



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"**

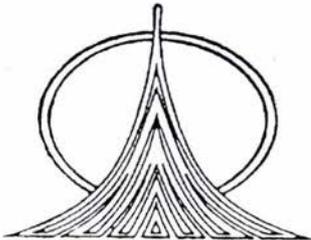
**Análisis del haplotipo HLA - I y de  
la expresión de moléculas del  
procesamiento antigénico, en  
células de pacientes con cáncer  
cervico-uterino**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A :  
**MICHÉLE-EK GONZÁLEZ FRANCO**

DIRECTOR: DRA. MA. DE LOURES MORA GARCÍA  
ASESOR: DR. ALBERTO MONROY GARCÍA



MÉXICO, D.F.

OCTUBRE 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Carrera: Químico Farmacéutico Biólogo

**Análisis del haplotipo HLA - I y de  
la expresión de moléculas del  
procesamiento antigénico, en  
células de pacientes con cáncer  
cervico-uterino**

ALUMNO: Michèle-Ek González Franco

NO. DE CUENTA: 9955124-1

AÑO DE TERMINO DE CARRERA: 2003

ORIENTACIÓN: Bioquímico Clínico

DIRECTOR: Dra. Ma. De Lourdes Mora García

ASESOR: Dr. Alberto Monroy García

OPCIÓN DE TITULACIÓN: Tesis experimental

LABORATORIO DE DIFERENCIACIÓN CELULAR Y CÁNCER L-326  
(FES ZARAGOZA)



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

# FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

## DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR PRESENTE.**

Comunico a usted que la alumna GONZÁLEZ FRANCO MICHÉLE-EK, con número de cuenta 9955124-I de la carrera de Q. F. B., se le ha fijado el día 18 del mes de Octubre de 2004 a las 15:00 hrs., para presentar examen profesional, que tendrá lugar en la sala de exámenes profesionales Campus II de esta Facultad, con el siguiente jurado:

- PRESIDENTE Dr. ALBERTO MONROY GARCÍA
- VOCAL Dra. MA. DE LOURDES MORA GARCÍA
- SECRETARIO Q.F.B. FRANCISCO JAVIER PARADA GARCÍA
- SUPLENTE M. en C. RAQUEL RETANA UGALDE
- SUPLENTE Q.F.B. NORMA PATRICIA VIVAR GUZMÁN

Handwritten signatures of the jury members: Alberto Monroy García, Ma. de Lourdes Mora García, Francisco Javier Parada García, Raquel Retana Ugalde, and Norma Patricia Vivar Guzmán.

El título de la tesis que se presenta es: **Análisis del haplotipo HLA-I y de la expresión de moléculas del procesamiento antigénico, en células de pacientes con cáncer cérvico-uterino.**

Opción de titulación: **Tesis Experimental**

**ATENTAMENTE.**  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
México, D.F. a, 10 de Septiembre de 2004.

MTRO. JUAN FRANCISCO SÁNCHEZ RUIZ  
DIRECTOR DE DIRECCIÓN

RECIBI

Vo Bo

A mi Tía Beatriz Franco

A quien dedico mi carrera y  
en especial esta Tesis por ser  
mi fuente de inspiración y mi  
fuerza para trabajar en busca  
de una esperanza para la gente  
con Cáncer.

A mi Mamá

quien fue mi apoyo incondicional y a  
quien debo todo lo que soy.

## AGRADECIMIENTOS

Dr. Alberto Monroy García y Dra. María de Lourdes Mora García, por compartir sus conocimientos, su amistad y por ser parte esencial de la culminación de este trabajo.

M en C Jorge Hernández Montes y Q.F.B Enrique Escalera Zúñiga , por su amistad y su apoyo incondicional.

A los doctores y maestros quienes conforman la Unidad de Diferenciación Celular y Cáncer en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Al apoyo Recibido de la beca del DGAPA-PAPIIT IN210501. Este proyecto fue financiado por DGAPA PAPIIT Apoyo Extraordinario No. IN228404-1; y CONACYT, proyecto No. 34835-M.

## DEDICATORIAS

A la familia Bonilla: por ser parte importante en mi vida.

A la familia Amaya Franco: por enseñarme el valor de Dios y de la familia.

A Luis Alberto Luna Camacho: por el aliento, el amor y el tiempo que hemos compartido y por ser mi fuente de energía para la culminación de mis sueños.

A mis mejores Amigas: María Inés González y Beatriz Ortega por todo los tiempos que hemos compartido juntas y por su constante apoyo.

A todos mis amigos que conocí durante la carrera por darme su apoyo siempre que lo necesité.

Los sueños pueden realizarse si  
dedicas un tiempo para pensar  
en lo que deseas en la vida...

<b>INDICE</b>	<b>Página</b>
<b>1. RESUMEN</b>	4
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	5
<b>3. FUNDAMENTACIÓN DEL TEMA</b>	7
Respuesta inmune	7
Complejo principal de histocompatibilidad (MHC)	11
Procesamiento y presentación de antígenos por MHC Clase I	17
Cáncer Cérvico-uterino	22
Expresión de HLA Clase II en el Cáncer Cérvico-uterino	28
Expresión de HLA Clase I en el Cáncer Cérvico-uterino	30
<b>4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	32
<b>5. OBJETIVOS</b>	34
<b>6. HIPÓTESIS</b>	35
<b>7. MATERIAL Y MÉTODO</b>	36
Material biológico	36
Cultivos celulares	36
Tipificación de HLA Clase I por microcitotoxicidad	37
Manejo de biopsias de CaCu	38

Transcripción reversa con reacción en cadena de las polimerasa (RT-PCR)	39
Corrimiento de los productos de PCR en gel de agarosa y revelado del gel de agarosa	42
Análisis estadísticos	42
<b>8. RESULTADOS</b>	43
Características de las pacientes y donadoras	43
Frecuencias alélicas HLA Clase I de pacientes y donadoras	43
Expresión de moléculas participantes en el procesamiento antigénico (TAP's, LMP's y PA28 $\alpha$ y $\beta$ )	47
Asociación de alelos HLA Clase I con defectos en la expresión de moléculas del procesamiento antigénico en tumores de Cáncer Cérvico-uterino	51
<b>9. ANÁLISIS DE RESULTADOS</b>	58
<b>10. CONCLUSIONES</b>	62
<b>11. PROPUESTAS</b>	63
<b>12. ANEXOS</b>	64
<b>13. GLOSARIO DE ABREVIATURAS</b>	74
<b>14. BIBLIOGRAFÍA</b>	76

## 1. RESUMEN

El Cáncer Cérvico-uterino (CaCu) en nuestro país es una de las principales causas de muerte por cáncer entre las mujeres, aún cuando se ha encontrado que la infección por genotipos oncogénicos de Virus del Papiloma Humano (VPH) es el factor de riesgo más significativo para desarrollar esta patología, las evidencias indican que la respuesta inmune del hospedero también juega un papel importante en la patogénesis de la enfermedad (Alonso P., *et al* 2000).

Aunque la evidencia de la asociación entre el Antígeno Leucocitario Humano (HLA) y CaCu ha sido controversial, hay estudios donde algunos haplotipos, HLA Clase I o II, están asociados positivamente con cáncer cervical invasor, mientras otros haplotipos actúan de manera negativa respecto al desarrollo del tumor, es decir, son protectores (Garrido F., *et al* 1997; Speiser D., *et al* 2004; Rios A., *et al* 2004). En el presente trabajo se estudiaron muestras de 100 pacientes con CaCu y 100 donadoras sanas. Los resultados obtenidos nos muestran que el haplotipo más frecuente en ambos grupos fue el dado por los alelos HLA-A2, -B35 y -Cw4; no obstante el alelo HLA-Cw10 fue el más frecuente en las pacientes con CaCu. Al analizar las asociaciones alélicas en ambos grupos, encontramos que las asociaciones de HLA-B39, -B35, -A3, -A24 y -A1 con el alelo HLA-Cw7 y los alelos HLA-A1 y -B39 con HLA-Cw4, fueron por lo menos dos veces más frecuentes en las donadoras sanas. Asimismo, al analizar la expresión de las moléculas del procesamiento antigénico en tumores de estas pacientes encontramos que TAP 1, TAP 2 y LMP-10 estuvieron ausentes en un 37, 43 y 47% respectivamente, además de que estas pacientes presentaron una baja frecuencia de las asociaciones alélicas antes mencionadas, lo que nos permite sugerir que estas asociaciones alélicas puedan estar asociadas en la protección contra el CaCu.

## 2. INTRODUCCIÓN

El Cáncer Cérvico-uterino (CaCu) es la segunda causa de muerte por cáncer entre las mujeres de todo el mundo y aún, cuando se ha encontrado que la infección por genotipos oncogénicos de Virus del Papiloma Humano (VPH) es el factor de riesgo más significativo para desarrollar esta patología, las evidencias indican que la respuesta inmune del hospedero también juega un papel importante en la patogénesis de la enfermedad (Alonso P., *et al.* 2000).

La respuesta inmune mediada por linfocitos T citotóxicos (CD8+) es fundamental en la eliminación de células infectadas con virus. Ellos reconocen péptidos antigénicos presentados por moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad Clase I (MHC-I) HLA en humanos, en la membrana de las células infectadas por virus o de las células tumorales. Los péptidos antigénicos derivan de la fragmentación de proteínas virales o mutadas del tumor producida por un complejo multienzimático (proteasoma) constituido por enzimas proteolíticas de bajo peso molecular (LMP-2, -7 y -10) y las proteínas activadoras del proteasoma PA28 $\alpha$  y  $\beta$  localizadas en el citoplasma. Posteriormente los péptidos son transportados al interior del retículo endoplásmico por las proteínas Transportadoras Asociadas al Procesamiento de Antígenos (TAP 1 y TAP 2) donde se ensamblan a las moléculas MHC-I y finalmente emergen a la superficie celular para su presentación.

Se ha reportado que en lesiones premalignas y malignas del cérvix, la pérdida o deficiencia en la expresión de las proteínas participantes en el procesamiento de antígenos puede favorecer la evasión de la respuesta inmune en estas pacientes con

CaCu. De hecho, la baja expresión de las proteínas TAP 1 o mutaciones de éstas, se han relacionado con la baja expresión de moléculas HLA Clase I, principalmente de los alelos: HLA-A2, -A30, -A31 y -A32; HLA-B39, -B40 y -B35 en las células tumorales de cáncer cervical (Tanaka K., *et al.* 1984; Borysciewicz L.K., *et al.* 1996; Bournnell M.E., *et al.* 1996; Silva B., *et al.* 1999).

Tomando en consideración que la pérdida en la expresión de proteínas del procesamiento antigénico puede asociarse con la disminución en la expresión de moléculas HLA Clase I y que ésta puede ser un factor genético para un mayor desarrollo de la enfermedad, el presente trabajo tuvo como finalidad el de analizar las frecuencias de haplotipos HLA Clase I de pacientes con cáncer cervical y su asociación con la pérdida en la expresión de moléculas que participan en el procesamiento de antígenos (TAP 1 y 2; LMP-2, -7 y -10; PA28 $\alpha$  y  $\beta$ ).

### 3. FUNDAMENTACIÓN DEL TEMA

#### *Respuesta Inmune*

El cuerpo tiene diferentes mecanismos de protección. La primera línea de defensa se proporciona por barreras mecánicas como la piel, que cubren superficies corporales y evitan físicamente que microorganismos y otros potenciales agentes lesivos penetren a los tejidos situados por debajo. Otra forma de defensa son células especializadas con la capacidad de reconocer, secuestrar y eliminar varios tipos de microorganismos o sustancias perjudiciales (ver Tabla 3.1) (Abbas A.K., *et al.* 2004).

El sistema inmunitario tiene cuando menos tres propiedades funcionales principales que lo diferencian de todas las otras defensas del cuerpo. La primera es su especificidad extrema, es decir, la propiedad de reconocer y distinguir un número grande de moléculas blanco distintas y responder (o no hacerlo) a cada una de ellas de manera individual. La segunda, efectúa una discriminación entre lo propio y lo extraño, de manera que coexiste pacíficamente con todas las múltiples proteínas y otras materias orgánicas que constituyen al huésped. La tercera, el sistema inmunitario tiene memoria; la propiedad de adaptarse a partir de experiencias previas (Roitt I., *et al.* 2000).

Desde hace tiempo, estos factores defensores se han caracterizado en dos sistemas funcionales más o menos distintos, con base en el tipo de resistencia (inmunidad) que confieren contra patógenos particulares: la inmunidad innata (o natural) y la inmunidad adquirida (o específica) (ver Tabla 3.1) (Margni R.,1996).

Tabla 3.1 Características de la inmunidad innata y adquirida (Abbas A.K., *et al.* 2004).

<b>Características</b>	Inmunidad innata	Inmunidad adquirida
Especificidad	Para estructuras comunes a grupos de microorganismos relacionados	Para antígenos de microorganismos y antígenos no microbianos.
Diversidad	Limitada	Muy amplia
Memoria	No	Si
<b>Componentes</b>		
Barreras físicas y químicas	Piel, epitelios mucosos; productos químicos antimicrobianos	Linfocitos en epitelios; anticuerpos secretados en superficies epiteliales.
Proteínas sanguíneas	Complemento	Anticuerpos
Células	Fagocitos (macrófagos, neutrófilos), células asesinas naturales	Linfocitos

La *inmunidad innata* (o natural) se refiere a cualquier resistencia existente al nacimiento que se presenta la primera vez que se enfrenta a un patógeno. Estos incluyen a las barreras físicas y a tres categorías de células inmunológicas que son granulocitos, monocitos/macrófagos y linfocitos (ver Tabla 3.1). Un ejemplo de las células más abundantes en sangre, son los granulocitos, los cuales fagocitan (ingieren) los antígenos que penetran en el cuerpo, sobre todo si estos antígenos han sido recubiertos en la sangre por inmunoglobulinas o por proteínas del sistema del complemento. Una vez ingeridos, los antígenos suelen ser destruidos por las potentes enzimas de los granulocitos (Janeway C., *et al.* 2005).

Las células y factores humorales del sistema inmunitario innato, en la mayor parte, han evolucionado para reconocer carbohidratos o marcadores de lípidos distintivos que se encuentran en muchos tipos de patógenos, pero no en el huésped normal.

La *inmunidad adquirida* (o adaptativa), se refiere a la resistencia débil o ausente en el momento de la primera exposición, pero que aumenta de manera espectacular con exposiciones subsecuentes al mismo patógeno específico. Hay dos tipos de respuesta inmunitaria adquirida, la inmunidad **humoral** y la **celular**, las cuales están mediadas por diferentes componentes del sistema inmunitario y cuya función es eliminar diferentes tipos de microorganismos o de sustancias extrañas que inducen una inmunidad específica (antígenos) (Abbas A.K., *et al.* 2000).

En la inmunidad **humoral** participan moléculas presentes en la sangre, denominadas anticuerpos, que se producen a partir de células conocidas como linfocitos B. Estos anticuerpos reconocen específicamente antígenos microbianos, estos linfocitos neutralizan a los microorganismos y dirigen su acción para su eliminación por diversos mecanismos efectores.

La inmunidad humoral es el principal mecanismo de defensa frente a los microorganismos extracelulares y sus toxinas debido a que los anticuerpos secretados pueden unirse a éstos para facilitar su eliminación (Roitt I. 2000).

Estos anticuerpos son elementos especializados, de manera que tipos diferentes de anticuerpos pueden activar mecanismos efectores distintos.

En la inmunidad **celular**, también llamada inmunidad mediada por células, participan los linfocitos T. Los microorganismos intracelulares, tales como los virus y algunas bacterias, sobreviven y proliferan en el interior de los fagocitos y otras células del huésped, lugar al que no tienen acceso los anticuerpos circulantes.

La defensa frente a este tipo de infecciones depende de la inmunidad celular que induce la destrucción de los microorganismos residentes en los fagocitos o de las células infectadas (Gostout B.S., *et al.* 2003).

Los linfocitos T, se subdividen en poblaciones funcionalmente diferentes, de las cuales las mejores definidas son las células T colaboradoras y las células T citolíticas (o citotóxicas) (Gostout B.S., *et al.* 2003).

Las células T no producen anticuerpos, sus receptores de antígenos son moléculas de la membrana distintas de los anticuerpos, pero estructuralmente relacionadas con ellos (Janeway C., *et al.* 2005).

Los linfocitos T colaboradores y citolíticos (CTL) tienen una especificidad limitada para los antígenos; sólo reconocen antígenos peptídicos unidos a proteínas del huésped codificadas por genes del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y que se expresan en la superficie de las células blanco ( Fig. 3.1 )(Stites D., *et al.* 2000).



Fig.3.1 Los linfocitos, o glóbulos blancos de la sangre, se generan en la médula. Estas células son las principales responsables del control de las infecciones, ya que atacan de manera directa a los antígenos, o sustancias extrañas al organismo. Cuando se trasplanta un órgano, los linfocitos suelen atacar a los tejidos trasplantados, causando el rechazo del trasplante.

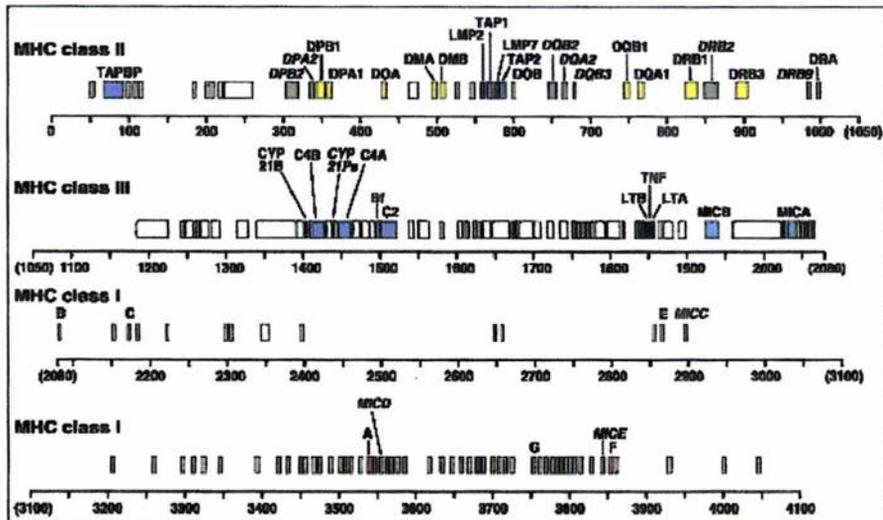
[www.CNRI/Science Source/Photo Researchers](http://www.CNRI/Science Source/Photo Researchers)

### *Complejo principal de histocompatibilidad (MHC)*

El MHC, está presente en todos los vertebrados superiores estudiados hasta la fecha. (Stoltze L, *et al.* 2000).

