

331285



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

IDENTIFICACION DE PEPTIDOS ANTIGENICOS DE LAS
PROTEINAS E6 Y E7 DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO
TIPO HPV-16 Y HPV-18, ESPECIFICOS PARA LOS ALELOS
DE HISTOCOMPATIBILIDAD HLA-A2 Y HLA-B35 DE
PACIENTES CON CANCER CERVICOUTERINO.

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 :

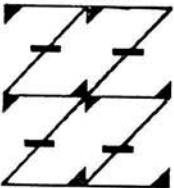
BERISTAIN AGUILAR ALAN ULISES

DIRECTOR DE TESIS: DR. ALBERTO MONROY GARCIA

LABORATORIO DE INMUNOBIOLOGIA.

UNIDAD DE INVESTIGACION EN DIFERENCIACION CELULAR Y CANCER

UNAM
FES
ZARAGOZA



LO HUMANO EJE
DE NUESTRA REFLEXIÓN

MEXICO, D. F.

2004



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.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

Esta tesis se la dedico a todos los que sufren de uno u otro modo.

Quiero agradecer primeramente a mis padres, el señor Jorge Beristain Carrera y la señora Ma. Dolores Aguilar Cruz, por que sin ellos simplemente yo no existiría, a mis hermanas Alinee y Joice, por que han estado conmigo toda mi vida.

En especial agradezco a mis papas por haberme "becado" todos estos años, en especial los dos años que tarde en realizar esta tesis, ya que sin ese apoyo económico, el que ahora escribe no habría realizado esta tesis.

Agradezco al Dr. Alberto Monroy, por aceptarme en su equipo de trabajo, y permitirme realizar mi servicio social, en el cual se me otorgo una beca por seis meses (proyecto PAPIIT-N210501), a partir del cual surgen las bases de esta tesis, sus esfuerzos para conseguir recursos, a través de los programas: CONACYT 34835-M y DGAPA-PAPIIT IN210501, con los cuales se compraron los reactivos y equipo de laboratorio que se utilizaron en esta investigación, y por su capacidad para dirigir mi tesis.

Agradezco también a todos mis maestros en especial a aquellos que lo fueron fuera del salón de clases.

Agradezco al Dr. Benny Weiss Steider, al M en B. E. Enrique Mendieta Márquez, Al Dr. Edelmiro Santiago Osorio, M. en C. Jorge Hernández Montes, por asesorarme en la realización de esta tesis.

Agradezco a Juana, y a todos mis amigos y compañeros, que vivimos tantas cosas juntos, y que de una u otra forma contribuyeron a esta investigación.

En las próximas paginas, leerán una parte de todas las cosas que hice para poder realizar esta tesis, pero hay muchísimas cosas que no están escritas y que fueron importantes, En memoria de Chuy

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Beristain Aguilar

Alan Ulises

FECHA: 6 Mayo 2004

FIRMA: Beristain Aguilar A.

INDICE.

| | PAGINA. |
|--|---------------|
| RESUMEN | 1-2. |
| MARCO TEORICO | 3. |
| I.-CANCER | 3. |
| I.II.-VIRUS DE PAPILOMA HUMANO Y CANCER CERVICOUTERINO..... | 4. |
| II.-VIRUS DE PAPILOMA HUMANO | 5. |
| a).-PROTEINAS E6 Y E7 DEL HPV..... | 6. |
| II.I.-TIPOS Y CLASIFICACION DE LOS HPV'S..... | 7. |
| a).-VARIACION GEOGRAFICA DEL HPV..... | 8. |
| b).-VARIANTES DEL HPV Y RIESGO DE CANCER..... | 9-10. |
| III.-SISTEMA INMUNE..... | 11. |
| III.I.-INMUNIDAD INNATA..... | 11. |
| III.II.-INMUNIDAD ADAPTATIVA..... | 11-12. |
| a).-ONTOGENIA DE LOS LINFOCITOS..... | 12-13. |
| b).-LINFOCITOS T..... | 14. |
| IV.-EL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD..... | 15. |
| IV.I.-MOLECULAS DEL MHC..... | 16-17. |
| V.-PROCESAMIENTO Y PRESENTACION DE ANTIGENOS POR MOLECULAS MHC..... | 18-19. |
| V.I.-UNION DEL PEPTIDO A LA MOLECULA MHC..... | 20-21. |
| VI.-DIVERSIDAD DEL MHC..... | 21-23. |
| VII.-PREDICCION DE EPITOPES ANTIGENICOS..... | 23. |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 24. |
| HIPOTESIS..... | 25. |
| OBJETIVO..... | 26. |
| OBJETIVOS PARTICULARES..... | 26. |
| METODO..... | 27-30. |
| RESULTADOS..... | 31-56. |
| ANALISIS DE RESULTADOS..... | 67-63. |
| CONCLUSIONES..... | 64. |
| PERPECTIVAS..... | 65. |
| BIBLIOGRAFIA..... | 66-76. |

RESUMEN.

El cáncer cérvicouterino (CaCu) es una de las principales causas de muerte en México, el virus de papiloma humano (HPV) se encuentra asociado a 99.7% de los casos de CaCu, los tipos 16 y 18 son los más frecuentes, en 50 % de los casos está asociado al HPV-16, y el HPV-18 se encuentra en 14 % de los casos, por lo que el HPV se considera factor de riesgo para desarrollar CaCu. Al penetrar el virus a la célula normal induce mutaciones que se transmiten a la progenie de esta célula y puede desencadenar fenómenos neoplásicos con capacidad invasora; el virus del papiloma humano está constituido por proteínas oncogénicas como las proteínas E6 y E7 que alteran el ciclo celular, favorecen la replicación del HPV y son necesarias para mantener el estado transformado, se encuentran durante todo el ciclo de vida del virus y en todas las etapas de la enfermedad. Estas proteínas intracelulares son generalmente procesadas por proteasomas y presentadas por moléculas del MHC clase I (MHC-I), actuando como antígenos tumorales. Los fragmentos (péptidos) del antígeno, presentados de forma adecuada por las MHC-I estimulan a los linfocitos T citotóxicos (Tc) que portan en su membrana receptores específicos para reconocer péptidos antigénicos.

Recientes investigaciones han permitido identificar péptidos inmunogénicos de proteínas del HPV que producen una elevada respuesta específica por parte de los linfocitos Tc cultivados *in vitro*, y algunos investigadores han aplicado algunos de estos péptidos en protocolos de inmunoterapia contra el CaCu. El presente trabajo se llevó a cabo con la finalidad de identificar péptidos antigénicos derivados de las proteínas E6 y E7 de los HPV 16 y 18, así como de la variante asiático americana-1 y variante asiático americana-2 descritas en México, más afines para los alelos HLA-A2 y B35 (de mayor frecuencia en México). A través de un programa del algoritmos se predijeron péptidos de 9 aminoácidos, derivados de las proteínas anteriormente mencionadas, con mayor afinidad a las moléculas HLA-A2 y HLA-B35. Muestras de linfocitos T de sangre periférica de 30 pacientes: 20 positivas para HLA-A2 y 18 para HLA-B35, ya sea con infección por HPV y cáncer cervical y de 14 donadoras normales, fueron evaluadas a través del estímulo *in vitro* de linfocitos T con los péptidos sintéticos obtenidos.

El péptido CVYCKQQLL derivado de la proteína E6 del HPV-16 y el péptido KLPHLCTEL derivado de la proteína E6 de la VAA1 de HPV-16, así como el péptido TLGIVCPIC de la proteína E7 de HPV-16 prototipo, fueron identificados como los más antigénicos para las pacientes positivas para el alelo HLA-A2. Asimismo, los péptidos YSKISEYRY derivado de la proteína E6 de la VAA-1 de HPV-16 y el péptido YSRIRELRY de la proteína E6 de la VAA-2 de HPV-18, fueron los más antigénicos para las pacientes positivas para el alelo HLA-B35. En este estudio se destaca que péptidos antigénicos derivados de las variantes asiático americanas 1 y 2, indujeron mayores estímulos en los linfocitos T de las pacientes HLA-A2 y HLA-B35 en comparación con los péptidos antigénicos identificados de las secuencias prototipo, lo cual es de gran relevancia para considerar el empleo de estos antígenos en el desarrollo de terapias contra el HPV y contra el cáncer cérvicouterino en nuestra población.

MARCO TEORICO.

I.-CANCER.

El fenómeno producido cuando las células proliferan sin control se conoce como cáncer o neoplasia, y es consecuencia de la alteración del ciclo celular e inhibición de la apoptosis, producidos por mutaciones dentro de la célula (Scaffidi, 1999). Las células cancerosas no dejan de crecer y dividirse, pudiendo formar tumores malignos que invaden tejidos vecinos mediante el proceso de metástasis, destruyendo tejidos y órganos vitales. En un mismo tejido se pueden encontrar variedades de cáncer con morfología y grado de malignidad distinta, existen más de 100 formas de cáncer, aunque sus mecanismos moleculares básicos son similares (Orozco y Gariglio, 2000), los cuales inicialmente fueron estudiados con el análisis molecular de virus tumorales (Bishop y Weinberg 1996).

Antes de 1900 las neoplasias eran poco conocidas, la mayoría de las muertes eran por enfermedades infecciosas como tuberculosis, influenza y neumonía. En el siglo XX y a la fecha, el cáncer es la causa más importante de mortalidad en el mundo junto con las enfermedades cardiovasculares (Orozco y Gariglio, 2000) por lo que en los últimos 20 años se ha estudiado con más énfasis este padecimiento. En México, el CaCu junto con el cáncer de mama son la primera causa de muerte en mujeres por cáncer, constituyendo un grave problema que afecta principalmente a la población económicamente activa, es decir entre los 15-64 años. (www.SSA.gob.mx 2001), ocasionando altos costos económicos para su tratamiento y afectando las actividades no sólo de la paciente sino de las personas que conviven con ella, impactando a un amplio sector de la población en general, por lo cual es muy importante realizar investigaciones que permitan desarrollar estrategias efectivas para prevenir y combatir el CaCu.

I.II.- VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO HPV Y CANCER CERVICOUTERINO.

Asociado al CaCu se encuentra el HPV en un 99.7 % de los casos en el mundo (Walboomers et al, 1999), estableciendo una asociación etiológica entre la infección por HPV y el desarrollo de la neoplasia intraepitelial cervical (Bosch et al,1995; Lizano et al, 1997; Torroella-Kouri et al, 1998; Muderspach et al, 2000;). El HPV tipo 16 es el más frecuente, se encuentra en casi 50 % de los tumores y el HPV tipo 18 se encuentra en aproximadamente 14 % de las neoplasias cervicales y se consideran factor de riesgo para desarrollar CaCu. El HPV por si solo no produce el CaCu, se necesita la alteración de antioncogenes y de otros genes para que se desarrolle un cáncer invasor. (Bosch et. al. 1995; Munoz, 2000; Walboomers et. al. 1999).

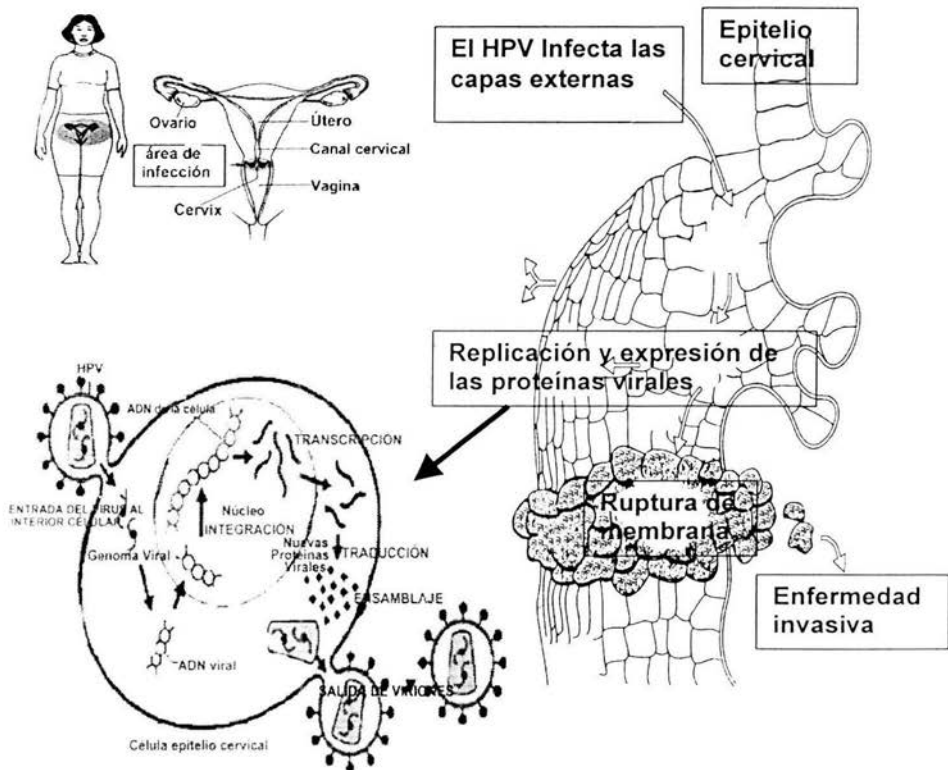
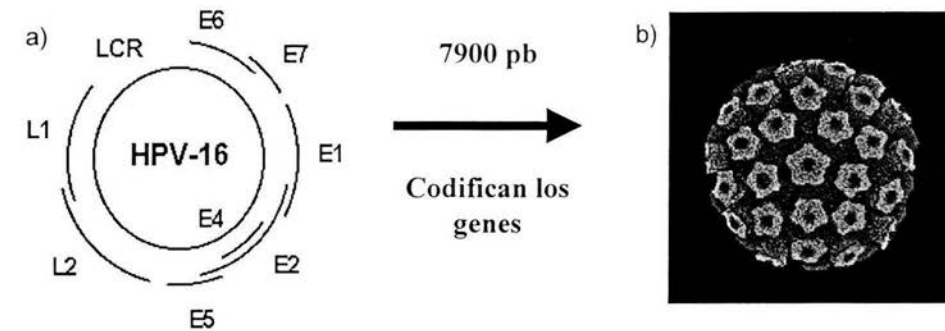


Figura 1.- Etapas de la infección con HPV en el cérvix, e integración al genoma celular (Tomado y modificado de www.hawaii.edu/hpv/cervical_cancer-info.html).

II.- VIRUS DE PAPILOMA HUMANO.

Los virus de papiloma humano (HPV) son pequeños virus oncogénicos que pertenecen a la familia *Papillomaviridae*, infectan la mucosa y epitelio cutáneo (epiteliotrópico) causando lesiones benignas hiperproliferativas (papilomas, verrugas, condilomas). Al penetrar el virus a la célula, incorpora sus genes al genoma de ésta, e induce mutaciones que se transmiten a la progenie de la célula, pudiendo desencadenar fenómenos neoplásicos con capacidad invasora (Fig. 1) (Gariglio et al, 1987; Gariglio y Salcedo, 1993; Zur Hausen, 1999). En algunos casos, la infección viral es claramente seguida de la activación del sistema inmune y la eliminación de la infección del hospedero; sin embargo, ocasionalmente las lesiones persisten y progresan malignamente causando tumores, la falla en la eliminación del virus es atribuida a una pobre respuesta inmunológica (O'Brien y Saveria 2002), la cual es vital en la protección contra el HPV, y la subsecuente progresión neoplásica (Gariglio y Rangel, 1992; Hilders et al, 1994,1995; Guzmán-Rojas, 1998).

El virus de papiloma tienen forma icosaédrica, su genoma está compuesto por una doble cadena de DNA de aproximadamente 7900 pares de bases (Fig. 2) (Howley y Knipe, 1996). Las cuales forman dos grupos de genes codificados por la misma doble cadena de DNA (transcritos en un solo sentido): los de transcripción tardía (L del inglés Late) ó tempranas (E del inglés Early). Los genes E son expresados durante todo el ciclo biológico viral, mientras que los genes L son expresados sólo durante la fase productiva. Se pueden clasificar estos genes funcionalmente en tres grupos: 1) los que codifican a las proteínas reguladoras E1 y E2 que controlan la replicación del DNA y la expresión de los genes virales; 2) los que codifican para las proteínas E6, E7 y E5 que controlan el crecimiento celular y 3) los componentes virales estructurales L1 y L2 (Fig. 2) (Laimins, 1998). Existe una región que precede a los genes tempranos llamada región larga de control (RLC o LCR) y contiene secuencias promotoras y aumentadoras de la transcripción, así como secuencias que controlan el inicio de la replicación (Zur Hausen, 1999; Kammer et al, 2000).



c)

| Proteína | Función |
|-----------|--|
| E1 | Codifica a una helicaza para la replicación episomal del DNA viral |
| E2 | Regula la expresión temprana de los genes y facilita la replicación del virus |
| E4 | Altera el citoesqueleto para facilitar la liberación del virus |
| E5 | Altera el pH endosomal y el reciclamiento de receptores de EGF a la superficie celular |
| E6 | Inactiva la función de p53 e inhibe la apoptosis |
| E7 | Se une a pRB y reactiva la síntesis de DNA del huésped |
| L1 | Constituye el 80% de la cápside (cubierta) viral |
| L2 | Constituye el 20% de la cápside viral |

Figura 2. a) Estructura tridimensional de un virión de HPV; b) Genoma del HPV; c) Genes E y L del HPV y la función que llevan a cabo (Tomado y modificado de www.cdcnpin.org/scripts/std.asp;papanicolau_hpv_abbB.html; unizh.ch/pathol/hpvnachweis.html).

a).-PROTEINAS E6 Y E7 DEL HPV.

El DNA del HPV se integra al genoma celular al azar, rompiéndose en la región E1 y E2 con lo cual se inactiva la proteína E2, favoreciendo la expresión de las proteínas virales E6 y E7, las cuales se unen e inactivan a p53 y a pRb respectivamente (Fig. 2), además de otras proteínas celulares (Jayaraman et al, 1995; Stoppler et al, 1998; Veress et al, 1999) induciendo la proliferación y pérdida de la regulación celular e inhibición de apoptosis, retrasando la diferenciación celular y el aumento de la replicación del HPV, existiendo un alto riesgo de que células infectadas con HPV puedan llegar a ser tumorigénicas (Levine et al, 1991; Lee et al, 1995; Hubert et al, 2001). Por su papel en el desarrollo del cáncer se les conoce como proteínas oncogénicas.

II.I.- TIPOS Y CLASIFICACION DE LOS HPV'S.

Hasta el momento han sido descritos más de 100 tipos virales, 40 de los cuales se encuentran asociados a infecciones del tracto anogenital (De Villers et al, 1994; Myers 1996). Existen variaciones entre los genomas de un mismo tipo de HPV. Un tipo viral del HPV se define como aquél cuyo DNA tiene menos del 90% de homología en la secuencia con cualquier otro tipo de HPV (Van Ranst et al, 1993; Zur Hausen et al, 2000), cuando los virus varían uno de otro de 2 al 10 % en su genoma, son clasificados como subtipos, cuando las diferencias son menores al 2%, en la región codificable y 5% en la región no codificable del genoma viral con respecto al prototipo aislado se clasifican como variantes intratípicas (Bernard et al, 1994). Estas variaciones confieren a los diferentes tipos, subtipos y variantes de HPV diferente capacidad antigénica y diferente potencial oncogénico (Brady et al, 1999; Hildesheim and Wang, 2002). Se ha descrito que la recombinación entre variantes es muy rara o no existe (Ho et al, 1993; Yamada et al, 1995,1997; Villa et al, 2000).

Los tipos virales del HPV se clasifican en grupos de bajo, intermedio y alto riesgo, de acuerdo a la frecuencia con que se encuentran asociados a lesiones premalignas o con el cáncer invasor. Los tipos virales HPV-16 y -18, son considerados tipos de «alto riesgo» ya que son comúnmente detectados en lesiones displásicas moderadas o severas y en el cáncer invasor (Picconi et al, 2000). Los tipos virales como el HPV-6, y -11 entre otros, son denominados de «bajo riesgo» por hallarse principalmente asociados a condilomas (verrugas genitales) y displasias leves (Cuadro 1) (Wheeler y Icenogle, 1995; Zur Hausen, 2000; Toshihiko et al, 2001).

| TIPO DE HPV | RIESGO ONCOGENICO |
|-----------------------|-------------------|
| 16, 18, 45, 56 | ALTO RIESGO |
| 31, 33, 35, 51, 52 | RIESGO INTERMEDIO |
| 6, 11, 34, 42, 43, 44 | BAJO RIESGO |

Cuadro 1.- Se muestran algunos tipos de HPV y su clasificación de acuerdo al riesgo oncogénico que representan. (Wheeler y Icenogle, 1995; Munoz, 2000; Picconi et al, 2000; Zur Huasen, 2000).

a).- VARIACION GEOGRAFICA DEL HPV.

Los últimos estudios han encontrado que el HPV-16 tiene 5 grandes ramas: dos presentes en África, una en Asia, una en Europa y una en Asia y América, las cuales se distribuyen en los cinco continentes de diferente forma (cuadro 2) una pequeñísima variante se ha reportado en Norte Americana (NA1) centro y Sudamérica (Cuadro 2)(Ho et al, 1993; Yamada et al, 1997). La distribución de las variantes de HPV-16 en el continente americano revela la colonización del nuevo mundo por europeos y africanos (Ho et al, 1993). Se ha relacionado esta variación geográfica con la prevalencia de HPV genitales (Eschele et al, 1992; Lorinz et al, 1992; Nindl et al, 1999; Ferrera et al, 1999; Herrero et al, 2000; Jacobs et al, 2000).

| VARIANTE DE HPV16 | DISTRIBUCION MUNDIAL |
|-------------------------|--|
| Asiático-Americana (AA) | Centro, Sudamérica y España. |
| Africana (Af1 y Af2) | África. |
| Asiática (As) | Sudeste de Asia. |
| Europea (E) | En todas las regiones menos en África. |

Cuadro 2.- Distribución mundial de las variantes de HPV-16 (Yamada et al, 1997).

En México se han realizado pocos estudios entorno a las variantes de HPV, por lo que es muy poca la información que existe al respecto. En pacientes mexicanas con infección de HPV-16, las variantes predominantemente encontradas son las Asiático Americanas y las variantes Europeas (Cuadro 3), y un pequeño porcentaje de una variante Af (Berumen et. al. 2001).

| VARIANTE DE HPV-16 | FRECUENCIA REPORTADA |
|-------------------------|----------------------|
| Asiático-Americana (AA) | 46 % |
| Europea | 54 % |

Cuadro 3.- Variantes de HPV-16 descritas en México, y la proporción en que se encuentran (Berumen et al, 2001).

b).- VARIANTES DEL HPV Y RIESGO DE CANCER.

En los últimos años se ha encontrado que existe una asociación entre la secuencia de nucleótidos de genomas virales y el potencial para inducir neoplasias intraepitelio-cervical (NIC). Estos estudios revelan cierta relación causal entre el grado de NIC y el tipo de HPV presente (Bergeron et al, 1992; Lorinz et al, 1992; Bosch et al, 1995; Londesborough et al, 1996; Lizano et al, 1997; Torroella-Kouri et al, 1998; Muderspach et al, 2000; Matsukura y Sugase 2001). Por otro lado las variantes AA se han asociado con carcinomas escamosos y adenoescamosos positivos para HPV-16 y 18, además estas infecciones tienden a persistir más frecuentemente, mientras que las variantes E se asocian con carcinomas escamosos y lesiones de bajo grado (Londesborough et al, 1996; Lizano et al, 1997 Villa et al, 2000). En un estudio con mujeres jóvenes se encontraron 16 variantes de HPV-16, una de las cuales persistió todo el tiempo, las otras fueron transitorias, mostrando que la variación intratípica de HPV-16 es un importante predictor de progresión de lesiones cervicales (Xi et al, 1997). En los estudios realizados en México las variantes AA se presentaron más frecuentemente en pacientes con cáncer que en personas aparentemente sanas (control), y su proporción es mayor respecto de las variantes E en cáncer cervical (cuadro 3). La edad promedio de las pacientes con cáncer con variantes AA es menor que la de las infectadas con variantes E, el porcentaje de variantes AA es mayor al reportado en Sudamérica, debido principalmente a que la subvariante AA-c es muy frecuente solo en México. Las variantes E por su parte se encontraron ligeramente más frecuentes en pacientes que en el grupo control, el hecho de que las variantes AA se encuentren con mayor frecuencia en pacientes que las variantes E muestra que las variantes AA son más oncogénicas (Berumen et al, 2001); esto puede ser explicado en base a que el número de copias por célula de la variante AA es mayor que el de la variante E, la actividad del promotor p97 es 3,3 veces mayor que en E sugiriendo que se replican más (Hubert et al, 2001). La alta tasa de infección de virus de alto riesgo y la gran proporción de variantes no prototípicas de HPV-16 asociadas con un mayor potencial oncogénico explica el porque existe una elevada frecuencia de cáncer cervical en ciertas poblaciones (Picconi et al, 2000; 2002). La gran incidencia de cáncer cervical en México (59/100,000) se puede asociar con una prevalencia alta de variantes oncogénicas. Se ha descrito que las variantes Asiático-Americana de HPV 16 y la variante Asiático-Amerindio para HPV 18 son más frecuentes que las europeas en pacientes mexicanas (Berumen et al, 2001).

