en la proliferación y activación de las células T al igual que en la producción de citocinas. Se ha detectado su expresión en DCs, macrófagos, células T y B, células endoteliales, de músculo, entre otras.

El receptor PD-1 (*Programmed cell death-1*) es miembro de la superfamilia Ig, tiene una función homóloga a CTLA-4. Es decir, tiene funciones inhibitorias de la respuesta de las células T al interactuar con B7.H1. PD-1 se expresa en células T activadas. Aún no se ha determinado de forma definitiva cual es el receptor co-estimulador presente en las células T para B7.H1, ya que se sabe que al bloquear a PD-1 se ve favorecida la estimulación, lo que sugiere la existencia de dicho receptor (Cheng, 2004).

Los transcritos de B7.H1 se han detectado en tejidos linfoides y no linfoides, donde el perfil de expresión es sumamente distinto, mientras que en células B y monocitos no se expresan niveles suficientes de B7.H1 (Freeman, y otros, 2000). Las DCs y algunas células endoteliales expresan B7.H1 de forma constitutiva en su superficie. Se ha demostrado la acción co-estimuladora de B7.H1 ya que incrementa los niveles de producción de IL-10 y de forma moderada los niveles de IFN- γ sin efecto significativo sobre los niveles de IL-2 e IL-4 (Latchman, y otros, 2001). También se ha demostrado que la estimulación de las células T inhibe la interacción con el receptor de las células T y la proliferación de éstas al igual de la producción de citocinas (IL-2, IL4, IL-10 e IFN- γ) llevando a las células a un arresto celular (Cheng, 2004).

○ Proteínas co-estimuladoras y su relación con el cáncer

Las células Langerhans en su función de APC profesionales juegan un papel importante en la co-estimulación, principalmente en epitelios (Giannini, y otros, 2002) ya que se ha demostrado en tejido cervical con NIC I positivas para HPV de alto riesgo, la disminución en el número de éstas (Jiménez-Flores, y otros, 2005). Muchos tejidos tumorales, particularmente de origen no-hematopoyético, no expresan moléculas co-estimuladoras, lo que puede significar la generación de células T anérgicas para antígenos específicos.

La expresión de B7.1 se encuentra dramáticamente reducida en carcinomas primarios pobremente diferenciados y carcinomas metastásicos de ascites maligno. Las moléculas de B7.1y B7.2 son comúnmente co-expresadas en mucosa normal y carcinomas primarios de estómago, mientras que sólo B7.1 deja de expresarse en carcinomas metastásicos (Koyama, y otros, 1998).

La expresión de B7.2 no varía entre el carcinoma gástrico tipo difuso y el carcinoma gástrico intestinal. Se ha visto que la reducción de la expresión de B7.1 sobre un tumor, correlaciona con el grado de diferenciación y progresión del tumor además del estado metastásico (Tatsumi, y otros, 1997).

Se sabe que B7.2 se expresa constitutivamente en la mucosa gástrica y puede iniciar la respuesta inmune, sin embargo también se sabe que B7.1 es más efectivo para estimular a los linfocitos T citotóxicos; y si las células tumorales carecen de B7.1, la inmunidad antitumoral mediada por células T hacia células tumorales humanas puede no inducirse y así contribuir al escape de los tumores al sistema inmunológico (Koyama, y otros, 1998).

Se han realizado estudios transfectando células tumorales con moléculas B7.1/CD80 induciendo una buena presentación de antígeno permitiendo la producción de linfocitos TCD8 o citotóxicos (CTLs) capaces de eliminar el tumor. Sin embargo, esta estrategia *in vivo* no siempre funciona (Alamartine, y otros, 1997). De los estudios más actuales que se han realizado con la nueva molécula co-estimuladora B7H.2 se ha podido observar que ésta molécula interactúa con ICOS (molécula inducible). B7.H2 es inducible por citocinas proinflamatorias como el IFN- γ y el TNF. Cuando B7.H2 se expresa en células tumorales se incrementa la destrucción de células cancerosas por linfocitos T CD8+ (Koyama, y otros, 1998).

Se ha demostrado que B7.H1 se expresa constitutivamente en tejidos con cáncer, por lo que se ve involucrada en la evasión inmunológica. También se ha comprobado que la expresión de B7.H1 se ve favorecida en células DC infiltradas en cáncer de ovario, en respuesta a la presencia del tumor y de los factores derivados de los macrófagos presentes del huésped, así como la producción de IL-10 y del factor de crecimiento vascular endotelial. Se ha demostrado que la expresión de B7.H1 reduce el crecimiento del tumor en modelos de ovarios de ratón (Cheng, 2004).

Los queratinocitos son considerados células presentadoras de antígeno no profesionales (APC no profesionales) porque normalmente no expresan MHC-II ni moléculas co-estimuladoras (Mota, y otros, 1999), pero pueden expresar MHC-II tras una inducción por la exposición a IFN- γ . Sin embargo la inducción de estimulación durante estados de inflamación puede inducir la expresión de MHC-II en una amplia variedad de células epiteliales y endoteliales. Después de la activación,

los queratinocitos que expresan MHC-II son capaces de proveer señales co-estimuladoras que inducen la proliferación de linfocitos T.

Mediante el uso de anticuerpos monoclonales contra B7.1 y B7.2, se ha demostrado que las células APC no profesionales (ejemplo: queratinocitos), pueden generar una señal co-estimuladora independiente de B7.1 y B7.2, o mediante proteínas solubles que interactúen con CD28 de los linfocitos T. Se han realizado varios trabajos en donde se transfectaron los genes CD80 ó CD86 en células tumorales y se ha observado un aumento en la lisis de estas células transformadas. Se han transfectado células CaSki, HeLa y SiHa con B7.1 (CD80) y estas fueron capaces de activar a linfocitos T, los cuales después lisaron a sus células blanco (Kaufmann, y otros, 1996).

En pacientes con LSIL HPV+, se ha encontrado una disminución en el número de células dendríticas plasmáticas positivas para B7.2 (CD86), sugiriendo la incapacidad de estas células mieloides para presentar antígenos a linfocitos T adecuadamente lo que puede generar una falla en la activación de la respuesta inmune sistémica en estas lesiones (Lee, y otros, 2006).

Las moléculas co-estimuladoras también son importantes para eliminar células infectadas por virus. En un estudio realizado en ratones deficientes de B7.1 y B7.2 a los cuales se les suministro una dosis de Herpesvirus tipo 2, se observó que los animales sufrieron infecciones y lesiones más severas que aquellos que expresaban moléculas co-estimuladoras (Thebeau, y otros, 2002).

Antecedentes Directos

Se ha descrito que los queratinocitos no son consideradas células presentadoras de antígeno profesionales debido a que carecen de moléculas co-estimuladoras (Nicokoloff, y otros, 1994).

Sin embargo se ha demostrado que células del estrato espinoso del epitelio cervical normal expresan B7.2/CD86 (**Figura 12**) pero B7.1/CD80 no. La presencia de B7.2 en epitelio cervical normal establece la posibilidad de que juegue un papel importante dentro de la respuesta inmune en la mucosa genital (Ortiz Sánchez, y otros, 2007). Este fenómeno se encontró en el 73 % de las muestras analizadas. A través de ensayos de hibridación *in situ*, se confirmó que la disminución de la proteína B7.2 en lesiones premalignas HPV-16 positivas es consecuencia de la disminución de su mRNA. Estos resultados sugieren un mecanismo de regulación negativa a nivel de transcripción de B7.2 en tejido cervical con LSIL HPV-16 positivas.

Se ha mencionado que las moléculas co-estimuladoras como B7.2 pueden ser reguladas por citocinas. Al realizar la detección *in situ* de IL-10 sobre las muestras que dejan de expresar B7.2, se demostró que dicha disminución es independiente de la presencia de IL-10. Por lo tanto, se concluyó que las células del estrato intermedio del epitelio cervical normal expresan a la molécula co-estimuladora B7.2, mientras que ésta se vio disminuida en lesiones premalignas LSIL HPV-16 positivas (**Figura 13**), siendo posiblemente la consecuencia de la disminución de su mRNA, lo que sugirió un mecanismo de regulación negativa de la transcripción del gen B7.2 en estas lesiones,

independientemente de la presencia de IL-10 (Ortiz Sánchez, y otros, 2007). Estos datos sugieren la posibilidad de una relación importante entre la presencia de HPV y la expresión de las moléculas co-estimuladoras.

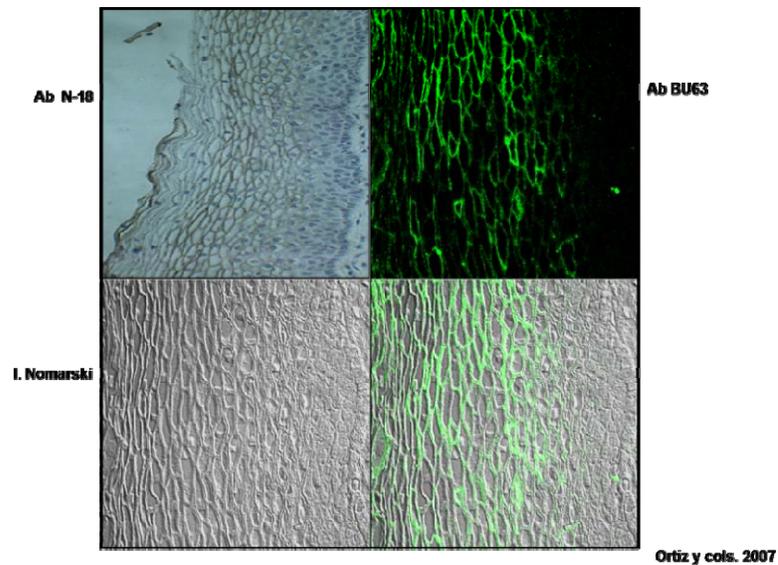
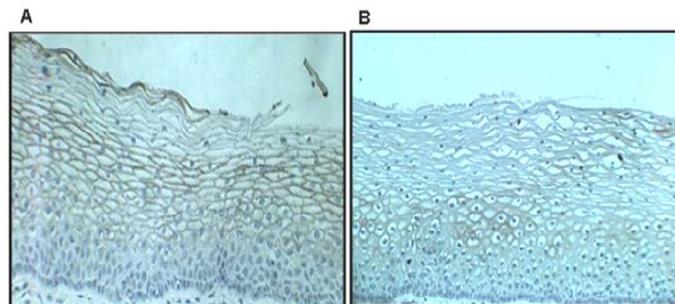


Figura 12 Detección de B7.2 en células epiteliales

Se procedió a la detección de B7.2 en tejido cervical normal con anticuerpos específicos para B7.2 como el anticuerpo N-18 y el anticuerpo BU63 a través de una inmunofluorescencia en tejido (Tomado y modificado de Ortiz Sánchez y otros, 2007).



| Normal | LSIL (HPV 16) |
|--------|---------------|
| +++ | ++ |
| 100 % | 73 % |

Figura 13 Detección de B7.2 en lesiones LSIL

Se procedió a la detección de B7.2 en epitelio cervical LSIL HPV16 positivas (lesiones de bajo grado o NIC₁) obtenidas tras una previa tipificación del virus, donde se observó una disminución en la detección B7.2 en tejido (Tomado y modificado de Ortiz Sánchez y otros, 2007).

En 2007 Hernández-Cerón realizó estudios (Tesis de Maestría, 2007) donde se analizaron varios tejidos clínicamente clasificados con diferentes grados de lesión en los cuales se procedió a la detección de la proteína B7.2 para observar su comportamiento de expresión. Se observó que

conforme el grado de lesión fue mayor, la detección por Inmunohistoquímica (IHQ) de B7.2 fue negativa para el total de muestras analizadas de NICIII ninguna fue positiva para B7.2.

| Muestras analizadas | Grado de lesión | IHQ CD86 negativo (%) |
|---------------------|-----------------|-----------------------|
| 25 | NIC I | 80% |
| 22 | NIC II | 90% |
| 13 | NIC III | 100% |

Se ha evaluado la expresión de B7.2 en lesiones LSIL HPV positivas y sin HPV (Castro, T.; Tesis de Maestría, 2005) con la intención de establecer una posible relación entre la expresión de B7.2 y la presencia del genoma viral de HPV, mediante IHQ. Encontrando una disminución de B7.2 sobre la membrana de las células epiteliales cervicales en muestras HPV positivas.

Justificación

El sistema inmune tiene un papel importante en la detección de infecciones. La regresión de condilomas inducidos por HPV se ha asociado con una infiltración de linfocitos dentro de las lesiones que correlaciona con la prognosis en el CaCU escamoso (Man 1998; Feltkamp, y otros 1995). Los linfocitos T CD4+ (Th) son las principales células que intervienen en la prognosis junto con linfocitos CD8+ (CTLs) y células NK (Coleman, 1994).

Es indispensable la activación apropiada de los linfocitos T y el reconocimiento del antígeno por las APCs profesionales (DC, linfocitos B, etc.) así como posiblemente en APCs no profesionales (queratinocitos), entre otras. La señal co-estimuladora generada por proteínas de la familia de B7 y su interacción con sus receptores en las células T, es de suma importancia para dicha activación.

Generalmente los tumores no-hematopoyéticos no expresan moléculas co-estimuladoras, lo que puede generar células T anérgicas. No es claro si los queratinocitos infectados o transformados con HPV son capaces de activar CTLs específicos, ya que estas células cultivadas *in vitro*, no expresan moléculas co-estimuladoras, lo que podría impedir una acción estimuladora adecuada de los linfocitos T bajo estas condiciones (Syrjänen, 1999).

Sin embargo, se ha demostrado que células epiteliales derivadas de cérvix normal expresan la molécula B7.2. En lesiones premalignas con HPV-16 se detectó una disminución de la presencia de B7.2 en la membrana de las células epiteliales, lo que implica que en estas lesiones, aún cuando las moléculas MHC-II de estas células pudieran presentar algún péptido específico (viral ó celular) al receptor de células T de los linfocitos T CD4+ o CD8+, estas células no serían activadas (Ortiz Sánchez, y otros, 2007) lo que sugiere la posibilidad de la participación de éstas en la activación de los linfocitos T presentes en el tejido cervical y la regulación de la respuesta inmune mediante mecanismos aún no bien definidos, por tanto se ha considerado importante evaluar la presencia de proteínas pertenecientes a la familia B7 en células derivadas de carcinoma cervical.

La expresión de las proteínas puede alterarse gracias a una posible relación con la presencia del genoma de HPV en las células derivadas de carcinoma cervical, ya que se ha podido observar, por lo menos alteraciones en la expresión de B7.2 en condiciones similares (Ortiz Sánchez, y otros, 2007).

La presencia de proteínas co-estimuladoras en dichas células podría estar vinculada con la presencia de HPV, lo que podría generar variaciones en la expresión de las mismas, mediante mecanismos de regulación negativa por parte del virus hacia las proteínas presentes, inhibiendo su expresión y función celular.

Por tanto, se analizará la expresión de las proteínas de la familia B7 en líneas celulares derivadas de carcinoma cervical con la presencia del genoma de HPV y en ausencia del mismo; estas condiciones podrían permitir sugerir la relación entre la presencia de HPV y la función de las proteínas co-estimuladoras. Ya que al no permitir la señal co-estimuladora no se activarán los linfocitos TCD4+ y no habría producción de citocinas inhibiendo la activación y diferenciación de los linfocitos TCD8+, al no activarse no se procede a la eliminación del agente infeccioso permitiendo el alojamiento del virus permitiendo la evolución de la enfermedad.

Hipótesis

La presencia del Virus del Papiloma Humano (HPV) en líneas celulares derivadas de cáncer cérvico-uterino (CaCU) puede afectar la expresión de las proteínas co-estimuladoras de la familia B7; por lo tanto, estas moléculas se verán afectadas a nivel de transcripción (mRNA) y expresión proteica.