Para llegar al reconocimiento de estos antígenos, Jean Dausset, Jan van Rood y colaboradores demostraron por primera vez que los pacientes que rechazan trasplante de riñón o que presentaban reacciones a los leucocitos en las transfusiones, contienen con frecuencia anticuerpos circulantes que reaccionan con antígenos presentes en la superficie de los leucocitos de la sangre o el órgano donado. Los sueros que reaccionan frente a las células de otros individuos alogénos se denominan aloantisueros y contienen aloanticuerpos, cuyas dianas moleculares se designaron como aloantígenos, los cuales son los productos de genes polimorfos que distinguen tejidos extraños de tejidos propios. Se recolectaron conjuntos de aloantisueros procedentes de donantes inmunizados con aloantígenos, tales como mujeres multíparas (las cuales se inmunizan por los aloantígenos paternos expresados por el feto durante el embarazo), voluntarios inmunizados activamente y receptores de transfusiones o trasplantes. Estos sueros se compararon según su capacidad para unirse y lisar linfocitos procedentes de diferentes donantes. El intercambio de reactivos entre laboratorios, gracias a los esfuerzos realizados en varios talleres internacionales, permitieron la identificación de diversos locus genéticos polimorfos agrupados conjuntamente en un único locus en el cromosoma 6 (ver Fig. 3.2), cuyos productos son reconocidos por los aloanticuerpos. Debido a que estos aloantígenos se expresan en leucocitos humanos, se denominaron Antígenos Leucocíticos Humanos (HLA) (Abbas A.K., *et al.* 2004).

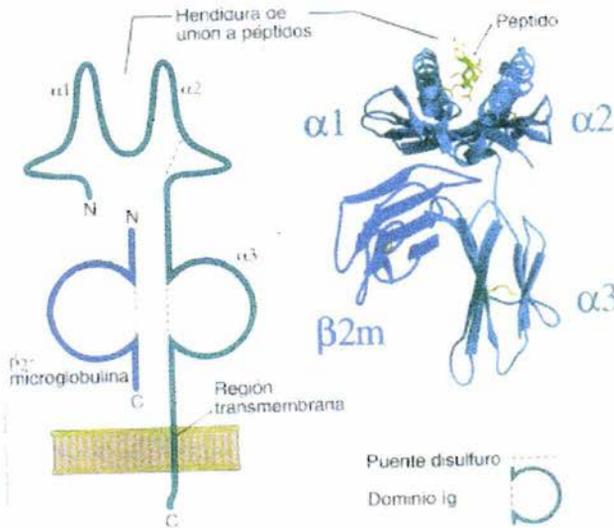
Fig. 3.2 Estructura genética del MHC en el brazo corto del cromosoma 6 (Janeway C., *et al.* 2005).



De manera que, el locus HLA humano es funcionalmente equivalente al locus H-2 del ratón. Hoy en día se sabe que las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) presentes en la superficie celular participan directamente en el reconocimiento de un antígeno (Ag) por parte de los linfocitos T colaboradores y citotóxicos (Gostout B.S., *et al.* 2003).

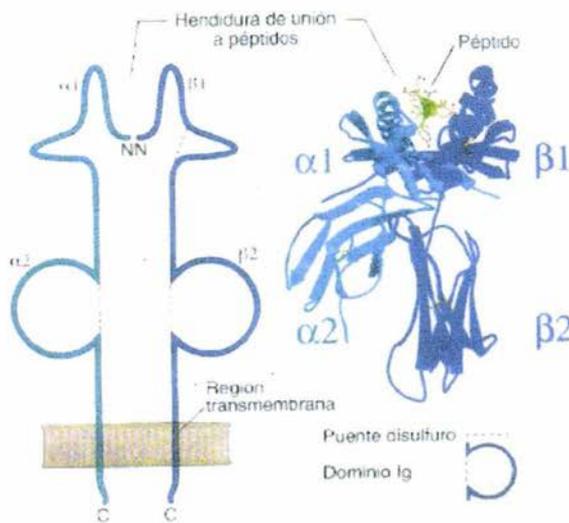
Las características más sobresalientes del HLA son la extensión de su polimorfismo y la identificación de 150 alelos para algunos de los loci, mediante análisis serológicos. La secuenciación molecular ha mostrado que un alelo HLA único definido serológicamente podría constar en realidad de múltiples variantes ligeramente diferentes (ver Tabla 3.2) (Abbas A.K., *et al.* 2004).

En la región del HLA en el brazo corto del cromosoma 6 ( Fig. 3.2) se pueden definir tres clases de genes; la Clase I (Fig. 3.3), la cual codifica péptidos transmembranales de 44kDa asociados en la superficie celular con la  $\beta_2$ -microglobulina, los cuales se encuentran en casi todas las células del organismo excepto en los trofoblastos vellosos del ser humano, por lo que el HLA se asocian con el antígeno de la superficie de las células infectadas por virus para señalar a los linfocitos T citotóxicos y presentan péptidos a las células T CD8+ y son reconocidas por éstas (Janeway C., *et al.* 2005).



**Fig. 3.3 Estructura de la molécula MHC Clase I.** La figura (izquierda) ilustra las diferentes regiones de la molécula MHC Clase I, constituida por una subunidad pesada y una subunidad ligera  $\beta_2$ -micro-globulina ( $\beta_2m$ ). En la parte superior se encuentra la hendidura de la molécula donde se traba el péptido, de unos nueve aminoácidos. Los extremos del péptido se mantienen fijos mediante enlaces en los entrantes de los bordes de la hendidura. La figura (derecha) representa el diagrama de cinta del MHC Clase I (Abbas A.K., *et al.* 2004).

Las moléculas de Clase II (Fig.3.4), son heterodímeros transmembranales compuestos por cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de casi el mismo tamaño, se asocian particularmente con linfocitos B y macrófagos pero pueden ser inducidos sobre células del endotelio capilar y células epiteliales por acción del interferón- $\gamma$ , señalan a los linfocitos T colaboradores para los linfocitos B y los macrófagos por un mecanismo de activación similar y presentan péptidos a las células T CD4+.



**Fig.3.4 Estructura de la molécula MHC Clase II.** La figura (izquierda) ilustra las diferentes regiones de la molécula MHC Clase II, constituidas de subunidades alfa ( $\alpha$ ) y beta ( $\beta$ ), de características similares. Estas moléculas retienen los péptidos en una hendidura y los enlaces que los ligan se hallan a la mitad del surco. Los péptidos unidos a las moléculas Clase II suelen ser más largos y variables en su longitud que los asociados con la Clase I. La figura (derecha) representa el diagrama de cintas del MHC Clase II. (Abbas A .K., *et al.* 2004).

Los genes de Clase III codifican componentes del complemento relacionados con la formación de C3 convertasas (Abbas A.K., *et al.* 2004). Se conoce que el HLA está compuesto por millones de pares de bases de DNA, en el centrómero del cromosoma 6 podemos encontrar la región que contiene genes de Clase II; mientras

que en el telómero del brazo corto de este cromosoma se encuentra ubicada la región que contiene genes de Clase I (ver Fig. 3.2).

Entre la región de Clase I y Clase II se encuentra la región de Clase III. Este contiene 75 genes que codifican una gran variedad de diferentes proteínas, las cuales se han encontrado que codifican componentes complementarios C4, C2 y factor B4 (ver Fig. 3.2) (Marsh S., *et al.* 2002).

Existen cinco isotipos de las proteínas de HLA Clase II los cuales son designados como: HLA-DM, -DO, -DP, -DQ y -DR. Los genes principales de HLA Clase I son aquellos que se codifican en cadenas pesadas (llamadas también cadenas  $\alpha$ ) en seis isoformas diferentes para la Clase I: HLA-A, -B, -C, -E, -F y -G (Tabla 3.2).

También existen las isoformas HLA-H, -J, -K y -L, las cuales son pseudogenes no funcionales cercanamente relacionados en la secuencia de los genes funcionales de clase I (Tabla 3.2) (Marsh S., *et al.* 2002).

Los genes que codifican para la  $\beta_2$ -microglobulina ( $\beta_2$ -m), que se asocia a la cadena pesada de la molécula de HLA Clase I, no se encuentra situada en el complejo de HLA sino en el cromosoma 15. Debido a la localización del cromosoma, el gen  $\beta_2$ -m no le da ninguna designación al HLA.

Otro gen parecido al complejo HLA Clase I localizado cerca de éste es el gen MIC y el HFE. Estos genes parecidos al HLA Clase I tienen la función de involucrarse en la defensa y el sistema inmune (Marsh S., *et al.* 2002).

Tabla 3.2 Número de alelos HLA con nombres oficiales en cada locus hasta julio del 2002 ( Marsh S., *et al.* 2002).

<i>Locus</i>	<i>Número de alelos</i>
HLA-A	250
HLA-B	490
HLA-C	119
HLA-E	6
HLA-F	1
HLA-G	15
HLA-DRA	3
HLA-DRB1	315
HLA-DRB2	1
HLA-DRB3	38
HLA-DRB4	12
HLA-DRB5	15
HLA-DRB6	3
HLA-DRB7	2
HLA-DRB8	1
HLA-DRB9	1
HLA-DQA1	22
HLA-DQB1	53
HLA-DPA1	20
HLA-DPB1	99
HLA-DOA	8
HLA-DOB	8
HLA-DMA	4
HLA-DMB	6
TAP 1	6
TAP 2	4

### *Procesamiento y Presentación de Antígenos por MHC Clase I*

Los linfocitos T CD8+, que mayoritariamente son Linfocitos T citotóxicos (CTL), reconocen antígenos asociados a moléculas de MHC-I. Además, las células T CD8+ generalmente reconocen antígenos que son sintetizados dentro de las células y luego expresados en sus superficies en asociación con MHC-I. Los ejemplos clásicos de antígenos sintetizados endógenamente son las proteínas virales y los antígenos tumorales. Los CTL son el principal mecanismo de defensa antiviral y pueden también tener un papel importante en la destrucción de células tumorales (Lehner J.P., and Creswell P. 1996).

Se han descrito 5 diferentes etapas que forman parte del mecanismo de procesamiento y presentación de antígenos por medio de moléculas MHC-I (Abbas A.K., *et al.* 2004).

Las etapas son las siguientes: A) generación de proteínas en el citosol; B) degradación proteolítica de las proteínas; C) transporte de péptidos desde el citosol al Retículo Endoplásmico (RE); D) ensamblaje de los complejos péptido-MHC Clase I en RE; y E) expresión en superficie de los complejos péptido-Clase I (Fig. 3.5).

#### *A) Generación de proteínas en el citosol*

La principal fuente de péptidos que se unen a moléculas MHC-I, deriva de proteínas sintetizadas por los ribosomas celulares. Sin embargo, las proteínas introducidas en el citosol, ya sea de manera artificial o durante el proceso de infección viral o bacteriana, puede también contribuir a la generación de péptidos antigénicos para ser presentados por moléculas MHC-I (Matsumara M., *et al.* 1992; Driscoll J., *et al.* 1992; y Williams D.B., *et al.* 1996).

La mayor parte de la actividad proteolítica que ocurre en el citosol, es atribuida a los proteasomas, quienes se encargan de digerir a las proteínas citosólicas para producir péptidos de 8-10 residuos de longitud (ver Fig. 3.5) (Goldeberg A.L., *et al.* 1992; Benham A., *et al.* 1995; y Lehner J.P., *et al.* 1996).

#### B) *Degradación proteolítica de las proteínas citosólicas*

La degradación proteolítica es el principal mecanismo de generación de péptidos por el proteasoma. El proteasoma es un gran complejo enzimático multiprotéico con un amplio espectro de actividades proteolíticas que se encuentran en el citoplasma de la mayoría de las células.

Dos subunidades catalíticas- $\beta$  que están presentes en muchos proteasomas, llamados LMP-2, LMP-7 se codifican por los genes del HLA y son muy importantes para generar péptidos de unión a la Clase I (Abbas A. K., *et al.* 2004). Una tercera subunidad del proteasoma conocida como MECL-1 (LMP-10), es inducible con IFN- $\gamma$  y reemplaza a la subunidad de proteasoma Z (Groettrup M., *et al.* 1997).

El proteasoma básicamente da mantenimiento a las células ya que degrada muchas proteínas citoplásmicas diferentes. Estas proteínas se marcan para ser degradadas por el proteasoma mediante la unión covalente de varias copias de un pequeño polipéptido denominado ubiquitina. Una vez terminada la ubiquitinación, se despliegan las proteínas, se elimina la ubiquitina y se enrollan las proteínas a través de los proteasomas (Fig. 3.5) (Lehner J.P., *et al.* 1996).

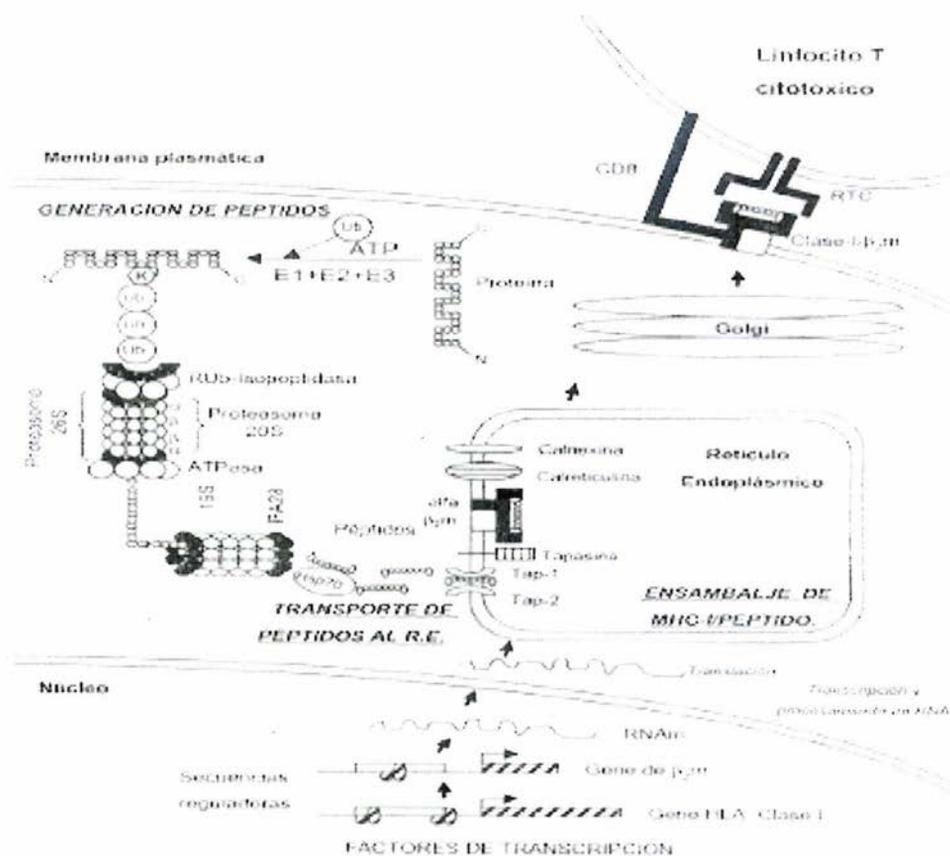


Fig. 3.5. **Procesamiento y presentación de antígenos.** El complejo MHC-péptido se transporta a través del citoplasma a lo largo de la vía ordinaria de transporte vesicular y pasa secuencialmente a través del aparato de Golgi, y la red trans-Golgi, antes de emerger sobre la superficie celular. Las proteínas de Clase I que fallan en fijar péptidos son inestables y se degradan dentro de la célula (Monroy-García A., *et al.* 1999).

### C) Transporte de los péptidos desde el citosol al retículo endoplásmico

El transporte de los péptidos citoplasmáticos al RE y al cis-Golgi ocurre principalmente por un heterodímero constituido por proteínas denominadas “Transportadores Asociados al Procesamiento de Antígenos” (TAP’s) (Kleijmeer M., *et al.* 1992; Nefjes J.J., *et al.* 1993; Androlewicz M.J., *et al.* 1993; y Shepherd J.C., *et al.* 1993). La distribución subcelular de estos transportadores, realizada por microscopía inmunoelectrónica y análisis confocal en RE y cis-Golgi, es consistente con la localización de moléculas MHC-I en este sitio (Kleijmeer M., *et al.* 1992).

La proteína TAP se localiza principalmente en el RE, donde interviene en el transporte activo dependiente de ATP de los péptidos desde el citosol hacia la luz del RE (Fig. 3.6).

Existen dos proteínas homólogas de las cuales está formado el transportador heterodimérico y son llamadas TAP 1 y TAP 2, las cuales transportan péptidos al interior del RE como parte de la vía endógena y están codificadas en la región de Clase II (ver Fig. 3.2).

En el lado luminal de la membrana del RE, la proteína TAP se une de manera no covalente a las moléculas del HLA Clase I recién sintetizadas mediante una proteína de unión denominada tapasina (Lehner J.P., *et al.* 1996).

