

6



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA HIDROCORTISONA SOBRE LA
EXPRESION DE MOLECULAS CLASE I DEL MHC Y DEL
PROCESAMIENTO ANTIGENICO EN LINEAS CELULARES DE CANCER
CERVICAL POSITIVAS Y NEGATIVAS AL HPV

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :
B I O L O G O
P R E S E N T A :
FLORES MARROQUIN CAROLINA

284518

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MA. LOURDES MORA GARCIA
ASESOR DE TESIS: DR. ALBERTO MONROY GARCIA
LABORATORIO DE INMUNOBIOLOGIA



JUNIO DE 2000



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 realizó en el laboratorio de Immunobiología de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, bajo la dirección de la Dra. Ma. de Lourdes Mora García y con la asesoría del Dr. Alberto Monroy García y el Biol. Jorge Hernández Montes.

Durante el desarrollo de la tesis se contó con el apoyo económico de:

Beca para desarrollar tesis de licenciatura.

PAPIID-DGAPA UNAM: IN256597.

Apoyos a proyectos de Investigación.

CONACyT: 25443-M y M0205-M9808.

PAPIID-DGAPA UNAM: IN256597

DEDICATORIAS

A mis padres:

Al final de esta etapa estoy muy agradecida con ustedes, por haberme apoyado tanto, en los momentos buenos y malos. Para mí ustedes son el ejemplo a seguir tanto de perseverancia como de superación. Estoy muy feliz de los padres que me dieron, ya que ellos sin ninguna duda decidieron sacar adelante a 8 hijos, dándoles estudio de licenciatura. Aun cuando la mayoría de las veces, tuvieron que verse las caras duras siempre nos demostraron una cara de felicidad. Supieron educarnos bastante bien, sin embargo, a veces las circunstancias provocan que uno se comporte de otra manera. Espero contar para la eternidad con mis padres.

A Javier, Gabriel, Patricia y Juan:

Mis hermanos mayores, que en ustedes vimos los más chicos los ejemplos a seguir, antes los considerábamos como los rectos, serios y un poco enojones; sin embargo las cosas cambian y ahora los lazos de sangre se han convertido en lazos de confianza y amistad. Por todos los detalles que han tenido hacia nosotros ¡Gracias!

A Enrique, Adriana y Elsa:

Los chiquitines de la familia, no tengo palabras para darles las gracias por todo el apoyo recibido por ustedes, ya que sino estaba mi mamá, siempre podía contar con alguno de ustedes tres para consolarme. Enrique aun cuando no estuve tan unida a ti, siempre me supiste dar confianza para platicarte cosas, y me alegrabas la vida con tus comentarios sobre mis dientes y mi color de piel, gracias hermano por todos los consejos recibidos de tu parte, si los tomare en cuenta. Adriana ahora se lo que cuestan las cosas, en ti he visto la persona que algún día quisiera ser, con ese carácter tan duro y segura de lo que haces, que lastima que no fuiste investigadora privaste a la ciencia de tu presencia. Finalmente Elsa, primero te diré: ¡no sabes la que te espera!, no es cierto, cuando las cosas te gusta aun cuando al final te quejes, quedas con una satisfacción de tranquilidad, porque cubriste cierta meta, hechale ganas. Al final de este camino sólo puedo decirles que me siento contenta por haber realizado la meta que en un principio no estaba clara, además de haberse negado tanto.

A mis amigos (en general): A toda la gente que estuvo a mi alrededor les doy las gracias, por qué gracias a ellos (cuando no estaba cerca de mi familia) pude seguir adelante, ya que cuando me sentía inconsolable recordaba muchos detalles bonitos. Para mí fue buena toda la ayuda prestada por cada uno de ellos, en su momento, y espero seguir los consejos más importantes recibidos para mejorar como persona.

A los integrantes del laboratorio de Inmunobiología:

En donde existió más que un trato formal de trabajo, creo que deberían darles una medalla por la paciencia que en todo momento me tuvieron, sobre todo a mi asesor: el maestro Beto. Gracias por todas sus enseñanzas

Quiero agradecer a todas las personas que de una u otra forma contribuyeron para el feliz término de esta tesis, de manera especial a mi directora de tesis la Dra. Lourdes Mora García, y mis sinodales Dra. Isabel Soto Cruz, Dr. Alberto Monroy García, Biol. Jorge Hernández Montes y el Dr. Edelmiro Santiago Osorio por sus comentarios y sugerencias.

Finalmente, agradezco también a los señores Ranulfo Pedraza y José Chavarría por su apoyo técnico.

INDICE

Resumen	1
Marco Teórico	
1. Cáncer cérvico uterino (CaCu) y virus del papiloma humano	3
1.1 Cáncer cérvico uterino	3
1.2 Virus de papiloma humano (HPV)	3
1.2.1 Estructura del virus	4
1.2.2 Ciclo celular del virus	6
1.3 Carcinogénesis cervical	7
1.4 Esteroides y CaCu	8
1.4.1 Producción y función de esteroides	8
1.4.2 Niveles y mecanismo de acción de la hidrocortisona en la sangre	8
1.4.3 Elementos de respuesta en el genoma del HPV	10
1.4.4 Metabolitos y participación en la carcinogénesis	13
2. Procesamiento y presentación de antígenos	16
2.1 Respuesta inmune	16
2.2 El complejo principal de histocompatibilidad (MHC)	18
2.3 Procesamiento y presentación de antígenos de la molécula clase I (MHC-I)	21
2.4 Hormonas y MHC	26
3. Planteamiento	27
4. Hipótesis	28
4. Objetivos	29
5. Metodología	30
5.1 Cultivos celulares	30
5.2 Obtención de epitelio normal	31
5.3 Aislamiento de RNA total por medio de la técnica de trizol	31
5.4 Obtención de DNA complementario a partir de RNA total	32
5.5 Amplificación de los genes del TAP1, TAP2, LMP2, LMP ^γ , LMP10, PA28 alfa y PA28 beta a través de la técnica de PCR	33
5.6 Análisis de los productos de PCR	34
5.7 Citometría de flujo	35
6. Resultados	36
6.1 La hidrocortisona disminuye la expresión del MHC-I en las líneas celulares de CaCu con infección de HPV	36
6.2 La hidrocortisona disminuye, a nivel transcripcional la expresión de moléculas MHC-I en algunas líneas celulares de CaCu	37
6.3 La hidrocortisona no disminuye la expresión de moléculas que intervienen en el procesamiento antigénico en las líneas celulares de CaCu	38
7. Discusión de resultados	51
8. Conclusiones	55
9. Vocabulario	56
10. Apéndice	57
11. Bibliografía	58

ABREVIATURAS

ACTH: Hormona adrenocorticotrofica o adrenocorticotrofina
ATP: Adenosintrifosfato
C2, C3 y C5: Componentes del complemento
CaCu: Cáncer cérvico uterino
c-myc: gen nuclear involucrado en la inmortalización de las células
CRE: elementos de regulación de clase I
CYP450, CYP1A1 y CYP1A2: enzimas que regulan el metabolismo del estrógeno
DNAc: ADN complementario.
erbB: receptor de membrana que enlaza la hormona del factor de crecimiento epidermal
ERG: Elemento de respuesta a glucocorticoides
GM-CSF: Factor de estimulación de colonias de macrófagos y granulocitos
GM-CSF: Factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos
HC: Hidrocortisona
HCMV: Citomegalovirus
HPV: Virus del Papiloma Humano
HSV: Virus del herpes simple
I3C: Fitoquímico anticancerígeno y antiestrogenico
IFN-γ: interferón gamma
IL: Interleucina
IRE: Elemento de respuesta a interferón
JAW1: Proteína transmembranal que puede funcionar como los TAP
Jun-b: Factor de transcripción
LMP10: Polipéptido de baja masa molecular 10
LMP2: Polipéptido de baja masa molecular 2
LMP7: Polipéptido de baja masa molecular 7
Mcf-7, MDA MB 231, MDA MB 435, IMIM MA-2 y IMIM MA-3: líneas de cáncer de mamá
MHC-I: Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase I
NF1: Gen asociado a la neurofibromatosis 1, que implica el desarrollo de múltiples tumores en el sistema nervioso periférico.
Oct: Elemento específico de tejido epitelial.
P97: Promotor transcripcional del HPV
PCT: Proteínas de choque térmico
ras: gen que convierte GTP a GDP, en la transducción de señales.
RLC: Región larga de control
RNAm: ARN mensajero
RT-PCR: Reacción de retrotranscripción y reacción en cadena de la polimersa
SM: Segundo mensajero
SP1: Elemento regulador de la transcripción de DNA en todos los genes de la célula.
TAP1: Transportador asociados con el procesamiento de antígeno (subunidad 1).
TAP2: Transportador asociados con el procesamiento de antígeno (subunidad 2).
TGF-β: Factor de Crecimiento Tumoral beta
TH1: linfocitos que producen citocinas, las cuales favorecen los fenómenos de inflamación.

TH2: linfocitos que producen citocinas, las cuales favorecen la inmunidad humoral

TNF- β : Factor de necrosis tumoral beta

Y, X MECL-1: subunidades del proteasoma que se encuentran en el proteasoma sin estimular con interferón

MECL-1: Complejo Semejante al Multicatalítico endopeptidasa-1

RESUMEN

A nivel nacional, el cáncer cérvico-uterino (CaCu) es la primera causa de muerte por neoplasias entre las mujeres. Esta enfermedad se encuentra asociada etiológicamente con la infección del virus de papiloma humano (HPV); cerca del 90% de los tumores la presentan. Se ha visto que la transformación del epitelio por el HPV se encuentra favorecida por varios factores, tal como la presencia de hormonas esteroides. Se sabe que estas hormonas aumentan la transcripción de proteínas oncogénicas del HPV debido a la interacción de ellas con elementos de respuesta localizados en el genoma viral. Asimismo en recientes estudios se ha encontrado que inducen la disminución de la expresión de moléculas clase I del MHC (MHC-I) en células infectadas con HPV. En el presente trabajo, analizamos el efecto de la hidrocortisona (HC) sobre la transcripción de las cadenas pesadas de las moléculas MHC-I y su expresión en membrana celular, así como de la transcripción de las principales moléculas que intervienen en la vía del procesamiento de antígenos por clase I en varias líneas celulares de cáncer cervical: 4 con infección de HPV-18 (CALO, INBL, HELA y VIPA), 2 con HPV-16 (CASKI y SIHA); y 2 sin HPV (C33A y VIBO). Mediante el análisis de citometría de flujo, se encontró que la HC indujo una disminución en mayor proporción de la expresión de MHC-I en las líneas celulares con HPV: las líneas positivas a HPV-18 presentaron una disminución de 30 a 50%; y las de HPV-16 de 20 a 30 %; mientras que en aquellas sin infección con HPV se encontró un efecto poco perceptible. El análisis de los transcritos de la cadena pesada del MHC-I y de las moléculas que intervienen en el procesamiento de antígenos (TAP-1, TAP-2, LMP-2, LMP-7, LMP-10, PA28 α y PA28 β) mediante RT-PCR reveló que sólo en HELA disminuyó la transcripción de las cadenas pesadas del MHC-I bajo el tratamiento con la HC, mientras que la transcripción de las moléculas del procesamiento antigénico no fue afectada por la hormona en todas las líneas celulares. El efecto de HC sobre la disminución de la expresión de MHC-I en la membrana de las células infectadas con HPV, estaría principalmente a nivel postranscripcional, en donde el aumento de la síntesis de las proteínas oncogénicas (E6 y E7) inducidas por la HC, afectaría directamente el proceso de formación y maduración de los complejos MHC-I

Finalmente se sugiere que el uso de hormonas estroides en personas que presenten infección con HPV, pueda constituir un factor de riesgo en el desarrollo de las neoplasias cervicales.

MARCO TEÓRICO

1. Cáncer Cérvico Uterino y Virus del Papiloma Humano

1.1. Cáncer Cérvico Uterino

En México las mujeres jóvenes en etapas reproductivas están propensas a sufrir cáncer cérvico uterino (CaCu), siendo así la primera causa de mortalidad (Meneses et al, 1994; Taylor et al, 1999). Algunos factores de riesgo son: inicio de la actividad sexual a edad temprana y el número de compañeros sexuales, entre otros. Además existen cofactores que aumentan el riesgo de progresión a cáncer como son: la inmunosupresión; la influencia de hormonas (esteroides) que favorecen la susceptibilidad a la infección con ciertos virus, provocando la disminución de moléculas clase I en las células infectadas (Bartholomew et al, 1997); infecciones con agentes sexuales de transmisión tales como la *C trachomatis*, que han sido asociados con el desarrollo de neoplasias cervicales (Muñoz y Bosch, 1997; Pavoneen et al, 1990). En los años 60 y 70, el CaCu se asoció etiológicamente con la presencia del virus Herpes simple (HSV) y en menor grado con citomegalovirus (HCMV), sin embargo, en la mayoría de los estudios moleculares no se encontraron pruebas contundentes del papel de estos virus en la transformación celular y se desechó esa idea (Warness, 1995; Villa et al, 1997). Más tarde en los 80, la etiología viral del CaCu se volvió a retomar cuando se encontró una alta frecuencia del HPV en los tumores. Actualmente con ayuda de técnicas de biología molecular, se ha podido constatar que cerca del 98% de los tumores existe la presencia de DNA del HPV, e incluso se sabe del papel transformante de algunas proteínas del HPV en la célula huésped (zur Hausen, 1991; Bosch et al, 1995).

1.2 Virus del Papiloma Humano

1.2.1. Estructura del virus.

En la familia de HPV existen más de 80 tipos, los cuales se clasifican en dos grupos: los de alto riesgo (el tipo 16, 18, 31, etc) y los de bajo riesgo (6, 11, 5 etc), cabe mencionar que cada virus presenta diferente grado de virulencia que los demás; por ejemplo, el tipo 18 es más agresivo que el tipo 16, ya que clínicamente el tipo 18 esta siempre asociado con neoplasias intraepiteliales cervicales avanzadas y carcinomas cervicales (Chen et al, 1993; Kurman et al, 1988; Matlashewski, 1989; Wright et al, 1989; y Storey et al, 1990).

El HPV posee una simetría icosaédrica y un DNA circular de doble cadena, y es estrictamente epiteliotrópico (Pater et al, 1994). El genoma del HPV se compone de aproximadamente 7904 pares de bases; consta de dos tipos de genes: los genes de expresión temprana (E, early), que ocupan alrededor de 4.5 Kb y son necesarios para regular la transcripción y transformación de la célula huésped; y los genes de expresión tardía (L, late), con 2.5 Kb, y codifican a las proteínas de la cápside. El HPV posee en su DNA una región reguladora de aproximadamente 1 Kb, que porta a su vez el origen de replicación y muchos elementos de control para la transcripción y replicación viral (ver figura 1.1). El único promotor transcripcional presente en el mapa de los HPV es designado como p97 (Arbeit et al, 1996 y Parte et al, 1994). En el proceso de replicación del genoma viral, el gen E2 tiene un efecto de represión sobre los oncogenes E6 y E7. Por otro lado, se ha visto que el DNA viral se encuentra en forma episomal en estadios de bajo riesgo (como verrugas y displasias del cérvix); mientras en los carcinomas, el genoma viral se integra a los cromosomas de la célula huésped, al integrarse se produce una ruptura que da origen a grandes fragmentos del genoma viral, perdiéndose normalmente los genes L1, L2 y algunos genes tempranos (como E1 y E2); al perderse E2 se potencia la replicación de los genes transformantes E6 y E7 (Matlashewski et al, 1989; Tindle 1996; Crusius et al, 1998; Desaintes y Demeret, 1996; Duggan-keen et al, 1998). Las funciones de los genes en el virus se enlistan en el cuadro 1.1.

Cuadro 1.1: Características y funciones principales de las proteínas del virus del HPV.

Proteínas Tempranas

E6	Proteína básica unida a zinc, se une a DNA de doble cadena con alta afinidad. Inmortaliza las células huésped y modula la transcripción del virus, se une a p53 con la finalidad de degradarla.
E7	Fosfoproteína nuclear ácida, unida a zinc. Inmortaliza las células del huésped y modula la transcripción del virus. Transforma cultivos primarios de células de ratón al cooperar con <i>ras</i> . Se une a pRb inactivándolo. Modula indirectamente la transcripción.
E2	Regula la transcripción viral, se une al DNA y coopera con E1 en la replicación viral.
E1	Participa en la regulación viral, inicia la replicación debido a que es una ATPasa dependiente de DNA y una helicasa de DNA requerida para la síntesis y modula la función
E4	Participa en la maduración de las partículas virales.
E5	Transforma y se pierde durante la integración viral.

Proteínas Tardías.

L1 y L2	Proteínas de la cápside del virus
---------	-----------------------------------

Toledo-Cuevas y García Carrancá, 1996; Münger et al, 1992.

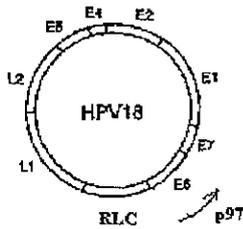


Figura 1.1: Organización genómica del virus del papiloma humano. En el esquema se presentan los diferentes genes que integran el papiloma: los tempranos (designados en inglés como *early*) E1, E2, E4, E5, E6 y E7; y los tardíos (designados en inglés *later*) L1 y L2. El virus posee un promotor temprano denominado p97 y una región larga de control (RLC), donde existen varios elementos de respuesta a diferentes proteínas.

1.2.2. Ciclo celular del virus

De acuerdo con estudios epidemiológicos, la edad promedio en la cual la carcinogénesis cervical ocurre con mayor frecuencia es a los 40 años de edad; el pico de mayor incidencia de la infección es a los 20 años. Después de ocurrida la introducción del virus a la célula huésped, se puede presentar un periodo de latencia largo entre la infección del virus y el desarrollo de cáncer (que va de los 20 a 50 años) (Fields et al, 1990 y Lazo, 1999). El HPV se desarrolla de acuerdo con el estado de diferenciación de las células epiteliales de cérvix, esta situación se explica debido a que la regulación transcripcional de la región larga de control es más activa en células ya diferenciadas. De hecho varios estadios del ciclo del virus requieren factores específicos que son provistos por las diferentes etapas de maduración de las células epiteliales escamosas (Pater et al, 1994). Se piensa que la infección primaria se da en las células no diferenciadas del epitelio estratificado, seguida de su penetración hacia su interior mediante mecanismos aún desconocidos. Las partículas virales de HPV tienen una cápside compuesta por las proteínas L1 (aproximadamente en un 90%) y L2 (10%); estas proteínas interactúan con las moléculas de superficie de la célula blanco

facilitando la entrada del DNA viral, y una posible vía de entrada a la célula es la α -integrina (Evander et al, 1997). Al inicio de la infección se detectan las proteínas E1, E2 y E5, en donde las dos primeras permiten la estabilidad del DNA episomal. En las capas epiteliales más diferenciadas se expresan las proteínas L1 y L2, las cuales permiten el ensamblaje y la liberación del virus (Duggan-Keen et al, 1998).

1.3. Carcinogénesis cervical

En el proceso de carcinogénesis cervical, pueden intervenir muchos factores como son: hormonas; oncogenes; factores mutagénicos; y factores vírales entre otros. En el caso de las hormonas se sabe que sensibilizan al epitelio, de tal manera que cuando el virus del papiloma lo infecta es posible desarrollar más rápido la infección y progresar a estadios más avanzados (Khare et al, 1997; Knebel et al, 1990; Pater et al, 1994; Mittal et al, 1993; Pater et al, 1988; DiSaia, 1998). Asimismo, se ha visto que hay una correlación entre el desarrollo de neoplasias cervicales y el uso prolongado de anticonceptivos orales (Beral et al, 1988); de hecho, durante el embarazo se incrementan los niveles de progesterona, lo cual es un factor significativo de riesgo para el proceso de transformación maligna (Pater et al, 1990; Pater and Pater, 1991).