METODOLOGÍA

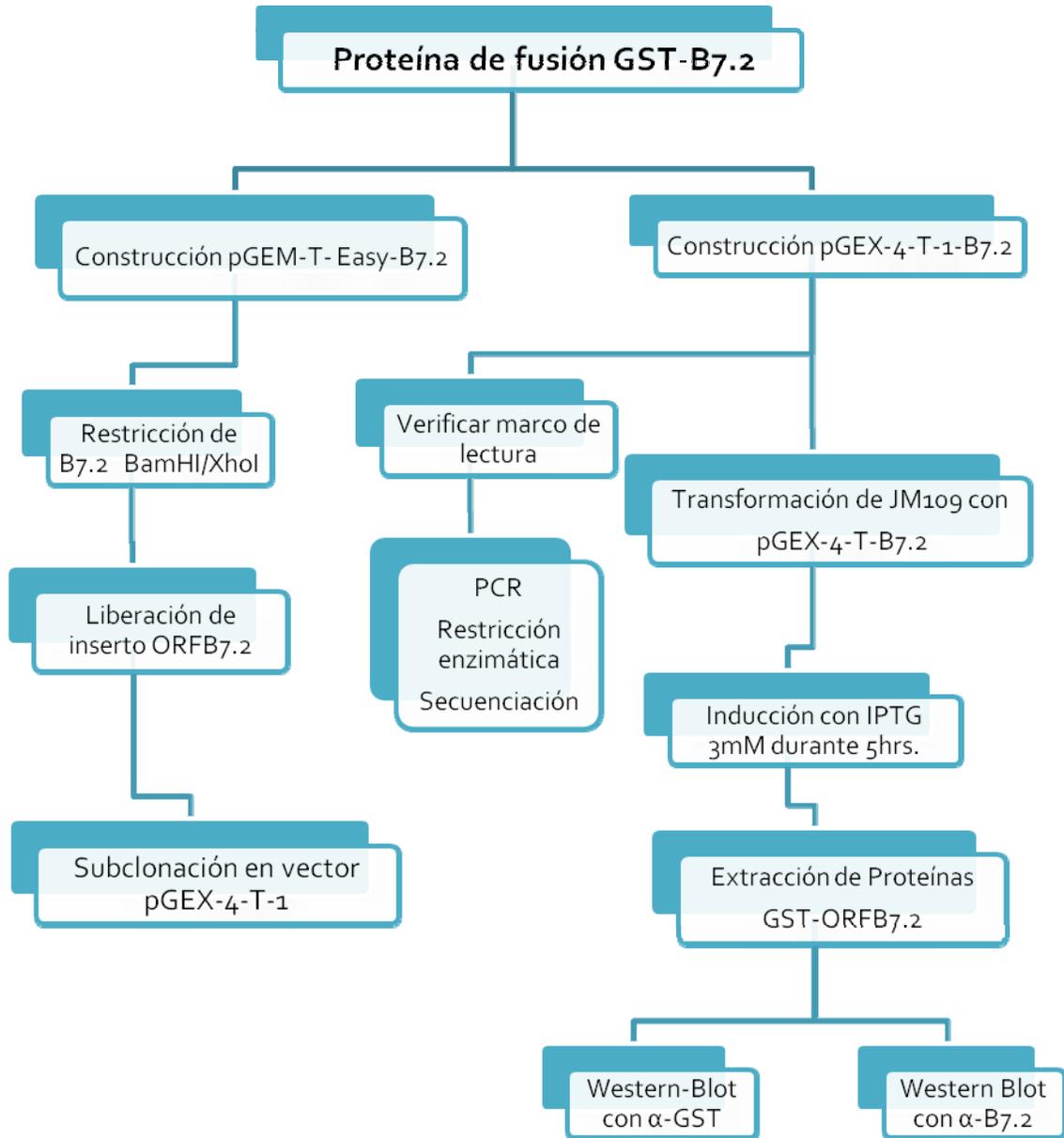


Figura 14 Estrategia Experimental

El análisis de la expresión de las proteínas co-estimuladoras B7.1, B7.2 y B7.H1 y B7.H2 se realizará en líneas celulares derivadas de carcinomas cervicales que presentan integrado el genoma de HPV de alto riesgo de los tipos 16 y 18 (HPV positivas) y en líneas celulares que no presentan esta condición (HPV negativas). Las líneas celulares a utilizar son: C-33A, HeLa, SiHa, CaSki, RaJi, HaCaT y JurKat.

| Línea celular | Origen | Grado de lesión | HPV |
|---------------|-----------------------------|-----------------|-----|
| SiHa | Células escamosas de cérvix | Carcinoma | 16 |
| HeLa | Epitelio de cérvix | Adenocarcinoma | 18 |
| CaSki | Epitelio de cérvix | Carcinoma | 16 |
| C-33 A | Cérvix | Carcinoma | - |
| HaCat | Células epiteliales | - | - |
| RaJi | Células B | - | - |
| JurKat | Células T | - | - |

Tabla 1 Características y origen de las líneas celulares.

Previamente serán cultivadas en monocapa y en suspensión (RaJi y JurKat). Se obtendrán cultivos por cada una tanto para la extracción de RNA como de proteínas. Las líneas HaCat, RaJi y JurKat serán los controles positivos para las distintas metodologías por su expresión comprobada de proteínas co-estimuladoras.

Se emplearán líneas celulares carentes del genoma de HPV o **HPV negativos** como C-33A y células derivadas de carcinomas cervicales con el genoma de HPV o **HPV positivos** como SiHa, HeLa y CaSki.

Extracción de RNA

La extracción de RNA total se realizará con el método de Trizol (fenol- isotiocianato de guanidina-cloroformo-acetato de sodio) que permite la extracción de RNA en condiciones ácidas aislando fácilmente a éste en una fase ácida-acuosa superior formada tras la aplicación de una fuerza centrifuga separándolo del DNA, proteínas y restos celulares.

Agregar 1ml de Trizol por caja, se mezcla homogéneamente hasta lisar, se agregan 200µl de cloroformo y se agita vigorosamente por 15 segundos, se incuba a temperatura ambiente por cinco minutos, se aplica una fuerza centrifuga de 12,500rpm a 4°C por 15 minutos, para separar de los restos celulares generados. Se recupera la fase acuosa y se coloca en un tubo de 1.5ml estéril. Para precipitar se agregan dos volúmenes de isopropanol y se deja incubar a -20°C por 20 minutos, se centrifuga a 12,500rpm a 4°C por 15 minutos y se desecha el sobrenadante, la pastilla

se lava con etanol al 70% (frío) y se aplican las mismas condiciones de sedimentación, se decanta y se deja secar a temperatura ambiente. Se resuspende en agua libre de RNAsas (enzimas degradadoras de RNA) o aplicar un tratamiento con DNAsa (enzima capaz de eliminar restos de DNA sin RNAsa).

- **Tratamiento con DNAsa**

El RNA es sometido a un tratamiento con DNAsa Turbo donde las pastillas de RNA obtenidas se resuspenden en 26µl de agua bidestilada, desionizada y estéril y libre de RNAsa, 3µl de buffer DNAsa libre de RNAsa 1x y 1µl de la enzima *DNase Turbo* (correspondiente a 2u). Se incuba a 37°C por 30 minutos, se adiciona 2µl de *Reagent Inhibitor*, incubar a temperatura ambiente por tres minutos (mantener resuspendido) y centrifugar a 12,500rpm por tres minutos.

Para confirmar la pureza del RNA se emplea un gel de agarosa desnaturalizante para RNA; la cámara de electroforesis es tratada con una solución de 0.5N de NaOH (Hidróxido de Sodio) para inhibir las RNAsas posibles mientras que a la matriz de agarosa se le agrega formaldehído al 37% y buffer de corrida o MOPS 10x y de igual forma la muestra de RNA debe mezclarse con buffer de corrida, formaldehído 37%, formamida, buffer de muestra y bromuro de etidio (dilución 1:10).

Síntesis de cDNA

Para la obtención del mRNA que conforma entre el 1 y 2% del RNA total y que puede ser separado del rRNA y tRNA gracias a que en su extremo 3' el RNA eucarionte es rico en Adenina (A) formando extremos conocidos como colas poliA de los transcritos de mRNA (que sirve como molde para la traducción de proteínas).

Se puede obtener DNA complementario (cDNA) empleando como molde mRNA gracias a un iniciador rico en Timina (T) o poliT conocido como oligo dT, que permitirá aislar al mRNA del RNA total, ya que se une a la cola poliA permitiendo hacer cDNA únicamente de mRNA. Para la síntesis de cDNA a partir del RNA, se emplea una enzima DNA polimerasa dependiente de RNA para la síntesis de cDNA con RNA como molde. La enzima reversa transcriptasa M-MLV RT (*Moloney Murine Leukemia Transcriptase*, Promega), se ha utilizado para la obtención de cDNA y se lleva a cabo el mismo procedimiento para cada línea celular. Para dicha síntesis se toma un volumen equivalente a una concentración de 2.5µg de RNA de cada línea celular y se aplican las mismas condiciones para todos los casos.

Se agrega 1µl de Oligo dT (equivalente a 500µg/ml) y se afora con agua bidestilada, desionizada y estéril a un volumen final de 13.5µl. Las muestras se colocan a -70°C por cinco minutos y se colocan inmediatamente en hielo y se deja incubar por lo menos 10 minutos. Sin remover se agrega el buffer de reacción M-MLV RT, dNTPs (desoxidinucléotidos trifosfato), RNAsin (inhibidor

de amplio espectro de RNAsas) y la enzima M-MLV RT encargada de síntesis del templado de cDNA.

| Mezcla de reacción | Volumen final |
|--------------------|---------------|
| 5x buffer M-MLVRT | 5 μ l |
| 1.25mM de dNTPs | 5 μ l |
| 20u RNA sin | 0.5 μ l |
| Enzima M-MLVRT | 1 μ l |

Tabla 2 Mezcla de reacción para síntesis de cDNA

Se mezcla con agitación manual y se incuba a 42°C por una hora y se inactiva la acción enzimática a 70°C por 15 minutos. Se finaliza colocando en hielo la mezcla y se preparan alícuotas de acuerdo al uso.

RT-PCR

Una reacción de RT-PCR (*Retro Transcriptase-Polimerase Chain Reaction* o Transcripción Reversa-acoplada con una Reacción en Cadena de la Polimerasa) que permite la amplificación de una cantidad pequeña de moléculas blanco de RNA (mRNA) con gran especificidad. Es indispensable aclarar que aunque comúnmente la RT-PCR es conocida como un mismo procedimiento, en realidad consiste en dos partes, bien diferenciadas en cualquier RT-PCR: la transcripción reversa (RT) donde se sintetizan copias de DNA (cDNA) a partir de cadenas molde de RNA y la amplificación (PCR) que en conjunto es conocida como RT-PCR (Cseke, y otros, 2004).

Para emplear la PCR, es necesario tener un conjunto de cebadores/iniciadores que se emplean para amplificar de forma exponencial fragmentos deseados del DNA molde. Los iniciadores dirigen la síntesis de la cadena molde, para ello se requiere un par de *cebadores*; es decir, un cebador sentido (dirección 5') y otro que flaquee en sentido contrario o cebador antisentido (dirección 3').

Obtener el valor real de la concentración de cDNA no es sencillo debido a que no se somete a un proceso de purificación y se encuentra contenido en la mezcla de síntesis.

Por tanto, la estandarización de las condiciones para la evaluación de la expresión del mRNA de cada una de las proteínas co-estimuladoras. Para lograrlo se procede a amplificar una región del gen constitutivo GAPDH, con un tamaño de 350pb y así llevar a cabo una normalización con los cebadores, siendo el cebador sentido GAPDHFwd 5'CATCTCTGCCCCCTCTGCTGA3' y el antisentido GAPDHRev 5'GGATGACCTTGCCACAGCCT 3'.

Las condiciones obtenidas de la normalización se aplican a todas las reacciones de PCR para cada uno de los genes, estandarizando el protocolo de PCR preparando una mezcla maestra de reacción o *Master Mix* donde se colocan todos los elementos para después ser divididos y así todos los ensayos tengan las mismas proporciones de cada elemento. Cada ensayo tendrá un volumen

final de 15µl, en el caso del control negativo no llevará cDNA, el volumen será aforado con agua destilada, desionizada y estéril para todos los casos

| Reactivos | Control - | C-33A | CaSki | HeLa | SiHa | JurKat | HaCat |
|-----------------------|-----------|---------|---------|---------|---------|---------|-------|
| 1x Buffer | 21.0 µl | | | | | | |
| 3mM MgCl ₂ | 6.3 µl | | | | | | |
| 10pmol/µl dNTPs | 4.2 µl | | | | | | |
| 10pmol/µl Oligo 5' | 4.2 µl | | | | | | |
| 10pmol/µl Oligo 3' | 4.2 µl | | | | | | |
| cDNA | | 0.6 µl | 0.7 µl | 0.6 µl | 0.5 µl | 1.0 µl | 2µl |
| Agua | 9.15µl | 8.55 µl | 8.45 µl | 8.55 µl | 8.35 µl | 8.15 µl | 6.8µl |
| Taq Polimerasa | 1.05 µl | | | | | | |

Tabla 3 Mezcla de reacción para PCR

Para la amplificación de los genes correspondientes a cada una de las moléculas co-estimuladoras, se han de emplear distintos cebadores específicos para cada una de ellas, a continuación se muestran las secuencias correspondientes a cada una de las moléculas.

| Oligonucleótidos | Secuencia |
|---------------------------|---|
| B7.2 entre los exones 7-8 | B7.2 Exon7 5' GAGAGGGAAGAGAGTGAACA3' |
| | B7.2PoliA 5' GCCATAAGTGTGCTCTGAA3' |
| B7.1 | B7.1S 5' AGTACAAGAACCGGACCATC3' |
| | B7.1AS 5' GCGTACACTTTCCTTCTC3' |
| B7.H1 | B7H1Fw 5' GACCTATATGTGGTAGAGTATGGTAG3' |
| | B7H1Rev 5' TTCAGCTGTATGGTTTTTCCTCAGGATC3' |
| B7.H2 | B7H2Fw 5' CTGGGATCCAGCAGTFFTCCTTCT 3' |
| | B7H2Rev 5' CCCTGGGATTCAGGAGGTTTT 3' |

El perfil térmico para la Amplificación de B7.2 exones 7-8, B7.H1, B7.H2 y B7.1 es el mismo, las temperaturas empleadas son: 96°C por cinco minutos; posteriormente un conjunto de 35 ciclos con 96°C por un minuto para la desnaturalización, 60°C por un minuto para la hibridación y 72°C por minuto y medio para la extensión; al finalizar los 35 ciclos se agregan diez minutos a 72°C complementarios para garantizar la Amplificación.

Extracción de Proteínas

La extracción de proteínas de cada línea celular se realiza con el método de M-PER (*Mammalian Protein Extraction Reagent* o Reactivo de Extracción de Proteínas Mamíferas). Permite la extracción de proteínas citoplasmáticas y nucleares derivadas de cultivos de células de mamíferos; dicho reactivo utiliza la propiedad detergente del buffer bicina (25mM), para la lisis celular. La extracción de proteínas con M-PER se realiza con las mismas condiciones para cada línea celular, se agregan 300µl del reactivo M-PER por cada caja p100 de la cual se han de extraer las proteínas.

Por succión se extrae el medio de cultivo a las células, se lava con 1ml de PBS 1x y se mezcla homogéneamente, nuevamente por succión se retira el PBS 1x y se agregan los 300µl del reactivo M-PER suplementado con OrtoVaOq, NaF (Fluoruro de Sodio), PMSF (inhibidor de proteasas), al suplementar el M-PER tan sólo deben agregarse 15µl del conjunto de elementos del suplemento por cada 300µl de M-PER. Se agita gentilmente durante cinco minutos mientras son lisadas las células, se colecta el lisado y es transferido a un tubo de microcentrifuga de 1.5ml limpio, se aplica una fuerza centrifuga de 14,000rpm durante cinco o diez minutos, se recupera el sobrenadante y coloca en otro tubo de 1.5ml limpio; se separa en alícuotas de 100µl y se etiquetan, se cuantifican y las que se usen pronto se guarda a -20°C, de lo contrario a -70°C.

Western blot

A través del Western-blot o Inmunodetección, se procede a la detección de las proteínas co-estimuladoras de la familia B7 gracias a su interacción con anticuerpos (Ab) específicos. El Western blot permite un análisis basado en la hibridación de proteína-proteína. La especificidad de la unión antígeno-anticuerpo permite la detección de una única proteína dentro de una mezcla compleja (Cseke, y otros, 2004).

De la mezcla de proteínas obtenida se toma el volumen equivalente a una concentración de 40µg/µl de proteína de cada línea celular y se agrega un volumen igual de buffer de carga suplementado con β-mercaptoetanol, se mezcla bien y se someten a ebullición por cinco minutos (para desnaturalizar) y son cargadas en el gel para separar la proteínas de acuerdo a su peso molecular a través de una migración electroforética en una gel de poliacrilamida desnaturalizante al 10% (SDS-PAGE) durante una hora a 25mAmp. Se equilibran las muestras para la transferencia, colocando el gel en buffer de Transferencia (metanol-tris-base-glicina) frío (4°C) durante 30 minutos, con agitación constante.

Posteriormente se transfieren las proteínas a una matriz que facilite su manipulación como las membranas de nitrocelulosa. El proceso de transferencia tiene las mismas condiciones para todos los ensayos, que consta de un voltaje constante de 95V a 4°C durante 95 minutos, la transferencia se realiza en una cámara que se cubre por completo con buffer de Transferencia. Al terminar la transferencia se separa la membrana y se tiñe con rojo de Panceau (Ac. sulfosalicilico-Ac. tricloracetico-Rojo de Panceau) para comprobar la transferencia de proteínas a la matriz.