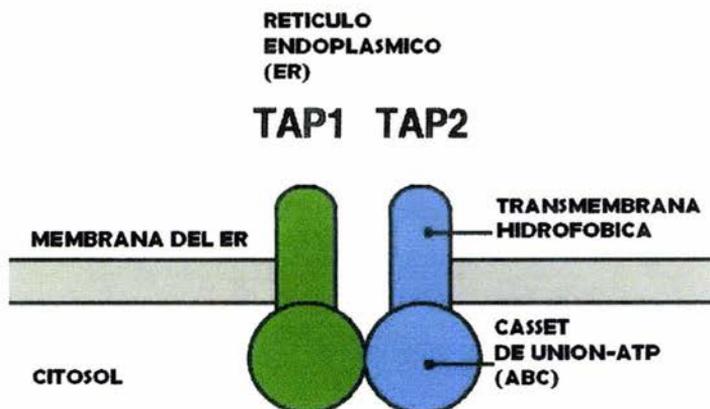


Fig.3.6. Estructura de las proteínas transportadoras asociadas al procesamiento antigénico (TAP). Estas proteínas se localizan principalmente en el Retículo Endoplásmico (RE), transportan péptidos de 6 a 30 aminoácidos de longitud y contienen extremos carboxílicos y transmembrana hidrofóbica; intervienen en el transporte activo dependiente de ATP de los péptidos desde el citosol hacia la luz del retículo endoplásmico. Estas proteínas presentan dos estructuras conocidas como TAP 1 y TAP 2 y sus genes están cerca de los que codifican para LMP-2 y LMP-7 en el MHC (Janeway C., et al. 2005).

#### *D) Ensamblaje de los complejos MHC-I/péptido en el RE*

Los péptidos translocados hacia el interior del RE se fijan a las moléculas del MHC-I que se encuentran unidas al heterodímero de TAP 1 y 2. Las cadenas alfa de Clase I y la  $\beta_2$ -microglobulina recién sintetizadas, entran al RE, en donde también se lleva a cabo el plegamiento adecuado de las cadenas alfa nascentes por la presencia de proteínas nodrizas, tales como calnexina y calreticulina. Una vez que en el interior del RE los dímeros de Clase I están vacíos, permanecen unidos al complejo TAP mediante la tapasina (Fig.3.5) (Williams D.B., et al. 1996).

Cuando el péptido entra en el RE a través del TAP, el péptido se fija a los sitios de la molécula de Clase I.

### *E) Expresión en superficie de los complejos péptido-Clase I*

Cuando la molécula de Clase I se encuentra ensamblada junto con su péptido, ésta es transportada desde el RE hacia el aparato de Golgi, donde es englobada en una vesícula secretora y posteriormente transportada a la membrana citoplasmática para fusionarse con ella y dejar expuestas y ancladas a las moléculas Clase I del MHC que expondrán su péptido para ser reconocido por los linfocitos T citotóxicos (Fig. 3.5) (Benham A., *et al.* 1995).

### *Cáncer Cérvico-uterino*

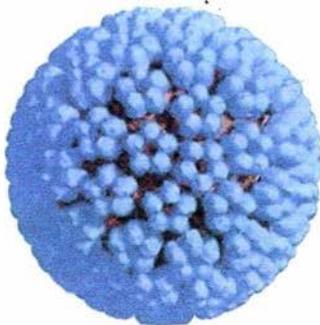
El Cáncer Cérvico-uterino (CaCu) es una neoplasia muy frecuente en la población femenina; constituye 30% de los tumores malignos que se presentan en los habitantes de los países en desarrollo y es la segunda causa de muerte en mujeres en el mundo (Shiffman H.M., *et al.* 1995; Broker T.R., *et al.* 1986; Silva B., *et al.* 1999; Fernández G., *et al.* 2004).

Según la Organización Mundial de la Salud, se registran más de 500 000 nuevos casos al año. En México es un grave problema de salud pública, pues en la última década ha sido el cáncer más frecuente en la población femenina (Escandón-Romero C., *et al.* 1992).

El factor de riesgo más importante para CaCu es la infección con Virus del Papiloma

Humano VPH, de alto riesgo; sin embargo, para la progresión de la neoplasia intraepitelial cervical (CIN) a cáncer invasivo (Riou G., *et al.* 1987) se necesita la participación de factores, como la respuesta inmune del huésped (Riou G., *et al.* 1987; Muñoz N., *et al.* 1994; Cullen A., *et al.* 1991; Schiffman M.H., *et al.* 1995; Pinion S.B., *et al.* 1991; Mitra A.B., *et al.* 1994).

Se conocen más de 80 tipos de VPH. La estructura del VPH consta de proteínas E7 y una proteína mayor de la cápside denominada L1, presenta un diámetro aproximado de 55 nanómetros (Fig 3.7) que de acuerdo con la similitud de las secuencias nucleotídicas del DNA viral, son estructuras específicas que infectan células epiteliales de mamíferos. Se ha encontrado que los tipos de VPH malignos 6, 11, 16, 18, 33 y 35 se presentan en tumores genitales, llamados de alto riesgo y específicamente el 16 es tres veces más frecuente en cáncer epitelial escamoso (De Villiers E. 1989; Van Ranst M., *et al.* 1992).



**PROTEÍNA MAYOR  
DE LA CAPSIDE (L1)**

**ADN VIRAL**

**Fig.3. 7 MODELO TRIDI-  
MENSIONAL DEL VPH**

Su diámetro es alrededor de 55 nanómetros, ADN bicatenario, cápside de 72 capsómeros, simetría icosaédrica y no tienen envoltura.

[www.pubmed.com](http://www.pubmed.com)

Se han descrito diferentes etapas del Cáncer Cérvico-uterino, entre ellas está la clasificación de Sur Hausen la cual nos dice lo siguiente:

## **Etapa 0 (Carcinoma in Situ)**

En la etapa 0, el cáncer se encuentra en la primera capa de células que recubren el cuello del útero solamente y no ha invadido los tejidos más profundos del cuello uterino. La etapa 0 se denomina también carcinoma in situ.

## **Etapa I**

En la etapa I, el cáncer se encuentra en el cuello uterino solamente. La etapa I se divide en etapas IA y IB, según la extensión del tumor.

- Etapa IA: Se detecta una cantidad muy pequeña de cáncer que no puede verse sin un colposcopio en los tejidos del cuello uterino. El cáncer no tiene más de 5 milímetros de profundidad (menos de 1/4 pulgada) y su ancho no supera los 7 milímetros (aproximadamente 1/4 pulgada).
- Etapa IB: En la etapa IB, el cáncer aún se encuentra dentro del cuello uterino y ya sea:
  - puede verse solamente con un colposcopio y tiene más de 5 milímetros de profundidad (menos de 1/4 pulgada) o su ancho supera los 7 milímetros (aproximadamente 1/4 pulgada), o
  - puede verse sin un colposcopio y puede ser más grande que 4 centímetros (aproximadamente 1 1/2 pulgadas).

## **Etapa II**

En la etapa II, el cáncer se ha diseminado más allá del cuello uterino pero no ha alcanzado la pared pélvica (tejidos que recubren la parte del cuerpo entre la cadera). La etapa II se divide en etapas IIA y IIB, según el grado de diseminación del cáncer.

- Etapa IIA: El cáncer se ha diseminado más allá del cuello uterino a dos tercios superiores de la vagina pero no a los tejidos en torno al útero.
- Etapa IIB: El cáncer se ha diseminado más allá del cuello uterino a dos tercios superiores de la vagina y a los tejidos en torno al útero.

## **Etapa III**

En la etapa III, el cáncer se ha diseminado al tercio inferior de la vagina y tal vez haya alcanzado la pared pélvica y los ganglios linfáticos circundantes. La etapa III se divide en etapas IIIA y IIIB, según el grado de diseminación del cáncer.

- Etapa IIIA: El cáncer se ha diseminado al tercio inferior de la vagina pero no a la pared pélvica.
- Etapa IIIB: El cáncer se ha diseminado a la pared pélvica o el tumor es lo suficientemente grande para bloquear los uréteres (tubos que conectan los riñones a la vejiga). Este bloqueo puede hacer que los riñones aumenten de tamaño o dejen de funcionar. Las células cancerosas pueden también haber alcanzado los ganglios linfáticos en la pelvis.

## Etapa IV

En la etapa IV, el cáncer se ha diseminado a la vejiga, el recto u otras partes del cuerpo. La etapa IV se divide en etapas IVA y IVB, según el lugar donde se encuentre el cáncer.

- Etapa IVA: El cáncer se ha diseminado a la vejiga o la pared del recto y puede haberse diseminado a los ganglios linfáticos en la pelvis.
- Etapa IVB: El cáncer se ha diseminado más allá de la pelvis y los ganglios linfáticos a otros lugares en el cuerpo, como el abdomen, el hígado, el tubo intestinal o los pulmones. ([www.NCI/PDQ/pacientes](http://www.NCI/PDQ/pacientes))

Los VPH aparentemente han evolucionado para evadir la respuesta inmune, y la infección generalmente dura varios años (Peralta-Zaragoza O., et al. 2004).

El ciclo de replicación de los VPH se lleva a cabo dentro de los queratinocitos; los viriones maduros escapan de la superficie epitelial infectada en los queratinocitos que se descaman (De Villiers E. 1989). De esta manera, durante la infección hay poca presentación de antígenos virales al sistema inmune.

La respuesta inmune contra los virus está dada tanto por la respuesta inmune humoral como por la celular. Diversos estudios se han realizado para conocer los anticuerpos circulantes contra los VPH, pero son pocos los que se han llevado a cabo para conocer la respuesta inmune celular (Peeling R.W. and Sparling F. 1999).

Las células asesinas naturales (NK) y los linfocitos T citotóxicos CD8+ (CTL), participan en la respuesta contra los Virus del Papiloma Humano, cuya actividad es

regulada principalmente por los linfocitos T CD4+, los que se dividen en dos subpoblaciones de linfocitos T cooperadores Th1 y Th2, (por sus siglas en inglés T helpers), y son antagonistas entre sí en cuanto a la función de las citocinas que secretan.

Los Th1 secretan interleucina (IL-2) e interferón gama (IFN-  $\gamma$ ), los que participan como los principales mediadores de la inmunidad celular contra microorganismos intracelulares y dirigen la defensa del huésped mediada por fagocitos. Las células Th2 secretan IL-4, IL-5 e IL-10, citocinas que suprimen la inmunidad mediada por células (Abbas A. K., *et al.* 2004).

Así, una respuesta inmune celular antitumoral es inducida por citocinas de los linfocitos Th1 e inhibida por los Th2 (inmunosupresión). Las células NK y macrófagos están presentes en la mayoría de las lesiones; sin embargo, células de cáncer cervical y líneas celulares VPH+ son resistentes a las células NK.

Se ha encontrado una gran proporción de linfocitos T CD3+, CD4+, CD8, junto con la expresión del factor de necrosis tumoral (TNF-  $\alpha$ ), IL-6 e IL-10 en 60% de las CIN (Tzyy-Choou W., *et al.* 1994; Golumbek P.T., *et al.* 1991; Dranoff G., *et al.* 1993; Topalian S.L., *et al.* 1994). Lo que sugiere que el factor más importante en la regresión espontánea o en el progreso a carcinoma cervical invasor es la respuesta inmune celular, como se había mencionado anteriormente. En esta respuesta el Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC, en vertebrados específicamente, o HLA, en humanos) tiene la capacidad de presentar gran variedad de antígenos tumorales y virales, que son reconocidos por los linfocitos T, los cuales actúan de una manera muy precisa para eliminar el tumor.

Aunque la evidencia de la asociación entre HLA y Cáncer Cérvico-uterino ha sido controversial, hay estudios donde algunos haplotipos, Clase I o II, están asociados positivamente con cáncer cervical invasor, mientras otros haplotipos actúan de manera negativa respecto al desarrollo del tumor, es decir, son protectores. Se han reportado ciertas alteraciones en la expresión de HLA en algunos tumores donde ésta se halla disminuida (Aaltonen M., *et al.* 1999; Hernández H., *et al.* 2004).

### *Expresión de HLA Clase II en el Cáncer Cérvico-uterino*

Las moléculas HLA-II no son expresadas normalmente en epitelio cervical, pero su expresión puede llevarse a cabo bajo diversas circunstancias patológicas, como lo es la inflamación, la transformación tumoral y la autoinmunidad (Gostout B.S., *et al.* 2003).

Se ha observado que en epitelio escamoso ectocervical no neoplásico, la expresión del HLA-DR fue negativa consistentemente, aun en secciones mostrando significativa infiltración linfocitaria; sin embargo, se observó expresión de HLA-DR en epitelio glandular endocervical, epitelio escamoso metaplásico inmaduro y carcinoma invasivo (De Leo C., *et al.* 1997; Gostout B.S., *et al.* 2003).

Existe una marcada ausencia en la expresión de HLA-DR en células cervicales normales y escasa expresión en neoplasia intraepitelial escamosa de bajo grado. Pero en la neoplasia intraepitelial escamosa de alto grado hay expresión de DR en los queratinocitos, lo que podría deberse a la producción de citocinas proinflamatorias liberadas por las células inmunocompetentes (Gostout B.S., *et al.* 2003).

En el análisis de la asociación de haplotipos Clase II DR-DQ con carcinoma cervical-VPH-16+ en mujeres hispánicas, se encontró que el DRB1\*1501-DQB1\*0602\*0301\*0303 y el DRB1\*0407-DR\*0302 se asocian fuertemente al desarrollo del carcinoma cervical, mientras que en el haplotipo DR13 la asociación es negativa (Hernández H., *et al.* 2004).

Puesto que los haplotipos DQA\*0501-DQB\*0301 son más comunes en poblaciones hispánicas que en caucásicas, se concluyó que quizás la presencia de ciertos haplotipos HLA-II induce una respuesta inmune para epítomos específicos de VPH y afectan el riesgo de generar una displasia cervical grave y posteriormente un carcinoma cervical invasivo (Gostout B.S., *et al.* 2003).

En mujeres afro-americanas se encontró una asociación estadísticamente significativa entre un riesgo relativo de cáncer cervical y los haplotipos DQB1\*0303 y DB1\*0604, mientras que el haplotipo DQB1\*0201 y el heterocigoto DQB1\*0301/\*0501 mostraron disminución en el riesgo de cáncer cervical.

Estos estudios confirman lo encontrado en mujeres caucásicas, donde los alelos HLA-DQ3 también se asocian al riesgo de CaCu (Aaltonen M., *et al.* 1999).

Resultados similares se reportan en un estudio de pacientes con cáncer cervical de células escamosas (SCCC), que presentan una frecuencia de los alelos DQA1\*030X y DQB1\*0301.

También existe una asociación significativa entre el haplotipo Clase II DQW3 y SCCC VPH+, que sugiere que estas pacientes presenten una incapacidad para eliminar la infección por VPH que las predispone a desarrollar el SCCC (Gostout B.S., *et al.* 2003). Asimismo, existe una ligera asociación de cáncer de células

escamosas y HLA-DQB12; hay aumento no significativo en la expresión de los subtipos de HLA B12 (HLA-B44/45) y se supone que este aumento probablemente es secundario a HLA-DQW3 (Gostout B.S., *et al.* 2003).

#### *Expresión de HLA Clase I en el Cáncer Cérvico-uterino*

El carcinoma de cérvix es derivado de epitelios HLA-I+. Hay varios mecanismos que pueden alterar la expresión del MHC-I, como son: inhibición en el transporte o glicosilación de HLA-I; mutación en los genes TAP; mutación o arreglos en el gen  $\beta$ -2-microglobulina; cambios en la metilación y la estructura de los genes Clase I; alteraciones en la unión de los factores transcripcionales a elementos potenciadores o enhancers y regulación negativa de la expresión de HLA-I por oncogenes Cis-Trans o por el VPH (Aaltonen M., *et al.* 1999).

Se ha detectado que lesiones premalignas y malignas presentan una expresión negativa específica del locus HLA-A,B,C, Clase I (Hernández H., *et al.* 2004).

Se ha encontrado una expresión reducida de HLA-I en 70% de los tumores estudiados, con un 50% de disminución en la expresión del alelo HLA-A2, 66% en A3, 56% en BW4 y 37% en BW6 (Silva B., *et al.* 1999; Fernández G., *et al.* 2004).

También se ha analizado la expresión de HLA-I en linfocitos infiltrantes de cáncer cervical, donde hay una disminución de la expresión de HLA-I en 60% de las metástasis cervicales; sin embargo, sólo hay una disminución en 21% de los tumores primarios, lo que sugiere que la pérdida de la expresión de HLA-I pueda representar un mecanismo de escape de la respuesta mediada por linfocitos T CD8 citotóxicos y producir un aumento en el potencial metastásico de las células tumorales (Hernández H., *et al.* 2004).

En algunos casos hay una pérdida en la expresión del haplotipo HLA-B7 en metástasis diseminadas de neoplasias cervicales, en donde se observa una variante de la proteína E6 de VPH-16, la cual tiene una alteración en uno de los epítomos que se unen a HLA-B7, mostrando un mecanismo de escape importante hacia la vigilancia inmunológica del VPH-16 en individuos HLA-B7 (Hernández H., *et al.* 2004).

Otro de los mecanismos que podrían explicar la baja expresión de HLA-I en Cáncer Cérvico-uterino, es la mutación en Proteína Transportadora de Antígenos (TAP); algunos estudios encuentran que la expresión de HLA-A y HLA-B por células tumorales es regulada negativamente en uno o más alelos, por lo menos en 73% de los carcinomas cervicales, y aproximadamente 50% de estos tumores presentó la pérdida de la expresión de TAP 1 y 2, sugiriendo que la inhibición de TAP 1 y 2 por regulación negativa es una estrategia potencial de las células malignas para evadir la vigilancia inmune (Gostout B. S., *et al.* 2003).

También se ha observado la baja expresión de  $\beta_2$ -microglobulina; dos tercios de 42 muestras de epitelio cervical premaligno presentaron sobreexpresión de esta molécula, comparada con el epitelio normal; sin embargo, en 32 de 36 tumores invasivos disminuyó notablemente la sobreexpresión de  $\beta_2$ -microglobulina, lo que concuerda con la falta de expresión de HLA-I en tumores que ya han penetrado las membranas basales (Groettrup M., *et al.* 1995).

#### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El Cáncer Cérvico-uterino (CaCu) se asocia etiológicamente con la infección por virus de papiloma humano (VPH) ya que más de un 99% de tumores cervicales resultan positivos a este virus. Además, se ha detectado que un alto porcentaje de las lesiones más avanzadas muestran una disminución parcial o total de la expresión de moléculas de histocompatibilidad Clase I (MHC-I), las cuales son importantes para la presentación de antígenos virales a los linfocitos T citotóxicos (Hernández J., *et al.* 2000).

Aunque la evidencia de la asociación entre HLA y CaCu ha sido controversial, hay estudios donde algunos haplotipos, HLA Clase I o II, están asociados positivamente con cáncer cervical invasor, mientras otros haplotipos actúan de manera negativa respecto al desarrollo del tumor, es decir, son protectores (Hernández H., *et al.* 2004).

Se han reportado ciertas alteraciones en la expresión de HLA en algunos tumores donde ésta se halla disminuida. Los alelos que se han visto alterados son: HLA-A2, HLA-DQ3, DR5 (Silva B., *et al.* 1999; Fernández G., *et al.* 2004).

Varios estudios han sido enfocados a analizar la baja expresión de moléculas HLA-I en células tumorales de CaCu y la expresión de moléculas participantes en el procesamiento antigénico (Hernández H., *et al.* 2004). Por ejemplo, en algunos estudios encuentran que la expresión de HLA-A y HLA-B en células tumorales está regulada negativamente en uno o más alelos. En 73% de los carcinomas cervicales y aproximadamente el 50% de estos tumores presentaron pérdida de la expresión de

TAP's, sugiriendo que la inhibición de TAP's por regulación negativa es una estrategia potencial de las células malignas para evadir la vigilancia inmune (Cromme F.V., *et al.* 1994; Keating P.J., *et al.* 1995).

Asimismo, en la población caucásica se ha encontrado una expresión reducida de HLA-I en 70% de los tumores estudiados, asociados con un 50% de disminución en la expresión del alelo HLA-A2, 66% en A3, 56% en BW4 y 37% en BW6 (Chen L.P., *et al.* 1992).

Sin embargo, no se sabe si la frecuencia en la expresión de algunos alelos de pacientes con CaCu se asocia con varios defectos en la expresión de moléculas del procesamiento antigénico, lo cual puede influir directamente en la presentación de péptidos antigénicos por estos alelos. Por lo anteriormente reportado, este estudio se llevó a cabo con la finalidad de analizar si existe una asociación entre la disminución o diferencias en la expresión de las subunidades catalíticas (LMP-2, LMP-7 y LMP-10), las proteínas reguladoras (PA28 $\alpha$  y PA28 $\beta$ ) del proteosoma o los transportadores de péptidos (TAP 1 y TAP 2) con las frecuencias alélicas HLA Clase I en las pacientes con CaCu.

## 5. OBJETIVOS

### *OBJETIVO GENERAL*

- Analizar el haplotipo HLA-A, -B, -C en pacientes con Cáncer Cérvico-uterino y la expresión de moléculas participantes en el procesamiento de antígenos en células tumorales de estas pacientes.

### *OBJETIVOS PARTICULARES*

- Tipificar el haplotipo HLA Clase I de pacientes con Cáncer Cérvico-uterino y de donadoras sanas.
- Analizar la expresión haplotípica de una población de mujeres con Cáncer Cérvico-uterino y una de donadoras sanas.
- Analizar la expresión de las subunidades catalíticas (LMP-2, LMP-7 y LMP-10) y reguladoras (PA28 $\alpha$  y PA28 $\beta$ ) del proteasoma, así como la de las subunidades transportadoras de péptidos TAP 1 y TAP 2, en células tumorales de Cáncer Cérvico-uterino.

## 6. HIPÓTESIS

La deficiencia en la expresión de las moléculas HLA Clase I en las células tumorales puede ser un factor importante en la progresión de cáncer, debido a que los antígenos de histocompatibilidad tienen la capacidad de presentar gran variedad de antígenos tumorales y virales, que son reconocidos y eliminados por los linfocitos T (Bahena-Román M., *et al.* 2000).

También se sabe que varios factores genotípicos y fenotípicos pueden influir en la disminución de la expresión de moléculas HLA Clase I de las células tumorales, tal como la deficiencia en la expresión de moléculas asociadas al procesamiento de antígenos como son LMP-2, -7,-10, TAP 1 y 2, PA28  $\alpha$  y PA28 $\beta$ .

Por lo que en el presente estudio se espera encontrar una asociación entre la deficiencia de expresión de moléculas participantes en el procesamiento de antígenos (LMP-2, -7,-10, TAP 1, TAP 2, PA28 $\alpha$  y PA28 $\beta$ ) y frecuencias alélicas encontradas en pacientes con CaCu.

## 7. MATERIAL Y METODO

### Material Biológico

En este trabajo se utilizaron muestras biológicas, consistentes en sangre periférica (100 pacientes con CaCu) y biopsias tumorales (30 pacientes con CaCu), obtenidas del Servicio de Ginecología Oncológica del Instituto Nacional de Cancerología, S.S. También se utilizaron muestras sanguíneas de 100 donadoras sanas sin evidencia de lesiones cervicales, ni reporte positivo de Papanicolaou. Las muestras sanguíneas de las donadoras sanas se obtuvieron en el Departamento de Transplantes del Hospital de Ciencias Médicas y de la Nutrición “Salvador Zubirán”, S.S.

### Cultivos celulares

Se usó la línea celular T2 como control negativo de las moléculas TAP 1, TAP 2, LMP-2 y LMP-7, debido a la presencia de una delección de los genes que codifican para estas moléculas en la región del MHC de estas células. También se utilizaron cultivos primarios de epitelio normal de cérvix y cultivos de Linfocitos de Sangre Periférica (LSP) como control positivo para la presencia de las moléculas del procesamiento antigénico: TAP's, LMP's y PA28 (Tabla 7.1).

Los cultivos celulares fueron mantenidos en medio de cultivo RPMI (Microlab, Mex) complementado con Suero Fetal de Bovino (SFB) (vol/vol) al 10% (Gibco o Hyclone, USA), dentro de un incubador biológico (Forma Científica, USA) a 37°C, con 5% de CO<sub>2</sub> en un ambiente de humedad saturante.

Tabla 7.1 Características de las células utilizadas.

TIPO CELULAR	CARACTERÍSTICAS
T2	Línea linfocítica con expresión deficiente de TAP 1, TAP 2, LMP-2 y LMP-7.
Linfocitos de sangre periférica (LSP)	Obtenidas de Donadoras Sanas
Fibroblastos	Cérvix sin diagnóstico oncológico
Muestras tumorales de pacientes con CaCu	Obtenidos en el Instituto Nacional de Cancerología, S.S.

Tipificación de HLA Clase I por microcitotoxicidad

Se tomó 1 mL de la muestra de sangre con anticoagulante (ACD), se colocó en un tubo de plástico de 5 mL (13 x 100mm) con tapa de plástico, y se agregaron 50 µL de una suspensión de anticuerpos monoclonales  $\alpha$ CD3 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 desarrolladora (contenida en el kit) (One Lambda Inc, USA) al 10% en solución amortiguadora de fosfatos (SAF) y se homogeneizó la mezcla. Enseguida el tubo se colocó en un magneto midi-MACS (Milteny Bistec, 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  $\mu$ L de RPMI-1640, y se distribuyeron 2  $\mu$ L 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; después se dejó incubar por una hora a temperatura ambiente en la oscuridad. Después de este tiempo se agregaron 5  $\mu$ L de revelador Fluoro Quench (bromuro de etidio, naranja de acridina y azida de sodio, One Lambda USA) a cada pozo, se agitó suavemente y se dejó incubar por 5 min en la oscuridad. Finalmente la placa se observó en el microscopio de fluorescencia (Leica U.S.A) para evaluar la citotoxicidad y determinar la reacción positiva de los antisueros, para obtener el haplotipo HLA Clase I de cada paciente.

#### Manejo de biopsias de CaCu

Una vez que se obtuvieron las biopsias tumorales, colocadas en tubos de 50 mL con RPMI-1640 suplementado con SFB 20% y antibióticos penicilina a 200 U/mL y estreptomycin a 200  $\mu$ g/mL en tubos (Falcon USA) de 50 mL. Las biopsias fueron transportadas al laboratorio en una hielera y las muestras sanguíneas a temperatura ambiente. Los tejidos cervicales fueron fragmentados y lavados con SAF en una caja petri de 6 cm de diámetro; una vez realizado este procedimiento varias veces se colocó la muestra fragmentada en un tubo Eppendorf (1.5 mL) con 1 mL de trizol (Life Technologies).

## Transcripción reversa con reacción en cadena de la polimerasa. (RT-PCR)

### *Obtención de RNA total*

Para obtener el RNA total se empleó el reactivo Trizol (Gibco, USA) de acuerdo con las instrucciones remitidas por el proveedor. Brevemente, el cultivo celular confluyente en buenas condiciones de una caja de 6 cm de diámetro fue lavado con SAF y entonces las células fueron lisadas al agregar directamente 1 mL de Trizol (Gibco, U.S.A), el lisado celular fue posteriormente transferido a un tubo para microcentrífuga de 1.5 mL de capacidad. En caso de células no adherentes, éstas fueron recuperadas mediante centrifugación, lavadas con SAF y lisadas directamente en el tubo Eppendorf de 1.5 mL.

A partir de este momento, se sometieron al proceso indicado consistente en la lisis con isotiocinato de guanidina y la extracción mediante la formación de una fase orgánica (fenol-cloroformo) y una fase acuosa donde se encontró solubilizado el RNA. El RNA se precipitó con isopropanol para recuperarlo y se resuspendió en 40  $\mu$ L de agua libre de RNAsas y DNAsas (Gibco, USA). Finalmente, se cuantificó mediante una lectura de la absorbancia de la solución en un espectrofotómetro (Eppendorf, USA) a 260 nm de longitud de onda.

### *Transcripción reversa*

La reacción de transcripción reversa se efectuó en tubos para PCR en un volumen de 100 $\mu$ L. En cada tubo se agregaron los siguientes reactivos: RNA (10  $\mu$ g), MgCl<sub>2</sub>(30 mM), Buffer RT 10x, dNTP's (100 mM), inhibidores de RNAsas (50mM), Oligo-dt

(10mM), dithiothreitol (DTT) (125mM), enzima transcriptasa reversa M-MLV (50mM), H<sub>2</sub>O libre de RNAsas y DNAsas (Gibco, USA).

La reacción se efectuó a 42°C durante 1 hora para finalizar a 95°C durante 5 minutos en un termociclador de marca Eppendorf (USA).

#### *Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*

Esta reacción se efectuó en un volumen final de 25 µL. Para tal efecto se mezclaron los siguientes reactivos, cuya concentración final resulta la siguiente: cDNA 5 µL; amortiguador para la reacción de PCR 1x (Biotecnologías Universitarias, Mex), MgCl<sub>2</sub> 1.25 µL (Biotecnologías Universitarias, Mex); dNTP's 0.8 µL (Gibco, USA); enzima polimerasa de DNA (Biotecnologías Universitarias, Mex) 1U, oligonucleótidos específicos para β-actina 1.0 µL (Gibco,USA), H<sub>2</sub>O cbp 25 µL, de los oligos se agregaron 2.0 µL de cada uno y los ciclos fueron de acuerdo a sus secuencias (Tabla 7.2).

Tabla 7.2 Secuencia de oligonucleótidos utilizados en el trabajo.

<b>OLIGO</b>	<b>SECUENCIA</b>	<b>PRODUCTO AMPLIFICADO (pb)</b>	<b>REFERENCIA</b>
$\beta$ -ACTINA	Sentido: GGG TCA GAA GGA TTC CTA TG Antisentido: GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG	230pb	Fueron diseñados
TAP 1	Sentido: CAG AAT CTG TAC CAG CCC Antisentido: CTG GCT GTT TGC ATC CAG G	345pb	Singal D., <i>et al.</i> 1998
TAP 2	Sentido: TAC CTG CTC ATA AG AGG GTG C Antisentido: ATT GGG ATA TGC AAA GGA GAC	312pb	Seliger, <i>et al.</i> 1997
LMP-2	Sentido: GGG ATA GAA CTG GAG GAA CC Antisentido: AGA TGA CAC CCC CGC TTG AG	321pb	Johnsen A., <i>et al.</i> 1998
LMP-7	Sentido: GAA CAC TTA TGC CTA CGG GGT C Antisentido: TTT CTA CTT TCA CCC AAC CAT C	174pb	Johnsen A., <i>et al.</i> 1998
LMP-10	Sentido: ATT CTG GGC GCC GAT ACG CG Antisentido: GCC AGG GCC GCG TCC TGA CC	174pb	Groettrup M., <i>et al.</i> 1995
PA28 $\alpha$	Sentido: GAG CCA GCT CTC AAT GAA GCC Antisentido: CAC CAG CTG CCG ATA ATC ACC	467pb	Johnsen A., <i>et al.</i> 1998
PA28 $\beta$	Sentido: CAC CCA AGG ATG AGA TGG Antisentido: GCT CAG CAT AGA AGG CCC TCA G	431pb	Johnsen A., <i>et al.</i> 1998

*pb* pares de bases

### Corrimiento de los productos de PCR en gel de agarosa y revelado del gel de agarosa

Los productos de las reacciones se sometieron a electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 3% en amortiguador TBE 0.5X, a un voltaje de entre 70 a 73 volts, y posteriormente se analizaron en un transluminador (Fotodyne, U.S.A) para verificar que se haya llevado a cabo una adecuada amplificación.

### Análisis estadísticos

Para realizar los análisis estadísticos de las frecuencias alélicas de cada locus, se utilizó la  $\chi^2$  cuadrada exacta de Fisher, con intervalos de confianza del 95%. Se determinó la frecuencia alélica (número de veces que se repite cierto alelo en la población estudiada) y la Frecuencia Génica (FG), la cual fue determinada con la siguiente ecuación:

$$FG = n / (\text{No. de alelos diferentes en la muestra} - \text{No. de alelos homocigóticos})$$

Donde n es el número de alelos presentes en las pacientes y donadoras.

## 8. RESULTADOS

### CARACTERISTICAS DE LAS PACIENTES Y DONADORAS

Las edades de las pacientes utilizadas en este estudio, oscilaron entre los 17 a 72 años con un promedio de edad de 46 años, muy cercano a la edad promedio (49 años) reportada para la población caucásica con cáncer cervical (ver Tabla 12.1 Anexos) (Guzmán-Rojas L., *et al.* 1998).

Los estadios clínicos más frecuentes en las pacientes fueron IB1 con 17 casos, IIB con 33 casos y IIIB con 22 casos (ver Tabla 12.1 Anexos).

Aunque sólo se registró el tipo tumoral de 49 casos, más del 80% fueron carcinomas epidermoides, seguido por adenocarcinomas en un 14% y el restante 6% a células gigantes no queratinizantes y cervicitis crónica (ver Tabla 12.1 Anexos).

En el caso de las donadoras sanas, las edades oscilaron entre los 8 a 77 años con una edad promedio de 35.5 años (ver Tabla 12.2 Anexos).

### FRECUENCIAS ALELICAS HLA CLASE I DE PACIENTES Y DONADORAS.

En los grupos de mujeres analizadas, se observó que los alelos de mayor frecuencia fueron HLA-A2, -B35 y -Cw4. Las Frecuencias Génicas (FG) de estos alelos en las pacientes con CaCu y donadoras normales fueron muy similares: para el alelo

HLA-A2, las FG fueron 0.366 y 0.367; para el alelo HLA-B35 fueron 0.258 y 0.289; finalmente para el alelo Cw4 fueron 0.347 y 0.397 respectivamente (Tabla 8.1). Los valores de las FG encontradas para los alelos HLA-A2, -B35 y -Cw4, coincidieron con las frecuencias génicas de los alelos más comunes reportados para la población mexicana en trabajos hechos recientemente (Silva B., *et al.* 1999, Hernández H., *et al.* 2004).

El alelo HLA-Cw10, el cual tuvo una frecuencia de 7% en el grupo de mujeres con CaCu, contra 0% en el grupo de donadoras sanas, presentó una Razón de Momios (RM) de 8.29(1.04-178.3) veces más en la población de pacientes con CaCu, con un 95% de confianza de acuerdo con la prueba Chi cuadrada exacta de Fisher (Tabla 8.1).

Por otro lado, al hacer asociaciones de los alelos HLA-Cw4 y -Cw7 con alelos de los loci HLA-A y HLA-B de mayor frecuencia encontrados en las poblaciones analizadas, se observó que las asociaciones de los HLA-B39, -B35, -A3, -A24 y -A1 con el alelo -Cw7 fueron por lo menos dos veces más frecuentes en las donadoras sanas que en las pacientes con CaCu (Tabla 8.2). El mismo comportamiento se observó al analizar las asociaciones de los alelos HLA-B39 y -A1 con el alelo -Cw4 (Tabla 8.2). Sugiriendo que estas asociaciones pudieran ser benéficas a nuestra población para protegerla contra el cáncer cervical.

Tabla 8.1 Tabla de frecuencias de alelos HLA-ABC en donadoras sanas y pacientes con CaCu.

HLA-ABC	Pacientes (100)*		Controles (100)*		PC	RM (IC 95%)
	n	FG	N	FG		
A2	67	0.366	69	0.367	NS	
A28	31	0.169	19	0.101	NS	
A24	29	0.158	30	0.159	NS	
A31	17	0.092	25	0.132	NS	
A1	10	0.054	23	0.122	NS	
A31	10	0.054	17	0.090	NS	
B35	48	0.258	53	0.289	NS	
B39	26	0.139	37	0.202	NS	
B51	13	0.069	22	0.120	NS	
B44	11	0.059	13	0.071	NS	
B62	7	0.037	13	0.071	NS	
B49	3	0.016	15	0.081	NS	
Cw4	50	0.347	64	0.397	NS	
Cw7	37	0.256	53	0.329	NS	
Cw3	33	0.229	42	0.260	NS	
Cw1	14	0.097	21	0.130	NS	
Cw6	8	0.055	4	0.024	NS	
Cw10	7	0.048			0.03	8.29(1.04-178.3)
Cw8	5	0.034	1	0.006	NS	
Cw2	3	0.020	6	0.037	NS	

NS no significativo

RM Razón de Momios

PC Porcentaje Calculado

FG Frecuencias Génicas

\* Se utilizaron muestras sanguíneas de 100 pacientes con CaCu y 100 de donadoras sanas, las cuales poseen 2 alelos por cada locus HLA-A, B o C por lo que las FG se calcularon con base a los 200 alelos de pacientes con CaCu y 200 de donadoras sanas para cada locus.