Otro factor de carcinogénesis es la presencia de oncogenes como *ras* activado, el cual permite que las células infectadas con HPV sean tumorigénicas favoreciendo la transcripción de los oncogenes (Chen et al, 1993; Yamada et al, 1997). Los factores mutagénicos y los asociados con virus se encuentran relacionados, ya que cuando se da la infección por el virus del papiloma en las etapas iniciales se expresan altos niveles de E1 y E2, con lo que se aumenta la replicación viral en células con displasia leve que contienen DNA episomal, a continuación E6 y E7 se transcriben produciendo una desestabilización cromosomal. Este evento facilita la integración del DNA viral en el genoma del huésped, por medio de la recombinación de las secuencias homólogas en presentes en el genoma de la célula (Pater, 1994). Algunos de los eventos ocurridos al integrarse el virus al genoma celular son: el DNA viral es linearizado entre E1 y E2 (al interrumpirse E2 deja de regular a E6 y E7, aumentando su expresión); hay pérdida o daño de los genes E1, L1 y L2; al integrarse el virus en el genoma de la célula huésped,

se puede alterar la expresión de los genes cercanos al sitio de integración, por ej. se ha visto que el DNA del HPV se integra cerca del gen *c-myc*, con este evento *c-myc* es capaz de alterar la expresión de otros genes celulares (Antinore et al, 1996). Los factores que producen la carcinogénesis pueden actuar en conjunto en la transformación de células normales como se muestra en la figura 1.2.

1.4. Esteroides y CaCu.

1.4.1. Producción y función de esteroides.

Las hormonas producidas por la glándula adrenal son de tres tipos: las hormonas que regulan el desarrollo sexual, los glucocorticoides y los mineralocorticoides. De éstas, los glucocorticoides juegan un papel importante sobre la inmunidad del huésped, por lo que nos enfocaremos al mecanismo y biosíntesis de estas hormonas. La glándula adrenal es estimulada para producir hormonas. El proceso inicia en los centros neuronales, los cuales pueden ser estimulados por estrés u otras entradas sensoriales. La sensibilización de estos centros, origina un mensaje hacia el hipotálamo para producir el factor de liberación de corticotropina. Este factor es enviado a la hipófisis, específicamente a la pituitaria anterior, donde se estimula directamente la liberación de la hormona adrenocorticotropina (ACTH, de 39 aminoácidos), que es liberada a sangre y viaja hasta la corteza fasciculada adrenal, donde estimula la producción de hidrocortisona (también denominado cortisol) (Hadley et al, 1992). En la biosíntesis de las hormonas esteroides como es el caso de la hidrocortisona, el colesterol es el compuesto del cual se producen todos los esteroides. La síntesis de la hidrocortisona se inicia cuando el colesterol por la adición de grupos hidroxilo se transforma a pregnenolona. A su vez la pregnenolona es hidroxilada con la finalidad de producir la 17-OH-pregnenolona; a este último compuesto posteriormente se le quita un hidrógeno, convirtiéndose en la 17-OH-progesterona. Después de sucesivas adiciones de OH se produce el 11-desoxihidrocortisona y finalmente la hidrocortisona (Baxter y Rousscau, 1979). Los glucocorticoides son potentes agentes anti-inflamatorios e inmunosupresores generales, destruyen el tejido linfoide (los eosinófilos y basófilos son suprimidos), activan una variedad de funciones metabólicas interviniendo en la gluconeogénesis. En

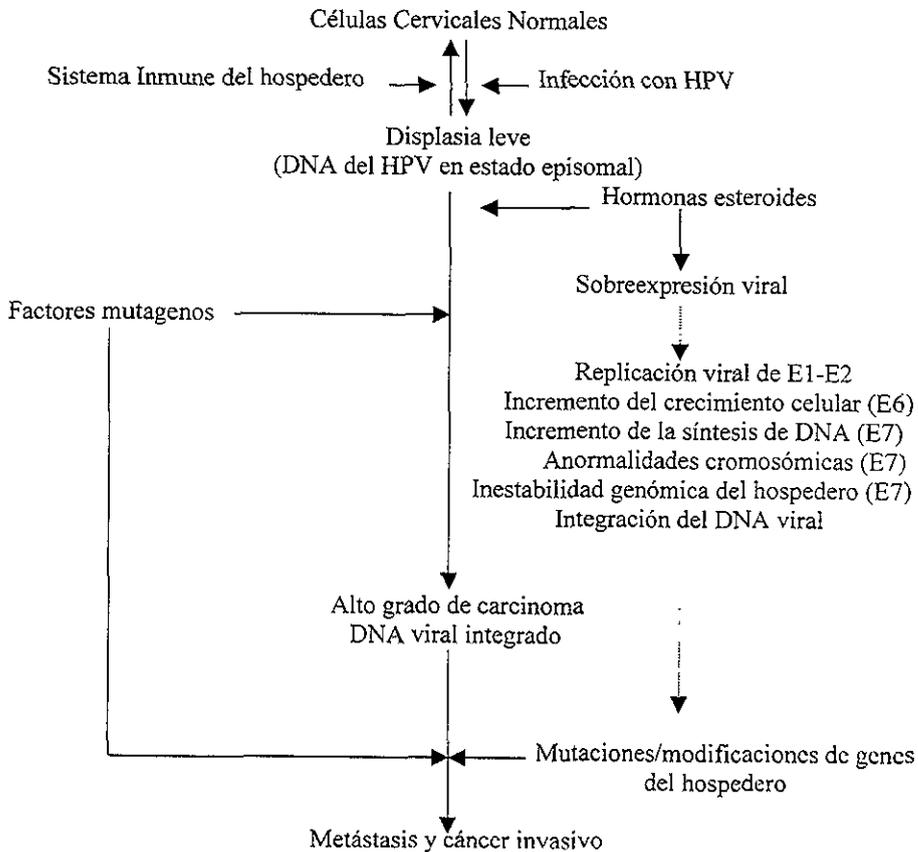


Figura 1.2: Modelo de carcinogénesis cervical. Cuando se da la infección por HPV, el sistema inmune puede controlar el "avance del tumor". Sin embargo, cuando se evade la respuesta inmunológica, se puede producir una displasia leve, en la cual el genoma viral se encuentra en estado episomal. Se ha visto que para que ocurra la transformación del epitelio cervical hacia una neoplasia intraepitelial de alto riesgo, intervienen varios factores como son los niveles normales o elevados de hormonas esteroides, que permiten que el virus pudiera aumentar la transcripción de sus genes. La integración del DNA viral al genoma celular, aunado a eventos mutagénicos como son las deleciones, translocaciones y duplicaciones, propician aún más la activación y supresión de algunos genes celulares que conllevan a la transformación celular y por consiguiente al desarrollo del tumor.

altas concentraciones, estas hormonas estimulan la degradación e inhibición de proteínas; promueven la lipólisis; estabilizan los lisosomas y membranas de todo tipo; inhiben la migración de leucocitos, e intervienen en la producción de bajos niveles de anticuerpos (Giuliani et al, 1995; Jonson, 1992; y Parker, 1993; Smith y Thier, 1990, y Wilckens y De Rijk, 1997)

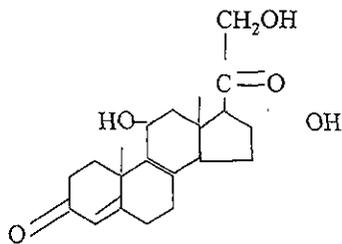
1.4.2 Niveles y mecanismo de acción de hidrocortisona en sangre

Los niveles de la hidrocortisona en el organismo varían a lo largo del día de manera natural, de forma heterogénea como se observa en la figura 1.3. En la figura se observa que la más alta concentración de hidrocortisona es en la mañana, y los niveles se reducen en la noche. Sin embargo existen factores externos como el estrés (infecciones fuertes pueden provocar estrés), que pueden inducir la producción de la hormona adrenocorticotropica (por la hipófisis) y la posterior liberación de la hidrocortisona (por la glándula adrenal). Cuando la hidrocortisona se vierte en el torrente sanguíneo, la hormona se une a la proteína llamada transcortina (con alta afinidad); sin embargo, no toda la hormona se une a la proteína, la que se encuentra libre es capaz de entrar a la célula blanco y producir sus efectos biológicos. La vida media de la hidrocortisona es de 90 minutos (Bolander, 1989).

Al atravesar la membrana celular el glucocorticoide es capaz de unirse a su receptor, que se encuentra de forma inactiva en el citoplasma (es decir, está unido a proteínas de choque térmico como 90 kDa, 70 kDa o 56 kDa) (O'Malley y Tsai, 1993 y Pater et al, 1990). Una vez que el receptor de glucocorticoides es activado, por la unión a esta hormona, es translocado al núcleo en forma de dímero, el cual se une a los elementos de respuesta a glucocorticoides en el DNA (Hadley, 1992; Hashida et al, 1991; Newfield et al, 1998) (figura 1.4).

1.4.3 Elementos de respuesta en el genoma del HPV

Como ya se había mencionado anteriormente el genoma de virus del HPV posee



Estructura molecular de la hidrocortisona

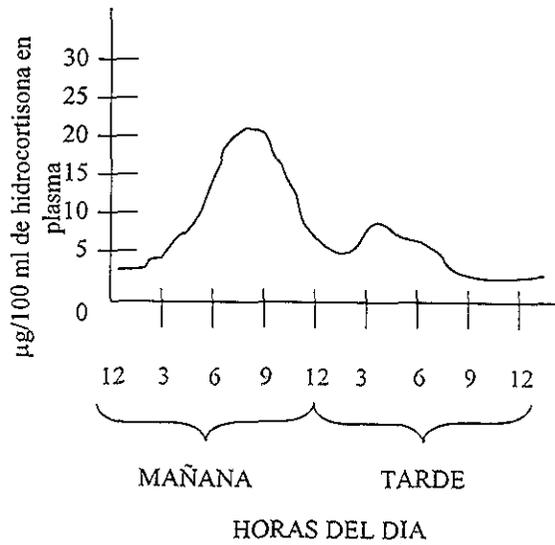


Figura 1.3: Variación de los niveles de hidrocortisona a lo largo del día en una persona normal, en la gráfica se observa que los niveles más altos se alcanzan entre las 6 y 9 de la mañana, debido a la variación diurna de la hormona adrenocorticotrófica (ATCH).

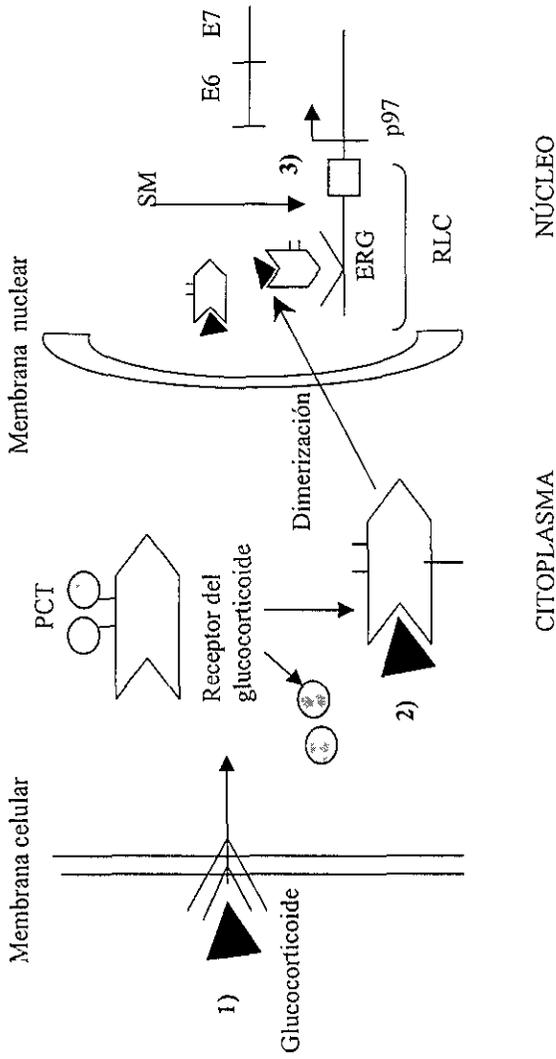


Figura 1.4 : Mecanismo de interacción del glucocorticoide con el virus del papiloma. 1) El receptor de glucocorticoides se encuentra en citoplasma o núcleo unido a proteínas de choque térmico (PCT) (estado inactivo); cuando entra el glucocorticoide a la célula e interacciona con el receptor se liberan las PCT sufriendo una dimerización(2), y penetrando así a núcleo (en el caso del receptor citoplásmico). 3) En núcleo se une a los elementos de respuesta de glucocorticoides (ERG) en DNA genómico o, en el caso del virus del papiloma donde existe un ERG ubicado en la región larga de control (RLC), este elemento permite que los oncogenes E6 y E7 del papiloma aumenten su transcripción. Se considera que en esta interacción puede intervenir un segundo mensajero (SM).

una región larga de control, la cual tiene varios elementos que regulan la transcripción de los genes del virus, entre los más importantes se encuentran AP1 (heterodímero formado por un elemento de la familia *fos* y uno de la familia *jun*); ERG (elemento de respuesta a glucocorticoides); NF1; SP1 y el elemento Oct-1 que da especificidad para epitelio (Butz, 1993; Mack y Laimins, 1991).

El elemento de respuesta a glucocorticoides (Figura 1.5), tiene un papel importante en la transformación de las células, debido a que en el humano se producen glucocorticoides que son capaces de unirse al virus, permitiendo el aumento de la transcripción de las oncoproteínas E6 y E7, las cuales afectan p53 y pRB (Huibregtse y Beaudenon, 1996 y Leanne y Münger, 1996).

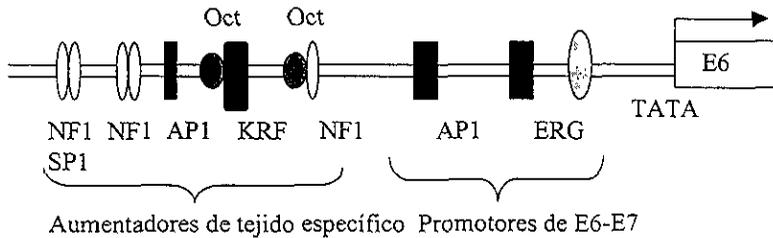


Figura 1.5: Región de Control Larga del virus del papiloma humano. Se compone de varios elementos de respuesta como: (1)El NF1 es importante en la estimulación para la transcripción de los oncogenes E6 y E7; (2)AP1 promueve la transcripción de E6 y E7, pero su incidencia es mayor que la de NF1; para una buena transcripción se requiere que las dos subunidades de este elemento estén presentes; (3)KRF-1 es un factor específico de epitelio que se une a Oct, juntos aumentan la actividad del HPV; (4)Se tiene un elemento de respuesta a glucocorticoides, que aumenta la expresión de E6 y E7 no tan marcadamente como AP1; el último elemento designado como SP1 tiene el mismo efecto que AP1. Cuando se producen mutaciones en SP1, se puede presentar una disminución en la actividad del virus.

1.4.4 Metabolitos de estrógenos y su participación en la carcinogénesis.

Las hormonas esteroideas se han asociado con el aumento de riesgo de cáncer cervical, debido a que existen metabolitos carcinogénicos, por ejemplo en el metabolismo del estradiol existen dos compuestos importantes: el 16 α -hidroxilado del estradiol (Bradlow et al, 1986; Schneider et al, 1989); y la forma 2-hidroxilada

(Michovicz and Bradlow, 1990). El estradiol es el principal componente estrogénico que se convierte a estrona por oxidación de carbono 17; la estrona es entonces metabolizada por el citocromo p450 específico, a través de 2 caminos: la hidroxilación en la posición 2 de los catecolestrógenos y la hidroxilación de la 16 α -hidroxiestrona y estriol (Figura 1.6). La dirección del metabolismo estrogénico está modulada por varios factores ambientales tales como dietas o químicos (Gierthy et al, 1988; Michnovicz and Bradlow, 1990).

Estudios sobre la transformación celular en modelos de ratón con cáncer cérvico-vaginal, que poseen los genes vírales de E6 y E7 de HPV16, muestran que estos animales desarrollan cáncer cuando son sometidos a tratamiento crónico con estrógeno. Los modelos han permitido analizar los eventos que preceden a la transformación celular, entre ellos: el incremento de la replicación del virus; incremento de la proliferación de las células sensibles a la hormona, incluyendo células infectadas con el virus; prevención de la apoptosis y aparición de metabolitos carcinogénicos. Estos últimos se incrementan a través de la infección con el papiloma (Auborn et al, 1991), por ejemplo en el caso del estradiol se aumentaría la 16 α -hidroxiestrona, incrementando la proliferación de células de tracto genital que estén infectadas o no por el HPV (Newfield et al, 1998). En el cuadro 1.2 se ilustra la presencia del metabolito en células normales y células transformadas.

Cuadro 1.2: Porcentaje del metabolito 16 α -hidroxiestradiol en células epiteliales genitales (% del compuesto por 100 μ g de proteínas)

Células	Normal	Inmortalizada
Prepucio	0.08 \pm 0.08	1.6 \pm 0.1
Cérvix (endocérvix)	0.7 \pm 0	
Cérvix (zona transformada)	2.7 \pm 0.7	16.3 \pm 0.5
Carcinoma cervical		8.6 \pm 1.4

Cuadro tomado de Auborn et al, 1991.

Datos recientes han mostrado que existen fitoquímicos como el I3C, un anticancerígeno y antiestrogénico, el cual inhibe el crecimiento de tumores benignos de laringe causados por HPV en ratón, además de ser efectivo en el tratamiento y prevención de papilomas. Los I3C son encontrados en altos niveles en vegetales crucíferos (por ejemplo col, brócoli, germen de bruselas, y coliflor). La dieta con el I3C funciona como un potente inductor del 2-hidroxiestradiol en roedores (Bradlow et al, 1991; Michnovicz et al, 1991) y humanos (Michnovicz y Bradlow, 1991), al incrementarse este metabolito la 16 α -hidroxiestrone disminuye. En experimentos realizados por Jin et al (1999), con ratones transgénicos que presentan el genoma del VPH tipo 16 y con la dieta de I3C, se observó que el 76% de los ratones sin tratamiento desarrollaron cáncer, mientras que sólo el 8% de los ratones tratados con I3C presentó cáncer. En este estudio se observó que los ratones sin tratamiento tuvieron los siguientes porcentajes: 21% de hiperplasia, 50% de displasia moderada, 21 % de displasia severa y cáncer 4%; mientras los tratados con I3C muestran 44% de hiperplasia, 48 % de displasia moderada y 8 % de displasia severa. Se considera que la forma en que actúa el I3C es por medio de la alteración de alguna enzima que regula el metabolismo del estrógeno por ejemplo CYP450; a través del incremento de CYP1A1 y CYP1A2, aumentando la 2-hidroxiestrone que compite con el estradiol por el receptor de estrógenos, asimismo se considera que inhibe la expresión de cinasas dependientes de ciclinas G c induce la detención del ciclo celular en G1 o a la apoptosis.

2. Procesamiento y Presentación de antígenos.

2.1 Respuesta Inmune

La defensa que presenta el organismo ante las diferentes enfermedades es mediada tanto por células y moléculas (inmunidad innata y adaptativa), como por hormonas (sistema endocrino). La inmunidad innata es producida por sistemas celulares de defensa con reconocimiento no clonal, donde la respuesta no es específica (Austyn et al, 1993). Entre ellos se encuentran los fagocitos (de linaje monocito-macrófago) y los polimorfonucleares o granulocitos (neutrófilos, basófilos y eosinófilos); aquí se incluye a las células llamadas asesinas naturales que son capaces de destruir a células infectadas

Datos recientes han mostrado que existen fitoquímicos como el I3C, un anticancerígeno y antiestrogénico, el cual inhibe el crecimiento de tumores benignos de laringe causados por HPV en ratón, además de ser efectivo en el tratamiento y prevención de papilomas. Los I3C son encontrados en altos niveles en vegetales crucíferos (por ejemplo col, brócoli, germen de bruselas, y coliflor). La dieta con el I3C funciona como un potente inductor del 2-hidroxiestradiol en roedores (Bradlow et al, 1991; Michnovicz et al, 1991) y humanos (Michnovicz y Bradlow, 1991), al incrementarse este metabolito la 16 α -hidroxiestrone disminuye. En experimentos realizados por Jin et al (1999), con ratones transgénicos que presentan el genoma del VPH tipo 16 y con la dieta de I3C, se observó que el 76% de los ratones sin tratamiento desarrollaron cáncer, mientras que sólo el 8% de los ratones tratados con I3C presentó cáncer. En este estudio se observó que los ratones sin tratamiento tuvieron los siguientes porcentajes: 21% de hiperplasia, 50% de displasia moderada, 21% de displasia severa y cáncer 4%; mientras los tratados con I3C muestran 44% de hiperplasia, 48% de displasia moderada y 8% de displasia severa. Se considera que la forma en que actúa el I3C es por medio de la alteración de alguna enzima que regula el metabolismo del estrógeno por ejemplo CYP450; a través del incremento de CYP1A1 y CYP1A2, aumentando la 2-hidroxiestrone que compite con el estradiol por el receptor de estrógenos, asimismo se considera que inhibe la expresión de cinasas dependientes de ciclinas G e induce la detención del ciclo celular en G1 o a la apoptosis.