Antes de la interacción con el anticuerpo primario se requiere bloquear la membrana, bloqueando los espacios de la membrana donde no se encuentre algún producto proteico cubriéndola con leche en polvo (Svelty 0% grasa, Nestlé) al 5% disuelta en PBS-Tween20 al 0.1% durante una hora

para después; sin enjuagar, colocar la membrana para su interacción con el anticuerpo primario y dejar incubando a 4°C toda la noche; un tiempo de incubación no menor a 16 horas. Hasta este punto, el procedimiento se repetirá para todos los ensayos aunque los anticuerpos primarios sean distintos.

| Proteína | Ab primario | Origen | Dilución |
|----------|-------------|---------------------|----------|
| B7.1 | B7.1 | Monoclonal de ratón | 1:100 |
| B7H | E-19 | Policlonal de chivo | 1:500 |
| B7.2 | C-19 | Policlonal de chivo | 1:500 |
| B7.2 | BU63 | Monoclonal de ratón | 1:500 |

Transcurrido el tiempo se retira el anticuerpo primario y se realizan dos lavados con 10ml de PBS-Tween20 al 0.1% por diez minutos con agitación constante, posteriormente se coloca el anticuerpo secundario en PBS 1x y se deja incubar de 1 a 2 horas, dependiendo de las características del mismo y de la concentración de éste. Tras el periodo de incubación se realizan tres lavados de PBS-Tween20 al 0.1% de 10 minutos cada uno y un lavado final de PBS 1x durante 10 minutos. Se retira el PBS 1x y se procede a revelar la membrana; no debe dejarse secar ésta, por lo tanto se vuelve a agregar PBS 1x hasta revelar.

| Ab primario | Ab secundario | Dilución | Exposición a ECL |
|-------------|-----------------|----------|------------------|
| B7.2 (BU63) | α -ratón | 1:2000 | 5 minutos |
| B7.2 (C-19) | α -chivo | 1:20000 | 5 minutos |
| B7.1 | α -chivo | 1:2000 | 10 minutos |
| B7H (E-19) | α -chivo | 1:10000 | 10 minutos |

El anticuerpo secundario se encuentra marcado con la enzima peroxidasa HRP (*Horseradish peroxidase*) que emite una señal detectable generada por la acción de la enzima en un sustrato específico como el ECL; dicha reacción, consiste en la oxidación del ECL en la presencia de la Hidrógeno peroxidasa (H_2O_2 peroxidasa). La oxidación del ECL lo lleva a un estado de excitación liberando energía emitiendo luminiscencia que se traduce en la señal deseada, siendo un método con alta sensibilidad y de fácil empleo. La emisión de luz hace referencia a que los anticuerpos detectaron la proteína o proteínas deseadas en la mezcla compleja. En todos los casos y sea cual sea el sustrato que se utilice, la intensidad de la señal se correlaciona con la cantidad del antígeno en la superficie de la membrana, equivalente a la cantidad de proteína (Walker, 2005).

Independientemente de tener los anticuerpos específicos para la detección de cada una de de las proteínas co-estimuladoras a través del método de Western blot se debe tomar en cuenta el hecho de que debe contarse con un control de expresión de cada una de las proteínas apropiado para comparar la expresión en las líneas celulares que se han de someter a esta metodología. En el caso de B7.2 no contamos con una línea celular apegada a nuestras características que exprese adecuadamente dicha proteína. Por lo tanto se decidió elaborar una estrategia experimental para crear un control para B7.2.

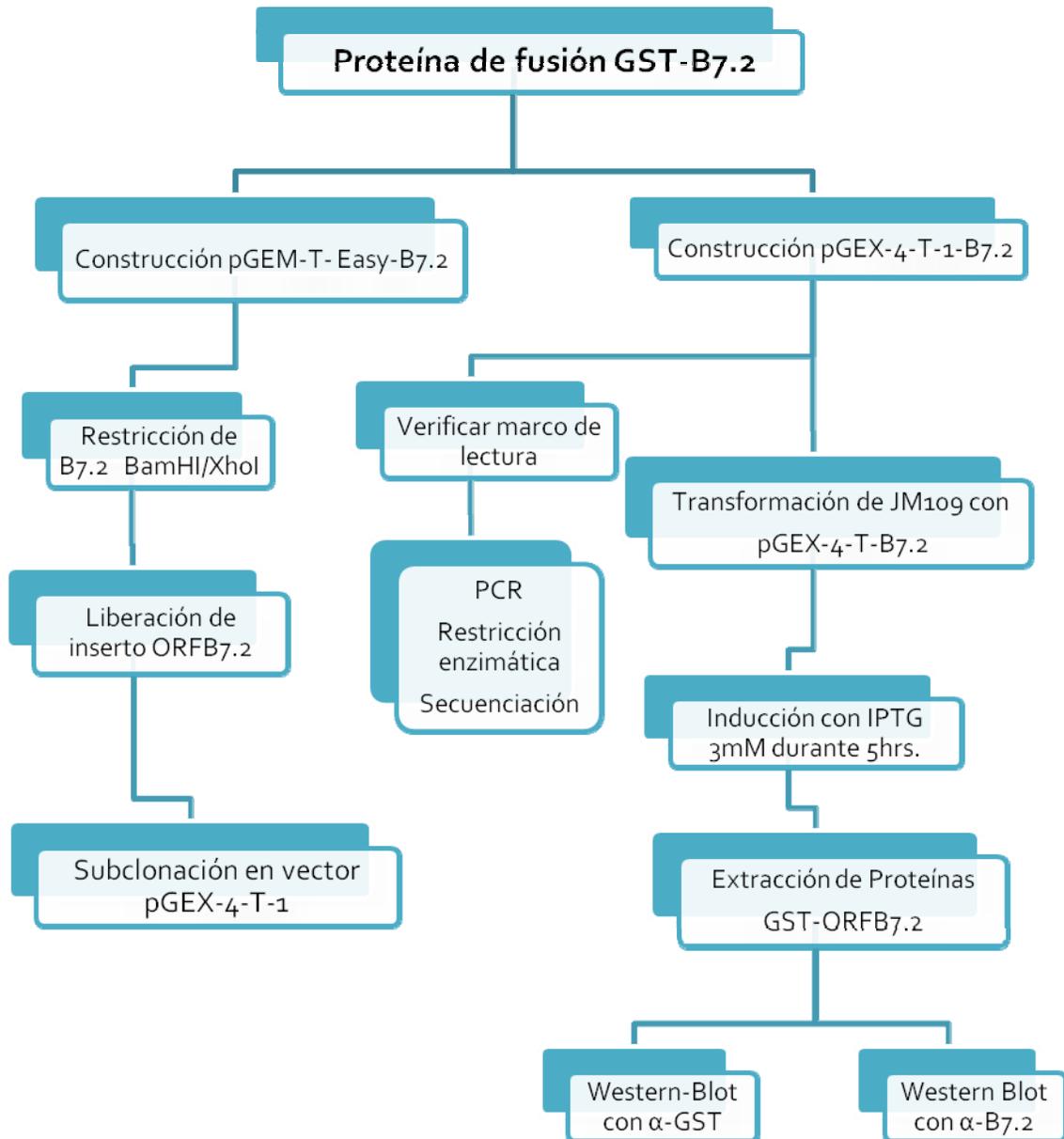


Figura 15 Estrategia experimental para proteína de fusión GST-B7.2

Diseño de la proteína de fusión GST-B7.2 permite la expresión en *E. coli* del marco de lectura abierto de la proteína co-estimuladora B7.2 que será empleada como control positivo de expresión en la detección de la proteína por Western blot.

Proteína de fusión GST-B7.2

Mediante el empleo de una PCR de punto final se obtiene un fragmento de 972 pb correspondiente al marco de lectura u ORF (*Open Reading Frame*) de la molécula B7.2/CD86 gracias al empleo de cebadores específicos Oli5CD86ORFa siendo el cebador sentido con la secuencia 5'TTGCGGATCCATGGGACTGAGTAACATTCTC3'y el cebador que flanquea en dirección opuesta o antisentido Oli3CD86ORFc con la secuencia 5'AATCTCGAGTTAAAAACATGTATCACTTTTGTGC3' diseñada para amplificar esta región de B7.2, además tienen la característica de presentar un sitio de corte para la enzima BamHI (sitio de reconocimiento 5'G_GATCC3'/3'CCTAG_G5') y la enzima XhoI (sitio de reconocimiento 5'C_TCGAG3'/3'GAGCT_C5'), que permiten obtener mediante una restricción enzimática nuevamente el fragmento completo.

La secuencia del ORF de B7.2 para este caso presenta tres mutaciones, que no generan ningún cambio en la estructura y funcionalidad de la proteína, siendo viable para su empleo y permitiendo la expresión de B7.2 en los ensayos que se realizarán, a continuación se muestra la secuencia del ORF B7.2 donde las mutaciones presentes se encuentran subrayadas.

```

GGATCCATGGGACTGAGTAACATTCTCTTTGTGATGGCCTTCTGCTCTCTGGTGCTG
CTCCTCTGAAGATTCAAGCTTATTTCAATGAGACTGCAGACCTGCCATGCCAATTTGC
AAACTCTCAAACCAAAGCCTGAGTGAGCTAGTAGTATTTTGGCAGGACCAGGAAAA
CTTGTTCTGAATGAGGTATACTTAGGCAAAGAGAAATTTGACAGTGTTTCATTCCAAG
TATATGGGCCGCACAAGTTTTGATTGCGACAGTTGGACCCTGAGACTTCACAATCTTC
AGATCAAGGACAAGGGCTTGTATCAATGTATCATCCATCACAAAAAGCCCACAGGAA
TGATTGCGATCCACCAGATGAATTCTGAACTGTCAGTGCTTGCTAACTTCAGTCAACC
TGAAATAGTACCAATTTCTAATATAACAGAAAATGTGTACATAAATTTGACCTGCTCA
TCTATACACGGTTACCCAGAACCTAAGAAGATGAGTGTTTTGCTAAGAACCAAGAATT
CAACTATCGAGTATGATGGTATTATGCAGAAATCTCAAGATAATGTCACAGAACTGTA
CGACGTTTCCATCAGCTTGTCTGTTTCATTCCCTGATGTTACGAGCAATATGACCATCT
TCTGTATTCTGGAACTGACAAGACGCGGCTTTTATCTTCACCTTTCTCTATAGAGCTT
GAGGACCCTCAGCCTCCCCCAGACCACATTCCTTGGATTACAGCTGTACTTCCAACAG
TTATTATATGTGTGATGGTTTTCTGTCTAATTCTATGGAAATGGAAGAAGAAGAAGCG
GCCTCGCAACTCTTATAAATGTGGAACCAACACAATGGAGAGGGAAGAGAGTGAACA
GACCAAGAAAAGAGAAAAAATCCATATACCTGAAAGATCTGATGAAACCCAGCGTGT
TTTTAAAAGTTCGAAGACATCTTCATGCGACAAAAGTGATACATGTTTTTAA
    
```

Para el desarrollo de esta fase se requiere tener el fragmento ORFB7.2 para lo cual se ha de someter a la construcción pGEM-T easy-ORFB7.2 a una reacción enzimática doble con las endonucleasas BamHI y XhoI.

| Mezcla de Reacción de vector | Volumen final 20µl |
|---|--------------------|
| pGEM-T Easy-ORFB7.2 | 5µl |
| Buffer Tango 1x | 2µl |
| XhoI | 1µl |
| BamHI | 1µl |
| Agua bidestilada, desionizada y estéril | 11µl |

Tabla 4 Mezcla de reacción para restricciones enzimáticas.

Se deja la reacción enzimática toda la noche a 37°C y se inactiva colocando la reacción durante diez minutos en hielo. Posteriormente se migran los 20µl de reacción en una matriz de agarosa al 1% hasta lograr que todas las bandas se separen y la banda correspondiente a nuestro fragmento liberado se corta. La purificación se realiza con el kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System*, Promega.

- **Clonación de B7.2**

La producción de la proteína de fusión requiere primeramente clonar el marco de lectura u ORF de B7.2 (el ORFB7.2 se emplea para todo el trabajo) en un vector o plásmido de expresión, que tras una estimulación permita incrementar los niveles de nuestra proteína de interés en la bacteria. La clonación consiste en la modificación por restricción enzimática del DNA del vector (plásmido) por la inserción de un DNA extraño o ajeno (inserto), obteniendo un plásmido recombinante, dicho plásmido recombinante puede emplearse para transformar células. Para la unión de estos, se requiere de un proceso conocido como ligación y previamente someter a la desfosforilación enzimática del vector para favorecer la inserción y unión con el plásmido y obtener el plásmido recombinante (Figura 16).

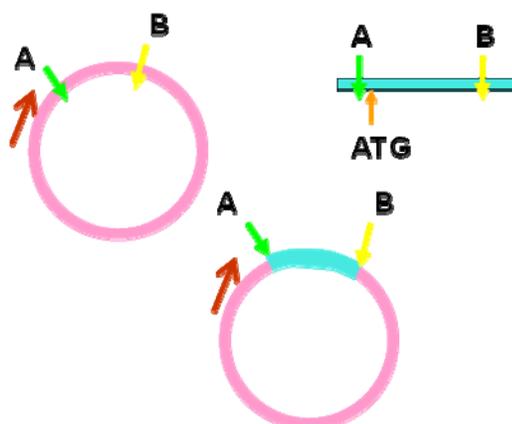


Figura 16 Clonación en plásmidos

Se muestra de manera general la finalidad de clonación dirigida por restricción enzimática siendo las mismas enzimas siendo A y B tanto al vector o plásmido de color rosa como al inserto de color azul para su posterior unión formando un plásmido recombinante; ATG corresponde a un codón de inicio que se encuentra en la secuencia del inserto.

Una vez liberado el fragmento ORFB7.2 del vector pGEM-T easy se ha de clonar en el vector de vector p-GEX-4T-1 (*Amersham Biosciences*) ya que presenta los mismos sitios de restricción que tiene la secuencia de ORFB7.2 en los extremos, que tiene un tamaño de 4.9Kb (4969pb), y posee un sistema que permite la purificación, detección y expresión de proteínas que al fusionarse al gen GST (*Glutathione S-Transferase*) y tras su inducción, se incrementa la expresión de nuestra proteína de fusión (GST-ORFB7.2). La expresión está a cargo del promotor de *tac*, el cual es inducido por un análogo de la lactosa conocido como *isopropil β-D tiogalactoside* o IPTG (Figura 17).

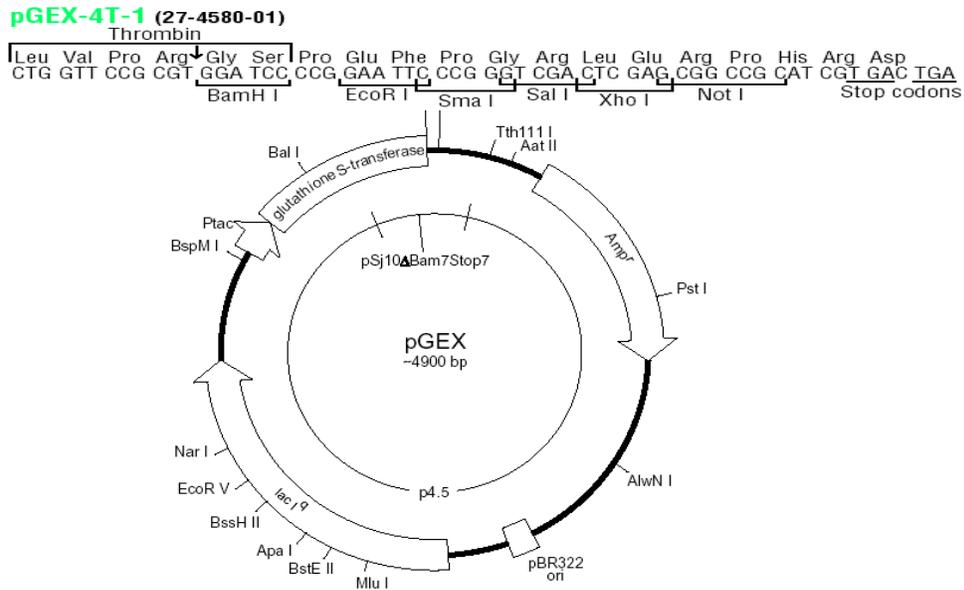


Figura 17 Mapa general de los vectores pGEX

Estructura general de los vectores pGEX, además en la parte superior se muestra la secuencia de la región del *polilinker* del vector específico empleado en este trabajo (Tomado y modificado de manual GST-Fusion System, Amersham Bioscience).

Se muestran las regiones que comparten en común todos los plásmidos de esta serie, como el gen GST o *glutathione S-transferase* que brinda la posibilidad de expresión tras un estímulo del producto de interés que ha sido insertado enseguida en la región del *polilinker*.

