



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

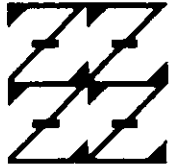
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

ANALISIS DE LA EXPRESION DE MOLECULAS DEL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD CLASE I EN OCHO LINEAS CELULARES DERIVADAS DE CANCER CERVICO UTERINO.

200750

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
HUGO LIRA HERNANDEZ

U N A M
FES
ZARAGOZA



LO INDIAMO EN
DE NUESTRA REFLEXION

DIRECTOR DE TESIS: JORGE HERNANDEZ MONTES

MEXICO, D.F.

FEBRERO DEL 2001



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ANÁLISIS DE LA EXPRESION DE MOLÉCULAS DEL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD CLASE I EN OCHO LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE CÁNCER CÉRVICO UTERINO.

Tesista

Hugo Lira Hernández

Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer
Laboratorio de Inmunología, FES Zaragoza, UNAM.

Comité tutorial

Dr. Alberto Monroy García

Dra. Maria de Lourdes Mora García

Biol. Jorge Hernández Montes

M. en I.B.S.H. Elia Roldán Reyes

Biol. Carlos Martínez Montoya

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Inmunobiología de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, bajo la dirección del Biólogo Jorge Hernández Montes, del Dr. Alberto Monroy García y del Dr Benny Weiss Steider.

Durante el desarrollo de este trabajo se contó con el apoyo de una beca-tesis sustentada mediante el proyecto PAPIIT-DGAPA UNAM (IN216597).

Agradecimientos

Dedico este trabajo de manera especial a Lorenzo y Alicia, mis papas, quienes me han brindado todo su apoyo en todo momento, se los agradezco infinitamente. A Javier y Lily, al Hannibal Lector, al Horace Pinker, a Madame Diana y al Javiercillo.

Agradezco a todos los profesores que contribuyeron en mi formación durante mi estancia en el Lab. de Inmunobiología, a Jorge Hernández, al maestro Beto, a la Dra. Lourdes y al maestro Santiago. Afortunadamente poseen una paciencia inagotable. También agradezco los comentarios sugeridos por la profesora Elia Roldan y el profesor Carlos Martínez.

También quiero reconocer el apoyo, durante toda la carrera, de los inseparables: Alfonso (Moustrón), Genaro (Moustrilio), Diana (la Ren), Fernando (Jimmy), Fer (Moustro, Chaneque, Gorky). A los incondicionales: Marlin, Gris, Osvaldo (Sherif), Miguel (Mickey Mouse), Homero (Caguaman); y a los Jelípes: Cesar, Jesús (Sr. Peloides), a todos los integrantes de la unidad (UDCC) y a los member's del CGH.

Finalmente, agradezco al señor Amulfo Pedraza por su apoyo técnico.

ÍNDICE.

	Páginas
1. Resumen.	2
2. Introducción.	3
3. Marco Teórico.	4
3.1. Origen de las células blancas del sistema inmune.	4
3.2. Inicio de la respuesta inmune.	6
3.3. Moléculas del complejo principal de histocompatibilidad.	7
3.4. Estructura tridimensional de las moléculas de MHC.	10
3.5. Mecanismo de procesamiento y presentación de las moléculas de MHC clase I.	12
3.5.1. Generación de péptidos.	12
3.5.2. Transporte de péptidos hacia el RE	15
3.5.3. Ensamblaje de péptidos con las moléculas clase I.	15
3.6. Etiología viral del cáncer cérvico uterino.	17
3.7. Evasión del sistema inmune.	21
4. Hipótesis y Objetivos.	23
5. Materiales y Métodos.	24
5.1. Células en cultivo.	24
5.2. Infección con virus vaccinia recombinante (Vvr)	25
5.3. Citometría de Flujo.	25
5.4. RT-PCR.	26
5.4.1. Reacción de retrotranscripción.	26
5.4.2. Amplificación por medio de la técnica de PCR.	27
6. Resultados.	28
6.1. Evaluación de la expresión de moléculas HLA clase I propias en líneas celulares derivadas de CaCu	29
6.2. Inducción de la expresión de moléculas de MHC clase I de ratón (K ^d , D ^d y L ^d) en las líneas celulares derivadas de cáncer cervical.	30
6.3. Análisis de los componentes involucrados en el mecanismo de procesamiento y presentación de antígenos clase I en la línea celular C33 derivada de CaCu.	34
7. Discusión.	35
8. Conclusiones.	38
9. Bibliografía.	39
11. Abreviaturas	46
12. Apéndice	47

1. Resumen.

Las células tumorales expresan superficialmente moléculas del MHC clase I que a su vez portan péptidos derivados de antígenos provenientes del interior de las células. Esto permite su reconocimiento y su eliminación por los linfocitos T citotóxicos. Sin embargo, la disminución de la expresión de estas moléculas puede dificultar el reconocimiento y proporciona un mecanismo de evasión del sistema inmune. Este puede ser el caso del cáncer cervical, puesto que las células transformadas expresan continuamente proteínas derivadas del virus de papiloma humano cuyos péptidos asociados a las moléculas MHC-I deberían conducir a su eliminación por parte de los linfocitos T citotóxicos; sin embargo, ocurre la progresión de la neoplasia hacia estadios más avanzados.

En este estudio se evaluó la capacidad de ocho líneas celulares derivadas de cáncer cérvico uterino para expresar moléculas del MHC clase I. En ellas, se indujo la expresión transitoria de las moléculas de histocompatibilidad de ratón K^d, D^d y L^d por medio de una infección con virus vaccinia recombinante. La expresión de estas moléculas se evaluó utilizando anticuerpos monoclonales específicos, mediante citometría de flujo. Se encontró que todas las líneas celulares estudiadas expresaron las moléculas de MHC clase I inducidas, aunque variaron en su capacidad de expresar los distintos alelos entre cada línea celular. El alelo con menor expresión en todas las líneas celulares fue L^d; y la línea celular con menor capacidad de expresar las diferentes moléculas fue C33. El estímulo con IFN γ , un inductor de la expresión de las moléculas del MHC clase I, fue más notable en aumentar la expresión de las moléculas del alelo L^d en todas las líneas tumorales y en aumentar la expresión de los todos los alelos de C33. Al analizar la relación entre tipo de HPV infectante y la expresión de moléculas de MHC I, fue notable que la línea celular negativa al HPV (C33) exhibió los niveles más bajos de expresión de moléculas de MHC I propias e inducidas (moléculas H-2 de ratón K^d, D^d y L^d), comparadas con la expresión observada entre las líneas celulares positivas al HPV 18 y al HPV 16. Las líneas celulares con secuencias génicas de HPV mostraron que su expresión es independiente del tipo viral infectante (HPV16 o HPV18) por lo que se concluye que no existe una relación entre el tipo de HPV infectante y la capacidad de expresión de moléculas de MHC clase I, y paradójicamente fue una línea celular sin secuencias integradas de HPV la que mostró la menor expresión. Finalmente, se analizó la expresión de moléculas que participan en el procesamiento de antígenos, en la línea celular C33, debido a que presentó la expresión de MHC I más baja; se observaron deficiencias en la expresión de moléculas TAP1, LMP7, y LMP10, sugiriendo que estos elementos son necesarios para una eficiente presentación de antígenos.

2. Introducción.

Aproximadamente 10 por ciento de los 6 millones anuales de carcinomas corresponden al cáncer de cérvix. En México, aproximadamente 5 mil mujeres mueren anualmente por cáncer cervico uterino, cifra que ha permanecido estable en los últimos 20 años; de manera tal que este padecimiento continúa siendo la principal causa de muerte por cáncer en mujeres mexicanas.

El cáncer cervical es un tumor que se origina en el cuello de la matriz y crece paulatinamente. Algunos factores de riesgo que se asocian a tal padecimiento son: el inicio de las relaciones sexuales a temprana edad, múltiples parejas sexuales, la multiparidad y el tabaquismo. Sin embargo, el papilomavirus humano (HPV) es considerado el principal factor de riesgo al estar presente en 99.7 por ciento de los casos estudiados. El HPV se transmite por contacto sexual, infecta el tejido del cuello de la matriz y produce alteraciones que pueden degenerar en cáncer. No obstante, la asociación entre la infección con HPV y el desarrollo del cáncer no es absoluta, ya que la mayoría de las mujeres infectadas con este virus no desarrollan el cáncer cervical; solamente en una pequeña cantidad de mujeres (20 por ciento de las originalmente infectadas) el virus no es erradicado, y la infección persiste. Este hecho puede provocar que el desarrollo de lesiones benignas con el tiempo evolucionen hasta tumores avanzados. El proceso desde que aparecen las primeras anomalías hasta que se desarrolla el cáncer dura varios años, de allí que sea posible prevenirlo.

Por otro lado, hoy en día se realizan estudios para encontrar tratamientos más eficaces contra este mal; actualmente, los tratamientos más comúnmente empleados son medicamentos de quimioterapia, la radioterapia y la cirugía. La aplicación de éstos depende de la localización y el tamaño del tumor, el estadio de la enfermedad, la salud general y la edad de la mujer, entre otros factores. Sin embargo, estos tratamientos son efectivos cuando se aplican en las primeras etapas de desarrollo y en estadios avanzados su efectividad es limitada; además en los países en vías de desarrollo la accesibilidad a ellos se ve afectada por las condiciones socioeconómicas.

Actualmente existen numerosas líneas de investigación que buscan proponer estrategias que permitan la erradicación de esta enfermedad. Algunas de ellas buscan esclarecer las propiedades del sistema inmunológico, por ejemplo, se basan específicamente en las propiedades de los linfocitos T citotóxicos. Estas células reconocen específicamente a fragmentos derivados de proteínas endógenas, asociados a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC I) y son expresadas en la membrana plasmática; de esta forma, es posible la detección de proteínas virales o mutadas que pueden ser indicativas de una transformación celular. Su participación es importante en la defensa en contra de patógenos

intracelulares y células tumorales, tanto que pueden determinar el destino de una lesión tumoral, ya que se ha observado que la presencia de linfocitos en lesiones se correlaciona con un mejor diagnóstico de l cáncer.

Tomando en cuenta los antecedentes mencionados respecto a la importancia que las moléculas MHC-I pueden tener en el desarrollo del cáncer cervical, en el presente estudio se analizó la capacidad de ocho líneas celulares derivadas de cáncer cérvico uterino para presentar en su superficie a esas moléculas.

3. Marco teórico.

3.1. Origen de las células blancas del sistema inmune.

Todas las células sanguíneas blancas del sistema inmune provienen de un progenitor común: las células madre hematopoyéticas de la médula ósea (HSCs), capaces de renovarse así mismas y de diferenciarse hacia cualquiera de los tipos de células sanguíneas. Generalmente dan lugar a células precursoras con un potencial más limitado que pueden originar a células sanguíneas rojas, o a las dos principales categorías de células sanguíneas blancas: linfoides y mieloides. Los diferentes tipos de células sanguíneas y las relaciones de sus linajes son resumidos en la figura 1 (Janeway *et al.*, 1999; Ikuta *et al.*, 1992; Francois *et al.*, 1984).

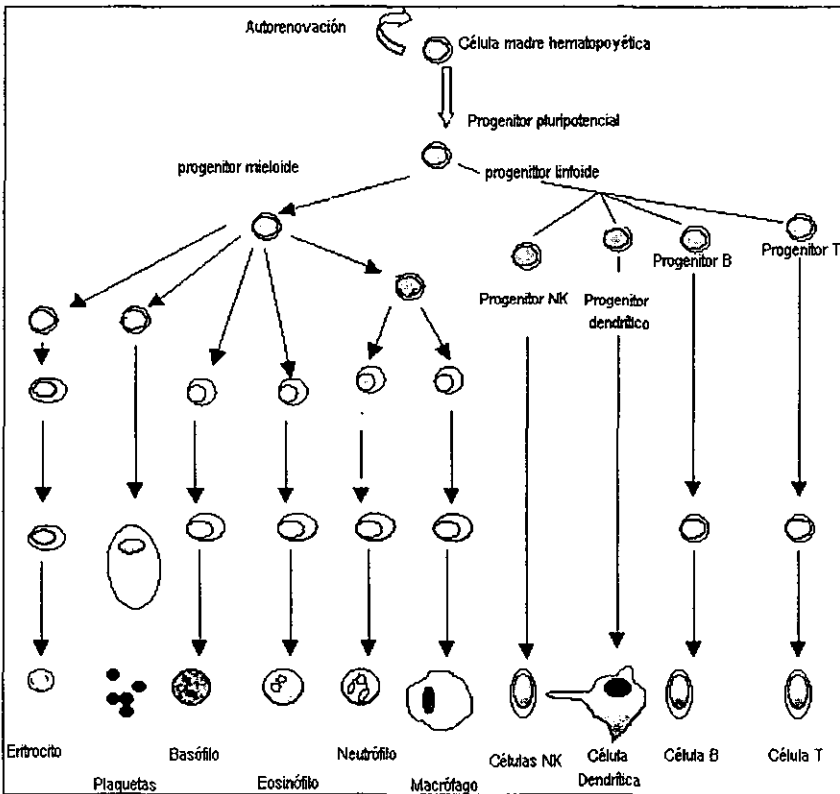


Figura 1. Árbol de diferenciación de las células madre hematopoyéticas de la médula ósea (HSCs) hacia las dos principales categorías de células sanguíneas blancas: linaje mieloide y linfóide (Morrison *et al.*, 1997).

Los progenitores comunes linfoides provenientes de las HSCs son los generadores de linfocitos, existiendo dos tipos principales: los linfocitos B (LB) y los linfocitos T (LT); estos últimos se dividen en tres clases. Una clase se diferencia, una vez activados, en células T citotóxicas (LTC); los segundos son llamados linfocitos T cooperadores (LTh) y, una tercera clase de célula linfoide son llamadas células naturales asesinas o células NK, las cuales carecen de receptores antígeno específicos y forman parte del sistema inmune innato (Janeway *et al.*, 1999; Ihle *et al.*, 1995).

Los linfocitos T y B se desarrollan en micro-ambientes del timo y de la médula ósea, respectivamente. El desarrollo de los LT requiere su migración hacia el timo para proliferar, y diferenciarse en células T maduras después de una compleja serie de interacciones con células estromales. En el desarrollo de los LB, los progenitores B permanecen e interactúan con las células estromales de la médula ósea para diferenciarse en células B maduras. Una vez que han completado su maduración, ambos tipos de linfocitos ingresan al torrente sanguíneo, circulan continuamente en la sangre en los tejidos linfoides periféricos hasta encontrar a un organismo extraño y activar sus funciones específicas (Abbas *et al.*, 2000; Janeway *et al.*, 1999; Renske *et al.*, 1998).

3.2. Inicio de la respuesta Inmune.

La sobrevivencia de un organismo depende de su capacidad para reconocer, interpretar y responder a los cambios medioambientales, así como a microorganismos que pueden ser dañinos para él. Para esto poseen barreras físicas, diversos tipos de células, ciertas sustancias químicas y enzimas, todos los cuales participan en su defensa frente a un ambiente potencialmente hostil (Germain, 1994).

