



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

**CARRERA DE QUÍMICO FARMACEÚTICO
BIÓLOGO**

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN
CELULAR Y CÁNCER.

“DETERMINACIÓN DE LAS PROTEÍNAS MICA Y
MICB EN CÉLULAS PROVENIENTES DE CÁNCER
DE CÉRVIX”

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO

P R E S E T A N:

**CLAUDIA MENDOZA RODRÍGUEZ
SAMUEL BAUTISTA CASTILLO**

UNAM
FES
ZARAGOZA

DIRECTOR DE TESIS:
DR. JORGE FLAVIO MENDOZA RINCÓN

ASESORA:
DRA. ISABEL SOTO CRUZ

México 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.

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE ONCOLOGÍA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y CÁNCER DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA" UNAM, BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. JORGE FLAVIO MENDOZA RINCÓN Y LA ASESORÍA DE LA DRA. ISABEL SOTO CRUZ

DURANTE LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO SE CONTÓ CON EL APOYO ECONOMICO DE UN BECA COMPLETA PARA TESIS DE LICENCIATURA. EL PROYECTO RECIBIÓ APOYO FINANCIERO DE CONACYT (P 41793)

AGRADECIMIENTOS

- *Al Dr. Jorge Flavio Mendoza Rincón, por brindarnos la oportunidad de participar en el proyecto y de esta manera poder desarrollar otra fase de nuestra carrera.*
- *A la Dra. Isabel Soto Cruz, por su invaluable apoyo en cuanto a la realización de las técnicas empleadas, así como a la enorme paciencia que tuvo para con nosotros.*
- *A los sinodales del jurado por sus aportaciones para la realización de este trabajo:*

Dra. Rosalinda Escalante Pliego

QFB. Hugo leynes celiseo

Dr. Alberto Monroy García

DEDICATORIA

- *A todos y cada uno de los profesores que tuvimos a lo largo de la carrera, ya que gracias a ellos pudimos realizar uno de los logros más importantes en nuestra vida.*
- *A nuestras familias, porque sin su apoyo en los momentos más difíciles, jamás hubiéramos podido terminar el camino que comenzó hace 9 años.*
- *A nuestros contadísimos amigos por las vivencias compartidas y porque siempre fueron ejemplo a seguir: Juan Carlos Valera Rojas, Ricardo A. Rovelo Martínez, Xochitl Moreno Morales, Claudia S. Zetina Flores, Javier Frausto Cabrera, Lugo Hernández Sandra.*
- *Y de una manera especial a nuestros hijos: Angela Beatriz Bautista Mendoza y Saúl Bautista Mendoza, por que todo el esfuerzo siempre fue pensando en ellos. Gracias por llegar a nuestras vidas.*

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
MARCO TEORICO	
Cáncer cervicouterino y el Virus del papiloma Humano (VPH)	3
Virus del papiloma Humano (VPH)	4
Sistema Inmunológico	7
El complejo mayor de histocompatibilidad (MHC)	8
Los genes MIC	9
Las proteínas MIC y la respuesta inmune	12
NKG2D: un receptor para las proteínas MIC	13
Polimorfismo de MICA en células derivadas de pacientes con Carcinoma de Cérvix.	17
Planteamiento del problema	18
Objetivos	19
Hipótesis	19
Diseño de investigación	19
Población	20
Criterios de inclusión y variable	20
METODOLOGIA	21
RESULTADOS	28
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	38
CONCLUSIONES	40
PERSPECTIVAS	40
APÉNDICE	41
BIBLIOGRAFÍA	45

RESUMEN

La similitud de los genes de la familia MIC con los del MHC-I encontrada en varios mamíferos, refuerzan la idea de que los genes MIC tienen una función importante en la respuesta inmune. Estas proteínas funcionan como marcadores de estrés fisiológico, por lo que se pretendió en el presente trabajo encontrar una posible relación entre el VPH y la presencia de las proteínas MIC. Para este fin se utilizaron líneas provenientes de cáncer de cérvix infectadas con el VPH-16 (CasKi, SiHa) y el VPH-18 (Calo, Inbl, Rova) utilizando como controles las líneas VIbo y C-33A provenientes también de cáncer de cérvix pero negativas para el VPH. Los resultados obtenidos son alentadores, se encontró que las diferentes células expresan las proteínas MIC y parece ser que no existe relación alguna entre la producción de las proteínas MIC y el VPH, pues estas se presentan ya sea en células infectadas con VPH-16 y 18 así como en controles negativos. Sin embargo un dato sumamente interesante es el hecho de que en los sobrenadantes de las diferentes líneas se encontró que existe una forma soluble de las proteínas de estrés fisiológico. Este hallazgo podría explicar el hecho de que se pueda desarrollar este tipo de neoplasia aún estando presentes las proteínas MIC, cuya misión principal es la de alertar a las células encargadas de eliminar a las células infectadas por virus y/o tumorales.

INTRODUCCIÓN

Mucho se ha avanzado en el conocimiento de la biología de los genes MIC (MHC class I Chain related genes) desde su primera descripción hace 8 años. En un inicio, la expresión de las proteínas MICA y MICB se demostró claramente en células de origen epitelial o fibroblástico. Sin embargo, la función biológica de la expresión de estas proteínas en células de tejido epitelial o conectivo no era del todo clara. Estudios posteriores han demostrado que las proteínas MIC pueden considerarse como proteínas de estrés fisiológico ya que su expresión está regulada por proteínas de choque térmico. Así también la importancia que en los últimos tiempos han adquirido estas proteínas es debido al hecho de que su expresión se ve aumentada en células infectadas por virus y/o bacterias, así como en una gran variedad de células tumorales tales como: pulmón, mama, ovario, riñón, colon y próstata.

Más recientemente, otros estudios han dado evidencias de que el citomegalovirus humano (HCMV; por sus siglas en inglés) provoca una sobreexpresión de la proteína MICA, aunque este hecho no es suficiente para originar una respuesta de las principales células de reconocimiento de estas proteínas, las células NK, ya que el HCMV utiliza otros mecanismos biológicos para evitar el reconocimiento por células NK.

MARCO TEÓRICO

Cáncer cérvicouterino y el Virus del papiloma Humano (VPH)

El cáncer de cérvix (CC) es el segundo tipo de cáncer más común en mujeres. Se estima que entre el 20 y el 40% de mujeres jóvenes sexualmente activas ha sufrido una infección por el virus del papiloma humano (Bosch et al., 1995) y en tiempos más recientes este porcentaje ha incrementado a casi el 50%. La incidencia es de 10 por cada 100,000 en ciudades industrializadas y más de 40 por cada 100,000 en algunas ciudades en desarrollo (Bosch et al., 1995). Se ha estimado que se presentan cerca de 500,000 casos nuevos de CC cada año (Torroella-Kouri et al., 1998), de los cuales cerca del 81% se presenta en los países en vías de desarrollo (Drain et al., 2002). Una de las regiones del mundo con alta incidencia de CC es Latinoamérica, siendo en México el cáncer más común entre las mujeres. Entre 1993 y 1994 se detectaron un total de 9135 de casos de CC sin metástasis y 16,442 con metástasis en la ciudad de México (Salud pública de México 1999)

Estudios epidemiológicos han mostrado que el virus del papiloma humano (VPH) parece jugar un papel muy importante en el desarrollo de este tipo de neoplasia, de hecho, esta asociación es más fuerte que la que pudiera existir entre fumar y padecer cáncer de pulmón. El IBSCC (internacional biological study of cervical cancer) demostró que el DNA del VPH es detectado en casi el 93 % de los casos de cáncer invasivo en el mundo (Bosch et al., 1995), aunque en otros estudios se ha encontrado que el VPH se encuentra hasta en un 99.7 % en personas que sufren de CC. (Walbommers, et al., 1999)

Estudios por el método de PCR han revelado la presencia del VPH en muestras de células exfoliativas provenientes de cérvix en mujeres cuyos frotis no presentaron alguna anormalidad: Washington D.C. (33.7%) (Hildesheim et al., 1993); Nuevo México (44.3%) (Wheeler et al., 1993); Pórtland, Oregon (17.7%) (Bauer et al., 1993) y New Jersey (27.8%) (Burk et al., 1996). Estudios similares en México han indicado que cerca del 17% de mujeres que aparentemente no presentaban alguna anormalidad por citología o colposcopia fueron positivas para el VPH (Torroella-Kouri et al., 1998). Estos estudios establecieron que el VPH es el virus más común transmitido por vía sexual con un alto grado de prevalencia en mujeres menores de 24 años.

En México el CC sigue siendo un problema grande de salud pública, en los pasados 25 años la mortalidad debida a este mal permaneció constante con una ligera variación de 16.9 por cada 100 000 mujeres en 1980 a 17.1 por cada 100 000 mujeres en 1997 (Salud pública de México 1999). Se estima que cada año fallecen más de 4000 mujeres en nuestro país (Hernández et al., 1998) (Lazcano et al., 1997) con un estimado de 5.2 personas por cada 100,000 (SSA 1996). Reportes epidemiológicos dados a conocer por el IMSS indicaron que en 1995 el CC ocupó el primer lugar en mujeres que fallecieron por algún tipo de cáncer (Salmerón et al., 1997).

En 1985 la incidencia CC invasivo era de 40 nuevos casos por cada 100 000 y para 1997 hubo un aumento de hasta 50 nuevos casos por cada 100 000 (Hernández et al., 1998) (Lazcano et al., 1997). Un dato alarmante es que el 90% de los casos de CC pudieron haber sido detectados mediante la prueba del papanicolau.

Virus del papiloma Humano (VPH)

Existen más de 120 tipos del virus del papiloma humano (VPH) que han sido identificados de los cuales, cerca de 40 tipos han sido asociados con infección del tracto genital (Drain et al., 2002). Se ha encontrado que los subtipos más comunes del VPH involucrados con CC son el VPH-16 el cual es el causante de casi el 50% de los casos, seguido por el VPH-18 con un 18% (Bosch et al, 1995). Otros tipos han sido identificados por regiones geográficas, tal es el caso del VPH -31, -33, -39, -45, -52 -58 , -59 y -69 (Bosh et al., 1995; Drain et al., 2002; Zur Hausen 2000). Los subtipos más comunes en América latina son el HPV -16, -18, -33, -39, -58 y -59 (Touzé et al., 2001).

Un pequeño porcentaje de los casos de CC dan resultados negativos en cuanto a la presencia de DNA del VPH, pero existe la posibilidad de que estos casos sea causado por algún subtipo aún no identificado del VPH (Tomasino et al., 2003). Estudios realizados en México, han revelado que el patrón de distribución del HPV es similar al de otras partes del mundo., ya que casi el 87% de los casos de cáncer invasivos son positivos para algún tipo de VPH, siendo el VPH-16 el causante de cerca de la mitad de los casos de cáncer cérvix, seguido por el VPH-18 y VPH-45 que ocupan el segundo y tercer lugar respectivamente (Torroella-Kouri et al., 1998). Sin embargo estudios un poco más recientes reportan una variedad más amplia de tipos del VPH causantes de CC.

Son 15 los tipos considerados como de alto riesgo: VPH-16, 18, 31,33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82; como de probable riesgo: VPH- 26, 53 y 66. y por último los de bajo riesgo: VPH- 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 y CP6108. (Muñoz et al., 2003)

El VPH es un virus con ADN de doble cadena incluido en la familia Papoviridae. El VPH está relacionado por sus propiedades filogenéticas y biológicas con otros papilomavirus animales, los cuales son específicos para otros hospedadores vertebrados, incluyendo anfibios, reptiles, pájaros y una amplia variedad de mamíferos terrestres y marinos.

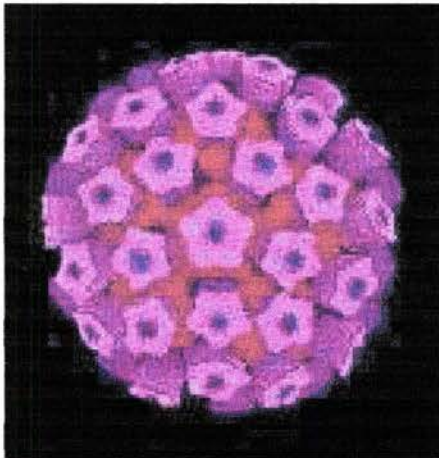


Figura 1. Dibujo del aspecto de la Cápside icosaédrica de un VPH, observándose las unidades pentaméricas

El DNA consta de 7800-7900 pares de bases envuelta en una cápside icosaédrica (Wolf et al., 2001) de naturaleza proteica y no tiene membrana de envoltura. El genoma está organizado en tres regiones: una región de control de la replicación y de la transcripción URR (upstream regulatory region), una región temprana ER (early region) y una región tardía LR (later region) (Bosch et al., 2002).

La proteína E6 influye en el destino de la célula infectada por VPH. La vida media de una célula está regulada por una programación genética determinada y las condiciones ambientales que le rodean. Las células se diferencian para poder realizar una función específica, tras la cual mueren sin mecanismos que regulen su muerte (senescencia) o de forma programada (apoptosis). La proteína E6 de VPH es capaz de evitar la apoptosis de las células infectadas formando complejos con una proteína celular (E6-AP) y uniéndose a p53, una proteína supresora de tumores, a la cual degrada. La inactivación de p53 inhibe la apoptosis y permite que la célula siga viva y facilita que el virus complete su ciclo vital (Bosch et al., 2002).

La región LR consta de dos fragmentos: L1 y L2. La primera codifica para el péptido mayor de la cápside, mientras que L2 para un péptido más pequeño, también componente de la cápside (Mark et al., 2002) (tabla1).

GEN	FUNCION
E1	Iniciación de la replicación del ADN
E2	Regulación transcripcional y replicación del ADN
E4	Ruptura del citoesqueleto
E5	Proteína transformante que interactúa con receptores de factores de crecimiento
E6	E6 Proteína transformante, se une a p53, e induce su degradación
E7	Proteína transformante, se une a p105RB y libera el factor de transcripción EF2
L1	Proteína mayor de la cápside
L2	Proteína menor de la cápside

Tabla 1. Principales funciones de las proteínas codificadas por los genes del VPH

La integración del genoma viral en la célula huésped puede tener implicación en la transformación celular, perpetuación y de la transformación fenotípica, así como también en la progresión del tumor (Mark et al., 2002). Numerosos estudios han revelado la gran importancia que tienen las proteínas E6 y E7 en el desarrollo de neoplasias (Tommasino et al., 2003), ya que afectan profundamente la acción de las proteínas supresoras de tumor p53 y p105Rb (Tabla 1). Estas proteínas supresoras de tumor normalmente controlan rutas de señalización que regulan el ciclo celular, además de que monitorean y protegen la integridad del genoma (Goodwin et al., 2000).

