



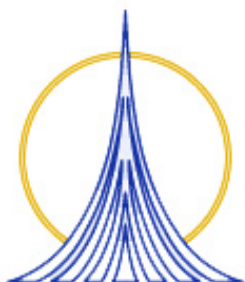
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**Identificación de linfocitos T citotóxicos específicos para
la proteína L1 de HPV-16 y HPV-18**

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
PAULINA ALONSO YONCA

DIRECTOR: JORGE HERNANDEZ MONTES



MEXICO, D. F.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

DEDICATORIA

A MIS PADRES

GUILLERMINA Y NICOLAS

A MI HERMANO

SERGIO

AGRADECIMIENTOS

Al laboratorio de Inmunobiología

Al Dr. Isaías Salgado por la ayuda estadística para este trabajo, a los doctores y maestros quienes conforman la unidad de Diferenciación Celular y Cáncer en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

A todos los maestros que a lo largo de mi vida han colaborado con sus conocimientos a mi realización profesional.

A todos mis amigos y compañeros: Biol. Noé Morales U., Biol. Azucena Sánchez H. Biol. Gabriel Ramírez G., Biol. Daniel Mendieta, Biol. Oswaldo S., Pedro M., Biol. Yanet, Héctor, Eva, Cristina, Enrique C., Diana, Rogelio, Saúl, Dulce, Dan, Paco, Noé y Jorge.

A mis padres por el apoyo incondicional pues sin ellos nada hubiera sido posible, y a mi hermano Sergio; recuerden que los QUIERO MUCHO

Becada por el proyecto DGAPA-PAPIIT IN212506-3

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo financiero del proyecto DGAPA PAPIIT IN212506-3 y CONACYT 47615Q, así como el apoyo institucional de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
MARCO TEÓRICO	
1. SISTEMA INMUNE.....	6
1.1 Inmunidad Innata.....	6
1.2 Inmunidad Adaptativa.....	7
1.3 Inmunidad humoral.....	8
1.4 Inmunidad celular.....	9
1.5 Linfocitos T.....	10
2. COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD.....	11
2.1 Estructura de complejo principal de histocompatibilidad.....	12
2.2 PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS.....	13
2.2.1 Generación de péptidos por el proteasoma.....	14
2.2.2 Translocación de péptidos por TAP.....	15
2.2.3 Ensamble de moléculas MHC.....	16
2.2.4 Presentación de péptidos antigénicos.....	17
2.2.5 Vías no clásicas de la presentación antigénica.....	18
3. BIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS.....	20
3.1 CÁNCER.....	21
3.1.1 Cáncer cervico uterino.....	22
3.1.2 HPV.....	22
3.1.3 Tipos y clasificación.....	24
3.2 INFECCIÓN POR HPV.....	28
3.2.1 Anatomía del útero.....	28
3.2.2 Histología de cérvix.....	29
3.2.3 Ciclo viral.....	31
3.2.4 Etapas de cáncer cervico uterino.....	34
3.2.5 Evasión de la respuesta inmune.....	36

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	37
HIPÓTESIS.....	38
OBJETIVOS.....	39
MATERIAL Y MÉTODOS.....	40
RESULTADOS.....	46
ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.....	65
CONCLUSIONES.....	69
PERSPECTIVAS.....	70
APÉNDICES.....	71
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	76

RESUMEN

Los linfocitos T citotóxicos (T CD8+) juegan un papel importante en la respuesta inmunológica del huésped hacia células infectadas con virus, células tumorales, y patógenos intracelulares. Los linfocitos T CD8+, vía su receptor, reconocen péptidos de 8 a 9 aminoácidos que provienen de proteínas virales o mutadas que se sintetizan en el citosol de las células blanco, asociadas a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC-I). Por otro lado, tomando en consideración que el cáncer cérvico uterino se asocia fuertemente con la infección por HPV, principalmente HPV-16 y HPV-18, y que péptidos derivados de proteínas de estos virus pueden funcionar como antígenos de la activación de linfocitos T de pacientes con lesión por HPV, se realizó este trabajo con la finalidad de estudiar la inmunogenicidad de tres diferentes péptidos de la proteína L1 de HPV-16 y HPV-18 con alta afinidad por las moléculas de histocompatibilidad HLA-A2, expresadas con frecuencia en la población mexicana. Fueron sintetizados 4 péptidos: 3 derivados de las proteínas L1 de HPV-16 y HPV-18 y otro de la proteína M1 del virus de influenza, con alta afinidad por el alelo HLA-A2, de acuerdo con un programa computacional de predicción por algoritmos. Estos péptidos fueron utilizados para la identificación de linfocitos CD8+ con reactividad específica hacia ellos, por medio de ensayos de proliferación, secreción de interferón- γ y citometría de flujo con complejos tetraméricos de moléculas HLA-A2. Los péptidos que indujeron una mayor estimulación fueron el péptido homólogo P2 (ILEDWNFGV), derivado del HPV-18 y el péptido P3 (ILEDWNFGL) derivado de HPV-16, pues respondieron los leucocitos de 17 de 22 pacientes. Estos péptidos estimularon de manera cruzada a linfocitos de pacientes con diferentes tipos de HPV infectante.

Por otra parte los ensayos de proliferación y la identificación de la citocina IFN- γ , muestran que existen clonas de linfocitos T CD8+ específicos hacia péptidos de la proteína L1; cuando las pacientes sólo tienen lesión por HPV, cabe destacar la presencia de estas clonas en esta etapa de la infección ya que hasta ahora sólo se han realizado estudios para la identificación de anticuerpos y la identificación o estimulación de células T CD8+ se hace en etapas posteriores de la enfermedad como en displasias e incluso neoplasias intraepiteliales . Es decir que en base a nuestros resultados podemos decir que existe respuesta inmune celular en etapas tempranas de la infección por HPV y que incluso esta puede verse in Vitro con la identificación de linfocitos T CD8+ específicos, por medio de la tinción con tetrámeros específicos hacia estos péptidos; además del uso de células dendríticas como presentadoras de nuestros antígenos, mostrando porcentajes de estos linfocitos que incluso rebasan el 1%.