Una vez que un patógeno ha infectado a un individuo, es detectado y destruido en pocas horas por un conjunto de células pertenecientes a la inmunidad innata. Dentro de la respuesta inmune innata (RII), los fagocitos, granulocitos y macrófagos proporcionan una primera línea de defensa en contra de muchos microorganismos comunes, y son esenciales para el control de infecciones bacterianas comunes. La respuesta inmune innata toma un papel importante en el control de las infecciones durante los primeros días de la infección, ya que existe un retraso de 4-7 días antes de que la respuesta inmune adaptativa tome efecto (Janeway *et al.*, 1999).

La limitada especificidad y eficiencia con que opera la respuesta inmune innata, generalmente es seguida por la respuesta inmune específica o adquirida, llamada así porque ocurre durante el tiempo de vida de un individuo como una respuesta adaptativa a la infección con el patógeno (Janeway *et al.*, 1999). La

respuesta inmune adquirida (RIA) en contra de patógenos es realizada por el conjunto de células linfoides que han evolucionado hacia medidas de defensa más versátiles y, además, proporcionan una mejor protección ante una posible reinfección con el mismo patógeno (Swain *et al.*, 1996).

La RIA comprende la captura y procesamiento del patógeno o agente extraño por las células presentadoras de antígenos (APC) y la exposición de esa forma procesada junto a moléculas del MHC, al conjunto de linfocitos T para inducir su activación. El término activación se refiere a los eventos que ocurren cuando las células T son expuestas a un estímulo inmune. Como consecuencia de la activación, las células T experimentan una expresión genética que culmina en la síntesis e inserción en la membrana de receptores para varias linfoquinas, tales como el receptor para la interleucina 2, un factor de crecimiento para las células T. Las células T activadas también producen un amplio rango de citocinas, por ejemplo IL-2, IL-3, IL-4 e IL-5, que les permiten regular su crecimiento, diferenciación y función de las células del sistema inmune (Izquierdo *et al.*, 1992; Germain, 1994; Janeway *et al.*, 1999).

Una estimulación efectiva de células T, requiere de dos señales independientes. La primera señal está dada por la interacción del receptor de la célula T (TCR) con el antígeno unido a la molécula de MHC en la superficie de las células presentadoras de antígenos. La naturaleza de la segunda señal es mucho menos definida y puede diferir, dependiendo del tipo celular (por ejemplo Th1 y Th2) y el estadio de diferenciación (virgen o de memoria) de las células durante la estimulación. Dependiendo de estos y otros factores, la función coestimuladora puede ser completada por una variedad de moléculas, tales como B7/CD28, IL-1 (en células Th2), LFA-1/ICAM, y otras (Sette *et al.*, 1994).

Una vez activados los LTC, se valen de mecanismos líticos para matar a células diana a las que se unen sin afectar a las células vecinas. Algunos mecanismos líticos resultan de la secreción de gránulos citoplasmáticos produciendo hinchazón osmótica y lisis a las células blanco; otros, utilizan enzimas activadas dentro de las células diana para digerir su propio ADN (apoptosis) (Janeway *et al.*, 1999 Romagnani, 1997; Mosmann *et al.*, 1987; Francois *et al.*, 1984).

3.3. Moléculas del complejo principal de histocompatibilidad.

El Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) es una región de genes altamente polimórficos que codifica glicoproteínas altamente especializadas que usualmente forman complejos estables con péptidos antigénicos, expuestos sobre la superficie celular para su reconocimiento por los CTL's del sistema inmune. Cada individuo ha sido equipado con un pequeño número de ellas, las cuales puede unirse a un amplio orden

o número de diferentes péptidos antigénicos, permitiendo al sistema inmune responder específicamente a una gran variedad de desafíos. Esta promiscuidad está dada por las características de la molécula, desde su estructura tridimensional así como su arreglo geométrico que permite una gran receptividad a diferentes secuencias de aminoácidos. Además de la amplia especificidad de péptidos y la capacidad para presentar cada péptido como un único complejo antigénico, las moléculas de MHC deben ser capaces de retener a sus ligandos sobre la superficie celular, para que el reconocimiento por las células T ocurra (Madden, 1995; Williams *et al.*, 1996).

Los genes del MHC están incluidos sobre el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.3), el cual posee alrededor de 3500 kilo-bases y comprende más de 200 genes (figura 2).

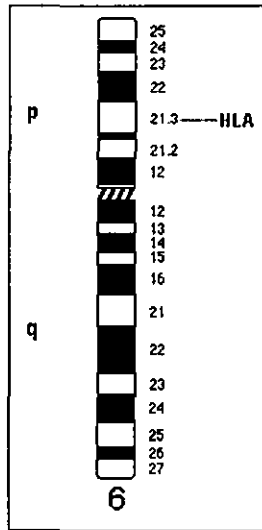


Figura 2. Esquema del cromosoma 6, que incluye a los genes del MHC.

El MHC es dividido en clase I, clase II, y clase III y es llamado HLA en humanos (antígenos leucocitarios humanos) y H-2 en el ratón (figura 3). La familia de genes HLA clase I a su vez es clasificada en Ia e Ib. Ia comprende los haplotipos HLA-A, -B y -C, estos son presentados en todas las células nucleadas y son altamente polimórficos. Ib comprende a los haplotipos HLA-E, -F y -G, poseen distribución celular restringida, y con polimorfismo limitado y no participan en la histocompatibilidad (Abbas *et al.*, 2000; Margni *et al.*, 1995; Breitung *et al.*, 1996)

Las moléculas de HLA clase I tienen como función principal unirse a péptidos antigénicos provenientes de patógenos intracelulares para ser expuestos a los LTC CD8⁺. Estas moléculas son expresadas por la mayoría de las células nucleadas. Ya que las moléculas de MHC están asociadas a la membrana y no son secretadas, los linfocitos T pueden reconocer antígenos extraños solamente cuando se unen a la superficie de otras células. Los LTC examinan diversos arreglos de complejos péptido-clase I, y bajo circunstancias normales, no reconocen péptidos propios (Abbas *et al.*, 1994; Austyn *et al.*, 199; Breitud *et al.*, 1996; van Endert, 1999).

Durante una infección viral o la transformación maligna de una célula, un amplio espectro de péptidos son presentados por las moléculas clase I. Algunos de estos complejos son reconocidos por los LTC, conduciendo a su eliminación. Es por esto que las moléculas de MHC I tienen un papel crucial en la inmunidad celular.

Los genes de HLA clase II codifican glicoproteínas expresadas sobre las células presentadoras de antígenos (células dendríticas, células epidermales de Langerhans, macrófagos), y se unen a péptidos exógenamente procesados en el camino endosomal/liposomal para ser reconocidas por linfocitos CD4⁺. Además, la región de MHC clase II también contiene genes que codifican proteínas involucradas en el procesamiento (LMP2, LMP7) y de transporte (TAP1, TAP2) de péptidos unidos y presentados por las moléculas clase I (Breitud *et al.*, 1996; Abbas *et al.*, 1994; Janeway *et al.*, 1999).

La región clase III incluye genes que codifican componentes del complemento (C2, C4, Bf), proteínas de choque térmico (Hsp70) y Factor de necrosis tumoral α y β (TNF α y β). En humanos, los genes de MHC clase I y clase II forman dos regiones discretas separadas por los genes clase III (Breitud *et al.*, 1996).

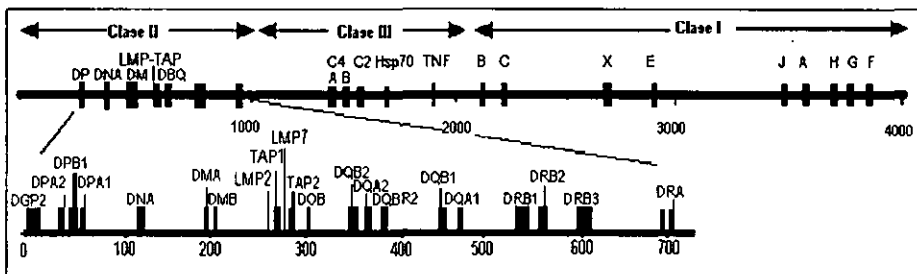


Figura 3. Mapa del complejo de antígenos leucocitarios humanos (HLA) que comprende a los genes clase I, II y III. Los genes son esquematizados como rectángulos negros verticales (Breitud *et al.*, 1996).

3.4. Estructura tridimensional de las moléculas de MHC.

La estructura tridimensional de las moléculas clase I ha sido determinada por cristalografía de rayos X. Las moléculas clase I están constituidas por tres subunidades: una cadena transmembranral pesada (α o HC del inglés *heavy chain*) altamente polimórfica de 45 kd (con dominios extracelulares α_1 , α_2 y α_3) codificada en el MHC; una subunidad soluble de 12 kd denominada β_2 -microglobulina (β_2m) asociada a la HC de manera no covalente y el péptido ligando. Los dominios distales α_1 y α_2 de la cadena α forman una hoja de 8 bandas β plegadas, atravesada por dos hélices α que comprenden el piso y los lados, respectivamente, del hueco de unión del péptido (figuras 4 y 5). Los bordes del hueco de unión están cerrados y la mayoría de los análisis cristalográficos han revelado que los términos -N y -C de los péptidos unidos son fijados en los extremos del hueco a través de interacciones de hidrógeno con residuos conservados entre todas las formas alélicas clase I. Generalmente estas características restringen el largo de los péptidos de 8 a 11 aminoácidos (Madden, 1995; Williams *et al.*, 1996; Elliot, 1997; van Endert *et al.*, 1996).

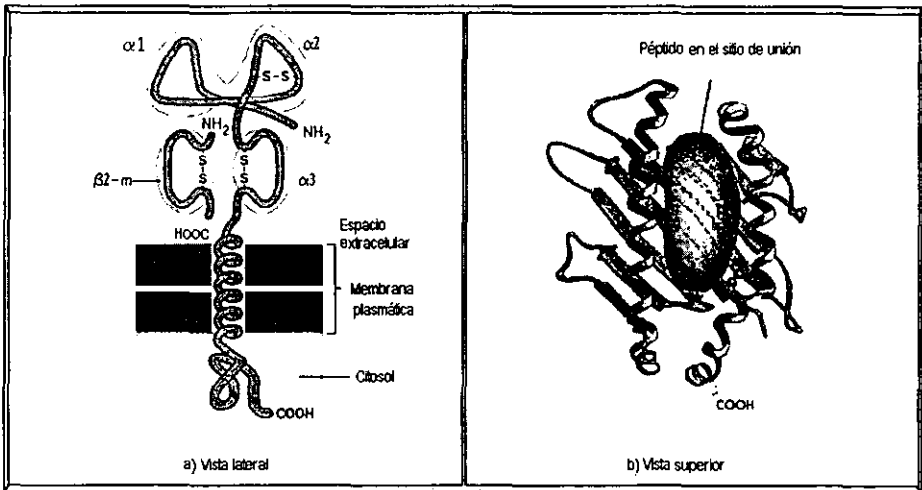


Figura 4. Estructura de la molécula de MHC clase I. (a) Vista lateral mostrando los dominios α_1 , α_2 , α_3 y a β_2 -m. (b) Vista superior para mostrar el péptido en el sitio de unión (Alberts *et al.*, 1994).

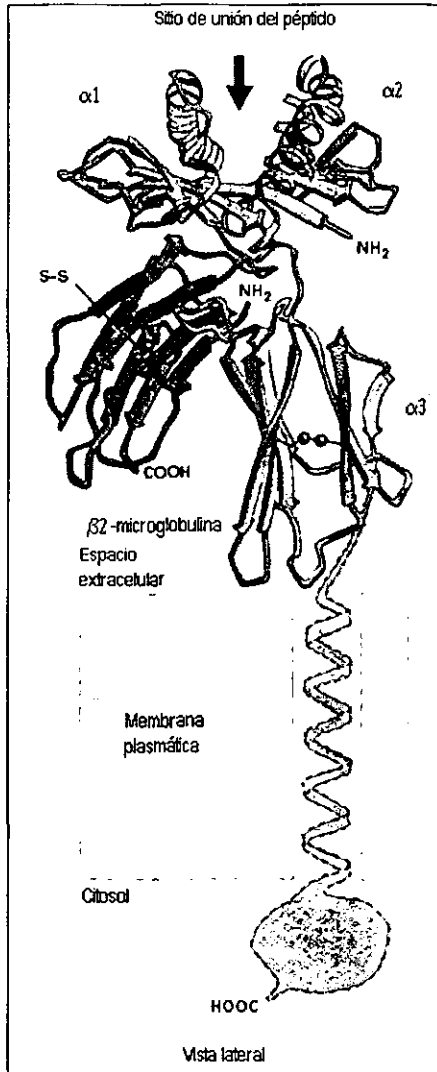


Figura 5. Estructura de la molécula HLA clase I. La estructura total indicando los dominios α_1 , α_2 , α_3 y β_2m . El péptido es unido entre las hélices α_1 y α_2 (Alberts *et al.*, 1994).

Además de las interacciones con los extremos terminales de los péptidos, se forman numerosas adhesiones de hidrógeno entre los residuos clase I y diversos átomos a lo largo del péptido. Estas asociaciones explican porque una amplia diversidad de péptidos pueden unirse fuertemente por un simple producto alélico clase I. La especificidad alélica está dada principalmente a través de la interacción entre los huecos en el piso del sitio de unión y los aminoácidos de las cadenas laterales en varias posiciones a lo largo del péptido (Williams *et al.*, 1996).

Los huecos varían en profundidad y naturaleza química entre variantes alélicas y sirven para fijar cadenas laterales de péptidos particulares (denominados residuos de anclaje). Sin embargo, los péptidos unidos a una molécula clase I en particular exhiben un patrón de unión alelo específico que consiste de dos o algunas veces tres residuos de anclaje. Uno de los residuos de anclaje se encuentra en el extremo -C terminal del péptido. En el caso de las moléculas clase I de ratón, todos los péptidos unidos analizados muestran residuos hidrofóbicos o positivamente cargados. Para los péptidos asociados con las moléculas clase I humanas, el extremo -C terminal de anclaje puede ser hidrofóbico o positivamente cargado. La capacidad de cada molécula para unir un amplio y generalmente no traslapado arreglo de péptidos asegura que la mayoría de las proteínas sintetizadas bajo condiciones normales o patológicas sean presentadas a las células T citotóxicas (Williams *et al.*, 1996).

3.5. Mecanismo de presentación de moléculas clase I.

El principal camino del procesamiento de antígenos que se asocia con el MHC I involucra tres pasos principales: generación de péptidos citosólicos, transporte de péptidos hacia el retículo endoplásmico (RE), y ensamblamiento de péptidos con las moléculas clase I (figura 6) (van Endert, 1996).

3.5.1 Generación de péptidos citosólicos.

La degradación de antígenos citosólicos es un paso esencial en la generación de la mayoría de los epitopes del MHC clase I presentados, es altamente específica y es controlada cuidadosamente para prevenir la destrucción no específica de proteínas propias esenciales y es efectuada por el proteasoma (Pamer *et al.*, 199; Johnsen *et al.*, 1998).

El proteasoma, es un complejo multi-subunitario de proteasas citosólicas que degradan selectivamente proteínas intracelulares. La mayoría de los mecanismos para marcar una proteína para su

degradación vía proteasoma es la ubiquitinación. Esto involucra la adhesión de múltiples cadenas de la ubiquitina de 76 aminoácidos a la proteína que será degradada (Johnsen *et al.*, 1998; Hilt *et al.*, 1995).