Sistema Inmunológico

El sistema inmunológico es mucho más difuso que cualquier otro órgano, sin embargo, muestra una unidad funcional bien integrada. Como órganos que participan en el sistema están: la médula ósea, el timo, los vasos y ganglios linfáticos, el bazo y las amígdalas. (Curtis et al., 1996)

La respuesta del sistema inmunológico a invasores externos se diferencia de otras defensas del cuerpo en que es muy específico e implica el reconocimiento del organismo atacante y el montaje de un ataque especialmente dirigido hacia él. Esta respuesta inmunológica consta de dos fases:

Respuesta natural o inespecífica. Es la que se lleva a cabo por las barreras naturales tales como la piel, mucosas, sudor, lágrimas, saliva y la respuesta inflamatoria. Las funciones que desempeñan no son dirigidas a un agente patógeno en especial, de ahí el nombre de inespecífica. (Rojas 1996).

Respuesta adquirida o específica. Es la que se genera solamente después del contacto con un agente y es específico para el mismo (Rojas 1996). Esta a su vez se divide en respuesta humoral y celular.

Respuesta humoral. Es llevada a cabo por las células B, cuya función principal es la formación de anticuerpos, un grupo complejo de proteínas globulares denominadas inmunoglobulinas. La producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B se presenta como una respuesta a la interacción de estas células con sustancias o moléculas que el cuerpo reconoce como extraños (antígenos).

Respuesta celular. Las células T se encargan de una respuesta inmunitaria aún más específica, las células T interactúan con otras células eucariotas, especialmente con las propias células. Existen dos tipos de linfocitos T, los T helper o cooperadores (CD4) que interactúan con macrófagos, otros linfocitos T y células B, estas últimas tienen la capacidad de proliferar y sintetizar anticuerpos específicos. Otro tipo de linfocitos es el citolítico (CD8) los cuales interactúan con las células diana (infectadas generalmente con virus ó células tumorales) y liberan sustancias llamadas perforinas que lisan a las células infectadas. (Regueiro et al; 2002).

El complejo mayor de histocompatibilidad (MHC)

Estudios sobre las funciones de las células T y los rechazos de transplantes de tejidos, han demostrado que el reconocimiento de las células del propio cuerpo, depende de un grupo de moléculas glucoproteicas situadas en la membrana de las células eucariotas. Los componentes proteicos de estas moléculas están codificados por un grupo de genes denominado complejo mayor de histocompatibilidad o MHC. (histo procede de la palabra griega tejido) (Curtis et al., 1996).

El MHC consta al menos de 200 genes diferentes (polimorfismo) y en la población humana, cada uno de estos genes tiene hasta 8 o 10 alelos. El número total de combinaciones que resulta es astronómico, por lo tanto, no existen dos personas, excepto los gemelos idénticos, que tengan el mismo complejo mayor de histocompatibilidad (Curtis et al., 1996).

En humanos, el MHC es conocido como antígenos leucocitarios humanos (HLA). Este sistema juega un papel importante en la respuesta inmune de tipo celular contra antígenos virales y tumorales (Kennedy et al., 2002). Durante el proceso de selección en el timo, las células T en desarrollo se ponen en contacto, con las proteínas del MHC exhibidas por las células del timo, por lo que aquellas células que presentan una alta afinidad son destruidas para evitar la respuesta inmune en contra del propio organismo. (Curtis et al., 1996).

El complejo de genes del HLA está localizado en el brazo corto del cromosoma 6, en la región 6p21.3 y se extiende a lo largo de 4 Mb (Mizuki et al., 1997b) y esta compuesto por casi 220 loci identificados (Trowsdale 2001). El MCH en el humano se divide en tres regiones de acuerdo a las familias de genes presentes en cada una: La clase I codifica péptidos transmembranales de 44 kDa asociados en la superficie celular con la β 2-microglobulina. Las moléculas de clase II son heterodímeros transmembranales. Los genes de clase III codifican componentes del complemento relacionados con la formación de C3 convertasa. Las moléculas de clase I se encuentran en células de todo el cuerpo y son necesarias para el reconocimiento por las células T citotóxicas, mientras que las de clase II se encuentran presentes sólo en células del sistema inmunológico y las identifica como tales.

Los genes MIC

La búsqueda de nuevas secuencias codificadoras en la región cercana al locus HLA-B para dilucidar la asociación entre el HLA-B27 con enfermedades reumatoides e inflamatorias condujo al descubrimiento de una nueva familia, los genes MIC (Major histocompatibility complex class I Chain-related genes, por sus siglas en inglés), que consisten en siete miembros, MICA (PERB11.1), MICB (PERB11.2), MICC (PERB11.3), MICD (PERB11.4), MICE (PERB11.5), MICE (PERB11.6) y MICG (PERB11.7) (Bahram et al., 1994; Gauderi et al., 1997) de los cuales sólo MICA y MICB codifican para transcritos de ARNm, mientras que MICC, MICD, MICE, MICE y MICG son pseudogenes debido a que presentan varias mutaciones puntuales y deleciones (Bahram et al., 1994) (Fig. 2).

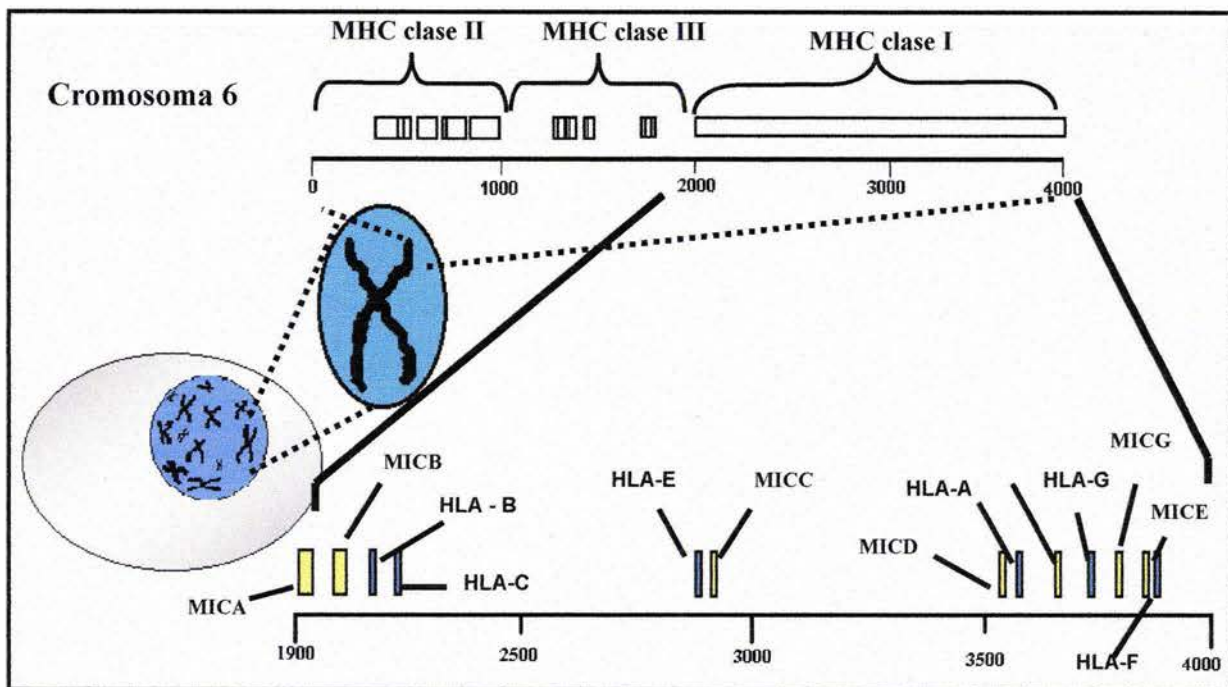


Fig. 2 Localización de los genes MIC en el cromosoma 6 (Tomado de Mendoza et al., 2001)

Resulta interesante el hecho de que los genes MIC han sido conservados en la mayoría de los mamíferos excepto en los roedores (Das et al., 2001), lo cual sugiere que han seguido una misma línea evolutiva. Algunos estudios han comparado la secuencia de los genes MIC de humanos con primates y se ha encontrado una similitud que va del 86% al 97%. (Pellet et al., 1999).

Los genes MICA y MICB están estrechamente relacionados y codifican para transcritos de 1382 y 2376 pares de bases (pb) respectivamente (Bahram et al. 1994; Fodil et al. 1996). La molécula de MICA es codificada por un gene muy extenso (comparado con los 3.5 kb promedio del HLA) y poco común de 11722 pb que se encuentra localizado 46.5 kilobases (kb) centromérico del locus HLA-B; también MICB es codificado por un gene extenso de 12930 pb que está localizado a 83 kb centromérico de MICA (Groh et al., 1996). MICA y MICB son muy polimórficos, pues se conocen más de 50 alelos diferentes para MICA y al menos 13 para MICB, cifras que tal vez irán en aumento (Stephens 2001). Otros reportes mencionan que MICB ya cuenta con 16 alelos (Bahram 2001).

Las proteínas MICA y MICB son similares en estructura en casi 84 % (Bahram et al., 1996b) (Bahram et al., 1996c), pero si los comparamos con las moléculas del MHC de clase I sólo comparten una similitud del 19%, 25% y 35% con respecto a los dominios alfa 1 ($\alpha 1$), alfa 2 ($\alpha 2$) y alfa 3 ($\alpha 3$) (Bahram et al. 1994). Recientemente se ha publicado la estructura de las proteínas MIC (Fig. 3) (Li et al., 1999) y se han comenzado a hacer investigaciones en cuanto a la regulación de su expresión, su distribución en los tejidos y su variabilidad alélica (Bahram et al., 1996^a) (Fodil et al., 1996) (Mendoza et al., 2001)

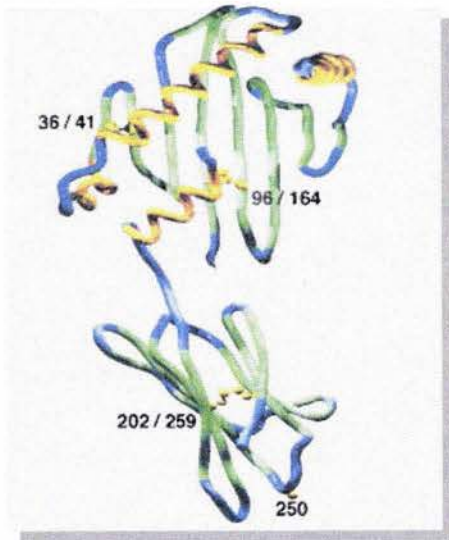


Fig. 3. Estructura cristalográfica de MICA (Li et al., 1999)

Los primeros estudios que se realizaron demostraron que las proteínas MIC son marcadores de estrés fisiológico y que su expresión se ve aumentada en infecciones virales y bacterianas, además se encontró que la presencia de las proteínas MIC está regulada por la expresión de las proteínas de choque térmico HSP70 (Groh et al., 1998) (Hankey et al., 2002)

Tipos celulares donde se expresan

Las moléculas HLA de clase I (HLA-A, B y C) están ubicuamente expresadas en la mayoría de las células de nuestro organismo, mientras que las moléculas no clásicas del HLA de clase I (HLA-E, E, F y G) tienen una distribución muchos más limitada.

Desde el descubrimiento de los genes MIC así como de las proteínas para las que codifican, surgió la inquietud de buscar una similitud con los genes del MHC debido a su cercanía con estos últimos. Se determinó que a pesar de que las proteínas MIC presentan un gran dimorfismo como los genes del MHC existen diferencias sustanciales que los separan. Entre las más importantes tenemos que las proteínas MIC en contraste con las proteínas del MHC no se relacionan con la β -2 microglobulina, no tienen actividad presentadora de antígeno (Li et al., 1999), además de que no son inducidas por IFN γ .

Es de gran importancia mencionar que se ha observado por inmunohistoquímica in vivo que la expresión de las proteínas MIC se ve limitada al tejido epitelial (Groh et al., 1996), aunque también se ha reportado que se encuentran en bajos niveles en células endoteliales, monocitos y queratinocitos (Zwirner et al., 2000), fibroblastos pero no en células de linaje linfohematopoyético (Bahram 2000; Bahram et al., 1996a; Fodil et al., 1996), aunque si son estimuladas con el activador de proliferación fitohemaglutinina se induce su expresión (Zwirner et al., 1998). Recientemente se ha reportado que MICA/B también se pudiera encontrar de manera normal en timo (Jinushi et al., 2003).

La importancia que han adquirido las proteínas MIC en el campo de la inmunología se debe al hecho de que su expresión se ve desregulada o sobreexpresada sobre la superficie de una gama de células tumorales (carcinomas) de origen epitelial: pulmón, mama, riñón, ovario, próstata y colón (Bahram et al., 1996a), así también su estudio se ha orientado a determinar de que manera el sistema inmunológico actúa en contra de las células que expresan las proteínas MIC.

Las proteínas MIC y la respuesta inmune

La respuesta de las células T citotóxicas en contra de tumores requieren del reconocimiento por parte de los linfocitos T CD8⁺ de péptidos específicos derivados de antígenos tumorales que se asocian con las proteínas del MHC clase I. Estos linfocitos presentan los receptores $\alpha\beta$ ($\alpha\beta$ T) y son generalmente encontrados en sangre periférica. Para que se pueda llevar a cabo la actividad de estas células, se requiere de la cooperación de células presentadoras de antígenos (CPA), las cuales tienen como función principal, cuando se presenta una infección viral o bacteriana, la de fagocitar al agente patógeno y presentarlo posteriormente en su superficie bajo el contexto de proteínas del MCH clase I para que de esta manera sea estimulada la actividad citotóxica de los linfocitos CD 8⁺. (Regueiro et al., 2002).