Tabla 8.2 Tabla de asociaciones alélicas HLA-ABC en donadoras sanas y pacientes con CaCu. Las frecuencias alélicas más significativas se resaltan en esta tabla.

ASOCIACIONES ALELICAS	PACIENTES N=100*		DONADORAS N=100*	
	(+)	(-)	(+)	(-)
B35-Cw4	33	167	40	160
A2-Cw4	24	176	30	170
A2-Cw7	19	181	29	171
A24-Cw4	12	188	16	184
A28-Cw4	9	191	13	187
<b>B39-Cw7</b>	8	192	22	178
<b>B35-Cw7</b>	8	192	18	182
A28-Cw7	7	193	11	189
A3-Cw4	6	194	5	195
<b>B39-Cw4</b>	5	195	15	185
<b>A3-Cw7</b>	4	196	1	199
<b>A24-Cw7</b>	3	197	13	187
<b>A1-Cw7</b>	3	197	12	188
<b>A1-Cw4</b>	2	198	7	193

\* Se utilizaron muestras sanguíneas de 100 pacientes con CaCu y 100 de donadoras sanas, las cuales poseen 2 alelos por cada locus HLA-A, B o C por lo que en total se utilizaron 200 alelos de pacientes con CaCu y 200 de donadoras sanas .

## EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS PARTICIPANTES EN EL PROCESAMIENTO ANTIGÉNICO (TAP's, LMP's y PA28 $\alpha$ y $\beta$ ).

Se sabe que las moléculas LMP-2, LMP-7 y LMP-10 son las principales subunidades catalíticas del proteasoma para generar péptidos antigénicos a partir de proteínas virales o propias del tumor, los péptidos al ser translocados hacia el interior del retículo endoplásmico por las moléculas transportadoras TAP 1 y TAP 2, se asocian con las moléculas MHC Clase I. Además, la carencia o deficiencia en la expresión de estas moléculas puede repercutir en el procesamiento y presentación de péptidos antigénicos por moléculas HLA Clase I, para ser reconocidos por los linfocitos T citotóxicos. Por lo que, en el presente trabajo se procedió a analizar la expresión de TAP 1, TAP 2, LMP-2, -7 y -10, así como de los reguladores del proteasoma PA28 $\alpha$  y  $\beta$ , en muestras de tejido tumoral de pacientes con CaCu.

En este trabajo se analizó la expresión de moléculas presentadoras de antígenos en sólo 30 pacientes, debido a la disponibilidad y viabilidad de las biopsias tumorales.

A través de RT-PCR se pudo evidenciar la expresión de las moléculas proteolíticas LMP-2, LMP-7 y LMP-10 (Figura 8.1), así como los transportadores TAP 1 y TAP 2 (Figura 8.2); además de los activadores PA28 $\alpha$  y PA28 $\beta$  del proteasoma (Figura 8.3), a partir del RNA mensajero (RNAm) obtenido de 30 biopsias de pacientes con Cáncer Cérvico-uterino. En las figuras 8.1 a 8.3 se puede observar la expresión y/o carencia de estas moléculas en 5 muestras de pacientes con Cáncer Cérvico-uterino. Cabe mencionar que la carencia de al menos una de estas moléculas fue observada en el 80% de las biopsias analizadas. Asimismo se observó que las moléculas TAP 1, TAP 2 y LMP-10 estuvieron ausentes en 37, 43 y 47% de las 30

muestras (Tabla 8.3), mostrando que los defectos en la vía del procesamiento antigénico están presentes de manera consistente en la generación y transporte de los péptidos hacia el retículo endoplásmico en la mayoría de los tumores de Cáncer Cérvico-uterino estudiados.

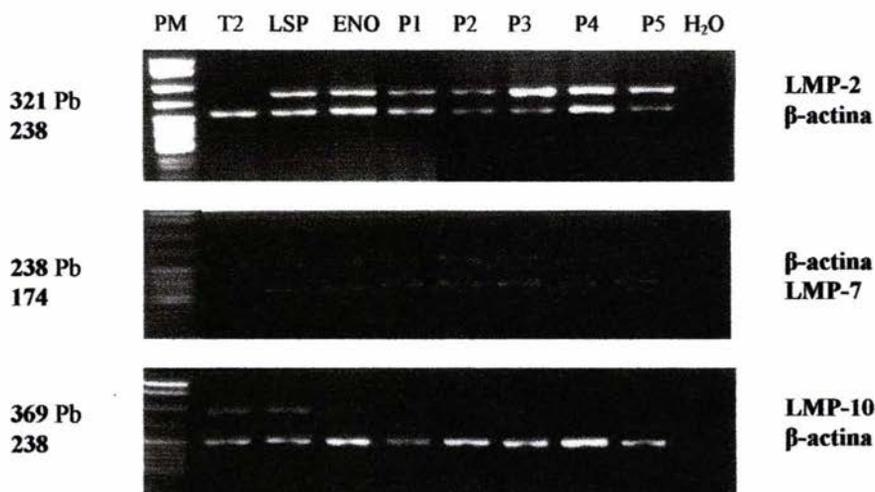


Figura 8.1 . Análisis de RT-PCR de la expresión de RNAm de las subunidades del proteasoma: LMP-2, LMP-7 y LMP-10 de biopsias provenientes de tumores de Cáncer Cérvico-uterino. Pb, pares de bases, PM peso molecular ; LSP, linfocitos de sangre periférica; ENO, epitelio normal; T2, línea celular linfoblastoide negativa para LMP's; P1-P5 pacientes con CaCu.

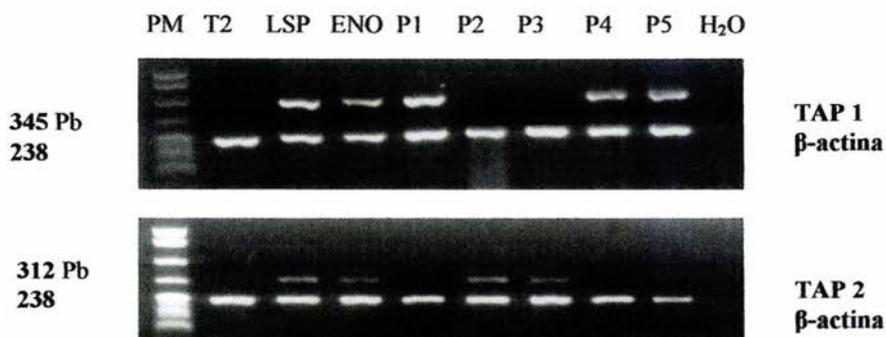


Figura 8.2. Análisis de RT-PCR de la expresión de RNAm de los transportadores asociados con el procesamiento antigénico: TAP 1 y TAP 2, en muestras provenientes de biopsias tumorales de Cáncer cérvico-uterino. Pb, pares de bases, PM peso molecular; LSP, linfocitos de sangre periférica; ENO, epitelio normal; T2, línea celular linfoblastoide negativa para TAP's; P1-P5, pacientes con CaCu.

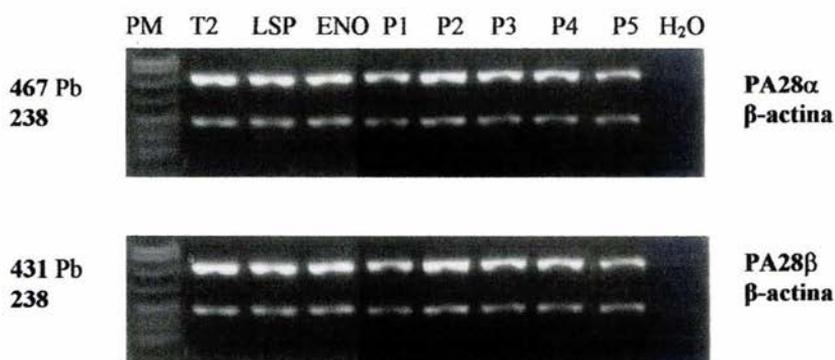


Figura 8.3 Análisis de RT-PCR de la expresión de RNAm de las subunidades reguladoras del proteasoma PA28 $\alpha$  y PA28 $\beta$  en muestras provenientes de biopsias tumorales de Cáncer Cérvico-uterino. Pb, pares de bases, PM peso molecular; LSP, linfocitos de sangre periférica; ENO, epitelio normal; T2, línea celular linfoblastoide negativa para TAP's y LMP's; P1-P5, pacientes con CaCu.

Tabla 8.3 Expresión de moléculas del procesamiento antigénico HLA Clase I en 30 pacientes con Cáncer Cérvico-uterino. Las moléculas TAP 1, TAP 2 y LMP-10 estuvieron ausentes en 37, 43 y 47% respectivamente.

Paciente	(E.C)	TAP 1	TAP 2	LMP 2	LMP 7	LMP 10	PA 28 $\alpha$	PA 28 $\beta$	Haplotipo HLA Clase I					
									A2	B65	Cw8	A28	B39	Cw7
1	IB1	-	-	+	+	-	+	+	A2	B65	Cw8	A28	B39	Cw7
2	IB2	ND	-	+	+	-	+	+	A2	B35	Cw4			
3	IIA	+	+	+	+	+	+	+	A3	B38	A11	B35	Cw4	
4	IIA	ND	-	ND	-	-	+	+	A2	B35	Cw4	A3	B41	Cw7
5	IIA	+	+	+	+	+	+	+	A2	B65	Cw7	A33	B50	Cw8
6	IB2	+	+	+	+	+	+	+	A2	B38	B60	Cw3		
7	IIIB	+	+	+	+	+	+	+			NT			
8	IB2	+	+	+	+	-	+	+	A1	B8	Cw7	A24	B44	
9	IIA	-	ND	+	+	ND	+	+	A2	B39	CW7	B41		
10	IIB	-	ND	+	+	-	+	+	A2	B35	Cw10	A31	B38	
11	IIIB	-	ND	+	+	-	+	+	A2	B39	Cw7	B51	Cw3	
12	IIB	+	+	+	+	+	+	+	A2	B7	Cw7	A23	B51	Cw3
13	IB2	+	+	+	+	-	+	+	A2	B35	Cw4	A23	B50	Cw6
14	IIB	-	-	+	+	-	+	ND	A2	B35	A28	B60		
15	IIIB	-	-	+	+	-	+	+	A2	B35	A24	B45		
16	IIB	-	ND	+	+	-	+	+	A23	B35	Cw4	A32	B50	
17	IIB	-	ND	+	+	-	+	+	A1	B35	A29	B44		
18	IB2	-	-	+	+	-	+	+	A28	B65	Cw3	A33	B61	
19	IIIB	+	+	+	+	+	+	+	A28	B35	Cw4	A24		
20	IIB	-	ND	ND	+	-	+	+	A30	B18	Cw7	A28	B38	
21	IB1	+	-	+	+	+	+	-	A2	B35	Cw3	A24	B40	Cw4
22	IIB	ND	+	+	+	-	+	-	A30	B18	Cw7	A28	B38	
23	IIIB	ND	ND	+	+	ND	+	ND	A31	B52	Cw9	A2	B44	Cw6
24	IIB	+	-	+	+	ND	+	+	A2	B35	Cw34	B49	Cw7	
25	IB1	+	-	+	+	ND	+	+	A3	B13	Cw4	A30	B35	Cw6
26	ND	+	-	+	+	+	+	+	A24	B36	Cw3	A31	B60	
27	IB	+	-	+	+	+	+	+	A2	B44	Cw3	A31	B39	
28	IIIB	ND	+	+	+	+	+	+	A28	B44	Cw4	A23	B51	
29	IB1	+	-	+	+	+	+	+	A29	B45	Cw6	A24	B51	
30	ND	-	-	+	+	+	-	+	A2	B35	Cw4	A24	Bw6	Cw4

ND No determinado

+ si se encuentra presente

- no se encuentra presente

EC Estadío clínico

## ASOCIACIÓN DE ALELOS HLA CLASE I CON DEFECTOS EN LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DEL PROCESAMIENTO ANTIGÉNICO EN TUMORES DE CÁNCER CÉRVICO-UTERINO.

Los alelos HLA Clase I que más fuertemente estuvieron asociados con la carencia en la expresión de TAP 1, TAP 2 y LMP-10 en las biopsias tumorales fueron A2(57%), B35(47%), Cw7(33%) y Cw4(30%) (Gráficas 8.1 a 8.3, Tablas 8.4 a 8.6). Además, la asociación alélica más frecuentemente encontrada fue HLA-B35 con el alelo -Cw4 la cual estuvo presente en 9 de las 30 pacientes. No obstante, las asociaciones alélicas entre HLA-B39 y Cw7; HLA-B35 y -Cw7 y HLA- B39 con el alelo -Cw4, fueron escasas en pacientes con CaCu y se presentaron de manera más frecuente en el grupo de las donadoras sanas (Tabla 8.2). Lo anterior apoya más la sugerencia de que las asociaciones alélicas HLA-Cw7 con los alelos HLA-B35 y -B39; y la del alelo HLA-Cw4 con -B39 pudieran tener un papel importante en la protección contra el Cáncer Cérvico-uterino en nuestra población.

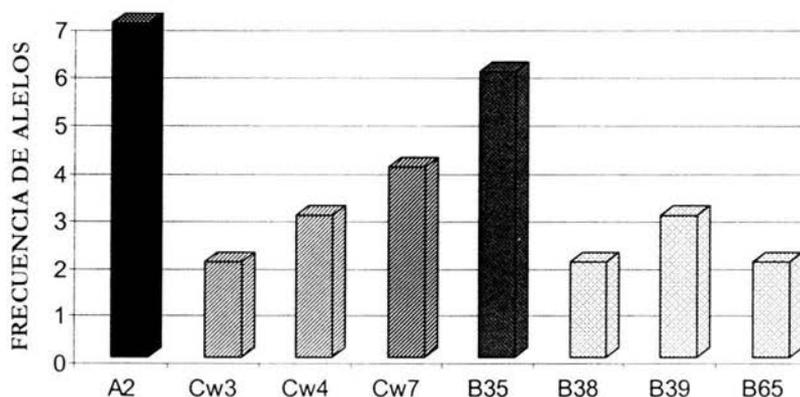
Los estadios clínicos más frecuentes en las pacientes fueron IB1 con 17 casos, IIB con 33 casos y IIIB con 22 casos (Tabla 12.1 Anexos).

Por otro lado, los estadios clínicos de las 30 pacientes de las cuales se obtuvieron las biopsias, fueron distribuidos de manera homogénea: IB1(4), IB2(5), IIA(4), IIB(8), IIIB(6) y no hubo una correlación directa con algún alelo HLA Clase I en particular, ya que los alelos predominantes HLA-A2, B35, Cw4 y Cw7 en estas pacientes, también se distribuyeron de manera homogénea entre los diferentes grupos de pacientes de acuerdo con su estadio clínico ( Gráficas 8.5 a 8.9).

En el caso de alelos HLA Clase I con defecto en la expresión de moléculas del procesamiento antigénico se encontró que la molécula TAP 1 estuvo ausente en un 37% de las muestras tumorales analizadas y los alelos más frecuentes en estas pacientes fueron HLA-A2, B35 y Cw7 (Tabla 8.4 y Gráfica 8.1).

Tabla 8.4 Pacientes con CaCu que no expresan la proteína transportadora TAP 1.

Paciente y E.C	Haplotipo HLA CLASE I
1 (IB1)	A2, B 65(14), Cw8, A28, B39(16),Cw7
9 (IIA)	A2,B39(16),Cw7,B41
10 (IIB)	A2,B35,Cw10,A31,B38
11 (IIIB)	A2, B39(16),Cw7, B51(5),Cw3
14(IIB)	A2,B35,A28,B60
15 (IIIB)	A2,B35,A24,B45
16 (IIB)	A23,B35,Cw4,A32,B50
17 (IIB)	A1,B35,A29,B44
18 (IB2)	A28,B65,Cw3,A33,B61
20 (IIB)	A30,B18,Cw7,A28,B38(16) (39)
30(NP)	A2,B35,Cw4,A24,Bw6,Cw4

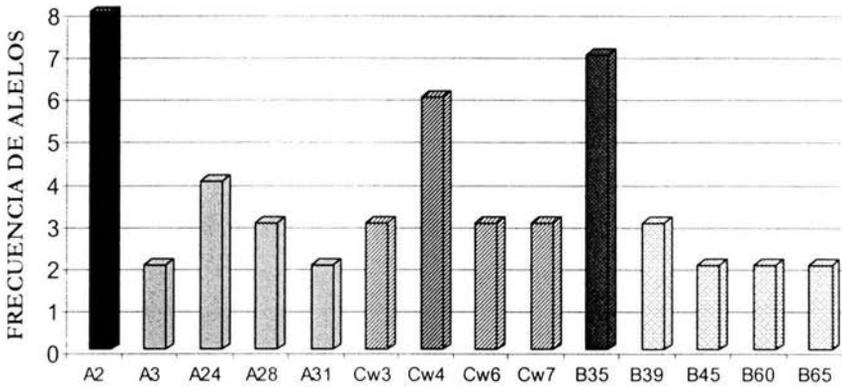


Gráfica 8.1 Principales alelos asociados a la no expresión de la molécula TAP 1 en células de pacientes con CaCu. En donde encontramos que los alelos más frecuentes son el A2, Cw7 y B35.