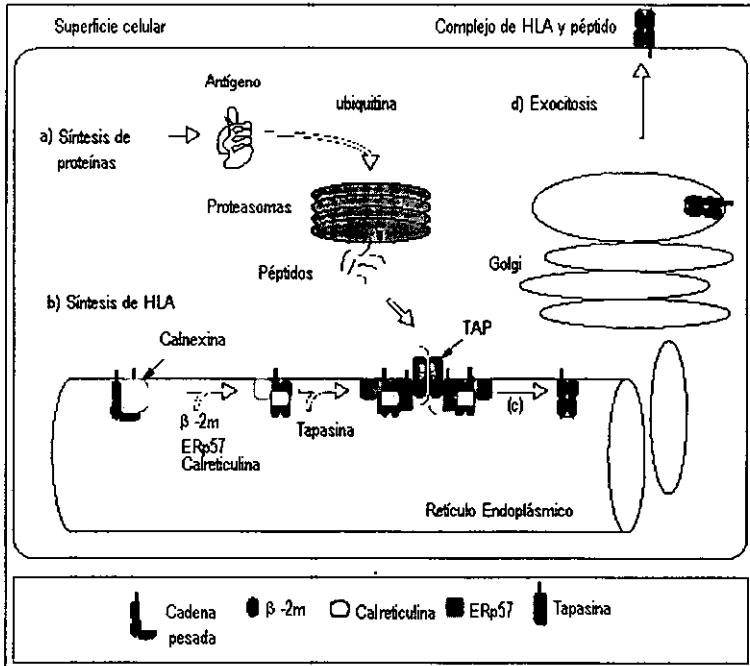


Figura 6. Mecanismo de presentación de moléculas HLA clase I (van Endert, 1996)

El proteasoma está constituido por un núcleo catalítico compuesto de 28 subunidades arregladas en cuatro anillos heptaméricos apilados. Dos de los anillos de los proteasomas de mamíferos contienen a la subunidad catalítica β, δ, X y Z. Estas son reemplazadas por LPM2 y LMP7 (proteínas de bajo peso molecular) y LMP10 en células tratadas con IFN (LMP2 puede reemplazar al LMP19, LMP7 al LMP17, y LMP10 puede reemplazar al LMP9) (figura 7); la incorporación de LMP2 y LMP7 al proteasoma altera la actividad enzimática e incrementa la producción proteolítica de ciertos péptidos, dependiendo de la naturaleza de los aminoácidos inmediatamente precedentes al sitio de rompimiento (Johnsen *et al.*, 1998; van Endert, 1996). El gene LMP10 también conocido como MECL-1, está ubicado en un cromosoma diferente del MHC, y

su papel regulador aun no ha sido establecido, aunque aparece como una subunidad catalítica (Johnsen *et al.*, 1998; van Endert, 1996; Madden, 1995).

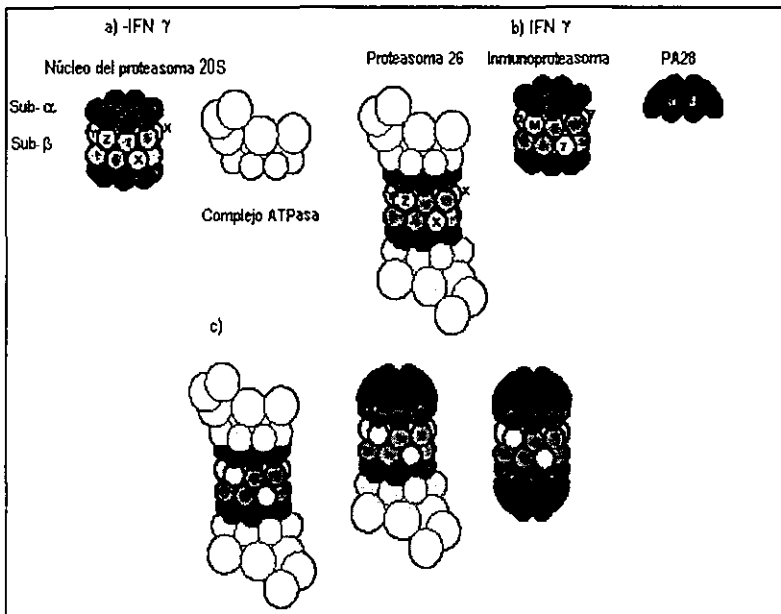


Figura 7. El IFN γ induce cambios en el proteasoma (basado en un proteasoma de levaduras). a) El proteasoma 20S es esquematizado como una estructura cilíndrica de cuatro anillos, constituido de siete subunidades α y siete subunidades β ; éste puede formar un complejo con otros dos complejos ATPasa. b) en humanos, el IFN γ induce la expresión del inmunoproteasoma. El núcleo del proteasoma 20S posee tres subunidades catalíticas β : X, Y y Z, mientras que el inmunoproteasoma posee a las subunidades inducibles con IFN y LMP2 (marcada como 2), LMP7 (7) y MELC1 (M) en la posición correspondiente durante el ensamblaje. El IFN γ también induce la expresión del regulador PA28, compuesto por PA28 α (α) y PA28 β (β). c) El proteasoma 20S y el inmunoproteasoma pueden asociarse al complejo ATPasa, al PA28, o a ambos (Früh *et al.*, 1999).

El núcleo del proteasoma 20S puede ensamblarse con otros componentes, tales como el complejo 19S (también conocido como PA700) para formar al proteasoma 26S, o al regulador del proteasoma 11S (también llamado PA28) para formar al complejo proteasómico PA28, (figura 7). El complejo regulador PA28 está compuesto por dos subunidades, PA28 α y PA28 β , formando un complejo en forma de "anillo" que se une a los extremos del proteasoma cilíndrico 20S. Las uniones de PA28 alteran la cantidad y calidad de péptidos producidos por el proteasoma (figura 5). La expresión incrementada de PA28 α aumenta el reconocimiento por los linfocitos citotóxicos T antígeno-específicos, y la asociación de PA28 con el proteasoma 20S favorece la generación de péptidos inmunogénicos. Algunos estudios han mostrado que el

complejo 26S puede degradar proteínas ubiquitinadas mientras que el proteasoma 20S, no (Johnsen *et al.*, 1998; Hilt *et al.*, 1996).

i. Transporte de péptidos hacia el RE.

Los transportadores asociados al procesamiento de antígenos tipo ABC compuestos por las subunidades TAP1 y TAP2 están codificados dentro de la región clase II del MHC, adyacentes a LMP2 y LMP7. Las funciones de los TAP's son necesarias para un eficiente procesamiento de antígenos clase I pues los genes de TAP codifican proteínas ubicadas en la membrana del retículo endoplásmico que transportan péptidos antigénicos a partir del citoplasma hacia el lumen del retículo endoplásmico (RE), donde se unen péptidos alelo-compatibles (usualmente noánmeros), para después ser transportados a la superficie celular (Hilt *et al.*, 1996; Keating *et al.*, 1995; Tindle, 1997).

TAP1 y TAP2 poseen un dominio N-terminal hidrofóbico que atraviesa la membrana de seis a ocho veces y un dominio C-terminal hidrofílico que contiene la región de unión al ATP. Las dos proteínas de TAP funcionan como un heterodímero en la membrana del RE y *cis* Golgi, con sus dominios de unión al ATP orientados hacia el citosol (Williams *et al.*, 1996).

Los complejos TAP de humanos y roedores muestran especificidad al sustrato, basándose principalmente en los extremos amino-terminales y en los tres residuos carboxi-terminales. Los TAP's de ratón exhiben una marcada preferencia por péptidos con terminales -C hidrofóbicas, mientras que los TAP's humanos transportan péptidos que posean cualquier residuo C-terminal (aunque, para algunos péptidos, los residuos ácidos C-terminales y de prolina son transportados pobremente). La especificidad de estas especies es dependiente del tamaño de los residuos C-terminales, identificados en los péptidos unidos a las moléculas clase I en las dos especies. También se han encontrado algunas diferencias en la unión de péptidos a algunos alelos, por ejemplo, HLA-A2 tiende a tener bajas afinidades mientras que otros alelos, especialmente HLA-B27, parece estar mucho mejor adaptado para unirse a péptidos aportados por TAP (van Endert, 1996; Williams *et al.*, 1996).

ii. Ensamblaje de péptidos con las moléculas clase I.

El ensamblaje de las moléculas clase I está íntimamente relacionado con la unión de péptidos. El orden de ensamblaje puede ocurrir por tres rutas principales: 1) el péptido puede unirse primero a la cadena pesada (H), seguida por la cadena ligera (β_2m); 2) un heterodímero clase I puede ensamblarse a partir de

una cadena H y β_2m , seguido por la unión del péptido; o 3) un heterodímero cadena H/ β_2m clase I es ensamblado a la tapasina, seguido por la asociación con el péptido (Neisig *et al.*, 1996).

Antes de la unión del péptido, el complejo cadena H/ β_2m permanece inestable por lo que es necesario que interactúe con algunas moléculas que transitoriamente le dan estabilidad. El orden de estas interacciones de las moléculas clase I con otras proteínas en el RE ya ha sido establecido. Las cadenas alfa clase I recién sintetizadas se asocian inicialmente con la proteína chaperona calnexina. Desde la unión de la β_2m , las moléculas humanas clase I totalmente oxidadas se unen a la calreticulina mientras que algunas se mantienen asociadas a la calnexina. En presencia de la proteína tapasina de 48 kDa, las moléculas clase I vacías unidas a la calreticulina/calnexina y a la reductasa Erp57 se asocian con los transportadores TAP (figuras 6 y 8). Una vez que un péptido se ha unido a ellas, las moléculas clase I se disocian de todas esas moléculas accesorias para ser exportadas a la superficie celular (van Endert, 1996).

La calnexina es utilizada para coadyuvar el plegamiento y la formación de puentes disulfuro en las cadenas alfa clase I y para promover su ensamblamiento con la cadena ligera β_2m ; además se ha sugerido que la calreticulina (muy probablemente junto con TAP y/o tapasina) está involucrada en la retención en el RE de las moléculas clase I no-ensambladas, ya que se ha observado que en la molécula mutante HLA-A2 (Thr134—Lys) no se permite la salida de las moléculas clase I sin péptidos cargados (van Endert, 1996).

La tapasina es una proteína transmembranal tipo I de 48 kDa residente del RE, que pertenece a la super-familia de inmunoglobulinas. La tapasina permite a los dímeros clase I vacíos, y probablemente también a la β_2m sola, asociarse con los complejos TAP; más de cuatro complejos de clase I y tapasina pueden asociarse con un dímero TAP1/2. Se ha reportado que la tapasina incrementa la expresión de los complejos TAP y puede regular su función probablemente actuando como chaperona sugiriendo que el papel fundamental de la tapasina es actuando principalmente como una concentradora de moléculas clase I vacías en el sitio de liberación de péptidos al RE, ver figura 8 (van Endert, 1996).

Otra proteína que ha sido identificada como un componente del proceso de la carga de péptidos del complejo clase I es la Erp57 una proteína residente en el RE previamente caracterizada como una reductasa dependiente de grupos *thiol*, una cisteína proteasa y una chaperona para otras proteínas. Erp57 es encontrada principalmente en complejos ya ensamblados de calreticulina y tapasina; sin embargo la asociación de Erp57 con las moléculas clase I parece preceder a TAP. Interesantemente Erp57, calreticulina y tapasina parecen ensamblarse con clase I en un modo cooperativo, aunque sus funciones pueden ser independientes (van Endert, 1996).

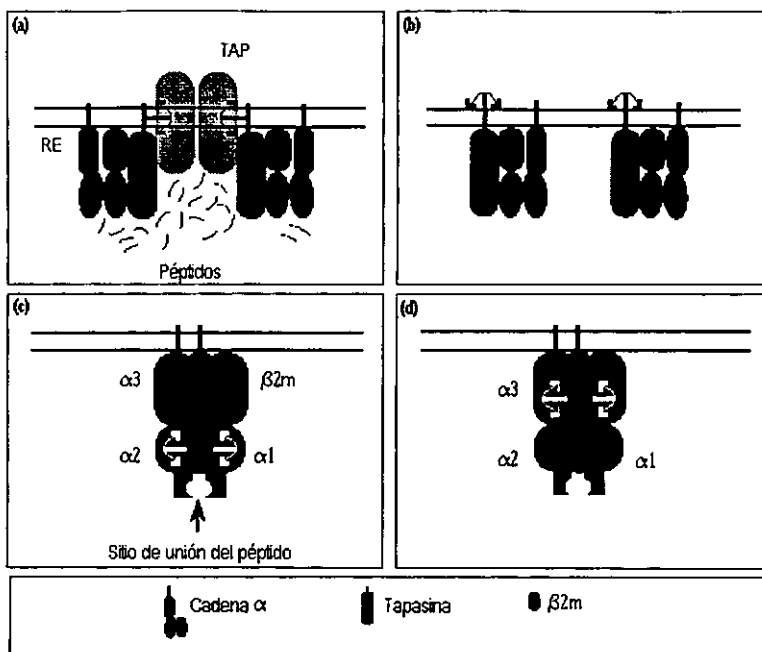


Figura 8. Función hipotética de la tapasina. a) La tapasina media la asociación de moléculas clase I con TAP, probablemente en el dominio transmembranal. Esta asociación puede tener dos efectos: incrementar la posibilidad de que los péptidos encuentren moléculas clase I vacías, o retener a las moléculas de MHC I no ensambladas en el RE. b) Utilizando sus propias señales de retención, tapasina puede detener a las moléculas clase I sin interactuar con TAP. c) La tapasina puede mantener al sitio de unión del péptido de las moléculas vacías en una conformación "abierta" e inestable interactuando con los dominios α_3 y β_2m . d) La tapasina puede estabilizar a las moléculas clase I vacías interactuando con el dominio α_3 y β_2m (Kim *et al.*, 1995; Duggan-Keen *et al.*, 1994) (Figura tomada de van Ender, 1999).

3.6. Etiología Viral Del Cáncer Cérvico Uterino.

A pesar de la existencia de programas de detección, hoy en día los altos niveles de cáncer cérvico uterino siguen siendo una importante causa de muerte; en todo el mundo son reportados anualmente 500,000 nuevos casos (Tindle, 1997; Wolfgang *et al.*, 1997). En México, entre las causas de muerte en mujeres, el CaCu es el número uno, aproximadamente 5000 mujeres mueren anualmente, cifra que ha permanecido estable en los últimos veinte años. Cuando se aplican tratamientos en las primeras etapas de desarrollo de este tipo de cáncer, el cien por ciento de las mujeres sana. Dependiendo de la dimensión y las características del tumor, éste se trata con cirugía, radioterapia o con ambos procedimientos. Sin embargo, conforme avanza el cáncer las posibilidades de curación van disminuyendo (Di Castro, 1998; Bartholomew *et al.*, 1997).