INTRODUCCION

El cáncer cérvico uterino (CaCu) representa la neoplasia más frecuente en nuestro país y es la segunda causa de muerte en 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 Mayor 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 producidos por un complejo multienzimático llamado proteasoma constituido por enzimas proteolíticas. Posteriormente los péptidos son transportados al interior del retículo endoplásmico por las proteínas transportadoras Asociadas al Procesamiento de Antígenos (TAP1 y TAP2) donde se ensamblan a las moléculas MHC-I y finalmente emergen a la superficie celular para su presentación (*Wenzel and Baumeister, 1995*).

Los pacientes con infección del HPV-16 y HPV-18 tienen un riesgo mayor para sufrir una displasia severa o cáncer invasor, en relación con otros tipos de HPV. Aparentemente la penetración del genoma viral en la célula del epitelio induce mutaciones que se replican en generaciones celulares sucesivas, y que pueden desencadenar un fenómeno neoplásico (*Brady et al, 1999*).

Los tumores y las infecciones virales presentan un esencial problema en el reconocimiento por el sistema inmune; debido a agentes etiológicos (virus u oncogenes desregulados) los cuales están ocultos en el interior de las células autólogas. Además el mecanismo inmune humoral tales como los anticuerpos y el complemento son generalmente inefectivos contra tumores o virus intracelulares. Estos problemas pueden ser solventados por el complejo principal de histocompatibilidad clase I vía presentación de antígenos, los cuales son muy activos en la mayor parte de las células somáticas. Usualmente sólo los péptidos autólogos son presentados por las moléculas MHC-I de manera natural, y estos son ignorados por el sistema inmune. Sin embargo, cuando las células sintetizan proteínas extrañas, como ocurre cuando una célula es infectada por un virus, las células efectoras pueden ser estimuladas (*Llora y Kenneth, 1999*).

La detección de péptidos que derivan de las proteínas intracelulares mutadas o virales en las células tumorales y que son presentadas por MHC-I en la membrana celular es llevada a cabo por los linfocitos T citotóxicos (Robey and Fowlkes, 2004). Los CTL son altamente específicos para reconocer a péptidos extraños. Estudios recientes han demostrado que péptidos derivados de HPV-16 son capaces de estimular CTL humanos contra líneas celulares con cáncer cervical positivas para HPV-16 (*Castellanos et al 2001*). Actualmente varios protocolos de estudios inmunológicos en el cáncer cervical se han enfocado en determinar a los péptidos antigénicos derivados de proteínas de HPV-16 y HPV-18, y que presentan una alta actividad de unión a la molécula HLA-I (Antígenos Leucocitarios Humanos).

Estudios recientes con modelos animales de enfermedades asociadas al virus del papiloma humano proponen el desarrollo de vacunas profilácticas contra el HPV-16. Estos han demostrado efectos protectivos generados por la inmunización con partículas propias del virus (VLPs) compuestas de la proteína principal de la cápside viral, L1. Sin embargo la venta de próximas vacunas hechas con VLPs es muy costosa por lo que no todo el público podrá tener acceso a este tipo de protección contra el cáncer cervical. Es por ello que en este trabajo nos enfocamos al estudio de diferentes péptidos derivados de la proteína L1 de HPV-16 y HPV-18 para determinar si son lo suficientemente antigénicos para generar una respuesta inmune celular contra el virus, pues es necesario desarrollar estrategias que resulten en costos menores, y que además funcione en etapas tempranas de la infección de esta forma, más mujeres, principalmente del tercer mundo, podrían tener acceso a una vacuna profiláctica.

1. SISTEMA INMUNE.

El sistema inmunitario cumple diversas funciones de defensa; evolucionó para proteger a los animales de la invasión de microorganismos patógenos y el cáncer (Golsby *et al*, 2004). Los sistemas inmunitarios más complejos dentro del reino animal se encuentran en los mamíferos pues cuentan con una creciente especialización de los tejidos linfoides y de las funciones linfocitarias, junto con la mayor variedad de clases de inmunoglobulinas. La inmunidad es mediada por una variedad de diferentes células y moléculas que son responsables de la defensa del organismo (Roitt *et al*, 2001).

1.1 Inmunidad Innata.

Los sistemas de defensa con reconocimiento no clonal son llamados inmunidad innata, debido a que todas las células que se diferencian de la célula progenitora tiene la misma capacidad de respuesta, la cual no se adapta o cambia a una particular infección (Austyn *et al* 2004). El sistema inmune innato incluye un grupo de leucocitos llamados fagocitos, el cual comprende el linaje macrófago y los polimorfonucleares o granulocitos (neutrófilos, basófilos y eosinófilos). Asimismo también incluye a otro grupo de células llamadas asesinas naturales que son capaces de destruir a células infectadas con virus o células tumorales (Ratcliffe *et al*, 2002).

El sistema inmune innato por medio de los fagocitos es la primera línea de defensa. Además constituye las barreras mecánicas como la piel y mucosas, enzimas como el ácido láctico y sustancias como el sudor que mantiene la epidermis con un pH ácido que ayuda a evitar la colonización por bacterias tarda solo unas horas para actuar (Figura 1) (Janeway *et al*, 2001).

1.2 Inmunidad Adaptativa.

La inmunidad adaptativa se llama así ya que se adapta y se desarrolla con la infección, se sabe que apareció primero en los vertebrados sin mandíbula y fue incrementando su especialización a la par con la evolución de las especies. Este tipo de inmunidad se caracteriza por (*Stites et al, 2000, Rogers et al, 2000*).

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

B.- Los linfocitos pueden reconocer y discriminar entre lo propio y lo extraño, y responder a una amplia variedad de antígenos, de manera que coexiste pacíficamente con toda la materia que constituye el huésped, pero responden de manera enérgica contra sustancias extrañas. Esta es una remarcada propiedad del sistema inmune llamada tolerancia inmunológica (*Nossal 2000*).