Por lo tanto, es posible relacionar tipos de HPV con las características histopatológicas del CaCu, como el caso de una variante de HPV-18 que ha sido encontrada exclusivamente en células de carcinoma escamoso (Lizano et al, 1997), lo cual es importante para determinar asociaciones entre diferencias funcionales entre las variantes virales e influir en el riesgo de lesiones precancerosas y su progresión, siendo importante para las estrategias de inmunización debido a la posición de algunos aminoácidos.

Se ha descrito que una sola variación en la secuencia de nucleótidos de la proteína E6 del HPV-16 aislada de cáncer cervical de un individuo, interfiere con la respuesta de las células T citotóxicas (Ellis et al., 1995). Por lo que estas variaciones en la secuencias de nucleótidos son usadas como una importante herramienta para estudios epidemiológicos de la transmisión y persistencia del virus del HPV (Kirnbauer et al, 1992, 1993; Franco, 1995). Hay pocas diferencias de nucleótidos entre las variantes de HPV (Cuadro 4) resultando interesante que estas alteraciones interfieran con las propiedades y funciones de proteínas virales antigénicas (Fujinaga et al, 1994; Song et al, 1997; Berumen et al, 2001). Un estudio realizado en México encontró que el cambio de un sólo aminoácido en la secuencia del péptido produce diferente respuesta, mostrando la especificidad del reconocimiento de antígeno (Monroy et al, 2002). Se ha reportado que el cambio de T por G en E6 de variantes de HPV 16 está coordinado con un cambio específico en E7 (Vaeteewoottacharn et al, 2003).

| SECUENCIA DE LA PROTEÍNA E6 DEL HPV-16. | VARIANTE A LA QUE CORRESPONDE. |
|---|--------------------------------|
| DPQERPRKLPQLCTELQTTI | secuencia prototipo (E) |
| DPQERPRKLPHLCTELQTTI | secuencia de la variante AA -1 |
| DKCLKFYISKISEYRHYCYSL | secuencia prototipo (E) |
| DKCLKFYISKISEYRYCYSL | secuencia de la variante AA -1 |

Cuadro 4.- Comparación entre un segmento de las secuencias de las proteínas E6 de HPV-16 prototipo (E=Europea) y el mismo segmento de la variante AA= Asiático Americana 1, los cuales cambian en un solo aminoácido (www.bimas.dcr.t.nih.gov/molbio/hla_bind/).

III.- SISTEMA INMUNE.

El organismo para defenderse de cualquier enfermedad cuenta con un sistema inmune constituido por el sistema inmune innato y el sistema inmune adaptativo, los cuales actúan de forma integral y son esenciales para la defensa del organismo. El sistema inmunológico está formado por células, moléculas, órganos linfoides, la circulación linfática, proteínas sanguíneas, miembros del complemento y otros mediadores de la inflamación, proteínas llamadas citocinas que regulan y coordinan muchas de las actividades de la inmunidad innata y adaptativa (Abbas et al, 2000).

III.I.- INMUNIDAD INNATA.

La inmunidad innata es aquella que se tiene al nacer y es la primera defensa del cuerpo, no depende del contacto previo con el agente infeccioso, su acción se lleva a cabo de forma inespecífica, y no se modifica de manera importante con exposiciones repetidas al patógeno durante la vida de un individuo. El sistema inmunitario innato está formado por barreras mecánicas tales como la piel que evita físicamente que potenciales agentes lesivos penetren al interior del cuerpo; además proteínas y enzimas como el ácido láctico y otras sustancias en el sudor que mantienen la superficie de la epidermis en un pH ácido que ayuda a evitar la colonización por bacterias y otros microorganismos. De forma similar el recubrimiento epitelial de las vías respiratorias y digestivas está bañado de una capa de moco protectora que puede atrapar, disolver y arrastrar hacia afuera sustancias extrañas. También se consideran parte de este tipo de inmunidad a las células fagocitarias: monocitos, macrófagos, neutrófilos y células asesinas naturales (NK); las dos primeras engloban y digieren virus y otras partículas. Cuando esta primera defensa falla, entra en acción la inmunidad adaptativa (Rojas Espinosa, 1996).

III.II.- INMUNIDAD ADAPTATIVA.

La inmunidad adaptativa se llama así ya que se adapta y se desarrolla con la infección, se sabe que apareció primero en los vertebrados sin mandíbula y fue incrementando su especialización a la par con la evolución de las especies. Este tipo de inmunidad se caracteriza por:

1.- Genera memoria hacia el antígeno, es decir que a partir de experiencias previas se modifica, de manera que encuentros subsecuentes con un mismo antígeno extraño originan respuestas más rápidas y vigorosas, aumentando en gran medida con exposiciones subsecuentes al mismo patógeno (Stites et al, 2000; Rogers et al, 2000).

2.- Los linfocitos pueden reconocer y discriminar entre lo propio y lo extraño, y responder a una amplia variedad de antígenos, de manera que coexiste

pacíficamente con toda la materia que constituyen el huésped, pero responden de manera enérgica contra sustancias extrañas. Esta es una remarcable propiedad del sistema inmune llamada tolerancia inmunológica.

3.- Por si esto fuera insuficiente, los linfocitos expresan en su membrana receptores capaces de distinguir pequeñas diferencias estructurales dando gran especificidad a la acción de los linfocitos, que reconocen porciones específicas de un antígeno la cual es llamada determinante antigénico o epítope (Fig. 4 y 7).

4.- El número total de especificidades que pueden reconocer los linfocitos de un individuo, es llamado repertorio linfocítico, es extremadamente amplio, se estima que en mamíferos el sistema inmune puede discriminar entre 10^9 y 10^{11} distintos determinantes antigénicos, esta propiedad del repertorio linfocítico se llama diversidad.

Con el tiempo la respuesta inmune normal decae después de que el antígeno ha sido eliminado, el sistema inmune retorna a un estado basal, a través del proceso llamado homeostasis, esto como una forma de auto limitación de la respuesta inmune (Abbas et al, 2000).

a).- ONTOGENIA DE LOS LINFOCITOS.

Desde las primeras semanas de vida embrionaria en el mesodermo del sacovitelino se forman las células madre hematopoyéticas (HCS, hematopoietic stem cells) y posteriormente en la médula ósea se producen, crecen y diferencian las células sanguíneas, a través de un proceso llamado hematopoyesis, en el cual se producen tres clases de células: 1) Eritrocitos, que transportan el oxígeno en la sangre; 2) Células mieloides ("de la médula ósea") como las plaquetas, que controlan la hemorragia; y 3) Leucocitos o glóbulos blancos que aparecen hasta el 5° mes de formación (Fig. 3). Las HCS humanas se pueden distinguir de otras células de médula ósea por una proteína que se expresa en las superficies celulares, denominada CD34 (CD, se refiere al grupo de diferenciación, cluster of differentiation) (Stites et al, 2000).

El cuerpo humano normal del adulto contiene alrededor de un billón (10^{12}) de linfocitos, los cuales se subdividen en linfocitos T provenientes del timo y linfocitos B derivados de la médula ósea, representando cerca de 75 y 10 % respectivamente del total de todos los linfocitos. Además de éstos, las células asesinas naturales (NK) constituyen aproximadamente el 15% (Stites et. al. 2000).

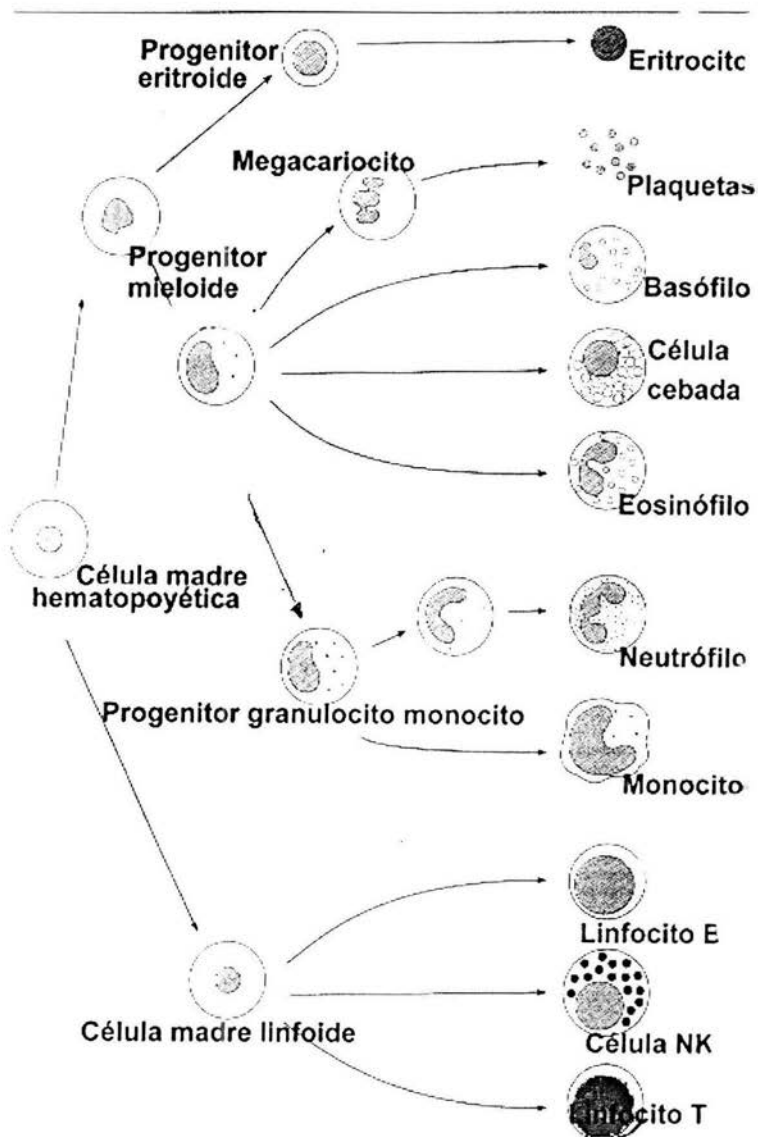


Figura 3.- Origen de los diferentes linajes de células hematopoyéticas (Tomado de Stites et al, 2000).

b).- LINFOCITOS T.

Los linfocitos T se pueden distinguir entre sí por la función que llevan a cabo, y por dos proteínas de superficie conocidas como CD4 y CD8, los linfocitos maduros expresan casi siempre una de las dos proteínas y esta se relaciona con su función celular y con el tipo de proteína MHC que reconocen (Fig. 4) (Abbas et al, 2000). Aproximadamente 70% de las células T son CD4, mientras que 25% son CD8; cerca de 4% fuera del timo son CD4-CD8-, dobles negativos, y casi todos éstos expresan un tipo alternativo de receptor de célula T, constituido por polipéptidos llamados gamma y delta. El 1% pueden ser dobles positivas, CD4+CD8+ cuya función se desconoce.

Los linfocitos T auxiliares (Th del inglés T helper) o TCD4+, expresan en su membrana moléculas CD4 y reconocen péptidos presentados por moléculas clase II del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) en la membrana de las células blanco (Fig. 4). Este reconocimiento es el estímulo inicial para su activación, además secretan proteínas llamadas citocinas que promueven la proliferación y diferenciación de otras células como los linfocitos T, las células B, macrófagos y otros leucocitos, así como su propio crecimiento (autócrino), siendo el principal de estos factores la IL-2 (Canaday et al, 2001). Dentro de las células TH pueden distinguirse dos grupos de células que secretan un grupo característico de citocinas cuando se activan, y así promueven tipos particulares de reacciones defensoras, las TH1 que secretan IL-2, IL-3, IL-13, IFN- γ y TNF- β y las TH2 que secretan IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-3, GM-CSF y IL-13 (Passmore et al, 2002).

Diferentes estudios han indicado que las células tumorales y células infectadas con virus pueden ser destruidas por los linfocitos T citotóxicos, es decir, que tienen la capacidad de destruir células extrañas (Brander y Walker 1999; Bontkes et al, 2000; Stites et al, 2000). Los linfocitos T citotóxicos presentan en su superficie moléculas CD8 y reconocen sólo porciones o péptidos antigénicos presentados por moléculas MHC clase I (Fig. 4). El linfocito T citotóxico activado produce gránulos citolíticos constituidos por enzimas proteolíticas (granzimas, perforinas) para destruir a las células blanco (Van Leeuwen y Samelson, 1999; Canaday et al, 2001), por lo que los linfocitos T citotóxicos (Tc) o CD8+ han sido usados por muchos años como las mejores células efectoras contra el crecimiento de tumores y se ha sugerido el uso de epítopos antigénicos a CD8+ en las vacunas tumorales para inducir una efectiva asociación antígeno-tumor, específica en la respuesta inmune celular (Alexander et al, 1996; Guzmán-Rojas et al, 1998; Yoon et al, 1998; Borgault et al, 2000; Castellanos et al, 2001; Ohlschlager et al, 2003). El reconocimiento de epítopos para células T ayuda a entender la forma en que el MHC I y II, maquinaria de procesamiento de antígeno (APM), y los defectos moleculares permiten que las células tumorales escapen del reconocimiento de las células T (Seliger et al, 2000; O'Brien y Savería, 2002).

IV.- EL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD.

El complejo principal de histocompatibilidad (MHC del ingles mayor histocompatibility complexe) es una región de genes muy polimórficos (Fig. 8) los cuales producen proteínas que se expresan en las superficies de las células nucleadas de los animales. Las moléculas MHC fueron descubiertas en los años 50's, cuando se observó que personas que recibieron transfusiones sanguíneas o que estuvieron embarazadas varias veces, tenían anticuerpos en su suero que reaccionaban contra glucoproteínas de la membrana a las cuales llamaron antígeno leucocitarios humanos (HLA), término que se usa como un sinónimo de MHC en humanos(Fig. 8). Después se observó que al incubar juntos leucocitos de dos individuos no relacionados, las células T de cada uno reaccionan fuertemente contra proteínas HLA expresadas por el otro, siendo las proteínas HLA los blancos principales de las reacciones inmunitarias celulares que causan el rechazo de tejidos transplantados entre individuos. Las proteínas HLA actúan como marcadores inmunógenos que distinguen a las células de cada persona y constituyen la principal barrera de la histocompatibilidad (Abbas et al, 2000). Las proteínas codificadas por el MHC se denominan moléculas del MHC o antígenos del MHC, y existen 2 tipos de estas moléculas: las de Clase I y las de Clase II. Estas moléculas están asociadas a la membrana celular de células presentadoras de antígeno (APC) (Janeway et al, 2001). La función principal de las moléculas del MHC es atrapar fragmentos (péptidos) de proteínas extrañas, formando complejos que pueden ser reconocidos por los linfocitos T. Las proteínas clase I y II se codifican por genes separados, pero están estrechamente vinculados en evolución y estructura similar en muchos aspectos (Aultman et al, 1999; Roitt et al, 2001).

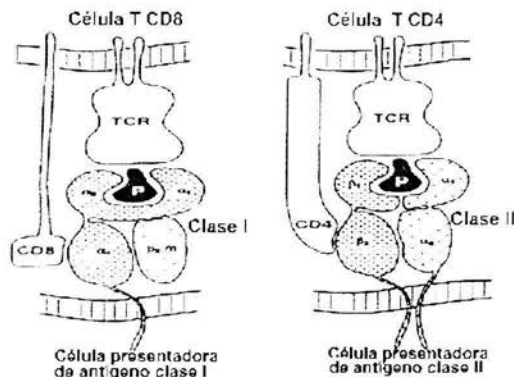


Figura 4.- Moléculas clase I y Clase II del MHC, presentando un péptido (antígeno), reconocidas por el TCR de un linfocito CD8+ y CD4+ respectivamente (Tomado y modificado de Marsh et al, 2000).

IV.I.- MOLECULAS DEL MHC.

Moléculas clase I.

Las moléculas clase I están formadas por 2 cadenas polipeptídicas separadas, una cadena alfa o pesada, codificada por el MHC en el brazo corto del cromosoma 6 para dar lugar a una proteína de aproximadamente 44 kilodaltones (kD); y una cadena beta 2 microglobulina no codificada por el MHC de 12 kD codificada en el cromosoma 15. La cadena alfa está formada por tres dominios: alfa 1, alfa 2 y alfa 3 (Stites et al, 2000) que forman juntos un polipéptido central de aproximadamente 44 kD y un oligosacárido; unida a la parte extracelular de la cadena alfa por enlaces no covalentes se encuentra la cadena beta 2 microglobulina. El extremo amino terminal del polipéptido y el oligosacárido, se extienden en el medio extracelular, un segmento hidrofóbico corto atraviesa la membrana, y el extremo carboxilo terminal con 30 aminoácidos se extiende en el citoplasma (Abbas et al, 2000). La beta 2 microglobulina es mas pequeña, con sólo un dominio plegado, se enlaza a la membrana sólo indirectamente a través de su vinculación con la cadena alfa (Fig. 5 y 6); esta vinculación es crítica para estabilizar la molécula de clase I y para facilitar su transporte a la superficie celular. Las proteínas del MHC I se expresan por todas las células somáticas y tienen la función de presentar antígenos a las células T CD8 (Stites et al, 2000).

Moléculas clase II.

Una molécula clase II está formada por las cadenas polipeptídicas llamadas alfa y beta, que son de tamaño similar y están anclados en la membrana de superficie en sus terminales carboxilo. Las regiones extracelulares de las cadenas alfa y beta de clase II se pliegan individualmente para formar un par de dominios globulares, designados alfa 1 y alfa 2 o beta 1 y beta 2 respectivamente (Fig. 5). Las proteínas MHC-II se expresan únicamente por macrófagos, linfocitos B y Th, y son necesarias para la presentación de antígenos a CD4 (Abbas et al. 2000).

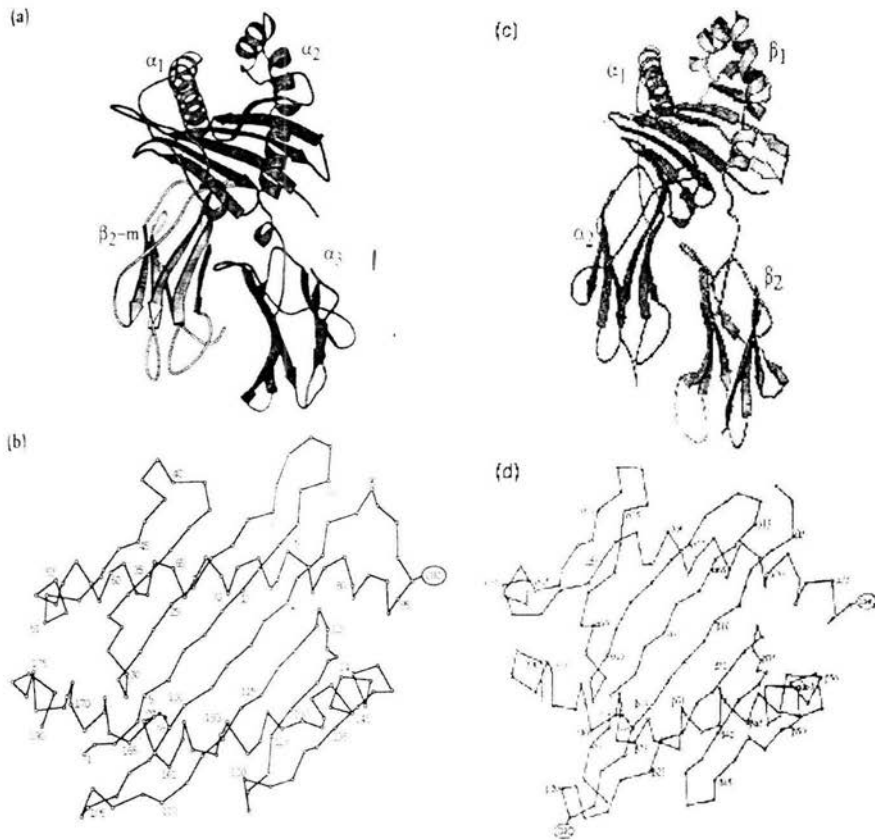


Figura 5.- En la figura se muestra de el lado izquierdo una (a) representación tridimensional de una molécula MHC-I, (b) esquema superior de la molécula MHC-I, mostrando los sitios donde se une al péptido; En el lado derecho se muestra un (c) esquema tridimensional de una molécula clase MHC-II, (d) vista superior de la molécula MHC-II, obsérvense las diferencias entre las conformaciones de una MHC-I y una MHC-II (Tomado de Marsh et al, 2000).

V.- PROCESAMIENTO Y PRESENTACION DE ANTIGENOS POR MOLECULAS MHC-I.

Para ser reconocidos como antígenos, las proteínas extrañas deben transformarse en péptidos y unirse a moléculas del MHC para presentarse en la superficie de las células (Fig. 6). En la década de los 90's el procesamiento de antígenos por MHC I fue bien caracterizado. La proteína antigénica proveniente de un agente extraño o de la propia célula debe estar accesible en el citosol para ser degradada por un complejo multienzimático denominado proteasoma, el cual degrada a las proteínas en fragmentos peptídicos cortos (8-10 aminoácidos) que son translocados dentro del lumen del retículo endoplásmico por los transportadores asociados con el procesamiento de antígeno (TAP's) que forman un heterodímero (TAP-1-TAP2) codificado en el MHC (brazo corto del cromosoma 6) y cuya función se asocia en la selección de péptidos con secuencia específica en el citosol, para ser bombeados al interior del retículo endoplásmico (RE). Una pequeña parte de los péptidos transportados, se unirán a la cadena pesada de la molécula MHC-I en el interior del RE, en donde otras moléculas accesorias como son: las tapasinas, calnexinas, calreticulinas y/ o ER60, pueden mostrar actividad para ligar péptidos y estabilizar a las moléculas MHC clase I durante el plegamiento y ensamble, y facilitar esta unión con el péptido (Seliger et. al. 2000). El complejo formado por el péptido y la molécula MHC-I sale del RE vía el camino secretor a la superficie celular (Ritz et. al. 2001; Gromme y Neefjes, 2002). Los fragmentos antigénicos son expuestos a los linfocitos T CD8+, a esto se le llama presentación de antígeno (Fig. 4, 6 y 7) y las células capaces de llevar esta función se les denomina células presentadoras de antígeno (CPA) (Rojas Espinosa, 1996; Roitt et al, 2001). Una CPA puede presentar varios antígenos diferentes simultáneamente, uno en cada una de sus múltiples proteínas. Existen caminos alternativos de procesamiento y presentación de antígenos, los cuales puede tener un importante papel en la respuesta inmune contra bacterias intracelulares y en inducción respuesta por linfocitos T citotóxicos (LTC) (Gromme y Neefjes, 2002).

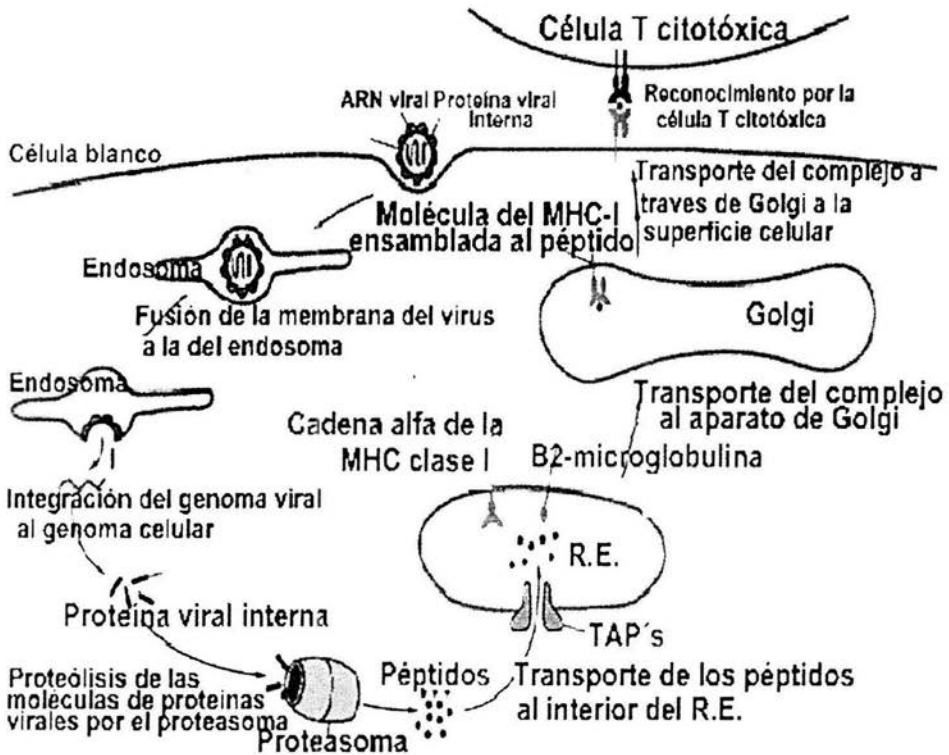


Figura 6.- Internalización, procesamiento del virus, y presentación del antígeno vía moléculas Clase I. (Tomado y modificado de www.bio.pvc/curso/bio145ab/b14505/51doo5.htm).

V.I.- UNION DEL PEPTIDO A LA MOLECULA MHC.