El inicio temprano de relaciones sexuales (antes de los 19 años), el número de parejas sexuales, el tabaquismo, el haber padecido enfermedades de transmisión sexual, constituyen sólo algunos de los factores de riesgo en el cáncer cervical. Sin embargo, el factor más importante parece ser la infección con virus de papiloma humano (HPV) (Di Castro, 1998; Wolfgang *et al.*, 1999).

La asociación del CaCu con el HPV es bastante fuerte, debido a que han sido detectados en más del 99.7% de los casos estudiados (Meijer *et al.*; 2000). Actualmente se han descrito alrededor de 100 tipos diferentes, son altamente huésped-específicos y estrictamente epitelio-específicos, difieren en su tejido blanco y en su patogenicidad; de ellos alrededor de 25 se han relacionado con lesiones en el tracto genital femenino. Estos papilomavirus genitales pueden ser divididos en tipos de bajo riesgo, los cuales inducen solamente lesiones benignas (condilomas y papilomas), las cuales raramente evolucionan a neoplasias, y tipos de alto riesgo, los cuales son asociados con el desarrollo de lesiones malignas (Thomas, 1998).

Se ha observado que las infecciones con HPV de alto riesgo, en particular el HPV tipo 16 (HPV16) y HPV tipo 18 (HPV18), pueden progresar a displasias de alto grado y carcinomas invasivos. El HPV16, aparece en el 50-60% de los tumores, y el HPV18 encontrado en el 20-25% de los casos. Aunque también han sido encontrados otros tipos de HPVs con menor incidencia: 31, 33, 35, 45, 52, y 39 (Tindle, 1996; Viguer *et al.*, 1995; Bartholomew *et al.*, 1997; Breitung *et al.*, 1996; Bournell *et al.*, 1996; Wolfgang *et al.*, 1999; Steenbergen *et al.*, 1998).

Los HPV's son virus pequeños de unos 55 nanómetros de diámetro, la cápside esta compuesta por 72 unidades morfológicas, o capsómeros, arreglados sobre una superficie de un icosaedro, T=7. Los capsómeros localizados en cada uno de los doce vértices, son pentavalentes, y los otros 60 capsómeros son hexavalentes (cada uno adyacente a los 6 capsómeros) (Stannard, 1995). Un modelo de la cápside del papiloma virus se muestra en la figura 9.

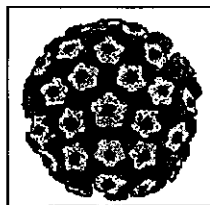


Figura 9. Cápside del HPV (Stannard, 1995).

Los HPV's están constituidos por una doble hebra circular de DNA y compuestos por unos 8000 nucleótidos. En el genoma viral se han identificado diversas regiones:

i. Zonas de lectura abierta (Open Reading Frame, ORF) que son fragmentos de ADN con capacidad para codificar proteínas de dos tipos:

- a. No estructurales, responsables de la regulación de las funciones virales, y
- b. Proteínas estructurales, que intervienen en la producción de las partículas infecciosas.

Las ORF que codifican proteínas no estructurales se denominan genes tempranos (E: early) cuya función es la de regular la replicación del DNA viral (E1 y E2), de la transcripción de RNA (E2) y de la transformación celular (E5, E6 y E7), E4 participa en la maduración de partículas virales. Los que codifican a los componentes estructurales de la cápside viral son denominados genes tardíos (L: late). Las ORF tempranas están constituidas por siete genes mientras que los genes tardíos lo están por dos.

ii. Región no codificadora (NCR: Non coding region), encargada de la transcripción y del origen de la replicación viral, ver figura 10 (Ponten et al, 1995; Viquer, 1995; Tzyy-Choou, 1993; Breitud et al, 1996).

La infección por HPV se transmite por contacto sexual y se inicia en células con mayor capacidad de división mitótica, es decir, en las células basales del epitelio escamoso, produciendo alteraciones celulares que pueden degenerar en cáncer. Una vez que la infección se produce, el virus puede permanecer sin replicarse, dando lugar a una infección latente, sin cambios morfológicos en algunos casos. La mayoría de estas infecciones son asintomáticas y transitorias, en estos casos el HPV se ha detectado como un episoma, integrado, o como una combinación de ambas formas. El proceso desde que aparecen las primeras anomalías hasta que se desarrolla el cáncer dura varios años, y de ahí que se pueda prevenir (Viquer et al., 1995; Berumen, 1997; Vernon *et al.*, 1997; Ponten *et al.*, 1995; Tzyy-Choou, 1993).

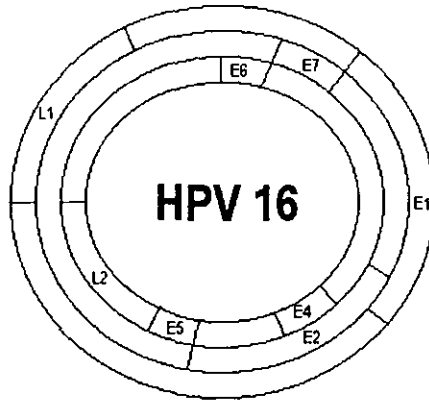


Figura 10. Genoma del HPV 16 (Tindle, 1997).

De esta manera, en enfermedades pre-neoplásicas, el DNA viral es detectado como un episoma, mientras que en cánceres está comúnmente integrado (Vernon *et al.*, 1997). Cuando el HPV se integra, frecuentemente el DNA viral se rompe en la región genética E1-E2, este rompimiento causa la pérdida de la expresión de E2, una proteína reguladora de los principales oncogenes del HPV: E6 y E7. Ya que la integración incrementa la expresión de E6 y E7 se afectan las características de crecimiento celular (Viguer *et al.*, 1995).

Los mecanismos por los cuales E6 y E7 interactúan con las proteínas reguladoras y cómo estas pueden contribuir al desarrollo de un fenotipo transformado ya han sido elucidados. En el caso de E6, se ha establecido que facilita la degradación de p53 por medio de la asociación con una proteína accesoria relacionada con la vía proteolítica de la ubiquitina. Esto sugiere que la función central de E6 es inactivar la función celular de p53 lo que conduce a una proliferación incontrolada, interrumpiendo los procesos de apoptosis en células infectadas (Labreque *et al.*, 1995).

En el caso de E7 se ha reportado que interactúa con numerosos blancos celulares [retinoblastoma (Rb), p107, Ciclina A y TBP] íntimamente involucrados en la regulación del crecimiento celular. El gene Rb, ha sido deletado o mutado en muchos tumores humanos incluyendo a retinoblastomas, osteosarcomas, carcinomas de células de pulmón, cáncer de pecho, y en carcinomas de vejiga. En todos los casos estudiados, la pérdida del gene Rb o la incapacidad para sintetizar a p105-Rb se ha correlacionado con incrementos en la proliferación y onco-génesis. Esto sugiere que la proteína Rb juega un papel importante en

el control de la proliferación de ciertas células y por lo tanto constituye un factor importante en la progresión de los tumores (Dyson *et al.*, 1989).

El genoma viral integrado en el genoma de la célula huésped, es capaz de causar una transformación maligna, definida como la pérdida del control de la proliferación provocando un incremento en la población de células cancerosas, evolucionando en algunos casos en tumores malignos (Vernon *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 1998; Viquer *et al.*, 1995; Ponten *et al.*, 1995).

3.7. Evasión del sistema inmune.

Las moléculas HLA clase I del MHC juegan un papel importante en la respuesta inmune, portando gran responsabilidad en la respuesta anti-tumores, cualquier desregulación o una carencia total en su expresión les confiere ventaja para evadir el control del sistema inmune, hasta que este se hace ineficiente para combatir el tumor.

Algunos de los mecanismos por los cuales se han mostrado como probables responsables de la alteración de la expresión de las moléculas clase I son:

- i. Mutaciones en β_2 -microglobulina o responsables de la pérdida total de clase I dificultando el ensamblamiento de moléculas clase I (Tait, 2000).
- ii. Anormalidades en los genes responsables de la expresión de TAP's y LMP's resultando en una disminución de los antígenos clase I debido a las deficiencias en la formación y transporte de péptidos (Tait, 2000).
- iii. Pérdida de haplotipos debido a deleciones en segmentos enteros de cromosomas (Tait, 2000; Breiturd *et al.*, 1996).
- iv. Pérdida de alelos debido a mutaciones en la cadena pesada clase I (Tait, 2000; Breiturd *et al.*, 1996; Keating *et al.*, 1995).
- v. Por el efecto de proteínas víricas y/o asociado al efecto de hormonas esteroides asociado a la integración de DNA de HPV de alto riesgo integrado en las células hospedera. Aunque hay pocas evidencias que sugieran que la disminución de clase I y el cáncer cervical este relacionado con los productos genéticos de los HPV's (Breiturd *et al.*, 1996; Bartholomew *et al.*, 1997; Fruh *et al.*, 1997).

Esta disminución y/o pérdida total de la expresión de las moléculas clase I ya ha sido demostrada en estudios por tinción inmuno-histoquímica en muchos tipos de células tumorales utilizando anticuerpos

monoclonales dirigidos hacia determinantes monomórficos (Breiturd *et al.*, 1996; Keating *et al.*, 1995; Vitale *et al.*, 1998; Hosch *et al.*, 1997).

La mayoría de estos estudios han evaluado la expresión de los antígenos clase I y de los elementos que participan en la maquinaria de procesamiento y presentación (Tait, 2000). Los primeros defectos en la capacidad para procesar y presentar péptidos antigénicos a los CTL's CD8⁺ fueron descritos en las células pequeñas de carcinoma de pulmón (SCLC), las cuales fracasaban en la transcripción de genes que codifican para LMP2, LMP7, TAP1 y TAP2 causando bajos niveles de expresión de moléculas de MHC I (Restifo *et al.*, 1993; Singal *et al.*, 1996; Johnsen *et al.*, 1998), un comportamiento muy parecido fue observado en líneas celulares de linfomas de Burkitt (Breiturd *et al.*, 1996). Esta anomalía , también ha sido encontrada en células de carcinoma hepático y en células renales malignas, resultando en una expresión heterogénea de los niveles de proteínas TAP1 y TAP2 para el carcinoma hepático, LMP2, LMP7, TAP1, TAP2 cadena alfa y cadena ligera para el carcinoma renal (Breiturd *et al.*, 1996; Seliger-Hohne *et al.*, 1996). En otro estudio realizado en 53 líneas provenientes de cáncer de mama, se encontró que 14 de 37 líneas celulares de alto grado presentaron disminución en la expresión de moléculas clase I, 8 de las 37 presentaron desregulación en la expresión de antígenos clase I, TAP1 o TAP2, y una pérdida total fue encontrada en 3 de las 37 (Vitale *et al.*, 1998). Johnsen analizó a 27 líneas celulares tumorales con diferentes tipos histológicos, 9 de ellas presentaron deficiencias en uno o más de los componentes (TAP1, TAP2, LMP2, LMP7) (Johnsen *et al.*, 1998).

En estudios realizados en cáncer de cérvix también se han reportado anomalías en la expresión de las moléculas clase I Keating y sus colaboradores (1995) estudiaron en 100 muestras provenientes de carcinoma de cérvix la expresión de las proteínas HLA-A y -B clase I la cual fue disminuida en uno o más alelos en al menos 73% de los carcinomas cervicales. Los TAP's fueron disminuidos en un 38% de los tumores con la expresión de HLA clase I desregulada. La pérdida de la expresión para alelos comunes de HLA clase I se encuentra en un intervalo de 36% al 71%. En otro estudio se reportó la disminución o ausencia de las moléculas de MHC clase I en más del 75% de lesiones de NIC y cáncer cervical (Tzyy-Chouu, 1993).

El presente trabajo fue llevado a cabo con la finalidad de analizar la capacidad de ocho líneas celulares derivadas de cáncer cérvico uterino para expresar moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad. El estudio consistió en infectar con el virus vaccinia recombinante a las células tumorales para que expresen en su membrana plasmática los alelos K^d, D^d y L^d del MHC clase I. Además se evaluó el efecto del IFN- γ sobre la expresión.

4. Hipótesis y Objetivos.

Hipótesis.

- La transformación maligna de las células tumorales humanas se asocia con la disminución o pérdida de la expresión de proteínas de MHC clase I. Asimismo, en la patogénesis del cáncer cervical tiene un lugar importante la infección por virus de papiloma humano. Entonces, la disminución de la expresión de moléculas MHC-I en este cáncer puede ser inducida por la expresión del virus de papiloma humano, y puede depender del tipo de virus infectante.

Objetivos:

Objetivo general:

*Evaluar la capacidad que tienen ocho líneas celulares derivadas de CaCu para expresar moléculas MHC I;

Objetivos particulares:

*Determinar la capacidad de líneas celulares derivadas de CaCu con diferentes tipos de HPV para expresar los alelos K^d, D^d y L^d del complejo principal de histocompatibilidad clase I.

*Determinar el efecto del INF γ en la expresión de moléculas del MHC I en cada una de las líneas celulares;

*Analizar si existe relación entre la expresión de moléculas de MHC I y la presencia o ausencia de HPV, así como el tipo de HPV infectante.

5. Materiales y Métodos.

5.1. Células en cultivo.

Las líneas celulares derivadas de cáncer cervical C33, ViBo, SiHa, CaSki, CaLo, HeLa, InBl, ViPa y el mastocitoma de ratón P815 (cuadro 1) fueron mantenidas en medio de cultivo RPMI suplementado con suero fetal de bovino (SFB) al 10%, a 37°C de temperatura, con una atmósfera al 10% de bióxido de carbono y un ambiente saturado de humedad en cajas Costar (USA) de 75 cm².

Tipo celular	Características
T2	Línea linfocítica carente de TAP1, TAP2, LMP2 y LMP7
Linfocitos de sangre periférica (LSP)	Cultivos obtenidos de donadores normales
CaSki	Carcinoma epidermoide cervical (metastásico) (HPV16)
SiHa	Carcinoma escamoso de cervix (HPV16)
CaLo	Carcinoma epidermoide de células grandes, no queratinizado; estadio clínico IIB (HPV18)
InBl	Carcinoma epidermoide de células grandes, no queratinizado; estadio clínico IVB (HPV18)
HeLa	Carcinoma epitelioido (adenocarcinoma) (HPV18)
ViPa	Carcinoma IIA (HPV18)
C33	Carcinoma de cervix (negativa a HPV)
ViBo	Carcinoma de cervix (negativa a HPV)

Cuadro 1. Características de las líneas tumorales empleadas.

Cada línea tumoral fue sembrada en dos grupos, uno de los cuales fue tratado con 400 U/ml de IFN- γ humano por 48 horas y el segundo se utilizó sin la estimulación de IFN- γ ; los dos grupos fueron sometidos a la infección con la vaccinia recombinante (750PFU/cel), y citometría de flujo (Diagrama 1).