C.- Además los linfocitos expresan en su membrana receptores capaces de distinguir pequeñas diferencias estructurales dando gran especificidad a la acción de los linfocitos, que reconocen porciones específicas de un antígeno la cual es llamada determinante antigénico o epítope.

D.- El número total de especificidades que pueden reconocer los linfocitos de un individuo, es llamado repertorio linfocítico, es extremadamente amplio, se estima que en mamíferos el sistema inmune puede discriminar entre 10^9 y 10^{11} distintos determinantes antigénicos, esta propiedad del repertorio linfocítico se llama diversidad (*Abbas et al, 2000*). Existen dos tipos de inmunidad adaptativa:

La inmunidad humoral y la celular.

1.3 Inmunidad Humoral.

La respuesta inmune humoral se lleva a cabo por medio de la generación de anticuerpos (inmunoglobulinas), las cuales son producidas por las células B y son específicas de la respuesta inmune, se encuentran en los fluidos de los componentes sanguíneos, o plasma, y en fluidos extracelulares. Las inmunoglobulinas son moléculas que presentan forma de “Y”, presentan sitios que son altamente variables de una molécula a otra. Están constituidas por cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas (H) con un peso de 50 a 70 kDa y dos ligeras (L) con un peso de 23 kDa, que en conjunto constituyen un monómero de inmunoglobulina, proporcionando una variedad requerida para el reconocimiento de antígenos específicos (*Barrera et al, 1998*).

Las regiones constantes de la cadena pesada (tronco de la Y), son codificadas por segmentos genéticos contiguos, los cuales definen las clases de los anticuerpos que determinan las propiedades funcionales, la unión de estas cadenas con una cadena ligera (κ o λ) constituye un isotipo; en el humano existen cinco isotipos de anticuerpos (IgM, IgG, IgA, IgE e IgD) los cuales tienen propiedades distintas, con el caso de IgM, IgG3, e IgG1 que activan el complemento, y de IgM e IgG que aglutinan bacterias y precipitan antígenos solubles haciéndolos más accesibles a las células fagocíticas (*Janeway et al, 2001*).

Los anticuerpos detectan, neutralizan y eliminan a los invasores extraños, bacterias o virus por medio de las proteínas del complemento; también recubren a los patógenos (opsonización) de tal forma que pueden ser fagocitados por los macrófagos células presentadoras de antígeno (CPA) y posteriormente procesar y

presentar a los antígenos (*Moreno, 2001*).

1.4 Inmunidad Celular.

Las células T pueden reconocer y responder a un antígeno proteico extraño solamente cuando un fragmento peptídico de la proteína extraña es presentado como un Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) en la superficie de una célula blanco apropiada. Por lo tanto, la inmunidad mediada por células se dirige a las células que llevan a los antígenos extraños en su superficie, y las reacciones inmunitarias mediadas por células para erradicar a los microorganismos o lo virus que viven en el interior de las células, es decir, dentro de las Células Presentadoras de Antígeno (*Abbas et al, 2000*). Las mismas bacterias, patógenos y parásitos, y otros virus, se replican dentro de la célula, por lo tanto estos patógenos no pueden ser detectados por los anticuerpos. La destrucción de estos invasores es función de los linfocitos T, los cuales son los responsables de la respuesta inmune mediada por células (*Janeway et al, 2001*).

Las reacciones mediadas por las células dependen de las interacciones directas entre los linfocitos T y las células presentadoras de antígeno. La acción de los linfocitos T citotóxicos es más directa. Estas células reconocen a las células infectadas con virus, los cuales se replican en el interior de las células para usar la maquinaria de síntesis de la célula. La replicación del virus eventualmente mata a la célula, liberando nuevas partículas de virus, no obstante, son entre tanto, mostrados en la superficie de la célula infectada, y estos son reconocidos por las células T citotóxicas, por lo que este tipo de inmunidad puede tardar días en llevarse a cabo (Figura 1) (*Doyle et al, 2002*).

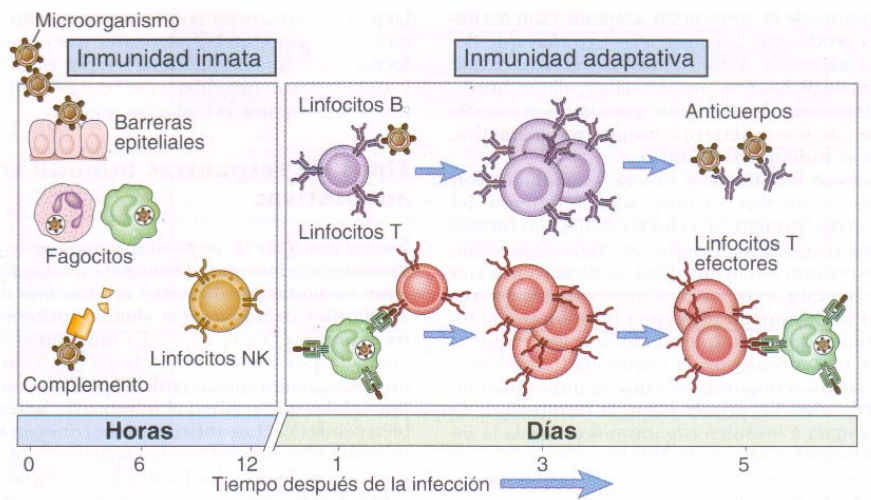


Figura 1. Los mecanismos de la inmunidad innata constituyen la primera barrera defensiva contra la infección. Las respuestas inmunitarias adaptativas se desarrollan después y consisten en la activación de los linfocitos. La cinética de las respuestas inmunitarias innata y adaptativa son aproximaciones y pueden variar en las distintas infecciones (Tomado de Abbas 2000)

1.5 Linfocitos T.

Los linfocitos T se pueden distinguir entre sí por la función que llevan a cabo, y por dos proteínas de superficie conocidas como CD4 y CD8, los linfocitos maduros expresan casi siempre una de las dos proteínas y esta se relaciona con su función celular y con el tipo de proteína MHC que reconocen (Abbas *et al*, 2000). El 70% de las células T son CD4+, el 25% son CD8+ y cerca del 4% son CD4-CD8-, el 1% pueden ser dobles positivos.