Los péptidos antigénicos se unen a las moléculas MHC-I en el surco formado por los dominios alfa1 y alfa 2 de la cadena pesada (Fig. 7); mientras que en la molécula clase II del MHC, en el surco formado por los dominios alfa1 y beta1. En ambos casos los dominios adyacentes se combinan para crear una lámina plegada beta de ocho tiras, que actúa como el piso del sitio de enlace y sobre el cual se colocan dos hélices alfa orientadas de manera adyacente y casi paralela entre sí, de modo que constituyen dos paredes con un surco entre ambas. Los péptidos se enlazan en el interior del surco en una conformación extendida, a través de enlaces no covalentes (Roitt et al, 2001). La estructura del surco determina los tipos de péptidos que puede enlazar (Fig. 5 y 7). El surco de una molécula clase I está delimitado en ambos extremos y por tanto sólo puede acomodar péptidos que tienen una longitud de 8 a 10 a.a, los extremos de la hendidura de enlace clase-II son más abiertos, lo cual permite que estas proteínas se enlacen a péptidos un tanto más largos e irregulares de 8 a 12 a.a (Janeway et al, 2001). La especificidad de enlace en las proteínas de clase I y de clase II se determina principalmente por los residuos de aminoácidos que constituyen el piso de la lámina beta (Fig. 7) y las paredes de la hélice alfa del surco de enlace del péptido: éstos crean bolsas diminutas con características espaciales y químicas singulares que pueden enlazar características complementarias en un péptido, como una cadena de aminoácidos en una posición particular (Janeway et al, 2001; Marsh et al, 2000). El enlace de péptidos por una proteína del MHC, es un tanto más selectiva, pero mucho menos específica, que el enlace de antígeno por el receptor del linfocito T (TCR) o por una proteína inmunoglobulina. Toda vez que una célula simple puede expresar proteínas clase I en un orden de 10^6 en su superficie, por lo que cada célula tiene el potencial de presentar muchos péptidos a la vez (Stites et al, 2000).

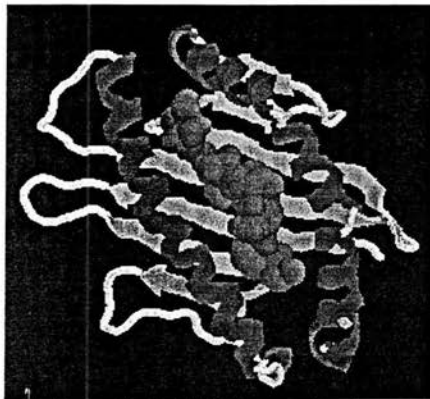


Figura 7.- Vista superior de la molécula MHC-I presentando un péptido en el centro de la hendidura (Tomado de www.guanajuato.gob.mx/ssg/cogusida/elvirus.htm).

Un antígeno se unirá a una molécula MHC-I o a una molécula MHC-II dependiendo del origen del antígeno el cual se puede producir por lo regular, a través de dos vías: La vía endocítica (clase II) y la vía citosólica (clase I) (Abbas et al, 2000; Gromme et al, 2002).

La vía endocítica: Cuando el antígeno proviene o es capturado del exterior de la célula y es llevado a su interior (Fig. 10), por endocitosis o por pinocitosis, como el caso de un macrófago, que captura un antígeno, lo capta en vesículas endosómicas, en donde se desdoblan gradualmente por exposición a un pH ácido y a enzimas proteolíticas celulares. Los péptidos generados por la vía endocítica varían ampliamente en secuencia y en longitud y se unen a moléculas MHC-II presentadas a linfocitos CD4+ (Stites et al, 2000).

La vía citosólica: Cuando el antígeno deriva de patógenos que viven dentro (endógenos) de células infectadas como es el caso de los virus, dependen de la maquinaria sintética de proteínas del huésped. Algunas bacterias y parásitos intracelulares que sintetizan sus propias proteínas, en este caso la degradación de la proteína se produce en el citosol dentro de complejos multi enzimáticos llamados proteasomas. Cuando el péptido se ha unido a una molécula MHC-I, este complejo es llevado a la superficie celular para su presentación a T CD8+ (Fig. 6 y 7). Todos los componentes de esta vía se expresan en casi todos los tipos celulares humanos nucleados, lo que asegura que cualquier célula infectada puede presentar antígenos a las células T y combatir al patógeno. Algunos patógenos son procesados a través de ambas vías. La segregación entre los dos caminos de procesamientos de antígenos y presentación no es absoluta (Stites et. al. 2000).

VI.-DIVERSIDAD DEL MHC.

Existen genes cuyas secuencias pueden variar frecuentemente, y al menos 1 % de los individuos pueden expresar un gen que difiera del gen homólogo del resto de los miembros de la población, tales genes se dice que son polimórficos y cada variante común de un gen polimórfico presente en la población se llama alelo. Genes similares se encuentran en todos los vertebrados, en el complejo mayor de histocompatibilidad el cual agrupa los genes polimórficos que ayudan a percibir un tejido como propio o extraño y son llamados genes de histocompatibilidad; se encuentran agrupados en una sola área del genoma. Debido a que en humanos se expresan en leucocitos se les conoce como antígenos leucocitarios humanos (HLA), y se denominan clase I: A, B, C, y Clase II: DP, DQ, DR (Fig. 8) (Abbas et al, 2000).

Una persona hereda normalmente dos copias de cada sitio génico (uno de cada progenitor) y por lo tanto porta un total de seis sitios de clase I y seis de clase II, además hay alelos múltiples distintos en cada sitio en la población humana, es decir, hay muchas versiones alternas de cada gen del MHC que producen proteínas con secuencias ligeramente diferentes. Hay cuando menos 250 alelos HLA-A conocidos, 490 alelos HLA-B y 119 alelos HLA-C (Marsh et al, 2000). Los alelos son designados actualmente con nomenclatura de 4 números, por ejemplo HLA-A*0201; esta nomenclatura puede compararse a la respectiva secuencia conocida en la vieja designación aun en uso, basada en serología, de solo dos caracteres, por ejemplo: HLA-A2 que incluye a los alelos desde A*0201 hasta A*02012 (Bodmer et al, 1994; Gómez-Casado et al, 1997). Los genes del MHC son los más polimórficos del sistema que se conocen, y cada variedad alélica tiene sus propiedades de enlace de péptidos propias. Un individuo puede heredar alelos distintos de la mayoría y esto aumentar la variedad de péptidos antigénicos distintos que pueden presentarse a las células T. Este polimorfismo aumenta la probabilidad de que cuando menos algunos individuos tengan la capacidad de presentar antígenos de cualquier patógeno nuevo que pueda encontrarse y así ayudar para asegurar la supervivencia de la población en general. El HLA-C se expresa generalmente en menor cantidad que HLA-A y HLA-B. Algunos genes de la región HLA no participan en la presentación de antígeno como es el caso de los genes para las citocinas del factor alfa y beta de necrosis tumoral, los factores del complemento C2 C4, B y F, y proteínas de choque térmico, aunque se desconoce el significado de estas vinculaciones (Marsh et al, 2000).

El número total de alelos del MHC presentes en cada cromosoma se llama haplotipo del MHC (Abbas et al. 2000), los alelos más frecuentes en la población mexicana son: HLA-A2, -A24, -A28, -B35 y -B39 (De Leo et al, 1997; Gómez-Casado et al, 1997; Weckman et al, 1997; Cerda Flores et al, 2002; Vargas-Alarcón et al, 2003). La forma de obtener información de la estructura de moléculas de MHC y sus receptores, es analizando con rayos X los cristales del MHC. Otros métodos son: 1) aislamiento bioquímico y estudio de asociaciones naturales de péptidos y MHC; y 2) estudios con ligandos de péptidos sintéticos, ya que se conocen muchos de los aminoácidos que se unen a moléculas MHC-I (Rammensee et al, 1995).

Los mecanismos por los cuales el cáncer escapa del sistema inmune puede envolver deficiencias simples o combinadas de diferentes componentes de procesamiento y presentación de antígenos por MHC clase I, las cuales pueden estar asociada con el HPV o con el fenotipo HLA (Morera et al. 1997, 1999; Silva 1999), y no con el grado o estadio del tumor (Hildesheim et al. 2002; Ritz et al. 2001).

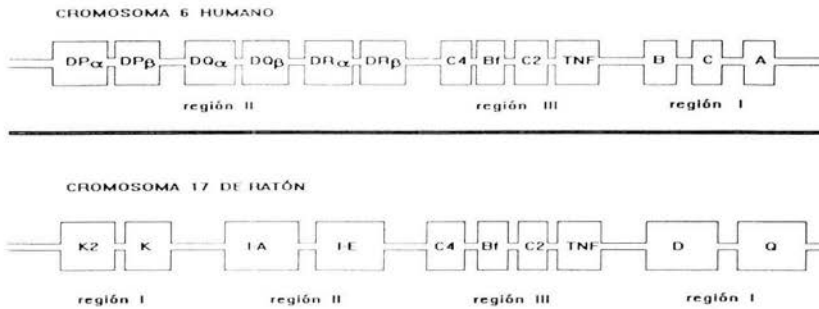


Figura 8.- El MHC en el cromosoma 6 humano está dividido en tres regiones y cada una de ellas contiene varios genes, heredados del padre y la madre. El conjunto de los genes de las regiones I y II representa el haplotipo de un individuo. Los genes de la región III no codifican para moléculas de histocompatibilidad. El MHC del cromosoma 17 del ratón se divide en una forma similar (Tomado de www.fmedic.unr).

VII.- PREDICCIÓN DE EPITOPES ANTIGENICOS.

Existen programas computarizados que analizan toda la secuencia de una proteína en busca de los sitios de anclaje más probables, formando secuencias de péptidos de 8-11 aminoácidos, que según sus propiedades teóricamente serán más antigénicos y de alta afinidad para ciertos alelos, estos programas se basan en información detalladamente descrita, de las reglas que gobiernan la interacción de péptidos con moléculas MHC-I (Fig. 5), el conocimiento acerca de los sitios de anclaje específicos para proteasoma, la producción de fragmentos peptídico por proteasas, y el transporte de los péptidos al RE (Parker et al, 1994; Rammensee et al, 1999) la estructura de los péptidos obtenida por cristalografía, sitios de unión, matrices o redes neurales artificiales (ANNs)(Rammensee et al, 1995; Nussbaum et al, 2003;). Para predecir epitopes es importante no considerar solo el sitio de unión básico para la MHC sino la posición del ancla, ya que esto puede contribuir considerablemente a la interacción con la molécula MHC(Fig. 7). Otros estudios detallados sobre ligandos muestran que algunos residuos en cierta posición en el péptido pueden ocasionar detrimento para ligar (Ruppert et al, 1993; Kast et al, 1994; Parker et al, 1994). Aunque las diferentes formas de procesamiento y presentación de antígenos aun no pueden ser simuladas por computadora completamente, ya que se desconocen muchos de los mecanismos intracelulares, existen herramientas como estos programas que sirven para predecir epitopes para linfocitos T con relevancia inmunológica en enfermedades infecciosas y cáncer.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El cáncer cérvicouterino es la primera causa de muerte en mujeres por cáncer en México, convirtiéndolo en un grave problema de salud, principalmente a la etapa más productiva (20-60 años)(www.SSA.gob.mx). En consecuencia, es de primordial importancia realizar estudios que aporten avances en el diagnóstico, prevención y tratamiento oportuno de la enfermedad. Actualmente la inmunología tumoral es un área de investigación que a través de la identificación de antígenos virales y tumorales y el monitoreo de la respuesta inmune hacia ellos, abre nuevas posibilidades para generar terapias específicas contra el desarrollo del cáncer (Castellanos et al, 2001; Rudolf et al, 2001). La alta asociación del virus de papiloma humano (HPV) con el desarrollo de esta neoplasia (aproximadamente 99.7%), especialmente HPV-16 y 18 (Walboomers et al, 1999), ha llevado a proponer que las proteínas derivadas de estos virus sean candidatos idóneos para presentarse como epitopes tumorales. La sobre expresión de las proteínas oncogénicas E6 y E7 de estos tipos virales es un requisito indispensable para mantener el estado transformado de las células malignas (Hubert et al, 2001), lo cual hace que estas proteínas sean idóneas para ser utilizadas como antígenos en terapias antitumorales (Da silva et al, 2001; Galloway et al, 2003). Por otro lado se sabe que existen variantes intratípicas de los diferentes tipos de HPV, las cuales tienen diferente potencial oncogénico y se distribuyen de diferente forma en todo el mundo (Yamada et al, 1997; Bernard et al, 1994; Lizano et al, 1997). Asimismo, se sabe que los linfocitos T CD8+ reconocen péptidos antigénicos derivados de proteínas virales procesadas endógenamente y presentadas por moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I en la membrana de células tumorales y células infectadas con virus, y que en nuestro país la presencia de variantes asiático americanas AA1 y AA2 de los HPV-16 y 18 se encuentra en proporciones similares a la europea (Lizano et al, 1997; Berumen et al, 2001), el presente trabajo tuvo como objetivo el de identificar péptidos antigénicos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 y 18 y de las variantes AA1 y AA2 para los alelos HLA-A2 y B35 (dos de los alelos de más alta frecuencia en la población Mexicana)(De Leo et al, 1997; Silva et al, 1999; Wheckman et al, 1999; Cerda Flores et al, 2002; Vargas Alarcón et al, 2003) con la finalidad de proponer alternativas terapéuticas contra el cáncer cérvicouterino.

HIPOTESIS.

Tomando en consideración que las moléculas MHC clase I presentan péptidos antigénicos derivados de proteínas virales procesadas endógenamente a los linfocitos T CD8+ para estimularlos a eliminar a las células cancerosas y células infectadas con virus. A través de la estimulación de linfocitos T CD8+ de pacientes con infección por HPV y con cáncer cervical, con péptidos de la proteínas E6 y E7 de HPV-16 y 18, se podrán identificar a los péptidos antigénicos contra el HPV los cuales se podrán proponer en el desarrollo de terapias para mujeres con cáncer cervical e infección con HPV.

OBJETIVO GENERAL.

Identificar a los péptidos antigénicos de las proteínas E6 y E7 de los HPV-16 y 18 y de sus variantes Asiático Americanas AA1 y AA2 para los alelos HLA -A2 y B35 del MHC-I.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- A) Obtener muestras sanguíneas de pacientes con cáncer cervical.
- B) Tipificar el HLA clase I de los pacientes de estudio.
- C) Tipificar el HPV presente en las muestras tumorales.
- D) Predecir y obtener los péptidos derivados de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 y 18 y de las variantes AA1 y AA2 con mayor afinidad para los alelos HLA-A2 y B35.
- E) Evaluar la respuesta proliferativa de linfocitos T de pacientes con infección con HPV y con cáncer cervical con los péptidos obtenidos.

METODO.

PREDICCIÓN DE PEPTIDOS ANTIGENICOS DE LAS PROTEINAS E6 Y E7 DE HPV-16 Y 18.

La predicción de péptidos de las proteínas E6 y E7 del Virus del Papiloma Humano tipo 16 y 18 así como de sus VAA-1 y -2 con mayor afinidad para las moléculas HLA-A2 y HLA-B35, se realizó mediante el programa de predicción por algoritmos que está disponible vía internet (bimas.dcrf.nih.gov/molbio/hla_bind/). El tamaño de los péptidos predichos fue de 9 aminoácidos (tamaño promedio de los péptidos que se unen a las moléculas HLA clase I) (Kast et al, 1994). Como control positivo de activación para el alelo HLA-A2 se utilizaron a los péptidos antigénicos: GILGFVFTL (el cual ha sido reportado como un epítope antigénico del virus de la gripe en humanos (Bednarek et al, 1991; Kast et al, 1994) y LLTEVETYV derivados de la proteína M de Influenza-A; y para el alelo HLA-B35 se utilizó a los péptidos: QARQMVQAM y GAKEISLSY derivados también de la proteína M de Influenza-A, la predicción se hizo mediante el mismo programa de algoritmos vía internet.

SINTESIS DE PEPTIDOS.

Los péptidos que tuvieron el mayor tiempo de disociación promedio para las moléculas HLA-A2 y HLA-B35 fueron sintetizados por métodos automatizados (Gausephol et al, 1990). Brevemente, para ello se utilizó un sintetizador automático (Applied Biosystems 2.01, Becton Dickinson y Co. Mountain View, C. A.). En una columna de fase sólida y apartir del aminoácido C-terminal, se incorporaron los demás aminoácidos mediante repetición de ciclos con desprotección de los aminoácidos de enlace, después se desprendieron los péptidos de la resina por tratamiento con ácido trifluoroacético. Los péptidos fueron liofilizados y disueltos en solución salina de fosfatos y almacenados a -70 °C en alícuotas para ser usados posteriormente.

OBTENCION DE MUESTRAS DE SANGRE PERIFERICA Y DE BIOPSIAS TUMORALES DE PACIENTES CON CANCER CERVICO UTERINO.

En dos tubos de vidrio vacutainer con anticoagulante (ACD) (Becton Dickinson, USA) se recolectaron aproximadamente 18 ml de sangre periférica, y por medio de las técnicas de colposcopia o enconación se obtuvieron las biopsias de tejido tumoral de las pacientes con cáncer cérvicouterino. Estos procedimientos se llevaron acabo por personal capacitado de las áreas de Ginecología del Instituto Nacional de Cancerología y del Hospital de Zona Gustavo Baz Prada (Cd. Neza). El material biológico se trasladó con mucho cuidado, al laboratorio de INMUNOBIOLOGÍA de la FES-Zaragoza, para su procesamiento y análisis.

TIPIFICACION DEL HLA CLASE I POR MICROCITOTOXICIDAD.

Se tomaron 2 ml de sangre periférica con anticoagulante ACD, se colocaron en un tubo de vidrio de 5ml con tapa de plástico, y se agregaron 100 µl de una suspensión de anticuerpos monoclonales αCD3 unidos a perlas magnéticas (One Lambda Inc, USA). Se colocó el tubo en un agitador horizontal por tres minutos, luego se agregaron 2 ml de solución activadora de la reacción (One Lambda Inc, USA) y se homogenizó la mezcla. En seguida el tubo se colocó en un magneto miniMACS (Milteny Biotec, Germany) durante tres minutos. Posteriormente, sin retirar el magneto, el sobrenadante fue sustraído con una pipeta serológica. Los linfocitos adheridos a la pared del tubo fueron lavados 2 veces con PBS durante 1 minuto y con 2ml de PBS cada vez. Finalmente los linfocitos T CD3 adheridos a la pared del tubo se resuspendieron en 250 µl de RPMI-1640, y se distribuyeron 2 µl de la suspensión en cada uno de los pozos de una placa de Terasaki de 96 pozos (One Lambda Inc, USA) conteniendo diversos antisueros anti-HLA-I. La placa se agitó ligeramente por un minuto para homogenizar, cuidando que no se derramara el contenido de los pozos, y después se dejó incubar por una hora a temperatura ambiente en la oscuridad. Después de este tiempo se agregaron 5 µl de revelador (naranja de acitidina-Bromuro de etidio, One Lambda USA) a cada pozo, se agitó suavemente y se dejó incubar por 5 minutos en la oscuridad. Finalmente la placa se observó en el microscopio de fluorescencia para evaluar la citotoxicidad y determinar la reacción positiva de los antisueros, para obtener el haplotipo HLA clase I de cada paciente (Bodmer et al, 1977; Boyum, 1968; Terasaki y Mc-Clelland, 1964; Terasaki et al, 1978).

OBTENCION Y CULTIVO DE LINFOCITOS T CITOTOXICOS.

La muestra de sangre (9 ml. Aprox.) se centrifugó a 2900 g, durante 5 minutos. Se obtuvieron dos fases, la fase superior (el plasma) fue retirada y colocada en un tubo de vidrio estéril con tapa; con ello se eliminaron grasas, proteínas, plaquetas y otros componentes de la sangre que se encuentran en el plasma. El tubo fue etiquetado y almacenado en un refrigerador. La fase inferior que contenía el paquete celular fue trasvasada a un tubo Falcón de 50 ml donde se resuspendió perfectamente con 30 ml de medio RPMI-1640, se centrifugó a 2900 g, durante 5 min y se obtuvieron dos fases: la fase superior fue desechada y la fase inferior (el botón celular) fue resuspendida en 30 ml. de RPMI-1640, y nuevamente se centrifugó a 2900 g, durante 5 min. El sobrenadante fue desechado y el botón celular fue resuspendido en 6 ml de medio RPMI-1640. Esta suspensión celular fue adicionada lentamente, a través de las paredes de los tubos, en dos tubos conteniendo cada uno 2.5 ml de un gradiente de Ficoll (Linfograde Microlab, Mex.) con una densidad de 1.077 g/ml para separar linfocitos. A continuación, los tubos fueron centrifugados durante 40 minutos a 1450 g. Posteriormente, la banda blanca, conteniendo a los linfocitos, fue retirada lentamente del gradiente y los linfocitos fueron lavados con medio RPMI-1640 durante tres veces mediante centrifugación a 2900 g, durante 3 minutos cada uno.

Finalmente el botón celular se resuspendió en 5 ml de medio de cultivo ISCOVE`S modificado con 10 % de Suero Fetal de Bovino, 4 mM de L-glutamina, 1 mM de Piruvato de Sodio, 20 µM de 2-Mercaptoetanol, y una mezcla de Aminoácidos no esenciales (Gibco BRL, USA) e IL-2 recombinante humana (Sigma, USA) a una concentración de 20 U/ml (De Leo et. al. 1997; Evans et. al. 1997; Weckman et. al. 1997).

TIPIFICACION DEL HPV DE LAS BIOPSIAS DE TUMORES DE CANCER CERVICAL.

Por otra parte las biopsias se lavaron con PBS estéril y se fragmentaron en pequeñas porciones, los fragmentos se colocaron en un tubo Eppendorf con 400 µl de amortiguador de lisis, constituido por NaCl a 100 mM, Tris a 10 mM, EDTA 25 mM a un pH=8.0 y SDS al 0.5% y se almacenaron hasta su utilización.

Posteriormente se descongelaron y se adicionaron 5 µl de proteinasa K (10 mg/ml, SIGMA USA) y se incubaron toda la noche a 37 °C. El tejido disgregado fue homogenizado por agitación y se adicionaron 40 µl de Tris-Base 1M, pH 9.4, 400 µl de fenol saturado en agua y se agitó vigorosamente con ayuda de un agitador. Se centrifugo 10 minutos a 11600 g, se extrajo la fase acuosa y se transfirió a un tubo nuevo donde se le agregó un volumen igual de cloroformo: alcohol isoamílico (25:1), se agitó vigorosamente y se centrifugó por 10 minutos a 11600 g. Se extrajo la fase acuosa y se transfirió a otro tubo, donde se adicionó la mitad del volumen de acetato de amonio 7.5 M y se homogenizó, posteriormente se agregaron 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío y se mezcló por inversión. Después de centrifugar durante 10 minutos a 7200 g y a 4 °C, el botón se enjuagó con etanol al 75%, se centrifugó 10 minutos a 7200 g a 4 °C y se eliminó el sobrenadante. Finalmente el tubo se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos (casi a sequedad), posteriormente el botón se disolvió con agua ultra pura en un volumen de 1:4, se incubó por lo menos 30 min a 56 °C, se centrifugó a 2300 g, por 10 min a 4 °C y el sobrenadante obtenido fue vertido a un tubo nuevo para su cuantificación por espectrofotometría. El HPV en las muestras de DNA tumoral fue tipificado mediante PCR, utilizando los oligonucleótidos MY09 y MY11 descritos por Manos et al, (1989) y utilizando digestión enzimática con la enzima de restricción RsaI para obtener el patrón de fragmentos de referencia (RFLP) para cada uno de los HPV-16 y 18 (Bernard et al, 1994).

CULTIVO DE LINFOCITOS T CON PEPTIDOS SINTETICOS DERIVADOS DE LAS PROTEINAS E6 Y E7 DE EL HPV-16 Y 18.

Una vez tipificado el HLA, se contaron los linfocitos T utilizando una cámara de Neubauer. Se eligieron los péptidos para cada uno de los alelo HLA-A2 ó B35. Los linfocitos se sembraron por triplicado a una concentración de 100 000 linfocitos por cada pozo y con cada uno de los péptidos a una concentración de 25 µM. a un volumen final de 200 µl con medio ISCOVE`S modificado, en una placa de 96 pozos. Además se colocaron tres pozos sólo con linfocitos T y medio ISCOVE`S como control negativo y otros linfocitos T en presencia de 20 U/ml de IL-2 ó 1 µl de fitohemaglutinina (Microlab, México) como controles positivos.²⁹

Los demás pozos fueron suplementados con medio de cultivo hasta un volumen total de 200µl.

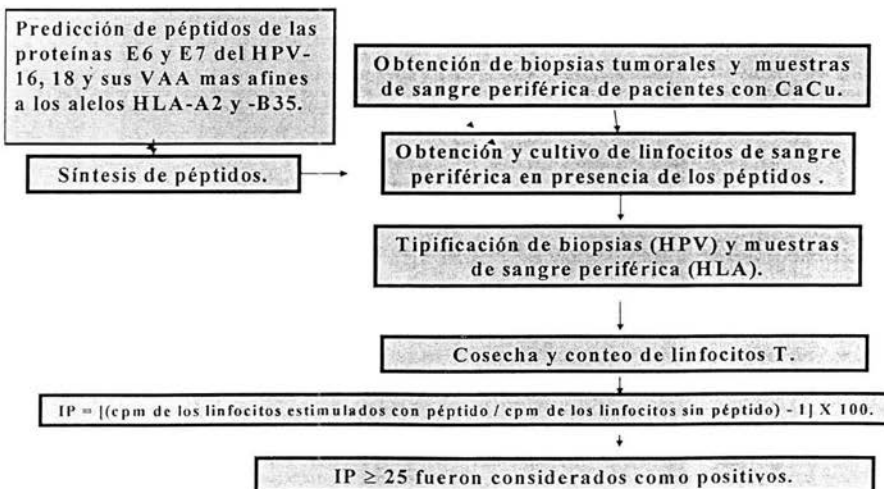
MARCAJE Y CONTEO DE PROLIFERACION DE LINFOCITOS T CULTIVADOS CON PEPTIDO.