- **Transformación celular**

Previo a la clonación se requiere tener al plásmido pGEX-4T-1 dentro de un sistema que permita su replicación de forma frecuente y sin incorporar mutaciones para lograrlo se transforman células competentes *E. coli* de la cepa DH5 α , que brinden al plásmido las condiciones necesarias para su soporte. Las células DH5 α se transforman con 400ng/ μ l de vector vacío. A continuación se procede a tomar un volumen de 250 μ l de células competentes y se colocan a descongelar en una cama de hielo; se encuentran almacenadas a -70°C, el vector también se coloca en la misma cama durante 30 minutos, aproximadamente. Transcurrido este tiempo, se mezclan las bacterias con el vector y se somete a un shock térmico a 42°C por 90 segundos e inmediatamente se coloca en hielo nuevamente por dos minutos.

Se agregan 950 μ l de medio de cultivo SOC (medio LB más glucosa), se mezcla suavemente y se incuba a 37°C con agitación constante (250rpm) de una a dos horas. Posteriormente se plaquean dos cajas Petri con medio LB semisólido más Ampicilina (Amp) una placa diluida; se colocan 100 μ l de medio SOC más células y se aplica una fuerza centrifuga de 3,000rpm por tres minutos, se toma el sobrenadante sin tocar la pastilla y se distribuye en un medio LB semisólido, la otra caja

se siembra con una solución concentrada que se obtiene resuspendiendo la pastilla en el volumen de medio restante y se distribuye en la caja. Se deja incubar a 37°C por 16 horas o toda la noche. En todos los casos donde se requiera incubar y crecer algún tipo celular (bacterias) se deben contar con controles que tan sólo lleven el medio empleado y el antibiótico.

Se seleccionan tres colonias para resembrar (picadura) en medio LB semisólido más Amp y de ahí sembrar la misma en 15 ml de medio líquido LB más Amp (10µg/ml) y se dejan crecer ambos cultivos a 37°C por 16 horas o toda la noche. Trascorrido el tiempo los cultivos de líquidos se emplean para la extracción del plásmido.

- **Extracción de plásmido**

De los cultivos de medio líquido se extrae el plásmido. Se coloca el volumen total de 15ml en un tubo cónico de 15ml (Falcon) y es calibrado con un contrapeso (en caso de solo tener un tubo) para empastillar las células, se aplica una fuerza centrifuga de 2,500rpm por cinco minutos, se desecha el sobrenadante y se conserva la pastilla.

La extracción del plásmido se lleva a cabo al agregar a la pastilla el buffer de suspensión (300µl) y agitar suavemente hasta disgregarla y transferirla a un tubo limpio y ahí mismo agregar los buffers de lisis celular y neutralización (300µl de cada uno) los cuales serán mezclados varias veces de manera homogénea. Se agrega 1ml de la solución de resina y se pasa por la columna, se agregan 2ml de solución de lavado y se pasa nuevamente se pasa por la columna. Finalmente se eluye en 30µl de agua desionizada, bidestilada y estéril (libre de nucleasas). La extracción del plásmido pGEX-4T-1 se basa en el empleo del kit de extracción *Wizard Plus Minipreps DNA Purification System*, Promega. Tras la elución se cuantifica en una dilución 1:25 por espectrofotometría.

- **Clonación en pGEX-4T-1**

Para la clonación del ORFB7.2 en el pGEX-4T-1 se requiere liberar el inserto de la construcción pGEM-T easy-ORFB7.2. Para ello ésta última se somete a una restricción enzimática con las enzimas BamHI y XhoI para extraer el inserto ORFB7.2, el cual se clonará nuevamente pero en el vector pGEX-4T-1. Éste último presenta en la región del polilinker los mismos sitios de reconocimiento para estas enzimas sin alterar su funcionalidad (**Figura 18**).

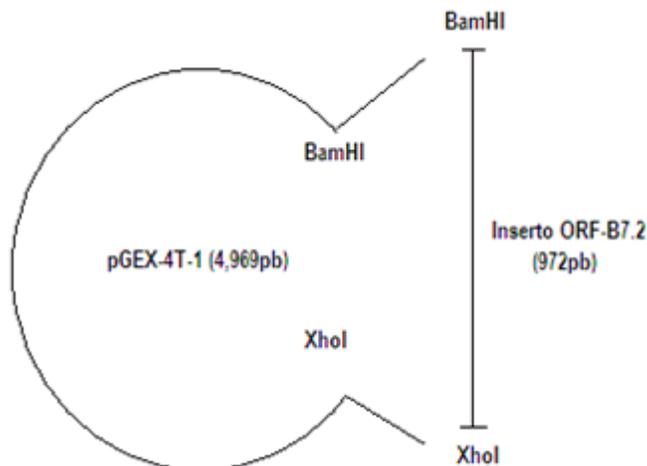


Figura 18 Diseño de la construcción pGEX-4T-1-ORFB7.2

Mapa de la construcción diseñada donde se muestran los sitios de restricción de las enzimas BamHI y XhoI así como los respectivos tamaños de cada uno de los elementos.

- **Desfosforilación y Ligación**

Con el objetivo de unir el fragmento de ORF B7 con el vector pGEX-4T-1 para obtener el plásmido recombinante, se realiza una reacción de ligación. Para ello, previamente, se desfosforila el vector vacío con el objetivo de disminuir la probabilidad de religado o restablecimiento del mismo. Se emplea una enzima conocida como T₄ DNA ligasa (Fermentas) que cataliza la reacción de ligación entre los fragmentos de DNA que contengan un extremo 5' con un grupo fosfato y un extremo 3' con un grupo hidroxilo, favoreciendo la unión. Si bien se utilizaron dos enzimas diferentes (BamHI y XhoI) para generar extremos cohesivos no complementarios, el uso de la fosfatasa disminuye la probabilidad de religado del vector en el caso de que una de las enzimas no haya funcionado apropiadamente.

Únicamente el vector que ha sido restringido es desfosforilado; en este caso, se emplea la enzima fosfatasa alcalina de camarón (SAP), la cual se coloca en una proporción 1:1 (1µl de SAP por 1µg de DNA de vector). La reacción de desfosforilación lleva una concentración de 50ng/µl del vector pGEX-4T-1, 0.5µl de la fosfatasa SAP, 1µl de buffer de reacción 1x y agua desionizada y bidestilada para aforar a un volumen final de 10µl, se incuba a 4°C durante toda la noche (aunque puede dejarse dos horas a temperatura ambiente), y es desactivada a 65°C durante diez minutos.

Una vez realizada esta condición se procede a ligar el vector y el inserto. Se coloca en un tubo de microcentrifuga una proporción adecuada de DNA tanto de vector como de inserto, este valor se obtiene gracias a la aplicación de la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{ng de vector} \times \text{kb de inserto}}{\text{kb de vector}} \times \text{relación molar} \frac{\text{inserto}}{\text{vector}} = \text{ng de inserto}$$

Por ejemplo, para nuestro caso específico se obtuvieron los siguientes valores obtenidos:

$$\frac{100 \text{ ng de vector} \times 1 \text{ kb de inserto}}{4.9 \text{ kb}} \times 5/1 =$$

$$20.4 \text{ ng} \times 5 = 102.4 \text{ ng de inserto}$$

Componentes agregados a la mezcla de ligación:

| Mezcla de Reacción | Volumen final de 10µl |
|--------------------------|-----------------------|
| Buffer de ligación 10x | 1µl |
| DNA vector (100ng/µl) | 2 µl |
| DNA inserto (102.4ng/µl) | 3 µl |
| Enzima T4 DNA ligase | 1 µl |
| Agua | 3 µl |

Tabla 5 Mezcla de reacción de ligación.

- **Construcción pGEX-4T-1-B7.2**

Se procede a confirmar la integración correcta de la construcción pGEX-4T-1-ORFB7.2, siendo que ORFB7.2 se insertó en dirección SP6-T7 mediante tres métodos. Por método enzimático con endonucleasas que poseen dos sitios de restricción; uno en el genoma del plásmido pero con un solo sitio de corte y de igual manera en el genoma del inserto. Tras el análisis de ambas secuencias (del vector y del inserto) se seleccionó a la enzima PstI (sitio de reconocimiento 5'CTGCAG3'/3'GACGTC5') y la enzima Eco911 o BstEII (sitio de reconocimiento 5'GCT_N_ACC3'/3'CCA_N_TGG5'); ambas de la marca Fermentas. Una vez sometida la construcción a la acción de estas enzimas se formarán patrones distintos de restricción que dependerán de la inserción correcta o no de ORF-B7.2 (**Figura 19**).

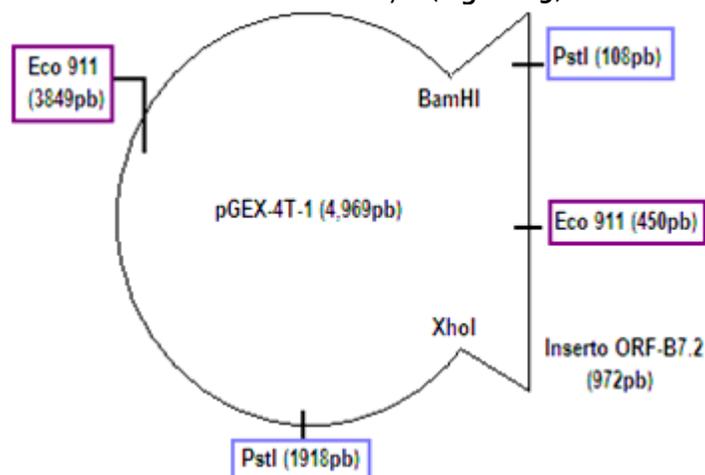


Figura 19 Construcción pGEX-4T-1-ORFB7.2

Mapa de restricción y patrón de tamaños arrojados tras la restricción con las enzimas PstI y Eco911 empleadas para verificar la inserción correcta.

Se realizan las restricciones por separado pero bajo las mismas condiciones, siendo para cada reacción una mezcla que contiene una concentración final de:

| Mezcla de reacción PstI | Volumen final 10µl | Mezcla de reacción Eco911 | Volumen final 10 µl |
|-------------------------|--------------------|---------------------------|---------------------|
| Buffer PstI (1x) | 1 µl | Buffer Eco911(1x) | 1 µl |
| DNA plásmido | 7 µl | DNA plásmido | 7 µl |
| Enzima PstI | 2 µl | Enzima Eco911 | 2 µl |

Tabla 6 Mezclas de reacción para restricción enzimática de pGEX-4T-1-ORFB7.2

Se dejan las reacciones de restricción durante toda la noche a 37°C, y se inactiva la enzima correspondiente colocando la reacción en hielo por diez minutos. Para verificar que se llevó a cabo la restricción se migra una porción pequeña de 5µl de la reacción en una matriz de agarosa al 1% y así poder observar el patrón de restricción esperado, siendo un patrón ideal aquel donde se obtienen dos bandas distintas para cada caso, siendo para PstI dos bandas (4056pb y 1827pb) y para Eco911 dos bandas (3425pb y 2455pb).

Igualmente se verifica que el inserto esté completo, ya que de lo contrario se vería alterada la expresión de nuestro fragmento. Para ello, a través de una PCR de punto final, donde se procede a amplificar el fragmento ORFB7.2 de 972pb con el par de cebadores o iniciadores siendo el iniciador sentido Oligo5CD86ORFa 5' TTGCGGATCCATGGGACTGAGTAACATTCTC 3' y el iniciador antisentido Oligo3CD86ORFc 5' AATCTCGAGTTAAAACATGTATCACTTTTGTGTC 3'; la mezcla de reacción donde el agua empleada siempre es bidestilada, desionizada y estéril y que contiene los siguientes componentes:

| Mezcla de reacción | Volumen final 50 µl |
|-------------------------|---------------------|
| Buffer (1x) | 10 µl |
| MgCl ₂ (3mM) | 6 µl |
| dNTPs (10pmol c/u) | 2 µl |
| Oligo 5' (10pmol) | 2 µl |
| Oligo 3' (10pmol) | 2 µl |
| DNA (287.5ng/ µl) | 1 µl |
| Agua | 25.5 µl |
| Enzima Taq polimerasa | 0.5 µl |

Tabla 7 Mezcla de reacción para PCR para pGEX-4T-1-ORFB7.2

Con un perfil térmico de 96°C durante 5 minutos iniciales, seguidos de 40 ciclos iniciando con 94°C durante un minuto para desnaturalización, 60°C durante un minuto para la hibridación seguidos de 72°C durante un minuto y medio para la extensión, al finalizar se agregan diez minutos de 72°C complementarios. Tras la reacción se migra una porción de la muestra de 5 µl en una matriz de agarosa al 1% para verificar la amplificación.

- **Secuenciación**

Es necesario comprobar de manera contundente que el fragmento ORFB7.2 ha quedado en marco de lectura dentro del vector, para ello se procede a analizar la secuencia completa donde se incluya información del plásmido con el inserto, secuenciando en dirección SP6-T7 con los oligonucleótidos diseñados para secuenciar en pGEX, en este caso se empleó el cebador pGEXSeq5 con la secuencia 5'GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG3'. Se procede a secuenciar el producto completo con el kit de secuenciación *Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)*, que establece las condiciones de la mezcla de reacción de secuenciación, siendo:

| Mezcla de reacción | Volumen final 20 µl |
|--|---------------------|
| Oligo pGEX5Seq | 3 µl |
| <i>Ready mix reaction</i> | 4 µl |
| Buffer de reacción 5x | 4 µl |
| Agua bidestilada y desionizada estéril | 3.5 µl |
| DNA pGEX-4T-1-ORFB7.2 | 5.5 µl |

Tabla 8 Mezcla de reacción para Secuencia de pGEX-4T-1-ORFB7.2

El perfil térmico para la reacción fue de 98°C al inicio seguidos de 30 ciclos iniciando con 98°C por 20 segundos de desnaturalización, 50°C por 10 segundos para alineamiento y por último 60°C por cuatro minutos para la extensión o hibridación, finalizando con un ciclo de 60°C por cuatro minutos.

Una hora previa a la finalización de la reacción de secuencia se equilibra una columna; o el número de columnas necesarias dependiendo del número de reacciones realizadas, con 800 µl de agua bidestilada y desionizada estéril, evitando las burbujas, colocar inmediatamente en un contenedor y someter a una fuerza centrífuga de 3000rpm durante tres minutos. Una vez equilibrada la columna y finalizada la reacción, verter la mezcla de reacción en el centro de la columna sin tocar las paredes y someter a una fuerza centrífuga igual. Posteriormente se seca la muestra de secuencia sometiéndola a un desecador centrífuga con vacío por 30 minutos y se envía a leer la secuencia en la Unidad de Ácidos Nucléicos del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN.

Tras la confirmación del alineamiento correcto se procede a inducir la expresión de la proteína fusión GST-ORFB7.2 dentro del vector con IPTG.

- **Inducción de GST-B7.2**

De las células DH5α transformadas con la construcción pGEX-4T-1-ORFB7.2 se extrae el plásmido con el kit de extracción *Wizard Plus Minipreps DNA Purification System*, Promega.

A continuación se transforman dos alícuotas de células competentes JM109 con un volumen de 200µl cada una y se manejan diferentes concentraciones de la construcción pGEX-4T-1-ORFB7.2 para la transformación. A una alícuota de células JM109 se agregará una concentración de 430ng de DNA de la construcción (equivalente a 1.5µl), mientras que a la otra se le agregará una concentración de 575ng de DNA de la construcción (equivalente a 2µl). Se colocan los tubos de 1.5ml que contienen las células JM109 y al plásmido pGEX-4T-1-ORFB7.2. Una vez descongeladas las fracciones se procede con el protocolo de Transformación celular, previamente descrito.

Una vez obtenidas la colonia o colonias, se selecciona, de ser posible por lo menos cinco colonias. El crecimiento nos permite suponer que se han transformado las células formando a los sistemas JM109-pGEX-4T-1-ORFB7.2 y así podemos iniciar la inducción de la proteína de fusión.

Se coloca un cultivo de aquellas colonias seleccionadas, debe tenerse cuidado de no mezclar las colonias y tenerlas bien identificadas ya que el trabajo será simultaneo. Las colonias seleccionadas son sembradas nuevamente en placas de medio LB más Amp (por picadura) y se coloca un pie de cultivo de medio líquido LB más Amp y se deja incubando a 37°C por 20 horas con agitación constante de 250rpm. Se agregan un par de controles siendo, un control que no será inducido para cada colonia y un control positivo de crecimiento y de inducción, para ello se emplea la proteína de fusión GST-E2 HPV16 (construcción pGEX-2T-E2HPV16), que se ha diseñado en el laboratorio y se maneja con eficiencia, sirviendo como control de inducción y expresión.

Una vez obtenido el pie de cultivo de cada colonia y del control GST-E2 bovino se procede a hacer diluciones 1:40 de cada una con medio LB más Amp. Se incuba a 28°C con agitación constante de 200rpm y se deja crecer el tiempo necesario hasta obtener una densidad óptica ideal de 0.5 DO (no debe ser mayor a éste valor); la densidad óptica esta relacionada con el crecimiento exponencial celular y nos indicará el momento para iniciar la inducción de la proteína de fusión GST-ORB7.2.