Como ya se mencionó anteriormente, las proteínas MIC se encuentran de manera normal en el epitelio intestinal y su expresión se puede ver aumentada bajo condiciones de estrés fisiológico, es decir, su función principal pudiera ser la de servir de "focos" de alerta cuando las barreras naturales han sido evadidas por parte de ciertos agentes patógenos. Se han realizado algunos estudios (Tieng et al., 2002) en los que se ha podido observar que la presencia de ciertas bacterias provoca un aumento en la expresión de las proteínas MIC y de este modo facilitar una efectiva respuesta por parte del sistema inmunológico, más específicamente de las células NK y los linfocitos $\gamma\delta$ T durante las primeras etapas de la infección. (Tieng et al., 2002)

En condiciones normales, la mayoría de las células expresan una gran cantidad de proteínas del MHC clase I y de esta forma son reconocidas por el sistema inmunológico, la manera en la que las células NK y los linfocitos T CD8⁺ diferencian células normales de las células tumorales es un proceso que hasta hace poco no se entendía del todo. El reconocimiento de células deficientes de las proteínas de clase I por parte de las células NK ha sido explicado por el descubrimiento de receptores específicos para dichas proteínas, encontrándose que la unión de estos receptores con sus ligandos de alguna manera inhiben la actividad de las NK. Se han identificado 3 familias de receptores para las proteínas clase I que inhiben la acción de las células NK: Ly49 (sólo se ha encontrado en ratón) (Karlhofer et al., 1992), KIR (sólo en humanos) (Wagtmann et al., 1995; Colonna M., et al., 1995), y CD94/NKG2A (en ambos) (Carretero et al., 1997; Vance et al., 1997).

NKG2D: un receptor para las proteínas MIC.

Tratando de dilucidar de que manera las proteínas MIC interactúan con el sistema inmunológico, se descubrió que las proteínas MIC funcionan como ligandos para el receptor NKG2D cuya expresión fue inicialmente encontrada en las células NK (Holmes et al., 2002). NKG2D es un miembro de la superfamilia de las lecitinas tipo C (Wu et al., 1999) (Bauer et al., 1999), el cual se relaciona muy poco con los receptores de la familia NKG2 (Houchins et al., 1991) y que no tiene asociación con CD94, ya que se expresa como un homodímero (Wu et al., 1999), además se asocia con un adaptador transmembranal conocido como DAP 10 (Wu et al., 1999; Leiner 2003). Este receptor está codificado por un gen que se encuentra dentro de la región denominada NKC (Natural Killer complex), en el cromosoma humano 12 y en el 6 en el caso del ratón. (Fig.4)

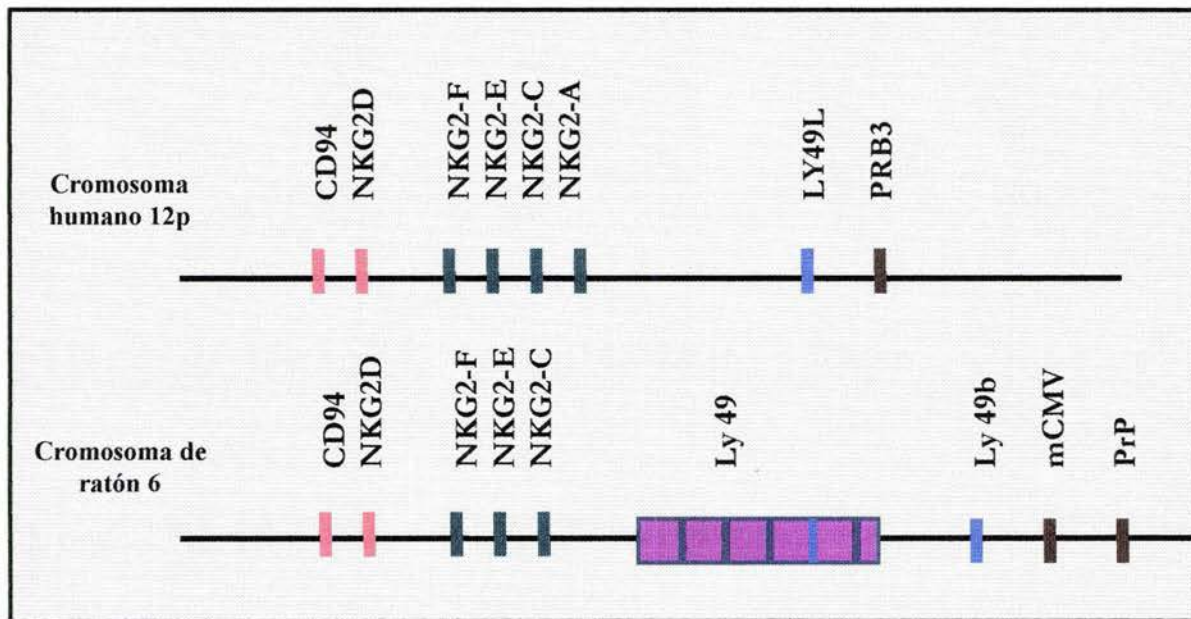


Fig.4 Ubicación del gen que codifica para el receptor NKG2D. El gen para NKG2D se encuentra dentro de la región NKC (Natural Killer Complex), localizada en el cromosoma 12 en el caso de los humanos y en el cromosoma 6 en el caso del ratón. El dibujo no está a escala. (Fan et al., 2001).

NKG2D se encuentra en todas las células NK tanto en humanos como en ratones (Diefenbach et al., 2000). En ratones NKG2D, se encuentra expresado además de las células NK, en algunos subtipos de linfocitos $\gamma\delta$ T en el bazo, en todas las células $\gamma\delta$ T epidérmicas, pero no en las células $\gamma\delta$ T provenientes del intestino (Diefenbach et al., 2000; Jamieson et al., 2002).

En el caso de los humanos de igual manera que en los roedores, NKG2D no está confinada a las células NK, se ha descubierto que la mayoría de los linfocitos $\gamma\delta$ T así como los $\alpha\beta$ T y los macrófagos presentan en su superficie al receptor NKG2D (Vetter et al., 2002). Se ha observado que la expresión de NKG2D se ve aumentada en células NK por la acción de IFN α , IL-15 e IL-12 (Sutherland et al., 2002).

El receptor NKG2D tiene como ligandos varios grupos de proteínas que guardan una semejanza con las proteínas del MHC clase I, las cuales se encuentran presentes en células tumorales, células infectadas por virus y en células bajo condiciones de estrés fisiológico (Diefenbach et al., 1999): RAE-1 y H60 en ratones y MICA, MICB y ULBP en humanos (Diefenbach et al., 2000). Los primeros ligandos para NKG2D en ser descubiertos en humanos fueron las proteínas relacionadas con las moléculas clase I del MHC: MICA y MICB (Bauer et al., 1999), de las cuales ya se hablado ampliamente.

Otros ligandos descubiertos para el receptor NKG2D son las proteínas ULBPs, las cuales son codificadas por aproximadamente 10 genes (seis codifican para proteínas potencialmente funcionales y cuatro pseudogenes), en el cromosoma 6q24.2-q25.3. Poco es lo que se conoce a cerca de las ULBPs, algunos miembros de esta familia se encuentran expresados en diversas células normales y detectadas por RT-PCR, sin embargo también se ha reportado que sufren una sobre expresión en células tumorales (Wu et al., 2000), se ha observado un aumento en tumores de colón y estómago, contrario a lo que sucede en tumores de riñón, en los cuales parece que hay una disminución de la ULPB.

Estructuralmente las ULBPs son homólogos en sus dominios α 1 y α 2 a las proteínas del MHC clase I, pero carecen de un dominio α 3. ULBP1, 2 y 3 son entre 23 y 27 % idénticas a MICA y MICB o a las proteínas del MHC clase I (Cosman et al., 2001). Las proteínas ULBPs fueron identificadas debido a la afinidad que presentan por la proteína del citomegalovirus humano denominada UL16, la cual tiene un papel importante en la evasión del sistema inmune, debido a que se une a las proteínas ULBPs y a las proteínas MIC, evitando así el reconocimiento de estas proteínas por parte del receptor NKG2D presente en diversas células efectoras y la consiguiente lisis de las células infectadas, sugiriendo esto un mecanismo de defensa viral interfiriendo en el reconocimiento de las proteínas de estrés fisiológico por parte del receptor NKG2D (Cosman et al., 2001).

Las células NK y los linfocitos V δ 1T; los cuales son un subtipo de los linfocitos $\gamma\delta$ T, expresan este receptor en su superficie y puede esta unión NKG2D-MIC por si sola desencadenar una respuesta citotóxica en contra de las células que presentan en su superficie las proteínas MIC (Das et al., 2001), ya sean células tumorales autólogas, o provenientes de diferentes tejidos tumorales (Groh et al., 1999).

Por otro lado, se han reportado evidencias de que la presencia del receptor NKG2D funciona como un co-estimulador en la actividad citotóxica de las células $\alpha\beta$ T, es decir, la unión NKG2D-MIC (Fig. 5), que se pudiera presentar en las células $\alpha\beta$ T no desencadena una acción lítica en contra de la célula que expresan la proteína MIC, (Kennedy et al., 2002; Bauer et al., 1999; Groh et al., 1998).

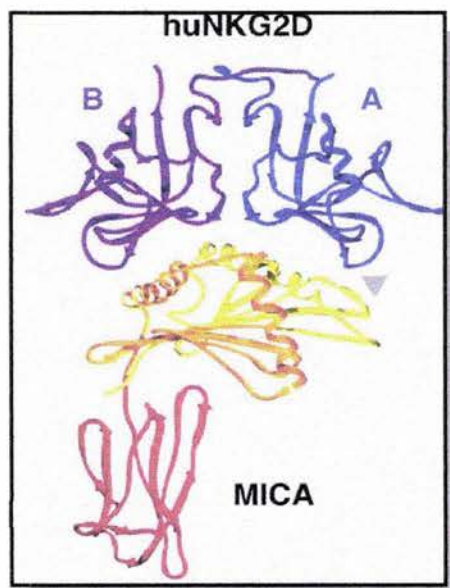


Fig. 5. Estructura cristalográfica del complejo formado entre NKG2D y MICA. (Extraída de

Algo paradójico con respecto a las proteínas MIC es el hecho de que si su función es la de estimular al sistema inmune, cabría preguntar ¿cómo es que entonces se desarrollan los tumores aún estando presentes las proteínas MIC?. Esto comenzó a dilucidarse cuando se descubrió que no todas las variantes de genes que codifican para MICA se ven expresados en las membranas de las células (Mizuki et al., 1997^a), específicamente la variante del gen para MICA 5.1, el cual se caracteriza por la inserción de 4 nucleótidos causando la terminación prematura de la proteína por la aparición del triplete de terminación (TAA) en la región transmembranal, esto trae como consecuencia que la proteína no se pueda expresar en la superficie de las células, dando origen a una forma soluble de MICA (sMICA).

Ya existen reportes en los que se demuestra que ciertas líneas tumorales tienen la capacidad de liberar una forma soluble de las proteínas MIC (Groh et al., 2002). En estos ensayos se ha encontrado que la liberación de sMIC trae como consecuencia un hecho muy importante que pudiera en determinado momento explicar la razón por la cual se da la progresión del cáncer: La proteína sMIC se une al receptor NKG2D (presente en linfocitos $\alpha\beta$ T y $\gamma\delta$ T así como en células NK, esta unión promueve la endocitosis seguido de reciclamiento o degradación de NKG2D, similar a lo que sucede con diversos receptores al unirse a sus ligandos (Huard et al., 2000). La disminución en la expresión de NKG2D provoca la aparición de células NK y linfocitos $\alpha\beta$ T y $\gamma\delta$ T carentes de dicho receptor, estas células "ciegas" por llamarlas de alguna manera, son incapaces de reconocer a las células tumorales o transformadas aún estando presente las proteínas MIC a nivel de membrana y así evadir al sistema inmunológico (Fig 6).

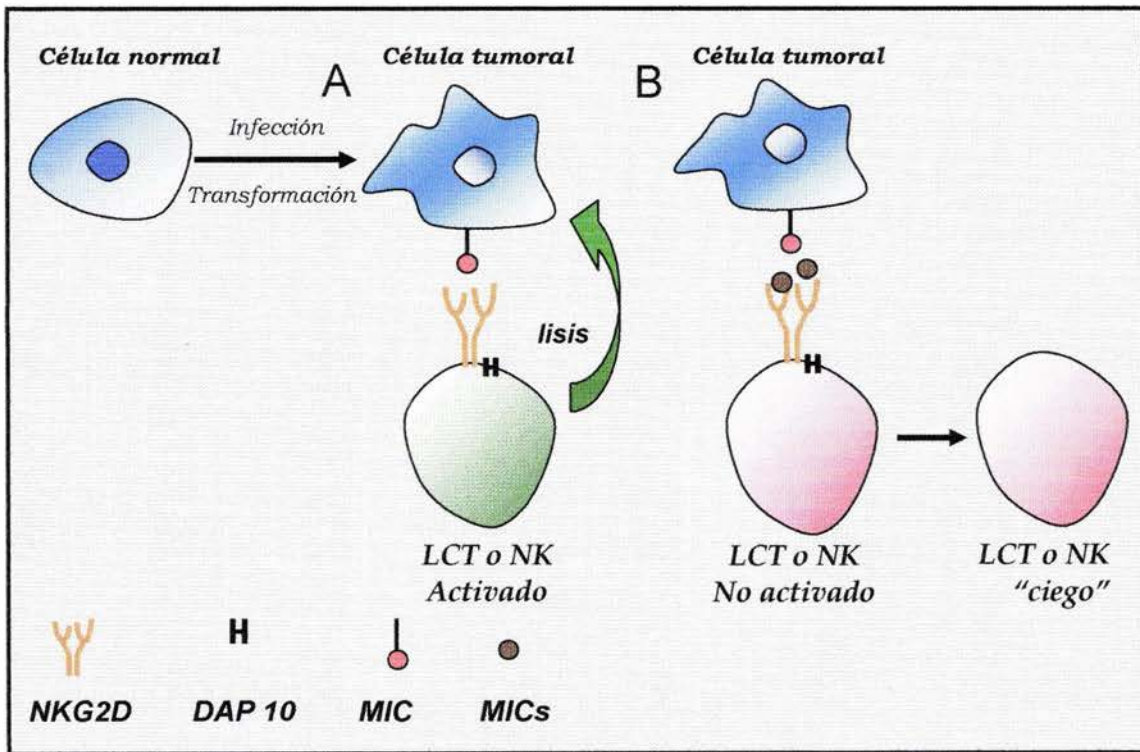


Fig.6. Evasión tumoral del sistema inmune. A. La unión de las proteínas MIC y el receptor NKG2D presente en las células NK y linfocitos $\alpha\beta$ T y $\gamma\delta$ T promueve la lisis de las células tumorales o transformadas que expresan dichas proteínas. B. La liberación de una forma soluble de las proteínas MIC, promueve la endocitosis del receptor NKG2D, dando como resultado la aparición de células "ciegas", las cuales son incapaces de reconocer células que expresen las proteínas MIC a nivel membranar. (Extraído de Yokohama 2002).