5.2. Infección con Virus Vaccinia Recombinante.

El virus Vaccinia es un poxvirus benigno notable por su uso extensivo como vacuna que condujo a la erradicación global de la viruela. Estos virus son modificados genéticamente para expresar proteínas extrañas, y son conocidos como recombinantes. Muchos de los trabajos con los virus vaccinia recombinantes (Vvr) son en parte para producir nuevas vacunas, o para promover la producción de otras proteínas en cultivos celulares (Munday, 2000). En este trabajo se utilizó al Vvr para inducir la expresión transitoria de las moléculas clase I de ratón K^d, D^d o L^d (Vvr-K^d, Vvr-D^d y Vvr-L^d, respectivamente, estos Vvr fueron proporcionados por el Dr. Fernando Esquivel, Instituto de Biotecnología, UNAM). Inicialmente se contabilizaron 200, 000 células de cada línea tumoral con ayuda de un hemocitómetro (Sigma, USA), de estas se tomaron 50, 000 y se resuspendieron en 0.5 ml de RPMI y se colocaron en cajas costar[®] de 24 pozos (costar[®], USA). A cada pozo se le añadió 5 µl de Vvr (con 750 PFU/célula), después se mezcló con 0.5 µl RPMI-SFB al 20% (Vvr-K^d, Vvr-D^d o Vvr-L^d según corresponda) (diagrama 1), y se incubó por cuatro horas (Restifo *et al.*, 1993).

5.3. Citometría de flujo (FACS[®]).

La citometría de flujo se realizó para evaluar la expresión de moléculas de MHC I propias y la expresión de las moléculas H-2 clase I K^d, D^d y L^d en cada una de las líneas celulares derivadas de CaCu estimuladas con IFN γ y sin estimular. Para la detección de las moléculas MHC I propias se utilizó el anticuerpo W6-32 que reconoce a las moléculas de MHC I unidas a β₂m. La línea celular de ratón P815 que expresa naturalmente los alelos K^d, D^d y L^d se utilizó como testigo para probar a los anticuerpos anti-K^d, anti-D^d y anti-L^d, (SF1.1, 344.2S. y HB27 respectivamente). Estos anticuerpos también se utilizaron en las líneas tumorales infectadas con los Vvr correspondientes. A continuación se presenta el procedimiento general:

Las líneas celulares derivadas de CaCu fueron cosechadas con 0.5ml de solución de verseno (apéndice) lavadas con PBS (apéndice) suplementado con SFB al 2% y mantenidas por 30 min en hielo con el anticuerpo primario correspondiente. Subsecuentemente se lavaron 2 veces más con PBS-SFB al 2%, se centrifugaron a 2000 rpm por 4 min; después se incubaron en hielo con PBS suplementado con SFB al 3% por 30 min con un anticuerpo secundario marcado con fluoresceína (FITC) (el anticuerpo secundario reconoce la región Fc del anticuerpo primario). Después se lavaron 2 veces con PBS-SFB al 2%, se centrifugaron a 2000 rpm por 4 min, se resuspendieron en 200µl de PBS con SFB al 2% y se procedió a la lectura en el citómetro de flujo.

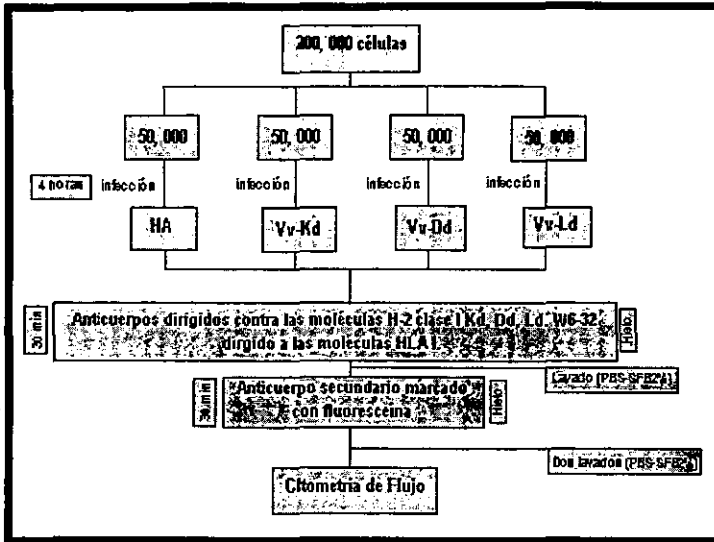


Diagrama 1. Procedimiento efectuado en cada una de las líneas celulares derivadas de cáncer cervical para la evaluación de las moléculas H-2 clase I K^d, D^d y L^d (anti-K^d, anti-D^d o anti-L^d respectivamente) mediante citometría de flujo.

5.4. RT-PCR.

El RNA se obtuvo siguiendo el protocolo suministrado con el reactivo Trizol (Life Technologies, Inc.), el cual consiste en lisis celular con isotiocianato de guanidina, extracción con fenol-cloroformo y precipitación con isopropanol. Para ello, se lisaron las células de una caja de cultivo de 25 cm² subconfluyente, con 2ml de Trizol.

Después de obtener el RNA total, se empleó el protocolo de retrotranscripción (RT), para poder obtener sólo RNA mensajero que lleva la información de las proteínas que serán traducidas. La reacción de RT se realizó bajo las siguientes condiciones empleando el kit de RT-PCR (Perkin-Elmer, USA).

i. Reacción de retrotranscripción:

Dos μ l de cloruro de magnesio (stock 25 mM); 1 μ l de buffer de PCR II (stock 10X); 4 μ l de nucleótidos (dATP, dTTP, dCTP y d GTP stock 10mM); 0.2 μ l de inhibidores de RNAsas (stock 20 U/ μ l), 0.5 μ l de oligo dT (stock 50 mM); 0.5 μ l de retrotranscriptasa reversa (stock 2.5 U/ μ l) y 0.5 μ l de ditiotritol (stock 0.7 mM), además de los 2 μ l de RNA (500 ng/ μ l).

La mezcla se incubó a 42°C por una hora, enseguida se incremento la temperatura a 94°C durante 5 minutos. La reacción se realizó en termociclador (Cyclogene techne, USA).

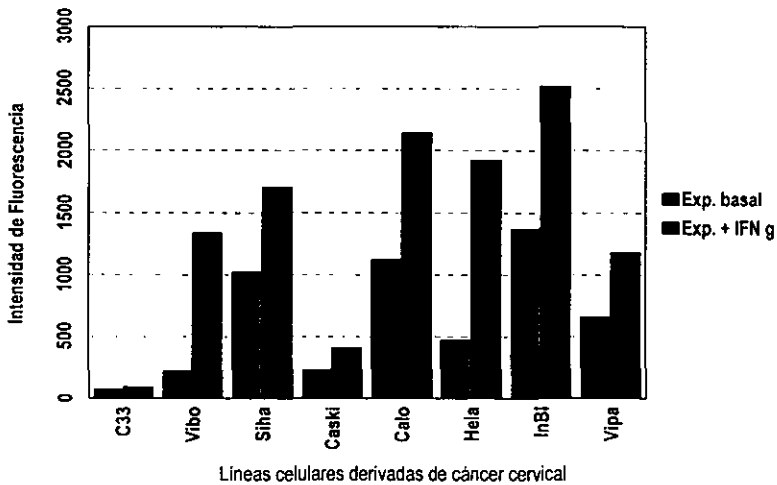
ii. Amplificación de los genes de TAP1, TAP2, LMP2, LMP7 a través de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa.

El DNA complementario (cDNA) resultante se amplificó por PCR combinando 5 µl de la solución de cDNA, 1.5 µl MgCl₂ 50 µm, 0.2 µl de trifosfato deoxinucleótidos, 0.125 µl de ampli-Taq (Life Technologies, Inc.), 0.1 µl de primers 26 µM para β-actina, 2.5 µl de buffer 10X PCR (Life Technologies, Inc.) y agua tratada con dietil pirocarbonato para completar el volumen final de 25 µl. Las muestras TAP2, LMP2, LMP7, PA28α y PA28β fueron incubadas en un termociclador Techne Ciclogen a 94° por 1 min, seguida de 25 ciclos de: 30 s a 94°C, 30 s a 60°C, y 1.5 min a 72°C, después de estos ciclos las muestras se incubaron a 72°C por 5 min. Mientras que LMP10 y TAP1 se incubaron por 94° por 5 min después, 27 ciclos de: 1 min a 94°C, 1 min a 60°C y 1.5 min a 72°C, finalmente se incubaron a 72° por 5 min. Los primers a utilizados fueron: TAP1 A: GAC AAG AGC CAC AGG TAT TTG G y TAP1 B: TGA TGA GAA GCA CTG AGC GG; TAP2 A: TAC CTG CTC ATA AGG AGG GTG C y TAP2 B: ATT GGG ATA TGA AAA GGA GAC; LMP2 A: GGG ATA GAA ATG GAG GAA CC y LMP2 B: AGA TGA CAC CCC CGC TTG AG; LMP7 A: GAA CAC TTA TGC CTA CGG GGT C y LMP7 B: TTT CTA CTTTCA CCC AAC CAT C; actina 1: GGG TCA GAA GGA TTC CTA TG y actina 2: GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG. Los productos de PCR fueron separados en un gel de agarosa , teñido con bromuro de etidio y fotografiados bajo luz ultravioleta. Los resultados obtenidos de la RT-PCR se confirmaron al compararlos con un control negativo (T2) y con un control positivo: linfocitos de sangre periférica (LSP) (Johnsen *et al.*, 1998; Referencia de los de TAP1y2).

6. Resultados.

6.1 Evaluación de la expresión de moléculas HLA clase I propias en líneas celulares derivadas de CaCu. El ensayo consistió en evaluar la capacidad de expresión de moléculas de MHC clase I propias bajo condiciones normales de cultivo, y después de haber sido tratadas por 48 horas con 400 U/ml de IFN- γ en las líneas celulares C33 y ViBo (negativas a cualquier tipo de papilomavirus), CaSki y SiHa (positivas al HPV tipo 16) y en CaLo, InBI, HeLa y ViPa con papilomavirus tipo 18.

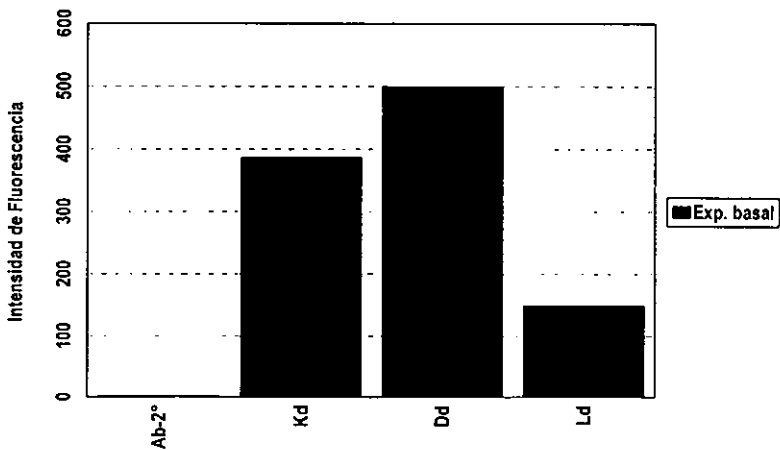
La expresión de las moléculas de MHC clase I fue evaluada mediante citometría de flujo utilizando al anticuerpo monoclonal W6-32 específico para un epítopo monomórfico de las moléculas de MHC clase I. Se encontraron diferentes intensidades de expresión de MHC-I en las distintas líneas ya que se algunas de ellas mostraron altos índices de fluorescencia media (IFM), y otras mostraron una intensidad de fluorescencia media baja. Por ejemplo, InBI, CaLo y SiHa presentaron los niveles de IFM más altos (1368, 1126 y 1025 unidades, respectivamente), mientras que C33, ViBo y CaSki presentaron los valores de IFM más bajos (101, 222 y 229 unidades, respectivamente). La fluorescencia media de HeLa y ViPa fue relativamente baja (471 y 657 unidades, respectivamente)(gráfica 1).



Gráfica 1. Expresión de moléculas HLA clase I propias en líneas celulares derivadas de cáncer cervical. Las células fueron incubadas durante 48 horas con o sin interferon γ ; después se marcaron con el anticuerpo monoclonal monomórfico W6-32, y analizadas mediante citometría de flujo.

Al evaluar el efecto del IFN- γ sobre la expresión de moléculas de MHC clase I propias encontramos un incremento bastante notorio en la expresión de estas moléculas en algunas de las líneas celulares bajo estudio. De tal manera que ViBo presentó un incremento del 502% y HeLa de 309%, en tanto que el aumento en CaLo fue 90%, en InBl 84%, en ViPa 81%, y en CaSki 79% . En la línea celular C33 se observó una respuesta moderada al incrementarse solamente en un 32 % (gráfica 1). La expresión heterogénea podría ser debida a que cada línea celular posee un haplotipo propio, y que los distintos alelos pueden estar expresados en forma diferente, o que incluso en algunas líneas dejen de expresarse algún alelo. Para profundizar en el análisis de la capacidad de expresar moléculas MHC-I en la superficie por parte de las líneas celulares se planteó como siguiente objetivo evaluar la expresión de alelos comunes en cada una de las líneas de cáncer del cuello uterino.

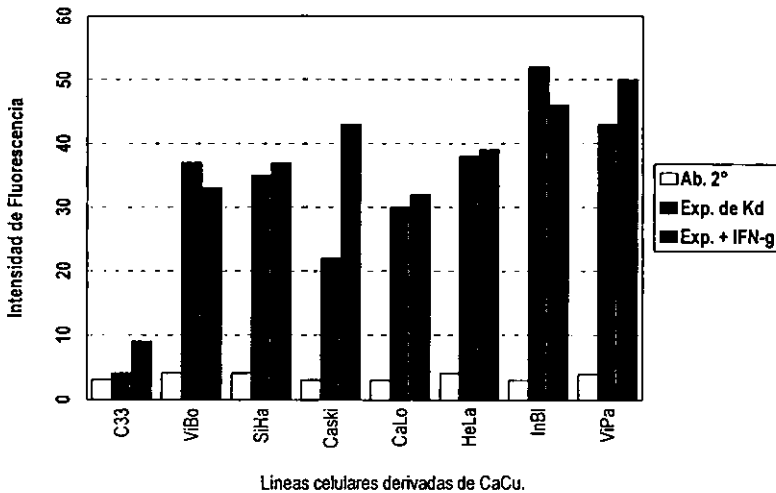
Para evaluar la expresión de moléculas de MHC clase I en forma homogénea en todas las líneas celulares, se indujo la expresión de moléculas de MHC I de ratón K^d, D^d y L^d por medio de una infección con virus vaccinia recombinante (Vvr). Inicialmente, en la línea celular P815 con haplotipo H-2^d (utilizada como positivo) se analizó la expresión de las moléculas K^d, D^d y L^d. Se encontraron altos niveles de IFM, indicando que los anticuerpos utilizados son adecuados (gráfica 2). De esta forma, la fluorescencia media de K^d tuvo un valor de 387 unidades, D^d presentó una IFM de 500 unidades y L^d con una intensidad de fluorescencia de 149 unidades. Estos datos concuerdan con lo reportado previamente, en donde se ha observado que la expresión del alelo L^d es menor que la expresión de K^d y D^d.



Gráfica 2. Evaluación de la expresión de los alelos K^d, D^d y L^d, expresados en forma natural en la línea celular P815.

El análisis de la expresión de moléculas de MHC clase I, alelo K^a es mostrado en la gráfica 3. Como se puede observar en éste gráfico, cada línea celular mostró distintos niveles de fluorescencia media, resaltando la línea celular C33 por su baja IFM, la cual tuvo un valor de 4 unidades. Las líneas celulares con fluorescencia media más alta son InBl, ViPa, HeLa y ViBo (IFM= 52, 43, 38 y 37 unidades, respectivamente); CaLo expresó una IFM de 30 unidades y en CaSki se observó una intensidad de fluorescencia relativamente baja (IFM=22 unidades).