Después de 96 hrs. de cultivo, los linfocitos T se marcaron con 2 µCi de timidina tritiada (Dupont, USA) por pozo y se cultivaron durante 24 hrs más (Castellanos et. al. 2001). La incorporación de timidina por las células en proliferación fue analizada a través de una cosechadora de células marca Brandel modelo MH-12 USA, después de varios lavados con agua destilada para eliminar el exceso de timidina. Los núcleos celulares cosechados en papel filtro de fibra de vidrio, se dejaron secar a temperatura ambiente antes de adicionarlos a viales Mini poly -Q (Beckman, USA) que contenían 2 ml de líquido de centelleo (Beckman Counter USA). Cada vial fue analizado en un contador automático (Beckman modelo LS 6,500 USA). Finalmente se obtuvo el índice de proliferación (IP) inducido por cada uno de los péptidos mediante la siguiente formula:

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

Los péptidos que indujeron IP mayores a 25 fueron considerados antigénicamente positivos al ensayarse en los linfocitos de cada individuo bajo estudio.

ESQUEMA GENERAL DEL METODO.



RESULTADOS.

1.- PREDICCIÓN, SÍNTESIS Y OBTENCIÓN DE PEPTIDOS DERIVADOS DE LAS PROTEÍNAS E6 Y E7 DE HPV-16 Y HPV-18 Y DE LAS VARIANTES ASIÁTICO AMERICANA (AA1 Y AA2) DE LA PROTEÍNA E6 DE HPV16 Y HPV 18.

Mediante el uso del programa algorítmico vía Internet: bimas.dcrf.nih.gov/molbio/hla_bind/, se predijeron péptidos de 9 aminoácidos con alta afinidad para las moléculas HLA-A2 y B35 (Tabla 1), a partir de las proteínas E6 y E7 del HPV-16 y HPV-18; así como de las variantes AA1 y AA2 de la proteína E6 de HPV16 y HPV-18 respectivamente que han sido descritas en México (Berumen et al, 2001; Lizano y García-Carranca, 1997). El mismo procedimiento se realizó para obtener péptidos derivados de la proteína Matriz (M1) de influenza-A con alta afinidad para las moléculas HLA-A2 y HLA-B35, los cuales fueron usados como control positivo para evaluar la activación de los linfocitos T de pacientes con HPV y/o cáncer cérvico uterino (CaCu). Se utilizó la proteína M1 de Influenza-A por ser muy antigénica y altamente conservada entre las cepas del virus de la gripe que infecta al humano. Para su síntesis, se eligieron los péptidos que tuvieron el tiempo medio de disociación más elevado de acuerdo con el programa de algoritmos, así como algunos péptidos que ya han sido descritos en la bibliografía por ser muy antigénicos (Tabla 1).

| ALELO HLA | PROTEÍNA | TIPO DE HPV | POSICIÓN EN LA PROTEÍNA | SECUENCIA | TIEMPO ½ DE DISOCIACIÓN (min) | No DE PÉPTIDO |
|-----------|------------------|----------------|-------------------------|-----------|-------------------------------|---------------|
| HLA-A2 | E6 | HPV-16 | 18 | KLPQLCTEL | 74.768 | 1 |
| HLA-A2 | E6 | HPV-16 | 21 | QLCTELQTT | 17.14 | 2 |
| HLA-A2 | E6 | HPV-16 | 79 | KISEYRHYC | 53.914 | 3 |
| HLA-A2 | E6 | HPV-16 VAA1 | 18 | KLPHLCTEL | 74.76 | 4 |
| HLA-A2 | E6 | HPV-16 VAA1 | 79 | KISEYRYYC | 53.91 | 5 |
| HLA-A2 | E6 | HPV-16 | 37 | CVYCKQQLL | 5.98 | 6 |
| HLA-A2 | E7 | HPV-16 | 86 | TLGIVCPIC | 2.037 | 7 |
| HLA-A2 | E7 | HPV-16 | 7 | TLHEYMLDL | 201.447 | 8 |
| HLA-A2 | E7 | HPV-16 | 11 | YMLDLQPET | 375.567 | 9 |
| HLA-A2 | E6 | HPV-18 | 13 | KLPDLCTEL | 306.550 | 10 |
| HLA-A2 | E6 | HPV-18 | 40 | ELTEVFEDA | 7.82 | 11 |
| HLA-A2 | E6 | HPV-18 | 36 | KTVLELTFV | 7.77 | 12 |
| HLA-A2 | E7 | HPV-18 | 90 | FLNTLSFVC | 54.34 | 13 |
| HLA-A2 | E7 | HPV-18 | 86 | FQQLFLNTL | 87.078 | 14 |
| HLA-A2 | E7 | HPV-18 | 7 | TLQDIVLHL | 201.447 | 16 |
| HLA-A2 | M1- INFLUENZA | | 58 | GILGFVFTL | 2666 | 17 |
| HLA-A2 | M1- INFLUENZA | | 3 | LLTEVETYV | 550 | 18 |
| HLA-B35 | E6 | HPV-16 | 15 | RPRKLPQLC | 12 | 19 |
| HLA-B35 | E6 | HPV-16 | 118 | CPEEKQRHL | 12 | 20 |
| HLA-B35 | E6 | HPV-16 | 11 | DPQERPRKL | 40 | 21 |
| HLA-B35 | E6 | HPV-16 VAA1 | 77 | YSKISEYRY | 30 | 22 |
| HLA-B35 | E7 | HPV-16 | 5 | TPTLHEYML | 20 | 23 |
| HLA-B35 | E7 | HPV-16 | 49 | RAHYNIVTF | 6 | 24 |
| HLA-B35 | E7 | HPV-16 | 30 | DSSEEEDEI | 6 | 25 |
| HLA-B35 | E6 | HPV-18 | 6 | DPTRRPYKL | 20 | 26 |
| HLA-B35 | E6 | HPV-18 | 113 | NPAEKLRLH | 40 | 27 |
| HLA-B35 | E6 | HPV-18 | 110 | KPLNPAEKL | 40 | 28 |
| HLA-B35 | E6 | HPV- 18VAA2 | 72 | YSRIRELRY | 30 | 29 |
| HLA-B35 | E7 | HPV-18 | 5 | KATLQDIVL | 6 | 30 |
| HLA-B35 | E7 | HPV-18 | 3 | GPKATLQDI | 24 | 31 |
| HLA-B35 | E7 | HPV-18 | 78 | SSADDLRAF | 15 | 32 |
| HLA-B35 | MI- INFLUENZA | | 208 | QARQMVMAM | 18 | 33 |
| HLA-B35 | MI- INFLUENZA | | 111 | GAKEISLSY | 36 | 34 |

Tabla -1 Características de los péptidos utilizados en esta investigación. Se muestran los alelos HLA-I para el que fueron predichos, su tiempo medio de disociación, así como el tipo de HPV, la posición en la que se encuentra en la proteína a la que corresponde cada uno de ellos. La columna de la derecha se muestra el número asignado a cada péptido.

2.- HAPLOTIPO DE HISTOCOMPATIBILIDAD HLA CLASE I (HLA-I) DE MUESTRAS SANGUINEAS DE PACIENTES Y DE DONADORAS NORMALES.

En esta investigación se trabajaron 30 muestras de pacientes: 4 que presentaban Infección con virus de papiloma humano (IHPV); 5 con neoplasia intraepitelial (NIC); y 19 con CaCu en diferentes estadios clínicos de la enfermedad (Tabla 2). Las etapas clínicas se determinaron de acuerdo con los parámetros de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO). Las edades de las pacientes de este estudio van de los 17 hasta los 73 años. También se analizó la presencia de HPV 16 y/o HPV 18; y mediante el empleo de ensayos de microcitotoxicidad en linfocitos T CD3+ de sangre periférica, se tipificaron los haplotipos de moléculas HLA-I (A,B,C,) de cada paciente, obteniéndose los resultados mostrados en la tabla 2.

En total se tipificó el haplotipo HLA-I de 85 mujeres mexicanas, de las cuales 42 presentaron el alelo HLA-A2 (51%) y 36 el alelo HLA-B35 (42.3%), seguidos por los alelos A28 con 28.57%, y A24 con 25%, para el alelo HLA-A, y respecto al alelo HLA-B: B39 con 17.9%, B15 con 21.15% y B7 con 17.9%, los cuales coinciden con las frecuencias alélicas reportadas en la literatura para la población mexicana (Long et al, 1991; De Leo et al, 1997; Silva et al, 1999; Vargas-Alarcón et al, 2003) cuya ascendencia puede ser asociada con la frecuencia de estos alelos (Cerdeira-Flores et al, 2002). No obstante debido a la disponibilidad de linfocitos con que se contó, en este estudio únicamente se incluyeron 30 pacientes, de las cuales 20 fueron positivas para el alelo HLA-A2; 18 positivas para el alelo HLA-B35 y 8 positivas para ambos alelos.

| PACIENTE | TIPO DE HPV | ESTADIO CLINICO | EDAD | HLA-I |
|----------|-------------|-----------------|------|---|
| 1 | 18 | IHPV | 35 | A2 , A28, B16, B40(60),Cw3 |
| 2 | 18 | NICI | 40 | A2 , B35 , B60(40), Cw3, Bw6 |
| 3 | ND | IB2 | 28 | A2 , B60 (40), Cw3, Cw7 |
| 4 | 18 | IIA | 32 | A2 , B35 , B16, Cw1, Cw4 |
| 5 | Otro | IB | 37 | A23, B35 , B39, Cw4, Cw7 |
| 6 | Otro | IIB | 45 | A28, A3, B35 , B65,Cw4 Cw8 |
| 7 | ND | IB | 39 | A2 , A24, B35 , B7, Cw4, Cw7 |
| 8 | ND | IIB | 52 | A24(9), A28(68), B16, B35 |
| 9 | 16 | IBI | 54 | A2 , A23(9), B51(5), B7,Cw6 |
| 10 | 18 | IIIB | 49 | A2 , A19, B16, Bw6 |
| 11 | Otro | IB2 | 40 | A24, A28, B35 , B15, Bw4, Cw4 |
| 12 | ND | IB2 | 33 | A2 , B5, Bw6, Bw4 |
| 13 | 16 | IIB | 73 | A2 , B52(5), B35 , Cw4 |
| 14 | 16 | IIB | 44 | A2 , A28, B35 , B15, Bw4,Cw4 |
| 15 | Otro | NICI | 32 | A24(9),A28(68), B35 ,B48,Cw4 |
| 16 | 16 | NICII | 26 | A2 ,A24(9),B75(15),Bw6,Cw1 |
| 17 | 16 | ND | 36 | A2 , A10,B5,B15,Bw6,Bw4,Cw3,Cw9 |
| 18 | 18 | IIB | 35 | A19, B35 , Bw4, Cw3 |
| 19 | Otro | AI | 42 | A2 , B15, Bw4, Bw6 |
| 20 | ND | IBI | 50 | A2 , A4, B7, B15, Cw3, Cw7 |
| 21 | 18 | ND | ND | A2 , A28(68), B35 , B48, Cw41 |
| 22 | ND | NICI | 37 | A2 , B7, B41, Bw6 |
| 23 | ND | ND | ND | A2 , B5, B5102, Cw3, Cw9 |
| 24 | ND | NICI | 23 | A24(9),A28(68), B35 ,B48,Cw6 |
| 25 | ND | IHPV | 17 | A24, A19, B35 , B62(15), Cw4 |
| 26 | ND | IHPV | 35 | A3, A19, B35 , Bw6, Cw4 |
| 27 | ND | IHPV | 21 | A2 , A9,B60, B40, Cw3 |
| 28 | 16 | IVB | 73 | A2 , A19, B5, B35 ,Cw3,Cw4 |
| 29 | ND | IBI | 48 | A19, B35 , B16, Cw3, Cw4 |
| 30 | ND | IIB | 55 | A2 , A29(19), B35 , B51(5), Cw4 |

Tabla 2.- Se muestra el haplotipo HLA-I de cada paciente de este estudio, si presenta HPV-16 o HPV-18, así como el estadio clínico y el tipo de carcinoma correspondiente a cada caso.

Otro: Se detectó HPV pero no corresponde al tipo 16 o 18; ND: No determinado; IHPV: Infección con Virus de Papiloma Humano.

De manera complementaria a esta investigación, se utilizaron 14 muestras de donadoras normales (sin diagnóstico de cáncer), tomadas de la Unidad de Transplantes del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, de las cuales 9 presentaron el alelo A2 y 6 presentan el alelo B35, 1 de ellas presentó tanto el alelo A2 como el B35. Las edades de las pacientes van desde los 30 hasta 57 años (Tabla 2 y 3).

| DONADORA | HLA-I |
|----------|--|
| 1 | A1, A11, B35 , Bw6, Cw4. |
| 2 | A11, B27, B35 , Cw1, Cw4. |
| 3 | A2 , A24(9), B39, B35 , Cw3, Cw4. |
| 4 | A2 , A23(9), B39(6), B45, Cw7, Cw6. |
| 5 | A24(9), B35 , B62(15), Bw6, Cw4, Cw1. |
| 6 | A24(9), B35 , B62(15), Cw1, Cw4. |
| 7 | A24(9), B35 , B62(15), Bw6, Cw1, Cw3. |
| 8 | A1, A2 , B8, B16, Bw6(15), Cw7, Cw1. |
| 9 | A1, A2 , B8, B39, BW6(15), CW7, CW1. |
| 10 | A2 , B39(16), B62(15), BW6, CW7, CW1. |
| 11 | A1, A2 , B8, B65, BW6(15), CW7, CW1. |
| 12 | A2 , A24(9), B39(16), CW1. |
| 13 | A2 , A24(9), B39(16), CW7. |
| 14 | A2 , A33(19), B62(15), B60(40), Cw4, Cw3. |

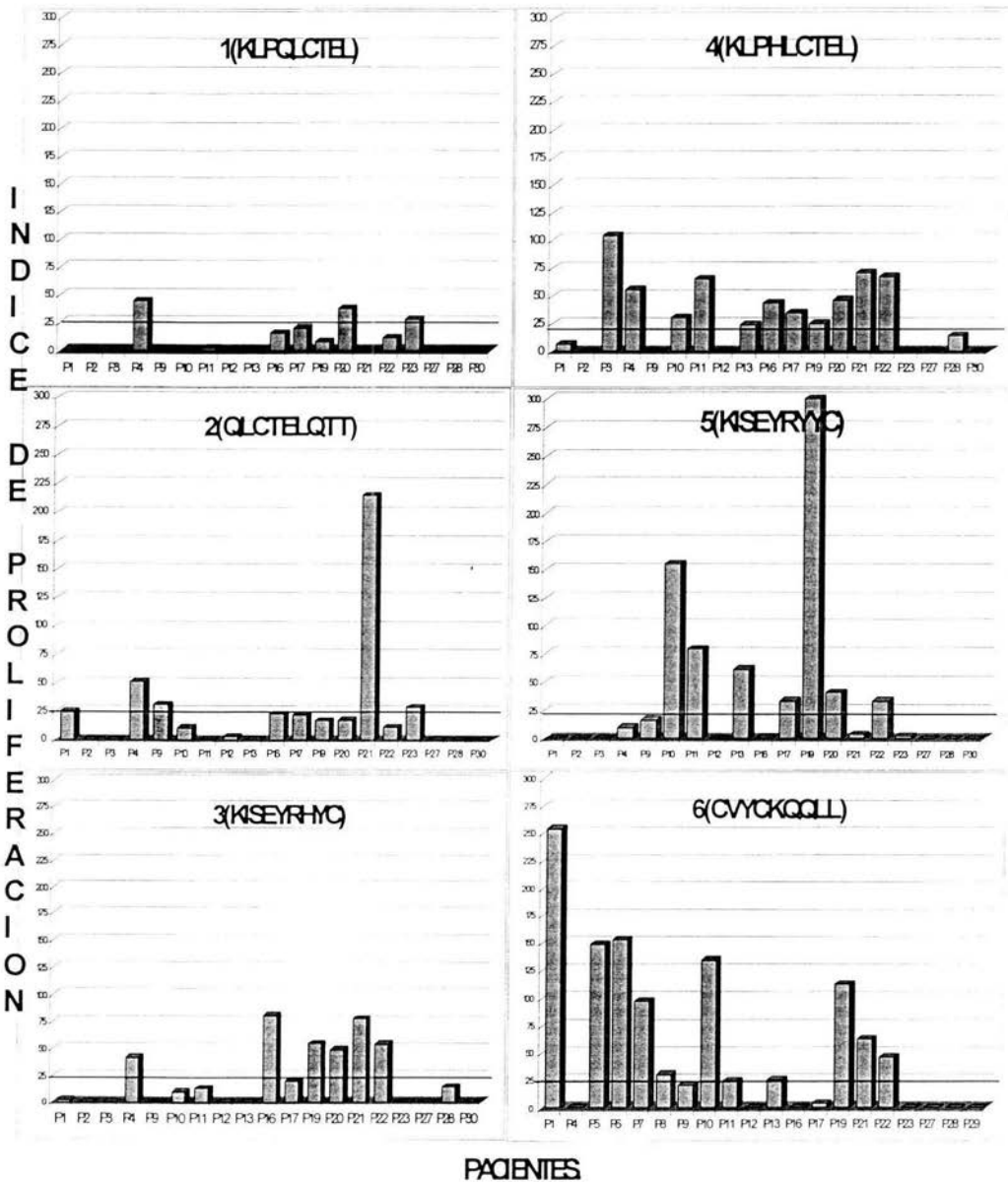
Tabla 3.- Se muestra el haplotipo HLA-I de cada una de las donadoras normales, así como el número asignado a cada una.

3.- RESPUESTA DE LINFOCITOS T DE PACIENTES POSITIVAS PARA EL ALELO HLA-A2, CON PEPTIDOS DERIVADOS DE LAS PROTEINAS E6 Y E7 DE HPV-16 Y-18 Y DE LA PROTEINA E6 DE LA VARIANTE AA-1 DE HPV-16.

Un total de 20 muestras de linfocitos T de sangre periférica de pacientes positivas para HLA-A2, fueron estimuladas con nonapéptidos derivados de las proteínas E6 y E7 del HPV- 16, HPV-18 y de la proteína E6 de la VAA-1 de HPV-16. En todos los casos se realizaron ensayos con IL-2 y Fitohemaglutinina (PHA) como controles positivo de activación de los linfocitos. Además se utilizaron nonapéptidos derivados de la proteína M1 de Influenza-A, como controles normales de activación. Se consideró positiva la estimulación de linfocitos T inducida con los péptidos cuando el índice de proliferación (IP) fue ≥ 25 . Cabe mencionar que en algunos casos el número de linfocitos T que se obtuvo fue un factor limitante, por lo que en algunos experimentos no se evaluaron todos los péptidos disponibles.

Estimulación de linfocitos T de pacientes con péptidos de la proteína E6 de HPV16 y su variante AA1 .

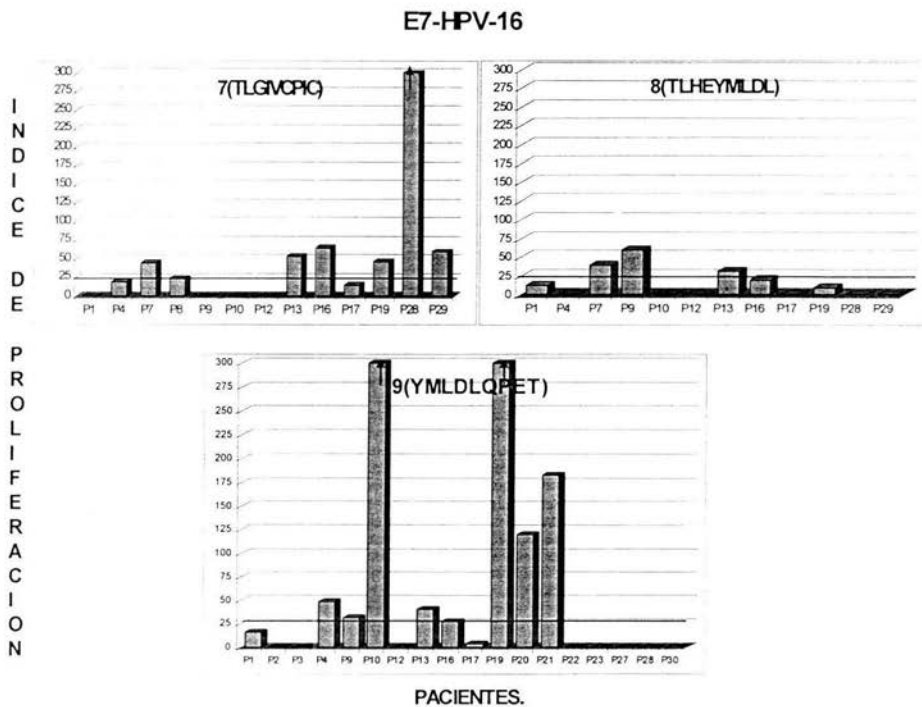
En la grafica 1 se observa que los péptidos derivados de la proteína E6 de HPV-16 (péptidos 1, 2, 3 y 6), estimularon en 15.7, 26, 33.3 y 55 % de los casos respectivamente; mientras que los péptidos derivados de la variante Asiático Americana 1 (péptidos 4 y 5) estimularon en 57.9 y 36.85 % de los casos respectivamente, además de que estos últimos indujeron estímulos con mayores índices de proliferación (Gráfico 1). Cabe mencionar que los péptidos 4 y 5 derivados de la proteína E6 de la VAA1 produjeron mayores índices de proliferación que sus homólogos, los péptidos 1 y 3 respectivamente, derivados de la secuencia E6 del HPV-16 prototipo.



Gráfica 1.- Proliferación de linfocitos T de pacientes, estimulados *in vitro* con péptidos derivados de la proteína E6 del HPV-16 y de la proteína E6 de la VAA del HPV-16, afines al alelo HLA-A2. Pn = Número de paciente.

Estimulación de linfocitos T de pacientes con péptidos derivados de la proteína E7 de HPV-16 .

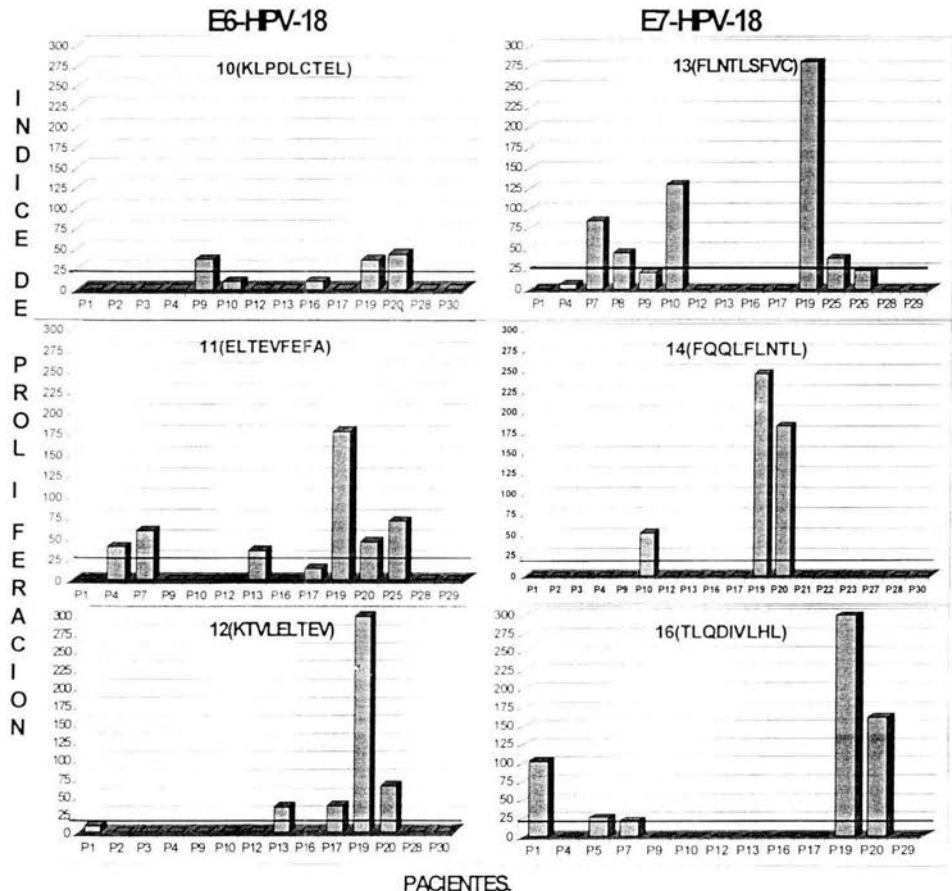
Por otro lado al evaluar el efecto de los péptidos derivados de la proteína E7 de HPV-16 se observó que el péptido 7 produjo estímulo en 8 de 13 casos, destacando el caso de la paciente 28, en el cual se produjo un índice de proliferación de los linfocitos T > 300 (Gráfica 2), uno de los estímulos más altos obtenidos en este trabajo. Por su parte el péptido 8 estimuló en 3 de 12 casos; y el péptido 9 produjo estímulo en 8 de 18 casos, cuatro de ellos con índices de proliferación >100.