Las lecturas de densidad óptica se tomarán cada hora; en un ambiente estéril, hasta obtener la densidad óptica ideal. Se procede a la inducción agregando IPTG 3mM (agregar 1.5µl de IPTG por cada ml de medio) y se monitorea la inducción durante 5 horas, tomando cada hora un volumen de 100µl de cada cultivo y los controles que se han inducido. Inmediatamente centrifugar a 3,000rpm por tres minutos para sedimentar las células, desechar el sobrenadante y resuspender en 100µl de buffer de carga más 10µl de SDS10%, mezclar por completo vigorosamente y guarda a -20°C.

○ Cinética de inducción

Para observar las variaciones en la expresión de la proteína de fusión GST-B7.2 es necesario evaluar los cambios en la intensidad de la banda del peso molecular correspondiente en geles de poliacrilamida SDS-PAGE, a los diferentes tiempos de inducción con IPTG 3mM. Para ello, se preparan varios geles SDS-PAGE al 10%; el número depende del total de cada muestra inducida. Se colocan en una cama de hielo las muestras con el buffer de carga hasta que se descongele, se toma un volumen de 20µl de cada muestra y se somete a ebullición, una vez lista la muestra se

deposita el total de cada muestra en el gel SDS-PAGE al 10% y se migra por electroforesis a un voltaje constante de 25v.

Transcurrida la migración colocar el gel en un molde para su tinción con 25ml del colorante azul de Coomasie (Agua-Metanol-Coomasie-acido acético) por dos horas con agitación constante. Se requiere desteñir el gel hasta observar tan sólo las bandas correspondientes a las proteínas, con una solución desteñidora (agua-metanol-acido acético). Se deja en agitación constante el tiempo necesario. Una vez todo listo se seca el gel de poliacrilamida. En este momento se puede observar el comportamiento de la inducción de la proteína de fusión GST-B7.2, por lo que se puede seleccionar la colonia y el tiempo de inducción más apropiado.

○ Extracción de proteína de fusión GST-B7.2

La colonia seleccionada se vuelve a sembrar. Se pica la colonia que se encuentra en placa en medio LB más Amp y se coloca en placa de medio Mg más Amp y de ahí se siembra en 15ml de medio líquido LB más Amp. Se dejan incubar a 37°C toda la noche en agitación. Nuevamente se hace una dilución 1:40 y se deja incubando a 28°C a 200rpm, se agrega IPTG 3mM y transcurridas cinco horas o el tiempo ideal de inducción se procede a la extracción de la proteína.

Se transfiere el cultivo en un tubo de fondo cónico de 15ml, se equilibra y se centrifuga a 3,000rpm por cinco minutos. Se decanta el sobrenadante y se recupera la pastilla por completo en 5ml de buffer NET-N (NaCl 100mM, Tris-HCl 20mM, EDTA 1mM y NP-40 0.5%), al cual se le agrega 1mM de PMSF, al momento.

Se procede a la lisis celular para liberar la proteína por medio de sonicación, se aplica una vibración ultrasónica que rompe las membranas celulares y así permite la liberación de las proteínas. Se aplican tres ciclos de 30 segundos de 20% de fuerza con intervalos de reposo de 30 segundos. Una vez terminado el último ciclo, empastillar a 12,000rpm a 4°C por 10 minutos; se recupera el sobrenadante y es separado en alícuotas de 1 ml.

A una fracción del lisado se le agregan 200µl de *Sepharose-Glutation* equilibrada (buffer de equilibrio NaCl 100mM y Tris-HCl 20mM). Se captura la proteína de fusión GST-ORFB7.2 permitiendo separarla del resto de la mezcla proteica por incubación a 4°C toda la noche en rotación. Transcurrido el tiempo se empastilla el lisado a 3,000rpm a 4°C durante 10 minutos.

A la fracción sedimentada se le agrega 10ml de buffer NET-N y se coloca a 4°C y se coloca en rotación durante 10 minutos. Posteriormente se centrifuga a 5000rpm a 4°C, se retira el sobrenadante y se guarda una fracción, repetir este procedimiento cinco veces para lavar los restos de la resina *Sepharose-Glutation* de la proteína de fusión GST-ORFB7.2. Las alícuotas de los lavados se resuspende en 200µl de buffer NET-N y se almacenan a -70°C.

Para comprobar la captura de GST-ORFB7.2 se realiza un Western blot y se detecta la presencia de GST con un anticuerpo primario α-GST (dilución 1:10,000) y un anticuerpo secundario α-mouse acoplado a peroxidasa. Una vez comprobada la presencia de la proteína se puede utilizar como control positivo para la detección mediante Western blot de la proteína B7.2.



RESULTADOS

Extracción de RNA

Tras la extracción de RNA con el método de Trizol, se cuantificó el RNA para la síntesis de cDNA, obteniendo valores como:

| Línea Celular | Concentración |
|---------------|---------------|
| SiHa | 1.9 µg/µl |
| HeLa | 4.0 µg/µl |
| CaSki | 1.4 µg/µl |
| C-33 A | 2.4 µg/µl |
| HaCat | 0.5 µg/µl |
| JurKat | 1.3 µg/µl |

Síntesis de cDNA

Como se mencionó previamente, se estandarizaron las condiciones para la RT-PCR, por lo tanto, tras la normalización se obtuvieron los valores de cDNA equivalentes a 2.5µg empleados en cada PCR para la detección de mRNA de las proteínas co-estimuladoras.

| Línea Celular | Volumen final |
|---------------|---------------|
| SiHa | 0.5 µl |
| HeLa | 1.05 µl |
| CaSki | 1.43µl |
| C-33 A | 0.87 µl |
| HaCat | 4.5 µl |
| Jurkat | 1.6 µl |

RT-PCR

Se realizó la PCR para la detección del cDNA equivalente al mRNA de cada proteína co-estimuladora. Los valores positivos y sus respectivas variaciones en la expresión son marcados con (+) para aquellos casos donde fue positiva la detección del mRNA, el numero de muestras (+) indica que la expresión de ese transcrito fue de mayor intensidad comparado con las otras líneas celulares. Aquellos mensajeros que no fue posible detectar fueron considerados como negativos. Todos los ensayos y resultados que se muestran a continuación fueron realizados por duplicado

Resultados

donde los patrones de expresión fueron los mismos. Para todos los ensayos realizados se empleó como control positivo a la línea celular JurKat, a continuación se muestran los resultados obtenidos mediante RT-PCR:

| | B7.1 | B7.2(Ex. 7-8) | B7.H1 | B7.H2 |
|--------|----------|---------------|----------|-------|
| C-33A | Negativo | + | +++ | +++ |
| CaSki | Negativo | Negativo | Negativo | ++ |
| HeLa | ++ | Negativo | +++ | +++ |
| SiHa | Negativo | Negativo | ++ | ++++ |
| HaCat | ++ | +++ | +++ | ++++ |
| JurKat | +++ | ++++ | +++ | +++ |

Tabla 9 Resultados obtenidos de RT-PCR

Se realizó la estandarización de condiciones y cantidades de cDNA de cada línea celular que fue agregado a las reacciones. Esta normalización se llevó a cabo amplificando una región del gen constitutivo GAPDH que arroja un fragmento de 350pb. Una vez obtenido esto se procedió a la detección de mRNA de cada proteína empleando estas condiciones. A continuación se presentan los geles de agarosa al 1% empleados para la evaluación de los resultados obtenidos anteriormente tras la PCR. En cada ensayo se utilizó un marcador de 100pb (Fermentas), donde cada banda corresponde a un tamaño de 100pb hasta alcanzar los 1000pb o 1kb (**Figura 20**).

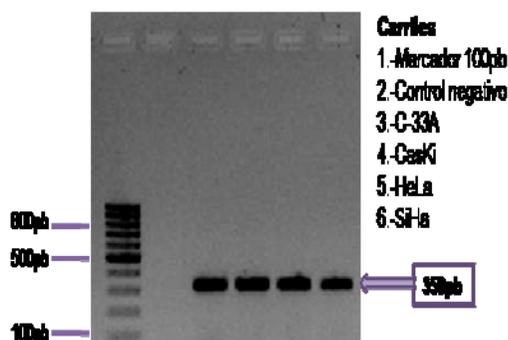


Figura 20 RT-PCR de GAPDH

La normalización para el caso de HaCaT se llevó a cabo posteriormente debido a que la disposición del cultivo fue posterior; se empleó a JurKat como control positivo con las mismas condiciones que en el caso anterior, la concentración de los elementos de la reacción fue la misma (**Figura 21**).

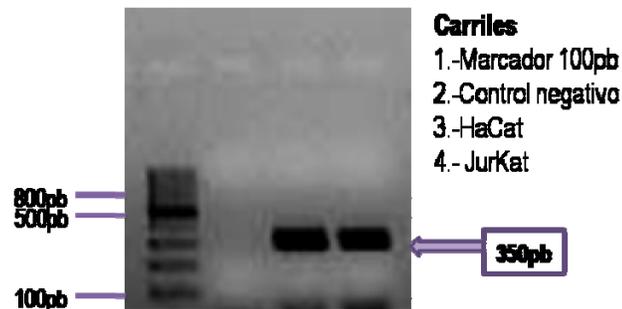


Figura 21 RT-PCR de GAPDH, HaCat

Los resultados obtenidos de la detección de la proteína B7.1 o CD80 donde se observa que las líneas celulares HeLa (HPV positiva) y en el control positivo JurKat. La intensidad de expresión de HeLa es tenue aunque apreciable, haciendo referencia al hecho de que no existen niveles importantes de la expresión de B7.1 en estos tipos celulares (Figura 22).

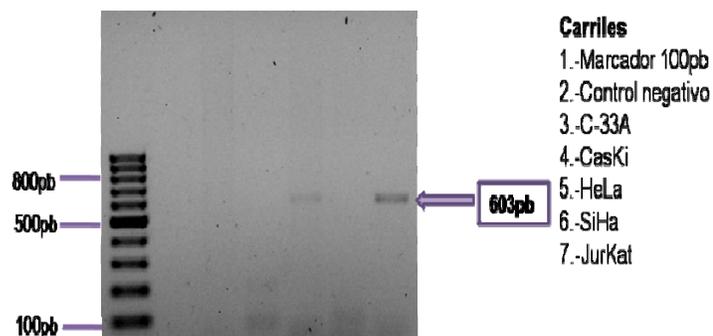


Figura 22 RT-PCR de B7.1

Para el caso de la amplificación de B7.1 se observó muy abundantemente en el caso de la línea celular HaCat, la cual es muy evidente alcanzando la intensidad de JurKat (Figura 23).

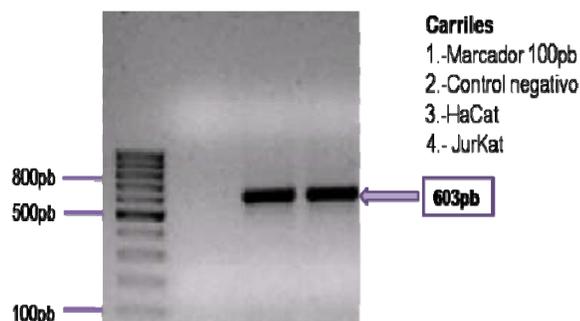


Figura 23 PCR de B7.1 para HaCat

Matriz de agarosa al 1% empleada para la observación de la reacción de PCR para la detección del mRNA de B7.2 exones 7-8, donde se emplearon las líneas celulares C-33A, CaSki, HeLa, SiHa y JurKat. La línea celular C-33A no presenta el genoma de HPV (HPV negativa) y es precisamente

Resultados

donde se logra apreciar una banda muy tenue de 364pb que corresponde al tamaño esperado de nuestro amplificado de B7.2 exones 7-8, aunque de muy baja intensidad. La línea celular JurKat fue empleada como control positivo de expresión y también se detectó el mRNA de B7.2 (**Figura 24**).

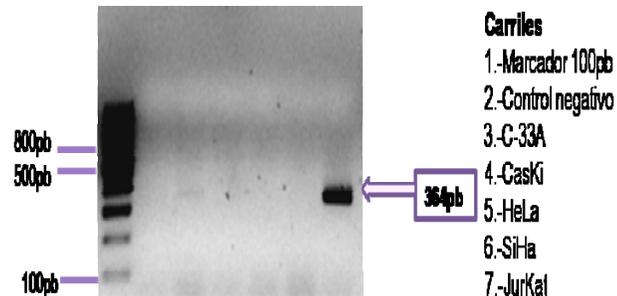


Figura 24 RT-PCR B7.2 exones 7-8

La detección del cDNA del gel de B7.2 exones 7-8 en el caso de HaCat fue positiva. En la matriz de agarosa se muestran dos muestras con sus respectivas bandas de 364pb, donde logramos la detección de esta región de B7.2 para ambos casos, al final de cada carril se pueden apreciar restos de la mezcla de PCR como los cebadores (**Figura 25**).

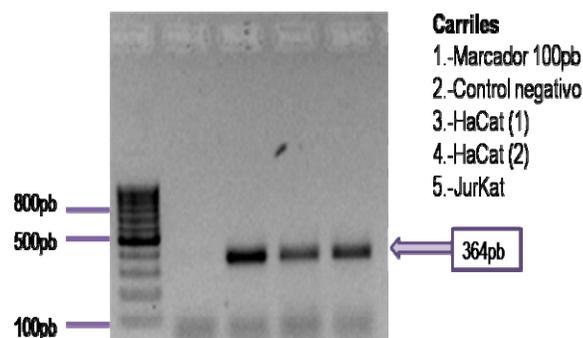


Figura 25 RT-PCR de B7.2 exones 7-8 para HaCat

El mRNA de B7.H1 fue detectado con un tamaño de 594pb para la mayoría, sólo se descarta a la línea CaSki donde no se detectó algún transcrito. Puede decirse que la expresión entre las líneas no varía mucho, salvo el caso de SiHa donde se aprecia una intensidad menor en comparación con el resto. SiHa tiene integrado el genoma del virus HPV del tipo 16, y al igual que el HPV tipo 18 es catalogado como de alto riesgo, con gran potencial para el desarrollo de CaCU (**Figura 26**).

Resultados

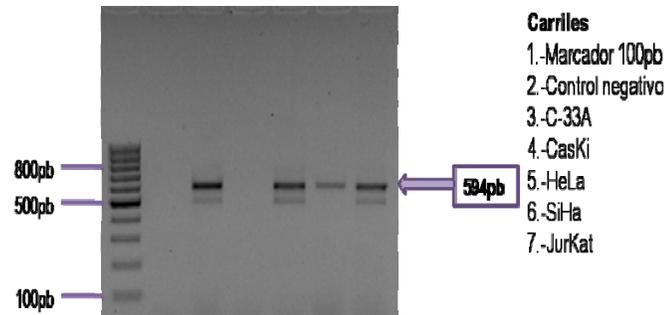


Figura 26 RT-PCR de B7.H1

Se logró de igual manera la detección del mensajero de 594pb en el caso de HaCat. Se obtuvo un comportamiento similar al resto de los ensayos realizados para la detección de esta proteína (Figura 27).

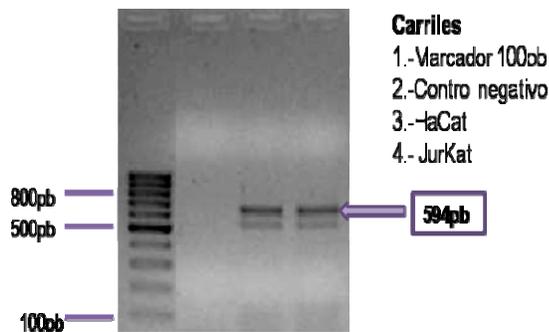


Figura 27 RT-PCR de B7.H1 para HaCat

Se detectó un transcrito para B7.H2 con un tamaño de 694pb que se apreció en todas las líneas, se logró observar la presencia con una expresión similar en todas las líneas celulares a excepción de la línea CaSki en la cual se observa una intensidad menor. Las muestras fueron colocadas en un gel de agarosa al 1% (Figura 28).

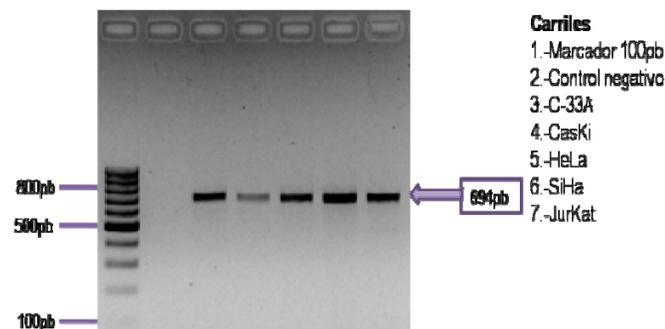


Figura 28 RT-PCR de B7.H2

De igual manera para la línea HaCat se logró la detección de una banda de 694pb correspondiente al transcrito de B7.H2, con la misma intensidad de expresión que el control positivo (Figura 29).