Por otro lado, al evaluar la respuesta de las líneas celulares al tratamiento con IFN- γ , destacan C33 y CaSki, las cuales incrementaron su fluorescencia media en 125 y 95%; las demás líneas tumorales incrementaron su expresión moderadamente ViPa (16%), CaLo y SiHa (6%), HeLa (2.6%) y ViBo e InBl ambas con 11%.

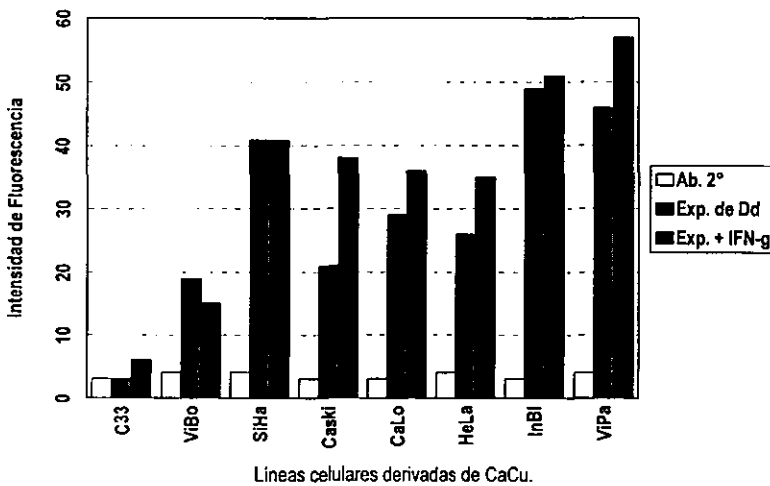


Gráfica 3. Análisis por citometría de flujo de la expresión de K^a sobre la superficie celular de líneas derivadas de CaCu. Las líneas celulares de CaCu fueron infectadas con Vacc-K^a y pre-tratadas con o sin 400 U/ml. IFN γ por 48. Las moléculas clase I fueron marcadas con el anticuerpo monoclonal SF1-1

En la gráfica 4, se observan los resultados obtenidos del análisis de las moléculas de MHC clase I, alelo D^a, sobre la superficie celular de las ocho líneas celulares bajo estudio. Se encontró que todas las líneas celulares de cáncer cervical presentaron diferente capacidad de expresión. Las líneas celulares con valores de fluorescencia media más altos son: InBl, ViPa y SiHa (IFM=49, 46 y 41 unidades, respectivamente); CaLo, HeLa, CaSki y ViBo presentaron valores de IFM intermedios (IFM=29, 26, 21 y 19 unidades,

respectivamente). De nueva cuenta, la línea celular C33 presentó la fluorescencia media con menor valor (IFM=3 unidades).

Al analizar el efecto del IFN- γ , encontramos que en las líneas celulares HeLa, ViPa, CaLo e InBl el incremento de la expresión de moléculas de MHC clase I, alelo D^d no fue muy evidente; SiHa mantuvo su expresión constante (IFM=41 unidades). Finalmente, la línea celular ViBo sufrió un decremento en su fluorescencia media en un 21%.

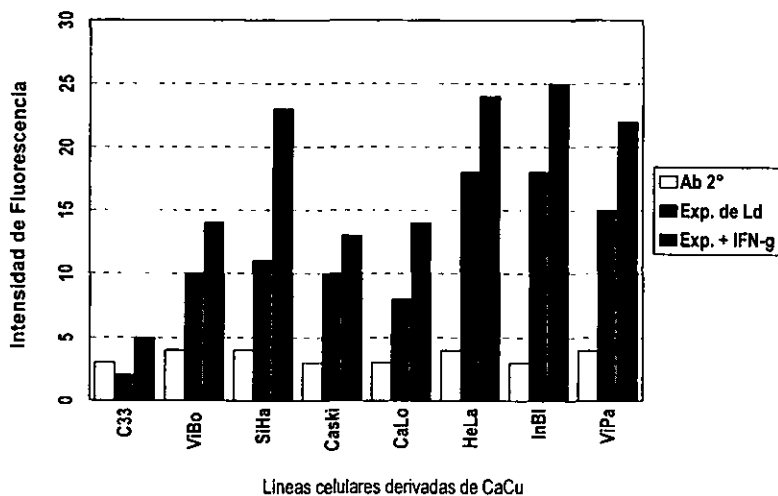


Gráfica 4. Evaluación de la expresión de moléculas de MHC clase I de ratón, alelo D^d ocho líneas celulares derivadas de CaCu. Las células tumorales fueron infectadas con Vvr-D^d y pre-tratadas con o sin 400 U/ml. IFN γ por 48. Las moléculas clase I fueron marcadas con el anticuerpo monoclonal 344.2S

Al evaluar la expresión de moléculas de MHC clase I, alelo L^d en las ocho líneas celulares de CaCu se encontró que los valores de IFM, a diferencia de los otros dos alelos (K^d y D^d), son mucho menores (gráfica 5). En lo que respecta a este alelo, las líneas celulares HeLa, InBl y ViPa se observaron los más altos niveles de fluorescencia media (16, 16 y 14 unidades, respectivamente); SiHa, ViBo, CaSki y CaLo presentaron niveles regulares de fluorescencia media (11, 10, 9 y 8 unidades, respectivamente). De nueva cuenta, en la línea celular C33 se observó la menor intensidad de fluorescencia media (IFM=2 unidades).

Por otra parte, al analizar el efecto de IFN- γ destacó que todas las líneas celulares presentaron un alto incremento en sus valores de fluorescencia media para la detección de la molécula L^d. A continuación se enlista en forma decreciente los porcentajes de incremento de la fluorescencia media de las líneas celulares bajo estudio: C33 (150%), SiHa (109%), ViBo (90%), CaLo (62.5%), ViPa (57%), InBl (56%), HeLa (50%), y finalmente CaSki (33%) (gráfica 5).

Todos estos resultados sugieren que la línea tumoral C33 presenta una o más alteraciones capaces de provocar una deficiente expresión de moléculas de MHC clase I (ya evidenciado por su baja capacidad para presentar moléculas de MHC clase I propias y también a las moléculas de MHC clase I de ratón K^d, D^d y L^d). Se ha reportado que son muchos los factores que pueden influenciar la expresión de clase I en las células cancerosas, una causa probable podría ser la pérdida o alteración de los genes involucrados en el mecanismo de procesamiento y presentación de las moléculas de MHC clase I, aunque también podrían estar involucrados otros más.



Gráfica 4. Evaluación de la expresión de moléculas de MHC clase I de ratón, alelo L^d en ocho líneas celulares derivadas de CaCu. Las células tumorales fueron infectadas con Vvr-L^d y pre-tratadas con o sin 400 U/ml. IFN y por 48. Las moléculas clase I fueron marcadas con el anticuerpo monoclonal HB27.

6.3. Análisis de los componentes involucrados en el mecanismo de procesamiento y presentación de antígenos clase I en la línea celular C33 derivada de CaCu. Se ha reportado que las células tumorales pueden presentar alteraciones en las proteínas involucradas en el mecanismo de procesamiento de péptidos y presentación de moléculas de MHC I, para evadir el reconocimiento y eliminación por los LTC.

En este ensayo se utilizó la técnica de RT-PCR para evaluar la expresión de RNAm de varios de los componentes del camino de procesamiento de antígenos de MHC clase I (TAP1, TAP2, LMP2, LMP7, LMP10, PA28 α y PA28 β) en la línea celular C33 (figura 11), en virtud de que ésta mostró drásticamente la menor expresión de moléculas clase I tanto constitutivas como inducidas mediante vaccinia recombinante. Se evaluaron las mismas moléculas en la línea celular T2, la cual tiene una delección homocigótica en la región del MHC que abarca a los genes TAP1, TAP2, LMP2 y LMP7 y que por tanto funciona como un control negativo para la expresión de esas moléculas (figura 11). También se evaluó la expresión en linfocitos de sangre periférica LSP, que sirvieron como un control positivo (figura 11). Se analizó también a la línea celular InBI (figura 11) ya que aunque deriva de un tumor cervical no presenta una expresión tan baja de moléculas MHC-I, como la presenta C33. En cuanto a la línea celular InBI, se encontró que expresa deficientemente la molécula TAP1, lo cual es común en la mayoría de las líneas celulares que manejamos en este trabajo (datos no mostrados). Por lo que respecta a C33, se observó que no expresa TAP1, LMP7 y tampoco LMP10, siendo la línea celular con mayor número de deficiencias observadas. Estos resultados nos permitieron concluir que estas moléculas influyen de manera importante a la capacidad de expresión de moléculas de MHC clase I, aunque existe la posibilidad de que otros factores estén involucrados en la baja expresión en esta línea y que aún no han sido analizados.

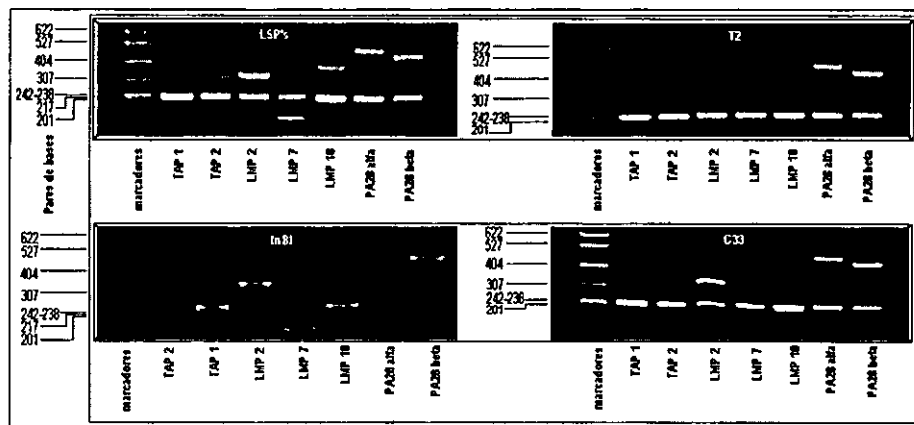


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa de las proteínas TAP1, TAP2, LMP2, LMP7, PA28- α y PA28- β en las líneas celulares derivadas de CaCu InBI y C33. T2 se utilizó como control negativo para los genes TAP1, TAP2, LMP2, y LMP7; LSP fue utilizada como control positivo.

7. Discusión.

La defensa en contra de patógenos intracelulares y células tumorales es dirigida por las células T CD8⁺. Estas células reconocen específicamente a péptidos extraños unidos a las moléculas de MHC clase I expresadas en la membrana plasmática. Los péptidos son originados a partir de proteínas citoplasmáticas sometidas al proceso de ubiquitinación y a los proteasomas para su degradación (Monaco *et al.*, 1995). Los péptidos resultantes son llevados por moléculas transportadoras (TAP's) al interior del RE en donde se unen a las moléculas HLA clase I (una cadena pesada asociada a una cadena ligera, $\beta_2\text{-m}$). Después atraviesan por el Aparato de Golgi, y finalmente son expresadas en la superficie celular. De esta forma, las moléculas HLA I, indican la composición de las proteínas celulares a las células del sistema inmune (Benham *et al.*, 1998), permitiendo el reconocimiento de proteínas mutadas o derivadas de los agentes patógenos, lo cual puede ser un indicio de transformación celular.

Por otro lado, se reconoce al cáncer cervical como una de las principales causas de muerte en mujeres en países subdesarrollados. Se ha documentado que la formación de tumores en el ser humano se origina como resultado de una serie de fenómenos en una multitud de pasos (multifactorial). Sin embargo, se ha considerado como principal factor de riesgo al HPV, el cual se ha encontrado en el 99.7% de muestras de carcinomas cervicales mundiales (Meijer *et al.*, 2000). Otra característica frecuentemente encontrada es la alteración de la expresión de las moléculas HLA I (Ruiz-Cabello *et al.*, 1991), ya sea la pérdida total (Connors *et al.*, 1990; Cromme *et al.*, 1993; Torres *et al.*, 1993; Hilders *et al.*, 1993; Honma *et al.*, 1994), la disminución de algunos alelos (Connors *et al.*, 1990; Cromme *et al.*, 1993; Cromme *et al.*, 1993; Torres *et al.*, 1993; Keating *et al.*, 1995), ó por la pérdida de alelos comunes (Connors *et al.*, 1990; Hilders *et al.*, 1993; Honma *et al.*, 1994; Keating *et al.*, 1995).

En el presente trabajo se evaluó la capacidad de expresión de moléculas del MHC clase I en ocho líneas celulares derivadas de cáncer cervical. Debido a que cada línea celular posee un haplotipo propio, se homogenizó la expresión de los mismos alelos induciendo transitoriamente la expresión de las moléculas de MHC I de ratón K^d, D^d y L^d en todas las líneas celulares. Los resultados indicaron que cada línea celular posee una capacidad particular para expresar moléculas de MHC I. De entre las líneas celulares en el estudio, C33 exhibió los niveles de expresión de antígenos clase I más bajos, para los tres alelos estudiados.

La diferente capacidad de cada línea tumoral para expresar moléculas de HLA I podría estar relacionada con las características propias de cada una de ellas; esto es, cada línea celular presenta distintas alteraciones genéticas, y estas alteraciones repercuten directamente en los niveles de expresión de moléculas

clase I. Por ejemplo, hay que considerar que son muchos los elementos que intervienen en el mecanismo de procesamiento y presentación de dichas moléculas (tales como LMP's, TAP's, cadena pesada, β_2m , etc) y cualquier deficiencia funcional podría alterar la expresión de moléculas clase I. Este fenómeno parece reflejarse en nuestros resultados, ya que en la línea celular C33 se observaron los niveles de expresión de moléculas clase I más bajos correspondiendo con el mayor número de deficiencias genéticas observadas (carece de LMP7, LMP10 y TAP1). En la línea tumoral ViBo también se han observado deficiencias en la expresión de LMP10 y TAP1 (datos no mostrados), lo cual corresponde con una expresión irregular.

Pensamos que los defectos encontrados en las subunidades del proteasoma LMP7 y LMP10, pueden alterar el espectro de péptidos producidos; aunado a esto, el subsecuente transporte hacia el RE por los transportadores asociados al procesamiento de antígenos se vería afectado, ya que TAP1 también presentó defectos en su expresión en las líneas tumorales bajo estudio (C33, e InBI). Estas deficiencias podrían influenciar a los péptidos antigénicos presentados vía clase I, cambiando la naturaleza y/o cantidad de péptidos presentados por las células malignas de cáncer cervical. Este comportamiento es importante si se considera que una activación eficiente de las células del sistema inmune depende, en parte, de los niveles de expresión de las moléculas de MHC clase I.