2. Procesamiento y Presentación de antígenos.

2.1 Respuesta Inmune

La defensa que presenta el organismo ante las diferentes enfermedades es mediada tanto por células y moléculas (inmunidad innata y adaptativa), como por hormonas (sistema endocrino). La inmunidad innata es producida por sistemas celulares de defensa con reconocimiento no clonal, donde la respuesta no es específica (Austyn et al, 1993). Entre ellos se encuentran los fagocitos (de linaje monocito-macrófago) y los polimorfonucleares o granulocitos (neutrófilos, basófilos y eosinófilos); aquí se incluye a las células llamadas asesinas naturales que son capaces de destruir a células infectadas

con virus, embriónicas o células tumorales. Además están los megacariocitos que producen plaquetas, las cuales están involucradas en la coagulación sanguínea y en la respuesta inflamatoria, que frecuentemente ocurre cuando hay alguna infección, conduciendo a los síntomas clásicos de dolor, calor, enrojecimiento e hinchazón (Ratcliffe et al, 1988 y van Furth, 1993).

Cuando el sistema innato no es suficiente para contrarrestar la infección, se pone en marcha la inmunidad adaptativa, compuesta por linfocitos T y B, y se caracterizan por la especificidad celular y la generación de memoria para eliminar la infección en un segundo ataque (Roitt, 1991). Los linfocitos B y T maduran en médula ósea y en el timo respectivamente, pueden generar cientos de variantes de sus receptores por medio de la recombinación de los genes que los codifican. Es posible que cada receptor sólo reconozca un antígeno específico y se active para proliferar y diferenciarse a célula efectora. La respuesta adaptativa está dada por 2 vías de reconocimiento antigénico denominadas: inmunidad humoral (linfocitos B) y celular (linfocitos T) (Janeway et al, 1997). La respuesta humoral se produce a través de anticuerpos (moléculas receptoras y efectoras de los linfocitos B), que son inmunoglobulinas en forma de "Y" constituidas por 4 cadenas polipeptídicas: dos pesadas (H) con peso de 50 a 70 kDa y dos ligeras (L) con un peso de 23 kDa, que en conjunto constituyen la molécula de inmunoglobulina (Roit, 1991; Paul, 1993 y Janeway et al, 1997). La inmunidad mediada por los anticuerpos, sigue dos vías: 1. a través del sistema de complemento, el complemento se compone de enzimas proteolíticas, las cuales lisan a las células que reconoce el anticuerpo y, 2. por medio de la opsonización de los patógenos, facilitando que los macrófagos los fagociten.

La inmunidad celular está dada por células T, que previamente han sido seleccionadas para reconocer sólo antígenos extraños presentes en las moléculas del MHC clase I y II, que se encuentran en la superficie de las células epiteliales situadas en la corteza tímica. En la selección se eliminan los linfocitos que reconocen antígenos propios, y sólo el 5% de los timocitos salen al torrente sanguíneo como linfocitos maduros (Austyn et al, 1993; Robey et al, 1994). Los linfocitos T citotóxicos producen citocinas como IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IFN- γ , etc., además producen vesículas que llevan enzimas con potencial lítico dirigidas hacia la célula infectada o transformada

(Squier et al, 1994; Berke, 1994; Berke, 1995; Peralta et al, 1995). Los timocitos CD4+ al madurar presentan la secreción de IL-2, IL-3 y GM-CSF, así mismo, existen dos poblaciones: TH1, la cual produce IFN- γ , IL-2 y TNF- β que participan en fenómenos de inflamación; y la TH2 que produce IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, las cuales favorecen la inmunidad humoral (Rober et al, 1991; Berke, 1994; Moreno, 1996).

En el caso del sistema endocrino, cuando se origina la infección, el organismo libera una gran cantidad de hidrocortisona como resultado del estrés que la infección le provoca. La función principal de esta hormona consiste en modular la respuesta inmune celular y humoral, además de inducir varios efectos fisiológicos como son: movilización de la glucosa de sus sitios de almacenamiento, aumento del ritmo cardiaco y la contracción muscular de las fibras musculares de los vasos de la piel y de otros órganos, dilatación los bronquios y los vasos localizados en los músculos esqueléticos, aumento la muerte por apoptosis de linfocitos inmaduros del timo, reducción de la actividad proinflamatoria de los fagocitos y facilita la coagulación sanguínea. En modelos de ratón recién nacidos a los que se les inyectaban bacterias muertas (lo que simulaba una infección), desarrollaban la respuesta de estrés y los macrófagos se activaban produciendo citocinas pro-inflamatorias (con lo que aumentaba el metabolismo oxidativo de los fagocitos, aumento en la liberación de radicales libres, así como la inducción de apoptosis). La infección crónica implica una actividad constante del organismo, por lo cual se puede generar la pérdida de peso, anorexia y en etapas más avanzadas la inmunosupresión (Reyes et al, 1996). Existen hormonas que pueden controlar los efectos producidos por la hidrocortisona, como es el caso de la melatonina (en la glándula pineal) sustancia que atenúa y balancea los efectos antagónicos entre la inflamación y el estrés. La timulina (producida en las células epiteliales del timo), la dchidroepiandrosterona (sintetizada en las adrenales) y acetato de zinc también pueden regular la acción producida por la respuesta inmune y restablecer el estado normal del animal (Reyes et al, 1996).

2.2 El Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC).

El MHC en el genoma humano se encuentra ubicado en el brazo corto del

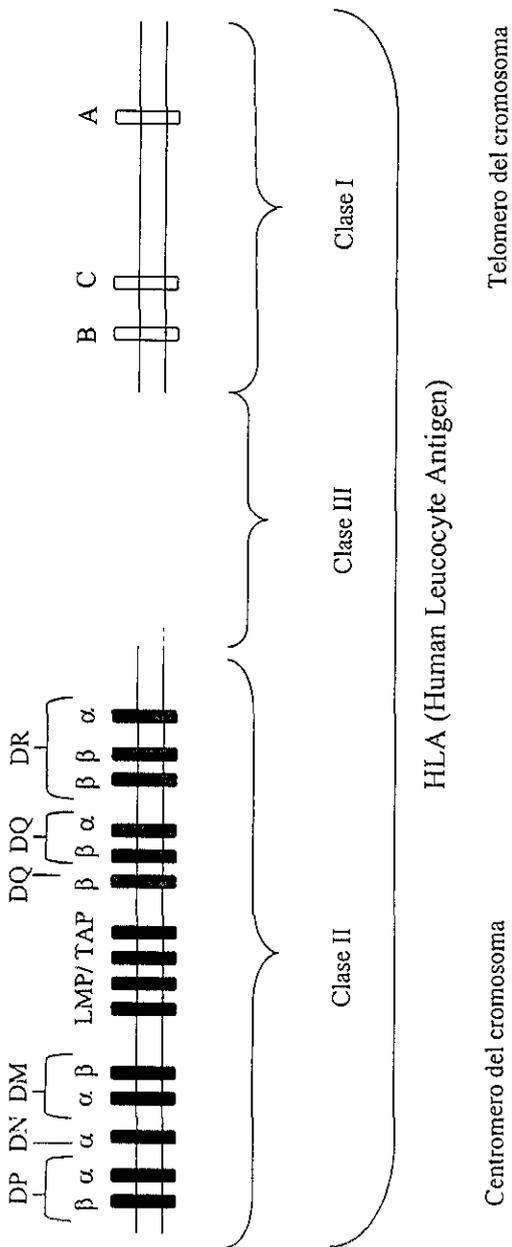


Figura 1.7: Organización de los genes que se encuentran en la región del MHC (también conocida como HLA), donde están contenidos las subregiones: MHC clase I, clase III y clase II (como LMP2, LMP7, TAP2 y TAP1). La región del MHC se ubica en el cromosoma 6.

cromosoma 6 (la parte distal de la banda 6p21.3), en una región conocida como sistema principal de histocompatibilidad, que abarca entre tres mil y cuatro mil pares de bases nucleotídicas. Esta región posee por lo menos 17 genes agrupados en tres variantes: las del MHC clase-I, también conocidas como HLA-A, -B y -C (que juntas forman el haplotipo HLA clase I) (Browning et al, 1996); las variantes de clase II DP, PO/DZ, DQ y DR; y la tercera variante (conocida como clase III) se encuentra entre las primeras dos regiones, donde se encuentran los genes que codifican los componentes del complemento C2, Factor B (fB) y C4A y C4B, así como los genes estructurales de la 21-hidroxilasa A y B (21-OHA y 21-OHB), además de los genes que codifican para glioxilasa I. En la región II también se encuentran los genes que codifican para las subunidades catalíticas de los proteasomas (LMP2 y LMP7, que degradan a las proteínas antigénicas a péptidos, ver adelante); los genes de los TAP (transportadores asociados con el procesamiento de antígenos que translocan los péptidos dentro del retículo endoplásmico); y los genes DM que tienen como función catalizar el enlace del péptido al MHC clase II (Parham, 1995, Janeway, 1997). En concreto, se puede decir que la región donde se ubica el MHC se compone de un grupo de genes que en su mayoría proveen el contexto para reconocimiento del antígeno extraño. Los genes del MHC-I son los más polimórficos, algunos de estos alelos difieren por más de 90 nucleótidos substituidos (Engelhard, 1994) (figura 1.7). La molécula MHC-I se compone por la cadena pesada que como ya se dijo esta codificada en el cromosoma 6, y por la subunidad β_2 -microglobulina que se encuentra codificada en el cromosoma 15.

El gen de las moléculas clase I del MHC se compone de 8 exones, de los cuales el exón 1 codifica la secuencia líder; el exón 2 para el dominio $\alpha 1$ de la cadena pesada; el exón 3 para el dominio $\alpha 2$; el exón 4 para el dominio $\alpha 3$; el exón 5 para la región transmembranal y parte de la citoplásmica; los exones 6 y 7 para partes de la región intracitoplásmica y el exón 8 para la cola 3' no traducida (Vargas, 1993).

La región designada para la molécula de histocompatibilidad clase I, posee varias secuencias de genes que funcionan como promotores de la molécula. Dentro de los detectados actualmente se hallan: la secuencia aumentadora A, que en ratones se ubica alrededor de 160 pares de bases antes de la caja TATA (Blanchet et al, 1991); en

la caja TATA se hallan 20 pares de bases antes de la secuencia de los genes MHC-I; otro elemento de promoción es el denominado con la siguiente secuencia: CCAAT (situado alrededor de 20 pares de bases antes de la caja TATA); los elementos de respuesta a interferón (IRE) (ubicado 110 pares de bases antes la caja TATA) (Blanchet et al, 1991) (figura 1.8). Entre las 400 y 431 pares de bases de esta región, se encuentra una secuencia de nucleótidos a la cual se le puede unir el elemento *c-jun*, provocando una disminución de la transcripción de las moléculas MHC-I (Howcroft, 1993), este elemento junto con *c-fos* dan origen al complejo AP-1, el cual se encuentra en epitelio. La transcripción del complejo AP-1 está regulada por ciertos factores como: la proteína E1A del adenovirus, o por el oncogene ras activado.

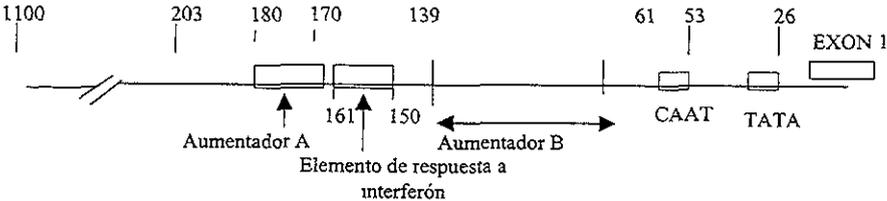


Figura 1.8: Elementos que controlan la transcripción de los genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad; es importante mencionar que las posiciones que se indican de las bases son anteriores a las de los genes del complejo.

2.3. Procesamiento y presentación de antígenos del MHC clase I (MHC-I)

En la mayoría de las células nucleadas, se expresan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I, las cuales son las responsables de presentar los péptidos antigénicos a los linfocitos T CD8+ con la finalidad de ser reconocidas y eliminadas, cuando existe una infección viral o transformación maligna (Berke, 1995; Moreno, 1996). La vía por la cual estos péptidos son presentados a los CD8+ es la siguiente:

Degradación de proteínas en el citoplasma:

Las proteínas endógenas propias o mutadas, son ubiquitinadas mediante una serie de enzimas (E1, E2 y E3), las cuales se enlazan covalentemente a residuos de lisina específicos de la proteína blanco (Michalek et al, 1993). La ubiquitinación conduce al desdoblamiento de la proteína para ser reconocida por el proteasoma, un

complejo multienzimático localizado principalmente en el citoplasma y cuya función es la de degradar a las proteínas previamente ubiquinadas. Este complejo multienzimático (también llamado 20S) se compone de 4 subunidades que forman un barril, las cuales a su vez poseen 7 subunidades alfa (que se encuentran en la parte exterior del barril) y 7 beta (que forman el interior); las subunidades beta poseen los sitios catalíticos y sólo 3 de las 7 subunidades son activas. Cuando se induce a la célula con interferón gamma, aumenta la actividad de los sitios proteolíticos, haciendo que las subunidades beta denominadas Y (δ) y X (MB1) sean remplazadas por LMP2 y LMP7 respectivamente; así mismo se induce el complejo multicatalítico semejante a la endopeptidasa MECL-1 (LMP10 el cual es codificado en el cromosoma 16) que reemplaza a la subunidad beta denominada Z. En la mayoría de los casos, los LMP 2 y 7 son esenciales en el procesamiento de antígenos ya que confieren especificidad al proteasoma, se ha visto que estas subunidades son capaces de aumentar los cortes de péptidos después de un residuo hidrofóbico básico, y existe una inhibición en el corte de péptidos después de residuos ácidos. En algunos estudios se ha reportado que células linfoblásticas así como en las células tumorales HELA de cáncer cervical, la transfección de LMP7 aumenta la capacidad de corte en los residuos hidrofóbicos o básicos, mientras que con la transfección de LMP2, disminuye la capacidad para cortar residuos ácidos (Sijts et al, 1996; Eggers et al, 1995; Martínez et al, 1991; Ortiz-Navarrete et al, 1991; Nandi et al, 1996).

La molécula MHC-I, típicamente enlaza péptidos que tienen residuos hidrofóbicos en el carboxilo terminal. En modelos donde los ratones carecen de LMP2, existen pocos linfocitos CD8+ maduros e incluso disminuye la respuesta de citotoxicidad hacia la infección con virus de la influenza. Por otro lado, los ratones con deficiencia en LMP7, presentan baja expresión de moléculas MHC-I en superficie.

La función del proteasoma es regulada principalmente por las moléculas PA28, las cuales son inducibles después del tratamiento con interferón- γ . La molécula PA28 está constituida por 6 subunidades designadas α y β que se acomodan de forma alternada en un anillo, estas estructuras se unen a los extremos del proteasoma 20S. La función de PA28 es la de aumentar la actividad proteolítica de las proteínas antigénicas

además de colaborar con LMP2 y LMP7 para aumentar la actividad de corte de aminoácidos después de residuos hidrofóbicos (Ustrell et al, 1995 y Dick et al 1996). Hay dos tipos de moléculas PA28 denominadas PA28 α y PA28 β , que están presentes en aproximadamente proporciones iguales; en experimentos sobre las subunidades el PA28 alfa cuando se transfecta en fibroblastos que poseen MCMV pp89, se hacen más susceptibles de lisis por medio de linfocitos CD8+ específicos, que los fibroblastos no transfectados (Groettrup et al, 1996 y Lindsay, 1998).

El núcleo del proteasoma 20S puede asociarse con otras subunidades (como el complejo 19S-ATPasa) que alteran su tamaño y actividad, al producirse esta unión el proteasoma 20S se conoce como complejo 26S (Hoffman et al, 1994). Entre otros compuestos que se unen al complejo 20S están: complejos de 700 kDa compuestos de aproximadamente 16 polipéptidos llamados PA700 (Ma et al, 1994); este complejo posee actividad de ATPasa y contiene múltiples subunidades con secuencias consenso para enlazar ATP (DeMartino et al, 1994).

Transporte de los péptidos al retículo endoplásmico: En la membrana del retículo endoplásmico (RE) se hallan los transportadores asociados con la presentación de antígenos (TAP), los cuales se encargan de translocar a los péptidos generados en citosol hacia el RE. Estos transportadores funcionan como un heterodímero, constituido por las subunidades TAP1 y TAP2 codificadas en los genes cercanos a LMP2 y LMP7 en el MHC, son inducibles con interferón- γ , y poseen varios dominios transmembranales, con una región hidrofóbica en el amino terminal y un dominio de enlace ATP en el carboxilo terminal. La expresión de TAP1 y TAP2 es requerida para un buen transporte de péptidos, debido a que el transporte está dado por la unión de las regiones citosólicas de los TAP (Androlewicz et al 1994 y Nijenhuis et al, 1997). En células de cáncer cervical, se ha encontrado que el TAP1 disminuye en los nódulos linfoides metastásicos (18 de 20 pacientes), más que en tumores primarios (11 de 20 pacientes) (Cromme et al, 1994). La mutación del residuo 374 en el TAP1, altera el transporte específico, ya que justamente este sitio tiene preferencia por el carboxilo terminal del péptido (Van Endert et al, 1995 y Uebel et al, 1995). El sitio de unión se forma por el extremo carboxilo hidrofóbico de las dos subunidades, adyacente al dominio hidrofílico citosólico. Es importante mencionar que el enlace del péptido es

independiente del ATP, pero no así su translocación (Neeffjes et al, 1993 y Androlewicz et al, 1994). En humanos, los transportadores enlazan péptidos con extremo carboxilo básico; así, la arginina en las primeras posiciones aumentan el enlace del péptido. Las posiciones 1,2,3 y 9 están predominantemente involucradas en el enlace de un péptido nonamero a los TAP. Otra vía de translocación al retículo endoplásmico es a través de proteínas transmembranales como JAW1, en algunos casos se ha presentado la situación de que el péptido entra a retículo endoplásmico de forma independiente a los TAP, luego vuelve a salir a citoplasma y es translocado a retículo por los transportadores.

Ensamblaje de la molécula

En la síntesis de las proteínas en retículo endoplásmico se les adicionan 3 glucosas, de las cuales 2 son removidas enzimáticamente para generar el ligando monoglucosilado al que se podría unir la calreticulina y la calnexina (la primera es una proteína soluble y la segunda transmembranal); se sabe que la calnexina se asocia a la cadena pesada sola reteniéndola en retículo endoplásmico antes de unirse con el péptido, aunque hay excepciones donde la cadena pesada se asocia con la β_2 -microglobulina, como es el alelo HLA-B27. La calreticulina se une a la cadena pesada, cuando ésta previamente se ha unido con la β_2 microglobulina, este complejo se asocia con los TAP a través de la proteína llamada tapasina. La tapasina es una glicoproteína transmembranal de 428 aminoácidos y rica en prolina, con un glicano unido al extremo amino. La región hidrofóbica forma un dominio transmembranal que contiene un residuo de lisina, el cual le permite la interacción con otras proteínas como los TAP. El gen que codifica la tapasina se ubica dentro de la región del MHC (a 500 kb del TAP1 y TAP2) (Ortmann et al, 1994; Sandasivan et al, 1995; Suh et al, 1994; y Ortmann et al, 1997).