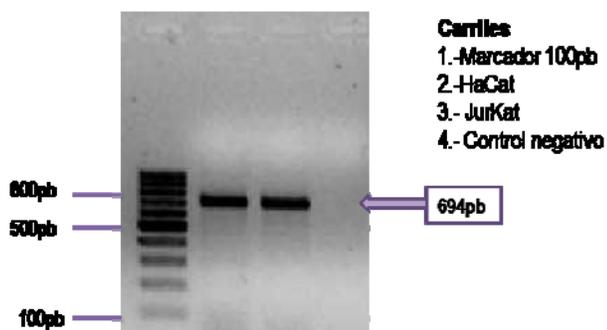


Figura 29 RT-PCR de B7.H2, para HaCat

Cuantificación de Proteínas

Tras la extracción de proteínas de las diferentes líneas celulares se procedió a cuantificar, para obtener los valores de concentración para cada uno de los casos.

| Línea celular | Concentración |
|---------------|---------------|
| SiHa | 4.83 µg/µl |
| HeLa | 4.63 µg/µl |
| CaSki | 6.40 µg/µl |
| C-33A | 7.04 µg/µl |
| HaCat | 5.73 µg/µl |
| RaJi | 6.98 µg/µl |

Western blot

Para el desarrollo de la inmunodetección con los distintos anticuerpos, se decidió colocar la misma concentración de proteína de cada línea celular. Para una concentración de 60µg/µl de proteína se tomaron:

| Línea celular | Volumen |
|---------------|---------|
| SiHa | 17µl |
| HeLa | 18.8 µl |
| CaSki | 25.8 µl |
| C-33A | 25.0 µl |

| | |
|-------|--------------|
| HaCat | 15 μ l |
| RaJi | 18.8 μ l |

El volumen de cada una de las líneas corresponde al volumen total, incluyendo el volumen de buffer de carga 2x (*Laemli buffer*) con el cual se encuentra la mezcla, con una proporción 1:1. Por lo tanto, la mitad del volumen corresponde a las proteínas de las células y la otra mitad de buffer de carga.

A continuación se muestran los resultados obtenidos mediante Western Blot:

| | B7.1 | B7.2 | B7H |
|--------|----------|----------|----------|
| SiHa | Negativo | Negativo | + |
| HeLa | Negativo | Negativo | Negativo |
| CaSki | Negativo | Negativo | Negativo |
| C-33 A | Negativo | Negativo | + |
| HaCat | + | Negativo | Negativo |

Tabla 1 Resultados obtenidos de Western Blot

Para la inmunodetección de B7.1 se colocaron 60 μ g de cada proteína. Se utilizó un anticuerpo primario monoclonal de ratón contra B7.1 con una dilución 1:100 y se empleó PBS-Tween 0.1% para la dilución del mismo. Se incubó toda la noche a 4°C, el anticuerpo secundario anti-ratón con una dilución de 1:2000 empleando PBS-Tween 0.1% para su dilución.

Se empleo ECL (Amersham Bioscience) para revelar con una exposición durante 10 minutos, se obtuvo una banda de aproximadamente 40kDa usando como referencia el marcador Dual Color, BioRad.

Se realizó la detección de la proteína B7.1 con un Ab dirigido de forma específica, aunque debido a las condiciones se aprecia fondo; sin embargo se logra detectar a B7.1 en la línea celular HaCat (carril 6). La banda tenue que se logra apreciar se encuentra señalada con la flecha. Es importante mencionar que el mRNA de B7.1 también logró detectarse en HaCat, permitiéndonos suponer que existe traducción de la proteína (**Figura 30**).

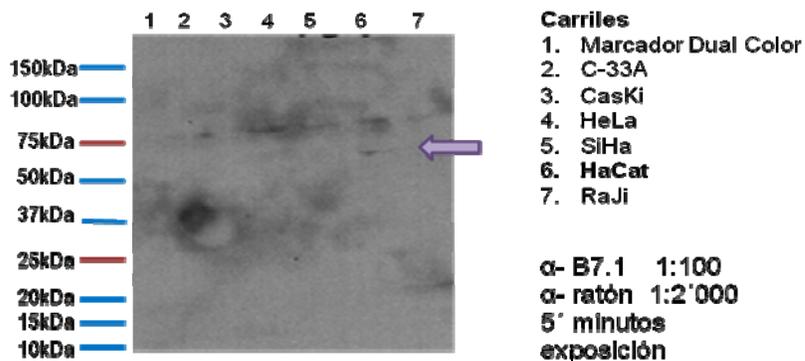


Figura 30 Western blot de B7.1

Para la detección de la proteína B7.2, se procedió previamente a la síntesis de una proteína de fusión GST-B7.2, tras lograr que se expresara y será empleada como control positivo para la inmunodetección.

Para la producción de la proteína de fusión GST-B7.2 previamente fue necesario realizar la construcción pGEX-4T-1-ORFB7.2 y con ella fueron transformadas células competentes JM109. Se sembraron e incubaron a 37°C, posteriormente se seleccionaron seis colonias que crecieron en medio semisólido LB más Amp y se sembraron en medio líquido LB más Amp.

Una vez obtenido el cultivo se procedió a la inducción de la producción de la proteína GST-B7.2 con IPTG al 3mM, dejando la inducción durante 5 horas y tomando 100µl cada hora, para poder observar el fenómeno esperado, un incremento en la concentración de proteína. Todas las muestras colectadas se migraron en un gel de poliácridamida (SDS-PAGE) al 10%, el cual se tiñó con azul de Coomassie y se eligió a la colonia en la cual se observará con mayor claridad la inducción. Se utilizó un control para cada colonia, el cual presentaba las mismas condiciones de crecimiento sólo que no fue inducido por IPTG (**Figura 31**).

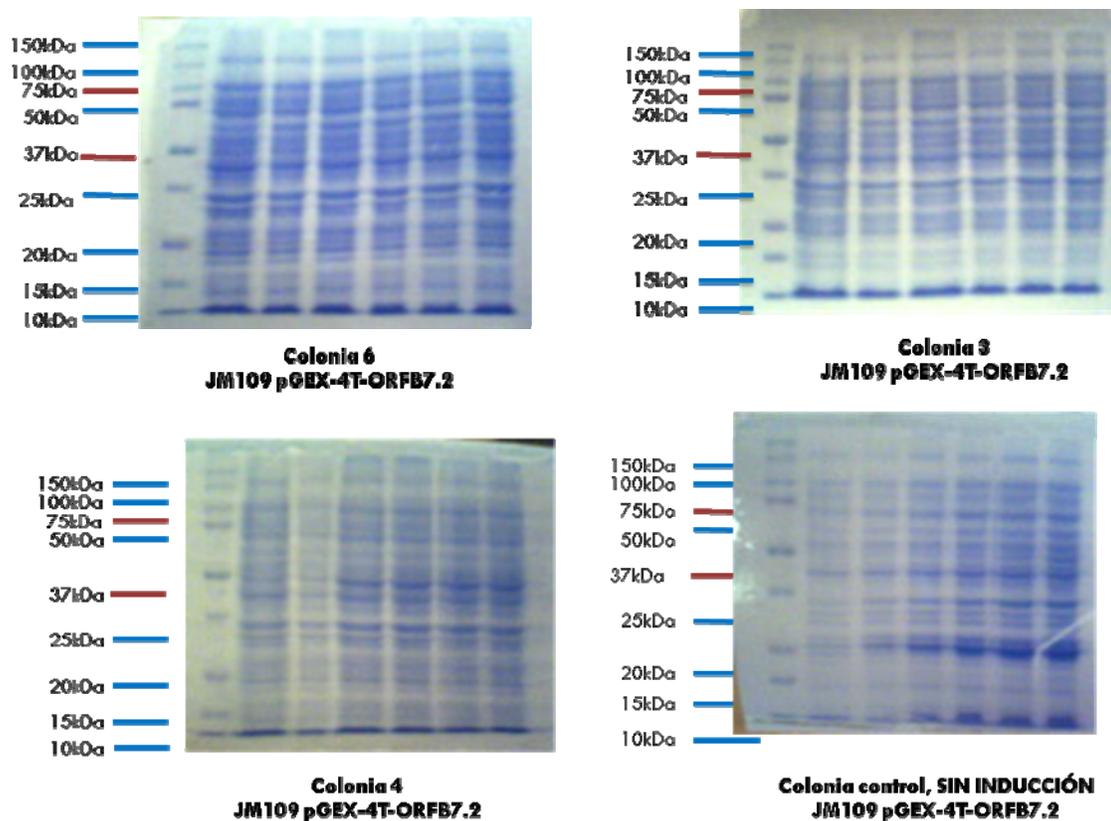


Figura 31 Cinética de Inducción

En este esquema se incluyen tres de las seis colonias seleccionadas las cuales fueron inducidas, esperando que se incremente una banda de aproximadamente 96kDa que corresponde al peso molecular de la proteína de fusión del ORFB7.2 (70kDa) con GST (26kDa), conforme transcurre el tiempo de inducción. También se incluye la colonia sin inducir como control. En el costado izquierdo de cada imagen se encuentra el marcador Dual Color (BioRad), seguido se encuentra la colonia sin inducir, sigue una hora de inducción, en el siguiente carril dos horas de inducción y así sucesivamente hasta las cinco horas de inducción.

Se seleccionó a seleccionar una colonia y un tiempo de inducción, donde se detectó un incremento en la señal de la expresión de la proteína de fusión con un peso aproximado de 75kDa. De los seis cultivos probados de JM109-pGEX-4T-1-ORF.B7.2, se seleccionó la colonia seis con un tiempo de inducción de cinco horas, tras la detección de CD86 por Western blot mediante el empleo del Ab C-19, que detecta una región en el extremo carboxilo de la proteína.

Se colocaron tres de las seis colonias seleccionadas e inducidas con los tiempos de inducción más tardíos y se procedió a la inmunodetección con el Ab específico C-19 dirigido a B7.2. La colonia control hace referencia a una colonia que presenta sólo el plásmido pGEX-4T-1 sin el inserto de ORFB7.2, por lo tanto no contiene la proteína de fusión, lo cual no permite que sea detectada en este ensayo (Figura 32).

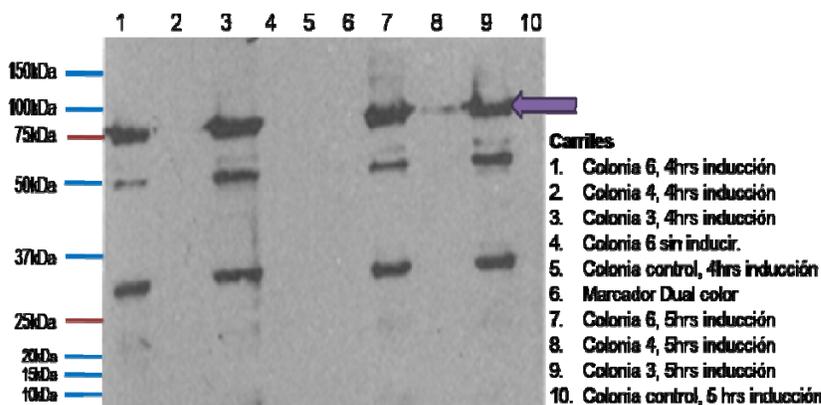


Figura 32 Western blot de B7.2 en colonias JM109pGEX-4T-1-ORFB7.2

Una vez seleccionada la colonia y el tiempo, se procedió a la captura de la proteína con la resina *Sepharosa-Glutation* a 4°C toda la noche en rotación y posteriormente se detectó la presencia de la proteína mediante Western blot con los anticuerpos α-GST. Se colocó un cultivo de la colonia seis con la proteína de fusión GST-B7.2 y una colonia control conteniendo tan sólo al plásmido de expresión. La captura fue probada mediante Western blot con el empleo del α-GST (Figura 33).

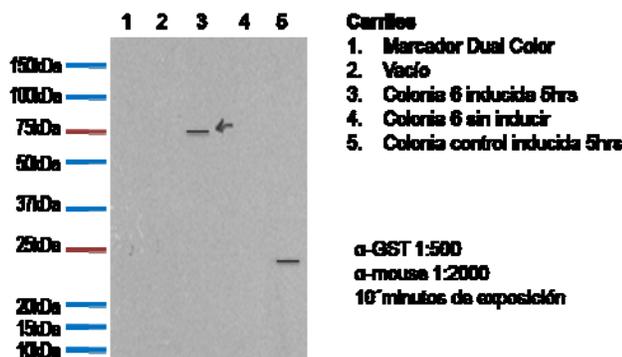


Figura 33 Detección de GST

Se colocó en un mismo ensayo la colonia seis y la colonia control inducidas durante cinco horas y la colonia seis sin inducir, obteniendo una banda correspondiente a aproximadamente 75kDa (banda señalada con una flecha), que corresponde a la proteína de fusión GST-B7.2 capturada de la colonia seis y una banda con un peso menor a 25kDa correspondiente a la fracción única de GST presente en el plásmido; ésta última, no se requirió capturarla.

Se logró la detección de GST-B7.2 de forma efectiva, permitiendo el empleo de la construcción como control positivo para la detección de CD86 mediante el empleo de más de un anticuerpo policlonal de chivo dirigido hacia diferentes regiones de la proteína B7.2. Para la detección con el anticuerpo GST se empleó una dilución 1:500 y un anticuerpo secundario α-ratón con una dilución 1:2000.

Resultados

Por lo tanto, se ha logrado la detección de la proteína de fusión mediante el empleo de los anticuerpo α -GST y α -C-19, el primero dirigido a la primera fracción de la proteína de fusión, mientras que el segundo dirigido específicamente a la detección de B7.2.

Posteriormente se procedió a la detección de B7.2 en las líneas celulares. Para este caso específicamente, la línea celular RaJi fue empleada como control positivo, debido a que se ha comprobado en ellas la expresión de dicha proteína. Con el empleo del Ab C-19 se logró la detección de B7.2 únicamente en la línea RaJi (**Figura 34 y 35**).

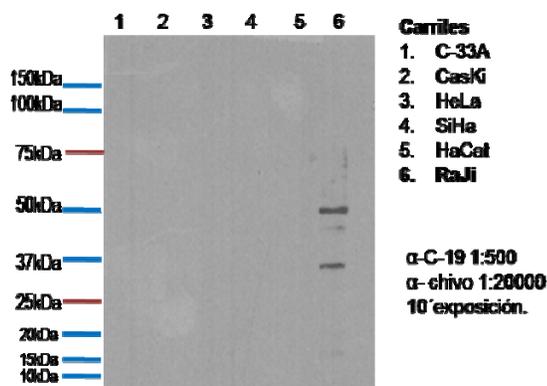


Figura 34 Detección B7.2 en líneas celulares

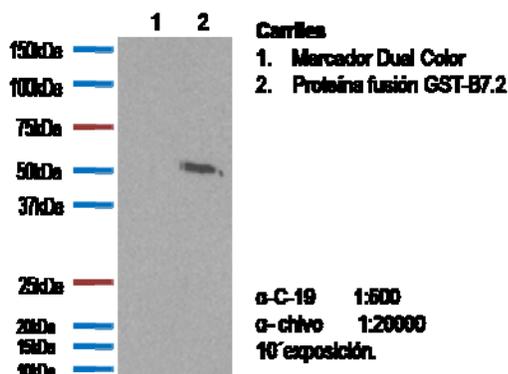


Figura 35 Detección de B7.2 mediante C-19

Posteriormente se procedió a la detección de B7.2 con un Ab monoclonal de ratón llamado BU63 que reconoce una región intermedia de B7.2. Para el caso de este anticuerpo se detectó únicamente la presencia de B7.2 en la línea RaJi, como control positivo y del control positivo GST-B7.2.

Para el caso de las tres líneas que expresaron el mRNA de B7.2 tan sólo se logró la detección de la proteína en la línea control RaJi (**Figura 36**). El peso molecular de las bandas obtenidas supera el de 70kDa, que corresponde al peso molecular reportado de la molécula B7.2 de 80kDa. Con el uso de los dos anticuerpos para B7.2 no fue posible la detección en el resto de las líneas celulares. Las bandas que se muestran de peso molecular menor a 70kDa, que se logra detectar en todas las líneas celulares es fondo del anticuerpo secundario (α -chivo).

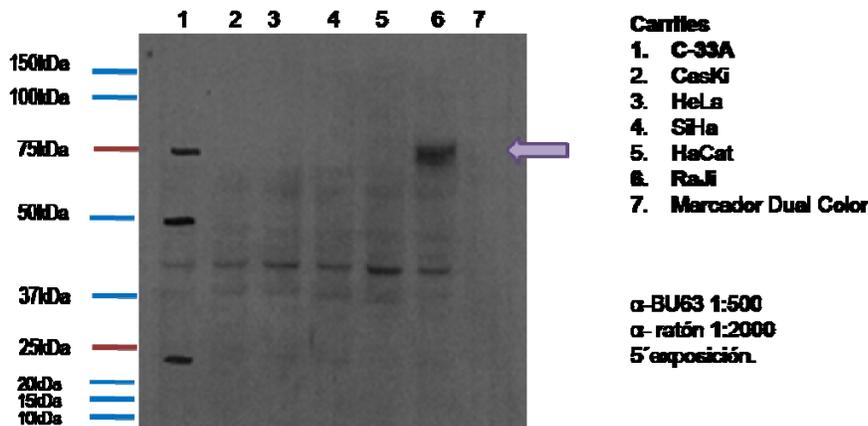


Figura 36 Detección de B7.2 mediante BU63

La detección de las proteínas B7.H1 y B7.H2 se realizó con el empleo de un mismo anticuerpo, ya que la región contra la que fue hecho el anticuerpo es común en ambas proteínas, lo cual no nos permite diferenciar y definir exactamente cual de las dos proteínas es la que se encuentra presente en las líneas celulares analizadas (Figura 37).