La hipótesis sobre el hecho de que la forma soluble de las proteínas MIC pudiera contribuir a la progresión del cáncer se apoya en ensayos realizados por el grupo de Groh, en los cuales pacientes positivos sMIC, presentaron una disminución del receptor NKG2D, los cuales después de la utilización de anticuerpos dirigidos contra las proteínas sMIC sus células efectoras presentaron una densidad normal del receptor NKG2D (Groh et al., 2002).

Polimorfismo de MIC en células derivadas de pacientes con Carcinoma de Cérvix.

Como ya se mencionó, los virus del papiloma humano tipo 16 y 18 (VPH 16 y 18) son considerados como el principal agente etiológico en cáncer cervical. Sin embargo, existen factores genéticos que contribuyen a la predisposición y a la persistencia de la infección por VPH en el carcinoma cervical. Por otro lado, se ha demostrado claramente que variantes alélicas de los genes de los leucocitos humanos (HLA) están asociadas con las neoplasias cervicales. Esta fuerte asociación se ha encontrado principalmente con genes HLA de la región de clase II. De manera adicional, existen reportes recientes de que el citomegalovirus humano (HCMV) puede aumentar la expresión de la proteína MICA. Por consiguiente sería importante explorar si en el carcinoma de cérvix el VPH (VPH 16 ó 18) tiene una propiedad similar a la mostrada para el HCMV, o por el contrario disminuye la expresión de la proteína MIC, evitando de esta manera su reconocimiento por células del sistema inmune.

Por otro lado, es conocido que la expresión de la proteína MIC aumenta la respuesta específica contra virus por células NK, pero en este caso los virus del papiloma 16 ó 18 pueden estar regulando negativamente la expresión de MICA y MICB evitando de esta manera una respuesta apropiada por parte de las células NK efectoras naturales para la eliminación de células tumorales. Asimismo, sería importante determinar si existe asociación entre el haplotipo de MICA y MICB con las líneas celulares de carcinoma de cérvix, así como en otras líneas relacionadas e incluso en células obtenidas de biopsias de cérvix humano para establecer si hay una asociación entre el haplotipo para MICA o MICB con células de carcinoma de cérvix respecto a células control.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Los virus del papiloma humano tipo 16 y 18 (VPH 16 y 18) son considerados como el principal agente etiológico en cáncer cervical. Sin embargo, también existen factores genéticos que contribuyen a la predisposición y a la persistencia de la infección por VPH en el carcinoma cervical. En ese contexto, se ha demostrado claramente que variantes alélicas de los genes de los leucocitos humanos (HLA) están asociadas con neoplasias cervicales. Esta fuerte asociación se ha encontrado principalmente con genes HLA de la región de clase II. De manera adicional, existen reportes recientes de que el citomegalovirus humano (HCMV) puede aumentar la expresión de la proteína MICA. En consecuencia, sería importante explorar si otros virus tienen una propiedad similar a la mostrada para el HCMV como puede ser el VPH 16 y 18, ya que como es conocido la expresión de las proteínas MIC aumenta la respuesta específica contra virus por células NK, pero en este caso el VPH 16 y 18 pueden estar regulando negativamente la expresión de MICA y MICB evitando de esta manera una respuesta apropiada por parte de las células NK efectoras naturales para la eliminación de células tumorales.

Debido a la relación que recientemente se ha encontrado entre una sobreexpresión de las proteínas codificadas por los genes MIC y el padecimiento de algunos tipos de cáncer, surge el interés de encontrar si existe alguna interacción entre estas proteínas y el carcinoma cervicouterino, es decir determinar la presencia de MICA y MICB en las diferentes líneas celulares.

Esto es importante para entender cuales son los mecanismos de evasión inmunológica causados por el VPH en cáncer cervicouterino que es un problema de salud pública en México, puesto que representa la primer causa de muerte en mujeres.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de las proteínas de estrés fisiológico MICA y MICB en las líneas de células tumorales CALO, CASKI, HELA, INBL, ROVA y SIHA infectadas con VPH así como en la línea C33-A y VIBO no infectadas con VPH

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la presencia de las proteínas MICA y MICB en las líneas celulares CALO, CASKI, HELA, INBL, ROVA y SIHA mediante inmunoblot, comparado con las líneas celulares C33-A y VIBO no infectadas con VPH.
- Analizar mediante ensayos de ELISA la presencia de MICA y MICB soluble en sobrenadantes y lisados de las líneas tumorales CALO, CASKI, HELA, INBL, ROVA y SIHA comparando con células de las líneas C33-A Y VIBO.

HIPÓTESIS

La expresión de las proteínas codificadas por los genes MIC se ve aumentada bajo condiciones de estrés fisiológico y por la presencia de virus. En consecuencia, se espera encontrar un aumento en la expresión de las proteínas MICA y MICB en las líneas CALO, CASKI, HELA, INBL, ROVA y SIHA, y este incremento estará determinado por la presencia del virus de papiloma humano (VPH 16 y 18).

DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

En este proyecto se utilizará como modelo experimental líneas celulares derivadas de pacientes con cáncer cervical. La investigación estará basada principalmente en ensayos a nivel celular y bioquímico.

POBLACION

Se emplearon las líneas celulares derivadas de carcinoma de cervix, CALO, CASKI, HELA, INBL, RUVA, SIHA, dichas líneas celulares son positivas para VPH (16 y 18). Así también se compararon con células VPH negativas: C33-A y VIBO. Todas estas líneas se mantuvieron en medio de cultivo RPMI 1640 adicionando SFB al 10% v/v en atmósfera saturante de humedad, temperatura de 37°C y 5% de CO₂, a excepción de C33-A la cual se mantuvo en medio de cultivo D-MEM con las condiciones de temperatura, concentración de suero y de CO₂ igual a las mantenidas en RPMI.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Se emplearon células infectadas con el virus del papiloma humano (VPH 16 y 18).

Se utilizaron células no infectadas con VPH como control (líneas celulares C33-A y VIBO)

NOMBRE	ORIGEN	Estadio	PRESENCIA DE VHP
CaLo	Carcinoma de cervix	IV	VPH-18
Ca Ski	Carcinoma epitelioides cervical	II	VPH-16
C33-A	Carcinoma de cervix	I	Negativo
HeLa	Adenocarcinoma de cervix	II	VPH-18
InBl	Carcinoma de cervix	III	VPH-18
Rova	Carcinoma de cervix		VPH-18
SiHa	Carcinoma escamoso de cervix	II	VPH-16
Vibo	Carcinoma de cervix		Negativo

VARIABLE.

Las variables consideradas en este estudio son las proteínas de estrés fisiológico MICA y MICB y la presencia de Virus de papiloma humano 16 y 18.

METODOLOGÍA

TÉCNICAS DE ASEPSIA Y MANEJO ADECUADO DE MATERIAL DE LABORATORIO.

Estas técnicas tienen como objetivo conocer todos los cuidados que se deben tener presentes para evitar la contaminación de nuestras células. Es de gran importancia este paso, ya que de una correcta manipulación del material y equipo se asegurará el éxito, que se verá reflejado en la obtención del mayor número de células para los análisis posteriores. En todo momento deberán observarse tres reglas importantes:

Mantener el mínimo número de objetos presentes en la campana de cultivo.

Retirar cada objeto una vez que ya no se necesita

Mantener los objetos bien separados, pero fácilmente accesibles, dentro de la campana de cultivo.

PROCEDIMIENTO DE DESCONGELACIÓN.

El vial se descongeló tan rápido como fue posible. Las células fueron colocadas en una caja de cultivo con el medio adecuado para cada línea celular suplementado con suero fetal bovino al 10%, y se mantuvieron en incubadora (Form Scientific, USA) a una atmósfera de 5% de CO₂, temperatura de 37°C y un ambiente saturado de humedad. Pasadas 4 horas el medio fue retirado se cambió por nuevo, esto con la finalidad de eliminar los residuos de DMSO así como las células que no sobreviven al proceso de descongelación

CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES ADHERENTES.

Las líneas celulares CALO, CASKI, HELA, INBL, ROVA, SIHA, VIBO se cultivaron en medio RPMI suplementado con suero fetal bovino (SFB) a una concentración final del 10%. La línea C33-A se mantuvo en medio D-MEM suplementado con SFB 10 %.

El medio se examinó y se cambió cada vez que fue necesario, esto es cuando las cajas de cultivo se saturaban. Dependiendo de las necesidades del trabajo las células se mantenían o se realizaban subcultivos de estas.

SUBCULTIVO DE CELULAS ADHERENTES.

Los subcultivos se realizaron con el fin de poder proporcionar a las células en crecimiento la mayor cantidad de área disponible así como las condiciones ambientales óptimas. Se adicionó 5 ml de Verseno (ver apéndice de soluciones) a la caja de cultivo, cuando esta era de 25 cm² y se golpeo suavemente por los lados para facilitar la separación, se dejó reposar por 5 minutos. El verseno y las células que se desprendieron se transfirieron a un tubo estéril que contenía 1 ml de medio más SFB (10%) y se centrifugó por 5 min a 600 rpm. El botón de células se resuspendió nuevamente en medio y se agregaron 0.5 ml a cada caja que se sembró, después se completó con 4ml de medio y 0.5 ml de SFB.

Cuando en los cultivos se observaba que el crecimiento no era normal se le adicionó al medio Ciprofloxacina (Lab. Senosiain S.A.) con el fin de eliminar y prevenir alguna contaminación con micoplasma, a una concentración de 50 µg/ml con fines terapéuticos y 10 µg/ml con fines preventivos.

CONTEO CELULAR

Se desprendieron y se lavaron las células como se señaló arriba, se resuspendieron en una cantidad conocida de medio de cultivo, posteriormente se homogenizó perfectamente y se tomaron 20 µl los cuales se colocaran en un tubo eppendorff con 180 µl de medio. De este tubo se tomaron 20 µl y se colocaron en otro tubo eppendorf con 20 µl de azul tripano. Se mezcló bien y se colocaron 20 µl en el hemocitometro para realizar el conteo celular en el microscopio óptico.

CONSERVACIÓN CRIOGÉNICA (CONGELACIÓN).

La conservación criogénica supone almacenar las células a una temperatura muy baja en nitrógeno líquido (-180°C), es un estado de animación suspendida, hasta que se necesitan. Las células solo deben criopreservarse cuando están sanas y se encuentran en la fase exponencial de crecimiento. Debe de tenerse mucho cuidado de no conservar a las células cuando se encuentren en la etapa Go del ciclo celular.

Se desprendieron las células y se lavaron como se describió antes. El botón celular se resuspendió en medio de congelación (medio RPMI preparado con una concentración final de SFB al 10% y DMSO al 10%) y se colocó en viales de congelación (aprox. 1 ml por vial), se colocaron los viales dentro del ultracongelador (REVCO) a -70°C durante 24 hrs y posteriormente se almacenaron en Nitrógeno líquido.

INMUNOPRECIPITACION

Para aislar un antígeno proteico de una mezcla de proteínas se utiliza un anticuerpo dirigido específicamente contra él. En los procedimientos más modernos el anticuerpo se une a una partícula en fase sólida (p.ej., una esfera de agarosa).

Lisado de células.

Se sembraron 10×10^6 células por cada frasco de todas las líneas celulares en cajas de 75 cm^2 y se incubaron 48 horas antes del experimento. Para llevar a cabo la lisis se adicionó 1 ml de buffer de lisis (ver apéndice de soluciones) y se mantuvieron por espacio de 3 minutos en hielo. Pasado este tiempo se raspó la caja con un gendarme con el fin de lisar y despegar las células. Las células se colocaron en un tubo eppendorf y se incubaron por 15 minutos en hielo, posteriormente se centrifugaron a 4°C por 15 minutos. El sobrenadante que se obtuvo es el lisado celular.

Preparación de esferas de agarosa para inmunoprecipitación

En tubos eppendorf se colocaron 18µl de proteína A agarosa y 18 µl de proteína G agarosa, se lavaron dos veces con 500 µl de buffer de lisis, se agregó 1.5µl de Ab específico contra la proteína de interés + 40µl de buffer de lisis y se incubaron por una hora a 4°C con agitación. Una vez transcurrido este tiempo fueron lavadas las esferas 2 veces con buffer de lisis, a las esferas unidas a anticuerpo se agregó el lisado celular obtenido anteriormente, los tubos se incubaron por 3 horas a 4°C con agitación. Transcurrido ese tiempo se lavaron nuevamente las esferas con buffer de lisis y se adicionó 25µl de buffer Laemli (ver apéndice de soluciones) reductor a cada tubo, se hirvieron por 5 minutos y se guardaron a -20°C hasta el día de la electroforesis que nunca excedió de 7 días.

ELECTROFORESIS.

En nuestro caso se utilizaron geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) en sistema de electroforesis vertical. Se usó un gel separador al 10% con acrilamida y un gel concentrador 4%. Una vez que las muestras de inmunoprecipitación se encontraron en el buffer de Laemmli, estas fueron colocadas en la placa de gel dentro de la cámara, además se colocó un marcador de pesos moleculares preteñidos (Gibco, USA) de un rango de 200 a 16 KDa. La cámara se llenó con buffer de corrida. Para la realización de la electroforesis se aplicó un voltaje de 87 V mientras las muestras se encontraban en el gel concentrador y a 100 V una vez que ingresaron al gel separador.

WESTERN BLOTTING

Pasado el tiempo de la electroforesis se llevó a cabo la transferencia. Se colocó en la cámara de transferencia un papel filtro de 6mm de 7x9 cm humedecido en buffer de transferencia (ver apéndice de soluciones), encima de este primer papel filtro se colocó la membrana de nitrocelulosa y se mantuvo humedecida. El gel se retiró cuidadosamente de las placas de electroforesis y se enjuagó con un poco de buffer de transferencia y se colocó encima de la membrana de la nitrocelulosa y finalmente otro papel filtro humedecido en buffer II. Se eliminaron las burbujas de aire que quedaron atrapadas en el sistema con la ayuda de una pipeta humedecida en buffer de transferencia y se llevó a cabo la transferencia de las proteínas por espacio de 1.5 hora a 124 mA.