La tapasina se une al TAP1 con la finalidad de bobear el péptido a la cadena pesada del MHC-I; por consiguiente en células carentes de tapasina, se ve afectada la expresión de MHC-I en particular, a los HLA-B (Grandea et al, 1997).

Después que se forma el complejo MHC-I/péptido, éste es transportado hacia el aparato de Golgi, donde es glicosilado y posteriormente llevado hacia la superficie de la célula (Pamer y Cresswell, 1998) (figura 1.9).

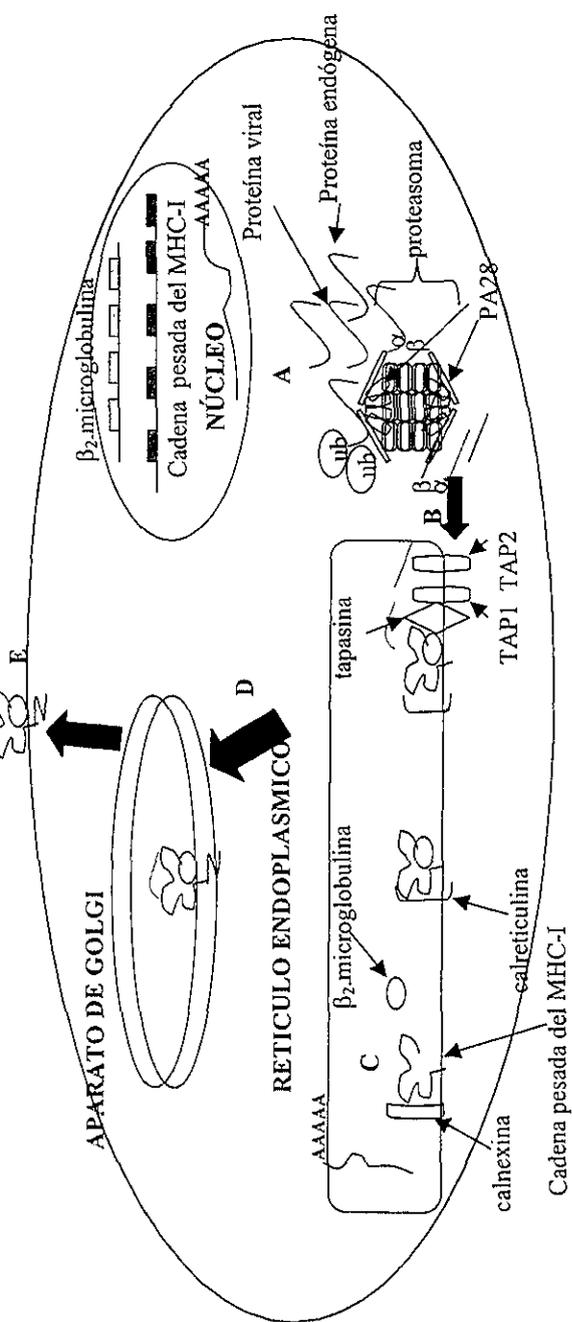


Figura 2.3.1: Procesamiento y presentación de antígenos vía molécula de histocompatibilidad clase I. A) El procesamiento inicia cuando las proteínas de un virus o endógenas de la célula, que están en citoplasma son marcadas con ubiquitinas (ub) para posteriormente ser cortadas por el proteasoma en fragmentos (péptidos) pequeños de 8 a 10 aminoácidos. B) Éstos son introducidos al retículo endoplásmico vía TAP. Mientras esto pasa C) el MHC-I se transcribe y traduce en retículo endoplásmico. En el interior de retículo se le une la calnexina, con la finalidad de que la cadena pesada adquiera cierta conformación estable, cuando se le une al MHC-I la subunidad β_2 microglobulina, la calreticulina se une al complejo para seguir manteniendo su estabilidad hasta que al complejo se le une el péptido. Cuando se une a los TAP, la tapasina se encarga de proporcionar el péptido al MHC-I. D) Al formarse el complejo MHC-I/ β_2 microglobulina/péptido, la molécula pasa a Aparato de Golgi, donde es glicosilada y esta lista para salir a membrana plásmática siendo reconocida por linfocitos T citotóxicos (E).

2.4 Hormonas y MHC

La expresión de MHC-I es regulada por varios factores inmunodominantes exógenos y endógenos, como interferones (alfa, beta y gama) y factor de necrosis tumoral que incrementan los niveles de RNA mensajero de clase I, mientras que algunos oncogenes disminuyen su expresión, lo que facilita la evasión de la respuesta inmunológica. La proteína H-2RIIBP se enlaza al elemento regulador designado CRE (elementos de regulación de clase I) II, siendo un factor que activa la transcripción de los genes clase I (Arbeit et al, 1996; Hamada et al, 1989). Existen otros CRE :I, II y III, que son reconocidos por complejos de factores *trans* celulares (Rodríguez et al, 1994). Los experimentos en la línea C4-I demuestran que la dexametasona disminuye la expresión de las moléculas MHC-I hasta en un 50% en 5 días, así mismo el análisis de los niveles constantes del RNA mensajero también muestran una reducción de hasta un 50% en su expresión en las líneas C4-I, HT3, HaCat, Sw756, SIHA y ME180 tratadas durante 24 horas con esta hormona (Von Knebel et al, 1990). Dependiendo de otros factores (ya sea transcripcionales, donde este integrado el DNA viral, entre otros) y la cantidad de receptores para la hormona, el efecto que se produzca puede ser a favor o en contra de los niveles del MHC-I (Leanne et al, 1996).

3.Planteamiento del problema.

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) ocupa el primer lugar de mortalidad por neoplasias en nuestro país, con un 40% del total; además es considerado un problema de salud a nivel nacional, ya que afecta a las mujeres en etapa productiva (25-50 años). El desarrollo del carcinoma cervical se encuentra fuertemente asociado con una etiología viral, cerca del 98% de los tumores presentan infección con el virus de papiloma humano (HPV). Además de la participación del HPV, varios cofactores pueden contribuir en el desarrollo de la carcinogénesis del epitelio cervical, entre los cuales destacan las hormonas esteroides. Se tiene reportado que la progesterona e hidrocortisona, a niveles fisiológicos, pueden disminuir los niveles de expresión de moléculas clase I del MHC en la membrana de las células del epitelio cervical infectadas con HPV, además de favorecer la replicación del virus y aumentar la transcripción de las proteínas oncogénicas E6 y E7. El resultado final se traduce en la transformación y la proliferación desmedida de las células (formación del tumor) y su evasión al reconocimiento específico por linfocitos T citotóxicos.

Se sabe que dentro del genoma del virus de papiloma humano existen elementos de respuesta a glucocorticoides, por lo que la transcripción de las proteínas oncogénicas (E6 y E7) de estos virus, es inducida mediante estas hormonas. No obstante, poco se sabe acerca de los mecanismos mediante los cuales los glucocorticoides pueden disminuir o inhibir la expresión de moléculas MHC-I. Se ha especulado que ésta pueda ocurrir a través de la regulación de la transcripción de los genes codificados en el MHC-I. Por tal motivo, el presente trabajo tuvo como objetivo el de analizar el efecto de la hidrocortisona sobre la transcripción de moléculas MHC-I y de moléculas que intervienen en el procesamiento de antígenos, en células tumorales de cáncer cervical (infectadas y no infectadas con HPV).

4. Hipótesis:

El cáncer cérvico-uterino se asocia etiológicamente con el virus de papiloma humano de alto riesgo (tipos 16, 18, 31, 33, 45). Además se sabe que el genoma de estos virus poseen un elemento de respuesta a glucocorticoides el cual favorece la replicación viral y la transcripción de los oncogenes E6 y E7. Asimismo, se ha observado que los glucocorticoides disminuyen la expresión de moléculas clase I del MHC en células infectadas con el HPV, al actuar indirectamente sobre la transcripción de moléculas codificantes en la región de histocompatibilidad. En consecuencia, se espera que al utilizar una hormona glucocorticoide, como la hidrocortisona, disminuya la expresión de moléculas clase I del MHC así como las de moléculas TAP1, TAP2, LMP2 y LMP7 (codificandos en el MHC) en líneas celulares de cáncer cervical infectadas con HPV.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General:

Analizar el efecto de la hidrocortisona sobre la expresión de moléculas MHC-I y de las moléculas que participan en el procesamiento de antígenos en líneas celulares de cáncer cérvico-uterino con y sin infección de HPV.

4.2. Objetivos particulares:

Analizar el efecto de la hidrocortisona en la expresión de moléculas MHC-I en las líneas celulares de cáncer cervical.

Analizar el efecto de la hidrocortisona sobre la expresión de las moléculas LMP2, LMP7, LMP10, PA28 α , PA28 β , TAP1 y TAP2 en las líneas celulares de cáncer cervical.

5. METODOLOGIA

5.1. Cultivos celulares

Se utilizaron 8 líneas celulares de cáncer cérvico-uterino: 2 infectadas con HPV-16 (CASKI y SIHA), y 4 infectadas con HPV-18 (CALO, INBL, HELA, VIPA), y 2 líneas sin infección a HPV (C33A y VIBO). Las características de las líneas son las siguientes:

Tabla 5.1. Características de las líneas celulares empleadas

TIPO CELULAR	CARACTERISTICAS
T2	Línea linfocítica carente de TAP1, TAP2, LMP2 y LMP7
Linfocitos de Sangre Periférica (LSP)	Cultivos obtenidos de donadores normales
HTB9	Línea celular de vejiga humana
Epitelio normal (EPINOR)	Cultivos de epitelio de cérvix obtenidos de donadoras normales
CASKI	Carcinoma epidermoide cervical (metastásico)(HPV-16)
SIHA	Carcinoma escamoso de cérvix (HPV-16)
CALO	Carcinoma epidermoide de células grandes, no queratinizado; estadio clínico IIB (HPV-18)
INBL	Carcinoma epidermoide de células grandes no queratinizado; estadio clínico IVB (HPV-18)
HELA	Carcinoma epitelioide (adenocarcinoma) (HPV-18)
VIPA	Carcinoma IIA(HPV-18)
C33A	Carcinoma de cérvix (negativo a HPV)
VIBO	Carcinoma de cérvix (negativo a HPV)

Las líneas celulares fueron cultivadas en medio RPMI-1640 sin rojo de fenol (con la finalidad de que el fenol del medio no simulara la estructura de la hormona, y pudiera producir un efecto similar al que se esperara con el tratamiento), suplementado con 10% de suero fetal de bovino previamente dializado para eliminar los esteroides del suero, en cajas petri de 60 mm (60x15mm) de poliestireno y en placas de 24 pozos (Nunc). Se manejaron 3 condiciones de cultivo: sin estímulo (control (-)); con interferón γ (100 U/ml durante 48 horas) y con hidrocortisona (0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 72 horas) (Bartholomew et al, 1997). Las células se mantuvieron en una incubadora Scientific a 95% aire / 5% de CO_2 y a una atmósfera de humedad a punto de rocío.

5.2. Obtención de epitelio normal.

Las células epiteliales fueron obtenidas de biopsias de tejido de cérvix humano, de pacientes sometidas a histerectomía por presentar miomatosis uterina.

El tejido se fragmentó en trozos pequeños colocandolos en un matraz con 15 mL de tripsina al 0.05% (Sigma Co. USA) en verseno (apéndice); el matraz se colocó en un baño a 37°C en agitación constante por 15 min. Al final de este periodo, el sobrenadante se decantó en un embudo con malla y se colectó en un tubo cónico con 0.5 mL de SFB.

Inmediatamente al tejido sobrante, se le adicionaron otros 15 mL de tripsina y se llevó a un baño a 37° en agitación constante por 15 min. Al término de este tiempo, la suspensión celular contenida en el sobrenadante se filtró a través de un embudo con malla y recolectó en un tubo cónico que contenía 1 mL de SFB.

Los tubos se centrifugaron a 500 g (gravidades) durante 5 min. Se retiró el sobrenadante mediante decantación y el botón celular resultante se resuspendió en 5 mL de RPMI suplementado con 10% de SFB. La suspensión celular se sembró en cajas de cultivo (COSTAR) y se mantuvieron en una incubadora Scientific al 95% aire / 5% de CO_2 y a una atmósfera de humedad a punto de rocío durante 24 hrs. Se realizó un cambio de medio por uno nuevo (RPMI al 10% de SFB) con 1mg/mL de insulina y 1mg/mL de hidrocortisona, de manera que sólo permanecieron en el cultivo las células adheridas. Después de 5 a 7 días se obtuvieron cultivos celulares de epitelio.

3. Aislamiento de RNA total por medio de la técnica de Trizol (Gibco

BRL)

Las células adherentes se despegaron con verseno (apéndice) y se resuspendieron en 1 ml TRIZOL (Gibco BRL, U.S.A) (2×10^6 células). La suspensión se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos, para favorecer la disociación de los complejos de nucleoproteínas. Enseguida se le adicionó 0.2 ml de cloroformo, se agitó vigorosamente durante 15 segundos, incubando al final de la agitación 3 minutos a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó a $12000 \times g$ durante 15 minutos a 4°C . Posteriormente, la fase acuosa (fase transparente) se transfirió a un tubo eppendorf nuevo que contenía 0.5 ml de isopropanol, la muestra se incubó 10 minutos a temperatura ambiente, y se centrifugó a $12000 \times g$ durante 10 minutos a 4°C . El botón resultante fue lavado con 1 ml de etanol al 75 % (preparado en agua con dietilpirocarbonato (apéndice)), y por último se resuspendió en cierto volumen de agua con dietilpirocarbonato, dependiendo de la cantidad de RNA obtenido.

Por último se cuantificó la presencia de RNA en la solución, utilizando un espectrofotómetro (Cam Spec) a una longitud de onda de 260 y 280 nanómetros, finalmente la solución se llevó a una concentración de $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, y se analizó por medio de un gel de agarosa (Gibco) especial para RNA con formamida.

5.4. Obtención del DNA complementario a partir de RNA total.

Después de obtener el RNA total, se empleó el protocolo de retrotranscripción (RT) para obtener DNA complementario. La reacción de RT se hizo bajo las siguientes condiciones empleando el kit de RT-PCR (Perkin-Elmer, USA).

Los reactivos empleados en la RT son: $1 \mu\text{g}$ de RNA, buffer de RT (1X), cloruro de magnesio (5mM), mezcla de nucleótidos (adenina, timina, citocina y guanina a una concentración de 4mM), inhibidores de RNasas (1U), oligo dT ($0.04 \mu\text{g}$), ditiotreitól (0.1M), retrotranscriptasa del virus de la leucemia de ratón (1U) y H_2O cbp $10 \mu\text{l}$

La mezcla se colocó a 42°C por una hora, enseguida la temperatura se subió a 94°C durante 5 minutos y finalmente se llevó a 4°C durante 24 horas. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (Cyclogene techn, USA) (Sambrook et al, 1989)

5.5. Amplificación del gen de la cadena pesada y de los genes TAP1, TAP2, LMP2, LMP7, LMP10, PA28 α y PA28 β mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En la amplificación de la cadena pesada de la molécula MHC, se empleo la siguiente mezcla de reacción: del DNA complementario obtenido de la RT se usaron 6 μ l, buffer de PCR (1X), cloruro de magnesio (2mM), nucleótidos (adenina, timina, citocina y guanina con una concentración de 0.8 mM), taq polimerasa (1U), oligos para β -actina y oligos genéricos (ver tabla 5.5.1) para la cadena pesada de MHC-I(1 μ M) y H₂O cbp 25 μ l. Mientras que para los diferentes genes de las moléculas presentadoras de antígenos, comparten las mismas concentraciones de los reactivos, por lo cual la mezcla que se uso para cada molécula es la siguiente: 10 μ l de DNA complementario obtenido de la RT, buffer de PCR (1X), cloruro de magnesio (1.5mM), nucleótidos (adenina, timina, citocina y guanina a una concentración de 0.8mM), taq polimerasa (1U), oligos para la β -actina y específicos para cada gene(1 μ M) y H₂O cbp 25 μ l

Tabla 5.2: Lista de oligos empleados en las amplificaciones

Molécula	Secuencia del oligos	Referencias
β -actina	Sentido: GGG TCA GAA GGA TTC CTA TG Antisentido: GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG	Fueron diseñados
LMP2	Sentido: GGG ATA GAA CTG GAC GAA CC Antisentido: AGA TGA CAC CCC CGC TTG AG	Johnsen <i>et al</i> , 1998
LMP7	Sentido: GAA CAC TTA TGC CTA CGG GGT C Antisentido: TTT CTA CTT TCA CCC AAC CAT C	Johnsen <i>et al</i> , 1998
LMP10	Sentido: ATT CTG GGC GCC GAT ACG CG Antisentido: GCC AGG GCC GCG TCC TGA CC	Johnsen <i>et al</i> , 1998

PA28 α	Sentido: GAG CCA GCT CTC AAT GAA GCC Antisentido: CAC CAG CTG CCG ATA ATC ACC	Johnsen <i>et al</i> , 1998
PA28 β	Sentido: CAC CCA AGG ATG ATG AGA TGG Antisentido: GCT CAG CAT AGA AGG CCC TCA G	Johnsen <i>et al</i> , 1998
TAP1	Sentido: GAC AAG AGC CAC AGG TAT TTG G Antisentido: TGA TGA GAA GCA CTG AGC GG	Seliger <i>et al</i> , 1997
TAP2	Sentido: TAC CTG CTC ATA AGG AGG GTG C Antisentido: ATT GGG ATA TGC AAA GGA GAC	Seliger <i>et al</i> , 1997
Cadena pesada de la molécula MHC-I	Sentido: CTC AAG CTT ATG GCC GTC ATG GCG Antisentido: GGG GAT CCC ACT TTA CAA GCT GTG AGA GAC ACC TAA GAG	Fueron diseñados

Las mezclas de reacción se sometieron a diferentes condiciones dependiendo de la molécula, así LMP2, LMP7 y TAP2 tienen las siguientes condiciones: una temperatura inicial de 94°C durante 2', seguida de: 30" a 94 °C, 30" a 60 °C y 1'30" a 72 °C que en conjunto representan un ciclo, y fueron 25 ciclos seguidos por 5 minutos a 72 °C. En el caso de LMP10 el programa empleado fue: 94°C por 5', los segmentos de RCP son 94°C por 1', 60 °C por 1' y 72°C por 1' 30", con 27 ciclos seguidos por 72°C por 5'. Los PA28 α y β se amplifican con: 94°C por 2' 30", con los siguientes segmentos. 94°C/1', 59°C/1', 72°C/ 1' 30", por 25 ciclos seguidos por un segmento de 72°C por 5'. El TAP1 se amplifica con un segmento de 94°C/ 2' 30", seguido por 94°C/1', 58°C/1', 72°C/1'30", durante 28 ciclos, además de un segmento de 72°C/ 5'.

5.5. Análisis de los productos de PCR

Los productos de PCR se analizaron en geles al 1% y 3% de agarosa con un voltaje de 60, además de emplear sus respectivos marcadores de peso molecular 1kb (Gibco) y de bajo peso molecular (Facultad de Medicina UNAM), para su análisis. Se uso el TBE como buffer de corrida (apéndice).