La carencia en la expresión de la molécula TAP 2 se encontró asociada a los alelos A2, B35 y Cw4 (ver Tabla 8.5, Gráfica 8.2).

Tabla 8.5 Pacientes con CaCu que no expresan la proteína transportadora TAP 2.

Paciente y E.C	Haplotipo HLA CLASE I
1 (IB1)	A2, B 65(14), Cw8, A28, B39(16),Cw7
2 (IB2)	A2,B35,Cw4
4 (IIA)	A2,B35,Cw4,A3,B41.Cw7
14(IIIB)	A2,B35,A28,B60
15 (IIIB)	A2,B35,A24,B45
18 (IB2)	A28,B65,Cw3,A33,B61
24 (IIB)	A2,B35,Cw4,B49,Cw7
25 (IB1)	A3,B13,Cw4,A30,B35,Cw6
26 (NP)	A24,B39,Cw3,A31,B60
27 (IB)	A2,B44,Cw3,A31,B39
29 (IB1)	A29,B45,Cw6,A24,B51(5)
30 (NP)	A2,B35,Cw4,A24,Bw6,Cw4

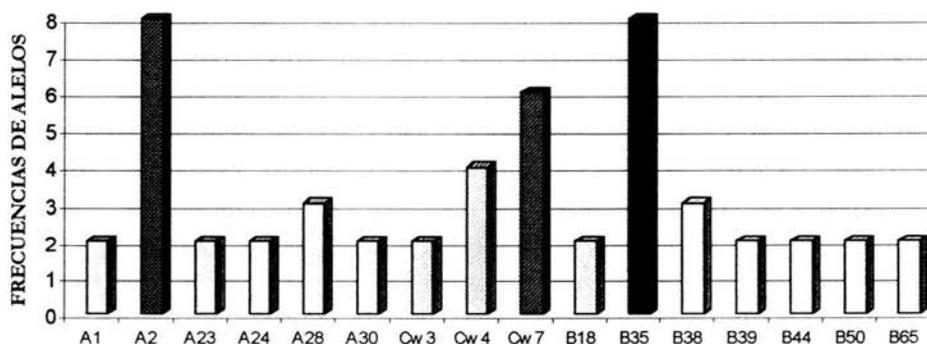


Gráfica 8.2 Principales alelos asociados a la no expresión de las moléculas TAP 2 en células de pacientes con CaCu. En donde encontramos que los alelos más frecuentes en el caso de la carencia de esta molécula, son A2, Cw4 y B35.

En el caso de la molécula LMP-10 se encontró que los alelos A2, B35 y Cw7 fueron más frecuentemente expresados en las pacientes cuyas muestras tumorales estaban carentes de esta molécula (Tabla 8.6, Gráfica 8.3).

Tabla 8.6 Pacientes con CaCu que no expresan la subunidad del proteasoma LMP-10.

Paciente	Haplotipo HLA CLASE I
1 (IB1)	A2, B 65(14), Cw8, A28, B39(16),Cw7
2 (IB2)	A2,B35,Cw4
4 (IIA)	A2,B35,Cw4,A3,B41,Cw7
8 (IB2)	A1,B8,Cw7,A24(9),B44 (12)
10 (IIB)	A2,B35,Cw10,A31,B38
11 (IIIB)	A2, B39(16),Cw7, B51(5),Cw3
13 (IB2)	A2,B35,Cw4,A23,B50,Cw6
14(IIB)	A2,B35,A28,B60
15 (IIIB)	A2,B35,A24,B45
16 (IIB)	A23,B35,Cw4,A32,B50
17 (IIB)	A1,B35,A29,B44
18 (IB2)	A28,B65,Cw3,A33,B61
20 (IIB)	A30,B18,Cw7,A28,B38(16) (39)
22 (IIB)	A30,B18,Cw7,A28,B38(16) (39)

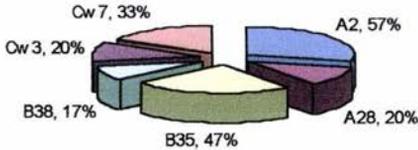


Gráfica 8.3 Principales alelos asociados a la no expresión de la subunidad de proteasoma en LMP-10 en células de pacientes con CaCu. En donde encontramos que los alelos más frecuentes en el caso de esta molécula fueron A2, Cw7 y B35.

Cabe mencionar que la asociación B35-Cw7 no fue frecuente en las pacientes que presentaron deficiencias en TAP 1, TAP 2 y LMP-10, lo cual nos indica que la expresión individual de estos alelos, a pesar de ser altamente frecuentes en estos grupos (A2 en 57%, B35 en 47% y Cw7 en 33%) (Tabla 8.7 y Gráfica 8.4), no pudieran estar relacionados con la protección contra el desarrollo de cáncer cervical, a menos que estén asociados entre ellos como lo muestra la tabla 8.2.

Tabla 8.7 Alelos más frecuentes en el estudio de baja expresión de moléculas del procesamiento de antígenos en 30 pacientes con Cáncer Cervical.

	Alelo A2	Alelo A28	Alelo B35	Alelo B38	Alelo Cw3	Alelo Cw7
Carentes de Tap 1	7/17	3/6	6/14	2/5	2/6	4/10
Carentes de Tap 2	9/17	2/6	8/14	0/5	4/6	2/10
Carentes de LMP-7	1/17	0/6	1/14	0/5	0/6	1/10
Carentes de LMP-10	8/17	5/6	8/14	3/5	2/6	6/10
Carentes de PA28 $\alpha$	1/17	0/6	1/14	0/5	0/6	0/10
Carentes de PA28 $\beta$	1/17	1/6	1/14	1/5	1/6	1/10

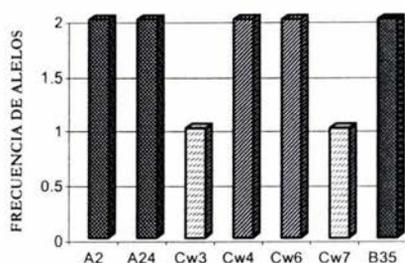


Gráfica 8.4 Alelos más frecuentes en Pacientes con Cáncer Cérvico-uterino, en donde A2 presenta un 57%, el B35 presenta un 47% y el Cw7 presenta un 33% de frecuencia; éstos a su vez se asocian a la deficiencia de moléculas presentadoras de antígenos (TAP 1 y LMP-10).

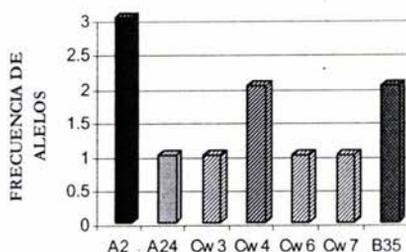
Por otra parte, al analizar las frecuencias alélicas con diferentes etapas del desarrollo del CaCu se encontró lo siguiente:

En el grupo con Estadío Clínico (EC) IB1 los alelos más frecuentes fueron A2, A24, Cw4, Cw6 y B35, encontrados en 2 pacientes cada uno (ver Gráfica 8.5); en el grupo con EC IB2 se encontró que los alelos más frecuentes fueron A2, Cw4 y B35 (ver Gráfica 8.6); en el EC IIA encontramos que los alelos más frecuentes fueron A2, Cw7, B35 y B41 (ver Gráfica 8.7); en el grupo del EC IIB se encontró que los alelos más frecuentes fueron A2, Cw7, B35 los cuales son los mismos alelos presentes al EC IIA (ver Gráfica 8.8); en el caso del EC IIIB, que nos indica una neoplasia más avanzada, se encontró una mayor dispersión de las frecuencias alélicas, observándose que los alelos más frecuentes fueron A2, A24, A28, Cw4, B35 y B51 presentes en dos pacientes cada uno, por lo que al igual que en los casos anteriores se presentan los mismos alelos que por si solos podrían no ser alelos protectores, debido al desarrollo de la patología, no obstante asociaciones particulares de estos pudieran serlo (ver Gráfica 8.9). Por lo que en la comparación de estas cinco tablas encontramos que entre ellas se encuentran alelos frecuentes los cuales son A2, B35 y Cw4, los que se consideran que son los más frecuentes en la población de mujeres Mexicanas.

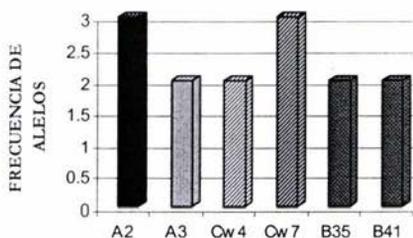
Gráfica 8.5 Pacientes con Estadio Clínico (EC) IB1.



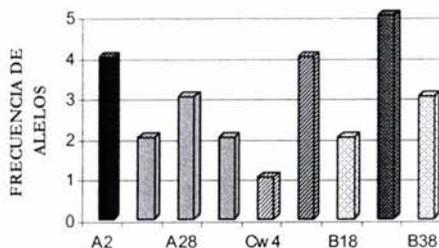
Gráfica 8.6 Pacientes con EC IB2.



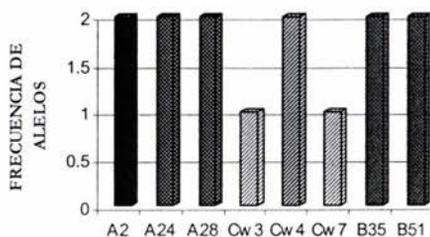
Gráfica 8.7 Pacientes con EC IIA.



Gráfica 8.8 Pacientes con EC IIB.



Gráfica 8.9 Pacientes con EC IIIB.



Gráficas 8.5 a 8.9 Los alelos más frecuentes de HLA Clase I en pacientes con EC IB1, fueron A2, A24, Cw4, Cw6 y B35, en el EC IB2 los alelos más frecuentes fueron A2, Cw4 y B35, en pacientes con EC IIA los alelos más frecuentes fueron A2, Cw7, B35 y B41, en el EC IIB los alelos más frecuentes fueron A2, Cw7 y B35 y en el EC IIIB, fueron A2, A24, A28, Cw4, B35 y B51.

## 9. ANÁLISIS DE RESULTADOS

En estudios recientes se ha recalado que el sistema inmune es capaz de detectar y eliminar células infectadas con virus y células tumorales a través del reconocimiento de antígenos peptídicos (de 8 a 10 aminoácidos) por el receptor de los linfocitos T citotóxicos (CTL's) (Janeway C., *et al.* 2005). Pero, las células pueden algunas veces evadir esta respuesta inmune específica de las células T en el curso de una evolución clonal (genética y fenotípica). Además de que el tumor escapa al mecanismo inmune, la alteración en las moléculas HLA juega un papel crucial en el procesamiento y presentación de antígenos hacia los linfocitos T y en la regulación de las células asesinas naturales (NK) lo que conduce al desarrollo y progresión de tumores. (Garrido F., *et al.* 1997; Garcia-Lora A., *et al.* 2003).

Por otra parte, se han asociado diferentes alelos HLA Clase I o Clase II con la susceptibilidad a diferentes enfermedades, como es el caso de la Espondilitis anquilosante con el alelo HLA-B27 y el de la Diabetes Mellitus Insulino-dependiente con el alelo DR3 y DR4 (Marsh, *et al.* 2000). En el caso particular de CaCu, se ha observado que la asociación de haplotipos Clase II y la expresión de alelos HLA Clase I puedan tener un papel importante en desarrollo de la enfermedad. Por ejemplo, en un estudio hecho en mujeres hispánicas con cáncer cervical positivas a la infección con VPH-16, se encontró que las asociaciones alélicas DRB1\*1501-DQB1\* 0602\*0301\*0303 y el DRB1\* 0407-DR\*0302 se relacionaron fuertemente con el desarrollo del carcinoma cervical, mientras que el haplotipo DR13 tuvo una asociación negativa (Hernández H., *et al.* 2004). En otros estudios, se ha encontrado una expresión reducida de moléculas HLA Clase I en el 70% de los tumores estudiados; en donde el alelo HLA-A2 presentó una disminución del 50% en su

expresión; el alelo HLA-A3 un 66% ; el alelo Bw4 en un 56% y el alelo Bw6 en un 37% (Silva B., *et al.* 1999; Fernández G., *et al.* 2004). La baja expresión de alelos HLA Clase I puede estar asociada con la pérdida de la expresión de las moléculas del procesamiento antigénico TAP 1 lo cual puede influir directamente en el aporte de péptidos hacia ciertos alelos HLA Clase I causando su retención en el retículo endoplásmico y en consecuencia el abatimiento de su expresión en la membrana para su presentación de péptidos antigénicos hacia linfocitos T, como recientemente se ha reportado por Cromme F.V., *et al.* 1994 y Gostout P.T., *et al.* 2003.

El investigar la asociación de defectos en el procesamiento antigénico con ciertos alelos HLA Clase I, es de gran relevancia para conocer la predisposición a la enfermedad. Por tal razón, en el presente trabajo analizamos las frecuencias alélicas HLA Clase I en pacientes mexicanas con CaCu con la finalidad de ver si estas se asocian con la pérdida de la expresión de moléculas del procesamiento antigénico (LMP-2, LMP-7, LMP-10, PA28 $\alpha$ , PA28 $\beta$ , TAP 1 y TAP 2) en tumores derivados de estas pacientes. Al estudiar un grupo de 100 pacientes con CaCu y uno de 100 donadoras sanas, encontramos que los alelos más frecuentes en ambos grupos fueron HLA-A2, -B35 y -Cw4; el alelo HLA-Cw10 fue más frecuente en pacientes con CaCu. Al analizar las asociaciones alélicas en ambos grupos, encontramos que las asociaciones de HLA-B39, -B35, -A3, -A24 y -A1 con el alelo HLA-Cw7 y los alelos HLA-A1 y -B39 con HLA-Cw4, fueron por lo menos dos veces más frecuentes en las donadoras sanas.

Asimismo, al analizar la expresión de las moléculas del procesamiento antigénico en tumores de estas pacientes encontramos que TAP 1, TAP 2 y LMP-10 estuvieron ausentes en un 37, 43, y 47% respectivamente, además de que estas pacientes

presentaron una baja frecuencia de las asociaciones alélicas antes mencionadas, lo que nos permite sugerir que estas asociaciones alélicas pueden ser protectoras contra el CaCu. Lo anterior se apoya por el hecho de que en trabajos recientes se ha reportado que los alelos HLA-Cw7 y -Cw4 presentan péptidos específicos derivados de antígenos tumorales, como es el caso de melanoma en donde el alelo HLA-Cw7 presenta un péptido común entre las proteínas MAGE-2, -3, -6 y -12 (Breckpot K., *et al.* 2004); o el del alelo HLA-Cw4 en donde nuestro grupo de trabajo ha encontrado que este alelo presenta péptidos derivados de antígenos virales, uno de ellos proveniente de la proteína L1 de VPH-18 (Monroy-García A., *et al.* 1999).

En otros estudios, se ha reportado que los alelos HLA-B35 o -B39 presentan eficientemente a varios antígenos virales (Marsh S., *et al.* 2000), entre ellos algunos derivados de VPH-18 (Monroy García A., *et al.* 2002). De acuerdo a lo observado en nuestro estudio, la baja asociación de los alelos HLA-Cw7 y Cw4 con otros alelos que también son eficientes para la presentación antigénica (como son HLA-B35 y -B39) en las pacientes con CaCu, podría dar una desventaja a la paciente para el desarrollo del tumor, dejándola probablemente con una mayor susceptibilidad a la enfermedad.

Se ha reportado que la baja presencia de algunos alelos HLA de tipo C en pacientes con cáncer tiroideo, principalmente HLA-Cw7 y -Cw1, se asocian con un pronóstico muy pobre para la sobrevivencia de estos pacientes, puesto que además de presentar antígenos tumorales a los linfocitos T, también pueden regular negativamente la respuesta mediada por las células NK (Rios A., *et al.* 2004). Esto también ha sido detectado en varios fenotipos tumorales carentes de algunos alelos HLA del tipo C, en donde de acuerdo con la interacción con el receptor KIR en la

célula NK, pueden inhibir su respuesta antitumoral, favoreciendo así la evasión de la respuesta inmune por parte del tumor (Garrido F., *et al.* 1997; Speiser D., *et al.* 2004).

En nuestro estudio, pacientes con CaCu que presentaban el alelo HLA-Cw7, también presentaron defectos en las moléculas del procesamiento antigénico principalmente TAP 1 y LMP-10 (Tabla 8.7). Lo que puede influir en la generación y transporte de péptidos para unirse a este alelo.

Finalmente, en un estudio epidemiológico reciente de la población de Costa Rica y Estados Unidos, se encontró una prevalencia del alelo alelo HLA-Cw2 en las mujeres con lesiones cervicales de alto grado con respecto a la población sana; además los alelos HLA de tipo C más frecuentes en la población control fueron HLA-Cw4 y -Cw7, lo que sustenta de manera importante los datos que obtuvimos en el presente trabajo (Wang S., *et al.* 2002).

## 10. CONCLUSIONES

- En el presente trabajo se encontró que los alelos HLA-A2, -B35 y -Cw4 fueron los más frecuentes en los grupos de pacientes con CaCu y donadoras sanas. También se encontró que el alelo HLA-Cw10 fue significativamente más frecuente en pacientes con CaCu.
- Al analizar las asociaciones alélicas en ambos grupos, encontramos que las asociaciones de HLA-B39, -B35, -A3, -A24 y -A1 con el alelo HLA-Cw7 y los alelos HLA-A1 y -B39 con HLA-Cw4, fueron por lo menos dos veces más frecuentes en las donadoras sanas.
- En el análisis de la expresión de las moléculas del procesamiento antigénico en tumores de estas pacientes encontramos que TAP 1, TAP 2 y LMP-10 estuvieron ausentes en un 37, 43, y 47% respectivamente, además de que estas pacientes presentaron una baja frecuencia de las asociaciones alélicas antes mencionadas.
- Lo que nos permite sugerir que las asociaciones alélicas: HLA-B39, -B35, -A3, -A24 y -A1 con el alelo HLA-Cw7 y los alelos HLA-A1 y -B39 con HLA-Cw4 pueden ser protectoras contra el CaCu.