Ver apéndice de preparación de soluciones

INMUNOBLOT

Una vez que terminó la transferencia, la membrana de nitrocelulosa se incubó en una solución de TBS-BSA 1% toda la noche a 4°C. Pasado este tiempo se realizaron 5 lavados con TBS-T de 5 minutos cada uno y 5 lavados con TBS (ver apéndice de soluciones) con la misma duración.

Anti fosfotirosina. Terminados los lavados se colocó la membrana en 5 ml de una solución de TBST-BSA 1% y se colocaron 5µl de anticuerpos antifosfotirosina (clones py99 y py20, Santacruz Biotechnology) y se mantuvieron con agitación por espacio de 1.5 hr. Pasado este tiempo se realizaron 5 lavados con TBST(ver apéndice de soluciones) y 5 con TBS. La membrana se colocó en 6 ml de TBST-BSA 1% y se agregó 1 µl de anticuerpo anti- ratón conjugado con peroxidasa y se agitó por espacio de 40 min. Se lavó nuevamente la membrana 5 veces con TBST Y 5 con TBS. Después se reveló mediante quimioluminiscencia (Pierce, USA) y se colocó en contacto con una película (Biomax-Kodak,USA) durante 1 min. Se retiró la membrana y la película se sumergió en el revelador (Kodak GBXCE) y se enjuagó con agua, posteriormente se sumergió en el fijador (Eastman-Kodak) por unos segundos, se dejó secar y se observó el resultado.

Elución

Para poder reutilizar la misma membrana se colocó en buffer de elución (Ver apéndice de soluciones) por espacio de 1 hr entre 70 y 80 °C en baño maría. Pasado el tiempo de la elución la membrana fue colocada en agitación durante 15 minutos en TBST, posteriormente se realizó otro lavado de 5 minutos con TBST y finalmente un lavado con TBS. La membrana se bloqueo en TBS-BSA 1% toda la noche a 4°C.

Blot Anti MIC.

La membrana se lavó 5 veces con TBST y 5 con TBS y se colocó en una solución de TBST-BSA 1% y se incubó con el anticuerpo primario para MIC con una dilución 1/500 (Santacruz Biotechnology) durante 1.5 horas con agitación. Se lavó la membrana 5 veces por 5 minutos con TBST y 5 veces con TBS de la misma manera, posteriormente se incubó 30 min con el anticuerpo secundario (anticuerpo anti-cabra conjugado con peroxidasa) 1:5000 en solución de TBST-BSA 1%.

Pasado este tiempo la membrana fue lavada 5 veces con TBST y 5 veces con TBS. Después se reveló mediante quimioluminiscencia (Pierce, USA) y se colocó en contacto con una película (Biomax-Kodak, USA) durante 1 min. Se retiró la membrana y la película se sumergió en el revelador (Kodak GBXCE) y se enjuagó con agua, posteriormente se sumergió en el fijador (Eastman-Kodak) por unos segundos, se dejó secar y se observó el resultado.

ELISA (ANÁLISIS INMUNOABSORBENTE LIGADO A ENZIMA)

Se sembraron cada una de las líneas celulares en placas de 24 pozos para cultivo de fondo plano en una concentración de 75,000 células en cada pozo y se adicionó medio RPMI suplementado con SFB 5% a excepción de C33-A para la cual se utilizó medio D-MEM. Se fueron colectando los sobrenadantes de las diferentes células cada día hasta completar 7 días, en el pozo 7 y después de haber retirado el sobrenadante se le agregó medio Iscoves y se dejó por otros 7 días más.

A 375 μ l del sobrenadante correspondiente a cada día se le adicionaron 45 μ l de una solución de carbonato de Sodio 0.2M y 80 μ l de una solución de bicarbonato de Sodio 0.2M para obtener un volumen final de 500 μ l. En las placas para ELISA se colocaron por duplicado 100 μ l de los sobrenadantes para cada día de las diferentes células. Así también, se colocó un pozo de más para cada línea para ser tomado como blanco o control negativo. Se realizó una curva con la proteína recombinante MIC en la misma solución de carbonatos en un rango de concentraciones de 200 ng a 100 pg.

Una vez que se colocaron tanto las muestras como el estándar, las placas fueron sensibilizadas manteniéndose a 4°C toda la noche. Pasado este tiempo se realizaron 4 lavados con PBS con 0.005 % de Tween 20 (PBST). Después de los lavados las placas fueron bloqueadas con leche al 3% en PBST por espacio de 1 hr a 37°C. Transcurrido el tiempo del bloqueo se lavó nuevamente con la solución de PBST cuatro veces y se colocó el anticuerpo primario (anti-MIC) con una concentración 1/1000, la cantidad adicionada fue 100 μ l por cada pozo y se incubó por 1 hora a 37 °C. En el pozo designado como blanco para cada línea no se le adicionó el anticuerpo, en su lugar se pusieron 100 μ l PBST. Se lavó 4 veces con PBST y se adicionaron 100 μ l anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (dilución 1:6000) y se incubó durante 1 hora a 37°C. Al terminar la incubación con el anticuerpo secundario se realizaron 4 lavados con PBST.

Después del último lavado se incubó con el sustrato que consistió en una solución de ortofenilendiamina con una concentración de 0.4 mg/ml y 0.03% de H₂O₂ en un buffer de citratos pH 5.06 (ver apéndice de soluciones), esta solución se preparó al momento. Se mantuvo a temperatura ambiente y protegido de la luz por espacio de 15 minutos. Transcurrido el tiempo se leyó a 490 nm en un lector de placas (ELX 800, BIO-TEK)

RESULTADOS

Células positivas para VPH expresan las proteínas MICA y MICB.

Para determinar la presencia de las proteínas MIC en diferentes líneas celulares de carcinoma de cérvix, se obtuvieron lisados celulares y se analizaron mediante inmunoblot, los resultados obtenidos mostraron la presencia de dos proteínas con un peso aproximado de 60 y 40 KDa. (Fig.1). En el caso de la línea C33-A se observa menor cantidad de ambas proteínas. También se observa la proteína MIC recombinante (MICr) con un peso de 90 KDa de acuerdo al esperado por ser altamente glicosilada

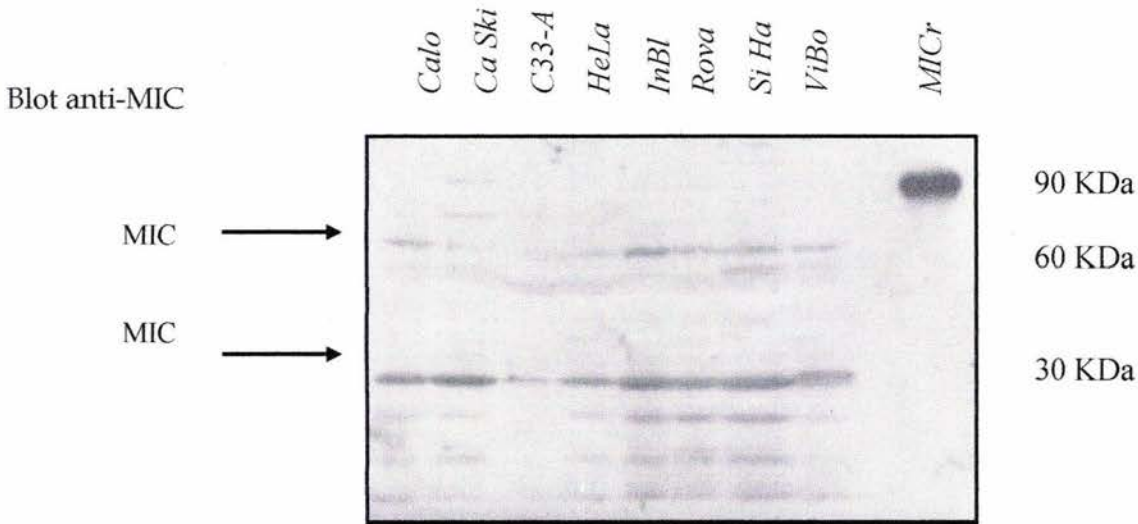


Fig. 1. identificación de las proteínas MIC. Blot anti MIC proveniente de lisado total de las diferentes líneas. Los anticuerpos utilizados fueron de cabra con una dilución para el ab. Primario de 1:500 y 1:6000 para el secundario

Así también, se pudo observar en estos primeros ensayos la presencia de algunas proteínas de menor peso, las cuales podrían corresponder a la degradación de las proteínas de mayor peso molecular, por lo anterior y aunado al hecho de que se encontró en numerosos ensayos que las proteínas MIC presentan una gran susceptibilidad a la degradación, se optó en los siguientes ensayos duplicar la cantidad de los inhibidores para impedir lo más posible la degradación de las proteínas.

Además, la electroforesis se realizó no más de tres días después de lisar a las células. Otra cuestión que se cuidó fue el hecho de que la proteína recombinante (rMIC), que se utilizó como estándar se hirvió con el buffer de Laemmli en el momento de su utilización, debido a que se degrada muy rápidamente aún con el buffer de la muestra.

Una vez estandarizada la técnica para el análisis de las proteínas MIC, los siguientes blots que se realizaron mostraron un patrón muy similar, es decir, se seguían observando dos proteínas que presentaban un peso molecular de aproximadamente 60 y 30 KDa respectivamente, y aún se podía observar las proteínas con menor peso molecular (Fig.2)

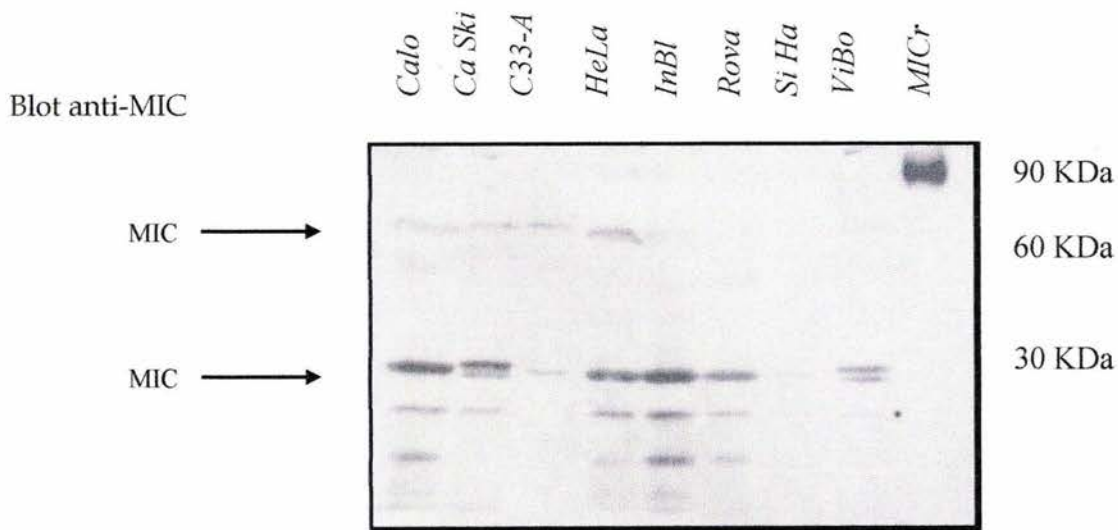


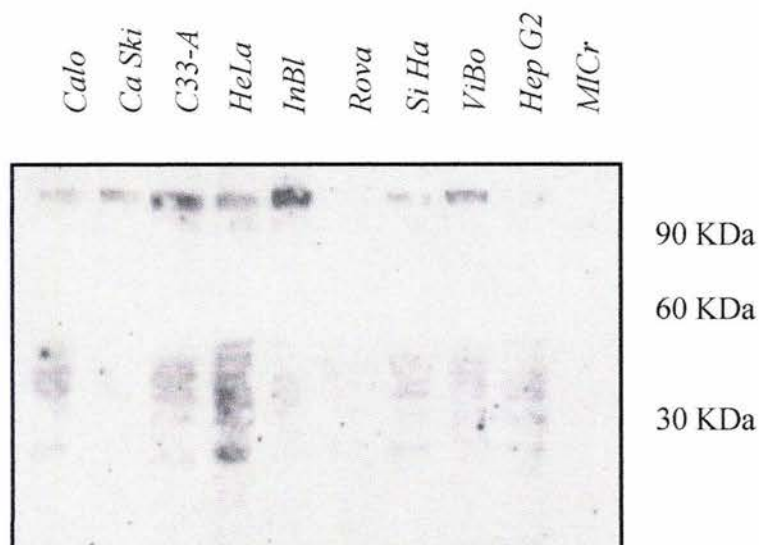
Fig. 2. identificación de las proteínas MIC. Blot anti MIC proveniente de lisado total de las diferentes líneas. Los anticuerpos utilizados fueron cabra antiMIC dilución 1:500 y anticuerpo secundario anticabra 1:6000. En este ensayo se duplicó la cantidad de los inhibidores para evitar la degradación de las proteínas. MICr= Proteína MIC recombinante

Las proteínas MICA y MICB presentes en las células positivas para VPH no están fosforiladas

Debido a que no existen reportes en la literatura sobre la posible fosforilación de las proteínas MIC, procedimos a evaluar si estas proteínas se encontraban fosforiladas en tirosina, para esto se utilizaron los anticuerpos py20 y py99, que reconocen residuos de tirosina fosforilada.