5.6. Citometría de flujo

Después de cultivar a las diferentes líneas celulares con los tres diferentes tratamientos (control negativo, con IFN- γ e hidrocortisona), se procedió a desprenderlas con una solución que contenía 5mM de EDTA en amortiguador de fosfatos (PBS). Después de lavarlas con PBS suplementado con 2% de suero fetal de bovino, 500,000 células fueron depositadas en cada uno de los pozos de una placa de 96 pozos, se centrifugó la placa a 500g durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Enseguida se agregó el anticuerpo monoclonal W6/32 (clase total) y un anticuerpo anti-CD8+ (como irrelevante); se incubó durante 30 minutos a una temperatura de 4°C, una vez que transcurrió este tiempo se centrifugó a 500g para eliminar el sobrenadante, y se realizaron dos lavados con 100 μ l de buffer de fosfatos suplementado con suero. A cada botón celular se le adicionó una solución que contenía 1 mg/ ml del anticuerpo secundario marcado con isotiocianato de fluoresceína, este anticuerpo reconoce la región Fc del anticuerpo primario. Después de incubar 30 minutos a 4 °C, se centrifugó a 500 g y se lavó dos veces más, adicionándose al final 300 μ l a cada pozo de yoduro de propidio (10 mg de propidio en 1 ml de agua estéril bidestilada). Finalmente se leyeron las muestras en un citómetro de flujo (FACScan, Becton Dickinson & Co. Mountain View, CA, USA). Para calibrar el aparato se utilizaron las líneas celulares sólo incubadas con anticuerpo secundario (Coligan et al, 1992).

6. RESULTADOS

6.1 La hidrocortisona disminuye la expresión de moléculas MHC-I en la membrana celular de líneas de CaCu con infección de HPV.

En estudios recientes, se ha encontrado que la hidrocortisona (HC) a una concentración fisiológica (0.4 µg/ml) disminuye la expresión de moléculas MHC-I en células del epitelio cervical en las cuales se encuentra integrado el HPV (Bartholomew et al, 1997). En el presente trabajo, utilizamos esta concentración de hidrocortisona para analizar el efecto de esta hormona sobre la expresión de moléculas clase I del MHC en la membrana celular de 8 líneas celulares de carcinoma cervico-uterino: 6 con infección de HPV y 2 sin infección HPV (Tabla 5.1)

Al evaluar la expresión de moléculas MHC-I en la membrana de células tratadas con HC, utilizando el anticuerpo monoclonal W6/32 que reconoce una región monomórfica (constante) de todas las moléculas MHC clase-I, se encontró que las líneas de cáncer cervico-uterino, a diferencia de las células de epitelio normal derivadas de tejido cervical sano, mostraron una disminución en la expresión de moléculas MHC-I. El tratamiento de las células de epitelio normal con HC, indujo un incremento en la expresión de moléculas MHC-I: la intensidad de fluorescencia media (IFM) de las células aumentó de 469.76 en células no tratadas con HC, a 632.09 en células tratadas con HC (Figura 6.1a).

Por otra parte, cinco de las seis líneas celulares de cáncer cervical con infección de HPV presentaron una considerable disminución en la expresión de moléculas MHC-I en comparación con aquellas líneas celulares negativas para HPV (Figura 6.1). De las líneas con infección de HPV, tres con HPV-18 presentaron los efectos más pronunciados en la disminución de moléculas MHC-I (Figura 6.1a): en el caso de la línea VIPA su IFM en células no tratadas fue de 466.9, mientras que en células tratadas con HC fue de 205.7; en la línea HELA, el tratamiento con HC disminuyó el IFM de 319.4 a 205.1; en la línea INBL el IFM disminuyó de 307.5 a 242.3 con el tratamiento de HC. En el caso de la línea CALO (también infectada con HPV-18), el efecto de HC fue imperceptible, el IFM cambió de 241.3 a 236.2 con el tratamiento de HC (figura 6.1a). Las líneas infectadas con HPV-16 mostraron una menor disminución

que las infectadas con HPV-18 en la expresión de moléculas MHC-I cuando fueron tratadas con HC: la línea celular SIHA disminuyó el IFM de 285.6 a 228.9; en la línea celular CASKI el IFM disminuyó de 159.7 a 117.3. Finalmente, en el caso de las líneas celulares sin infección con HPV, los valores de los IFM disminuyeron muy discretamente: en la línea celular C33A, el IFM disminuyó de 58.6 a 53.2 con el tratamiento de HC; mientras que en la línea celular VIBO, el IFM cambió de 163.3 a 146.9. De manera interesante, se encontró que la línea celular HTB9, derivada de un carcinoma de vejiga humana, al cultivarse en presencia de HC incrementó la expresión de moléculas MHC-I en la membrana celular, pues el IFM incrementó de 162.2 a 262.6 (figura 6.1b). Estos resultados, indican que las líneas celulares de cáncer cervicouterino que presentan infección con HPV, al igual que lo mostrado en la literatura (Bartolomew et al, 1997), tienden a presentar una disminución en la expresión de moléculas MHC-I a nivel de membrana cuando son cultivadas en presencia de HC.

6.2 La hidrocortisona disminuye, a nivel transcripcional, la expresión de moléculas MHC-I en algunas líneas celulares de CaCu.

En células tumorales de carcinoma mamario, se ha reportado que la disminución o ausencia de moléculas Clase I del MHC en membrana, se relaciona con la reducción de los niveles transcripcionales de algunos alelos MHC-I, o con la inhibición de secuencias promotoras de moléculas MHC-I en células tumorales cultivadas con hormonas esteroides (Garrido et al, 1997). En el caso particular de células tumorales de CaCu, se ha visto que la dexametasona puede afectar los niveles de RNA mensajero (von Kneber et al, 1990). Considerando estos antecedentes y el hecho de que en las líneas celulares de CaCu con infección de HPV se encontró una disminución en la expresión de moléculas MHC-I por el tratamiento con HC, se procedió a determinar el efecto de la HC sobre la transcripción de las moléculas MHC-I en estas líneas celulares. Para ello, mediante la técnica de RT-PCR, se utilizaron oligonucleótidos consenso para amplificar y analizar el efecto de HC sobre la transcripción de las cadenas pesadas de las moléculas MHC-I (que incluyen los locus HLA-A, -B y -C) de las líneas celulares de CaCu. Los productos de PCR de las cadenas pesadas de las líneas celulares no tratadas y tratadas con HC, así como de células tratadas con IFN- γ (citocina inductora

de la transcripción de moléculas MHC-I) se muestran en la Figura 6.2. La disminución en los transcritos de las moléculas MHC-I sólo se presentó en la línea celular HELA. En la línea SIHA se pudo observar un ligero incremento en la expresión de los transcritos de la cadena pesada de MHC-I. Finalmente, en el caso de las líneas celulares C33A y VIBO, ambas sin infección con HPV, el nivel de expresión de la cadena pesada del MHC-I en C33A fue muy bajo, correlacionando de manera parcial con el nivel de expresión de moléculas MHC-I en la membrana celular de esta línea. Sin embargo, en la línea celular VIBO no se lograron amplificar los transcritos de las cadenas pesadas del MHC-I, pudiéndose deber a la variabilidad alélica presentada por esta línea celular, por lo cual los oligonucleótidos no fueron compatibles para amplificar a las cadenas pesadas de las moléculas MHC-I de la línea. Estos resultados nos permiten sugerir que la disminución de moléculas MHC-I encontrada a nivel de membrana en las líneas de CaCu tratadas con HC, no sólo está dada por la disminución de los niveles transcripcionales de estas moléculas, pudiendo participar de manera complementaria, la disminución en la expresión de otras moléculas que participan de manera importante en el procesamiento y presentación de las moléculas MHC-I en la membrana celular.

6.3 La hidrocortisona no disminuye la expresión de moléculas que participan en el procesamiento antigénico en las líneas celulares de CaCu.

Tomando en consideración que las hormonas esteroideas pueden actuar a nivel de secuencias promotoras del MHC (Garrido, et al, 1997), y que varias moléculas que participan en la vía del procesamiento antigénico del MHC-I están codificadas en esta región (brazo corto del cromosoma 6), se procedió a determinar el efecto de la HC sobre la expresión de las moléculas TAP-1, TAP-2, LMP-2 y LMP-7 (codificadas en el cromosoma 6), así como de las moléculas LMP-10, PA28 α y PA28 β que también juegan un papel importante en el procesamiento de antígenos. Para ello, utilizamos la técnica de RT-PCR para amplificar algunos fragmentos correspondientes a estas moléculas en las líneas celulares previamente tratadas con HC y comparados con aquellos obtenidos de células no tratadas con HC y células tratadas con IFN- γ . Cabe mencionar que en las diferentes reacciones de RT-PCR se metieron controles de agua, con la finalidad de saber si existía contaminación en la reacción.

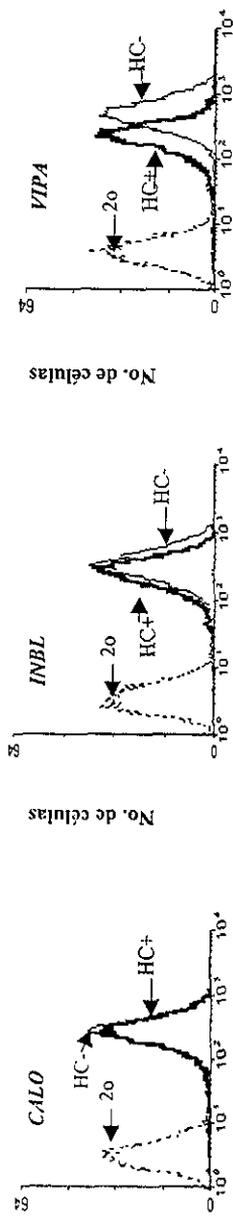
Al analizar la expresión de los TAP, se encontró que todas las líneas celulares de CaCu con o sin infección de HPV, presentaron deficiencia en la expresión de TAP-1, además de que en ninguno de los casos el IFN- γ pudo restablecer adecuadamente su expresión cuando las células fueron incubadas con este factor (Figura 6.3.1). En el caso de TAP-2 (Figura 6.3.2), la hidrocortisona no indujo cambios en la expresión de esta molécula en las líneas celulares de cáncer cervical. En estos ensayos se utilizó a la línea linfoblástica T2 como control negativo, debido a que presenta una delección en los genes que codifican para TAP1, TAP2, LMP2 y LMP7 (Salter et al, 1985 y Salter y Cresswell, 1986); y como control positivo se utilizó DNAC obtenido de linfocitos de sangre periférica de un donador normal.

Cuando se analizó la expresión de las proteínas de bajo peso molecular (LMP), unidades proteolíticas de los proteasomas, se encontró que la HC no indujo la disminución de la expresión de las subunidades LMP-2, LMP-7 y LMP10 en las líneas celulares de cáncer cervical (Figuras 6.3.3-6.3.5). Cabe destacar que las líneas celulares sin infección al HPV (VIBO y C33A) no expresaron LMP10 y que únicamente C33A fue carente en la expresión de LMP7 (Figuras 6.3.3 y 6.3.4), lo que también correlaciona con los bajos niveles de expresión de moléculas MHC-I encontrados previamente a nivel de membrana celular.

La hidrocortisona tampoco indujo disminución en la expresión de las subunidades reguladoras (PA28 α y PA28 β) del proteasoma en las líneas celulares de carcinoma cervical utilizadas en este estudio (Figuras 6.3.6-6.3.7).

De acuerdo con los resultados obtenidos en conjunto, se puede concluir que la hidrocortisona induce una disminución en la expresión de moléculas clase I del MHC en las líneas celulares de cáncer cervical, principalmente en aquellas que tienen infección con virus de papiloma humano. Se puede hablar de que esta baja expresión de la molécula este asociado con la baja transcripción de la cadena pesada de la molécula, como ocurrió en HELA, sin embargo se deben realizar más experimentos con diferentes líneas para ratificar o desechar esta idea, así como se pueden usar otras técnicas. No obstante, el hecho de que no se encontraran efectos notables de la HC sobre la transcripción de moléculas que participan en el procesamiento antigénico (TAP, LMP y

PA28 alfa y beta) en las líneas celulares, indica que la disminución en la expresión de moléculas MHC-I a nivel de membrana en las células tumorales de cáncer cervical con infección de HPV pudiera ser también a través de mecanismos postranscripcionales que serán mencionados en discusión.



I.F.M

I.F.M: 2°=3.2, HC-=241.3

HC+=236.2

I.F.M

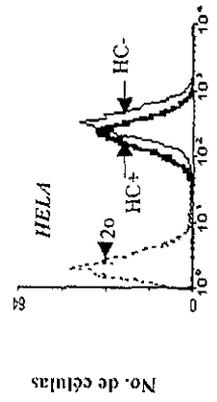
I.F.M: 2°=3.8, HC-=307.5

HC+=242.3

I.F.M

I.F.M: 2°=3.9, HC-=466.9

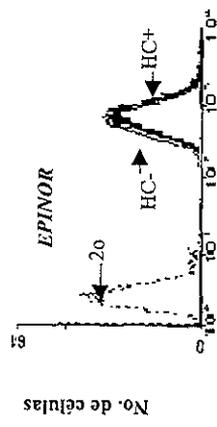
HC+=205.7



I.F.M

I.F.M: 2°=2.4, HC-=319.4

HC+=205



I.F.M

I.F.M: 2°=3.12, HC-=575.2

HC+=746.1

Figura 6.1.a: Efecto de la HC sobre la expresión de moléculas MHC-I en las líneas celulares de CaCu. Las líneas celulares fueron cultivadas en ausencia (HC⁻, histograma de línea delgada) o en presencia (HC⁺, histograma de línea gruesa) de hidrocortisona durante 72 hrs, y posteriormente utilizadas para evaluar la expresión de MHC-I mediante citometría de flujo, utilizando el anticuerpo monoclonal W6/32. La abreviatura I.F.M representa la intensidad de fluorescencia y la notación 2° representa la fluorescencia producida cuando el anticuerpo secundario con FITC se une de forma inespecífica a la célula.

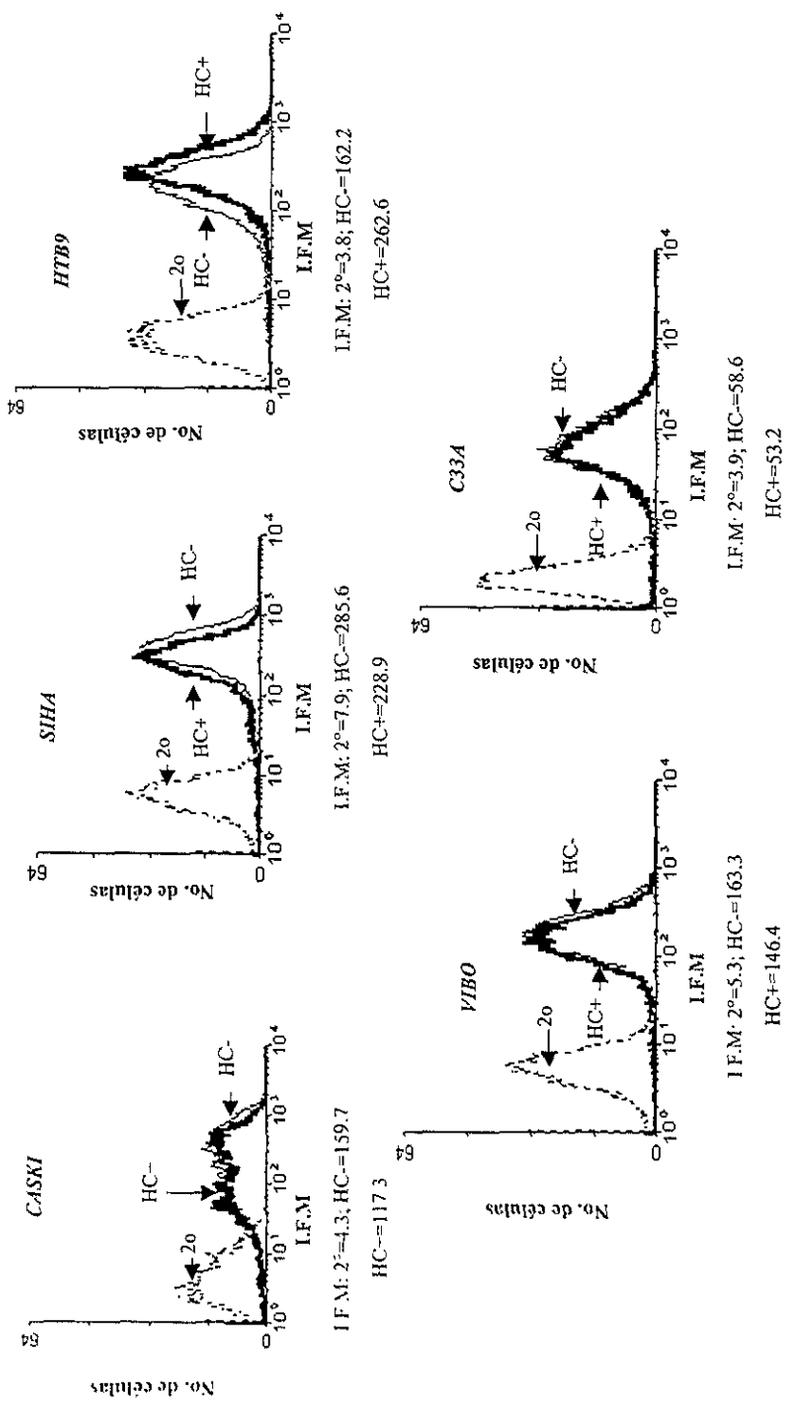


Figura 6.1.b: Efecto de la HC sobre la expresión de moléculas MHC-1 en las líneas celulares de CaCu. Las líneas celulares fueron cultivadas en ausencia (HC-, histograma de línea delgada) o en presencia (HC+, histograma de línea gruesa) de hidrocortisona durante 72 hrs, y posteriormente utilizadas para evaluar la expresión de MHC-1 mediante citometría de flujo, utilizando el anticuerpo monoclonal W6/32. La abreviatura I.F.M. representa la intensidad de fluorescencia y la notación 2° representa la fluorescencia producida cuando el anticuerpo secundario con FITC se une de forma inespecífica a la célula.

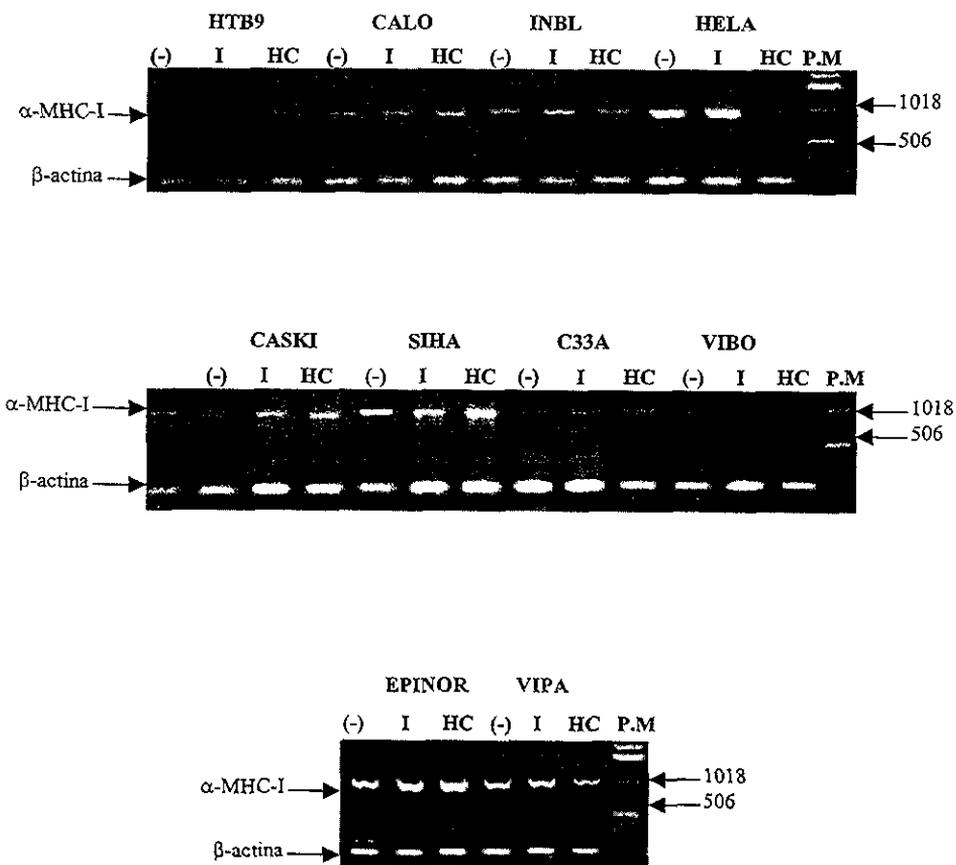


Figura 6.2: Efecto de la hidrocortisona sobre la transcripción de moléculas MHC-I, en líneas celulares de CaCu. El RNA total fue extraído de células cultivadas ya sea en medio normal (-); en presencia de 100 U/ml de INF- γ (I); o con 0.4 μ g/ml de hidrocortisona (HC). Los productos de RT-PCR obtenidos de la amplificación de las cadenas pesadas de las moléculas MHC-I (1100 pb), fueron analizadas mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%. La amplificación de un fragmento de β -actina (238 pb) fue utilizado como control de la estabilidad del RNA, en todos los casos. Los marcadores de peso molecular (P.M), al final de cada gel.