Al evaluar la expresión de las moléculas de MHC I de ratón K^d , D^d y L^d , se observó una baja intensidad de fluorescencia del alelo L^d , comparado con K^d y D^d . Este comportamiento es acorde con estudios previos, en los cuales se ha señalado que el alelo L^d es menos estable que K^d y D^d ; la baja estabilidad es atribuida a su secuencia de aminoácidos y a su estructura (Beck *et al.*, 1986; Hansen *et al.* 1988). También se ha mencionado que las moléculas de MHC clase I de ratón L^d poseen baja afinidad por la cadena ligera β_2m ; aunque se ha reportado que la β_2m es requerida por las cadenas pesadas de las moléculas MHC-I para ser transportada la superficie celular, se ha observado que este alelo (L^d) no requiere a β_2m para expresarse en la superficie (Martinko *et al.*, 1986; Potter *et al.*, 1984; Allen *et al.*, 1986), aunque se presenta en niveles bajos (Hansen *et al.*, 1988).

Un objetivo en este estudio fue determinar la posible relación entre el HPV y la expresión de moléculas HLA clase I. Esto se realizó considerando que las líneas tumorales CaLo, InBI, ViPa y HeLa poseen al HPV tipo 18; SiHa y CaSki son positivas al HPV16, mientras que C33 y ViBo son negativas a cualquier tipo de HPV. En nuestros resultados observamos que una línea celulares negativa al HPV, fue la que presentó los niveles de IFM más bajos, comparadas con las líneas positivas al papilomavirus humano. Estos resultados nos dejan frente a dos posibilidades. Una de ellas sería que la expresión de moléculas MHC-clase I esté incrementada por encima de lo normal en las líneas celulares con infección por HPV. Un evento

que podría explicar este fenómeno está relacionado con la proteína E7 de los HPV. Berezutskaya y colaboradores (1987) observaron que la proteína oncogénica E7 posee otros blancos además de la proteína Rb. Uno de ellos es la subunidad 4 (S4) del complejo ATPasa del proteasoma 26S. E7 se une a S4 por medio de la interacción con su dominio carboxiterminal, esta interacción incrementa la actividad de la ATPasa provocando un incremento de la degradación de proteínas citosólicas y produciendo una mayor cantidad de péptidos, los cuales serían transportados al interior del RE, unidos a las moléculas de MHC I, y por lo tanto incrementando la expresión de moléculas clase I.

Por otro lado, la segunda interpretación posible es que las líneas celulares carentes de secuencias génicas de HPV, tengan una disminución importante en su capacidad para expresar a las moléculas MHC I. Esto es evidente en la línea C33 ya que muestra la expresión más baja tanto de HLA-I (moléculas propias) como de los tres alelos de ratón inducidos (K^d, D^d y L^d). En tanto Vibo, mostró una baja expresión de HLA-I aunque su comportamiento fue irregular en cuanto a la expresión de los alelos de ratón inducidos. Esta disminución puede deberse a la deficiente expresión de algunas moléculas relevantes para el procesamiento de antígenos asociados a moléculas MHC clase-I. Consistentemente con tal idea en la figura 11 se muestra que la línea C33 presenta defectos en la expresión de los genes para TAP1, LMP7 y LMP10, a diferencia de otra línea que expresa con mayor intensidad a las moléculas MHC I (InBl), la cual es incapaz de expresar a TAP1. Por otro lado la línea Vibo, cuya expresión de moléculas MHC I fue baja en algunos casos y elevada en otros tiene defectos en TAP1 y LMP10 (datos no mostrados).

Se ha observado que el tratamiento con IFN- γ de células en las cuales los genes que codifican bajas cantidades de las proteínas involucradas en el procesamiento de antígenos (TAP's y LMP's) es capaz de aumentar el RNA mensajero para que se expresen y revertir las deficiencias bioquímicas y funcionales observadas (Allison *et al.*, 1995; Yamada *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 1998). Al evaluar el efecto del IFN γ se observó un incremento de la expresión de moléculas de MHC clase I propias en todas las líneas tumorales (gráfica 1); en el caso de los alelos H-2 (K^d, D^d y L^d) también se observó en general un incremento en la expresión aunque fue moderado y en algunas fue imperceptible (gráficos 3, 4 y 5). Estos resultados sugieren que el IFN γ podría estar reestableciendo la expresión de las proteínas TAP's o LMP's, de tal manera que se mejora la expresión de las moléculas HLA clase I.

Aunque el papel del sistema inmune en la erradicación viral aún no es claro, existen evidencias de que la respuesta inmune celular puede determinar el destino de la infección con HPV latente hacia la regresión o hacia el desarrollo de una neoplasia. Se ha observado que las lesiones cervicales asociadas al HPV son más frecuentes en individuos inmunosuprimidos, tales como los receptores de transplantes que han

sido sometidos a terapias inmunosupresoras (Halpert *et al.*, 1986) o quienes han sido infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (Petry *et al.*, 1994). También se ha observado la regresión espontánea de verrugas genitales inducidas por el HPV relacionado con la infiltración de linfocitos en las lesiones (Coleman *et al.*, 1994). Del mismo modo, se ha observado que la presencia de linfocitos en las lesiones se correlaciona con un mejor diagnóstico en el cáncer escamoso (Tosi *et al.*, 1992). Estas observaciones resaltan la importancia de la respuesta inmune celular en este padecimiento, y propician el desarrollo de terapias basadas en su empleo. Una de estas estrategias consiste en el diseño de vacunas dirigidas en contra de algunas de las proteínas del HPV. Se han postulado a la inmunización con secuencias derivadas de las proteínas de HPV denominadas como L1 y L2, considerando que podrían prevenir la infección por el HPV. Por otro lado, E6 y E7 son proteínas que persisten en las células y que se han reportado como necesarias para mantenerlas transformadas, por lo que serían utilizadas como parte de una terapia para estimular a los linfocitos citotóxicos T, ya que se ha comprobado que bajo condiciones experimentales las moléculas MHC I pueden presentar péptidos derivados de tales proteínas. Sin embargo, para el adecuado funcionamiento de las alternativas inmunoterapéuticas es necesario la comprensión cabal de los mecanismos involucrados. Por ejemplo, en este trabajo demostramos que existen células derivadas de cáncer cervical con severas deficiencias en la expresión de moléculas involucradas en el procesamiento de antígenos; este tipo de deficiencias podría representar una seria dificultad para establecer un procedimiento inmunoterapéutico basado en la presentación de antígenos virales en el contexto de las moléculas MHC I. Por lo tanto se hace evidente que se requiere profundizar en el conocimiento de la inmunobiología de las patologías como es el caso del cáncer cervical.

8. Conclusiones.

- La expresión de las moléculas de MHC clase I fue diferente en células infectadas por el HPV, en comparación con una línea celular sin secuencias génicas de HPV.
- No hay diferencia en la expresión de moléculas MHC I entre líneas celulares infectadas con HPV tipo 16 e infectadas con HPV tipo 18.
- El IFN γ incrementa la expresión de clase I principalmente en las células con menor expresión basal.
- La expresión de MHC clase I en la línea C33 está afectada por la expresión de las moléculas involucradas en el procesamiento de antígenos.

Bibliografía.

- Abbas AK., Andrew HL., Jordan SP., Cellular and Molecular Immunology. 2ª. Ed Saunders Company, USA, 10-15, 1994.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson JD. Biología Molecular de la Celula. Ed. Omega, 1994. © 1994 by Bruce Alberts, Dennis Bray, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and James D. Watson
- Allison JP., Krummel, MF. The Yin and Yang of T Cell Costimulation. *Science* 270, 932-3, 1995
- Allen H., FraserJFD., Calvin S., Flavell S. β_2 -Microglobulin is not required for cell surface expresión of the murine class I histocompatibility antigen H-2D^b or of a truncated H-2D^b. *Proc Natl Acad Sci* 83: 7447-51, 1986.
- Austyn MJ., Kathryn JW. Principles of Cellular and Molecular Immunology. Ed. Oxford University Press, 30-38.
- Bartholomew SJ., Glennville S., Sarkar S., Burt DJ., Stanley MA., Cabello FR., Chengang J., Garrido F., Stem PL. Integration of High-Risk Human Papillomavirus DNA Is Linked to the Down-Regulation of Class I Human Leukocyte Antigens by Steroid Hormones in Cervical Tumor Cells. *Cancer Res*. 57: 937-42, 1997.
- Beck CJ., Hansen HT., Cullen ES., Lee RD. Slower processing weaker β_2 -M association, and lower surface expression of H-2L^d are influenced by its amino terminus. *J Immunol* 137 : 916-923, 1986.
- Benham AM., Grommé M., Neeffes J. Allelic Differences in the Relationship Between Proteasome Activity and MHC Class I Peptide Loading. *J Immunol* 161 : 83-9, 1998.
- Benham A., Tulp A., Neeffes J. Synthesis and assembly of MHC-peptide complex. *Immunol Today* 16: 17-25, 1995.
- Berumen V. Vacunas terapéuticas recombinantes contra el cáncer del cuello uterino. *Salud pública de México* 4: 288-97, 1997.
- Berezutskaya E., Bagchi S. The Human Papillomavirus E7 Oncoprotein Functionally Interacts with the S4 Subunit of the 26 S Proteasome. *J Biol Chemistry* 272: 30135-40, 1997.
- Bjorkman P J, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. Structure of the HLA class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329: 506-12, 1987.
- Bournnell G., Rutherford, Hickling, JK., Rollinson, EA., Munro S., Rolley, N., McLean, CS., Borysiewicz, LK., Vousden, K., Inglis, SC. Construction and characterisation of a recombinant vaccinia virus expressing human papillomavirus protein for immunotherapy of cervical cancer. *Vaccine* 14: 1485-94, 1996.
- Boyer SN., Wazer, D.E., Band, V. E7 Protein of Human Papillomavirus 16 Induces Degradation of Retinoblastoma Protein through the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *Cancer Res* 56 : 4620-4, 1996.
- Boyle P. Global burden of cancer. Lancet 349 (supl. II). 1997, pp: 23-6

Breiturd F., Ramoz, N., Salmon, J., Orth, G. HLA control in the progression of human papillomavirus infections. *Sem Cancer Biol* 7: 359-71, 1996.

Campbell AE., Slater JS. Down-Regulation of Major Histocompatibility Complex Class I Synthesis by Murine Cytomegalovirus Early Gene Expression. *J Virol* 68: 1805-11, 1994.

Chen HLD., Gabrilovich R., Tampe KR., Girgis SN., Carbone DP. A functionally defective allele of TAP1 results in loss of MHC class I antigen presentation in a human lung cancer. *Nat Genet* 13: 210-8, 1996.

Di Castro PL. Cáncer cérvico uterino. Htm, 1997, <http://www.esterilidad.com.mx/histolab/pap/htm>

Chatterjee-Kishore M., Kishore F., Hicklin Dj., Marincola FM., Ferrone S. Different requirements for signal transducer and activator of transcription 1 alpha and interferon regulatory factor 1 in the regulation of low molecular mass polypeptide 2 and transporter associated whit antigen processing 1 gene expression. *J Biol Chem* 26: 16177-83, 1998.

Clavarrá R., Forman J. H-2L-Restricted recognition of viral antigens. *J Exp Med* 156 : 778-790, 1982.

Coleman N. Immunological events in regressing genital warts. *Am J Clin Pathol* 102: 768-74, 1994.

Connor ME., Stern PL. Loss of MHC class I expression in cervical carcinomas. *Int J Cancer* 46: 1029-34, 1990.

Cromme FV., Meijer CJLM., Snijders PJF., Uyterlinde A., Kenemans P., Helmerhost T., Stern PL., van den Brule AJC., Walboomers JMM. Analysis of MHC class I expression in relation to presence of HPV genotypes in premalignant and malignant cervical lesions. *Br J Cancer* 67: 1372-1380, 1993.

Daniels P.R., Sanders, C.M., Coulson, P., Maitland, N.J. Molecular analysis of the interaction between HPV type 16 E6 and human E6-associated protein. *FEBS Letters* 416 : 6-10, 1997.

Duggan-Keen M., Keating PJ., Cromme FV., Walboomers JMM., Stern PL. Alterations in major histocompatibility complex expression in cervical cancer: posibles consequences for immunotherapy. *Papillomavirus* 5: 3-9, 1994.

Dillner J. Immunobiology of paillovavirus. Prospects for vaccination. *Cancer J* 5: 1992. <http://www.infobiogen.fr/agora/journals/cancer/articles/5-4/dill.htm>

Duran T. El temible cáncer cérvico uterino. *La Jornada* , Nov., 13, 1999.

D'Urso CM., Wang Z., Cao Y., Tatake R., Zeff RA., Ferrone S. Lack of HLA class I antigen expresión by cultured melanoma cells F0-1 due to a defect in β_2m gene expresión. *J Clin Invest* 87: 284-292, 1991.

Dyson N., Howley, P.M., Münger, K., Harlow, E. He Human Papilloma Virus 16 E7 Oncoprotein Is Able to Bind to the Retinoblastoma Gene Product. *Science* 243: 934-7, 1989.

Elliot T. How does TAP asociate with MHC class I molecules?. *Immunol Today* 16 : 1997.

Epperson DE., Arnold D., Spiess T., Cresswell P., Pober JS., Jonhnsn DR. Cytokines increase transport in antigen processing-1 expresión more rapidly than HLA class I expresión in endotelial cells. *J Immunol* 149 : 3297-301, 1992.

Ferrone S., Marincola FM. Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance. *Immuno Today* 16: 487.

Francois JB. *Inmunología*. Ed: Limusa, México, 46, 1984.

Fruh K., Ahn K., Peterson PA. Inhibition of MHC class I antigen presentation by viral proteins. *J Mol Med* 75 : 18-27, 1997.

Gariglio P. Genética molecular del cáncer humano, Virus y Cancer. *Ciencia y Desarrollo* 120 : 65-74, 1995.

Garrido F., Cabrera T., Concha A., Glew S., Ruiz-Cabello F., Stern LP. Natural history of HLA expression during tumor development. *Immunol Today* 14: 491-99, 1993.

Germain RN. MHC-Dependent Antigen Processing and Peptide Presentation: Providing Ligands for T Lymphocyte Activation. *Cell* 76 : 287-99, 1994.

Halpert R., Fuchter RG., Sedlis A., UVT K., Boyce JG., Sillman FH. Human papillomavirus and lower genital neoplasia in renal transplant patients. *Obstet Gynecol* 68, 251-8, 1986.

Hansen TH., Myers NB., Lee DR. Studies of two antigenic forms of L^d with disparate β_2 -microglobulin (β_2m) associations suggest that β_2m facilitates the folding of the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ domains during de novo sintesis. *J Immunol* 140: 3522-27, 1988

Harding CV., Song R. Phagocytic processing of exogenous particulate antigens by macrophages for presentation by class I MHC molecules. *J Immunol*. 53:4925-30, 1994.

Henderson RA., Michel H., Sakaguchi K. HLA-A2.1-associated peptides from a mutant cell line: a second pathway of antigen presentation. *Science* 255: 1264-6, 1992

Hilt W., Wolf, H., D. Proteasomes: destruction as a programme. *TIBS* 21: 96-102, 1996.

Hilders CG., Muñoz IM., Nooyen Y., Fleuren GJ. Altered HLA expression by metastatic cervical carcinoma cells as a factor in impaired immune surveillance. *Ginecol Oncol* 57: 366-75, 1995.