## 11. PROPUESTAS

De acuerdo a lo encontrado en el presente trabajo se sugiere que las asociaciones alélicas HLA-B39, -B35, -A3, -A24 y -A1 con el alelo HLA-Cw7 y los alelos HLA-A1 y -B39 con HLA-Cw4, pueden ser protectores contra el desarrollo de Cáncer Cérvico-uterino. Por tanto, si el desarrollo de CaCu está asociado etiológicamente con la infección por VPH y las proteínas virales con mayor potencial antigénico corresponden a las de la cápside (L1 y L2) y a las oncogénicas (E6 y E7), entonces sería de gran relevancia buscar péptidos antigénicos de estas proteínas específicas hacia esos alelos, para ser utilizados como vacunas en pacientes con CaCu y en personas con riesgo de padecerla.

## 12. ANEXOS

Tabla 12.1 Datos de Pacientes con CaCu.

PACIENTE	TIPO DE TUMOR	ESTADIO CLINICO (E. C)	HAPLOTIPO HALA CLASE I
1	Ca. Epidermoide	IIIB	A2, B35, A68, B48,Cw4
2	Adenocarcinoma	IIB	A3,B7,Cw3,A24,B50(21),Cw3
3	Ca. Epidermoide	IIB	A1,B8,Cw1,A36, B60(1),Cw1
4	Ca. Epidermoide	IIIB	A24(9), B35, Cw1, A28, B15, Cw1
5	Ca. Epidermoide	IB1	A2, B39, Cw3, A2, B60, Cw3
6	Ca. Epidermoide	IIB	A2, B35,A2, B35
7	Ca. Epidermoide	IIIB	A31, B35, A28, B48
8	Ca. Epidermoide	IB2	A1, B8, A24(9), B44(12)
9	Ca. Epidermoide	IIA	A2, B65(14), Cw7, A33(19), B50(21), Cw8
10	Ca. Epidermoide	IB2	A2, B38(16),Cw3, A2, B60(40), Cw3
11	Adenocarcinoma	IIA	A3, B38,Cw4, A11, B35, Cw4
12	Ca. Epidermoide	IB2	A2, B35, Cw4, A2,B35,Cw4
13	Adenocarcinoma	IB1	A2, B65(14), Cw8, A28,B39(16), Cw7
14	Ca. Epidermoide	IIA	A2,B35,Cw4,A3,B41,Cw7
15	Ca. Epidermoide	IIA	A2,B39(16)Cw7,A2, B41, Cw7
16	Ca. Epidermoide	IIB	A2, B35,Cw10,A31,B38,Cw10

PACIENTE	TIPO DE TUMOR	ESTADIO CLINICO (E. C)	HAPLOTIPO HALA CLASE I
17	Ca. Epidermoide	IIIB	A2,B39(16)Cw7,A2, B51(5), Cw3
18	Ca. Epidermoide	IIB	A2,B7,Cw7, A23,B51, Cw3
19	Ca. Epidermoide	IVA	A2, B48, Cw7, A28, B51, Cw3
20	Ca. Epidermoide	IB2	A2, B35, Cw4, A23,B50,Cw6
21	Ca. Epidermoide	IIB	A2, B41, Cw9; A28, B62, Cw9
22	Ca. Epidermoide	IIIB	A24, B46, A28, B48
23	Ca. Epidermoide	IIIB	A31, B35, Cw10, A28, B15, Cw10
24	Ca. Adenoescamoso	IIB	A2, B35, A28, B60
25	Ca. Adenoescamoso	IIIB	A2, B34, A24, B45
26	Ca. Epidermoide	IIB	A23, B35,Cw4, A32,B50, Cw4
27	Ca. Epidermoide	IIIB	A1, B35,A29,B44
28	Ca. Epidermoide	IB2	A28, B65,Cw3, A33, B61, Cw3
29	Ca. Epidermoide	IIIB	A28, B35,Cw4, A24, B35, Cw4
30	Ca. Epidermoide	IIB	A30, B18, Cw7, A28, B38(16) (39),Cw7
31	Ca. Epidermoide	IIB	A2,B42,Cw7,A30,B42,Cw7
32	Cervicitis crónica	IIB	A2,B35,Cw4,A2,B49,Cw7
33	Ca. Epidermoide	IIIB	A2,B50,Cw2,A2,B27.Cw2
34	Adenocarcinoma	IB1	A3,B13,Cw4,A30,B35,Cw6
35	Ca. Epidermoide	IB1	A2,B35,Cw3,A24,B40,Cw4
36	Ca. Epidermoide	IIB	A2,B35,Cw4,A24,B27,Cw2

PACIENTE	TIPO DE TUMOR	ESTADIO CLINICO (E. C)	HAPLOTIPO HALA CLASE I
37	Ca. Epidermoide	IIIB	A31(19),B52(5)Cw9,A2,B44(12),Cw6
38	Ca. Epidermoide	IB1	A2,B44,Cw4,A33,Bw4,Cw4
39	Ca. Epidermoide	IIB	A2,B35,Cw4,A31,Bw6,Cw4
40	Ca. Epidermoide	In situ	A2,B35,Cw4,A2,B39(16),Cw4
41	Adenocarcinoma velloglandular invasor	IIB	A2,B48,A28,B39
42	Ca. Epidermoide	IB1	A31,B61,Cw3,A32,B51,Cw3
43	Ca. Epidermoide	IIIB	A2,B62,Cw1,A3,B7,Cw7
44	Ca. Epidermoide	IIA	A2,B55(22),Cw4,A28,B35,Cw4
45	Ca. Epidermoide	IIIB	A2,B51,A28,B15
46	Ca. Epidermoide	IIB	A1,B8,Cw7,A31,B35,Cw4
47	Ca. Epidermoide	IIB	A2,B8,Cw7,A30,B18,Cw5
48	Ca. Epidermoide	IIIB	A2,B13,Cw6,A1,B58,Cw6
49	Carcinoma Epidermoide	IIIB	A28,B35,Cw4,A11,B61(40),Cw3
50	NP	NP	A24,B35,Cw1,A31,B39,Cw1
51	NP	NP	A2,B35,Cw4,A24,B35,Cw4
52	NP	NP	A2,B35,Cw4,A24(9),B35,]Cw4
53	NP	NP	A2,B35,Cw3,A34(10),B49(21),Cw3
54	NP	IB1	A2,B62(15),Cw3,A28,B65(14),Cw8
55	NP	IIB	A28,B35,Cw4,A24(9),B35,Cw1
56	NP	IIB	A31(19),B39(16),Cw7,A28,B37,Cw7
57	NP	IIB2	A2,B44,A31,B61
58	CaCu células gigantes no queratinizantes	IB1	A2,B62,A68(28),B51
59	NP	IIB	A24,B39,Cw3,A28,B61,Cw3

PACIENTE	TIPO DE TUMOR	ESTADIO CLINICO (E. C)	HAPLOTIPO HALA CLASE I
60	NP	IIIA	A1,B52,A24,B39
61	NP	IIB	A2,B39,Cw8,A68(28),B64,Cw8
62	NP	IIIB	A2,Cw10,A2,B60,Cw10,A2,B62,Cw1
63	NP		A24(9),B60(40),Cw3,A11,B55(22),Cw3
64	NP	IIB	A1,B8,Cw1,A68(28),B75,Cw1
65	NP	IB1	A2,B35,Cw4,A24(9),B35,Cw4
66	NP	IIIA	A2,B48,Cw10(3),A2,B7,Cw10
67	NP	IIB	A2,B51,(5),Cw3,A24(9),B39(16),Cw3
68	NP	IIB	A31,B65(14)A28,B39(16)
69	NP	IIIB	A2,B35,Cw4,A68(28),B39(16),Cw10
70	NP	IIB	A29(19),B44(12),Cw4,A29,B44,Cw4
71	NP	IIIB	A28,B39,Cw7,A28,B39,Cw7
72	NP	NP	A31(19),B39,A11,B53
73	NP	IIB	A28,B35,Cw4,A28,B53,Cw4
74	NP	IB	A2,B44,Cw3,A2,A31,B39,Cw3
75	NP	NP	A24,B39,Cw3,A31,B60,Cw3
76	NP	IIIB	A28,B44,Cw4,A23,B51,Cw4
77	NP	IIIB	A2,B75(15)Cw1(1),A30(19),B65(14),Cw1
78	NP	IB1	A29,B45,Cw6,A24,B51(5),Cw6
79	NP	IIIB	A2,B13,Cw4,A30(19),B35,Cw4
80	NP	IB2	A28,B39,Cw6,A2,B65(14)Cw6
81	NP	IB1	A2,B35,Cw4,A2,B39,Cw4
82	NP	IIIB2	A2,B35,Cw4,A24,B39,Cw7
83	NP	IIA	A24,B35,Cw3,A29(19),B44(12), Cw3
84	NP	IB	A31(19), B61 (40), Cw3, A24 (9), B35, Cw4
85	NP		A28, B38 (16), Cw 7, A30(19), B35, Cw4
86	NP	IIA	A2, B35, Cw4, A3, B39(16), Cw7
87	NP	IB	A2, B35, Cw1, A24 (9), B35, Cw4
88	NP	IIB	A2, B35, Cw4, A3, B35, Cw7

PACIENTE	TIPO DE TUMOR	ESTADIO CLINICO (E. C)	HAPLOTIPO HALA CLASE I
89	NP	IB1	A2, B62(15), Cw3, A11, B7, Cw7
90	NP	IIB	A1, B8, Cw7, A24 (9), B35, Cw4
91	NP	IB	A2, B35, Cw4, A24 (9), B7, Cw7
92	NP	IIIB	A1, B8, Cw7, A2, B62(15), Cw7
93	NP	IIB	A3,B65(14),Cw5,A30(19),B44(12),Cw5
94	NP	IIB	A2,B35,Cw4,A23,B51(5),Cw4
95	NP	IIA	A28,B39,Cw7,A28,B61(40),Cw3
96	NP	IB1	A2,B39(16),Cw3,A31(19),B60,Cw3
97	NP		A2,B51(5),Cw7,A26(10),B49(21),Cw7
98	NP	IIB	A2,B35,Cw4,A29(19),B51,Cw4
99	NP	IB2	A2,B60(40),Cw3,A2,B60,Cw7
100	NP	IIB	A28,B60(40),Cw3,A24(9),B60,Cw3

NP Dato No Proporcionado

Tabla 12.2 Datos de donadoras sanas.

Donadora	Edad	Haplotipos HLA Clase I
1	22	A1,B8,Cw7,A2,B35,Cw4
2	25	A11,B35,Cw4,A2,B39(16),Cw7
3	22	A1,B49(21),Cw6,A2,B27,Cw1
4	36	A11,B53,Cw4,A2,B16,Cw7
5	29	A28,B39(16),Cw7,A28,B60(40),Cw3
6	18	A2,B52(5),Cw1,A2,B62(15),Cw3
7	29	A1,B15,Cw2,A2,B63(15),Cw7
8	24	A2,B62(15),Cw3,A28,B39(16),Cw7
9	39	A1,B8,Cw3,A2,B39(16),Cw7

Donadora	Edad	Haplotipos HLA Clase I
10	53	A1,B49(21),Cw7,A28,B60(40),Cw3
11	66	A2,B35,Cw4,A11,B64,B65(14),Cw4
12	77	A2,B62(15),Cw3,A24(9),B62,Cw3
13	28	2,B35,Cw4,A29(19),B7,Cw4
14	29	A2,B35,A68,B15
15	20	A1,B49(2),Cw7,A28,B62(15),Cw1
16	35	A2,B35,Cw4,A24(9),B48,Cw4
17	18	A2,B35,Cw4,A24(9),B48,Cw8
18	21	A2,B35,Cw4,A68(28),B39(16),Cw7
19	40	A3,B38(16),Bw3,A3,B55(22),Cw3
20	42	A2,B44(12),Cw4,A24(9),B35,Cw4
21	21	A3,B35,Cw4,A2,B39(16),Cw4
22	37	A2,B39(19),Cw7,A31(19),B44(12),Cw5
23	43	A2,B35,Cw4,A28,B60(40),Cw3
24	38	A2,B62(15),Cw3,A2,B39(16),Cw7
25	40	A2,B39(16),Cw7,A28,B48,Cw8
26	36	A1,B8,Cw7,A32(19),B60(40),Cw3
27	43	A2,B35,Cw4,A28,B35,Cw4
28	14	A2,B60(40),Cw7,A28,B48,Cw7
29	19	A1,B8,Cw3,A2,B62(15),Cw1
30	39	A2,B27,Cw1,A24(9),B35,Cw1
31	45	A24(9),B35,Cw4,A28,B39,Cw7

Donadora	Edad	Haplotipos HLA Clase I
32	44	A1,B49(21),Cw4,A23(9),B41,Cw4
33	47	A2,B62(15),Cw1,A2,B39(16),Cw7
34	49	A2,B48,Cw7,A24(9),B62(15),Cw1
35	40	A2,B35,Cw4,A3,B49(2),Cw7
36	56	A2,B51(5),Cw7,A24(9),B39(16),Cw7
37	40	A2,B62(15),Cw3,A24(9),B21,Cw3
38	36	A1,B8,Cw7,A24(9),B35,Cw4
39	46	A24(9),B60(40),Cw4,A31(19),B35,Cw4
40	8	A28,B35,Cw3,A11,B62(15),Cw1
41	29	A2,B60(40),Cw3,A11,B35,Cw4
42	54	A23(9),B39(16),Cw7,A24(4),B48,Cw7
43	41	A24(9),b51(5),Cw4,A34(10),B51(5),Cw4
44	35	A3,B62(15),Cw3,A24(9),B48,Cw3
45	28	A28,B35,Cw4,A3,B39,Cw4
46	73	A24(9),B35,Cw4,A29(19),B44(12),Cw4
47	58	A2,B16(40),Cw3,A24(9),B61(40),Cw3
48	42	A2,B41,Cw7,A24(9),B35,Cw3
49	34	A2,B35,Cw4,A29(19),B7,Cw7
50	38	A2,B39(16),Cw7,A24(9),B39,Cw7
51	25	A3,B35,Cw4,A31(19),B39(16),Cw3
52	18	A31(19),B39(16),Cw3,A28,B51(59),Cw4
53	15	A2,B49(21),Cw7,A28,B39(16),Cw7

Donadora	Edad	Haplotipos HLA Clase I
54	39	A1,B35,Cw2,A30(19),B18,Cw5
55	49	A2,B51(5),Cw7,A2,B49(21),Cw7
56	30	A2,B44(12),Cw5,A24(9),B39(19),Cw5
57	65	A2,B35,A2,B35
58	29	A26(10),B38(16),Cw4,A2,B38,Cw4
59	57	A2,B35,Cw4,A28,B35,Cw1
60	25	A2,B52(5),Cw3,A24(9),B45(12),Cw3
61	30	A28,B60(40),Cw3,A31(19),B52(15),Cw4
62	28	A2,B51(5),a29(19),B44(12)
63	23	A2,B39(16),Cw7,A24(9),B35,Cw1
64	42	A24(9),B38(16),Cw7,A31(19),B35,Cw4
65	18	A1,B8,Cw7,A2,B8,Cw4
66	54	A2,B62(15),Cw1,A28,B35,Cw4
67	28	A24,B48,Cw4,A23,B35,Cw4
68	27	A3,B35,Cw4,A28,B39(16),Cw4
69	47	A24(9),B55(22),Cw3,A11,B35,Cw4
70	29	A24,(9),B7,Cw7,A2,B35,Cw4
71	37	A2,B51(5),Cw3,A3,B13,Cw3
72	62	A24(9),B48,Cw4,A11,B35,Cw4
73	40	A1,B35,Cw4,A31(15),B35,Cw2
74	51	A31(19),B35,Cw7,A32(19),B41,Cw7
75	20	A68(28),B39(16),Cw4,A29(19),B44(12),Cw4

Donadora	Edad	Haplotipos HLA Clase I
76	36	A24(9),B60(40),Cw3,A24,B60,Cw3
77	NP	A2,B51(5),A68(28),B39(16)
78	42	A2,B35,Cw4,A2,B 35,Cw4
79	25	A2,B35,Cw4,A31(19),B39(16),Cw7
80	23	A2,B60(40),Cw6,A24(9),B49(21),Cw6
81	21	A2,B39,Cw7,A24,B39,Cw7
82	25	A2,B39(16),Cw7,A31(19),B51(5),Cw7
83	26	A24,B39(16),Cw7,A2,B35,Cw4
84	37	A24(9),B35,Cw4,A31(19),B35,Cw4
85	46	A1,B8,Cw7,A2,B35,Cw4
86	35	A1,B52(5),A1,B18
87	30	A2,B35,Cw4,A31(19),B35,Cw4
88	44	A1,B7,Cw7,A2,B51(5),Cw3
89	36	A2,B62(15),A24,B62
90	34	A1,B49(21),Cw7,A31,B35,Cw4
91	38	A2,B35,Cw4,A28,B51(5),Cw3
92	24	A2,B35,Cw4,A68(28),B61(40),Cw3
93	22	A2,B39(16),Cw7,A28,B39(16),Cw1
94	41	A2,B8(Bw6),Cw4,A28,B35(11),Cw7
95	29	A2,B62,Cw1,A24,B61,Cw3
96	32	A2,B62,Cw1,A26,B38,Cw1
97	33	A2,B39(16),Cw4,A31(19),B39(16),Cw3

Donadora	Edad	Haplotipos HLA Clase I
98	20	A2,B39(16),Cw7,A24(9),B35,Cw4
99	54	A2,B39(16),Cw4,A32(19),B51(5),Cw3
100	32	A2,B62(15),Cw1,A2,B56(22),Cw1

NP Dato No Proporcionado

### 13. GLOSARIO DE ABREVIATURAS

**CaCu** Cáncer Cérvico-uterino

**CIN** Neoplasia Cervical Intraepitelial

**CTL** Linfocitos T Citotóxicos

**DNA** Acido Desoxiribonucleico

**ENO** Epitelio Normal

**HFE** Probable Gen de la Hemocromatosis

**HLA** Antígeno Leucocitario Humano

**IFN- $\gamma$**  Interferón Gamma

**IL** Interleucina

**LMP** Subunidades Catalíticas del Proteasoma, codificadas por genes del MHC

**LSP** Linfocitos de Sangre Periférica

**MAGE** Genes Asociados al Melanoma

**MHC** Complejo Principal de Histocompatibilidad

**MIC** Moléculas Asociadas al MHC Clase I

**NK** Células Asesinas Naturales

**OP** Orden de Proporcionalidad

**PA28** Molécula Activadora del Proteasoma.

**PCR** Reacción en Cadena de la Polimerasa.

**RE** Retículo Endoplásmico

**RM** Razón de Momios

**RNA** Acido ribonucléico

**RNAm** Acido Ribonucléico mensajero

**RT** Retro Transcripción

**SCCC** Cáncer Cervical de Células Escamosas

**SFB** Suero Fetal de Bovino

**TAP** Transportadores Asociados al Procesamiento Antigénico

**VPH** Virus del Papiloma Humano

## 14. BIBLIOGRAFÍA

1. Aaltonen M., Partanen J., Auvinen E., Rihkanen H. and Vaheri A. HLA-DQ Alleles and Human Papillomavirus DNA in Adult-Onset Laryngeal Papillomatosis. *The Journal of Infectious Diseases*; 179:682-685. 1999.
2. Abbas A.K., Lichtman A., Pober J. *Inmunología celular y molecular*. Madrid : Editorial Mc Graw-Hill interamericana. 2004.
3. Alonso P., Lazcano E., Hernández M. *Cáncer cervicouterino, diagnóstico, prevención y control*. México. Editorial Médica panamericana: pp. 3-9. 2000.
4. Androlewicz, M.J., Anderson, K.S., Cresswell, P. Evidence that transporters associated with antigen processing translocate a major histocompatibility complex Class I binding peptide into the endoplasmic reticulum in an ATP-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90:9130-34. 1993.
5. Bahena-Román M., Bermúdez Ocaña D., Estrada Aguilar R.A, Lazcano Ponce E., Madrid Marina V.<sup>1</sup> Instituto Nacional de Salud Pública. Cuernavaca, Morelos, México, HGR 1 IMSS Morelia, Mich. Asociación del Antígeno HLA-DQw3 con la Neoplasia intraepitelial cervical el carcinoma invasor del CERVIX uterino y el papilomavirus: casos y controles, *Nutrición*; 2. 2000.
6. Benham, A., Tulp, A., Neefjes J. Synthesis and assembly of MHC-peptide complex. *Immunol. Today*. 16:17-25. 1995.