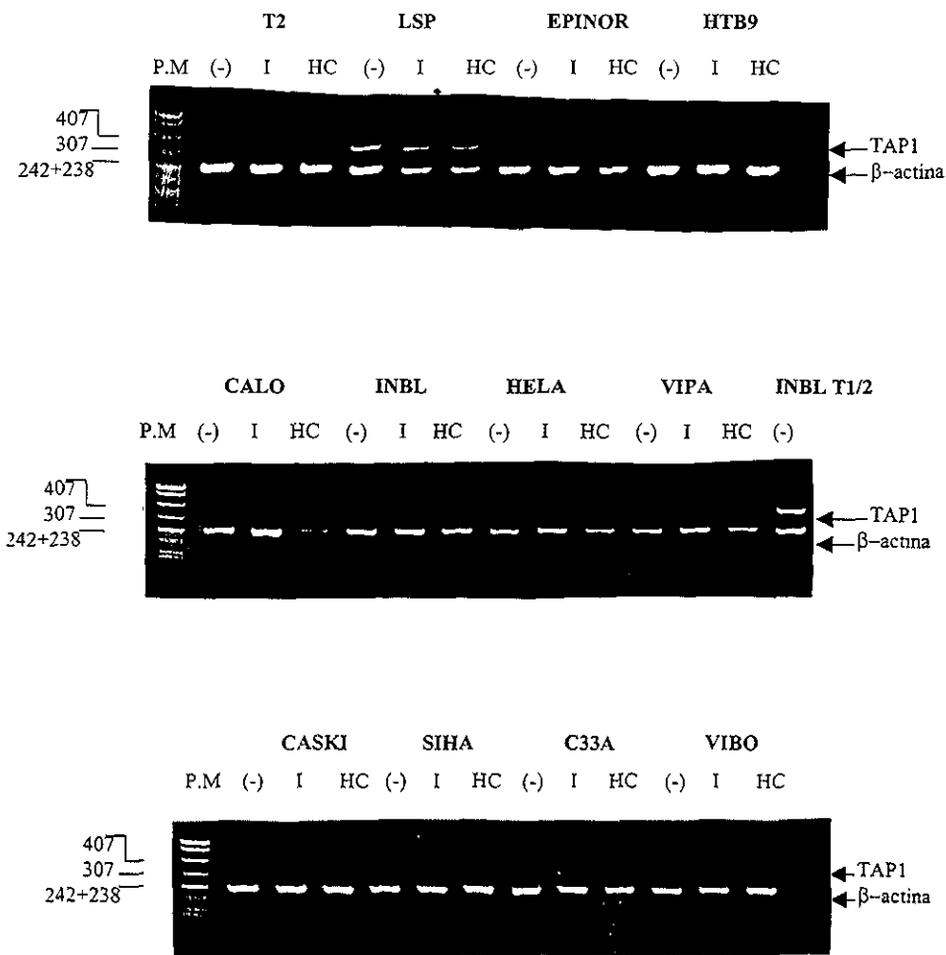


Figura 6.3.1: Efecto de la hidrocortisona sobre la transcripción de TAP1 en las diferentes líneas de CaCu. El RNA total fue extraído de células cultivadas ya sea en medio normal (-); en presencia de 100 U/ml de IFN- γ (I); o con 0.4 μ g/ml de hidrocortisona (HC). Los productos de RT-PCR obtenidos de la amplificación del TAP1 (345 pb) fueron analizados en un gel de agarosa al 3%. La amplificación de un fragmento de β -actina (238 pb) fue utilizado como control de la estabilidad del RNA, en todos los casos. Los marcadores de peso molecular (P.M), al principio de cada gel. El pozo de INBL T1-2 es la línea INBL transfectada con el TAP1 y TAP2. La abreviatura EPINOR representa células de epitelio normal.

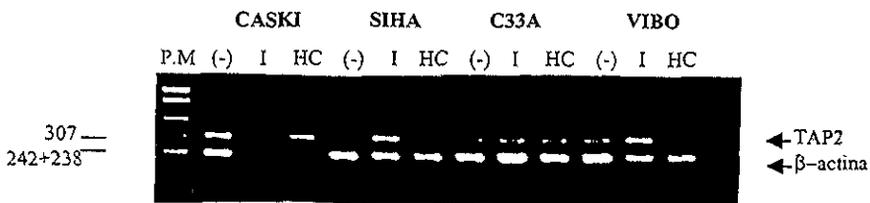
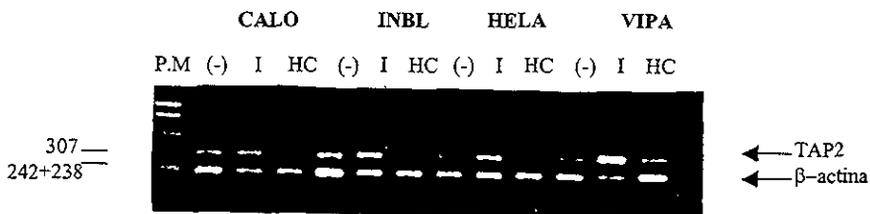
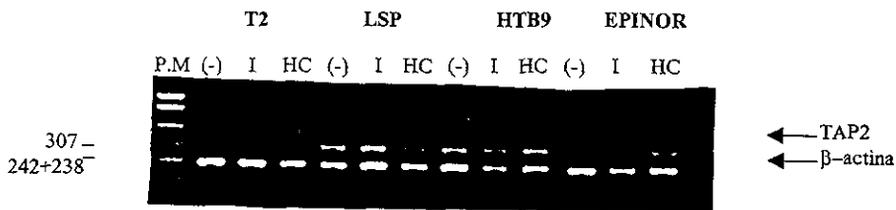


Figura 6.3.2: Efecto de la hidrocortisona sobre la transcripción de TAP2 en las diferentes líneas de CaCu. El RNA total fue extraído de células cultivadas ya sea en medio normal (-); en presencia de 100 U/ml de IFN- γ (I); o con 0.4 μ g/ml de hidrocortisona (HC). Los productos de RT-PCR obtenidos de la amplificación del TAP2 (312 pb) fueron analizados en un gel de agarosa al 3%. La amplificación de un fragmento de β -actina (238 pb) fue utilizado como control de la estabilidad del RNA, en todos los casos. Los marcadores de peso molecular (M.P), al principio de cada gel. La abreviatura EPINOR representa células de epitelio normal.

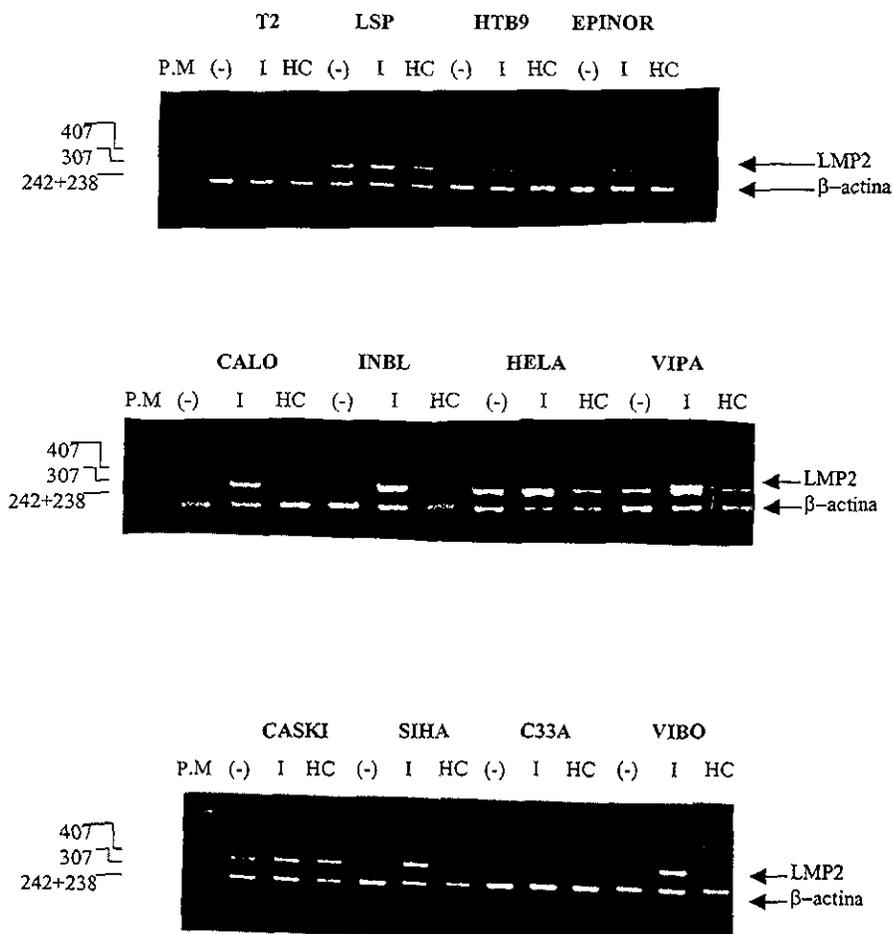


Figura 6.3.3: Efecto de la hidrocortisona sobre la transcripción de LMP2 en las diferentes líneas de CaCu. El RNA total fue extraído de células cultivadas ya sea en medio normal (-); en presencia de 100 U/ml de IFN- γ (I); o con 0.4 μ g/ml de hidrocortisona (HC). Los productos de RT-PCR obtenidos de la amplificación del LMP2 (321 pb) fueron analizados en un gel de agarosa al 3%. La amplificación de un fragmento de β -actina (238 pb) fue utilizado como control de la estabilidad del RNA, en todos los casos. Los marcadores de peso molecular (P.M), al principio de cada gel. La abreviatura EPINOR representa células de epitelio normal.

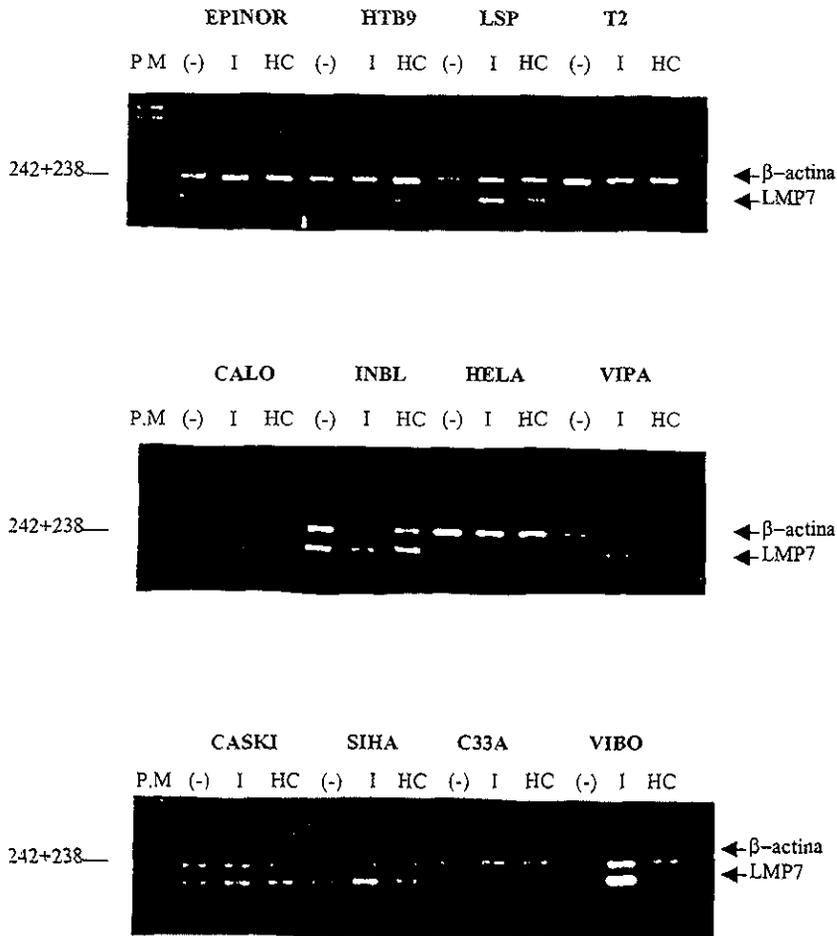


Figura 6.3.4: Efecto de la hidrocortisona sobre la transcripción de LMP7 en las diferentes líneas de CaCu. El RNA total fue extraído de células cultivadas ya sea en medio normal (-); en presencia de 100 U/ml de IFN- γ (I); o con 0.4 μ g/ml de hidrocortisona (HC). Los productos de RT-PCR obtenidos de la amplificación del LMP7 (174 pb) fueron analizados en un gel de agarosa al 3%. La amplificación de un fragmento de β -actina (238 pb) fue utilizado como control de la estabilidad del RNA, en todos los casos. Los marcadores de peso molecular (P.M), al principio de cada gel. La abreviatura EPINOR representa células de epitelio normal.

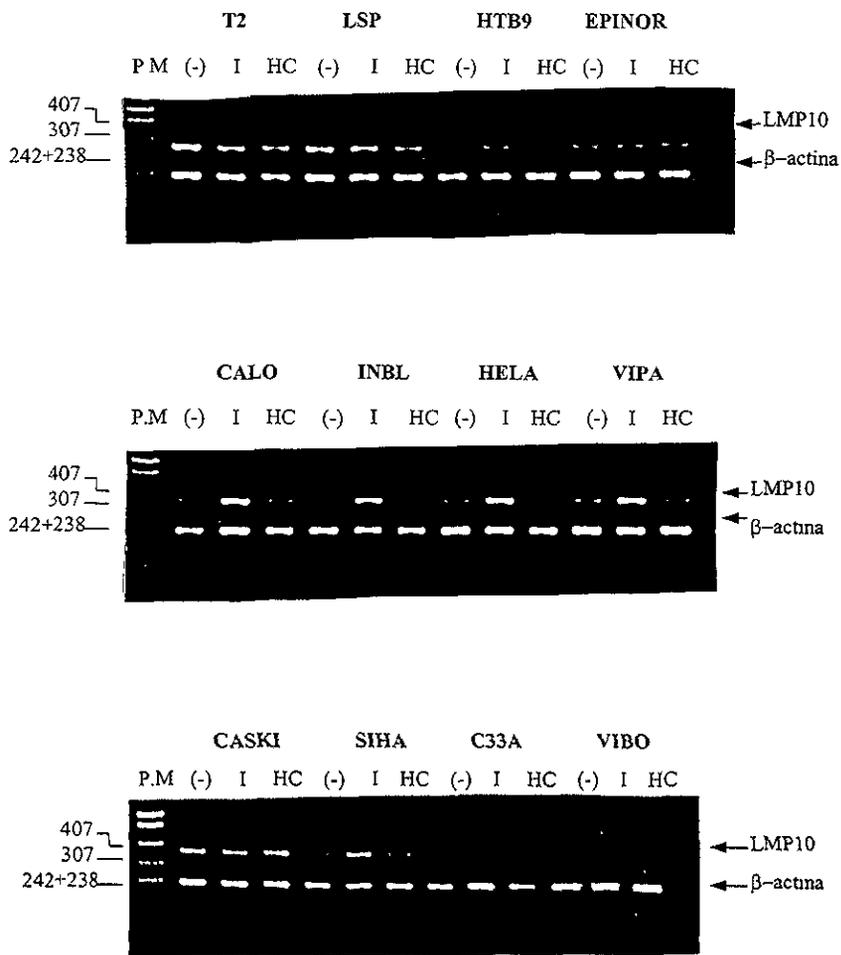


Figura 6.3.5: Efecto de la hidrocortisona sobre la transcripción de LMP10 en las diferentes líneas de CaCu. El RNA total fue extraído de células cultivadas ya sea en medio normal (-); en presencia de 100 U/ml de IFN- γ (I); o con 0.4 μ g/ml de hidrocortisona (HC). Los productos de RT-PCR obtenidos de la amplificación del LMP10 (369 pb) fueron analizados en un gel de agarosa al 3%. La amplificación de un fragmento de β -actina (238 pb) fue utilizado como control de la estabilidad del RNA, en todos los casos. Los marcadores de peso molecular (P.M), al principio de cada gel. La abreviatura EPINOR representa células de epitelio normal.

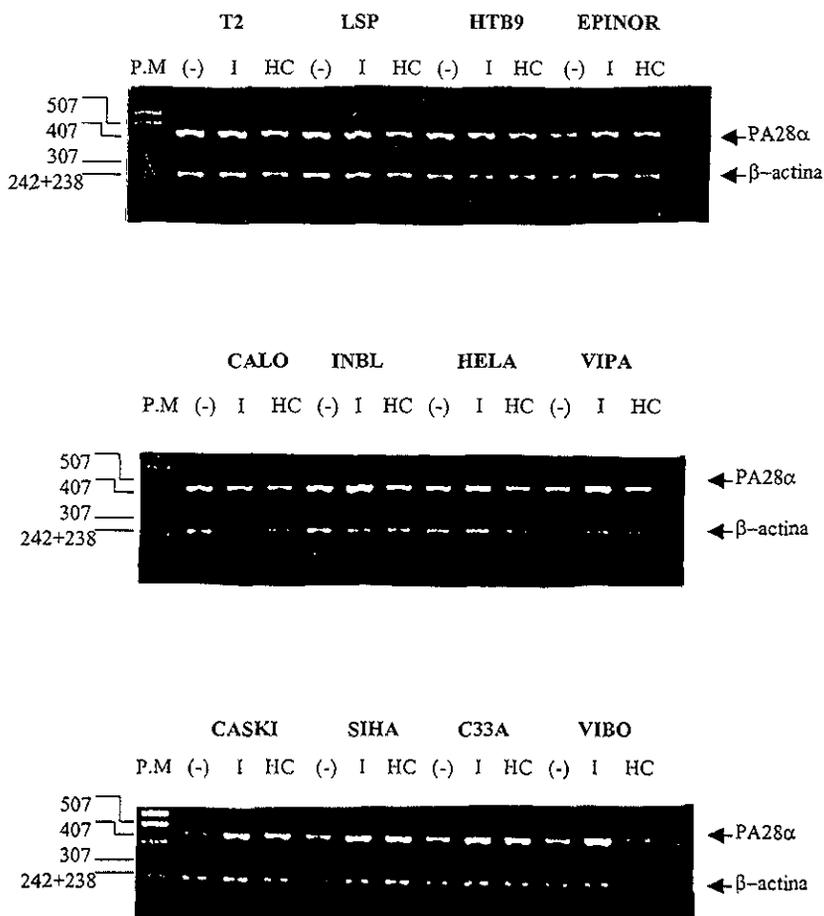


Figura 6.3.6: Efecto de la hidrocortisona sobre la transcripción de PA28 α en las diferentes líneas de CaCu. El RNA total fue extraído de células cultivadas ya sea en medio normal (-); en presencia de 100 U/ml de IFN- γ (I); o con 0.4 μ g/ml de hidrocortisona (HC). Los productos de RT-PCR obtenidos de la amplificación del PA28 α (467 pb) fueron analizados en un gel de agarosa al 3%. La amplificación de un fragmento de β -actina (238 pb) fue utilizado como control de la estabilidad del RNA, en todos los casos. Los marcadores de peso molecular (P.M), al principio de cada gel. La abreviatura EPINOR representa células de epitelio normal.