Los resultados obtenidos muestran que las proteínas MIC no están fosforiladas (Fig. 3A), aunque se observan algunas proteínas fosforiladas de mayor peso molecular. Para corroborar que la proteína MIC estaba presente se eluyeron los anticuerpos antipy en un medio ácido y se probó nuevamente el blot con anticuerpos anti MIC. Se observó la presencia de las dos proteínas de 60 y 30 KDa.(Fig. 3B)

A) Blot anti-Py



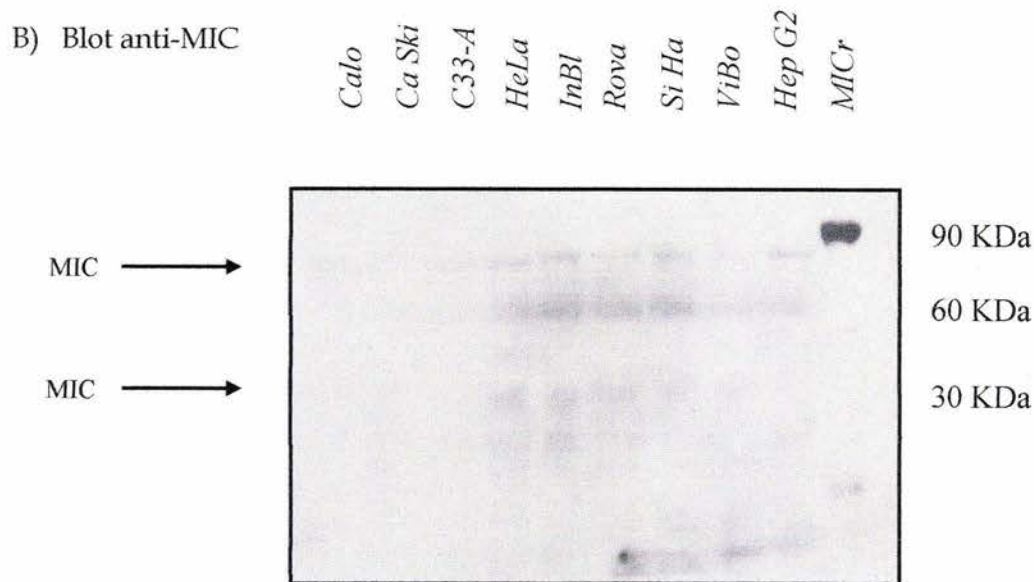


Fig. 3. Determinación de la fosforilación en tirosina de las proteínas MIC. A) Blot anti- py proveniente de lisados totales de las diferentes líneas, se utilizaron los anticuerpos monoclonales py 20 y py 99 con una concentración 1:1000 y el secundario (goat anti- mouse) 1:6000. B) Blot anti-MIC, los anticuerpos antifosfotirosina fueron eluidos de la membrana por incubación en medio ácido, se bloqueó nuevamente la membrana y se incubó con anticuerpos antiMIC a una dilución 1:500 y 1:6000 para el anticuerpo secundario.

La proteína MICA es secretada en los sobrenadantes de líneas positivas para HPV

Para determinar la presencia de una forma soluble de las proteínas MIC, se utilizaron los sobrenadantes de las células que fueron incubadas durante 7 días.

Antes de llevar a cabo los ensayos de ELISA se realizó una curva estándar para poder determinar la concentración mínima a la que los anticuerpos pueden reconocer a la proteína guardando una linealidad. Esta curva se realizó utilizando diluciones en un rango desde 200 ng hasta 10 ng, en diluciones menores los valores de las absorbancias eran incongruentes. (Fig 4)

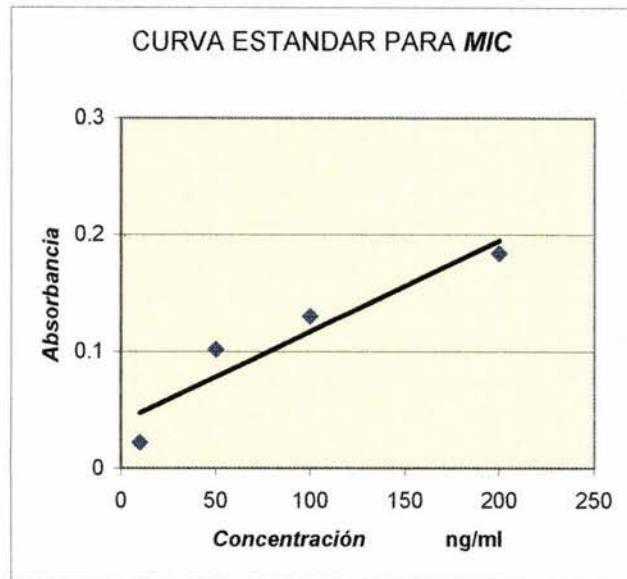


Fig4. Curva estándar realizada con la proteína MIC recombinante. Las diluciones utilizadas fueron desde 10 hasta 200 ng/ml. En concentraciones menores a estas los valores de las absorbancia eran muy incongruentes

Antes de poder determinar si efectivamente se producía una forma soluble de las proteínas MIC en los sobrenadantes de las células en estudio se realizaron ensayos en los que solo se colocó medio únicamente para saber cual sería la absorbancia proporcionada por este y poder realizar un valor de corte. Este valor osciló entre 0.066 y 0.069 por lo que se estableció que las absorbancias que fueran superiores a 0.069 se tomarían como reflejo de la liberación de la forma soluble de las proteínas MIC por parte de las células en cuestión. (Fig5).

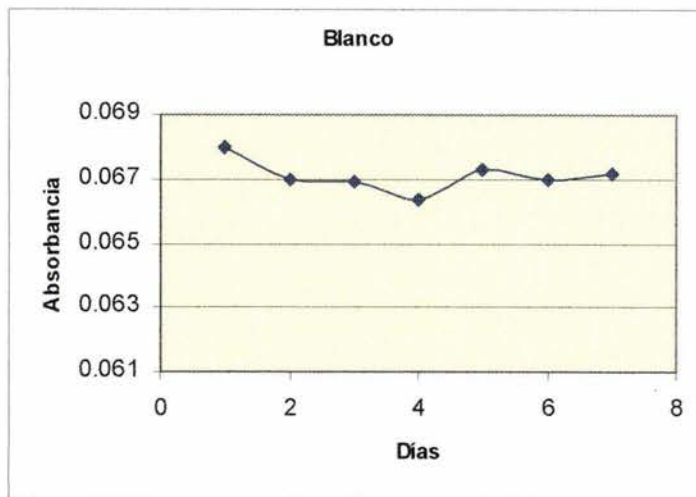


Fig. 5. Gráfica de blanco. En los ensayos de ELISA se colocó el medio el cual se fue colectando durante 7 días como si se tratara de una línea celular y así para poder medir la absorbancia proporcionada por medio. El ensayo se repitió por duplicado un mínimo de tres veces.

En los resultados que se obtuvieron de los ensayos de ELISA para determinar la presencia de las proteínas MIC soluble, se encontró un ligero aumento en las absorbancias obtenidas. Para estos ensayos, cabe mencionar que también se utilizó a la línea HEP-G2 para poder observar si se presentaba alguna diferencia en cuanto a la producción de las proteínas MIC soluble en una línea tumoral de origen diferente. En las gráficas obtenidas se puede observar que es a partir del cuarto y quinto día cuando se presentan las absorbancias máximas, los valores graficados son el resultado de la diferencia entre las absorbancias obtenidas de las líneas celulares y la absorbancia establecida como el valor de corte que fue de 0.069. (Fig 6-11).

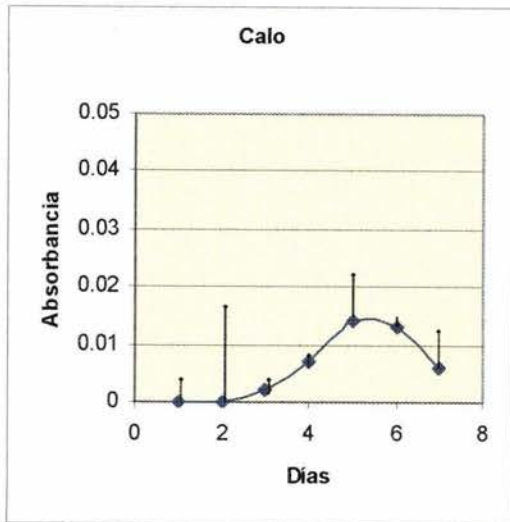


Fig.6. Presencia de la forma soluble de MICen la línea celular CALO infectada con VPH 18.Los resultados de las absorbancias se graficaron versus días y se obtuvieron promedios de las lecturas obtenidas, además de que se calcularon las desviaciones estándar para cada día. Los ensayos se realizaron por duplicado un mínimo de tres veces

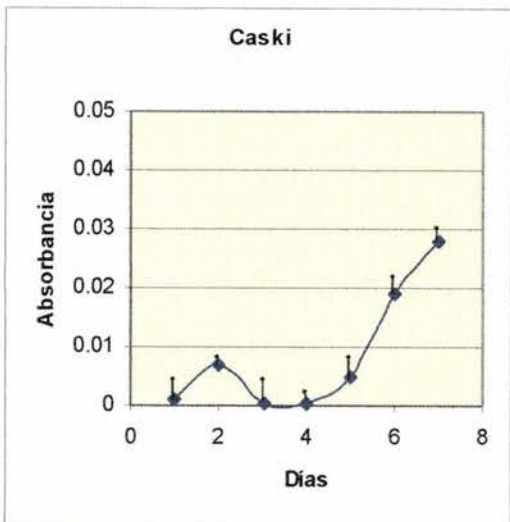


Fig.7. Presencia de la forma soluble de MICen la línea celular CASKI infectada con VPH 16.Los resultados de las absorbancias se graficaron versus días y se obtuvieron promedios de las lecturas obtenidas, además de que se calcularon las desviaciones estándar para cada día. Los ensayos se realizaron por duplicado un mínimo de tres veces

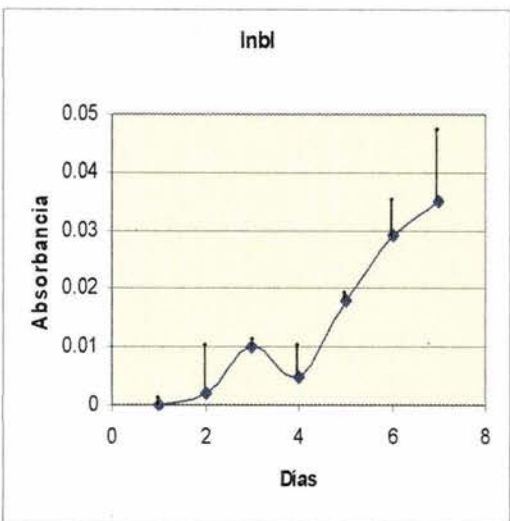


Fig.8. Presencia de la forma soluble de MIC en la línea celular INBL infectada con VPH 18.Los resultados de las absorbancias se graficaron versus días y se obtuvieron promedios de las lecturas obtenidas, además de que se calcularon las desviaciones estándar para cada día. Los ensayos se realizaron por duplicado un mínimo de tres veces

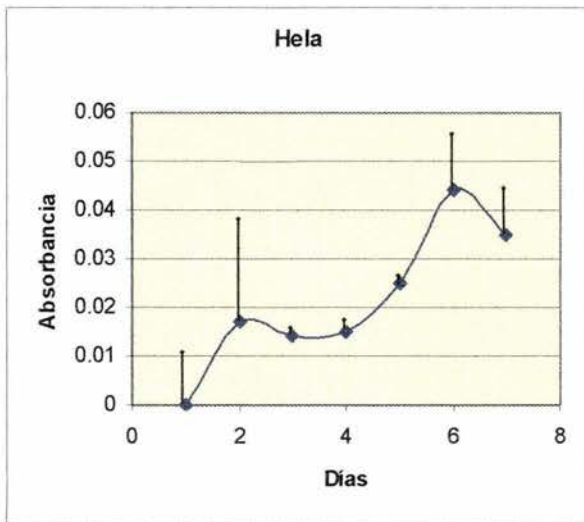


Fig.9. .Presencia de la forma soluble de MIC en la línea celular HELA infectada con VPH 18.Los resultados de las absorbancias se graficaron versus días y se obtuvieron promedios de las lecturas obtenidas, además de que se calcularon las desviaciones estándar para cada día. Los ensayos se realizaron por duplicado un mínimo de tres veces

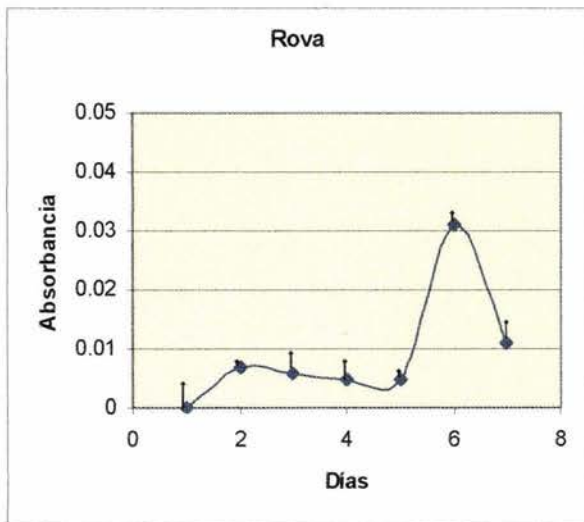


Fig.10.Presencia de la forma soluble de MIC en la línea celular ROVA infectada con VPH 18.Los resultados de las absorbancias se graficaron versus días y se obtuvieron promedios de las lecturas obtenidas, además de que se calcularon las desviaciones estándar para cada día. Los ensayos se realizaron por duplicado un mínimo de tres veces

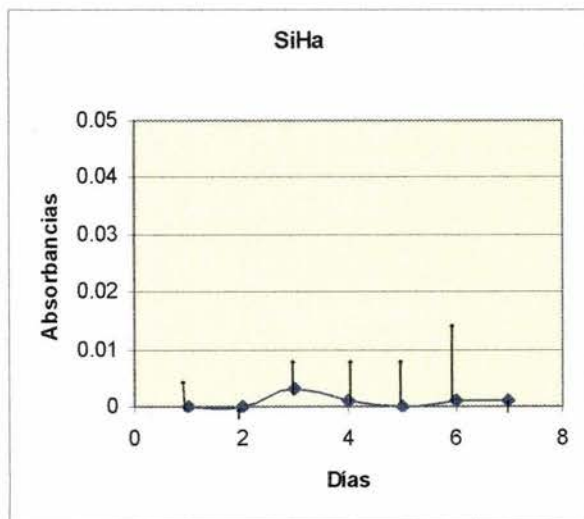


Fig.11.Presencia de la forma soluble de MIC en la línea celular SiHa infectada con VPH 16.Los resultados de las absorbancias se graficaron versus días y se obtuvieron promedios de las lecturas obtenidas, además de que se calcularon las desviaciones estándar para cada día. Los ensayos se realizaron por duplicado un mínimo de tres veces

Se encontró que en la mayoría de las células positivas para el VPH, se dio efectivamente la producción de la forma soluble buscada de las proteínas MICA, con excepción de la línea SIHA. Se pudo observar que la línea HEP-G2 es un buen control positivo ya que produce gran cantidad de MICA soluble comparada con cualquiera de las demás células (Fig.12).