Gráfica 2 – Proliferación de linfocitos T de pacientes, estimulados *in vitro* con péptidos derivados de la proteína E7 del HPV-16, afines al alelo HLA-A2. Pn= Número de paciente.

Estimulación de linfocitos T de pacientes con péptidos derivados de la proteína E6 y péptidos derivados de la proteína E7 de HPV-18.

En la gráfica 3 se muestra que de los péptidos derivados de la proteína E6 de HPV-18, el péptido 10 produjo estímulo en 3 de 14 casos; el péptido 11 en 6 de 14 casos; y el péptido 12 en 4 de 14 casos. Cabe destacar que los linfocitos T del paciente 19 respondieron fuertemente a los péptidos 11 y 12, los cuales comparten sus secuencias en 5 de 9 aminoácidos (ELTEV).

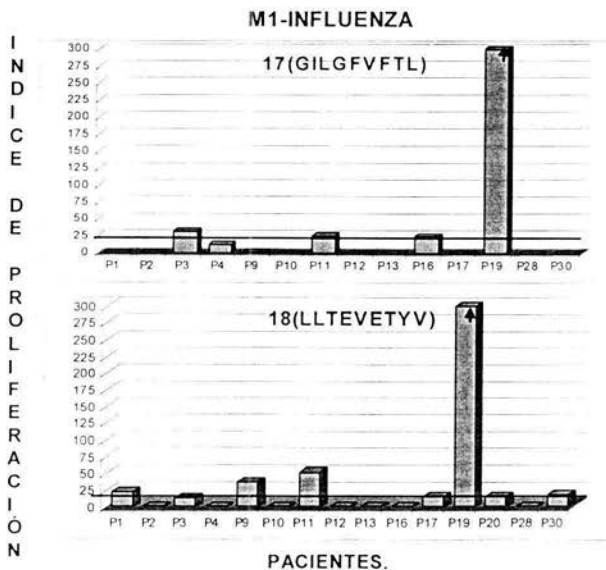


Gráfica 3.- Proliferación de linfocitos T de pacientes, estimulados *in vitro* con péptidos derivados de la proteína E6 y péptidos derivados de la proteína E7 de HPV-18 afines al alelo HLA-A2. Pn = Número de paciente.

En cuanto al estímulo producido por los péptidos de la proteína E7 de HPV-18 sobre los linfocitos T de las pacientes, se observó que el péptido 13 estimuló en 6 de 15 casos; el péptido 14 en 3 de 18 casos, y el péptido 16 en 4 de 13 casos. Los linfocitos T de las pacientes 19 y 20 presentaron índices de proliferación mayores a 100 cuando fueron estimulados con los tres péptidos (Gráfica 3).

Estimulación de linfocitos T de pacientes con péptidos derivados de la proteína M1 de Influenza-A.

Al analizar el efecto de dos péptidos derivados de la proteína M1 de Influenza-A en pacientes HLA-A2+, se encontró que el péptido 17 produjo estímulo en 4 de 13 casos, mientras que el péptido 18 produjo estímulos positivos en 3 de 14 casos; ambos péptidos estimularon fuertemente a los linfocitos de la paciente 19 con índices de proliferación >300 en ambos casos (Gráfica 4).



Gráfica 4 – Proliferación de linfocitos T de pacientes, estimulados *in vitro* con péptidos derivados de la proteína M1-Influenza, afines al alelo HLA-A2. Pn = Número de paciente.

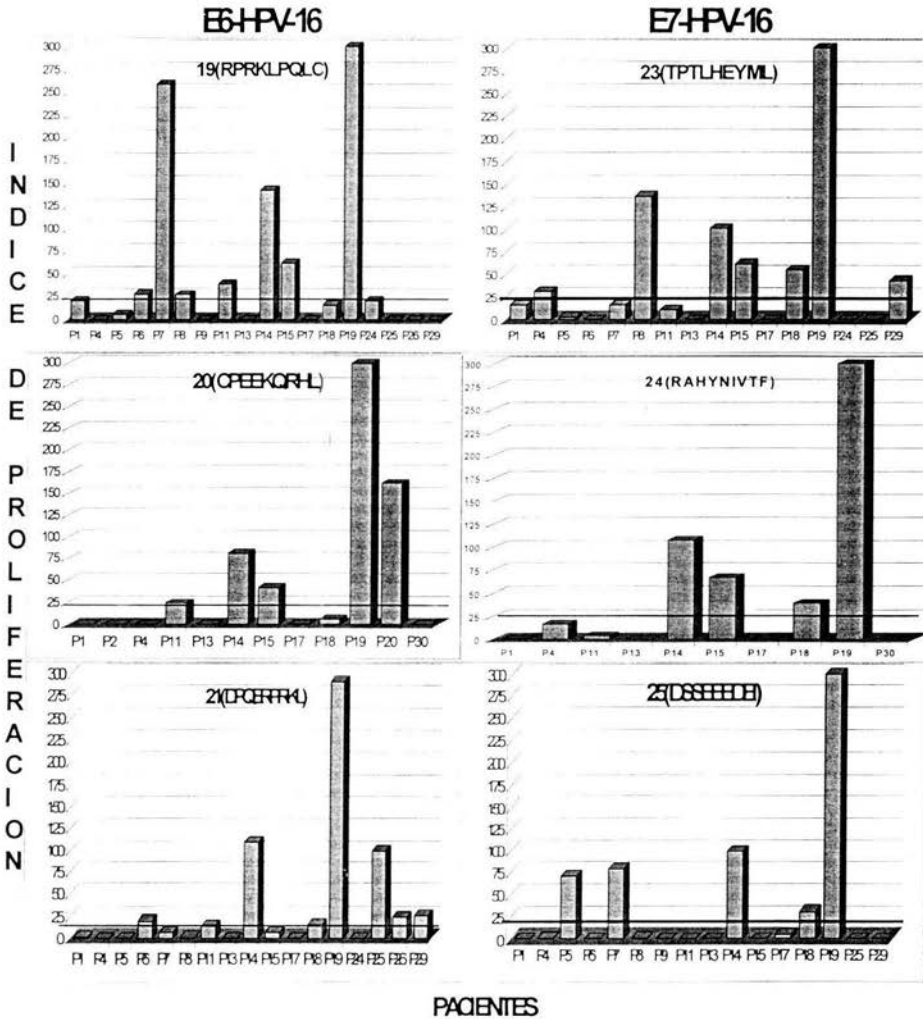
RESPUESTA DE LOS LINFOCITOS T DE PACIENTES POSITIVAS PARA EL ALELO HLA-B35, CON PEPTIDOS DERIVADOS DE LAS PROTEÍNAS E6 Y E7 DE HPV-16 Y 18 Y LAS VARIANTES AA-1 Y AA-2 DE ESTAS.

Un total de 18 muestras de linfocitos T de sangre periférica de pacientes positivas para HLA-B35, fueron estimuladas con nonapéptidos derivados de las proteínas E6 y E7 del HPV- 16, HPV-18, de la proteína E6 de la VAA-1 de HPV-16 y de la proteína E6 de la VAA-2 de HPV-18. También en todos los casos se realizaron ensayos con IL-2, PHA, y nonapéptidos derivados de la proteína M1 de Influenza-A. Se consideró positiva la estimulación de linfocitos T inducida con los péptidos cuando el índice de proliferación (IP) fue ≥ 25 . Cabe mencionar que en algunos casos el número de linfocitos T que se obtuvo fue un factor limitante, por lo que en algunos experimentos no se evaluaron todos los péptidos disponibles.

Estimulación de linfocitos T de pacientes con péptidos derivados de las proteínas E6 y E7 de HPV-16.

Con respecto a los péptidos derivados de la proteína E6 de HPV-16, el péptido 19 produjo estímulos positivos en 7 de 18 casos, el péptido 20 en 5 de 12 casos, y el péptido 21 en 5 de 17 casos (Gráfica 5).

En cuanto a los péptidos derivados de la proteína E7 de HPV-16, se obtuvo que el péptido 23 estimuló a 7 de 16 casos; el péptido 24 en 4 de 10 casos y el péptido 25 en 5 de 16 casos (Gráfica 5). Los linfocitos de la paciente 19 (P19) también fueron estimulados fuertemente con los péptidos derivados de las proteínas E6 y E7 de HPV-16.

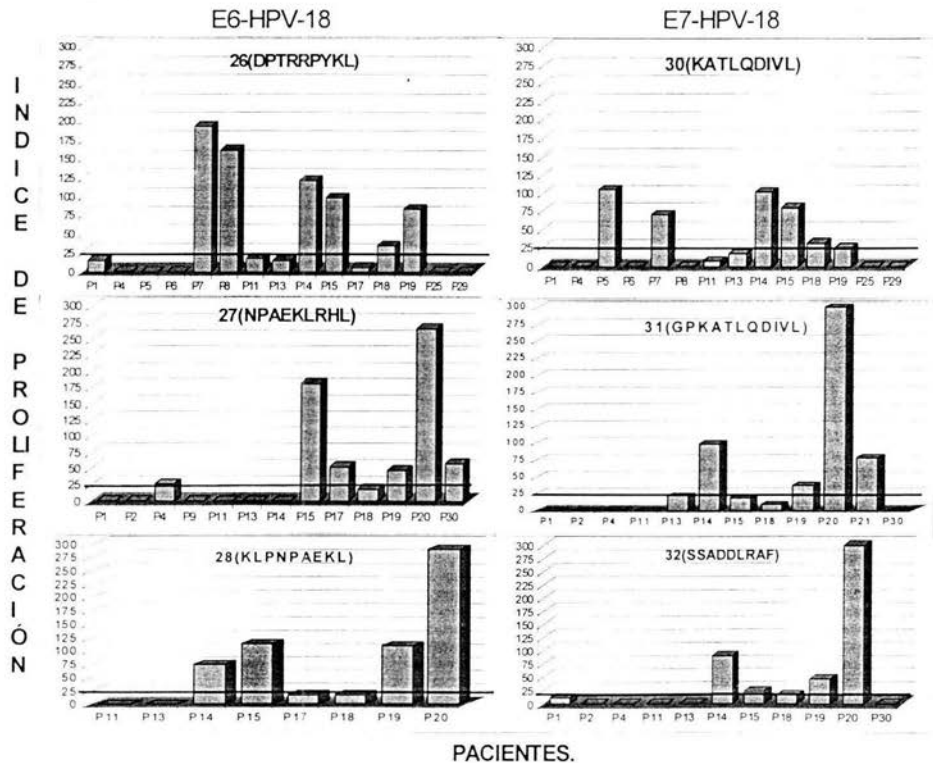


Gráfica 5.- Proliferación de linfocitos T de pacientes, estimulados *in vitro* con péptidos derivados de la proteína E6 y E7 de el HPV 16, afines al alelo HLA-B35. Pn = Número de paciente.

Estimulación de linfocitos T de pacientes con péptidos derivados de la proteína E6 y E7 de HPV-18.

Por otra parte al estimular los linfocitos de las pacientes, con péptidos derivados de las proteínas E6 de HPV-18 se pudo observar que el péptido 26 estimuló en 6 de 15 casos, el péptido 27 en 6 de 13 casos, mientras que el péptido 28 en 4 de 8 casos (Gráfica 6).

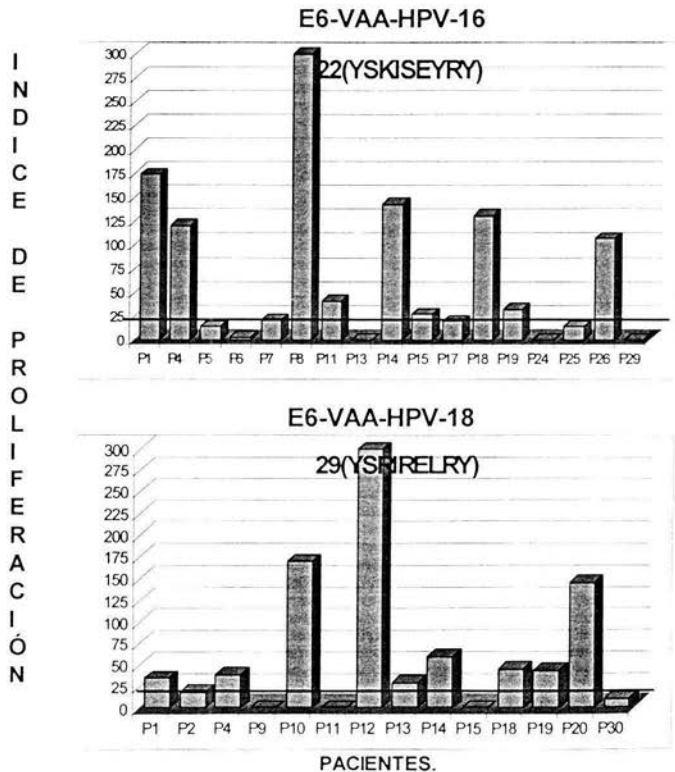
En el caso de los péptidos derivados de la proteína E7 de HPV-18, el péptido 30 estimuló en 6 de 14 casos, el péptido 31 en 4 de 12 casos y el péptido 32 en 3 de 11 casos. En este grupo de pacientes fue evidente un mayor estímulo con los péptidos de la proteína E6 que con los péptidos de la proteína E7 derivados del HPV-18 (Gráfica 6). Los linfocitos T de la paciente 20 se estimularon fuertemente con los péptidos 27, 28, 31 y 32, con IP>275. Además los linfocitos de la paciente 19 también fueron estimulados con la mayoría de los péptidos, aunque con menor intensidad.



Gráfica 6.- Proliferación de linfocitos T de pacientes, estimulados *in vitro* con péptidos derivados de la proteína E6 y E7 de el HPV 18, afines al alelo HLA-B35. Pn = Número de paciente.

Estimulación de linfocitos T de pacientes con péptidos derivados de las proteínas E6 de las variantes AA-1 y AA-2 de HPV-16 y HPV-18 respectivamente.

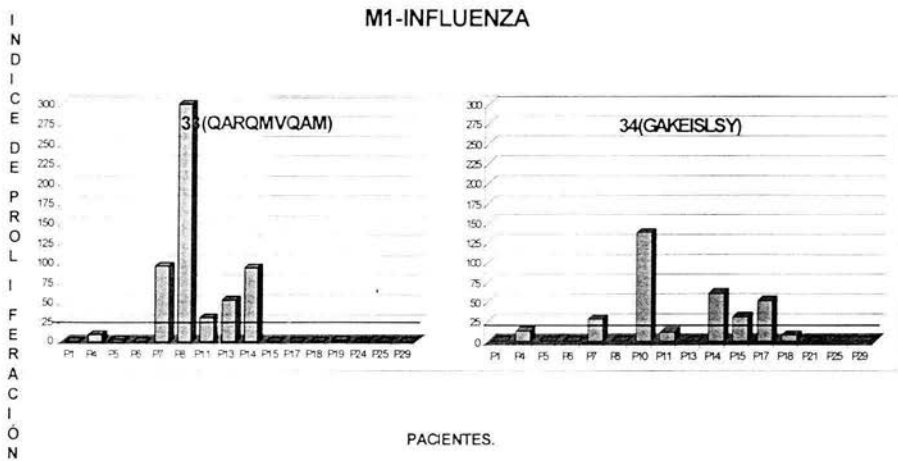
Al evaluar el efecto de los péptidos derivados de las variantes E6 de HPV-16 y 18 se observó que el péptido 22 perteneciente a la VAA-1 de HPV-16 estimuló positivamente en 9 de 17 casos, mientras que el péptido 29 derivado de la proteína E6 de la VAA-2 de HPV-18 produjo estímulos en 9 de 14 casos (Gráfica 7). Es importante destacar que entre estos dos péptidos se comparten 6 de los nueve aminoácidos y estimularon mayor número de casos que los obtenidos por péptidos derivados de las proteínas E6 prototipos de HPV-16 y HPV-18 (ver Gráfica 5 y 6).



Gráfica 7.- Proliferación de linfocitos T de pacientes, estimulados *in vitro* con péptidos derivados de la proteína E6 de las variantes AA de HPV-16 y HPV-18, afines al alelo HLA-B35. Pn =Número de paciente.

Estimulación de linfocitos T de pacientes con CaCu con péptidos derivados de la proteína M1 Influenza-A.

Por otro lado los péptidos 33 y 34 derivados de la proteína M1 de Influenza-A estimularon positivamente en 5 de 16 casos cada uno, no obstante los índices de proliferación inducidos por el péptido 33 fueron mayores que los inducidos por el péptido 34 (Gráfica 8).



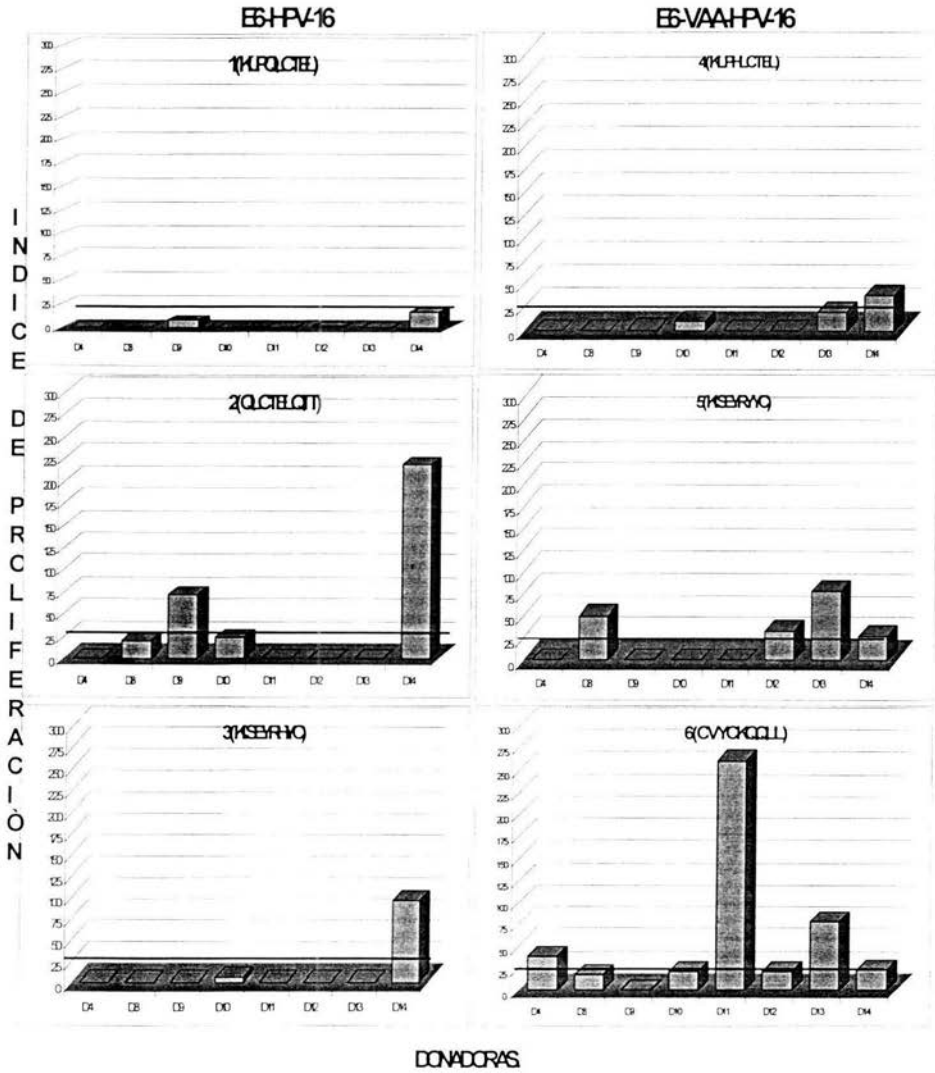
Gráfica 8.- Proliferación de linfocitos T de pacientes, estimulados in vitro con péptidos derivados de la proteína **M1- de Influenza**, afines al alelo **HLA-B35**. Pn = Número de paciente.

4.- RESPUESTA DE LOS LINFOCITOS T DE DONADORAS NORMALES POSITIVAS PARA LOS ALELOS HLA-A2 y -B35, AL SER ESTIMULADOS CON PÉPTIDOS DERIVADOS DE LAS PROTEÍNAS E6 Y E7 DE HPV-16 Y-18 Y VARIANTES DE ESTAS.

En el grupo control constituido por 14 donadoras negativas para la infección con HPV y cáncer cervical en el momento de la toma de muestra, el estímulo de linfocitos T con los péptidos derivados de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 así como de HPV-18 y sus variantes fue inferior respecto al encontrado en las pacientes, observándose que el índice de proliferación en la mayoría de las donadoras analizadas fue < 25%.

Estimulación de linfocitos T de donadoras HLA-A2+ con péptidos derivados de la proteína E6 de HPV-16 y de su VAA1, afines al alelo HLA-A2.

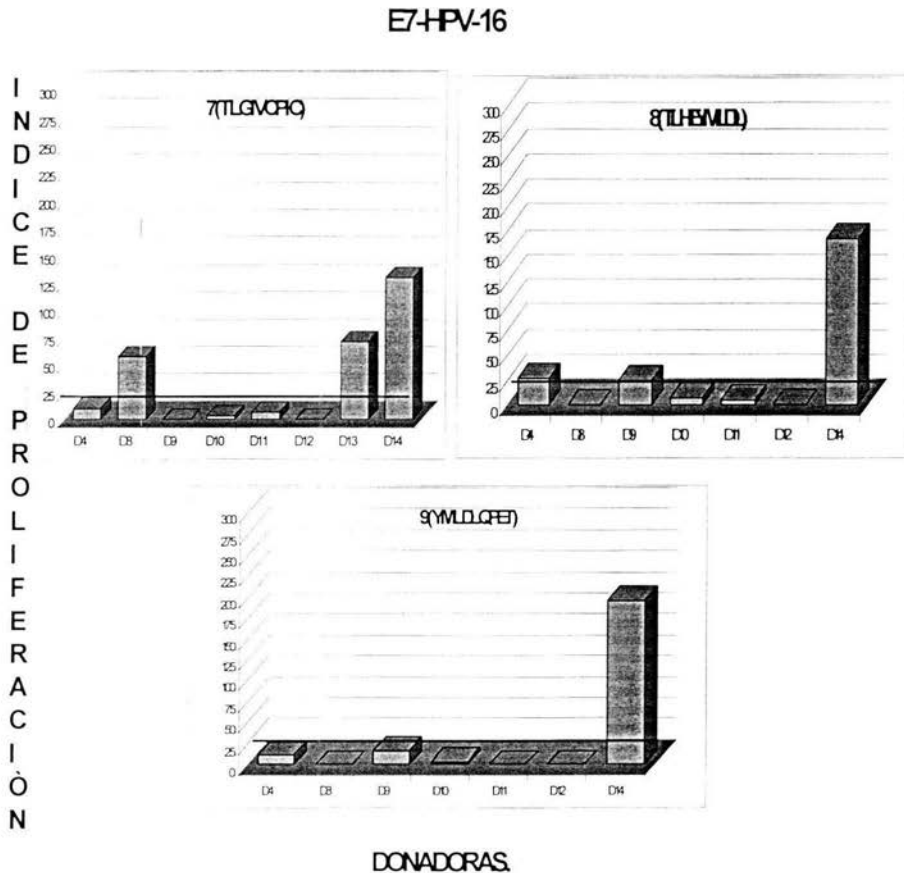
Al estimular linfocitos T de donadoras HLA-A2+ con péptidos derivados de la proteína E6 de HPV-16 y de la VAA de HPV-16, se encontró una, baja actividad estimuladora en la mayoría de las donadoras, no obstante los linfocitos de la donadora 14 (D14) fueron estimulados fuertemente con los péptidos 2 y 3 de E6 de HPV-16; asimismo los linfocitos de la donadora D13 fueron ligeramente estimulados con los péptidos 5 y 6 derivados de la proteína E6 de la VAA, en cambio con los péptidos derivados de la secuencia prototipo no hubo ningún estímulo; y los linfocitos de la donadora D11 resultaron fuertemente estimulados con el péptido 6 de la proteína E6 de la VAA (Gráfica 9). En la gráfica 9 también se puede observar que el péptido 3 y el péptido 5 produjeron diferente número de estímulos a pesar de variar sólo en un aminoácido de su secuencia, ya que estimularon en 1 y 4 de 8 casos respectivamente. Sugiriendo que estas donadoras probablemente presentaron infección por algún tipo de HPV en alguna etapa de su vida.



Gráfica 9.- Estimulos de linfocitos T de donadoras con péptidos derivados de la proteína E6 del HPV-16 y de su variante AA, afines al alelo HLA-A2. Dn= número de donadora.

Estimulación de linfocitos T de donadoras HLA-A2+ con péptidos derivados de la proteína E7 del HPV-16 afines al alelo HLA-A2.