Los linfocitos T auxiliares (Th del inglés T helper) o TCD4+, reconocen péptidos presentados por moléculas clase II del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC), este reconocimiento es el estímulo inicial para su activación, además secretan citocinas que promueven proliferación y diferenciación de otras células T y B, siendo el principal de estos factores la interleucina-2 (IL-2) (Canaday *et al*, 2001). Dentro de de las células Th pueden distinguirse 2 grupos:

Th1 secretan IL-2, IL-3, IL-13, IFN- γ y TNF- β y las Th2 que secretan IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-3, GM-CSF, E IL-13 (*Passmore et al, 2002*).

Diferentes estudios han indicado que las células tumorales y células infectadas con virus pueden ser destruidas por los linfocitos T citotóxicos, es decir, que tienen la capacidad de destruir células extrañas (*Canaday et al, 2001; Stites et al, 2000*). Los linfocitos T citotóxicos presentan en su superficie moléculas CD8 y reconocen solo porciones o péptidos antigénicos presentados por moléculas MHC-I. El linfocito T citotóxico activado produce gránulos citolíticos constituidos por enzimas proteolíticas (granzimas, perforinas) para destruir a las células blanco (*Van Leeuwen y Samelson, 1999; Canaday et al, 2001*), por lo que los linfocitos T citotóxicos (Tc) o CD8+ han sido usados por muchos años como las mejores células efectoras contra el crecimiento de tumores y se ha sugerido el uso de epítopes antigénicos a CD8+ en las vacunas tumorales para inducir una respuesta efectiva, específica en la respuesta inmune celular (*Castellanos et al, 2001; Ohlschlager et al, 2003*).

2. COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD.

El complejo principal de histocompatibilidad (MHC del inglés mayor histocompatibility complexe) es una región de genes muy polimórficos los cuales producen proteínas que se expresan en la superficie de las células nucleadas de los animales. En los seres humanos se le llama HLA (Antígenos Leucocitarios Humanos), estas proteínas actúan como marcadores inmunógenos que distinguen a las células de cada persona y constituyen la principal barrera de la histocompatibilidad (*Abbas et al, 2000*). Estas moléculas están asociadas a la membrana celular de células presentadoras de antígeno (*Janeway et al, 2001*).

Los genes de este complejo se localizan en el cromosoma 6. Su ADN comprende unas 3500 Kb y sus genes están agrupados en tres regiones: clase I, clase II y clase III (Figura 2). Los genes MHC de clase I en humanos ocupan una posición más telomérica y son principalmente tres los que juegan un papel importante en los procesos de rechazo: HLA-A, HLA-B, y HLA-C; para Clase II son: DP, DQ y DR (Aultman *et al*, 1999).

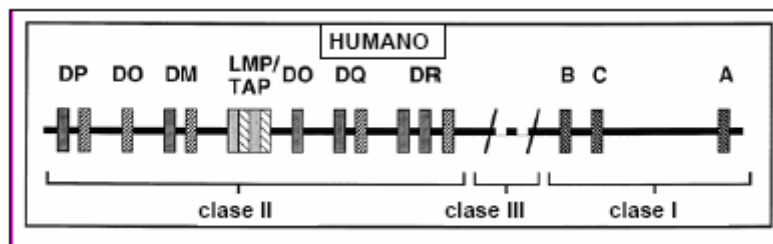


Figura 2. Organización de los genes del MHC en el genoma humano (Tomado y modificado de Márques 2001)

2.1 Estructura del Complejo Principal de Histocompatibilidad.

La molécula clase I está formada por 2 cadenas polipeptídicas separadas, una cadena alfa o pesada, codificada por el MHC en el brazo corto del cromosoma 6 para dar lugar a una proteína de aproximadamente 44 kilodaltones (kD); y una cadena beta 2 microglobulina no codificada por el MHC; con un peso de 12 kD codificada en el cromosoma 15 (Figura 3). La cadena alfa está formada por 3 dominios alfa 1, alfa 2, y alfa 3 (Stites *et al*, 2000) que forman juntos un polipéptido central de aproximadamente 44 kD y un oligosacárido; unida a la parte extracelular de la cadena alfa por enlaces no covalentes se encuentra la cadena beta 2 microglobulina; presentan antígenos a linfocitos T CD8+ (Stites *et al*, 2000).

Una molécula clase II está formada por las cadenas polipeptídicas llamadas alfa y beta, que son de tamaño similar y están anclados en la membrana de superficie en su terminales carboxilo. Las regiones extracelulares de las cadenas

alfa y beta de clase II se pliegan individualmente para formar un par de dominios globulares, designados alfa 1 y alfa 2 o beta 1 y beta 2 respectivamente. Las proteínas MHC-II se expresan únicamente por macrófagos, linfocitos B y Th, y son necesarias para la presentación de antígenos a CD4 (*Abbas et al, 2000*).