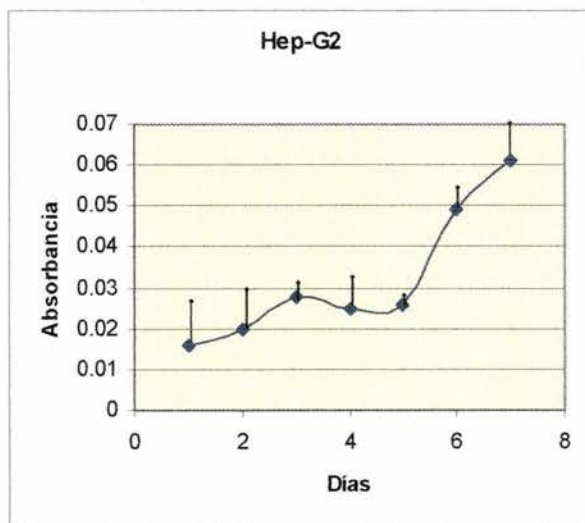


Fig.12.Presencia de la forma soluble de MIC en la línea celular HEP-G2.Los resultados de las absorbancias se graficaron versus días y se obtuvieron promedios de las lecturas obtenidas, además de que se calcularon las desviaciones estándar para cada día. Los ensayos se realizaron por duplicado un mínimo de tres veces

Por otro lado, en las células utilizadas como control negativo, C33-A y VIBO, que no están infectadas con VPH, se observó que solamente la línea VIBO presenta un ligero aumento a partir del quinto día (Fig. 13 y 14).

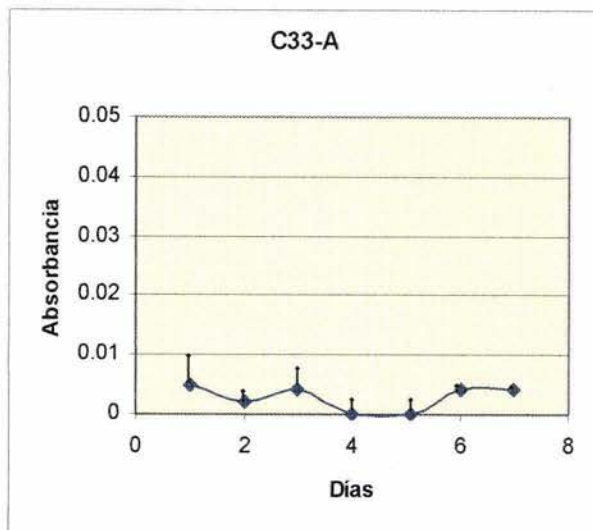


Fig. 13. Presencia de la forma soluble de MIC en la línea celular C33-A no infectada con VPH. Los resultados de las absorbancias se graficaron versus días y se obtuvieron promedios de las lecturas obtenidas, además de que se calcularon las desviaciones estándar para cada día. Los ensayos se realizaron por duplicado un mínimo de

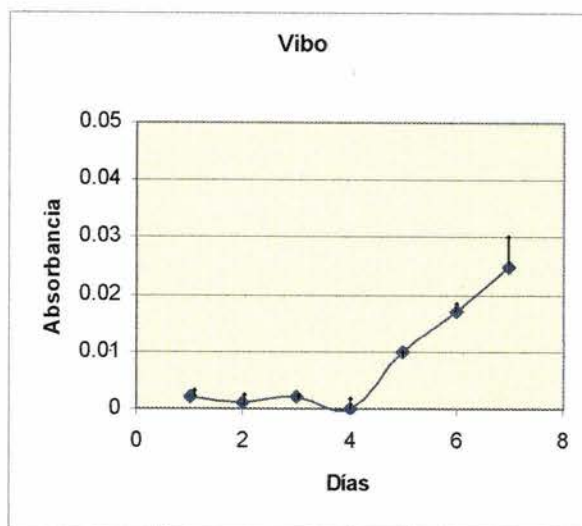


Fig. 14. Presencia de la forma soluble de MIC en la línea celular VIBO no infectada con VPH. Los resultados de las absorbancias se graficaron versus días y se obtuvieron promedios de las lecturas obtenidas, además de que se calcularon las desviaciones estándar para cada día. Los ensayos se realizaron por duplicado un mínimo de tres veces

Los valores de las absorbancias se interpolaron en la curva estándar y se obtuvieron valores que fueron de 1 ng/ml hasta 14.6 ng/ml en lo que respecta a las células provenientes de cáncer de cérvix, pues HEP-G2 presentó una concentración de 20.33 ng/ml (Tabla 1).

LÍNEA	CONCENTRACIÓN (ng/ ml)
CALO	4.6
CASKI	9.33
C33A	1.3
HELA	14.6
INBL	11.6
ROVA	10.53
SIHA	1.0
VIBO	14.6
HEP-G2	20.33

Tabla 1. Concentraciones máximas de la proteína MIC soluble. Los valores de las absorbancias se interpolaron en la curva estándar obteniéndose así las concentraciones máximas para cada línea, las cuales se presentaron a partir del quinto día aproximadamente

DISCUSIÓN

Las proteínas MIC han adquirido una gran importancia en el campo de la inmunología debido a que son marcadores de estrés fisiológico, esto significa que se ha observado que dichas proteínas se ven sobre-expresadas en una gama de células tumorales provenientes de diversos orígenes: pulmón, mama, riñón, ovario, próstata y colón (Bahram et al., 1996a). En los ensayos realizados con células provenientes de carcinoma de cérvix, se encontró que las proteínas MIC también se encuentran expresadas. Ya se ha mencionado que los genes MICA y MICB codifican para proteínas de membrana de aproximadamente 383 aminoácidos con un peso molecular de 43 KDa (Stephens 2001). En los blots obtenidos se observan claramente dos proteínas con un peso aproximado de 30 y 60 KDa respectivamente. Esta última, corresponde a la forma glicosilada de las proteínas MIC, pues se ha reportado que las proteínas MIC contienen 8 sitios potenciales de glicosilación dentro de su secuencia, lo cual le confiere un peso de entre 65 y 75 KDa (Groh et al., 1996). Por lo anterior, la proteína que aparece consistentemente en los blots con un peso de 30 KDa pudiera corresponder a la forma no glicosilada de las proteínas, la cual, según se ha reportado tienen un peso de 43 KDa aproximadamente (Bahram et al., 1996a), aunque como ya se mencionó, otra explicación también podría ser que se trataran de algunos fragmentos de degradación de las proteínas MIC. Cabría en ensayos futuros, determinar si las dos proteínas están glicosiladas y poder dilucidar esta disyuntiva.

El hallazgo importante es que las proteínas MIC sí se expresan en las células provenientes de cáncer de cérvix y además produce una forma soluble. Parece ser que el estar infectadas con el virus del papiloma humano, ya sea el tipo 16 o 18 no es factor que influye para que se de una sobre-expresión de dichas proteínas con respecto a los controles negativos para el VPH, pues como se observó en los ensayos la producción de las proteínas es semejante en las distintas líneas celulares. Cabe mencionar que no fue posible hacer una distinción entre MICA y MICB debido a que los anticuerpos utilizados son policlonales, por lo que también sería importante realizar los mismos ensayos con anticuerpos monoclonales y determinar alguna diferencia en la expresión de las proteínas en las células estudiadas.

Aunque se necesitan los ensayos de citometría de flujo (FACS) para definir con precisión si existen una diferencia en la expresión de las proteínas MICA y MICB en células infectadas con HPV versus no infectadas.

En los resultados obtenidos en los ensayos de ELISA se nota un aumento en las absorbancias comparada con los blancos, y tal parece que es a partir del cuarto día cuando se observa mejor el aumento en la producción de las proteínas MIC. Este aumento en las absorbancias corresponde a un rango que va de 1 a 14.5 ng/ml en lo que concierne a las células provenientes de cáncer de cérvix, pues como se pudo observar la línea celular HEP-G2 proveniente de cáncer de hígado produjo una cantidad mayor de MICs (20.33 ng/ml). Se ha observado que en ensayos realizados en sueros de pacientes MIC positivos se encontró la presencia de MICs en un rango de (25-50 ng/ml) (Groh et al., 2002).

En el caso de las líneas C33-A y de SIHA en las cuales se notó una producción menor de MICs, pudiera ser que debido a que las líneas celulares C33-A y SIHA se obtuvieron de biopsias en estadios menos avanzados (I y II respectivamente), es decir, de acuerdo a los resultados obtenidos en los ensayos, se puede suponer que la expresión de la forma soluble de las proteínas MIC pudiera estar ligado de alguna manera con el grado de transformación de las líneas tumorales.

Por todo lo anterior se puede establecer que la producción de una forma soluble de las proteínas MIC se pudiera expresar en las líneas provenientes de cáncer de cérvix, y esta producción pudiera estar relacionada directamente con el grado de transformación de las células.

En caso de que efectivamente se produjera la liberación de una forma soluble de las proteínas MIC, sería algo muy interesante, ya que se pudiera tomar como una estrategia por parte del VPH para evadir la respuesta inmunológica, pues es ahora sabido gracias a numerosos ensayos que las proteínas MIC al encontrarse sobre la superficie de diversas células tumorales estimulan la lisis de estas debido a que funcionan como ligandos del receptor de tipo activador NKG2D el cual se encuentra presente los linfocitos T CD8+ con receptores $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ así como en las células NK (Vetter et al., 2002). La disminución del receptor antes mencionado como consecuencia de la existencia de la forma soluble de las proteínas MIC, podría permitir la expansión del cáncer pues las células NK que son las responsables de la respuesta inmune inespecífica, encargadas de eliminar células transformadas (tumorales) y las infectadas por bacterias y/o virus estarían incapacitadas de eliminar a las células MIC positivas.

CONCLUSIONES

- Se encontró la expresión de las proteínas MIC en células provenientes de cáncer de cérvix.
- EL VPH parece no tener un efecto sobre la expresión de las proteínas MIC
- Se determinó la presencia de una forma soluble de las proteínas MIC en sobrenadantes de células provenientes de cáncer de cérvix.

PERSPECTIVAS

Es un hecho que aún falta mucho que investigar a cerca de las proteínas MIC, por lo que ahora lo que se pretende es extender los estudios en tejidos de pacientes con carcinoma de cérvix, así como en personas normales, corroborar la existencia de la forma soluble de las proteínas MIC es sueros de pacientes con carcinoma de cérvix comparando con personas normales, y de esta manera lograr entender de una manera más exacta la manera en que se desarrolla el CC.

APÉNDICE

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Gel Separador

Acrilamida 10%3.33 ml

Tris pH 8.81.25 ml

SDS 10%0.1 ml

Persulfato de amonio 1.5% 0.5 ml

Agua destilada4.8 ml

TEMED 0.015 ml

Mezclar los ingredientes en el orden anterior a excepción del TEMED, que se deberá colocar antes de que se vacíe en las placas y dejar que polimerice.

Gel concentrador

Acrilamida1.25 ml

Tris pH 6.82.5 ml

SDS0.1 ml

Persulfato de amonio 0.5 ml

Agua destilada5.6 ml

TEMED0.015 ml

Mezclar los ingredientes en el orden anterior a excepción del TEMED, que se deberá colocar hasta que se vacíe en las placas y dejar que polimerice.

Tris pH 8.8

Disolver 36.3 g de tris en 50 ml de agua destilada, ajustar el pH con HCl concentrado y aforar a 100 ml.

Tris pH 6.8

Disolver 0.05 g en 50 ml de agua destilada , ajustar el pH con HCl concentrado y aforar a 100 ml

Buffer de transferencia (II)

Tris9.1 g

Glicina42.2 g

SDS1.5 g

Mezclar en 2400 ml de agua destilada y ajustar el pH (8.3) con HCl, completar a 2600 ml y agregar 400 ml de metanol.

Buffer (I) 5X

Glicina72 g

Tris15 g

SDS5 g

Disolver el SDS en 100 ml de agua destilada, mezclar los demás ingredientes y aforar a 1000 ml.

Buffer de Elución

Glicina3.75 g

SDS2.5 g

Disolver en agua destilada y ajustar el pH a 2.5 con HCl concentrado y aforar a 500 ml con agua.

Buffer de Muestra (Laemli)

Azul de bromocresol..... 5 mg

SDS..... 1 g

Glicerol..... 5 ml

Tris pH 6.8.....

TBS

Cloruro de sodio 5 M..... 30 ml

Tris 1 M20 ml

Mezclar los ingredientes y aforar a 1000 ml con agua destilada.

TBST

A 500 ml de la solución anterior agregar 500µl de tween 20.

Buffer de lisis.

Para 50 ml.

500 µl de triton

50 µl de ortovanadato 0.1M

100 ml de EDTA 0.5 M

500 µl Tris 1 M

3 ml fluoruro de sodio 0.5 M

1 ml pirofosfato de sodio 0.1 M

1.5 ml de NaCl 5 M

500 ml de PMSF 0.1 M *

500 µl leupetina 100 µg/ml*

500 µl aprotinina 1800 µg/ml*

500 µl pepstanina 100 µg/ml *

* se agrega al buffer el día que se va a utilizar

PBS 1x.

Cloruro de potasio0.2 g

fosfato de potasio monobásico0.2 g

Cloruro de sodio8.0 g

Fosfato de sodio monobásico2.16 g

Disolver en agua destilada. Medir el pH y ajustar a 7.2 y aforar a un litro, Esterilizar 15 min a 120 lb.