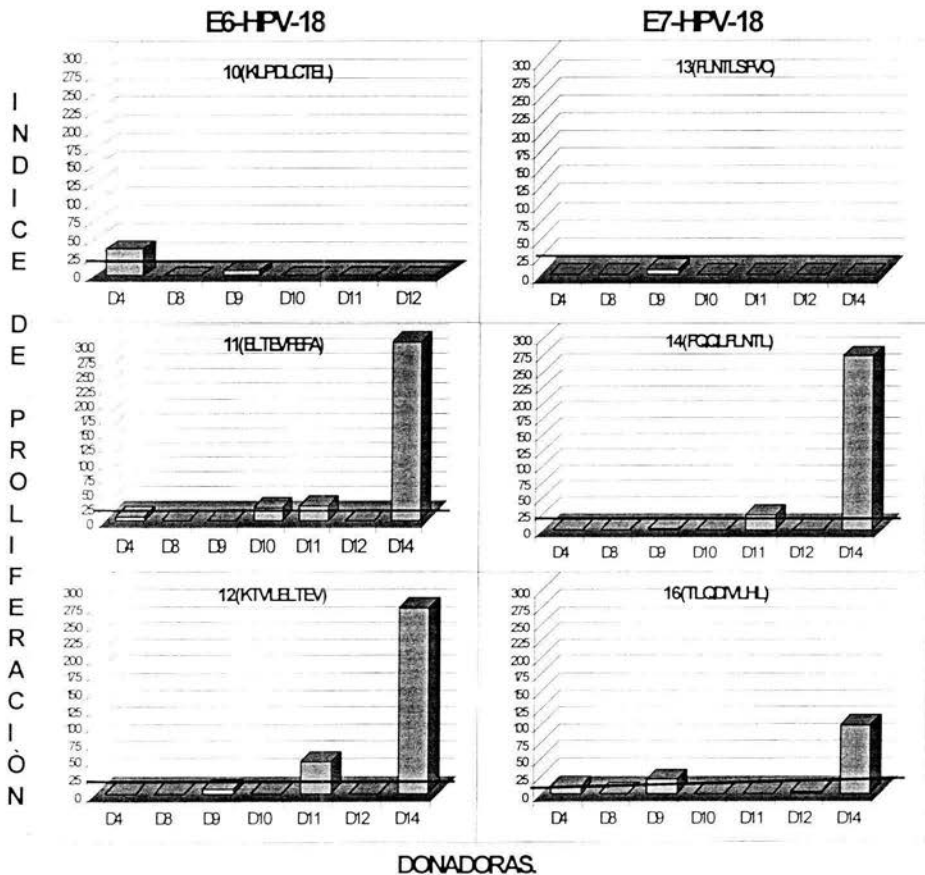
En cuanto a los resultados obtenidos al estimular linfocitos de donadoras con péptidos de la proteína E7 del HPV-16, se encontró que los linfocitos T de la donadora D14 fueron estimulados fuertemente con los péptidos 7, 8 y 9 derivados de esta proteína. Además los linfocitos T de la donadora 8 y 13 también fueron estimulados, aunque en menor proporción, con el péptido 7 (Gráfica 10).



Gráfica 10.- Estimulos de linfocitos T de donadoras con péptidos derivados de la proteína E7 del HPV-16, afines al alelo HLA-A2. Dn= número de donadora.

Estimulación de linfocitos T de donadoras HLA-A2+ con péptidos derivados de las proteínas E6 y E7 del HPV-18 afines al alelo HLA-A2.

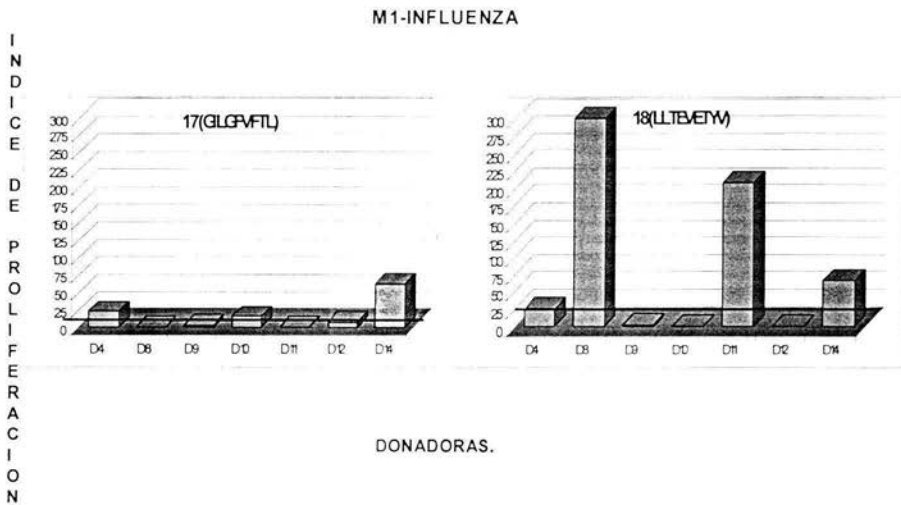
Nuevamente, se puede observar que los estímulos de linfocitos T en las donadoras fueron muy bajos en la mayoría de las donadoras, sin embargo los linfocitos de la donadora 14 fueron activados fuertemente con los péptidos 11 y 12 de la proteína E6 de HPV-18 y con los péptidos 14 y 16 de la proteína E7 de HPV-18 (Gráfica 11), indicando una fuerte respuesta inmune de esta donadora, muy probablemente debida a una infección reciente por HPV.



Gráfica 11.- Estimulo de linfocitos T de donadoras con péptidos derivados de las proteínas E6 y E7 del HPV-18, afines al alelo HLA-A2. Dn = número de donadora.

Estimulación de linfocitos T de donadoras HLA-A2+ con péptidos derivados de la proteína M1 de Influenza-A afines al alelo HLA-A2.

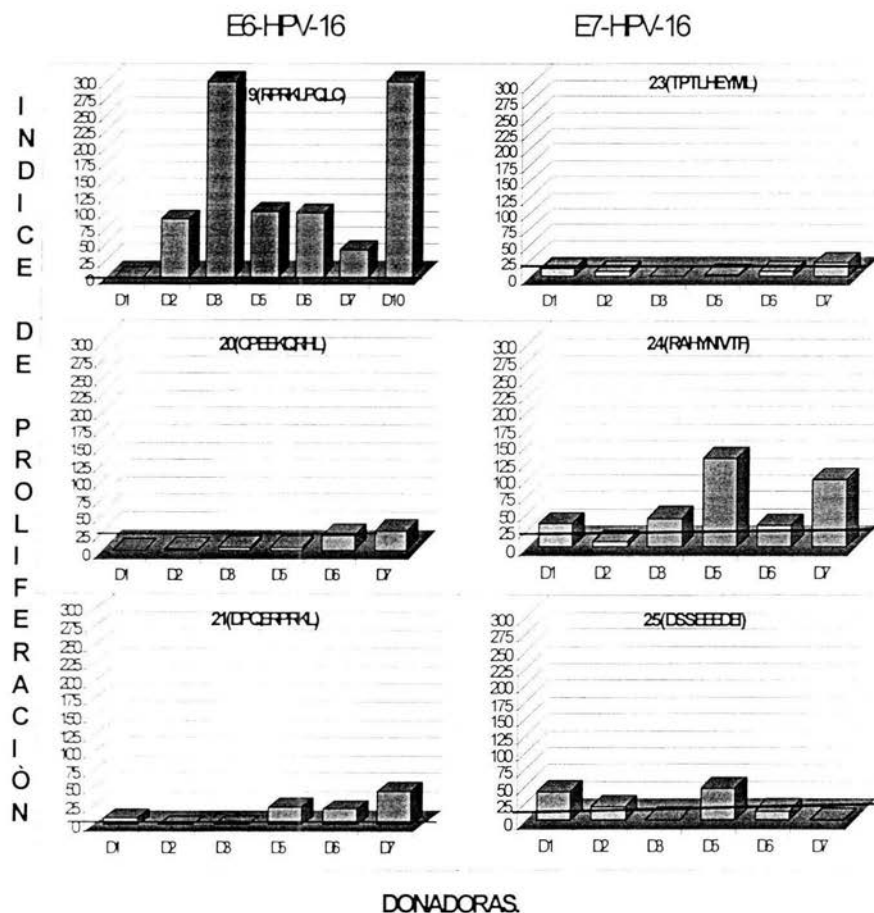
El estímulo dado por los péptidos 17 y 18 derivados de la proteína M1 de Influenza-A fue relativamente escaso a como era de esperarse, ya que estimularon en 1 de 7 donadoras y 4 de 7 donadoras respectivamente; siendo el péptido 18 el que indujo mejor respuesta en estas donadoras (Gráfica 12).



Gráfica 12.- Estimulos de linfocitos T de donadoras con péptidos derivados de la proteína M1-Influenza, afines al alelo HLA-A2. Dn = número de donadora.

Estimulación de linfocitos T de donadoras HLA-B35+ con péptidos derivados de la proteína E6 y E7 de HPV-16 afines al alelo HLA-B35.

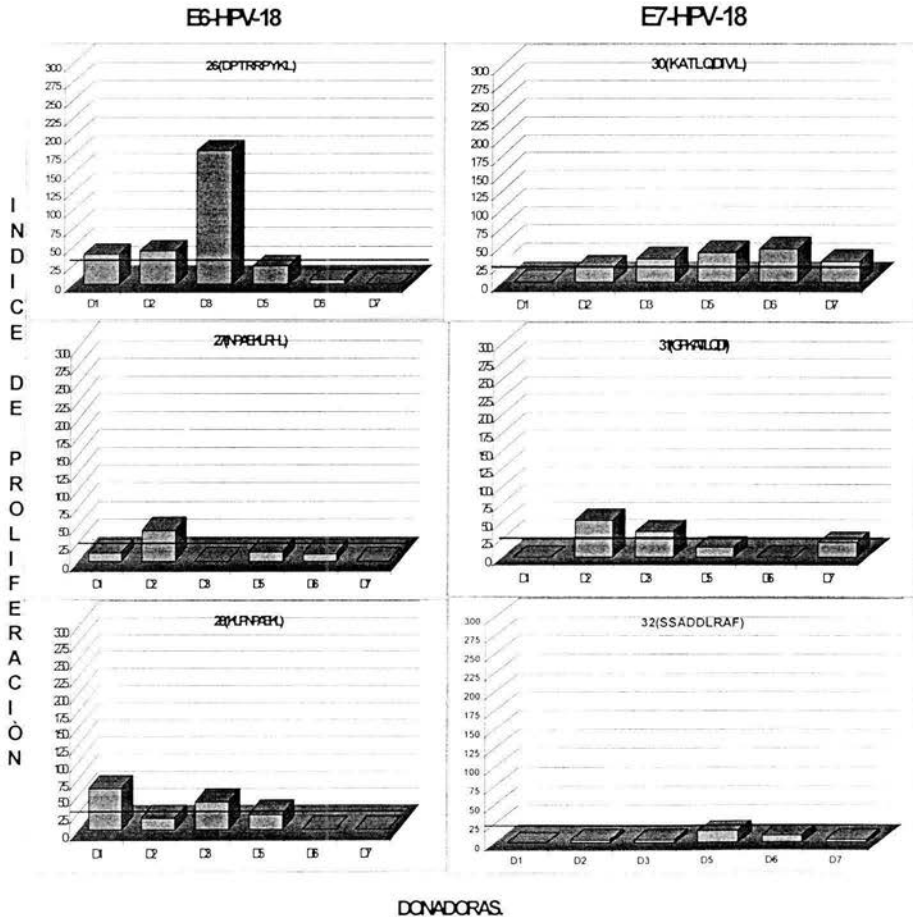
Al evaluar el efecto de los péptidos derivados de las proteínas E6 y E7 de HPV-16, sobre los linfocitos de las donadoras normales HLA-B35+, se observó que el péptido 19 derivado de la proteína E6 de HPV-16 indujo estímulo en 6 de 7 donadoras, especialmente en las donadoras 3 y 11 en donde éste fue muy fuerte. Además el péptido 24 derivado de la proteína E7 de HPV-16 también indujo efecto estimulador en 5 de 6 donadoras, aunque en menor proporción que el ejercido por el péptido 19 (Gráfica 13).



Gráfica 13.- Estimulo de linfocitos T de donadoras con péptidos derivados de la proteína E6 y E7 del HPV-16, afines a moléculas del alelo HLA-B35. Dn = número de donadora.

Estimulación de linfocitos T de donadoras HLA-B35+ con péptidos derivados de la proteína E6 y E7 de HPV-18 afines a HLA-B35.

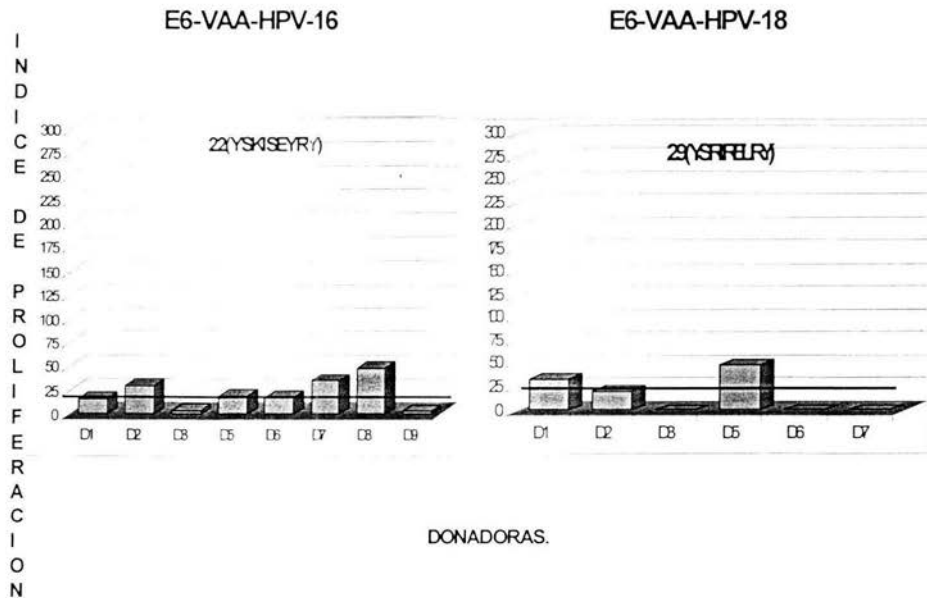
Los péptidos 26 derivado de la proteína E6 y el péptido 30 derivado de la proteína E7 de HPV-18, estimularon en 4 de 6 casos cada uno. Los péptidos 28 derivado de la proteína E6 y el péptidos 31 derivado de la proteína E7 de HPV-18, estimularon en 2 de 6 casos cada uno. En estos casos los estímulos fueron no mayores a un IP de 50, a excepción del estímulo ejercido por el péptido 26 en la donadora D3 el cual fue de un IP de 180 (Gráfica 14).



Gráfica 14.- Estimulos de Linfocitos T de donadoras con péptidos derivados de la proteína E6 y E7 del HPV-18, afines a moléculas del alelo HLA-B35. Dn = número de donadora.

Estimulación de linfocitos T de donadoras HLA-B35+ con péptidos derivados de las proteínas E6 de las VAA de HPV-16 y de la VAA de HPV-18 afines al alelo HLA-B35.

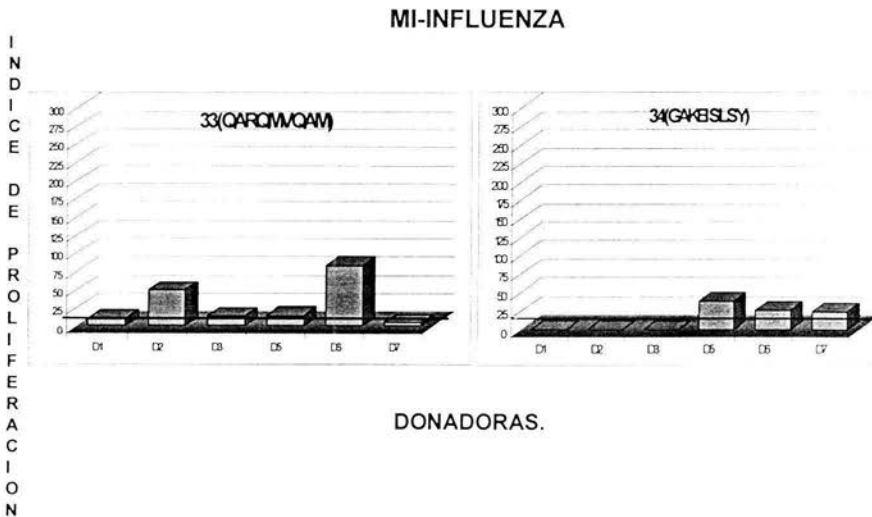
El péptido 22 derivado de la proteína E6 de la variante del HPV-16 estimuló en 3 de 6 casos con IP menores a 50; datos similares se obtuvieron con el péptido 29 perteneciente a la variante del HPV-18 que estimuló en 2 de 6 casos (Gráfica 15). Es posible considerar que los pocos casos en que se produjo estimulación de los linfocitos T de las donadoras, se pueden deber a que en alguna etapa de su vida, estas donadoras estuvieron expuestas a algún tipo de HPV, pero han logrado resolver la infección y conservan algunos linfocitos de memoria.



Gráfica 15.- Estimulos de linfocitos T con péptidos derivados de las proteínas E6 de las VAA del HPV-16 y del HPV-18, afines a moléculas del alelo HLA-B35. Dn = número de donadora.

Estimulación de linfocitos T de donadoras HLA-B35+ con péptidos derivados de la proteína M1 de Influenza-A afines al alelo HLA-B35.

Los péptidos 33 y 34 derivados de la proteína M1 de Influenza-A, lograron estimular en 2 de 6 casos y en 3 de 6 casos respectivamente (Gráfica 16).



Gráfica 16.- Estimulos de linfocitos T de donadoras con péptidos derivados de la proteína **M1-Influenza**, afines a moléculas del **alelo HLA-B35**. Dn = número de donadora.

Finalmente, al analizar los resultados de manera global, se puede observar que los péptidos P4(KLPHLCTEL) y P6(CVYCKQQLL) derivados de la proteína E6 de la variante AA de HPV-16, así como los péptidos P7(TLGIVCPIC) y P9(YMLDLQPET) de la proteína E7 de HPV-16, fueron los péptidos que indujeron estímulos en el mayor número de las pacientes positivas para el alelo HLA-A2 (Tabla 4). Asimismo, el péptido P22(YSKISEYRY) derivado de la proteína E6 de la variante AA de HPV-16, el péptido P28(KPLNPAEKL) y el péptido P29(YSRIRELRY) de la proteína E6 de la variante AA2 de HPV-18, estimularon en un mayor número de casos a pacientes positivas para el alelo HLA-B35 (Tabla 5). También se muestra que el péptido P19(RPRKLPQLC) indujo el mayor índice de proliferación de linfocitos T en las pacientes estudiadas (Tabla 4). Por otra parte, los péptidos P19(RPRKLPQLC) y el péptido P24(RAHYNIIVTF) derivados de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 indujeron estímulos en varias de las donadoras normales positivas para HLA-B35 (Tabla 5). Además se destaca que los péptidos específicos para HLA-B35 indujeron mayores índices de proliferación en las pacientes y donadoras normales, que los péptidos específicos para el alelo HLA-A2 (Tablas 4 y 5)

5.- ESTIMULO DE LINFOCITOS T DE PACIENTES CON CANCER CERVICAL, CON LOS PEPTIDOS DE LAS PROTEINAS E6 Y E7 DE: HPV 16 Y 18, LAS VARIANTES VAA1 Y VAA2 DE EL HPV 16, PARA MOLECULAS HLA -A2 Y -B35.

| TIPO DE PROTEINA | PEPTIDO | PACIENTES | | DONADORAS | |
|---------------------------|----------------------|--------------------|-----------|------------------|----------|
| | | % ESTIM. | TOTAL | % ESTIM. | TOTAL |
| E6/HPV16 | P1(KLPQLCTEL) | 15.7(36.8) | 19 | 0 | 8 |
| | P2(QLCTELQTT) | 26.5(72.8) | 19 | 28(65.8) | 7 |
| | P3(KISEYRHYC) | 33(60.1) | 18 | 14(95.6) | 7 |
| E6/HPV16 VARAA | P4(KLPHLCTEL) | 57.9(51.43) | 19 | 12(37.6) | 8 |
| | P5(KISEYRYYC) | 36.9(188.94) | 19 | 50(46.85) | 8 |
| E6/HPV16 | P6(CVYCKQQLL) | 55(130) | 20 | 37(125.7) | 8 |
| E7/HPV16 | P7(TLGIVCPIC) | 53.9(116) | 13 | 37(86.43) | 8 |
| | P8(TLHEYMLDL) | 23(44) | 13 | 42(73) | 7 |
| | P9(YMLDLQPET) | 44.5(182.9) | 18 | 12(127) | 8 |
| E6/HPV18 | P10(KLPDLCTEL) | 21.4(39.16) | 14 | 28(73.5) | 7 |
| | P11(ELTEVFEFA) | 42.85(79) | 14 | 14(340) | 7 |
| | P12(KTVLELTEV) | 28.6(110) | 14 | 28(160) | 7 |
| E7/HPV18 | P13(FLNTLSFVC) | 40(183.5) | 15 | 14(203) | 7 |
| | P14(FQQLFLNTL) | 16.6(160.3) | 18 | 14(273) | 7 |
| | P16(TLQDIVLHL) | 30.7(149.8) | 13 | 14(99) | 7 |
| M1 INFLUENZA | P17(GILGFVFTL) | 28(147.3) | 14 | 14(61.5) | 7 |
| | P18(LLTEVETVYV) | 20(290) | 15 | 57(167) | 7 |

Tabla 4.- Estimulos de linfocitos T de pacientes y donadoras normales positivas para el alelo HLA-A2 con péptidos derivados de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 y 18 y de la variante AA1 de HPV-16. El número de estímulos corresponde a los casos en donde el IP>25, el promedio del IP de los casos positivos aparecen entre paréntesis. Los péptidos con mayor actividad antigénica se marcan en negritas.

| TIPO DE PROTEINA | PEPTIDO | PACIENTES | | DONADORAS | |
|---------------------------|-----------------------|------------------|-----------|------------------|----------|
| | | % ESTIM. | TOTAL | % ESTIM. | TOTAL |
| E6/HPV16 | P19(RPRKLPQLC) | 38(200) | 18 | 85(136.8) | 7 |
| | P20(CPEEKQRHL) | 41(185) | 12 | 16(28) | 6 |
| | P21(DPQERPRKL) | 29(110) | 17 | 33(32.5) | 6 |
| E6/HPV16 VARAA | P22(YSKISEYRY) | 52(133) | 17 | 42(38) | 7 |
| E7/HPV16 | P23(TPTLHEYML) | 43(191.4) | 16 | 0 | 6 |
| | P24(RAHYNIVTF) | 40(76) | 10 | 83(66.5) | 6 |
| | P25(DSSEEEDEI) | 31(136.1) | 16 | 33(43.1) | 6 |
| E6/HPV18 | P26(DPTRRPYKL) | 42(114.95) | 14 | 66(72.25) | 6 |
| | P27(NPAEKLRL) | 46(105.7) | 13 | 16(42.8) | 6 |
| | P28(KPLNPAEKL) | 50(147.5) | 8 | 33(50) | 6 |
| E6/HPV18 VAA | P29(YSRIRELRY) | 64(161) | 14 | 33(40.57) | 6 |
| E7/HPV18 | P30(KATLQDIVL) | 42(69) | 14 | 66(36.85) | 6 |
| | P31(GPKATLQDI) | 33(193.67) | 12 | 33(44) | 6 |
| | P32(SSADDLRAF) | 27(197) | 11 | 0 | 6 |
| MI INFLUENZA | P33(QARQMVQAM) | 31(119) | 16 | 33(67) | 6 |
| | P34(GAKEISLSY) | 31(62) | 16 | 50(30) | 6 |

Tabla 5.- Estimulos de linfocitos T de pacientes y de donadoras normales positivas para el alelo HLA-B35, con péptidos derivados de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 y 18 y de la variante AA1 de HPV-16 y AA2 de HPV-18. El número de estimulos corresponde a los casos en donde el IP>25, el promedio del IP de los casos positivos aparecen entre paréntesis. Los péptidos con mayor actividad antigénica se marcan en negritas.

ANÁLISIS DE RESULTADOS.

La infección por virus de papiloma humano (HPV) en genitales es una de las enfermedades de transmisión sexual más comunes en la población mundial. Se calcula que aproximadamente 60-75% de la población sexualmente activa está infectada por algún tipo de HPV (Riethmuller et al, 1999). Los tipos HPV-16 y 18 se han encontrado asociados con un 70-80% de los tumores cervicales y junto con otros HPV's (HPV-31, 33, 45, 54, etc.) en un 99.7% de los tumores (Walboomers et al, 1999). En México el cáncer cervical es el de mayor incidencia en la población femenina y considerando la alta incidencia de cáncer cervical en el mundo, así como su clara asociación con el HPV se ha hecho necesaria la adopción de nuevas estrategias para tratar de controlar este problema. Los avances en el conocimiento de la biología molecular del HPV durante la historia natural de la enfermedad, así como de los mecanismos moleculares de la respuesta inmune contra este virus, han favorecido el desarrollo de propuestas de vacunación contra el cáncer cérvicouterino en los últimos años (Guzmán-Rojas et al, 1998; Pandey et al, 1999; Galloway et al, 2003).