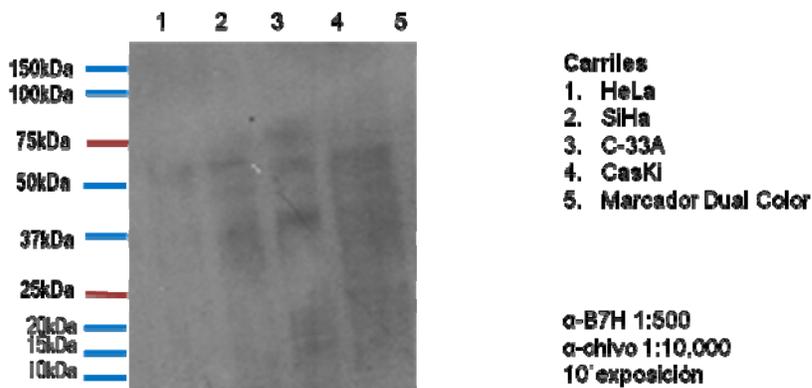


Figura 37 Detección de B7H mediante E-19

Las líneas de nuestro interés para la evaluación de la presencia y/o ausencia de las proteínas co-estimuladoras fueron C-33A, CaSki, HeLa, SiHa y HaCat. Algunas de las líneas celulares derivan de carcinoma cervical y presentan el genoma de HPV integrado en el genoma celular y mientras que C-33A y HaCat no. HaCat es una línea celular de queratinocitos con ausencia de HPV que también ha sido de nuestro interés para la evaluación de las moléculas en células que comparten características con aquellas presentes en el tejido cervical. A continuación se muestra un cuadro donde se resumen los resultados obtenidos para todas las líneas celulares en ambos casos, donde se marcan aquellas células que arrojaron datos donde se detectó la presencia de mRNA de cada molécula como positiva y de igual forma para el caso de la detección de las proteínas mediante el empleo de anticuerpos específicos.

| | mRNA | | | | Proteína | | |
|--------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | B7.1 | B7.2 | B7.H1 | B7.H2 | B7.1 | B7.2 | B7.H |
| SiHa | Negativo | Negativo | Positivo | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo |
| HeLa | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo | Negativo | Negativo | Negativo |
| CaSki | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Negativo |
| C-33 A | Negativo | Positivo | Positivo | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo |
| HaCat | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Negativo | Positivo |

Tabla 11 Relación de resultados obtenidos

DISCUSIÓN

El CaCU es resultado de la falta de prevención y cuidado de la salud de las mujeres a nivel mundial. En México es la principal causa de muerte por tumores en mujeres y en su desarrollo se ve involucrado la presencia de HPV, siendo los tipos 16 y 18 los de mayor prevalencia. HPV16 se ha encontrado con una frecuencia aproximada del 63% en carcinomas de cérvix, mientras que HPV18 es el segundo tipo viral más común asociado a este padecimiento, encontrándose en entre el 10-14% en las células derivadas de carcinomas. Sin embargo, es el primer tipo asociado a adenocarcinoma cervical causando entre 37-41% de los casos, mientras que HPV16 tiene una frecuencia del 26-37% en este tipo de lesiones. La incidencia de infecciones con HPV se puede favorecer por muchos factores incluyendo la falta de una adecuada respuesta inmune (Herrington C. , 1995; Doorbar, 2006).

Los virus son parásitos intracelulares estrictos y requieren de la maquinaria celular del huésped para llevar a cabo su síntesis proteica y completar su metabolismo. Su estructura y complejidad genética son extremadamente variables. Los virus se unen a las células huésped a través de receptores específicos, lo que determina el tropismo del virus hacia un determinado huésped o tipo de célula.

La primera barrera defensiva frente al virus es la integridad de las superficies corporales; una vez atravesadas éstas, se activan los primeros mecanismos de defensa inespecíficos o innatos, así como el IFN- γ y las células NK. Conforme progresa la infección, el sistema inmunitario específico comienza a responder, y aparecen las células T CD8+, T CD4+ y se activan los linfocitos B e inicia la producción de anticuerpos contra el virus y constituyen una de las principales barreras para evitar la transmisión del virus entre células y tejidos. En las superficies mucosas se activa la producción de IgA que se supone previenen las re-infecciones.

Para la activación apropiada del sistema inmune y producción de altas cantidades de anticuerpos, es necesario que las células T sean activadas mediante su interacción con células APC, esto sucede por una relación entre una molécula en la superficie del Linfocito T (CD28 o CTLA) con moléculas co-estimuladoras presentes en la APC que pertenecen a la familia B7 como B7.1, B7.2, B7.H1 y B7.H2. Una vez que interactúa alguna de estas moléculas con su contraparte en la célula T, se genera una señal necesaria para la activación total de las células T e iniciar la respuesta inmune.

En ausencia de una señal co-estimuladora hacia las células T inmaduras, la interacción TCR-Antígeno-MHC produce el fenómeno de anergia. Los linfocitos T tras la co-estimulación inician la síntesis de citocinas que favorecen su proliferación. Considerando la importancia de las señales co-estimuladoras y de las proteínas que participan en el desarrollo de una respuesta inmune apropiada para la defensa del organismo, ha sido de nuestro interés evaluar algunas de estas moléculas con relación al desarrollo del cáncer cérvico-uterino.

En el cérvix normal se secretan diferentes citocinas como son la IL-1 α , IL-1 β , IL-8, TNF- α , entre otras, mientras que en lesiones severas de cérvix, donde se han encontrado células que presentan el genoma de HPV16 o se puede observar una disminución importante en la expresión de estas citocinas. En estudios realizados en mucosa del tracto genital se ha establecido la existencia de un microambiente inmune del tipo Th2, en el que predominan citocinas como IL-4, IL-5, IL-6, IL9

e IL-10. Algunas de estas citocinas (IL-10 e IL-6), se ha demostrado que inhiben la expresión de la molécula co-estimuladora B7.2.

Otros estudios realizados en muestras de lesiones tempranas NICI y de epitelio cervical normal, detectaron la presencia de B7.2 en ambos casos, pero una disminución importante en la presencia de B7.2 en muestras con el genoma de HPV16 presente, sugiriendo la posible existencia de una influencia entre HPV sobre la expresión de B7.2. En el estudio referido, también se analizó la presencia de B7.1 y la expresión de la citocina IL-10, encontrando que no existen diferencias en los niveles de estas moléculas en tejido normal y en NICI HPV16 positivas, sugiriendo que de existir un mecanismo donde HPV16 regule la expresión de B7.2, no es mediante el incremento de la producción de IL-10 (Ortiz Sánchez, y otros, 2007).

Por tanto, ha sido importante conocer los niveles de expresión de otros miembros de la familia B7 en las células blanco del HPV, ayudando a conocer un poco más el ambiente inmune en las mucosas cervicales y tal vez definir estrategias que permitan el desarrollo de técnicas para una prevención más efectiva contra el desarrollo de cáncer cérvico-uterino.

Este estudio ha permitido el análisis de la presencia o ausencia de moléculas co-estimuladoras en líneas celulares derivadas de carcinomas cervicales arrojando, que en la mayoría de los casos, la detección de las moléculas correspondientes a las proteínas y la expresión de las mismas sucede independientemente de la presencia del genoma de HPV.

Las proteínas co-estimuladoras más conocidas son B7.1/CD80 y B7.2/CD86. Se logró la detección de la presencia de sus transcritos en algunas líneas celulares.

Los transcritos de B7.1 fueron detectados en las líneas celulares HeLa y HaCat. Las células HeLa presentan el genoma de HPV tipo 18, mientras que HaCat es una línea celular que deriva de queratinocitos epiteliales, aunque no precisamente de cérvix.

Tras la detección del mRNA de B7.1 en la línea HeLa no se logró detectar la proteína en la misma línea. En el resto de las líneas celulares, tanto aquellas que presentan el genoma de HPV16, como en las que carecen de HPV, no se detecta la presencia de dicha molécula.

Es interesante el hecho de que las líneas HeLa, SiHa, C-33A y CaSki comparten características morfológicas debido a que son derivadas de lesiones avanzadas o de tumores generados a partir de epitelio cervical. El hecho de no observar expresión de B7.1 a nivel de mRNA ni proteína en líneas HPV negativas puede relacionarse con la observación previa de que en el epitelio cervical, ya sea proveniente de tejido normal o bien de lesiones tempranas con presencia de HPV16, no ha sido posible la detección de B7.1 (Ortiz Sánchez, y otros, 2007). Por tanto, para el caso de B7.1 no parece existir una relación entre la presencia de HPV y los niveles de expresión de este gen.

Sin embargo la detección del transcrito de B7.1 en la línea celular HeLa nos indica que probablemente las diferencias mínimas de la expresión del genoma entre HPV18 y HPV16 en las líneas celulares, podrían determinar cambios en la expresión de genes celulares, que podrían favorecer el establecimiento de una estrategia de protección en el huésped, aunque no lo suficientemente eficiente ya que no se logró apreciar la presencia de traducción de dicho transcrito; por tanto, no fue posible la detección de B7.1 a nivel proteico en líneas derivadas de

carcinoma cervical; esto puede estar relacionado con las estadísticas que mencionan que HPV18 esta asociado hasta en un 41% de los adenocarcinomas cervicales.

La detección de B7.1 en la línea HaCat permite comprobar que los queratinocitos pueden considerarse como APC no profesionales ya que además de detectarse el mRNA específico, fue en la única línea celular en la que se detectó B7.1 a nivel de proteína.

Se logró detectar el mRNA de B7.2 en HaCat pero no a nivel de proteína, lo cual permite suponer que la ausencia de la proteína B7.2 en las membranas celulares puede deberse a mecanismos de regulación negativa a nivel de transcripción como "splicing" alternativo, poliadenilación temprana o a nivel de traducción.

El mRNA de B7.2 fue detectado mediante RT-PCR en las líneas celulares HaCat y C-33A (HPV-negativas). En el caso de las líneas HPV-positivas no se logró la detección de B7.2.

La ausencia de mRNA de B7.2 en líneas HPV-positivas puede deberse a los cambios en la expresión génica que sufren las células epiteliales durante el desarrollo de CaCU ocasionados por presencia de HPV. Puede ser que la falta de B7.2 se deba al virus como se observó en lesiones NIC HPV16-positivas donde se apreció una disminución de B7.2 en las células (Ortiz Sánchez, y otros, 2007).

Es decir, la relación entre la evolución de la enfermedad, la activación del mecanismo viral y su integración al genoma celular permite suponer que conforme incrementan dichas actividades, la expresión y acción de B7.2 se ve disminuida, pudiendo ser debido a mecanismos de regulación derivados por la presencia del HPV desde nivel de transcripción (mRNA) hasta la traducción, ya que no se logró la detección de la proteína. Los cambios ocurridos pueden generar que la célula modifique las rutas de activación de la respuesta inmune, inhibiendo la expresión de las más frecuentes. En ninguno de los casos se logró la detección de la proteína B7.2 mediante Western blot.

El transcrito de B7.H1 fue detectado en la mayoría de las líneas celulares a excepción de CaSki (HPV16 positiva). Las líneas SiHa, HeLa, C-33A y HaCat expresan transcritos de B7.H1 con niveles similares. Las dos primeras líneas son HPV-positivas, mientras que las últimas son HPV-negativas. En las líneas SiHa (HPV16) y HeLa (HPV18) no se detectó B7.2, mientras que solo en el caso de HeLa se detectó B7.1. La detección de mRNA de B7.H1 y ausencia de las moléculas B7.1 y B7.2 puede sugerir que este gen sigue otras rutas que no son se aprecian tan alteradas por la presencia de HPV, al menos a nivel de mRNA.

La expresión de B7.H1 y la ausencia de B7.2 en líneas celulares derivadas de carcinoma cervical, puede ser reflejo de la alteración de las condiciones celulares y del ciclo celular (a diferencia de las lesiones tempranas NICI) que permiten la activación de mecanismos o genes distintos que podrían participar en la defensa ante el desarrollo de cáncer, como el caso de la detección de mRNA de B7.H1.

Se conoce que la interacción de B7.H1 con el receptor PD-1 induce un aumento en la producción de IL-10 y eleva moderadamente los niveles de INF- γ pero no tiene un efecto significativo sobre los niveles de IL-2 e IL-4 (Freeman, y otros, 2000).

Se ha demostrado que la expresión de IL-10 inhibe la expresión de B7.2 (Latchman, y otros, 2001), si los niveles de IL-10 en tejido cervical se incrementan y pudiera deberse gracias a la expresión de B7.H1 aunado a la presencia de HPV, la expresión de B7.2 se vea alterada por completo. Sin embargo, este mecanismo no aplica directamente en las líneas celulares derivadas de carcinoma cervical, ya que aunque el comportamiento celular se ha modificado por la presencia de HPV, la participación de citocinas generadas por el estímulo es nula en los cultivos celulares.

En el caso de B7.H2, los niveles de mRNA fue uniforme en todas las líneas celulares, siendo la única molécula evaluada en la que se logró su detección a nivel transcripcional de forma similar en todos los casos. Esto puede significar que en el desarrollo de CaCU los niveles de esta molécula se mantengan constantes, sin importar la presencia o ausencia de HPV y ninguna de sus variantes. Por tanto, podría pensarse también que la presencia del agente causal del CaCU no se vea afectado por la expresión de ésta molécula y puede alojarse en las células del huésped y activar sus mecanismos virales.

La expresión constante del mRNA de B7.H2 nos permite suponer también que no tiene la capacidad necesaria para activar un proceso de respuesta inmunológica y sugeriría que la expresión de la misma podría no sea favorable para las células, ya que se ha detectado su mRNA en células derivadas de diferentes carcinomas, donde todas los mecanismos de defensa del organismo han sido evadidos, sin importar en este caso, la presencia del HPV. En cualquiera de los casos y de las condiciones del origen de cada una de las células la expresión de esta molécula es constante, aunque en el caso de CaSki la expresión se ve reducida en comparación de las otras líneas.

Se han realizados estudios en epitelios húmedos como epitelio de mucosas y en tejido de pulmón donde se han analizado las vías de estimulación presentes y se ha logrado observar que en ausencia de las vías CD28 o CTLA-4 y en la ausencia de B7.1 y B7.2 en las células APC del epitelios aéreos, están presentes en la zona otras moléculas co-estimuladoras, como B7.H2, que favorecen la producción de citocinas (IL-10 e IL-4) al igual que en la estimulación del desarrollo y la proliferación de células T y B (Kurosawa, y otros 2003). De acuerdo con lo anterior la expresión de B7.H2 favorece en todo momento la estimulación de una respuesta inmunitaria, así como la producción de citocinas tanto Th1 como Th2.

Durante la realización de este trabajo y en este sentido con respecto a que B7.H2 favorece en todo momento la estimulación de una respuesta inmune, se sugiere en cambio, que la presencia de B7.H2, por lo menos a nivel transcripcional, en lugar de favorecer una respuesta inmune y beneficiar al organismo, su expresión parece no tener ningún efecto positivo sobre las células cervicales.

La detección de las proteínas B7.H1 y B7.H2 mediante Western Blot se llevó a cabo empleando un anticuerpo que reconoce un epitope común en ambas proteínas. De esta manera, detectamos alguna de estas moléculas en las líneas SiHa, C-33A y en la línea HaCat. Siendo la primera una línea HPV positiva (HPV16) mientras que las últimas 2 no presentan el genoma de HPV.

Estos resultados en su conjunto, nos permiten establecer la hipótesis de que existen otras rutas de señalización que siguen las células del cérvix ante algún cambio inducido por la presencia de algún agente particular, o simplemente por modificaciones internas.

La detección de B7.H de forma general permite establecer el hecho de que aún en ausencia de HPV, cuando se ven alteradas las condiciones normales celulares se desencadenan otros mecanismos que pueden generar la producción de elementos necesarios para la defensa, o que a pesar de la activación de rutas alternas y la expresión de proteínas relacionadas con la respuesta inmune no se ve modificación durante el desarrollo del CaCU.

CONCLUSIONES

La evaluación de las moléculas co-estimuladoras indispensables para el desarrollo adecuado de una respuesta inmune que se refleja en la defensa del organismo contra agentes infecciosos como el HPV, lo que permite valorar la existencia de otros mecanismos presentes en las células cervicales, y que podrían ser considerados para el desarrollo de estrategias terapéuticas más efectivas contra el agente causal del CaCU.