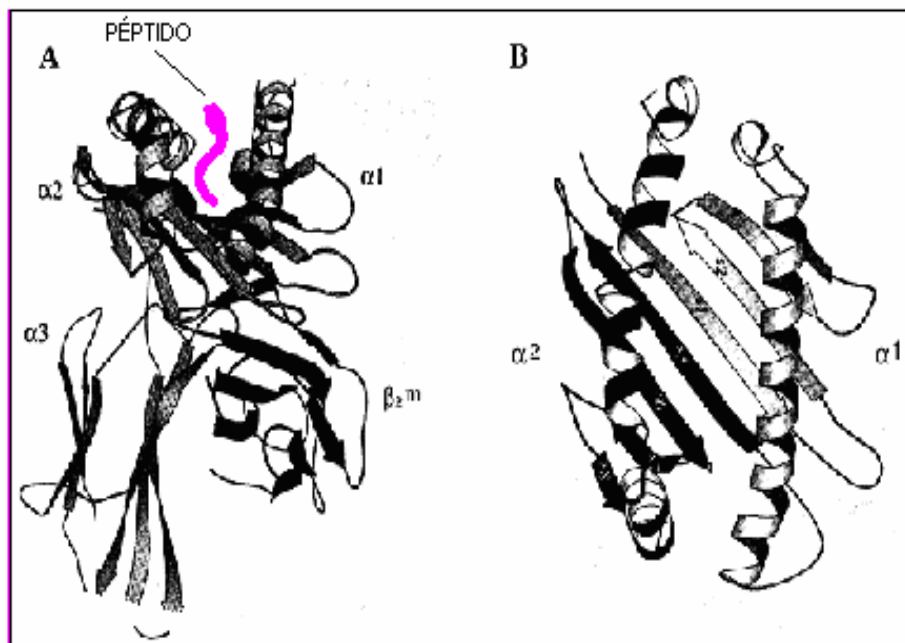


Figura 3 Diagrama que muestra la estructura tridimensional de la molécula MHC-I (A) muestra el heterotrímero MHC-I con péptido, los dominios de la cadena pesada $\alpha 1$ y $\alpha 2$ forman un surco para la unión del péptido (B) Vista superior del péptido unido al surco formado por ocho pliegues laminados antiparalelos (*Tomado de Jardetzky, 2002*).

2.2 PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS.

En general, la molécula MHC-I presenta antígenos derivados de péptidos endógenos. Estos péptidos originalmente son de proteínas del citosol y son generados por un complejo multicatalítico llamado proteasoma (Figura 4) (*Lowe et al, 2005; Groll et al, 2000*). Estos péptidos son translocados en lumen del retículo endoplásmico asociados con TAP (Proteínas asociadas al transporte) y presentada en la superficie celular.

2.2.1 Generación de Péptidos por el Proteasoma.

Los antígenos nucleares necesitan primero ser degradados a pequeños péptidos antes de ser transportados por TAP a la molécula MHC-I. Las proteínas contienen secuencias de destrucción que consiste en estiramientos particulares de aminoácidos conservados; en estos sitios son agregadas ubiquitinas para formar una línea de poliubiquitina que es reconocida por la cápsula del proteasoma (19S). Esta cápsula también realiza el desdoblamiento que preceda a la degradación (Kloetzel, 2001). Posteriormente al pasar a la 20S ocurre la degradación dando lugar a péptidos de un promedio de ocho aminoácidos, la presencia de 11S aumenta la hidrólisis de 20S con lo cual se refuerza la producción de péptidos (Orlowski et al., 2003; Cardozo et al., 2004). El proteasoma (Figura 4) es el principal sistema proteolítico de células eucariotas para la generación de péptidos antigénicos (Seemuller et al., 2005).

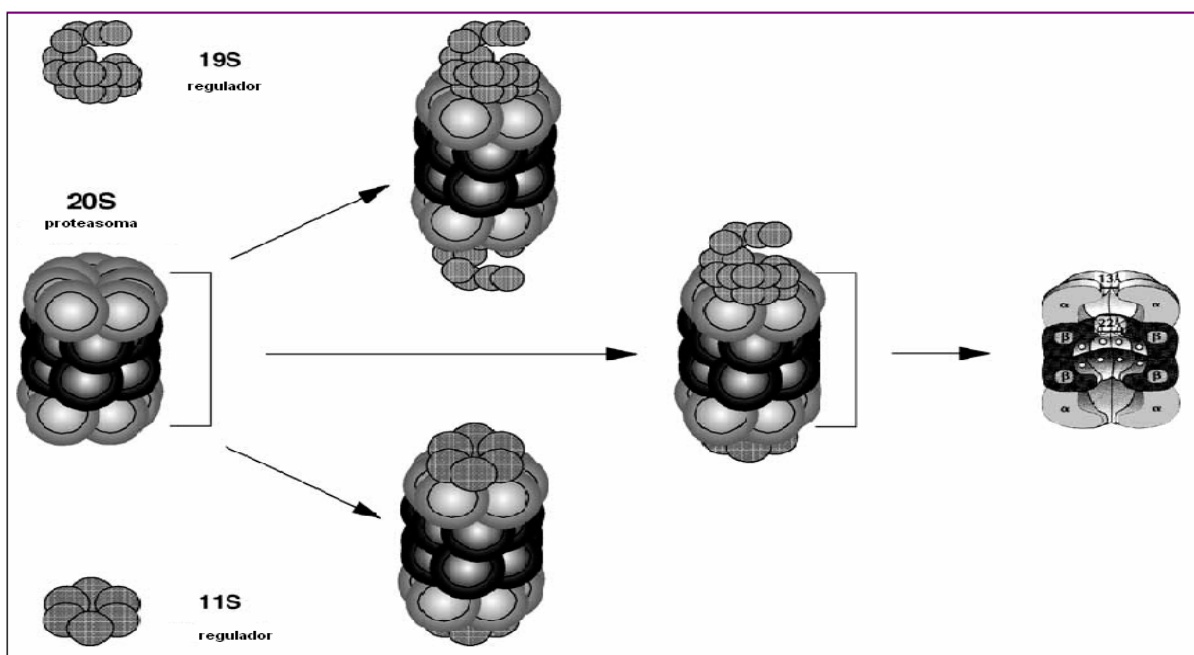


Figura 4 Proteasoma de células eucariotas, se muestran las diferentes subunidades 19S, el corazón 20S y el regulador 11S (Tomado de Rubin and Finley, 2002).