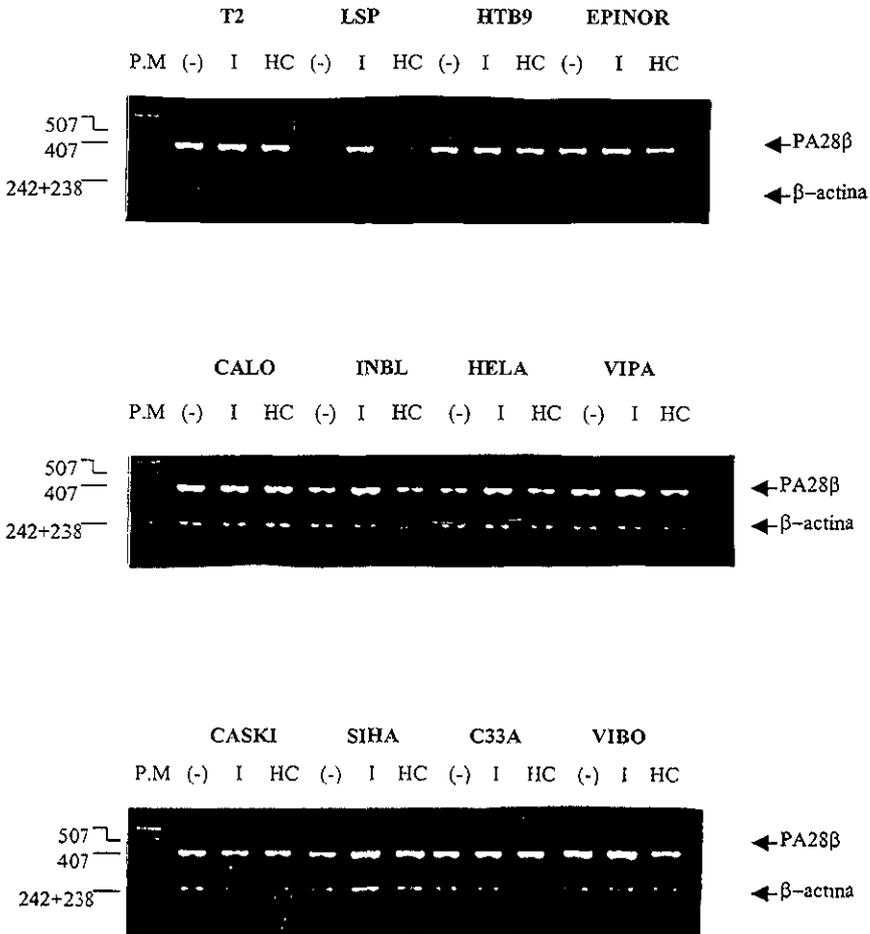


Figura 6.3.7: Efecto de la hidrocortisona sobre la transcripción de PA28β en las diferentes líneas de CaCu. El RNA total fue extraído de células cultivadas ya sea en medio normal (-); en presencia de 100 U/ml de IFN-γ (I); o con 0.4 μg/ml de hidrocortisona (HC). Los productos de RT-PCR obtenidos de la amplificación del PA28β (431 pb) fueron analizados en un gel de agarosa al 3%. La amplificación de un fragmento de β-actina (238 pb) fue utilizado como control de la estabilidad del RNA, en todos los casos. Los marcadores de peso molecular (P.M), al principio de cada gel. La abreviatura EPINOR representa células de epitelio normal.

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las moléculas clase I del MHC juegan un papel importante en la inmunidad adquirida para eliminar a las células tumorales o células infectadas con virus, debido a que son las responsables de mostrar en la membrana de la célula blanco, a los péptidos antigénicos derivados de proteínas propias mutadas o de las proteínas vírales para su reconocimiento por los linfocitos T citotóxicos (Janeway et al, 1997 y Moreno et al, 1996). La disminución de la expresión de moléculas MHC-I es muy frecuente en células malignas; aproximadamente un 60-85% de los tumores pueden disminuir o perder ya sea un alelo HLA clase I, un locus HLA-A, -B o -C, o bien el haplotipo completo de las moléculas MHC-I (Keating et al, 1995; Garrido et al, 1997; Rensing et al, 1996; Browning et al, 1997; Seliger et al, 1997; Vitale et al, 1998; Finke et al, 1999). En el caso particular de CaCu, se han asociado varios factores con la disminución en la expresión de moléculas MHC-I, entre ellos se encuentran: alteraciones en la cadena pesada de algunas moléculas MHC-I (mutaciones y deleciones en los sitios de unión a péptidos) (Koopman et al, 1999; Koopman et al, 2000; Johnsen et al, 1998); pérdida en la expresión de la cadena ligera (β 2-microglobulina) (Seliger et al, 1996); alteraciones en la expresión de moléculas que intervienen en el procesamiento y presentación de antígenos (ausencia de moléculas transportadoras como los TAP); y el papel de hormonas esteroideas (Chen et al, 1997; Jin et al, 1999; Peace-Brewer et al, 1996).

En estudios recientes, se ha encontrado que cuando las células epiteliales del cuello uterino (con infección por HPV) son cultivadas en presencia de hormonas esteroideas, a niveles fisiológicos, la expresión de moléculas MHC-I en la membrana celular disminuye notablemente (Bartholomew, 1997). Se ha sugerido que la disminución de la expresión de moléculas MHC-I en estas células, pudiera ocurrir a nivel transcripcional, tal como se ha observado en células tumorales derivadas de cáncer de mama, en donde se tienen evidencias de que las hormonas glucocorticoides pueden incidir indirectamente sobre la transcripción de las moléculas MHC-I a través de elementos (p.ejm. *c-jun*) que interactúan con regiones promotoras de genes que codifican en el MHC (Howcroft et al, 1993 y Yang-yen, 1990). Estos elementos se

originan después de que el complejo hormona-receptor atraviesa la membrana nuclear y captura al elemento *fos* del complejo AP-1 para dejar libre a *c-jun*, el cual interactúa con la región promotora ubicada aproximadamente a 400pb de los genes que codifican a las moléculas del MHC.

En el presente trabajo, utilizando concentraciones fisiológicas de HC (0.4µg/ml), encontramos que en ocho líneas celulares de cáncer cervico-uterino, 5 de 6 líneas que presentan infección con HPV, disminuyeron notablemente la expresión de moléculas MHC-I en membrana. La baja expresión de moléculas MHC-I en la membrana de estas células, inducida por el efecto de HC, sólo se correlaciono en la línea celular HELA con la disminución de la transcripción de la cadena pesada del MHC-I y en ninguno de los casos con la disminución o la pérdida de moléculas que participan en el procesamiento de antígenos de la vía MHC-I, como fue el caso de los transportadores de péptidos antigénicos (TAP-1 y -2), las subunidades proteolíticas del proteasoma (LMP-2, -7 y -10) y los reguladores del proteasoma (PA28α y β). El efecto heterogéneo producido por la hormona HC en las diferentes líneas de CaCu, sobre la disminución en la expresión de moléculas MHC-I a nivel de membrana del MHC-I, puede estar asociado con diversos elementos propios de las células tumorales que resultan del proceso de transformación maligna. Entre estos elementos se pueden considerar: el número de copias activas del virus del HPV que se encuentran integradas en el genoma de la célula huésped; el número de receptores para glucocorticoides presentes en la célula maligna; la presencia de diversos oncogenes activados (*c-myc* y *ras*); el aumento de receptores que propician la proliferación celular, por ejemplo el receptor para el factor de crecimiento epidermal, etc. Es importante mencionar que de los elementos antes mencionados, el número de copias activas de los HPV pudiera tener un papel muy importante en la disminución de la expresión de moléculas MHC-I, debido a que dentro del genoma de los HPV de alto riesgo, existen elementos de respuesta a glucocorticoides (ERG). Después de que ocurre la integración del virus en el genoma de la célula huésped y son eliminados los genes reguladores E1 y E2 del HPV, los complejos hormona-receptor interactúan con el ERG para favorecer la transcripción de los oncogenes E6 y E7 (Burt y Hoppe-Seyler, 1993; Chen et al, 1993; Jin et al, 1998). El resultado final es la transformación de la célula huésped y la disminución de

moléculas MHC-I. Se ha postulado que este último fenómeno se debe a que un segmento de la proteína oncogénica E7, semejante a un dominio de la proteína E1A del adenovirus, retiene a las moléculas MHC-I en el retículo endoplásmico, favoreciendo su degradación por enzimas residentes en este organelo (Braspenning et al, 1998; Brokaw et al, 1994).

Por otro lado, las deficiencias en la expresión de moléculas que participan en procesamiento y presentación de moléculas MHC-I, conducen a la disminución en la expresión de moléculas MHC-I a nivel de membrana, lo que constituye *per se* un mecanismo de evasión de la respuesta inmunológica (Thomas y Banks, 1999; Garrido et al, 1997). En este trabajo encontramos que las líneas celulares sin infección con HPV (VIBO y C33A), mostraron deficiencias en la expresión de las moléculas TAP1, LMP7 y LMP10, lo cual correlacionó con la baja expresión de moléculas del MHC-I encontrada a nivel de membrana y de los transcritos de las cadenas pesadas del MHC-I. En este sentido, también habrá que considerar si existen mutaciones en las secuencias que codifican para las cadenas pesadas del MHC-I de estas líneas celulares, lo cual pudiera influir en la deficiente amplificación de estas moléculas mediante la técnica de RT-PCR, tal como fue observado en nuestros resultados.

La disminución de la expresión de las moléculas MHC-I inducida en las líneas de CaCu (infectadas con HPV) mediante la HC, puede ser considerada de relevancia, debido a que tal disminución pudiera afectar a ciertos alelos que tienen un papel esencial en la respuesta inmunológica, por su capacidad de presentar determinantes antigénicos. Se sabe que la disminución o pérdida de la expresión de un sólo alelo en las células tumorales, es capaz conducir a la evasión del reconocimiento inmune celular mediado por los linfocitos T citotóxicos (Seung et al, 1993). Se tienen reportes de casos donde la célula tumoral evade la respuesta inmunológica, a través de cambios en la expresión de moléculas MHC-I que presentan péptidos antigénicos, de tal manera que los linfocitos citotóxicos CD8+ no las pueden reconocer y eliminarlas (Garrido, 1997; Keatin et al, 1995; Cromme et al, 1994; von Knebel et al, 1990). Por ejemplo, se sabe que en pacientes con melanoma avanzado el alelo HLA-A2, caracterizado por presentar antígenos asociados al melanoma, disminuye considerablemente su expresión en estos

tumores (Ferrone et al, 1995); asimismo, en pacientes con CaCu también se ha visto que la pérdida del alelo HLA-B7 se asocia con un mal pronóstico de supervivencia (Ressing et al, 1996). Se esperaría que al disminuir los niveles de expresión de la molécula MHC-I, se activaran las células asesinas naturales, sin embargo, esto no ocurre. Ante esta situación varios autores han planteado que el tumor evade la respuesta de linfocitos citotóxicos a través del abatimiento parcial de las moléculas MHC-I que son importantes en la presentación de antígenos vírales, mientras que por otro lado los alelos que mantienen su expresión (por lo general del locus HLA-C), pueden inducir señales de inactivación en las células asesinas naturales para evitar su acción citotóxica (Garrido et al, 1997).

Finalmente, podemos considerar que la asociación entre HPV y hormonas esteroides puede ser un factor de riesgo considerable para el desarrollo del cáncer cervico-uterino, puesto que se sabe que cerca del 98% de los tumores de CaCu se asocia etiológicamente con la presencia de virus de HPV oncogénicos. En este sentido, largos periodos de estrés que conducen al aumento de los niveles fisiológicos de hormonas esteroides, ó el uso prolongado de anticonceptivos orales o anti-inflamatorios constituidos por hormonas esteroides, pueden alterar el curso de una displasia cervical hacia el desarrollo de un carcinoma cuando existen infecciones genitales con HPV.

8. CONCLUSIONES

1. La hidrocortisona disminuye la expresión de moléculas MHC-I en membrana en células positivas a la infección con HPV.
2. La hidrocortisona no afecta la transcripción de moléculas que participan en el procesamiento y presentación de antígenos (TAP, LMP, PA28)

9. VOCABULARIO

Condiloma acuminado: Se le designa así a las verrugas externas producidas en el aparato genital, por lo regular son producidos por el HPV-6 y -11, no son malignos

Displasia: Cambios en el tamaño, la forma y la organización de las células, debido a la irritación o inflamación crónicas; puede progresar hasta neoplasia, o regresar a la normalidad si se elimina el factor estresante. Algunos autores consideran que la displasia es semejante a la neoplasia intracervical

Estadios clínicos del cáncer cervical

Estadio 0: carcinoma in situ (algunos autores lo consideran con las mismas características de la displasia III)

Estadio I: Tumor conferido al cérvix (puede estar disgregado)

Estadio IA: Carcinoma invasor preclínico, diagnosticado sólo por microscopio.

Estadio IA1: mínima invasión a estroma

Estadio IA2: Tumor con componentes invasivos, las células tienen crecimiento de 5mm o menos en profundidad tomado desde la base de epitelio y 7mm o menos en su extensión horizontal.

Estadio IB: Tumor más grande que IA2.

Estadio II: Carcinoma cervical que invade más allá del útero, pero no la pared pélvica o la parte baja de vagina.

Estadio IIA: Sin invasión parametrial

Estadio IIB: Invasión parametrial

Estadio III: Carcinoma cervical que se extiende a la pared de la pelvis y/o involucra la parte baja de la vagina y/o causa hidronefrosis o no permite que funcione el riñón.

Estadio IVA: Tumor que invade la mucosa de vejiga o recto y/o se extiende hasta pelvis.

Adenocarcinoma: Resulta de células columnares de endocérvix, representa del 10 al 5 % de los carcinomas. Tienen una apariencia glandular pero pueden pasar a una apariencia sólida. Tiene núcleos agrandados y sus mitosis son incrementadas.

Adenoescamosos: Representan el 2 % de los carcinomas. Son una mezcla de adenocarcinoma maligno y de carcinoma de células escamosas

Carcinoma Invasivo: Ocurre cuando las células de epitelio malignas rompen la membrana basal y entran en estroma. Implicando una lesión visible que se expare a vagina, útero, a la parte anterior de la vejiga, o a la parte posterior del recto.

Metastasis: Se produce cuando las células transformadas son transportadas a través del torrente sanguíneo

10. APÉNDICE

Verseno (1X para 1 L):

Tris-base 3.04 gr

NaCl 8.0 gr

KCl 0.4 gr

EDTA 0.2 gr

Ajustar a pH 7.7 con ácido clorhídrico

Agua tratada con dietilpirocarbonato:

Se disuelve 0.2 ml de dietilpirocarbonato en 100 ml de agua milliQ, y se deja toda la noche en agitación a 37 °C, con la finalidad de homogeneizar la solución. Al siguiente día se esteriliza.

Buffer Salino de Fosfatos (PBS 1X para 1 L):

NaCl 8 gr

KCl 0.2 gr

KH₂ PO₄ monobásico 0.2 gr

Na₂HPO₄ dibásico 2.16 gr

Buffer de TBE (para 5L)

Tris-base 54 gr

Acido Bórico 27.5 gr

EDTA pH 8 0.5 M (20 ml)

Llevar a 5 litros de agua.

11. BIBLIOGRAFIA

Androlewicz MJ, and Cresswell P. 1994. Human transporters associated with antigen processing possess a promiscuous peptide-binding site. *Immunity*. 1: 7-14.

Androlewicz MJ, Ortmann B, van Endert PM, Spies T and Cresswell P. 1994. Characteristics of peptide and major histocompatibility complex class I/β₂-microglobulin binding to the transporters associated with antigen processing (TAP1 and TAP2). *Proceedings National Academic Science. USA*. 91: 716-720.

Arbeit MJ, Howeley MP, and Hanahan D. 1996. Chronic estrogen-induced cervical and vaginal squamous carcinogenesis in human papillomavirus type 16 transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 93: 2930-2935.

Auborn KJ, Woodworth C, Dipaolo JA, and Bradlow HL. 1991. The interaction between HPV infection and estrogen metabolism in cervical carcinogenesis. *International Journal of Cancer*. 49: 867-869.

Austyn M.J, and Kathryn JW. 1993 *Principles of Cellular and Molecular Immunology*. Ed. Oxford University Press. 730 pp.

Bardlow HL, Hershcopf RJ, Martucci CP y Fishman. 1986. 16α-hidroxylation of estradiol a possible risk marker for breast cancer. *Annual New York Academic Science*. 464: 138-151.

Bartholomew JS, Glenville S, Sarkar S, Burt DJ, Stanley M.A, Ruiz-Cabello F, Chengang J, Garrido F, Stern P.L. 1997. Integration of high-risk human papillomavirus DNA is linked to the downregulation of class I human leukocyte antigens by steroid hormones in cervical tumors cells. *Cancer Research*. 57: 937-942.

Baxter DJ y Rousseau GG 1979. *Glucocorticoid hormone action*. Springer-Verlag Berlin. New York. 638 pp.

Berke G. 1994. The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: Molecular and cellular aspects. *Annual Reviews Immunology*. 12: 753-773.

Berke G. 1995. The CTL's kiss of death *Cell*. 81: 9-12.

Blanchet O, Bourge JF, Zinszner H, Tataru Z, Degos L y Paul P. 1991. *DNA binding of regulatory factors interacting with MHC-class I gene enhancer correlates*

with MHC-I transcriptional level in class I defective cell lines. *International Journal of Cancer*. Suplemento 6: 138-145.

Bolander FF. 1989. *Molecular Endocrinology*. Academic Press Inc. San Diego California. 840 pp.

Bosch FX, Manos M, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah K. 1995. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer. *International Journal Cancer*. 60: 1-26.

Bradlow HL, Michnovicz J, Telang NT y Osborne MP. 1991. Effects of dietary indole-3-carbinol on estradiol metabolism and spontaneous mammary tumors in mice. *Carcinogenesis*. 12: 1571-1574.

Braspenning J, Marcini A, Albarani V, Levy L, Ciccolini F, Cremonesi C, Ralston R, Gissman L and Tommasino. 1998. The CXXC Zn binding motifs of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein are not required for its in vitro transforming activity in rodent cells. *Oncogene*. 16: 1085-1089.

Brokaw LJ, Yee LC, and Mürger K. 1994. A mutational analysis of the amino terminal domain of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Virology*. 250: 603-607.

Browning M, Dunnion D. 1997. HLA and cancer: implications for cancer immunotherapy and vaccination. *European Journal of Immunogenetics*. 24: 293-312.

Browning M, Petronzelli F, Bicknell D, Rowan A, Tonks S, Murray N, Bodmer J and Bodmer W. 1996. Mechanisms of loss of HLA class I expression on colorectal tumor cells. *Tissue Antigens*. 47: 364-371.

Burt K and Hoppe-Seyler F. 1993. Transcriptional control of human papillomavirus (HPV) oncogene expression: composition of the type 18 up-stream regulatory region. *Journal of Virology*. 67: 6476-6486.

Chen MT, Pecoraro G and Defendi V. 1993. Genetic Analysis of in vitro progression of human papillomavirus-transfected human cervical cells. *Cancer Research*. 53: 1167-1171.

Chen Z, Storthz AK, and Shillitoe JE. 1997. Mutations in the long control region of human papillomavirus DNA in oral cancer cells and their functional consequences. *Cancer Research*. 57: 1614-1619.

Coligan EJ, Kruisbeek MA, Margulies HD, Shevach ME and Strober W. 1992. Current protocols in immunology. Vol 2. Greene Publishing Associates and Wiley-interscience. New York. A.5.9 pp.

Cromme FV, van Bommel PFJ, Walboomers JMM, Galle MPW, Stern PL, Kenemas P, Helmerhorst Th.J.M, Stukart M.J and Meijer CJLM. 1994. Differences in MHC and TAP1 expression in cervical cancer lymph node metastases as compared with the primary tumors. *British Journal of Cancer*. 69: 1176-1181.

Crusius K, Auvinen E, Steuer B, Gaissert H, and Alonso A. 1998. The human papillomavirus type 16 E5-protein modulates ligand-dependent activation of EGF receptor family in the human epithelial cell line HaCat. *Experimental Cell Research*. 241:76-83.