La sobre expresión de las proteínas oncogénicas E6 y E7 de los HPV de alto riesgo (Hubert et al, 2001) en células del epitelio cervical infectadas por el virus y en las células tumorales desarrolladas durante la enfermedad ha llevado a proponer que éstas puedan ser las proteínas blanco idóneas para servir como antígenos tumorales (Da Silva et al, 2001; Galloway, 2003).

Por otro lado, debido a que los linfocitos T citotóxicos son los efectores primarios en la eliminación de células infectadas con virus y células tumorales, a través del reconocimiento de péptidos presentados por moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (HLA-A, B, C), varios grupos de investigación han dirigido sus esfuerzos para identificar a los péptidos antigénicos derivados de las proteínas E6 y E7 con capacidad de estimular y generar linfocitos T citotóxicos restringidos a moléculas particulares del complejo principal de histocompatibilidad clase I. El alelo HLA clase I más estudiado, ha sido el alelo HLA-A2, por ser el alelo más frecuente en la población mundial (De Leo et al, 1997; Silva et al, 1999; Weckman et al, 1999; De Anda Turati et al, 2000; Salit et al, 2002), por lo cual, varios péptidos inmunogénicos (capaces de inducir una respuesta inmune) derivados de E6 y E7 de HPV-16 y 18, con especificidad para el alelo HLA-A2, han sido recientemente identificados. Entre ellos destacan los péptidos: ISEYRYYC de la proteína E6 de HPV-16; los péptidos TLGIVCPIC y YMLDLQPETT de la proteína E7 de HPV-16; los péptidos KLPDLCTEL, ELTEVFEFA y KTVLELTEV de la proteína E6 de HPV-18; y los péptidos FLNTLSFVC y TLQDIVLHL de la proteína E7 de HPV-18, no obstante estos péptidos derivan de secuencias prototipo (Europea) de los HPV-16 y 18 (Kast et al, 1994; Alexander et al, 1996; Yoon et al, 1998; Muderspach et al, 2000; Villa et

al, 2000; Youde et al, 2000; Castellanos et al, 2001; Rudolf et al, 2001; Sanclemente, 2003), la cual es muy frecuente en la población caucásica (Yamada et al, 1997; Bible et al, 2000; Fu Xi et al, 2002:).

Por otra parte, tomando en consideración que en México existen las variantes asiático americanas AA1 y AA2 de los HPV-16 y 18 (Lizano et al, 1997) y que las VAA de HPV-16 se encuentran en proporciones similares a la europea (Berumen et al, 2001), el presente trabajo de investigación se realizó con la finalidad de identificar péptidos antigénicos derivados de las proteínas E6 y E7 de los HPV-16 y 18 tanto de la variante europea como de las asiático americanas, para dos de los alelos de más alta frecuencia en nuestra población, HLA-A2 y HLA-B35 (Vargas- Alarcón et al, 1996, 2003; Gómez-Casado et al, 1997; De Leo et al, 1997; Silva et al, 1999; Weckman et al, 1999; Cerda Flores et al, 2002). A partir de ensayos de estimulación de linfocitos T citotóxicos obtenidos de sangre periférica de pacientes con infección de HPV y/o cáncer cervical en diferentes estadios de la enfermedad y de donadoras normales, con péptidos derivados de estas proteínas oncogénicas (obtenidos a través de un programa de algoritmos), se encontró que el péptido P4(KLPHLCTEL) derivado de la proteína E6 de la VAA1 del HPV-16 y el péptido P6(CVYCKQQLL) derivado de la proteína E6 del HPV-16, así como los péptidos P7(TLGIVCPIC) y P9(YMLDLQPET) de la proteína E7 de HPV-16 prototipo, fueron los péptidos que indujeron mayores índices de proliferación en el mayor número de las pacientes analizadas en este estudio, positivas para el alelo HLA-A2. Asimismo, el péptido P22(YSKISEYRY) derivado de la proteína E6 de la variante AA1 de HPV-16 y el péptido P29(YSRIRELRY) de la proteína E6 de la variante AA2 de HPV-18, indujeron altos índices de proliferación en un mayor número de casos de las pacientes analizadas positivas para el alelo HLA-B35. Además, se encontró que los péptidos P19(RPRKLPQLC) y el péptido P24(RAHYNIVTF) derivados respectivamente de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 así como los péptidos P26(DPTRRPYKL) y P30(KATLQDIVL) derivados respectivamente de las proteínas E6 y E7 de HPV-18 indujeron estímulos en varias de las donadoras normales positivas para HLA-B35.

Varios de los péptidos que utilizamos en este estudio son similares a péptidos que ya han sido utilizados en estudios de prueba inmunogénica en la población caucásica. Por ejemplo, el péptido YMLDLQPETT de la secuencia 11-20 de la proteína E7 del HPV-16 (Alexander et al, 1996; Castellanos et al, 2001; Youde et al, 2001;) el cual ha sido aplicado clínicamente en pacientes con NIC's y en pacientes con cáncer cervical (Alexander et al, 1996; Muderspach et al, 2000). Asimismo el péptido MLDLQPETT ha sido aplicado en protocolos de vacunación de pacientes con CaCu inicial y avanzado, obteniéndose resultados muy favorables en las pacientes con enfermedad preinvasiva, en las cuales su estado de salud no fue inmunocomprometido (Muderspach et al, 2000). En nuestro estudio, se utilizó el nona péptido P9(YMLDLQPET) de la secuencia 11-19 de la proteína E7 de HPV-16, con el cual se logró obtener un estímulo importante en 8/17 pacientes, reafirmando que esta secuencia es un importante epítipo de la proteína E7 de HPV-16, mostrando también su inmunogenicidad en pacientes Mexicanas.

Otro de los péptidos antigénicos reportados en la literatura es el péptido P10 (KLPDLCTEL) de la secuencia 13-21 de la proteína E6 de HPV-18, el cual ha resultado ser altamente inmunogénico en 5/15 ensayos de citotoxicidad en donadoras normales de la población de Estados Unidos de Norte América (Yoon et al, 1998; Rudolf et al, 2001). En nuestro estudio estimuló a 3/13 pacientes, al igual que el péptido P1(KLPQLCTEL) de la secuencia 18-26 de la proteína E6 de HPV-16. Sin embargo, el péptido P4(KLPHLCTEL) de la secuencia 18-26 de la proteína E6 de la variante AA1 de HPV-16, el cual cambia el aminoácido D (ácido aspártico), aminoácido aniónico, del péptido 10 o el aminoácido Q (Glutamina), aminoácido polar sin carga, del péptido 1, por el aminoácido básico H (histidina), indujo una respuesta fuerte en 11/18 pacientes, lo cuál nos sugiere que este cambio puntual en el péptido P4 derivado de la VAA-1 lo hace más antigénico que sus homólogos derivados de E6 de HPV-16 y 18 en la población mexicana analizada.

Por otra parte, los péptidos P12(KTVLELTEV) y P11(ELTEVFEFA) de la proteína E6 de HPV-18; el péptido P16(TLQDIVLHL) de la proteína E7 de HPV-16; y el péptido QFLN^TLSFV de la proteína E7 de HPV-18 este ultimo comparte 8 aminoácidos con el péptido 13(FLN^TLSFVC) de esta investigación, han resultado ser altamente inmunogénicos en la población norteamericana (Yoon et al, 1997; Rudolf et al, 2001; Castellanos et al, 2001); no obstante en nuestro estudio no fueron importantes en inducir una respuesta inmune en la mayoría de las pacientes.

El péptido P7(TLGIVCPIC) de la secuencia 86-94 de la proteína E7 de HPV-16, el cual incluye al octapéptido TLGIVCPI, utilizado en las primeras pruebas de una vacuna a base de péptidos contra el CaCu de alto grado (Muderspach et. al. 2000), estimuló fuertemente a los linfocitos de 6/12 pacientes estudiadas.

Otro de los péptidos con actividad estimuladora relevante fue el péptido P6 (CVYCKQQLL), ya que en nuestro estudio indujo un fuerte estímulo de linfocitos T en 11/19 pacientes estudiadas. Cabe mencionar que en el programa de predicción por algoritmos, éste péptido aparece en el lugar 6 en la lista de los péptidos de la proteína E6 del HPV-16 prototipo más afines a moléculas HLA-A2; no obstante este péptido aparece en el primer lugar de la lista de los péptidos derivados de la proteína E6 de la variante VAA1 con mayor afinidad para este alelo. Considerando que este péptido antigénico es común entre las secuencias de proteína E6 de HPV-16 prototipo y de las variantes VAA1 y AA2 existentes en nuestro país, y debido a que no fueron tipificadas las muestras para diferenciar las variantes de los papilomas, sería conveniente saber si este péptido resulta ser más antigénico en las pacientes infectadas con la variante VAA que en pacientes infectadas con el HPV-16 prototipo.

Es interesante mencionar que los péptidos P3(KISEYRHYC) de la proteína E6 de HPV-16 y el péptido P5(KISEYRYYC) de la proteína E6 de la VAA-1 de HPV-16, junto con el péptido 22(YSKISEYRY) de la proteína E6 de la VAA-1 de HPV-16, con el cual comparten 7 de 9 a a, pertenecen a una región antigénica de la proteína E6 de HPV-16 (Esquemas 1 y 2), tanto para el alelo HLA- A2 como para el alelo HLA-B35, ya que los péptidos 3 y 5 afines al alelo HLA-A2 estimularon en

6 de 17 y 7 de 18 casos respectivamente y el péptido 22 afin al alelo HLA-B35 estimuló 9 de 16 casos. Además el péptido 29 derivado de la proteína E6 de HPV-18, el cual comparte 7 de sus 9 aminoácidos con el péptido 22, mostró la más alta antigenicidad al estimular linfocitos de pacientes en 9 de 13 casos, ambos péptidos pertenecen a diferente tipo de HPV, sugiriendo que esta región de la proteína E6 corresponde a un epítipo conservado entre ambos papilomas (Esquemas 1 y 2), los cuales pertenecen a un ancestro común (Myers et al, 1996). Por otra parte, también observamos que linfocitos T de pacientes positivas para HLA-A2 (pacientes 17, 18 y 20) fueron estimulados con el péptido 22, o en el caso de la paciente 11, positiva para HLA-B35, cuyos linfocitos fueron estimulados con el péptido 5, lo cual nos indica una reactividad cruzada de estos péptidos hacia los alelos analizados (Marsh et al, 2000). En consecuencia, estos epítopes homólogos serían buenos candidatos para ser aplicados en protocolos de vacunación de pacientes infectados con diferentes tipos de HPV, por ejemplo 16,18 y variantes de éstas, así como con diferentes alelos de histocompatibilidad clase I (HLA-A2 y B35), abarcando amplios sectores de la población infectada por estos virus.

Resulta interesante observar que 21 de los 34 péptidos que se utilizaron en esta investigación presentan una leucina en posición 1, o 2 o en la parte carboxilo terminal de su secuencia, lo cual parece ser importante al observar su afinidad hacia las moléculas estudiadas y hacia su antigenicidad. Además de manera interesante, en ciertas regiones de las secuencias de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 y 18 y variantes de ellas, se localizan varios de los péptidos predichos con especificidad para HLA-A2 y HLA-B35, compartiéndose algunos aminoácidos entre estos péptidos, además de identificarse como regiones antigénicas en estas proteínas (Esquemas 1 y 2).

Por otra parte, se observó que los linfocitos T de varias de las mujeres pertenecientes al grupo control (donadoras normales) con positividad para el alelo HLA-B35, mostraron reactividad hacia los péptidos 19 derivado de la proteína E6 del HPV-16 y el péptido 24 derivado de la proteína E7 de HPV-16 principalmente; y en menor grado hacia el péptido 26 derivado de la proteína E6 del HPV-18 y el péptido 30 derivado de la proteína E7 de HPV-18. Este dato resulta muy interesante, ya que existen datos que indican que el alelo HLA-B35 es un buen presentador de antígenos virales ya que varios epítopes derivados de HIV-1, HCV, CMV, EBV y EBNA3 han sido caracterizados a partir de este alelo (Marsh et al, 2000). En el caso de nuestro estudio, es posible que el estímulo de linfocitos T encontrado en este grupo de mujeres positivas para HLA-B35, se relacione con respuesta inmunológica de memoria como consecuencia de algún contacto eventual con el virus en alguna etapa de la vida, además hay que recordar que cerca del 60-70% de la población sexualmente activa puede presentar infección con algún tipo de HPV (Riethmuller et al, 1999). Asimismo, encontramos que los índices de proliferación de los linfocitos T de las pacientes positivas para HLA-B35, fueron más altos que los encontrados en las pacientes positivas para el alelo HLA-A2 al ser estimulados con péptidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 y 18 y las variantes AA1 y 2 (Tablas 3 y 4).

Por otra parte, observamos que los cuatro péptidos derivados de la proteína M de Influenza-A no fueron tan eficientes en inducir respuesta de linfocitos T en el grupo y en el grupo de las pacientes analizadas, probablemente debido a que otros epitopes de la proteína M de influenza-A pudieran ser de mayor relevancia en nuestra población, a causa de posibles cambios en las secuencias de las variantes de este tipo (Acosta Araujo, 2002).

Finalmente, tomando en consideración los resultados obtenidos de manera global, el presente trabajo de investigación revela la importancia que tiene la secuencia de los epitopes o determinantes antigénicos de las proteínas E6 y E7 de los HPV-16 y 18 y variantes AA-1 y AA-2 de éstas en la activación de linfocitos T de pacientes que cursan por varios estadios de la enfermedad (desde pacientes infectadas con HPV hasta pacientes con CaCu avanzado), lo cual es de gran trascendencia para poderlos proponer en la asignación de protocolos de vacunación contra estas pacientes. La mayoría de los trabajos hechos hasta ahora, se han enfocado a identificar epitopes de las secuencias prototipo de los HPV-16 y 18 (Yoon et al, 1998; Rudolf et al, 2001), los cuales han tenido un papel importante en la aplicación de protocolos de vacunación en la población caucásica (Kammer et al, 2000; Salit. et al, 2002). Nuestro trabajo de investigación, basado en la predicción de epitopes derivados de secuencias de las proteínas E6 y E7 de los HPV-16 y 18 del prototipo Europeo y de las variantes Asiático Americana reportadas en nuestro País (Lizano et al, 1997; Berumen et al, 2001), muestra que cambios puntuales en la secuencia de algunos epitopes de las variantes AA, pueden ser vitales en generar mejores estímulos en linfocitos T de las pacientes mexicanas analizadas al compararse contra los epitopes homólogos derivados de las secuencias prototipo. Aun cuando no se contó con la tipificación del tipo de HPV o de la variante en la mayoría de las pacientes, estos datos son de gran relevancia para nuestra población ya que hasta el momento no se han hecho estudios sobre la respuesta de linfocitos T hacia antígenos de las variantes de HPV-16 y 18 descritas en México (Grakoui et al. 1999; Hildesheim y Wang 2002), por lo que este estudio es muy enriquecedor para entender la especificidad antigénica debida a las variaciones entre uno y otro tipo o variante de HPV en la respuesta de los linfocitos T humanos durante la infección con este virus y el eventual desarrollo de CaCu, siendo éste un factor muy importante en el tratamiento de la población mexicana que padece infección con HPV y/o CaCu.

SECUENCIA DE LAS PROTEINAS DE E6 Y E7 DE EL HPV-16.

PROTEINA E6

| | |
|--|----------------|
| 1...MHQKRTAMFQ DPQERPRKLP QLCTELQTTI HDIILECVYC KQQLLRREVY DFAFRDLCIV | <i>péptido</i> |
| <u>KLP QLCTEL</u> | 1 |
| <u>QLCTELQTT</u> | 2 |
| <u>KLP HLCTEL</u> | (AA1)4 |
| <u>CVYC KQQL</u> | 6 |
| <u>RPRKLP QLC</u> | 19 |
| <u>DPQERPRKLP</u> | 21 |
| 71..YRDGNPYAVC DKCLKFYSKI SEYRHYCYSL YGTTLEQQYN KPLCDLLIRC | |
| <u>SEYRHYCYSL</u> | 3 |
| <u>SEYRHYCYS</u> | (AA1)5 |
| <u>YSKI SEYRY</u> | (AA1)22 |
| 121. INCQKPLCPE EKQRHLDDKQ RFHINIRGRWT GRCMCCRSS RTRRETQL | |
| <u>INCQKPLCPE</u> | 20 |

PROTEINA E7

| | |
|--|----------------|
| 1...MHGDTPTLHE YMLDLQPETT DLYCYEQLN* SSEEDEIDG PAGQAEPDRA HYNIVTFCK | <i>péptido</i> |
| <u>YMLDLQPETT</u> | 8 |
| <u>YMLDLQPET</u> | 9 |
| <u>YMLDLQPE</u> | 23 |
| <u>RAHYNIVTF</u> | 24 |
| 71..CDSTLRRLCVQ STHMDIRTLLEDLLMGTILGIVCPICSQKP | |
| <u>ILGIVCPIC</u> | 7 |

Esquema 1. Se muestran las secuencias de las proteínas E6 y E7 del HPV-16, en color claro se muestran las secuencias de los péptidos utilizados y en color rojo se muestran los péptidos mas antigénicos del lado derecho se muestra el número del péptido a l que corresponden.

SECUENCIA DE LAS PROTEINAS DE E6 Y E7 DEL HPV - 18

•PROTEÍNA E6

| | |
|--|----------------|
| 1..MARFEDPTRR PYKLPDLCTE LNTSLQDIEI TCVYCKTVLE LTEVFEFAFK DMFDSI | <i>péptido</i> |
| <u>KLPDLCTE</u> | 10 |
| <u>E LTEVFEFA</u> | 11 |
| <u>KTVLE LTEV</u> | 12 |
| <u>DPTRR PYKL</u> | 26 |
| 71.PHAACHKCID FYSRIRELRH YSDSVYGD ¹ TL EKLNTNGLYN LLIRCLRCQKPAKLRH LNEKR ² RFHNI | |
| <u>ISRRELY</u> | 29 |
| <u>NPAEKL³RH L</u> | 27 |
| <u>FLN⁴TL</u> | 28 |
| 131.AGHYRGQCHS CCNRARQERL QRRRETQV | |

PROTEÍNA E7

| | |
|--|----------------|
| 1..MHGPKATLQD IVLHLEPQNE IPVDLLCHEQ LSDSEEENDE NHQHLPARRA EPQV ¹ ICTM | <i>péptido</i> |
| <u>TLQD IVLHL</u> | 16 |
| <u>KATLQD IV</u> | 30 |
| <u>GPKATLQD</u> | 31 |
| 71.CCKCEARIEL WV ² ESSADDLR AFQQLFLN ³ TL SFVCPWCA | |
| <u>FLN⁴TL SFVC</u> | 13 |
| <u>FQQLFLNT</u> | 14 |
| <u>SSADDLR AF</u> | 32 |

Esquema 2. Se muestran las secuencias de las proteínas E6 y E7 del HPV-18, en color claro se muestran las secuencias de los péptidos utilizados y en color rojo se muestran los péptidos más antigénicos del lado derecho se muestra el número del péptido a l que corresponden.

CONCLUSIONES.

1.- Se identificaron los péptidos P4(KLPHLCTEL) y P6(CVYCKQQLL) derivados de la proteína E6 de la variante AA1 y del prototipo de HPV-16 respectivamente; así como los péptidos P7(TLGIVCPIC) y P9(YMLDLQPET) de la proteína E7 de HPV-16 prototipo, como altamente antigénicos para las pacientes positivas para el alelo HLA-A2.

2.- Asimismo, el péptido P22(YSKISEYRY) derivado de la proteína E6 de la variante AA1 de HPV-16 y el péptido P29(YSRIRELRY) de la proteína E6 de la variante AA2 de HPV-18, fueron identificados altamente antigénicos para las pacientes positivas para el alelo HLA-B35.

3.- Los péptidos derivados de las variantes, indujeron mayores estímulos en los linfocitos T de las pacientes HLA-A2 y HLA-B35 en comparación con los péptidos antigénicos identificados de las secuencias prototipo.

4.- Los péptidos afines al alelo HLA-B35, produjeron mayores índices de proliferación en las pacientes que los péptidos afines al alelo HLA-A2.

5.- Los péptidos derivados de HPV-16 y sus variantes produjeron mayores estímulos en las pacientes positivas para HLA-A2, mientras que los péptidos derivados de HPV-18 produjeron mayores estímulos en las pacientes positivas para HLA-B35.

PERSPECTIVAS.

- 1.- Es conveniente ampliar el número de muestras de pacientes y caracterizarlas en cuanto a la tipificación de HLA-A2 y HLA-B35; para el tipo de HPV-16 y 18 y las variantes Asiático Americanas encontradas en estas muestras; así como para los estadios clínicos en los que se encuentren las pacientes, con la finalidad de correlacionar la antigenicidad de los epítopes identificados en este estudio.
- 2.- Asimismo sería conveniente contar con un grupo de mujeres control (sanas) libres de infección con HPV, tipificadas mediante pruebas de PCR, captura de híbridos etc, además de la prueba negativa de Papanicolaou.
- 3.- Determinar si estos epítopes identificados a través de la proliferación de linfocitos T de las pacientes, son capaces de inducir citotoxicidad específica contra células tumorales o células presentadoras de estos antígenos.
- 4.- Con base a las propiedades químicas de los péptidos identificados de las variantes y sus homólogos de las secuencias prototipo, analizar su inmunogenicidad *in vivo* e *in Vitro*.

BIBLIOGRAFIA.

**Abbas A.K., Lichtman A.H., and Pober J.S. (2000). Cellular and molecular immunology. W B saunders company. 4-8, 63-161,291-335.

*Acosta A. A. (2002). Identificación de péptidos inmunogénicos de la proteína L1 del HPV-16 y 18 para los alelos HLA-A y B de pacientes con cáncer cérvicouterino. Tesis UNAM. 41.

**Alexander M., Salgaller M. L., Celis E. S. A., Barnes W. A., Rosenberg S. A. and Steller Michael A. (1996). Generation of tumor-specific cytolytic T lymphocytes from peripheral blood of cervical cancer patients by in vitro stimulation with a synthetic human papillomavirus type 16 E7 epitope. Am J Obstet Gynecol. 175:1586-1593.

**Aultman D., Adamashvili I., Yaturu K., Langford M., Gelder F., Gautreaux M., Ghali G. E. and Mcdonald John. (1999) Soluble HLA in human body fluids. Hum Immunol. 60: 239-244.

**Bednarek M. A., Sauma S. Y., Gammon M. C., Porter G., Tamhankar S., Williamson A. R., Zweerink H. J. (1991). The minimum peptide epitope from the influenza virus matrix protein. J Immunol. 147:4047-4053.

**Bergeron C., Barrasso R., Beaudenon S., Flamant P., Croissant O. and Orth G. (1992). Human papillomaviruses associated with cervical intraepithelial neoplasia: Great diversity and distinct distribution in low-and high-grade lesions. Am J Surg Pathol. 16:641-649.

**Bernard H. U., Chan S. Y., Manos M. M., Ong C. K., Villa L. L., Delius H., Peyton C. L., Bauer H. M. and Wheeler C. M. (1994). Identification and assesment of know and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment lenght polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. J Infect Dis. 170:1077-1085.

**Berumen J., Ordoñez R.M., Lazcano E., Salmeron J., Galván S.C., Estrada R.A., Yunes E., Garcia-Carranca A., González-Lira G., and Madrigal-De la Campa. (2001). Asian-american variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. J Natl Cancer Institut. 93:1325-1330.