2.2.2 Translocación de Péptidos por TAP.

Los péptidos producidos en el citosol por el proteasoma (*Wenzel and Baumeister, 1995*) tienen que ser translocados al retículo endoplásmico mediante el heterodímero proteico llamado TAP1 y TAP2 (Figura 5) que son proteínas de 76 y 70 kD respectivamente cuyos genes se localizan en el MHC, dentro de la región de las moléculas clase II (*Monaco et al, 1998; Deverson, 1998*). La asociación de los péptidos con los TAP ocurre espontáneamente una vez que ellos son liberados del proteasoma; sin embargo el traslado requiere el aporte energético de ATP (*Carrington et al, 1998*). Se requiere la participación de ambas unidades puesto que la presentación de solo uno; no registra asociación en el bombeo de péptidos (*Nijenhuis et al, 2002; Androlewicz et al, 2002*).

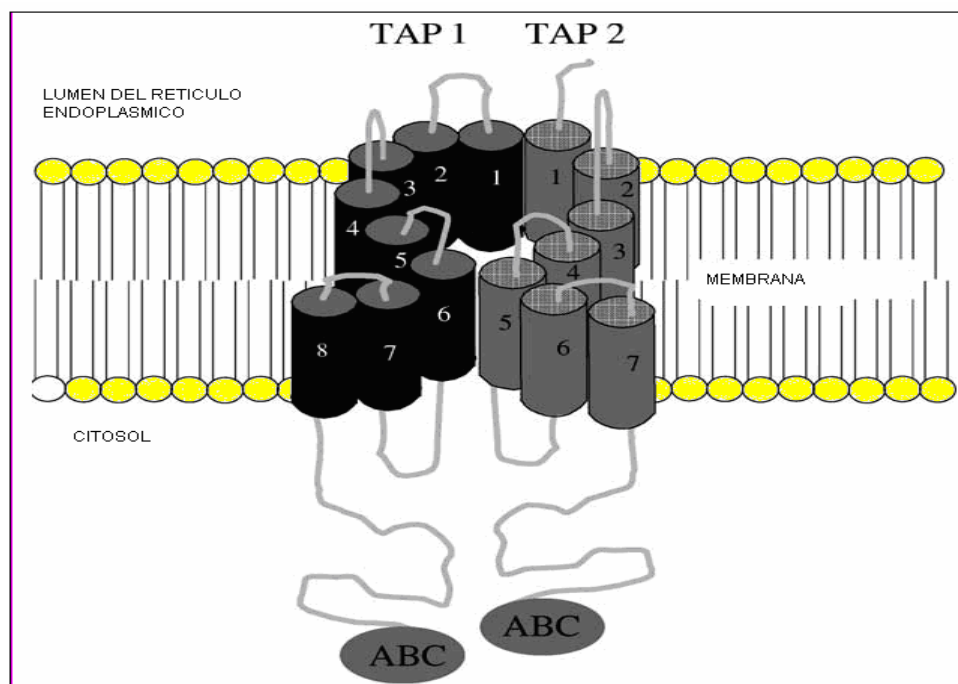


Figura 5 Modelo del heterodímero TAP 1 y TAP 2 (Tomado de Vos et al 2002, 2000, M)

2.2.3 Ensamble de la Molécula MHC.

Se ha propuesto que varias moléculas participan en la conformación del complejo MHC/péptido (Figura 6). Una de ellas, ampliamente estudiada es llamada calnexina (*Galvin et al, 2002; Ahluwalia et al, 2002*). La calnexina es una molécula de 88 kD en los humanos (p88). Se asocia a la molécula MHC-I cuando son recién sintetizadas, en ausencia de beta-2microglobulina en humanos, posteriormente es la β -2-microglobulina la que disocia a la calnexina de la molécula MHC-I. Por otra parte la Calreticulina que es una molécula de 46 kD con cierto grado de homología con la calnexina y con actividad semejante (*Sonnichsen et al, 1994*). Muestra alta afinidad por iones calcio, comunes en el retículo endoplásmico se asocia a la cadena pesada de la molécula MHC-I cuando esta se encuentre unida a β -2-microglobulina (*Sadasivan et al, 2002*). Por último tenemos a la tapasina que tiene un peso de 48kD se trata de una proteína transmembranral de 428 aminoácidos que en su segmento hidrófobo incluye un residuo de lisina que le permite una interacción con otras proteínas, como es el caso de TAP1. La función más probable para la tapasina es la de facilitar el cargado de las moléculas MHC-I una vez que los péptidos son transportados al interior del retículo endoplásmico por los TAP aumentando la probabilidad de su encuentro. (*Ortmann et al 2002*).

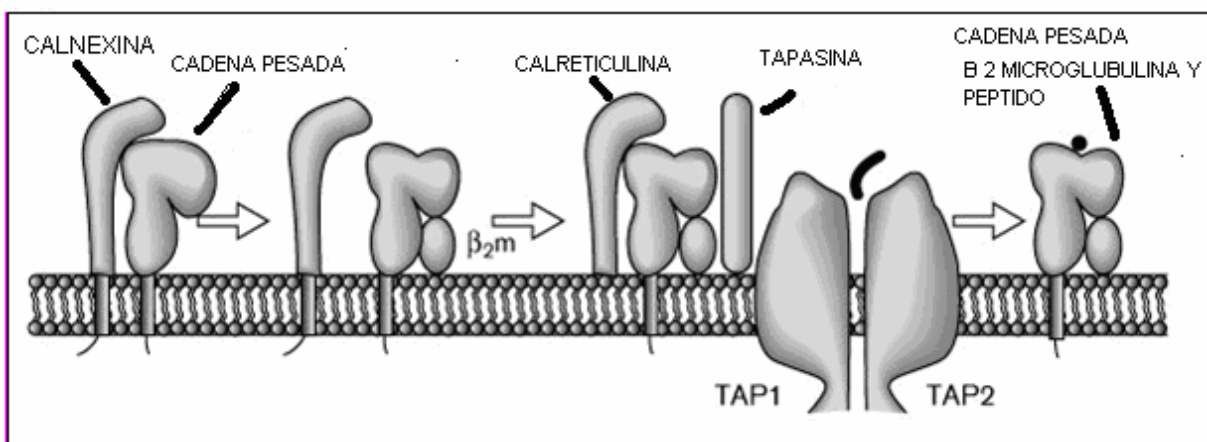


Figura 6 Ensamble de la molécula MHC (Tomado de Márquez 2001)

2.2.4 Presentación de Péptidos Antigénicos.

Solo una pequeña parte de los péptidos generados por el proteasoma son bombeados hacia el interior del retículo endoplásmico por los TAP's y solo algunos de ellos son ensamblados con la molécula MHC-I. Después del ensamble de MHC-I, β -2-microglobulina y péptido; el trímero es transitado a través del aparato de golgi, para finalmente salir a la superficie celular (*Ritz et al, 2001; Gromme y Neefjes, 2002*). Los fragmentos antigénicos son expuestos a los linfocitos T CD8+ (Figura 7). Los complejos MHC-I sin péptido son inestables, lo que permite asegurar que solo los complejos útiles a nivel funcional interactúen con los TCR de los linfocitos T CD8 (*Roitt et al, 2001*).