DeMartino GN, Moomaw CR, Zagnito OP, Proske RJ, Ma C-P, Afendis SJ, Swaffield JC, Slaughter CA. 1994. PA700, an ATP-dependent activator of the 20S proteasome, is an ATPase containing multiple members of a nucleotide-binding protein family. *Journal of Biological Chemistry*. 269 : 878-884.

Desaintes C and Demeret C. 1996. Control of papillomavirus DNA replication and transcription. *Seminars in cancer biology*. 7: 339-347.

Dick TP, Ruppert T, Groettrup M, Kloetzel PM, Kuehn L, Koszinowski UH, Stevanovic S, Schild H, Rammensee HG. 1996. Coordinated dual cleavages induced by the proteasome regulator PA28 lead to dominant MHC ligands. *Cell*. 86: 253-263.

DiSaia PJ. 1998. Preinvasive disease of the cervix. *Clinical gynecologic oncology*. Mosby Year Book, St Louis, Mo. 332pp.

Duggan-Keen FM, Brown DM, Stacey NS y Stern LP. 1998. Papillomavirus Vaccines *Frontiers in Bioscience*. *British Journal of Cancer* 3: 1192-1208.

Eggers M, Bocs-Fabian B, Ruppert T, Kloetzel PM, Koszinowski UH. 1995. The cleavage preference of the proteasome governs the yield of antigenic peptides. *Journal Experimental Medicine*. 182: 1865-1870.

Engelhard HV. 1994. Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules. *Annual Reviews Immunology*. 12: 181-207.

Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi, Y. M., Hengst K y McMillan NAJ. 1997.

Identification of the alpha (6) integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *Journal of Virology* 71: 2449-2456.

Ferrone S and Marincola MF. 1995. Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance. *Immunology Today*. 16: 487-494.

Fields NB, Knipe MD, Chanock MR, Hirsch SM, Melnick LJ, Monath PT, Roizman B. 1990. *Fields Virology*. vol 2. 2da edición. Ed. Raven Press. 950 pp.

Finke J, Ferrone S, Frey A, Mufson A y Ochoa A. 1999. Where have all the T cells gone? Mechanisms of immune evasion by tumors. *Immunology today*. 20: 158-160.

Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Pérez-Villar J.J, López-Botet M, Duggan-Keen M, y Stern LP. 1997. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumors. *Immunology Today*. 18: 89-93.

Gierthy JF, Lincon DW y Kampcik SJ. 1988. Enhancement of 2-y 16 α -estradiol hidroxilación in MCF-7 human breast cancer cells by 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo bioquímica. *Biophysia Research*. 157: 515-520.

Grandca AG, Lehner PJ, Cresswell P, Spies T. 1997. Regulation of MHC class I heterodimer stability and interaction whit TAP by tapasin. *Immunogenetics*. 72: 313-320.

Groettrup M, Suza A, Eggers M, Kuehn L, Dick TP, Schild H, Rammensee HG, Koszinowski UH, and Kloetzel PM. 1996. A role for the proteasome regulator PA28 α in antigen presentation. *Nature*. 381: 166-168.

Guiliani C, Saji M, Napolitano G, Palmer LA, Taniguchi SI, Shong M, Singer SD y Kohn D. L. 1995. Hormonal modulation of mayor histocompatibility complex class I gene expression involves an enhancer A-binding complex consisting of Fra-2 and the p50 subunit of NF- κ B. *The Journal of Biological Chemistry*. 270: 11453-11462.

Hadley EM. 1992. *Endocrinology*. 3ra edición. Prentice Hall. New Jersey. 608 pp.

Hamada K, Gleason LS, Levi ZB, Hirschfeld S, Appella E, y Ozato K. 1989. H-2RIIBP a member of the receptor nuclear hormone superfamily that binds to both the

regulatory element of major histocompatibility class I genes and the estrogen response elements. *Proceeding of the National Academy of Science USA*. 86: 8289-8298.

Hashida T and Yasumoto S. 1991. Induction of chromosomal abnormalities in mouse and human epidermal keratinocytes by the human papillomavirus type 16 E7 oncogene. *Journal General Virology*. 72: 1569-1577.

Hoffman L and Rechsteiner M. 1994. Activation of the multicatalytic portease: The 11S regulator and 20S ATPase complexes contain distinct 30-kilodalton subunits. *Journal Biological and Chemistri*. 269: 890-895.

Howcroft KT, Richardson CJ, and Singer SD. 1993. MHC class I gene expression is negatively regulated by the proto-oncogene, c-jun. *The EMBO Journal*.12: 3163-3169.

Huibregtse MJ y Beaudenon LS. 1996. Mechanism of HPV E6 proteins in cellular transformation. *Seminars in Cancer Biology*. 7: 317-326.

Janeway CA and Travers P. 1997. Immunobiology the immune system in health and disease. *Current biology limited*. New York U.S.A. 254 pp.

Jin L, Qi M, Chen D-Z, Anderson A, Yang G-Y, Arbeit M.J, and Auburn J.K. 1999. Indole-3-carbind prevents cervical cancer in human papilloma virus type 16 (HPV16) transgenic mice. *Cancer Research*. 59: 3991-3997.

Johnsen A, France J, Man-Sun S, and Harding V.C. 1998. Down-regulation of the transporter for antigen presentation, proteasome subunits, and class I mayor histocompatibility complex in tumor cell lines. *Cancer Research*. 58:3660-3667.

Jonhson RL. 1992. *Essential medical Physiology*. Rewen Press. New York. 770pp.

Keating PJ, Cromme FV, Duggan-Keen M, Snijders PJF, Walboomers JMM, Hunter, Dyer PA and Stern. 1995. Frecuency of down-regulation of individual HLA-A and -B alleles in cervical carcinomas in relation to TAP-1 expression. *British Journal of Cancer*. 92: 405-411.

Khare S, Pater MM Tang SC and Pater A. 1997. Effect of glucocorticoid hormones on viral gene expression, growht and dysplastic differentiation in HPV16 immortalized ectocervical cells. *Experimental Cell research*. 232: 353-360.

Knebel DM, Koch S, Drzonck H and zur Hausen H. 1990. Glucocorticoid

hormone reduce the expression of major histocompatibility class I antigens on human epithelial cells. *European Journal Immunology*. 20: 35-40.

Koopman AL, Corve EW, van der Slik AR, Giphart JM y Fleuren G. 2000. Multiple Genetic Alterations Cause Frequent and Heterogeneous Human Histocompatibility Leukocyte Antigen Class I Loss in Cervical Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 191: 961-975.

Koopman AL, van der Slik RA, Giphart JM and Fleuren JG. 1999. Human leucocyte antigen class I gene mutations in cervical cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 91: 1669-1677.

Kurman RJ, Schiffman MH, Lancaster WD, Jenson RR, Jenson AB, Temple GF, and Lorimer AT. 1988. A possible role for type 18 in rapid progression. *American Journal Obstetrics Gynecological*. 159: 239-296.

Lazo PA. 1999. The molecular genetics of cervical carcinoma. *British Journal of Cancer*. 80: 2008-2018.

Leanne DJ and Münger K. 1996. Interactions of the human papillomavirus E7 protein with cell cycle regulators. *Seminars in Cancer Biology*. 7: 327-337.

Lindsay JW. 1998. *Antigen Presentation*. Ed Springer. USA. 244pp.

Ma CP, Vu JH, Proske RJ, Slaughter CA and DeMartino GN. 1994. Identification, purification and characterization of a molecular weight, ATP-dependent activator (PA700) of the 20S proteasome. *Journal of Biological Chemistry*. 269: 3539-3547.

Mack DH, and Lamins LA. 1991. A keratinocyte-specific transcription factor, KRF-1, interacts with AP1 to activate expression of human papillomavirus type 18 in squamous epithelial cells. *Proceedings National Academic Science*. USA 88:9102-9106.

Martinez CK, and Monaco JJ. 1991. Homology of proteasome subunits to a major histocompatibility complex-linked LMP gene. *Nature*. 353: 664-667.

Matlashewski G. 1989. The cell biology of human papillomavirus transformed cells. *Anticancer Research*. 9: 1447-1456.

Meneses GF, and Cos MT. 1994. Evaluación de las actividades de detección y seguimiento del cáncer cérvicouterino en población bajo cobertura de la secretaría de Salud. México *Revista del Instituto Nacional de Cancerología*. 40: 168-177.

Michalek MT, Grant EP, Gramm C, Goldberg AL, and Rock KL. 1993. A role for the in MHC classI-restricted antigen presentation. *Nature* 363: 552-554.

Michnovicz JJ and Bradlow HL. 1991. Altered estrogen metabolism and excretion in humans following consumption of indole-3-carbinol. *Nutricion cancer*. 16: 59-6.

Michovicz J and Bardlow H. 1990. Indution of metabolism by dietary indole-3-carbinol in humans. *Journal National cancer Institute*. 82: 947-949.

Mittal RMD, Tsutsumi K. MD, Pater A. PhD and Pater M.M PhD. 1993. Human papillomavirus type 16 expression in cervical keratinocytes: role of progesterone and glucocorticoid hormone. *Trends Microbiology*. 2: 229-234.

Moreno RJ. 1996. Respuesta inmune y Mecanismos de autoinmunidad. Ed. Limusa. México.112pp.

Müger K, Scheffiner M, Huibregste J, and Howley P. 1992. Interactions of HPV E6 and E7 oncoproteins with tumor suppressor gene products. *Cancer Surveys*. 12: 197-217.

Muños N, and Bosch FX. 1997. Cervical cancer and human papillomavirus: epidemiological evidence and perspectives for prevention. *Salud Pública de México*. 39: 274-82.

Nandi D, Jiang H, and Monaco JJ. 1996. Identification of MECL-1 (LMP10) as the tirad IFN-gamma-induceccible proteasome subunit. *Journal Immunology*. 156: 2361-2364.

Neefjes JJ, Momburg F, Hammerling GJ. 1993. Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter. *Science*. 260: 769-771.

Newfield L, Bradlow HL, Sepkovic DW, and Auburn K. 1998. Estrogen metabolism and the malignant potential of human papillomavirus immortalized keratinocytes. *Proccedins Society Experimental Biology Medicine*. 217: 322-326.

Nijenhuis M, Hammerling GJ. 1997. Múltiple regions of the transporter associated with antigen processing (TAP) contribute to its binding site. *Journal of Immunology*. 157: 5467-5477.

O'Malley B.W and Tsai J.J. 1993. in *Steroid Hormone Action* (Parker M.G ed) IRL Press. New York. 45-63 pp.

Ortiz-Navarrete V, Seliger A, Gernold M, Frentzel S, Kloetzel PM, and Hammerling GJ. 1991. Subunit of the '20S' proteasome (multicatalytic proteinase) encoded by the major histocompatibility complex. *Nature*. 353: 662-664.

Ortmann B, Androlewicz M, and Cresswell P. 1994. MHC class I/ β_2 -microglobulin complex associate with TAP transporters before peptide binding. *Nature*. 368: 864-867.

Ortmann B, Copeman J, Lehner PJ, Sadasivan B, Herbert JA, Grandea SG, Rdell SR, Tampe R, Spies T, Trowsdale J, Cresswell P. 1997. A critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes. *Science*. 277: 1306-1309.

Paavonen J, Koutsky LA and Kaviat N. Cervical neoplasia and other STD-related genital and anal neoplasia. 1990. *Sexually Transmitted Diseases*. New York. McGraw-Hill. 561-592pp.

Pamer E, and Cresswell P. 1998. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. *Annual Reviews Immunology* 16: 323-358.

Parham P, Adams J, Arnett LK. 1995. *The origins of HLA-A,-B,-C polymorphism*. *Immunological Reviews*. 143: 141-177.

Parker GM. 1993. *Steroid hormone action*. IRL Press. Oxford. 210pp.

Pater A, Bayatpour M, and Pater MM. 1990. *Oncogenic transformation by human papillomavirus type 16 deoxyribonucleic from oral contraceptives*. *American Journal Obstetrics Gynecology*. 162: 1099-1103.

Pater MM, Mittal R and Pater A. 1994. Role of steroid hormones in potentiating transformation of cervical cells by human papillomaviruses. *Trends Microbiology*. 2: 229-234.

Pater MM, Hughes GA, Hyslop DE, Nakshatri H, and Pater A. 1988. Glucocorticoid-dependent oncogenic transformation by type 16 but not type 11 human papillomavirus DNA. *Nature*. 335: 832-835.

Paul WE. 1993. *Fundamental Immunology*. 3a edición. Ed. Raven Press. N.Y. U.S.A. 1122pp.

Peace-Brewer A, Tussey GI, Matsui M, Li G, Quinn GD, and Frelinger A. 1996. A point mutation in HLA-A*02101 results in failure to bind the TAP complex

and to present virus-derived peptides to CTL. *Immunity*. 4: 505-514.

Peralta ZO, Sánchez MT, Barrera RR, and Madrid MV. 1995. Estructura y función del receptor de antígeno de linfocitos T y su papel en enfermedades infecciosas. *Revista de investigación Clínica*. 48: 69-79.

Ratcliffe DR, Nolin SL, and Cramer EB. 1988. Neutrophil interaction with influenza infected epithelial cells. *Blood*. 72: 142-149.

Ressing M, Offringa R, Toes EMR, Ossendorp F, Jong HJ, Brandt MPR, Kast MW and Melief JMC. 1996. *Immunotherapy of cancer by peptide-based vaccines for the induction of tumor-specific T cell immunity*. *Immunotechnology* 2: 241-451.

Reyes GMG, Terrazas VLI and García TF. 1996. Infecciones, estrés e inmunidad. *Ciencia y desarrollo*. XXII: 47-51pp.

Rodríguez F, Perán F, Garrido F, and Ruiz CF. 1994. Up-modulation by estrogen of HLA class I expression in breast tumor cell lines. *Immunogenetics*. 39: 161-167.

Rogers S, Wells R, and Reachsteiner M. 1986. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins the PEST hypothesis. *Science* 234: 364-368.

Roitt IM. 1991. *Essential Immunology*. 7th. Blackwell Scientific Publications. U.S.A. 328pp.

Salter RD and Cresswell P. 1986. Impaired assembly and transport of HLA-A and -B antigens in a mutant TXB cell hybrid. *The EMBO Journal*. 5: 943-949.

Salter RD, Howell DN and Cresswell. 1985. Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids. *Immunogenetics*. 21: 235-246.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2da. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.

Sandasivan BK, Cariappa A, Waneck GL, and Cresswell P. 1995. Assembly peptide loading, and transport of MHC class I molecules in a calnexin-negative cell line. *Cold Spring Harbor Sympy*. New York. 275pp.

Schneider A, Hülz M and Gissmann L. 1987. Increased prevalence of human papillomaviruses in the lower genital tract of pregnant women. *International Journal of Cancer*. 40: 198-203.

Seliger B, Dunn T, Schwenzler A, Casper J, Huber C, Schmoll HJ. 1997.

Analysis of the MHC class I antigen presentation machinery in human embryonal carcinomas: evidence for deficiencies in TAP, LMP and MHC class I expression on their upregulation by IFN- γ . *Scandinavian Journal of Immunology*. 46: 625-632.

Seliger B; Hohne A; Knuth A; Bernhard H; Ehring B; Tampé R and Huber C. 1996. Reduced membrane Major Histocompatibility complex class I density and stability in a subset of human renal cells carcinomas con low TAP and LMP expresión. *Clinical Cancer Research*. 2: 1427-1433

Seung S, Urban LJ; and Schreiber H. 1993. A tumor escape variant that has lost one major histocompatibility complex class I restriction element induces specific CD8+ T cells to an antigen that no longer serves as a target. *Journal Experimental Medicine*. 178: 933-940.

Sijts AJAM, Villanueva MS, Pamer EG. 1996. CTL epitope generation is tightly linked to cellular proteolysis of *Listeria monocytogenes* antigen. *Journal of Immunology*. 156: 1497-1503.

Squier MKT, and John JC. 1994. Cell-mediated cytotoxic mechanisms cooperate to maintain calreticulin in the endoplasmic reticulum. *Currents Opinion Immunology*. 6: 447-452.

Storey A, Osborn K, Crawford L. 1990. Co-transformation by human papillomavirus type 6 and 11. *Journal General of Virology*. 71: 165-171.

Suh W; Cohen-Doyel MF, Froh K, Wang K, Peterson PA, and Williams DB. 1994. Interaction of MHC class I molecules with the transporter associated with antigen processing. *Science*. 264: 1322-1326.

Taylor AJ, Tewari K, Liao YS, Hughes WCC and Villarreal PL. 1999. Immunohistochemical analysis, human papillomavirus DNA detection, hormonal manipulation, and exogenous gene expression of normal and dysplastic human cervical epithelium in severe combined immunodeficiency mice. *Journal of virology*. 73: 5144-5148.

Tindie RW. 1996. Human papillomavirus vaccines for cervical cancer. *Currents Opinion Immunology*. 8: 643-650.

Toledo-Cuervas EM and García-Carrancá A. 1996. La proteína p53 y los oncogenes de papilomavirus humanos en la carcinogénesis del cuello uterino. *Revista*

de Investigación Clínica 48: 59-68.

Uebel S, Meyer TH, Krass W, Kienle S, Jung G, Wiesmuller K-H, Tampe R. 1995. Requirements for peptides binding to the human transporter associated with antigen processing revealed by peptide scans and complex peptide libraries. *Journal Biological and Chemistry*. 270: 512-516.

Ustrell V, Realini C, Pratt G, and Rechsteiner M. 1995. Human lymphoblast and erythrocyte multicatalytic proteases: differential peptidase activities and responses to the 11s regulator. *FEBS letters*. 376: 155-158.

Van Endert PM, Riganelli D, Greco G, Fleischhauer K, Sydney J, Sette A, and Banch JF. 1995. The peptide-binding motif for the human transporter associated with antigen processing. *Journal Experimental Medicine*. 182: 1883-1895.

Van Furth R. 1993. Cell biology of molecular phagocytes. In: Hemopoietic growth factors and molecular phagocytes. R. Van Furt (ed). 1-9pp.

Vargas A.G y Granados A.J. 1993. El sistema principal de histocompatibilidad. *Revista Mexicana de Reumatología*. 8: 251-256.

Villa L.L. 1997. Human papillomavirus and cancer cervical. *Advances Cancer Research*. 71: 321-341.

Vitale M, Rezzani R, Rodella L, Zauli G, Grigolato P, Cadei M, Hicklin J.D, and Ferrone S. 1998. HLA class I antigen and transporter associated with antigen processing (TAP1 and TAP2) down-regulation in high-grade primary breast carcinoma lesions. *Cancer Research*. 58: 737-742.

von Knebel DM, Koch S, Drzonek H and zur Hausen H. 1990. Glucocorticoid hormones reduce the expression of major histocompatibility class I antigens on human epithelial cells. *European Journal of Immunology*. 20: 35-40.

von Knebel M, Bauknecht T, Bauknecht T, Bartsch D, and zur Hausen H. 1990. Influence of chromosomal integration on glucocorticoid-regulated transcription of growth-stimulating papillomavirus genes E6 y E7 in cervical carcinoma cells. *Proceedings National Academic Science. USA*. 88. 1411-1415.

Wilckens T and De Rijk R. 1997. Glucocorticoids and immune function: *unknown dimensions and new frontiers*. *Immunology Today*. 18: 418-424.

Wright TC, and Richart RM. 1989. Review Role of human papillomavirus in the

pathogenesis of genital tract warts and cancer. *Gynecological Oncology*. 37: 151-64.

Yamada T, Michele MM, Peto J, Greer C, Muñoz N, Bosch XF y Wheeler MC. 1997. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *Journal of Virology*. 71: 2463-2472.

Yang-Yen FH, Chambard JC, Sun Y.L, Smeal T, Schmidt TJ, Drouin J and Karin M. 1990. Transcriptional interferences between c-jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell*. 62:1205-1215.

Zur Hausen H. 1991. Viruses in human cancer. *Science*. 254: 1167-1170.

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