7. Borysiewicz L.K., Flander A., Nimako M., Man S., Wilkinson G.W., Westmoreland D. *et al.* A recombinant vaccinia virus encoding human papillomavirus types 16 and 18, E6 and E7 proteins as immunotherapy for cervical cancer. *Lancet*; 347:1523-1527. 1996.
8. Boursnell M.E., Retherford E., Hickning J.K., Rollinson E.A., Munro A.J., Rolley N. *et al.* Construction and characterization of a recombinant vaccinia virus expressing human papillomavirus proteins for immunotherapy of cervical cancer. *Vaccine*; 14(16):1485-1494. 1996.
9. Breckpot K., Heirman C., De Greef C., Van der Bruggen P. and Thielemans K. Identification of New Antigenic Peptide Presented by HLA-Cw7 and Encoded by Several MAGE Genes Using Dendritic Cells Transduced with Lentiviruses. *The Journal of Immunology*. 172: 2232-2237. 2004.
10. Broker T.R., Botchan M. Papillomaviruses: Retrospectives and prospectives. *Cancer Cell* ; 4:17-35. 1986.
11. Chen L.P., Ashe S., Brady W.A., Hellstrom I., Hellstrom K.E., Ledbetter J.A. *et al.* Co-stimulation of antitumor immunity by the B7 counter receptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4. *Cell*;71:1093-1102. 1992.
12. Cohen C.J., Sarig O., Yamano Y., Tomaru U., Jacobson S., Reiter Y. Direct phenotypic enclasis of human MHC class I antigen presentation: visualization, quantitation and insitu detection of human viral epitopes using peptide specific, MHC-restricted human recombinant antibodies. *J. Immunol.* Ap 15; 170(3):4349-61. 2003.

13. Cromme F.V., Airey J., Heemels M.T., Ploegh H.L., Keating P.J., Meijer C.J. *et al.* Loss of transporters protein encoded by the TAP-1 gene, in highly correlated with loss of HLA expression in cervical carcinomas. *J. Exp Med*;179(1): 335-340. 1994.
14. Cullen A., Reid R., Campion M., Loincz A.T. Analysis of the physical state of different HPV DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasia. *J. Virol*; 65:606-612. 1991.
15. De Leon C., Casterlan N., López M., González N., *et al.* HLA Class I and Class II alleles and Haplotypes in Mexican Mestizos established from serological typing of 50 families. *Human Biology*. 69:809-818. 1997.
16. De Villiers E. Heterogeneity of human Papillomavirus group. *J. Virol*; 63:4894-4903. 1989.
17. Dranoff G., Jaffee E., Lazenby A.J., Golumbek P.T., Levitsky HI, Brose K. *et al.* Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*; 90:3539-3543. 1993.
18. Driscoll J., Finley D. A. controlled breakdown: Antigen processing and the turnover of viral peptides. *Cell* 68:823-25. 1992.

## ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

19. Escandón-Romero C., Benítez-Martínez M.G., Navarrete-Espinoza J., Vázquez-Martínez J.L., Martínez-Montaño O.G., Escobedo-de la Peña J. Epidemiología del cáncer cervicouterino en el Instituto Mexicano del Seguro Social. *Salud Pública Mex*; 34:607-614. 1992.
20. Fernández G., Carbajal E., Mendoza S.L., Illades B., Hernández D., Terán M.A., Madrid V. HLA DQB1\*03 in mestizo and Nahuatl women with premalignant lesions or cervical cancer related to human papilloma virus infection. 21<sup>th</sup> international conference & clinical workshop Papillomavirus . 506, 2004.
21. Gao L., Chain B., Sinclair C., Crawford L., Zhou J., Morris J. *et al.* Immune response to human papillomavirus type 16 E6 gene in a live vaccinia vector. *J. Gen. Virol.*; 75:157-164. 1994.
22. García-Lora A., Algarra I., Garrido F. MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *J. Cell Physiol.* Jun; 195(3):346-55. 2003.
23. Garrido F., Ruiz-Cabello F., Cabrera T., Perez-Villar J., López Botet M., Duggan-Keen M., Stern P.L. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunology Today.* 18:89-95.1997.
24. Goldeberg, A.L., Rock K.L. Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature* 357:375-379. 1992.
25. Golumbek P.T., Lazenby A.J., Levitsky H.I., Jaffe L.M., Karasuyama H., Baker M. *et al.* Treatment of established cancer by tumor cells engineered to secrete interleukin-4. *Science*; 254:713-716. 1991.

26. Gostout B.S., Poland A., Clhoun E., Sohni Y.R., Giuntoli R.L., McGovern R.M., Sloan J.A., Cha S. and Persing D. TAP 1, TAP 2, and HLA-DR2 alleles are predictors of cervical cancer risk. *Gynecologic Oncology* 88:326-332. 2003.
27. Groettrup M., Ruppert T., Kuchn L., Seeger M., Stander S., Koszinowski U., Kloetzel P.M. The interferon- $\gamma$ -inducible 11s regulator (PA28) and the LMP17 , LMP 7 subunits govern the peptide production by the 20s proteasome *in vitro*. *J Biol.Chem.* 270:23808-15.1995.
28. Groettrup M., Standera A., Stohwasser R., Kloetzel P. M. The subunits MECL-1 and LMP 2 are mutually required for incorporation into the 20S proteasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:8970-8975.1997.
29. Garrido F., Ruiz-Cabello F., Cabrera T., Pérez-Villar J. J., López- Botet M., Duggan K. M., Stern P.L. Implications for immunosurveillance of a Hered HLA class I phenotyps in human tumors. *Immunol. Today* 18:89-95.1997.
30. Guzmán-Rojas L., Alcocer-González J.M., Madrid-Marina V. Perspectivas para el desarrollo de vacunas e inmunoterapia contra cáncer cervicouterino. *Salud Pública Mex;* 40:38-46. 1998.
31. Hernández H., Granados A., Juárez C., Apresa G., García C., Vargas A., Lizano M., Mohar B. HLA I and II Haplotypes associated with positive HPV-16 in Mexican women with invasor Cervical Cancer (CC). 21<sup>th</sup> international conference & clinical workshop Papillomavirus . 509, 2004.

32. Hernández J., Mora M.L., Esquivel F., V.F. Ortiz V.F., Flores C., Lira H., Weiss B., Monroy A. Líneas celulares de cáncer cervical negativas para HPV presentan deficientemente antígenos de vaccinia en comparación con líneas celulares con infección por HPV. *Genética y biomedicina molecular*. CCVP01.2000.
33. Janeway C., Travers P., Walport M., Capra D. *Inmunobiología, el sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad*. Barcelona: Editorial Masson. pp.125-128. 2000.
34. Johnsen A., France J., Man-Sun S., and Harding V.C. Down-regulation of the transporter for antigen presentation, proteasome subunits, and class I major histocompatibility complex in tumor cell lines. *Cancer Research*. 58:3660-3667. 1998.
35. Keating P.J., Cromme F.V., Duggan-Keen M., Snijers P.J., Walboomers J.M., Hunter R.D. *et al.* Frequency of down- regulation of individual HLA-A and B alleles in cervical carcinomas in relation to TAP-1 expression. *Br J. Cancer*; 72(2):405-411. 1995.
36. Kleijmeer, M., Kelly, A., Geuze, H.J., Slot, J.W., Townsend, A., Trowsdale, J. Location of MHC-encoded transporters in the endoplasmic reticulum and *cis*-Golgi. *Nature* 357:342-44. 1992.
37. Lehner, J.P., Creswell, P. Processing and delivery of peptides presented by MHC class I molecules. *Curr. Opin, Immunol*. 8:59-57. 1996.
38. Margni R. *Inmunología e Inmunoquímica Fundamentos*. 5ª edición. Buenos Aires: Editorial media panamericana. pp. 201-205. 1996.

39. Marsh S., Parham P., Barber L. The HLA facts books: Facts book Series. London. pp.7-56. 2002.
40. Matsumara, M., Fremont, D.H., Peterson, P.A., Wilson, I. A. Emerging principles for recognition of peptide antigens by MHC class I molecules. *Science* 257:927-34. 1992.
41. Meneguzzi G., Cerni C., Kieny M.P., Lathe R. Immunization against human papillomavirus type 16 tumor cells with recombinant vaccinia viruses expressing E6 and E7. *Virology*; 18 1:62-69. 1991.
42. Mitra A.B., Murty V.V., Pratap M., Sodhani P., Chaganti R.S. erbB2 (HER/neu) oncogene is frequently amplified in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Cancer Res*; 54:637-639. 1994.
43. Monroy-García A., Ortiz-Navarrete V.F., Mora-García M.L., Flores-Borja F., Díaz-Quinonez A., Isibasi-Araujo A., Trejo-Becerril C., Chacón-Salinas R., Hernández-Montes J., Granados-Arreola J., De León C., Weiss-Steider B. Identification of peptides presented by HLA class I molecules on cervical cancer cells with HPV-18 infection. *Immunology Letters* 67:167-177.1999.
44. Monroy-García A., Weiss-Steider B., Hernandez-Montes J., Ortiz-Navarrete V.F., Bañuelos-Pánuco A., Acosta-Araujo A., Díaz-Quinonez A., López-Graniel C. M., Herbert G., Granados J., De Leon C., Silva-López R.M. and Mora-García M. L. Identification of two homologous antigenic peptides derived from L1 HPV-16 and 18 proteins specific for the HLA-B\*3901. *Arc. Virol.* 147:1933-1942.2002.

45. Moretta L., Mingari M.C., Bottino C., Pende D., Biassoni R. and Moretta A. Cellular and molecular basis of natural killer and natural killer-like activity. *Immunology Letters* 88:89-93,2003.
46. Muñoz N., Bosch F.X., Sanjosé S., Shah K.V. The role of HPV in the etiology of cervical cancer. *Mutat Res*; 305:293-301. 1994.
47. Nandi, D., Jiang, H., Monaco, J. J. Identification of MECL-1 (LMP-10) as the third IFN-gamma-inducible proteasome subunit. *J. Immunol.* 156:2361-64. 1996.
48. Neefjes, J.J. Momburg, F. Hämmerling, G.J. Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC- encoded transporter. *Science.* 261:769-71. 1993.
49. Peralta-Zaragoza O., Bermudez-Morales V., Bahena-Roman M., Alcocer-González J., Recillas-Targ F., Madrid-Marina V. *Molecular Biology of Pathogens*, National Institute of Public Health, Cuernavaca, Morelos, Mexico; School of Biologist Science, Autonomus University of Nuevo Leon, Monterrey, Nuevo Leon, Mexico; Molecular Genetic, Institute of Cellular Physiology, National Autonomous University of Mexico, Mexico DF, Mexico. 2004.
50. Peeling R. W. and MD Sparling F. *Sexually transmitted diseases methods and Protocols.* Totowa, New Jersey. Edit. Human Press. 1999.
51. Pinion S.B., Kennedy J.H., Muller R.W., MacLean A.B. Oncogene expression in cervical intraepithelial neoplasia and invasive cancer of cervix. *Lancet* 1; 337:819-820. 1991.

52. Rios A., Rodriguez J.M., Moya M. R., Galindo P.J., Cariteras M., Alvarez M. R., Parrilla P. Frequency of HLA-C alleles in differentiated thyroid carcinoma in southeastern Spain, HLA-Cw7 as a Poor Prognosis Factor. *American Cancer Society*. 100:264-269. 2004.
53. Riou G., Le M.G., Le Doussal V., Barrios M., George M., Haie C. C-myc proto-oncogene expression and prognosis in early carcinoma of the uterine cervix. *Lancet*; 2:761-763. 1987.
54. Roitt I. *Inmunología fundamentos*. 7ª edición. Madrid: Editorial medica panamericana. pp. 43-70. 2000.
55. Shiffman H.M., Brinton A.L. The epidemiology of cervical carcinogenesis. *Cancer*; 10:1888-1901. 1995.
56. Schiffman M.H., Bauer H.M., Hoover R.N., Glass A.G., Cadell D.M., Rush B.B. *et al.* Epidemiologic evidence showing that HPV infection causes most cervical intraepithelial and invasive neoplasia. *J. Natl Cancer Inst*; 85:958-964. 1993.
57. Shepherd, J.C., Shumacher, T.N. M., Ashton-Rickardt, P.G., Imaeda, S., Ploegh, H.L. TAP1- Dependent peptide translocation in vitro is ATP dependent and peptide selective. *Cell* 74:577-84. 1993.
58. Silva B., Vargas G., Zúñiga J., Rodríguez T., Hernández B., Osnaya N., Kofman S., Torres A., Granados J. Genetic Features of Mexican Women Predisposing to Cancer of the Uterine Cervix. *Human Pathology*. 30: 626-628. 1999.

59. Speiser D.E., Pittet M.J., Valmori D., Dunbar R., Rimoldi D., Liénard D., MacDonald H. R., Cerottini J.C., Cerundolo V. And Romero P. In vivo Expression of Natural Killer Cell Inhibitory Receptors by Human Melanoma-specific Cytolytic T Lymphocytes. *J. Exp. Med.* 190:775-782. 2004.
60. Stites A., Terr A., Parslow T. *Inmunología básica y clínica.* 9ª edición. México: Editorial el manual moderno.pp. 200-250.2000.
61. Stoltze L., Nussbaum A., Sijts A., Emmerich N., Kloetzel P. and Schild H. The junction of the proteasome system in MHC class I antigen processing. *Immunology today.* 21:317-319. 2000.
62. Tanaka K., Isselbacher K., Khnoury G., Jay G. Reversal of oncogenesis by the expression of a major histocompatibility complex class 1 gene. *Science*; 228:26-30. 1984.
63. Topalian S.L., Rivoltini L., Mancini M., Markus N.R., Robbins P.F., Kawakami Y. *et al.* Human CD4+ T cells specifically recognize a shared melanoma-associated antigen encoded by the tyrosine gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 91:9461-9465. 1994.
64. Tzzy-Choou W. Immunology of the human papillomavirus in relation to cancer. *Curr Opin Immunol*; 6:746-754. 1994.
65. Van Ranst M., Kaplan J.B., Burk R.D. Phylogenetic classification of human papillomaviruses: Correlation with clinical manifestation. *J. Gen. Virol.*; 73:2653-2660. 1992.

66. Wang S., Hildesheim A., Gao X., Schiffman M., Herrero R., Bratti M. C., Sherman M. E., Barnes W A., Greenberg M. D., McGowan L., Mortel R., Schwartz P. E., Zaino R. J., Glass A. G., Burk R.D., Karacki P., and Carrington M. Comprehensive Analysis of Human Leukocyte Antigen Class I Alleles and Cervical Neoplasia in 3 Epidemiologic Studies. *The Journal of Infectious Diseases*. 186:598-605.2002.

67. Williams D.B., Vassilakos A., Suh W.K., Peptide presentation by MHC class I molecules. *Trends Cell Biol.* 6:267-73. 1996.

*Páginas web*

Compumedicina (<http://by8fd.bay8.hotmail.msn.com/cgi-bin/compose?>)

Brown, John. 1995. What The Heck is PCR?  
(<http://falcon.cc.ukans.edu/~jbrown/pcr.html>)

Vierstraete, Andy. 1999. PCR to amplify the requested gene  
(<http://allserv.rug.ac.be/~avierstr/principles/pcrani.html>)

NCBI [www.pubmed.com](http://www.pubmed.com)

The Journal of Immunology [www.jimmunol.org](http://www.jimmunol.org).