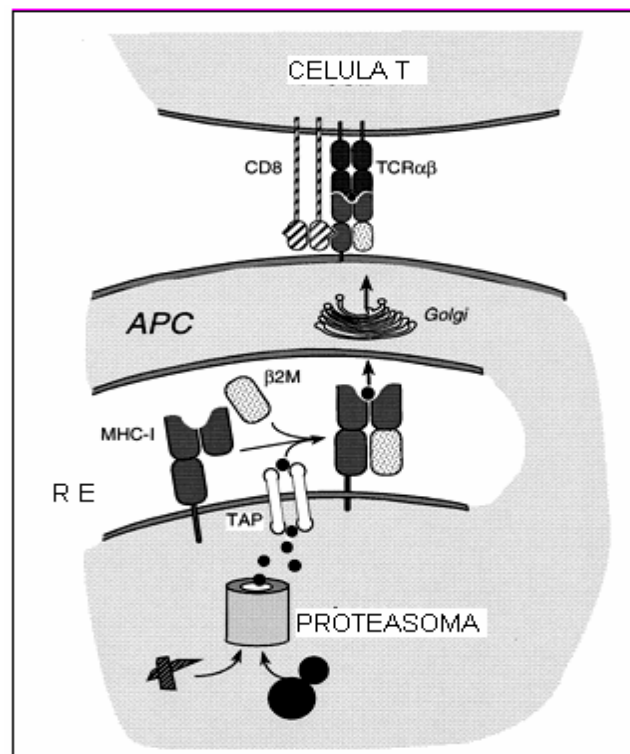


Figura 7 Presentación antigénica por MHC-I El ensamblaje del péptido cargado en las moléculas de clase I es reconocido por el receptor TCR α/β de los linfocitos T CD8+. Los péptidos son derivados de las proteínas citosólicas degradadas por el proteosoma y transportados dentro del retículo endoplasmático por el transportador TAP (*Tomado de Márquez 2001*).

2.2.5 Vías no Clásicas de la Presentación Antigénica.

Como se ha explicado las moléculas MHC-I son cargadas con péptidos endógenos; sin embargo existe un modelo llamado “fagosoma a citosol” que describe como antígenos exógenos pueden ser presentados por MHC-I. El modelo dice que antígenos exógenos pueden ser internados por fagocitosis o endocitosis y pueden ser degradados por el fagolisosoma o el proteasoma; de esta forma los péptidos generados son cargados en MHC-I y transportados a la superficie celular (Figura 8), esta vía es dependiente de TAP (*Castellino et al, 2000*).