La línea celular HaCat (queratinocitos inmortalizados) arrojó resultados positivos para la detección de transcritos de todas las moléculas co-estimuladoras.

Los queratinocitos pueden desempeñar funciones de células presentadoras de antígeno, ya que también se detectó en esta misma línea la presencia de la proteína B7.1.

El mRNA de B7.1 solo se detectó en la línea HaCat y en la línea HeLa que presenta el genoma de HPV18, lo cual puede sugerir una posible relación entre el tipo viral y la detección del transcrito.

Los niveles de mRNA de B7.1 en HeLa fueron bajos y no fue posible detectar la proteína B7.1 mediante Western Blot, en HeLa.

Solo fue posible la detección de la proteína B7.1 en la línea HaCat.

B7.2 presenta variaciones en su expresión, desde su detección *in situ* en epitelio cervical (disminución en LSIL HPV16-positiva) hasta la ausencia tanto de mRNA y proteína en líneas celulares HPV positivas.

B7.2 no fue posible su detección a nivel transcripcional (mRNA) ni la expresión a nivel proteico en ninguna línea celular HPV positiva.

La detección del mRNA de B7.H1 fue posible en casi todas las líneas celulares a excepción de CaSki (HPV16).

La expresión de la molécula B7.H1 no se ve afectada por la presencia de HPV; su presencia o ausencia no refleja un efecto importante sobre B7.H1 por lo menos a nivel transcripcional.

La expresión de B7-H1 permite suponer que al detectarse en ambas condiciones (HPV positivas o negativas), no ejerce ninguna función que favorezca una respuesta inmune ante el virus o cambios celulares que ocurren en células cancerosas ya que la expresión de ésta proteína no afecta el desarrollo del CaCU.

La detección del mRNA de B7.H2 fue posible en todas las líneas celulares tanto en HPV positivas como HPV negativas. La intensidad de la expresión de B7.H2 puede indicar que es la molécula más activa.

La participación de B7.H2 como co-estimuladora del sistema inmune no se refleja en los efectos esperados tras la detección de dicha molécula junto con la expresión de B7.H1.

En conjunto B7.H1 y B7.H2 fueron las moléculas con mayor expresión a nivel de mRNA y donde se logró la detección a nivel de proteína en la línea SiHa (HPV positiva) y en una línea HPV negativa C-33A.

La detección de alguna de éstas dos en condiciones contrarias con respecto a la presencia del HPV, deja ver que la presencia del HPV no ejerce ninguna actividad de regulación sobre las mismas y que la expresión de las mismas no afecta al virus en su proceso de infección o de generación del proceso neoplásico, y que de esta forma, la expresión de las mismas podría no favorecer a las pacientes que llegan a padecer CaCU.

La expresión de estas últimas dos puede no ser necesariamente benéfica para el control del desarrollo de CaCU, debido a que las líneas celulares presentan las condiciones más drásticas del desarrollo del padecimiento.

Es importante no perder de vista que la prevención y cuidado de la salud de cada mujer, son sin duda la mejor herramienta para disminuir los casos de contagios y de los de mortandad que el cáncer cérvico-uterino genera diariamente a nivel mundial. La mejora en programas de prevención, programas de salud, detección oportuna, educación sexual son las herramientas más valiosas para las mujeres hoy en día.

INDICE de FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 Zona de infección por HPV | 3 |
| Figura 2 Organización del epitelio cervical | 5 |
| Figura 3 Virus del Papiloma Humano o HPV | 6 |
| Figura 4 Organización genómica del Virus del Papiloma Humano | 8 |
| Figura 5 Ciclo Replicativo de HPV | 11 |
| Figura 6 Esquema de la Respuesta Inmunológica y sus tipos | 14 |
| Figura 7 Células Linfoides | 17 |
| Figura 8 Interacción de proteínas co-estimuladoras | 21 |
| Figura 9 Estructura básica de B7.1 y B7.2 | 22 |
| Figura 10 Estructura molecular de B7.1 | 23 |
| Figura 11 Estructura general del gen de B7.2 y variantes | 24 |
| Figura 12 Detección de B7.2 en células epiteliales | 28 |
| Figura 13 Detección de B7.2 en lesiones LSIL | 29 |
| Figura 14 Estrategia Experimental | 35 |
| Figura 15 Estrategia experimental para proteína de fusión GST-B7.2 | 42 |
| Figura 16 Clonación en plásmidos | 44 |
| Figura 17 Mapa general de los vectores pGEX | 45 |
| Figura 18 Diseño de la construcción pGEX-4T-1-ORFB7.2 | 47 |
| Figura 19 Construcción pGEX-4T-1-ORFB7.2 | 48 |
| Figura 20 RT-PCR de GAPDH | 55 |
| Figura 21 RT-PCR de GAPDH, HaCat | 55 |
| Figura 22 RT-PCR de B7.1 | 56 |
| Figura 23 PCR de B7.1 para HaCat | 56 |
| Figura 24 RT-PCR B7.2 exones 7-8 | 57 |
| Figura 25 RT-PCR de B7.2 exones 7-8 para HaCat | 57 |
| Figura 26 RT-PCR de B7.H1 | 57 |
| Figura 27 RT-PCR de B7.H1 para HaCat | 58 |
| Figura 28 RT-PCR de B7.H2 | 58 |
| Figura 29 RT-PCR de B7.H2, para HaCat | 58 |
| Figura 30 Western blot de B7.1 | 60 |
| Figura 31 Cinética de Inducción | 61 |
| Figura 32 Western blot de B7.2 en colonias JM109pGEX-4T-1-ORFB7.2 | 62 |
| Figura 33 Detección de GST | 62 |
| Figura 34 Detección B7.2 en líneas celulares | 63 |
| Figura 35 Detección de B7.2 mediante C-19 | 63 |

| | |
|---|----|
| Figura 36 Detección de B7.2 mediante BU63 | 64 |
| Figura 37 Detección de B7H mediante E-19 | 64 |

INDICE de TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Características y origen de las líneas celulares. | 36 |
| Tabla 2 Mezcla de reacción para síntesis de cDNA | 38 |
| Tabla 3 Mezcla de reacción para PCR | 39 |
| Tabla 4 Mezcla de reacción para restricciones enzimáticas. | 43 |
| Tabla 5 Mezcla de reacción de ligación. | 48 |
| Tabla 6 Mezclas de reacción para restricción enzimática de pGEX-4T-1-ORFB7.2 | 49 |
| Tabla 7 Mezcla de reacción para PCR para pGEX-4T-1-ORFB7.2 | 49 |
| Tabla 8 Mezcla de reacción para Secuencia de pGEX-4T-1-ORFB7.2 | 50 |
| Tabla 9 Resultados obtenidos de RT-PCR | 55 |
| Tabla 10 Resultados obtenidos de Western Blot | 60 |
| Tabla 11 Relación de resultados obtenidos | 65 |

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Abbas, KA. *Cellular and molecular immunology*. Filadelfia: W.B. Sanders, 1991.
2. Alamartine, E, H Stauss, Beverly P, y et al. «Both ICAM-1 and B7.1 are required to convert non-stimulatory keratinocytes into T cell-stimulation APCs.» *Eur. J Dermatol* 7, nº 7 (1997): 481-486.
3. Arlene, H, MD Sharpe, KA Abbas, y et al. «T-cell Costimulation-Biology, Therapeutic Potencial, and Challenges.» *The N. England J Med* 10, nº 335 (2006): 973-975.
4. Arredondo, J. L. y Figueroa, A. D. R. «Temas actuales de infectología.» 143-154. Ed. Intersistemas, 2003.
5. Carreno, BM, y M Collins. «The B7 Family of Ligands and Its Receptors: New Pathway for Costimulation and Inhibition of Immune Response.» *Annu. Rev. Immunology.*, nº 20 (2002): 29-53.
6. Cheng, Lieping. «Co-Inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity.» *Nature*, nº 4 (2004): 336-347.
7. Coleman, N and Stanley, MA. «Analysis of HLA-DR expression on keratinocytes in cervical neoplasia.» *Int J Cancer*, nº 52 (1994): 314-319.
8. Cseke, LJ, y Kaufman;PB. *Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine*. Segunda Edición. CRC Press, 2004.
9. Dell, Gaston. «Contributions in the domain of cancer research: Review Human papillomavirus and their role in cervical cancer.» *CMLS*, nº 58 (2001): 1923-1942.
10. Ding, L, P Linsley, LY Huang, y R and Shevach, E. Germain. «IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression.» *Immunology* 3, nº 151 (1993): 1224-1234.
11. Doorbar, John. «Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer (Review).» *Clinical Science*, nº 110 (2006): 525-541.
12. Freeman, GJ, AJ Long, Y Iwai, y et al. «Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation.» *J Exp Med*, nº 192 (2000): 1027-1034.
13. Gaarenstroom, KN, GG Kenter, JMG Bronfer, MPW Kore CM: Gallee, y AAM Hart. «Prognostic significance of serum antibodies to human papillomavirus-16 E4 and E7 peptides in cervical cancer.» *Cancer*, nº 74 (1994): 2307-2313.
14. Garrido, F, T Cabrera, A Concha, S Glew, RF Cabello, y LP Stern. «Natural history of HLA expression during tumor development.» *Immunology Today*, nº 14 (1993): 491-499.
15. Gaspari, AA, GD Semopws, P Chess, y J and Phips, RP. Gish. «Human epidermal keratinocytes are induced to secrete interleukin-6 and co-stimulate T lymphocyte proliferation by a CD40-dependent mechanism.» *Eur J Immunol.*, nº 26 (1996): 1371-712.
16. Giannini, SL, P Hubert, J Doyen, J Boniver, y P. Delvenne. «Influence of the mucosal epithelium microenvironment on Langerhans cells: implications for the development of squamous intraepithelial lesions of the cervix.» *Int J Cancer*, nº 97 (2002): 654-659.
17. Greenfield, E, K Nguyen, V Kuchroo, y et al. «CD28/B7 costimulation: A review.» *Crit Rev Immunology*, nº 18 (1998): 389-418.
18. Greenwald, RJ and Freeman, GJ. «The B7 Family Revisited.» *Annu Rev Immunology*, nº 23 (2005): 15-48.
19. Harris, NL and Ronchese, F. «The role of B7 costimulation in T-cell immunity.» *Immunology and Cell Biology*, nº 77 (1999): 304-311.

20. Herrington, CS. «Human papillomaviruses and cervical neoplasia. Interaction of HPV with other factors.» *J Clin Pathology*, nº 48 (1995): 1-6.
21. Jellis, CL, y otros. «Genomic organization of the gene coding for the costimulatory human B-lymphocyte antigen B7-2 (B7.2).» *Immunogenetic*, nº 42 (1995): 85-89.
22. Jellis, CL, y otros. «Genomic organization of the gene coding for the costimulatory human B-lymphocyte antigen B7-2 (B7.2).» *Immunogenetic*, nº 42 (1995): 85-89.
23. Jiménez-Flores, R, y otros. «High-risk human papilloma virus infection decrease the frequency of dendritic Langerhans cells in the human female genital tract.» *Immunology* 2, nº 117 (2005): 220-228.
24. Kaufmann, A, L Gissman, D Street, C Schreckenberger, M Hunter, y L. N Quiao. «Expression of CD80 Enhances immunogenicity of cervical carcinoma cells in vitro.» *Cell Immunology*, nº 169 (1996): 246-251.
25. Koyama, S, T Maruyama, S Adachi, y M. Nozue. *Cancer Res Clin Oncol.*, nº 124 (1998): 383-388.
26. Kurosawa, S, y otros. «Expression of the Costimulatory Molecule B7-H2 (Inducible Costimulator Ligand) by Human Airway Epithelial Cells.» *An. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, nº 28 (2003): 563-573.
27. Latchman, Y, CR Wood, T Chernove, y et al. «PD-L2 a novel B7 homologue, es a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation.» *Nat Immunol*, nº 2 (2001): 261-268.
28. Lee, BN, y otros. «Deficiencies in myeloid antigen-presenting cells in women with cervical squamous intraepithelial lesions.» *Cancer* 5, nº 107 (2006): 999-1007.
29. Liu, X, y otros. «B7H co-stimulates clonal expansion of, and Cognate Distribution of Tumor Cells by, CD8+T Lymphocyte in vivo.» *J Exp Med* 9, nº 194 (2001): 1339-1348.
30. Manos, MM, y otros. «Identifying women with cervical neoplasia: using human papillomavirus DNA testing for equivocal Papanicolaou test.» *JAMA* 17, nº 281 (Mayo 1999): 1605-10.
31. Matsuda. «Low grade cervical intraepithelial neoplasia associated with the human papillomavirus infection. Long time follow up.» *Acta Cytol.*, nº 42 (1998): 625-630.
32. McBride. «Partitioning Viral Genomes in Mitosis: Same Idea, Different Targets.» *Cell cycle*, nº 5 (2006): 1499-1502.
33. McBride, AA, y otros. «The Papillomavirus E2 Regulatory Proteins.» *Journal of Biology Chemistry*, nº 266 (1991): 18411-18414.
34. Moscicki. *VPH y la mujer adolescente. En HPV, Today.* 5 de Septiembre de 2004. (último acceso: 2008).
35. Mota, F, N Rayment, S Chong, A Slinger, y B. Chain. «The antigen-presenting environment in normal and human papillomavirus (HPV)-related premalignant cervical epithelium.» *Clin Exp Immunol*, nº 116 (1999): 33-40.
36. Muñoz. «Chapter 1: HPV in The Etiology of Human Cancer.» *Vaccine*, 2006: S1-S10.
37. Najafian, N, y Khouryk SJ. «T cell costimulatory pathways: blockade for autoimmunity.» *Expert Opin Biol Ther* 3, nº 10 (2003): 227-236.
38. Nicokoloff, BJ, y LA. Turka. «Immunological functions of non-professional antigen-presenting cells: new insights from studies of T cell interactions with keratinocytes.» *Immunol Today*, nº 15 (1994): 464-469.
39. Ortiz Sánchez, E, P Chávez- Olmos, Piña-Sánchez, E, M Salcedo, y E Garrido. «Expression of the costimulatory molecule CD86 but not CD80, in keratinocytes of normal cervical epithelium and human papillomavirus-16 positive low squamous intraepithelial lesions.» *Inst. J Gynecol Cancer*, nº 17 (2007): 571-580.

40. Park, J, EJ Kim, HJ Kwon, ES Hwang, y SE y Um, SJ Mankoong. «Inactivation of interferon Regulatory Factor-1 Tumor Suppressor Protein by HPV E7 Oncoprotein.» *Journal Biology Chemistry* 10, nº 275 (2001): 6764-6769.
41. Rojas Espinosa, Oscar. *Inmunología (de memoria)*. Tercera. Ed. Médica Panamericana, 2006.
42. Ronchese, F, B Hausmann, S Hubele, y P. Lane. «Mice transgenic for a soluble form of murine CTLA-4 show enhanced expansion of antigen-specific CD4+T cells and defective antibody production in vivo.» *J Exp Med*, nº 179 (1994): 809-817.
43. Schwarz, DJC, X Zhang, AA Fedorov, GS Nathenson, y SC Almo. «Structural basis for costimulation by the human CTLA-4/B7-2 complex.» *Nature* 410, nº 29 (Marzo 2001): 604-608.
44. Syrjänen, S and Syrjänen, K. *Papillomavirus infections in human pathology*. Reino Unido de la Gran Bretaña: Wiley & Sons, 1999.
45. Tatsumi, T, y otros. «Expression of costimulatory molecules B7-1 (CD80) and B7.2 (CD86) on Human Hepatocellular carcinoma.» *Hepatology*, nº 25 (1997): 1108-1114.
46. Thebeau, LG, y BA. Morrison. «B7 costimulation plays an important role in protection from herpes simplex virus type 2-mediated pathology.» *J Virol*, nº 76 (2002): 2563-25366.
47. Thorland, E, Myers S, Persing D, Sarkar G, McGoern R, y Gostout B and Smith D. «Human papillomavirus type 16 integration in cervical tumors frequently occurs in common fragile sites.» *Journal Cancer Research*, nº 60 (2000): 5916-5921.
48. Walker, MJ and Rapley, R. *Medical Biometrics Handbook*. USA: Human Press, 2005.
49. Wang, S and Chen, L. «T Lymphocyte Co- Signaling Pathways of the B7-CD28 Family.» *Cellular and Molecular Immunology*, nº 1 (2004): 37-42.
50. Woodworth, C, y S. Simpson. «Comparative Lymphocyte Secretion by cultured normal human cervical keratinocytes, papillomavirus-immortalized, and carcinoma cell lines.» *Am J Pathol.*, nº 142 (1993): 1544-1555.
51. Zur Hausen, H, y EM Villiers. «Human Papillomaviruses.» *Annu. Rev. Microbiol.*, nº 48 (1994): 427-447.