****Bible J.M., Mant Ch. Best J.M., Kell B., Starkey W.G., Raju K.S., Seed P., Biswas Ch., Muir P., Banarvala J.E. and Cason J. (2000). Cervical lesions are associated with human papillomavirus type 16 intratypic variants that have high transcriptional activity and increased usage of common mammalian codons. J of Gen Virol. 81: 1517-1527.**

****Bishop J.M., and Weinberg R.A., (1996). Molecular Oncology. Nueva York Scientific American Inc. 92-95**

****Bodmer J.G., Pickbornie P. and Richard S. (1977). La serology, in Bodmer WF, Batchelor JR, Bodmer JG, et. al. Histocompatibility testing. Munksgaard, Copenhagen. 35.**

****Bodmer J.G., Marsh S.G. E., Albert E. D., Bodmer W. F., Dupont B., Erlich H.A., Mach B., Mayr W.R., Parham P., Sasazuki T., Schreuder G.M.Th., Strominger J.L., Svejgaard A. and Terasaki P.I. (1994). Nomenclature for factors of the HLA system. Tissue Antigen. 14:1-18.**

***Bontkes H.J., Van D.M., De Grujil T.D., Duggan-Keen M.F., Walboomers J.M., Stukart M.J., Verheijen R.H., Helmerhorst T.J., Meijer C.J., Scheper R.J., Stevens F.R., Dyer P.A., Sinnott P. and Stern P.L. (1998). HPV 16 infection and progression of cervical intra-epithelial neoplasia: analysis of HLA polymorphism and HPV 16 E6 sequence variants. Int J Cancer. 78:166-171.**

****Bontkes H.J., De Grull T.D., Adrie J.C., Muysenberg V. D., Verheijmeijen R.H.M., Stukart M.J., Meijer Ch.J.L.M., Scheper R.J., Stacey S.N., Duggan K.M., Stern M.L., Man S., Borysiewicz L. K. and Walboomers H.M.M. (2000). Human papillomavirus type 16 E6/ E7-specific cytotoxic T lymphocytes in women with cervical neoplasia. Int J Cancer. 88:92-98.**

****Bosch F.X., Manos M. N., Sherman M., Jansen A.M., Peto J., Schiffman M.H., Moreno V., Kurman R. and SHAH K.V. (1995). Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. J natl Cancer Inst. 87: 796-802.**

****Bourgault V. I., Beneton N., Bony C., Connan F., Monsonogo J., Bianchi A., Saiag P., Levy J. P., Guillet J. G. and Choppin J. (2000). Identification in humans of HPV-16 E6 and E7 protein epitopes recognized by cytolytic T lymphocytes in association with HLA-B18 and determination of the HLA-B18-specific binding motif. Eu J Immunol. 30:2281-2289.**

****Boyum A. (1968). Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. Scand J Clin Lab Invest. 97:31.**

****Brander C. y Walker B. (1999). Respuestas de los linfocitos T en la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana Tipo-1. Implicancias para el desarrollo de una vacuna. Curr Op Immunol. 11: 451-459.**

****Brady C.S., Duggan-Keen M.F., Davidson J.A., Varley J.M. and Stern P.L. (1999). Human papillomavirus type 16 E6 variants in cervical carcinoma: relationship to host genetic factor and clinical parameters. J Gen Virol. 80:3233-40.**

****Canaday D.H., Robert J.W., Qing L., Clifford V.H., Silver R.F. and Boom H.W. (2001) CD4+ and CD8+ T cells kill intracellular mycobacterium tuberculosis by a perforin and γ Fas/Fas ligand-independent mechanism. J Immunol. 167:2734-2742.**

- **Castellanos M.R., Roberta L.H. and Mitchell A. M. (2001). Synthetic peptides induce a cytotoxic response against human papillomavirus type-18. *Gynecol Oncol.* 82:77-83.
- **Cerdeira F.R.M., Villalobos T.M.C., Barrera S.H.A., Cortés P.L., Barajas L.O., Rivas F., Cariacedo A., Zhong Y., Barton S.A. and Chakraborty R. (2002). Genetic admixture in three mexican mestizo population based on D1S80 and HLA-DQA1 loci. *Am J H Biol.* 14:257-263.
- **Da Silva D.M., Eiben G.L., Fausch S.C., Wakabayashi M.T., Rudolf M.P., Velders M.P., and Kast W.M. (2001). Cervical cancer vaccines: emerging concepts and developments. *J Cell Phy.* 186:169-182.
- **De Anda T., Granados A. J., y Quiroz M. H. (2000). Marcadores genéticos en retinopatía diabética proliferativa en mexicanos portadores de diabetes mellitus no insulinodependientes. *An Méd H ABC.* 45:61-64.
- **De Leo C., Catelan N., López M., González M., González N., Weckman A. L., Melin Aldana H., Vargas-Alarcón G., Bordes J., Alarcón-Segovia D., Granados J., and Ramírez E. L. (1997). HLA class I and class II alleles and in mexican mestizos from serological typing of 50 families. *Hum Biol.* 69: 809-818.
- **De Villiers E.M. (1994) Human pathogenic papilloma-virus types: an update. *Curr Top Microbiol Immunol.* 186:1-12.
- **Ellis J. R. M., Keating P. J., Baird J., Hounsell E. F., Renouf D. V., Rowe M., Hopkins D., Duggan-Keen M. F., Bartholomew J. S., Young L. S. and Stern P. L. (1995). The association of an HPV-16 oncogene variant with HLA-B7 has implications for vaccine design in cervical cancer. *Nature Medicine.* 1:464-470.
- **Eschele D., Durst M., Ter M.J., Luande J., Eberhardt H.C., Pawlita M., and Gissmann L. (1992). Geographical dependence of sequence variation in the E7 gene of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol.* 73:1829-1832.
- **Evans E.M., Man A.S., and Borysiewicz L.K. (1997). Infiltration of cervical tissue with human papillomavirus-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Cancer Res.* 57:2943-2950.
- **Ferrera A., Velema J. P., Figueroa M., Bulnes R., Toro L. A., Claros J. M., De Barahona O. and Melchers W. J. G. (1999). Human papillomavirus infection, cervical dysplasia and invasive cervical cancer in Honduras: a case-control study. *Int J Cancer* 82:799-803.
- **Franco E.L. (1995). Cancer causes revisited: Human papillomavirus and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* 87:779-780.
- **Fujinaga Y., Okazawa K., Nishikawa A., Yamakawa Y., Fukushima M., Kato I., and Fujinaga K. (1994). Sequence variation of human papillomavirus type 16 E7 in preinvasive and invasive cervical neoplasias. *Virus Genes.* 9:85-92.
- **Fu X.L., Carter J.J., Galloway D.A., Kuypers J., Hughes J.P., Kuang L.S., Adam D.E., Kiviat N.B. and Koutsky L.A. (2002). Acquisition and natural history of human68

papillomavirus type 16 variant infection among a cohort of female university students. *cancer epidemiology biomarkers y prevention*. 11: 343-351.

**Galloway D.A. (2003). Papillomavirus vaccines in clinical trials. *Reviews. The Lancet*. 3:469-475.

**Gariglio P., Ocadiz R. and Saucedo R. (1987) Human papilloma virus DNA sequences and c-myc oncogene alterations in uterine-cervix carcinoma. *Cancer Cells*. 5:342-348.

**Gariglio P. y Range! L.M. (1992). Virus y cáncer. *Salud Pública México*. 34: 308-317.

**Gariglio P. and Salcedo M. (1993). Molecular genetics of uterine cervix carcinoma involvement of C-MYC oncogene. En XVII world congress of anatomic and clinical pathology. G. G. Santoscopy Monduzzi. 295-300.

**Gómez-Casado E., Vargas-Alarcón G., and Martínez-Laso J. et al. (1997). Generation of a novel HLA-B35, -B5, -B16, and B15 groups of alleles studied by intron 1 and 2 sequence analysis. *Inmunogenetics*. 46:469-476.

**Gousepohl H., Kraft M., Boulin C., and Frank R.W. (1990). In proceedings of the 11th American Peptide Symposium. Leiden. 1.10

**Guzmán-Rojas L., Alcocer-González J. M., y Madrid M. V. (1998). Perspectivas para el desarrollo de vacunas e inmunoterapia contra el cáncer cérvicouterino. *Salud Pública México*. 40:38-46.

**Gromme M., and Neeffes J. (2002). Antigen degradation or presentation by MHC class I molecules via classical and non-classical pathways. *Mol Immunol*. 39:181-202.

**Grakoui A., Bromley S. K., Sumen C., Davis M.M., Shaw A.S., Allen P.M., Dustin M.L., Harley C.B., and Vileponteau B. (1999). Telomeres and telomerase in aging and cancer. *Curr Opin Genetics Dev*. 5:249-255.

**Herrero R., Hildesheim A., Bratti C., Sherman M. E., Hutchinson M., Morales J., Balmaceda I., Greenberg M. D., alfaro M., Burk R. D., Wacholder S., Plummer M. And Schiffman M. (2000). Population based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Natl Cancer Inst*. 92:464-474.

**Hildesheim A. and Sophia S.W. (2002). Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review. *Virus Research*. 89:229-240.

**Hilders C.G., Houbiers J.G., Krul E.J., and Fleuren G.J. (1994). That MHC-I down-regulation in cervical carcinomas involves post-transcriptional mechanisms, not directly related to E7 transcription and overexpression of c-myc. *Am J Clin pathology*. 101(1):5-12.

**Hilders C.G., Muñoz I.M., Nooyen Y., and Fleuren G.J. (1995). Altered HLA expression by metastatic cervical carcinoma cells as factor in impaired immune surveillance. *Gynecol Oncol*. 57:366-375.

**Ho L., Chan S.Y., Burk R. D., Das B. C., Fujinaga K., Icenogle P. J., Kahn T., Kiviat N., Lancaster W., Mavromara-Nazos P., Labropouton V., Mitrani-Rosenbaum S., Norrild M., M. Pillai R., Stoerker J., Syrjanen K., Tay S.K., Villa L.L., Wheeler C.M., Williamson A. L., and Bernard H.U. (1993). The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human population. *J Virol.* 67:6413-6423.

**Ho G.Y., Tay S.K, Chan S.Y. and Bernard H.U. (1993). Sequence variants of human papillomavirus type 16 from couples suggest sexual transmission with low infectivity and polyclonality in genital neoplasia. *J of Inf Dis.* 168: 803-809.

**Howley P.M. B.N, and Knipe D.M. (1996). Papillomavirinae: The viruses and Their replication : in fields. *Fields Virology.* 2045-2076.

**Hubert W.G. and Laimonis A.L. (2001). The Action of E6 yE7 of human Papillomaviruses in cellular Immortalitation and Transformation. *Mechanisms of DNA Tumor Virus Transformation. Monogr Virol Basel Karger.* 23: 44-63.

**Jayaraman L. and Prives C. (1995). Activation of p53 sequence- specific DNA binding by short single strands of DNA requierres the p53 C-terminus. *Cell.* 81:1021-1029.

**Janeway C.A., Travers P., and Walport M.S. (2001). *Immunobiology: The immune system in health and disease.* Churchill Livingstone and Garland Publishing. 1-76.

**Jacobs M. V., Walboomers J. M., Snijders P. J. F., Voorhorst F. J., Verheijen R. H. M., Fransen-Daalmeijer N., and Meijer C. J. L. M. (2000). Distribution of 37 mucosotropic HPV types in women with cytologically normal cervical smears: The age-related patterns for high-risk and low-risk types. *Int J Cancer.* 87:221-227.

**Kammer Ch., Warthors U., Torrez M.N., Wheeler C.M. and Pfister H. (2000). Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants an functional consequences for p97 promoter activity. *J Gen Virol.* 81:1975-1986.

**Kast W.M, Brandt R. M.P., Sidney J., Drifhout J. W., Kubo R. T., Grey H. M., Melief C. J. M., and Sette A. (1994). Role of HLA-A motifs in identification of potencial CTL epitopes in human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins. *J Immunol.* 152:3904-3912.

**Kirnbauer R., Booy F., Cheng N., Lowy D. R. and Schiller J. T. (1992). Papillomavirus L1 major protein self-assembles into virus -like particles that are highly immunogenic. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 89:12180-12184.

**Kirnbauer R., Tabú J., Greenstone H., Roden R., Durst M., Gissman L., Lowy D. R. and Schiller J. T. (1993). Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J Virol.* 67:6929-6936.

**Laimins L. A. (1998). Regulation of transcription and replication by human papillomaviruses. *Human Tumor Viruses.* 201-223.

**Lee S., Elenbaas B., Levine A. and Griffith J., (1995). p53 and its 14 kDa Germinal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches. *Cell.* 81:1013-1020.

**Levine A. J. Momand J. and Finlay C.A. (1991). The p53 tumor suppressor gene. *Nature*. 351:453-456.

**Lizano M., Berumen J., Guido M. C., Casas L., y García Carranca. A. (1997). Association Between Human Papillomavirus Type 18 Variants and Histopatology of Cervical Cancer. *J of the Nat Can Inst*. 89:1227-1231.

**Lizano M., García Carranca A. (1997). Molecular variants of human papillomaviruses type 16, 18, and 45 in tumor of the uterine cervix in Mexico. *Gac Med Mex*. 1:43-48.

**Londesborough P. Ho L. Terry G. Cuzick J. Wheeler C. and Singer A. (1996). Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities. *Int J Can*. 69:364-368.

**Long J. R., Williams J., and Mc-Auley E. (1991). Genetic variation in Arizona Mexican Americans: Estimation and interpretation of admixture proportions. *Am J Phys Anthropol*. 84:141-157.

**Lorinz A. T., Reid R., Jason B., Greenberg M. D., Lancaster W., and Kurman R. J. (1992). Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol*. 79:328-337.

**Marsh S.G.E., Parham P., and Barber L.D. (2000). The HLA factsbook. Academic Press. 61-84.

**Manos M., Ting Y., Wrigth D., Lewis A., Broker T., and Wolinsky S. (1989). The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells*. 7:209-214.

**Matsukura T. and Sugase M. (2001). Relationships between 80 human papillomavirus genotypes and different grades of cervical intraepithelial neoplasia: Association and causality. *Virol*. 283:139-147.

**Monroy G., Weiss S., Hernández M., Ortiz Navarrete V. F., Bañuelos P., Acosta A. A., Díaz Q., López G., Herbert G., Granados J., De Leo C., Silva L. R. M., and Mora G.M.L. (2002). Identification of two homologous antigenic peptides derived from L1 HPV- 16 and 18 proteins specific for the HLA-B*3901 allele. *Archives of Virol*. 147:1933-1942.

**Morera B. L. M., Marsan S. V., Villaescusa B. R., Guerreiro H. A. M., Figueredo R. M. y Roque A. M. C. (1997). HLA y leucemias. Estudio de 144 casos. *Rev Cub Hematol Inmunol Hemoter*. 13:27-37.

**Morera B. L. M., Ricardo L. R., Hernández G., Martínez L. Z. C., Guerreiro H. A. M. y Agüero M. M. (1999). Glaucoma primario de ángulo abierto y HLA B35. *Rev Cub Hematol Inmunol Hemoter*. 15:1-5.

**Muderspach L., Sharon W., Linda R., Liz B., Juan F., Small L.A., Martin K. W., Grace F., Verna M. and Jeffrey W. (2000). A phase I trial of a human papillomavirus (HPV) peptide

vaccine for women with high-grade cervical and vulvar intraepithelial neoplasia who are HPV 16 positive. *Clin Can Res.* 6:3406-3416.

**Munoz N. (2000). Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol.* 19:1-5.

**Myers G., Lu H., Calef Ch. and Leitner T. Heterogeneity of papillomaviruses. (1996). *Seminars in Cancer Biology.* 7:349-358.

**Nindl I., Rindfleisch K., Lotz B., Schneider A., and Durst M. (1999). Uniform distribution of HPV 16 E6 and E7 variants in patients with normal histology, cervical intra-epithelial neoplasia and cervical cancer. *Int J Cancer.* 82:203-7

**Nussbaum A. K, Kuttler Ch., Tenzer S. and Hansjorg S. (2003). Using the world wide web for predicting CTL epitopes. *Curr Op In Immunol.* 15: 69-74.

**Ohlschlager P., Osen W., Dell K., Faath S., Garcea R. L., Jochmus I., Muller M., Pawlita M., Schafer K., Sehi P., Staib C., Sutter G, and Lutz G. (2003). Human papillomavirus type 16 L1 capsome es induceli-specific cytotoxic T lymphocytes and tumor regression in C57 BL/6 Mice. *J Virol.* 8: 4635-4645.

**O'Brien P. M., and Saveria C. M. (2002). Evasion of host immunity directed by papillomavirus-encoded proteins. *Virus Research.* 88: 103-117.

**Orozco E. y Gariglio P. (2000). Genética y biomedicina molecular. Orozco E. Gariglio P., Orozco L. y López Revilla R. IPN, Limusa. 181-198.

**Pandey M., Mathew A. and Nair M. K. (1999). Cancer vaccines: a step towards prevention and treatment of cancer. *Eur J Surgical Oncol.* 25:209-214.

**Parker K. C., Bednarek M. A., and Coligan J. E. (1994). Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J. Immunol.* 152:163.

**Passmore S., Jo-Ann B. V. C., Shepard G. Enid., Marais J. D., Bruce A., Kay P., Rose C. R., and Williamson A. L. (2002). Single-cell cytokine analysis allows detection of cervical T-cell responses against human papillomavirus type 16 L1 in women ifected with genital HPV. *J Med Virol.* 67:234-240.

**Picconi M. A., Alonio L. V., Garcia C. A. et al. (2000). Variantes moleculares de virus papiloma humano (HPV) tipo 16 y 18 en adenocarcinoma de cerviz. *Medicina.* 60: 889-894.

**Picconi M. A., Gronda J., Alonio L. V., Sichero L., Miranda S., Barcena M., and Teyssie A., (2002). Virus papiloma humano en mujeres quechuas jujeñas con alta frecuencia de cáncer de cuello uterino, tipos virales y variantes de HPV 16. *Medicina Argentina.* 3:209-220.

**Rammensee J. B., Niels N. E., Alexander B. O., and Stevanovic S. (1999). SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50: 213-219.

**Rammensee H.-G., Friede T., and Stefan S. (1995). MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics*. 41: 178-228.

**Ritz U., Momburg F., Pilch H., Huber C., Maeurer M. J. and Seliger B. (2001). Deficient expression of components of the MHC class I antigen processing machinery in human cervical carcinoma. *International J Oncology*. 19:1211-1220.

**Riethmuller D., Gay C., Bertrand X., Bettinger D., Schalaal J.P., Carbillet J.P., Lassabe C., Arveux P., Seilles E., and Mouglin C. (1999). Genital human papillomavirus infection among women recruited for routine cervical cancer screening or for colposcopy determined by hybrid capture II and polymerase chain reaction. *Americ J Surgical pathol*. 8:157-64.

**Roitt I., Brostoff J., and Male D. (2001). *Immunology sixth edition*. Mosby. 87-97,105-115,174.

**Rojas Espinosa O. (1996). *Inmunología*. Editorial Médica Panamericana. 17-56,175-177.

**Rogers P. R., Dubey C. and Swain S. L. (2000). Qualitative changes accompany memory T cell generation: faster, more effective responses at lower doses of antigen. *J Immunol*. 164:2338-2346.

**Rudolf M. P., Man S., Melief C. J. M., Sette A., and Kast W. M. (2001). Human T-cell responses to HLA-A restricted high binding affinity peptides of human papillomavirus type 18 proteins E6 and E7. *Clin Cancer Research*. 788-794.

**Ruppert J., Sidney J., Esteban C., Kubo R. T., Grey H. M., and Sette A. (1993). Prominent role of secondary anchor residues in peptide binding to HLA-A2.1. *Mol Cell*. 74:929-938.

**Salit Rachel B., Kast W. Martin and Velders Markwin P. (2002). Ins and outs of clinical trials with peptide-based vaccines. *Frontiers in Bioscience*. 7:204-213.

**Sancllemente Gloria. (2003). Lo que los clínicos deben saber acerca de las vacunas contra el virus del papiloma humano. *Gac Méd Méx*. 139:173-183.

**Scaffidi C., Kirchhoff S., Krammer P. H., and Peter M. E. (1999). Apoptosis signaling in lymphocytes. *Curr Op Immunol*. 11:277-285.

**Seliger B., Maeurer M. J. and Ferrone S. (2000). Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. *Inmunol Today*. 21:455-463.

**Silva B., Vargas-Alarcón G., Zúñiga R. J., Rodríguez R. T., Hosannilla N., Kofman S., Torres L. A., and Granados J. (1999). Genetic features of mexican women predisposing to cancer of the uterine cervix. *Hum Pathol*. 30:626-628.

**Song Y. S., Kee S. H., Kim J. W., Park N. H., Kang S. B., Chang W. H., and Lee H. P. (1997). Major sequence variants in E7 gene of human papillomavirus type 16 from

cervical cancerous and noncancerous lesions of Korean women. *Gynecol Oncol.* 2:275-81.

**Stites M. D., Daniel P., Terr M.D. Abba I., and Parslow T. G. (2000). *Inmunología básica y clínica*. Editorial el Manual Moderno. 21-165.

**Stoppler H., Stoppler M. C., Jonson E., Simbulan-Rosenthal C. M., Smulson M. E., and Lyer S. (1998). The E7 protein of human papillomavirus type 16 sensitizes primary human keratinocytes to apoptosis. *Oncogene.* 17:1207-1214.

**Terasaki P.I., Bernoco D.D., Park M.S. (1978). Microdroplet testing for HLA-A, B, C and D antigens. *Am J Clin Pathol.* 69:103-120.

**Terasaki P. I., and McClelland J.D. (1964). Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature.* 204:998.

**Torroella-Kouri M., Morsberger S., Carrillo A., Mohar A., Meneses A., Margarita I., Richard W. D., Ghaffari A. M., Gilberto S. and Shah K. V. (1998). HPV prevalence among mexican women with neoplastic and normal cervixes. *Ginecol Oncol.* 70:115-120.

**Toshihiko M. and Motoyasu S. (2001). Relation between 80 human papillomavirus genotypes and different grades of cervical intraepithelial neoplasia: association and causality. *Virology.* 283:138-147.

**Vaeteewoottacharn K., Jearanaikoon P., and Ponglikitmongkol M. (2003). Co-mutation of HPV-16 E6 and E7 genes in thai Squamous cervical carcinomas. *Anticancer Research.* 23:1927-31.

**Van Leeuwen J. E. M. and Samelson L. E. (1999). T cell antigen- receptor signal transduction. *Curr Op Immunol.* 11:242-248.

**Van Ranst, Tachezy R., Delius H., and Burk R. D. (1993). Taxonomy of the human papillomavirus. *Papilloma-virus Rep.* 4: 61-65.

**Vargas-Alarcón G., Hernández P. G., Rodríguez P. J. M., Pérez H. N., Zúñiga J., Martínez L. J., Arnaiz V., and Granados J. (2003). Distribution of HLA-B alleles in mexican amerindian population. *Inmunogenetics.* 54:756-60.

**Vargas-Alarcón G., Martínez-Laso J., and Granados J., (1996). Description of a Novel HLA-B35 (B*3514) Allele found in a mexican of Nahua(Aztec) descent. *Hum Immunol.* 45:148-151.

**Vargas-Alarcón G., Álvarez M., and Martínez-Laso J., (1996). A new HLA-B35 (B*3516) allele found in a mexican of nahua (aztec) descent. *Immunogenetics.* 43:244-245.

**Vargas Alarcón G., Martínez-Laso J., and Gómez-Casado E. (1996). A novel HLA-B35(B*3517) allele found in a mexican of otomi descent. *Tissue Antigens* 47:547-550.

**Veress G., Skarka K., Dong X. P., Gergely L. and Pfiser H. (1999). Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16. *J General Virol.* 80:1035-1043.

**Villa L. L., Laura S., Rahal P., Caballero O., Ferenczy A., Rohan T. and Franco E. J. (2000). Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J General Virol.* 81:2959-2968.

**Walboomers J. M., Jacobs M. V., Manos M. M., Bosch F. X., Kummer J. A., Shah K. V., Snijders P. J., Meijer C. J., and Muñoz N. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer world wide. *J Pathol.* 1:12-9.

**Weckman A. L., Granados J., Cardiel M. H., Andrade F., Vargas Alarcón G., Alcocer V. J., and Alarcón S. D. (1999). Immunogenetics of mixed connective tissue disease in a mexican mestizo population. *Clinical and experimental rheumatology.* 17:91-4

*Weckman A. L., Vargas-Alarcón G., López M., et. al. (1997). Frequency of HLA-A, and HLA-B alleles in a mexico city mestizo group. *Am J Hum Biol.* 9:1-5.

**Wheeler C. and Icenogle J. (1995). A closer look at papillomavirus variants. 41-45.

**Xi L. F., Kutsy L. A., Galloway D. A., Kuypers J., Hughes J. P., Wheeler C. M., Holmes K. K. and Kiviat N. B. (1997). Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Nat Cancer Institute.* 89:796-802.

**Yamada T., Wheeler C. M., Halpern A. L., Stewart Ann-Charlotte M., Hildesheim A., and Jansen S. A. (1995). Human papillomavirus type 16 variant lineages in united states population characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments. *J Virol.* 69:7743-7753.

**Yamada T., Manos M. M., Peto J., Creer C. E., Muñoz N., Bosch X. F., and Wheeler C. M. (1997). Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspectiva. *J Virol.* 71:2463-2472.

**Yoon H, Chung Mi-K, Sung-Shik M., Lee G. H., Yoo D. W., Chung K. T., Noh-Pal J., and Sue N. P. (1998). Synthetic peptides of human papillomavirus type 18 E6 harboring HLA-A2.1 motif can induce peptide- specific cytotoxic T- cell from peripheral blood mononuclear cells of healthy donors. *Virus Research.* 54:23-29.

**Youde S. J., Dunbar P. R. Rod., Evans E. M. L., Fiander A. N., Borysiewicz L. K. Cerundolo V., and Man S. (2000). Use of fluorogenic histocompatibility leukocyte antigen-A *0201/HPV 16 E7 peptide complexes to isolate rare human cytotoxic T-lymphocyte recognizing endogenous human papillomavirus antigens. *Cancer Research.* 60:365-371.

**Zur Hausen H. (1999). Papillomaviruses in human cancers. *Poc Assoc Am Physicians.* 111:1-7.

**Zur Hausen H. (2000). Papillomaviruses causing cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J National Cancer Institute.* 92: 690-698.

**www.bimas.dcrf.nih.gov/molbio/hla_bind/

**www.bio.pvc/curso/bio145ab/b14505/51d005.htm

**www.cdcnpin.org/scripts/std.asp.

**www.hawaii.edu/hpv/cervical_cancer-info.html.

**papanicolau.hpv_abbB.html.

**www.SSA.gob.mx 2001.

**www.guanajuato.gob.mx/ssg/cogusida/elvirus.htm

**www.fmedic.unr.edu.ar/catedras/inmunologia

**www.unizh.ch/pathol/hpvnachweis.html.