Nota: Preparar una solución 20X de la solución anterior.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas A.K., Lichtman A. H., Pober J. S. *Inmunología celular y molecular*. Ed. McGraw-Hill. Madrid España 1999. pp 63-67, 218- 220.
2. Bahram S, Bresnahan M, Geraghty D.E. and Spies T. 1994. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91:6259-63.
3. Bahram S and Spies T. 1996a. The MIC gene family. *Res Immunol*. 147:328-33
4. Bahram, S., and T. A. Spies. 1996b. Nucleotide sequence of a human MHC class I MICB cDNA. *Immunogenetics* 43:230.
5. Bahram, S., N. Mizuki, H. Inoko, and T. A. Spies. 1996c. Nucleotide sequence of the human MHC class I MICA gene. *Immunogenetics* 44:80.
6. Bahram, S. 2000. MIC genes: from genetics to biology. *Adv. Immunol*. 76, 1-60
7. Bahram S. 2001. MIC genes: from genetics to biology. *Advances in Immunology*. 76:1-60.
8. Bauer, H.M.; Hildesheim, A.; Schiffman, M.H.; Glass, A.G.; Rush, B.B.; Scott, D.R.; Cadell, D.M.; Kurman, R.J.; Manos, M.M. 1993. Determinants of Genital Human Papillomavirus Infection in Low-Risk Women in Portland, Oregon. *Sex. Transm. Dis*. 20, 274-278.
9. Bauer S., Groh V., Wu J., Steinle A., Phillips J.H., Lanier L.L., & Spies T. 1999. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress inducible MICA. *Science* 285: 727.
10. Bosch F X, Manos MM., Muñoz N., Sherman M., Jansen A., Peto J., Schiffman M., Moreno V., Kurman R., Shah K., Group IS. 1995. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: A worldwide perspective. *J Natl. Cancer Inst*. Vol. 87:796-802.
11. Bosch F X, Comino R, Galera H, Guerra A, Hernández F, Nogueira JM, Rodríguez M, Dilata JJ. 2002. Monografía Diagnostico de la infección genital por el Virus del Papiloma Humano (VPH).
12. Burk, R.D.; Kelly, P.; Feldman, J.; Bromberg, J.; Vermund, S.H.; DeHovitz, J.A.; Landesman, S.H. Declining Prevalence of Cervicovaginal Human Papillomavirus Infection with Age Is Independent of Other Risk Factors. *Sex. Transm. Dis*. 1996, 23, 333-341.
13. Carretero M. et al., The CD94 and NKG2-A C- type lectins covalently assemble to form a natural Killer cell inhibitory receptor for HLA class I molecules. *J Immunol*. Vol. 27:563-567.

14. Colonna M., Samaridis J. 1995. Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells. *Science*. Vol. 268:405-408.
15. Cosman, D., Mullberg, J., Sutherland, C.L., Chin, W., Armitage, R., Fanslow, W., Kubin, M., Chalupny, N.J. 2001. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 14,123-133.
16. Curtis H., Bernes N. Sue. *Invitación a la biología*. 6ª edición. Editorial Médica panamericana, S.A. España 1996. pp 583-602.
17. Das H., Groh V., Kujil C., Sugita M., Morita C.T., Spies T., & Bukowski J.F. 2001. MICA Engagement by human V γ 2V δ 2 T cells enhances their antigen-dependent effector function. *Immunity*. Vol. 15:83-93.
18. Drain PK, Holmes KH, Hughes JP & Koutsky A. 2002. Determinants of cervical cancer rates in developing countries. *Int. J. Cancer*. Vol. 100:199-205.
19. Diefenbach A. and Raulet D.H. 1999. Natural killer cells: Stress out, turn on, tune in. *Current Biology*. Vol 9:22:851-853
20. Diefenbach A., Jamieson A.M., Liu S.D., Shastri N., Raulet D.H. 2000. Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and macrophages. *Nat. Immunol.* 1:119-126.
21. Fan, Q.R., Long, E.O., and Wiley, D.C. 2001. Crystal structure of the human natural killer cell inhibitory receptor KIR2DL1-HLA-Cw4 complex. *Nat. Immunol.* 2, 452-460.
22. Fodil N, Laloux L, Wanner V, Pellet P, Hauptmann G, Mizuki N, Inoko H, Spies T, Theodorou I and Bahram S. 1996. Allelic repertoire of the human MHC class I MICA gene. *Inmunogenetics*. 44:351-7.
23. Gaudieri S, Leelayuwat C, Townsend DC, Mullberg J; Cosman D and Dawkins RL. 1997. Allelic and interlocus comparison of the PERB11 multigene family in the MHC. *Inmunogenetics*. 45:209-16.
24. Goodwing EC & DiMaio E. 2000. Repression of human papillomavirus oncogenes in HeLa cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol.97:23:12513-18.
25. Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M and Spies T. 1996. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93:12445-50.

26. Groh V, Steinle A, Bauer S and Spies T. 1998. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial γ δ T cells. *Science*. 279:1737-40.
27. Groh V., Rhinehart R., Scecrist H., Vauer S., Grabstein K., and Spies T.1999. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived $\gamma\delta$ Tcells of MICA and MICB. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA*. Vol.96:6879-6884.
28. Groh V., Wu J., Yee C. & Spies T. 2002. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T- cell activation. *Nature* 419: 734-738
29. Hankey KG, Drachenberg CD, Papidimitriou JC, Klassen DK, Philosophe B, Bartlett ST, Groh V, Spies T & Mann DL. 2002. MIC expression in renal and pancreatic allografts. *Transplantation* Vol.73:2:304-306
30. Hernández-Avila M, Lazcano-Ponce EC, Alonso-de Ruiz P, Romieu I.1998. Evaluation of the cervical cancer screening program in Mexico: A populationbased case-control study. *Int J Epidemiol* ;27:1-7.
31. Hildesheim, A.; Gravitt, P.; Schiffman, M.H.; Kurman,R.J.; Barnes, W.; Jones, S.; Tchabo, J.G.; Brinton, L.A.;Copeland, C.; Epp, J.; Manos, M.M. 1993. Determinants of Genital Human Papillomavirus Infection in Low-IncomeWomen in Washington, DC. *Sex. Transm. Dis.* 1993, 20,279-285.
32. Holmes M.A. Li P., Petersdorf E.W., Strong R.K. 2002. Structural of allelic diversity of the MHC class I homolog MIC-B, a stress-inducible ligand for the activating immunoreceptor NKG2D. *Journal of immunology* 1395-1400.
33. Houchins, J.P., Yabe, T., McSherry, C., Bach, F.H., 1991. DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J. Exp. Med.* 173, 1017-1020.
34. Huard B. and Karlsson L. 2000. KIR expression on self-reactive CD8+ T cells controlled by T-cell receptor engagement. *Nature* 403: 325-328.
35. Jamieson A.M., Diefenbach A., McMahon C.W., Xiong N., Carlyle J.R., Raulet D.H.2002. The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. *Immunity*.Vol. 17:19-29.
36. Jinushi M, Takehara T , Tatsumi T, Kanto T, Groh V, Spies T, Kimura R, Miyagi T, Mochizuki K, Sasaki Y and Hayashi N. 2003. Expression and role of MICA and MICB in human hepatocellular carcinomas and their regulation by retinoic acid. *Int. J. Cancer*: 104, 354-361.

37. Karlhofer F.M., Ribaud R.K., Yokoyama W.M. MHC class I alloantigen specificity of Ly-49+ of IL-2 activated natural killer cells. *Nature* Vol. 358:66-70.
38. Kennedy C., Naipian A., Gruis A. N., Strujik L., Ter S.J., Willemze R., Frans H.J., Bouwes N.J., Doxiadis I.N. 2002. MICA gene polymorphism is not associated with an increased risk for skin cancer. *The journal of investivative dermatology*. Vol 118 No. 4: 686-691.
39. Lazcano-Ponce EC, Rascón-Pacheco RA, Lozano-Ascencio R, Velasco-Mondragón HE. Mortality from cervical carcinoma in Mexico: Impact of screening, 1980-1990. *Acta Cytol* 1996;40:506-512.
40. Leiner LL. 2003. Natural killer cell receptor signaling. *Current opinion immunology*. Vol. 15:1-7
41. Li P., Wilie ST., Bauer S., Morris DL., Spies T., Strong RK., 1999. Crystal structure of the MHC class I homolog MIC-A a $\gamma\delta$ T cell ligand. *Immunity*. 10:1-20
42. Mark H., Goldberg L., Goldberg Einstein. 2002. Human papillomavirus and cervical neoplasia. *Cancer investigation*. Vol.20:7:1080-85.
43. Mendoza Rincón JF, Partida Rodríguez O, Soto Cruz I, Corona Ortega MT, Rangel Corona R, García del Valle A, Weiss Steider B. 2001. Los genes MIC (MHC class I chains related genes): su importancia en la respuesta inmune no específica y en condiciones patológicas. *Vertientes* 4:11-18.
44. Mizuki N., Ota M., Kimura M. 1997a. Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: A strong association of the six GCT repetitions with behcet disease. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. Vol.94:1298-1303.
45. Mizuki N, Ando H, Kimura M, Ohno S, Miyata S, Yamazaki M, Tashiro H, Watanabe K, Ono A, Taguchi S, Sugawara Ch, Fukuzumi Y, Okumura K, Goto K, Ishihara M, Nakamura S, Yonemoto J, Kikuti YY, Shiina T, Chen L, Ando A, Ikemura T and Inoko H. 1997b. Nucleotide sequence analysis of the HLA class I region spanning the 237-kb segment around the HLA-B and C genes. *Genomics*. 42:55-66.
46. Muñoz N, Bosch FX, San Jose S, Herrero R. Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer C J L, 2003. *N. England journal of medicine*. Vol. 348:518-527.
47. National Cancer Institute. 1989. Workshop: The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytological diagnoses. *JAMA*;262:931-934.
48. Pellet P, Vaneensberghe C, Debré P, Sumyuen MH & Theodorou I. 1999. MIC genes in non-human primates. *Eur. Journal of immunogenetics*. Vol. 26:239-241.

49. Regueiro G.J.R., López L.C., González R.S., Martínez N.E. 2002. *Inmunología Biología y Patología del sistema inmune*. Editorial Médica Panamericana. 3era Edición. Madrid España.
50. Rojas-Espinoza O. *inmunología*. Editorial médica panamericana. México D.F. 1996. pp 17
51. Salmerón-Castro J, Franco-Marina F, Salazar-Martínez E, Lazcano-Ponce EC. 1997. Panorama epidemiológico de la mortalidad por cáncer en el IMSS: 1990-1995. *Salud Publica Mex.* 39:266-273.
52. *Salud Publica Mex* 1999. Estadísticas de mortalidad relacionada con la salud reproductiva. México, 1997 (Indicadores) 41:138-146.
53. Secretaria de salud, Dirección general de epidemiología. 1996. *Histopathological Registry of malignant Neoplasma. SSA ?*
54. Stephens H.A. 2001. MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved ?. *Trends Immunology*.
55. Stittes D., Abba I., Parslow T. *Inmunología básica y clínica*. Editorial el manual moderno S.A de C.V. México D.F. 1996 pp 198-206, 278-280.
56. Sutherland CL, Chalupny NJ, Schooley K, VandenBos T, Kubin M, Cosman D. 2002. UL16-binding proteins, novel MHC class I-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells. *J Immunol.* 168:671-679.
57. Tieng V., Bouguéneq C., Du Merle L., Bertheau P., Desreumaux P., Janin A., Charron D., & Toubert A. 2002. Binding of Escherichia coli adhering AfaE to CD55 triggers cell-surface expression of the MHC class I-related molecule MICA. *Immunology Vol.* 99:5:2977-2982.
58. Tommasino M., Acardi R., Caldeira S., Dong W, Malanchi I, Smet A, Zehbe I. 2003. The role of TP53 in cervical carcinogenesis. *Human mutation.* Vol 21:307-12
59. Torroella-Kouri M, Morsberg S., Carillo A., Mohar A., Meneses A., Ibarra M., Daniel R. W., Ghaffari A. M., Solorza G., Shah K.V. 1998. HPV prevalence among Mexican Women with neoplastic and normal cervixes. *Gynecology oncology.* Vol. 70:115-120.
60. Touzé A, San José S, Coursaget P, Almirall MR, Palacio V, Meijer CL, Kornegay J, Bosch JF. 2001. Prevalence of anti-human papillomavirus type 16, 18, 31 and 58 virus-like particles in women in the general population and in prostitutes. *J. of clinical microbiology.* Vol.39:12:4344-47.
61. Trowslade J. 2001. Genetic and functional relationships between MHC and NK receptor genes. *Immunity.* Vol. 15: 363-374.

62. Vance R.E., Tanamachi D.M., Hanke T., Raulet D.H.1997. Cloning of a mouse homolog of CD94 extends the family of C-type lectins on murine natural Killer cells. *Eur. J.Immunol.* Vol. 27:3236-41.
63. Vetter CS, Groh V, Straten P, Spies T, Brocker E, Becker JC. 2002. Expression of stress-induced MHC class I related chain molecules on human melanoma. *J. of investigative dermatology.* Vol. 118:4:600-605
64. Wagtmann N., Rajagopalan S., Winter C.C., Peruzzi M., Long E.O. 1995. Kileer cell inhibitory receptors specific for HLA-A and HLA-B identified by direct binding and by functional transfer. *Immunity.* Vol. 3:801-809.
65. Walboomers JJM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV , Snijders PJF, Peto J, Meijer CJLM and Muñoz N. Human. 1997. Papillomavirus Is A Necessary Cause Of Invasive Cervical Cancer Worldwide. *J. Pathol.* 189: 12-19
66. Wheeler, C.M.; Parmenter, C.A.; Hunt, W.C.; Becker, T.M.; Greer, C.E.; Hildesheim, A.; Manos, M.M. 1993. Determinants of Genital Human Papillomavirus Infection Among Cytologically Normal Women Attending the University of New Mexico Student Health Center. *Sex. Transm. Dis.* 20, 286-289.
67. Wolf JK., Ramirez PT. 2001. The molecular biology of cervical cancer. *Cancer Investigation.* Vol.19:6:621-629.
68. Wu J., Song Y., Bakker A.B., Bauer S., Spies T., Lanier L.L., Phillips J.H. 1999. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science.* 285:730-732.
69. Yokoyama W M. 2002. catch us if you can. *Nature* Vol. 419:679-680.
70. Zur HH. 2000. Papillomaviruses causing cancer:Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J. of the national cancer institute.* Vol.92:9:690-698.
71. Zwirner NB, Fernández-Viña MA and Stastny P. 1998. MICA, a new polymorphic HLA-related antigen, is expressed mainly by keratinocytes, endotelial cells and monocytes. *Inmunogenetics.* 47:139-48.
72. Zwirner N.W., Marcos C.Y., Mirbaha F., Zou Y. & Stastny.2000. Identification of MICA as a new polymorphic alloantigen recognized by antibodies in sera of organ transplant recipients. *Human Immunology.* Vol. 61: 917-924.