Hosch SB., Izbicki, JR., Pichmeier, U., Stoecklein, N., Niendorf, A., Knoefel, WT., Broelsch, CE., Pantel, K. Expression and prognostic Significance of immunoregulatory Molecules in Esophageal Cancer. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 74 : 582-7, 1997.

Hoss A., D'Incan, C., Gissmann, L., Altmann, A., Momburg, F., Nindl, I., Osen, W., Schönning, BH., Jochmus, I. Human papillomavirus type 16 (HPV16) E7 and major histocompatibility complex (MHC) class I and II expression in human keratinocytes in culture. *Arch Virol* 141: 449-58, 1996.

Ihle JN., Witthuhn, BA., Quelle, FW., Yamamoto, K., Silvennoinen, O. Signaling through the haematopoietic cytokine receptors. *Annu Rev Immunol* 13: 369-98, 1995.

Ikuta K., Uchida, N., Frieman, J., Weissman, IL. Lymphocyte Development from stem cells. *Annu Rev Immunol* 10: 759-83, 1992.

Janeway CA., Travers P., Simon H., Walport, M., Capra, D., J. *IMMUNOBIOLOGY* 4th ed., Current Biology limited. New York, USA. 363-36, 1999.

Johnsen A., France, J., Sy, M-S., Harding, V. C. Down-regulation of the Transporter for Antigen Presentation, Proteasome Subunits, and Class I Major Histocompatibility Complex in Tumor Cell Lines. *Cancer Res* 58: 3660-7, 1998.

Joseph LJ., Levy E., Ozato K., Hochman J., Shearer GM. Differential lack of class I H-2d antigen expression by sublines of the BALB/c S49 T cell lymphoma. *J Immunol* 137 : 4016-20, 1986.

Keating PJ, Cromme, FV, Duggan-Keen, M, Snijders, PJF, Walboomers, JMM, Hunter, RD, Dyer, PA, Stern, PL. Frequency of down-regulation of individual HLA-A and -B alleles in cervical carcinomas in relation to TAP-1 expression. *Br. J. Cancer* 72 : 405-11, 1995.

Kim J., Modlin RL., Moy RL., Dubinett SM., McHugh T., Nickloff BJ., Uyemura K. IL-10 production in cutaneous basal and squamous cell carcinomas. A mechanism for evading the local T cell immune response. *J. Immunol.* 155: 2240-47, 1995.

Labrecque S., Matlashewski, G.J. Viability of wild type p53-containing and p53-deficient tumor treatment: the use of human papillomavirus E6 to target p53. *Oncogene* 11 : 387-92, 1995.

Lie WR., Myers BN., Gorka J., Rubocki, JR., Connolly MJ., Hansen HT. Peptide ligand-induced conformation and surface expression of the L^d class I MHC molecule L. *Nature* 344 : 439-441, 1990.

Madden DR. The Three-Dimensional Structure of Peptide- MHC Complexes. *Annu Rev Immunol* 13 : 587-622, 1995.

Man S. Human cellular immune responses against human papillomaviruses in cervical neoplasia. *Mol Med* 1-19, 1998 <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/smc/bxt001smc.pdf>

Margni RA., Fundamentos: INMUNOLOGIA E INMUNOHISTOQUIMICA. Ed. Panamericana 4^o ed, Buenos Aires, Argentina, 17-27, 254-260, 1990.

Martinko JM., Anderson SJ., Potter T. A murine cell line defective in expresión of several class I molecules. *Immunogenetics* 23: 64-6, 1986.

Massimi P., Banks, L. Repression of the Transcriptional Activity by the HPV E7 Proteins. *Viroi* 227: 255-9, 1997.

Meijer CJLM., Snijders PJF., van den Brule AJC. Screening for cervical cancer: Should we test for infection with high-risk HPV?. *CMAJ* 163: 535-8, 2000.

Meneses GF., Cos-A Ma.T. Evaluación de las actividades de detección y detección del cáncer cervico uterino en población bajo la cobertura de la Secretaria de Salud. México. *Rev Inst Nal Cancerología* 40 : 168-77, 1994.

Monaco JJ., Nandi D. The genetics of proteasomes and antigen processing. *Annu Rev Genet* 29: 729-54, 1995.

Mossmann T.R., Coffman, R.L. Two types of mouse helper T-cell clone. *Immunol Today* 8 : 223-7, 1987.

Morrison SJ., Wandycz AM., Hemmati HD., Wright DE., Weissman IL. Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development* 124: 1929-39, 1997.

Muñoz N., Bosch FX. The causal link between HPV and cervical cancer and its implications for prevention of cervical cancer. *Bull Pan Amer Health Org* 30: 326-77, 1997.

Neisig A., Wubbolts, R., Zang, X., Melief, C., Neefjes, J. Allele-Specific Differences in the Interaction of MHC Class I Molecules with Transporters Associated with Antigen. *J Immunol* 156: 3196-3206, 1996.

Pamer EG., Cresswell P. Mechanism of MHC class I-restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol* 16: 323-58, 1998.

Pardigon N., Bercovici, N., Calbo, S., Cesar, S-L., E., Liblau, R., Kourilsky, P., Pierre, JA. "Role of co-stimulation in CD8⁺ T cell activation". *Int Immunol* 10 : 619-30, 1998.

Peto R. Viral etiology of cervical cancer. Introduction: Geographic Patterns and Trends. Eds Cold Spring Harbor, New York, Banbury Report. 3-15, 1986.

Petry KU. Cellular immunodeficiency enhances the progresión of human papillomavirus associated cervical lesions. *Int J Cancer* 57: 836-40, 1994.

Pfeifer JD., Wick MJ., Roberts RL., Findlay KF., Normark SJ., Harding CV. Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC molecules. *Nature* 361: 359-66, 1993.

Ponten J., Adami, H-O., Bergtröm, R., Dillner, J., Friberg, L-G., Gustafsson, L., Miller, AB., Parkin, DM., Sparén, P., Trichopoulos, D. Strategies for global control of cervical cancer. *Int. J. Cancer* 60 : 1-26, 1995.

Potter TA., Boyer C., Schmitt-Verhulst AM., Goldstein P., Rajan TV. Expression of H-2D^b on the cell surface in the absence of detectable β_2 -microglobulin. *J Exp Med* 160: 317-22, 1984.

Renske DMS., Parker, JN., Isem, S., Snijders, PJF., Walboomers, JMM., Meijer, CJLM., Broker, TR., Chow, LT. Viral E6-E7 Transcription in the Basal Layer of Organotypic Cultures without Apparent p21cip1 Protein Precedes Immortalization of Human Papillomavirus Type 16- and 18- Transfected Human Keratinocytes. *J Virol* 72 : 749-57, 1998.

Restifo PN, Esquivel F., Kawakam Y., Yewdell JW., Múle JJ., Rosenberg SA.,Bennink JR. Identification of human cancer deficient in antigen processing. *J Exp Med* 177: 265-72, 1993.

Ribaudo RK., Margulies DH. Polymorphism at position nine of the MHC class I heavy chain affects the stability of association whit beta 2-microglobulin and presentation of a viral peptide. *J Immunol* 155 : 3481-93, 1995.

Romagnani S. The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today* 18: 6 263-6 1997.

Seliger B, Harders C., Lohman S., Momburg F., Urlinger S., Tampe R., Hubert C. Downregulation of the MHC class I antigen-processing machinery after oncogenic transformation of murine fibroblast. *Eur J immunol* 1: 122-33, 1998.

Seliger B., Dunn T., Schwenze A., Casper J., Huber C., Schmoll HJ. 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 . *Scand J Immunol* 46: 625-32.

Seliger B., Hohne A., Knuth A., Bernard, H., Meyer T., Tampe R., Momburg F., Huber C. Analysis of the major histocompatibility complex class I antigen presentation machinery in normal and malignant renal cells: evidence for deficiencies associated with transformation and progression. *Cancer Res* 56 : 1756-60, 1996.

Seliger B., Maeurer, MJ., Ferrone, S. TAP off - tumors on. *Immunol Today* June, 1997.

Sette A., Alexander, J., Ruppert, J., Snoke, K., Franco, A., Ishioka., Grey, H.M. Antigen analogs/MHC complexes as specific T cell receptor antagonist. *Annu Rev Immunol*. 12: 413-31, 1994.

Secretaria de Salud Jalisco: <http://ssj.jalisco.gob.mx/index.htm>

Singal DP., Ye, M., Qui, X. Molecular basis for lack of expression of HLA class I antigens in human small-cell lung carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 68 : 629-36, 1996.

Song R., Harding CV. Roles of proteasomes, transporter for antigen presentation (TAP), and β 2-microglobulin in the processing of bacterial or particulate antigens via an alternate class I MHC processing pathway. *J Immunol* 154: 4182-90, 1996.

Solheim JC., Harris MR., Kindle CS., Hansen TH. Prominence of β 2-Microglobulin, Class I Heavy Chain Conformation, and Tapasin in the Interactions of Class I Heavy Chain with Calreticulin and the Transporter Associated with Antigen Processing. *J Immunol* 158 : 2236-41, 1997.

Stannard LM. Principles of Virus Architecture, 1995: <http://www.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/virarch.html>

Stites DP., Abba iT. *Inmunología Básica y Humana*. Ed. El Manual Moderno, México, D.F., 73-89, 1994.

Swain S., L., Croft, M., Dubey, C., Haynes, L., Rogers, P., Zhang, X., Bradley, L., M. From Naive to Memory T Cells. *Immunol Rev* 150: 143-167, 1996.

Steenbergen R.D.M., Parker, J.N., Isem, S., Snijders, P.J.F., Walboomers, J.M.M., Meijer, C.J.L.M., Broker, T.R., Chow, L.T. Viral E6-E7 Transcription in the Basal Layer of Organotypic Cultures without Apparent p21cip1 Protein Precedes Immortalization of Human Papillomavirus Type 16- and 18- Transfected Human Keratinocytes. *J Virol* 72 : 749-57, 1998.

Tait BD. HLA Class I Expression on Human Cancer Cells. *Hum Immunol* 61: 158-165, 2000.

Thomas J.T., Laimins, L.A. Human Papillomavirus Oncoproteins E6 and E7 Independently Abrogate the Mitotic Spindle Checkpoint. *J Virol* 72 : 1131-7, 1998.

Tindle R.W. Human papillomavirus vaccines for cervical cancer. *Curr Opin Immunol* 8: 643-50, 1996.

Tindle RW. Immunomanipulative Strategies for the Control of Human Papillomavirus Associated Cervical Disease. *Immunol Res* 16 : 387-400, 1997.

Torroella-Kouri M., Morsberger S., Carrillo A., Mohar A., Meneses A., Ibarra M., Daniel RW., Ghaffari AM., Solorza G., Shah KV. HPV Prevalence among Mexican Women with Neoplastic and Normal Cervixes. *G Oncol* 70: 115-20, 1998.

Tosi P., Cintonino M., Santopietro R., Lio R., Barbini P., Ji H., Chang F., Kataja V., Syrjanen S., Syrjanen K. Prognostic factors in invasive cervical carcinomas associated with human papillomavirus (HPV). *Path Res Pract* 188: 866-73, 1992.

Tzyy-Chouu W. Immunology of the human papilloma virus in relation to cancer. *Curr Opin Immunol* 5 : 719-25, 1993.

van Endert PM. Peptide Selection for Presentation by HLA Class I: A Role for the Human Transporter Associated with Antigen Processing?. *Immunol Res* 15 : 265-79, 1996.

Vernon S.D., Unger, E.R., Miller, D.L., Lee, D.R., Reeves, W.C. Association of Human Papillomavirus Type 16 Integration in the E2 Gene with Poor Disease-Free Survival from Cervical Cancer. *Int. J. Cancer* 74: 50-6, 1997.

Viguer MJ., Garcia, MR. Laboratorio y Atlas de citología. Ed. Interamericana McGraw-Hill, Madrid, España. 78-102, 1995.

Villa LL. Human papillomaviruses and cervical cancer. *Adv Cancer Res* 71: 321-41, 1997.

Vitale M., Rezzani, Rodella L., Zauli G., Grigolato P., Cadei M., Hicklin DJ., Ferrone S. HLA Class I Antigen and Transporter Associated with Antigen Processing (TAP1 y TAP2) Down-Regulation in High-Grade Primary Breast Carcinoma Lesions. *Cancer Res* 58 : 737-742, 1998.

Wei ML., Cresswell P. HLA-A2 molecules in an antigen-processing mutant cell contain signal séquence-derived peptides. *Nature* 356: 443-6, 1992.

Weir DM., Stewart. Inmunología. Ed. El manual moderno 2ªed, México. 7-19, 1990..

Weis JH., Seidman JG. The expression of major histocompatibility antigens under metallothionein gene promoter control. *J Immunol* 134 : 1999-2003, 1985.

Weis JH., Murre C. Differential expression of H-2Dd and H-2Ld histocompatibility antigens. *J Exp Med* 161: 356-65, 1985.

Williams DB., Vassilakos, A., Suh, WK. Peptide presentation by MHC class I molecules. *Annu Rev Cell Biol* 6: 267-273, 1996.

Wolfgang M.J., Janicek , M.F., Mirhashemi. Epidemiology and Biology of Cervical Cancer. *Sem Surg Oncol* 16: 203-11, 1999.

Yamada T., Michele, M.M., Peto, J., Greer, C.E., Muñoz, N., Bosch, F.X., Wheeler, C.M. Human Papillomavirus Type 16 Sequence Variation in Cervical Cancers: a Worldwide Perspective. *J Virol* 71: 3 2463-72, 1997.

York IA., Rock KL. Antigen Processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* 14: 369-96, 1996.

Zambrano SA. Inmunología. Ed. N. Interamericana, México, 7-15, 1994.

Abreviaturas.

APC	Células Presentadoras de Antígenos
ATP	Adenosina Trifosfato
β_2m	β 2 microglobulina
EDTA	Ácido Etilendiamintetra-acético
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
HLA	Antígenos Leucocitarios Humanos
HPV	Virus de Papiloma Humano
HSCs	Células Madre Hematopoyéticas de la Médula Ósea
IFN γ	Interferón gamma (γ)
LB	Linfocitos B
LMP2, -7, 10.	Subunidades Proteasómicas de bajo peso molecular
LTC	Linfocitos T citotóxicos
LTh	Linfocitos T cooperadores
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad
NIC	Neoplasia Intraepitelial
PA28	Subunidad Activadora del Proteasoma
PBS	Solución Amortiguadora de Fosfatos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RE	Retículo endoplásmico
Ri	Respuesta Inmune
RIA	Respuesta Inmune Adquirida
RNA	Ácido Ribonucleico.
RT	Reacción de Retrotranscripción.
SFB	Suero Fetal de Bovino
Vvr	Virus Vaccinia Recombinante.

Apéndice

Verseno (1X para un litro):

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 día siguiente se esteriliza.

Buffer salino de fosfatos (PBS 1X para 1 L):

NaCl	8 gr
KCl	0.2 gr
KH ₂ PO ₄ monobásico	0.2 gr
Na ₂ HPO ₄ dibásico	2.16 gr

Buffer de TBE (para 5L):

Tris-base	54 gr
Ácido Bórico	27.5 gr
EDTA pH 8	0.5 M (20 ml)

Llevar a cinco litros de agua.