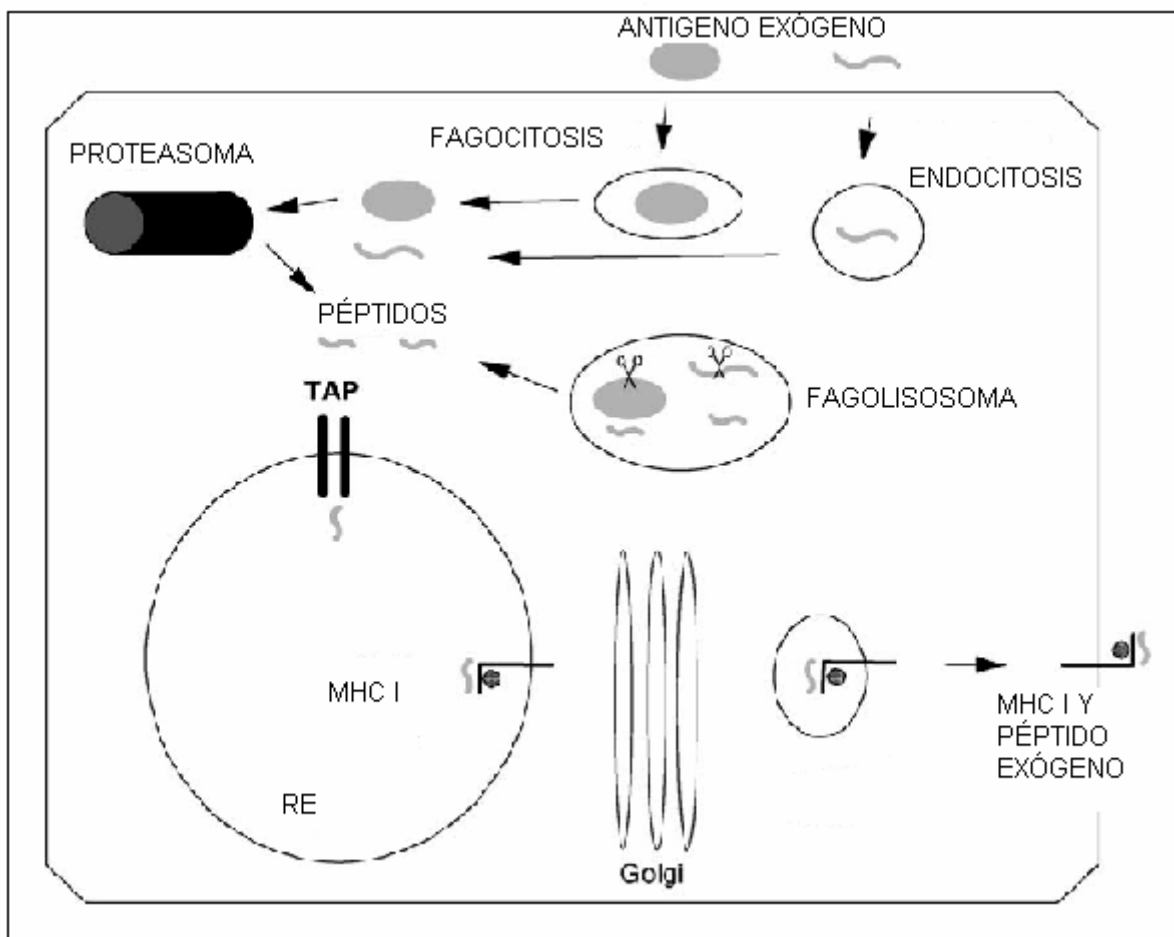


Figura 8 Modelo Fagosoma-Citosol, vía no clásica de MHC-I para la presentación de péptidos exógenos, dependientes de TAP (*Tomado de Grommé and Neeffes, 2002*).

Un segundo modelo llamado Post-Golgi (Figura 9) dice: Antígenos exógenos son internados y degradados por compartimientos endocíticos especializados MIIC. Los péptidos de estos compartimientos pueden regurgitarse al espacio extracelular y pueden ser unidos o reemplazar péptidos de MHC-I de la superficie celular. En adición MHC-I puede perder estabilidad y llegar hasta MIIC por internalización donde sería cargada nuevamente con un péptido y podría ser transportada nuevamente a la superficie celular (Jin *et al.*, 2002; Kovacsovics-Bankowski and Rock, 2002; Liu *et al.*, 2002; Brossart and Bevan, 1997), este modelo es independiente de TAP.

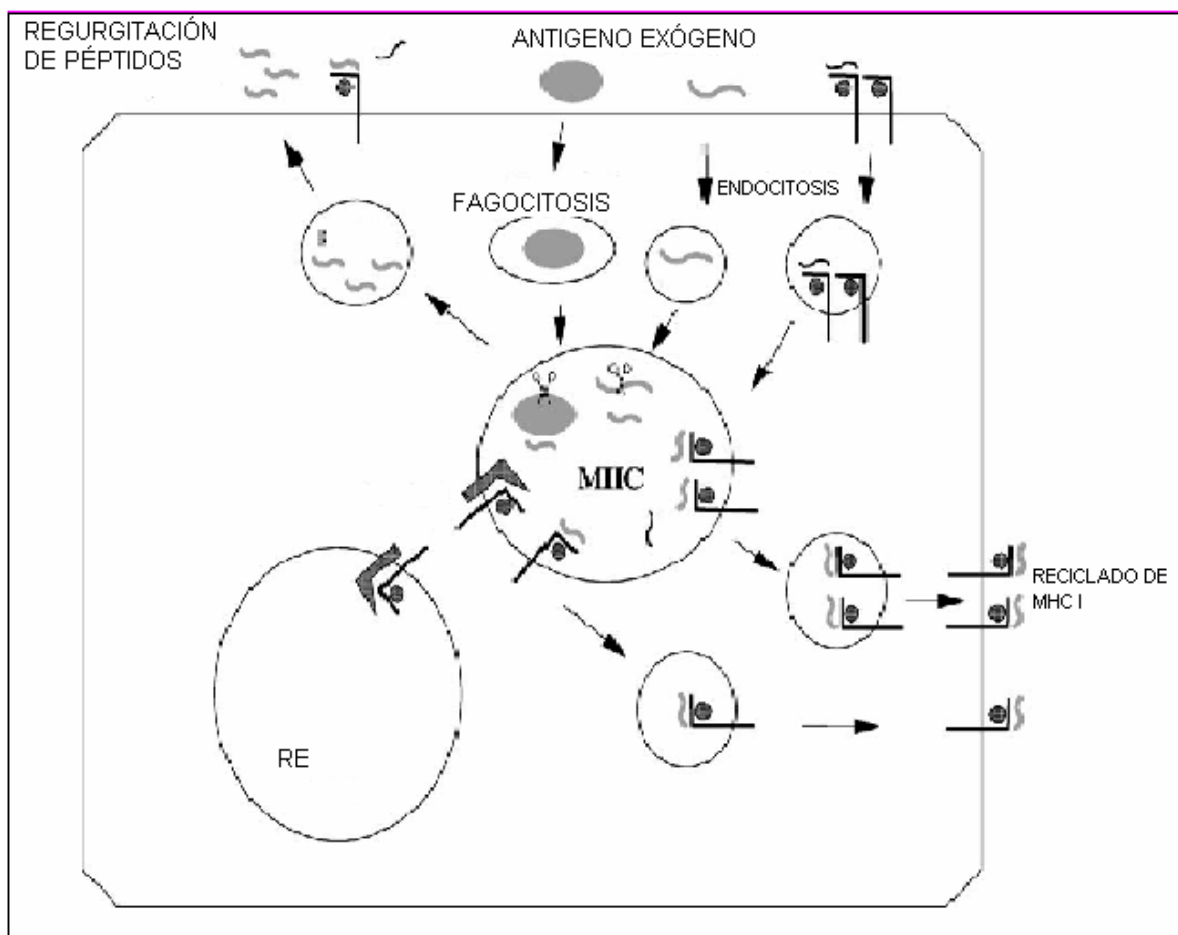


Figura 9 Modelo Post-Golgi para el cargado de péptidos exógenos a la molécula MHC-I, independiente de TAP (Tomado de Grommé and Neeffjes, 2002).

3. BIOLOGÍA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS.

Las células dendríticas son las más eficientes células presentadoras de antígenos, con una potente capacidad de estimular linfocitos T vírgenes. Esta función es posible gracias a su potencial para capturar antígenos en los tejidos periféricos en su estado de inmadurez, procesarlos mientras viajan al órgano linfoide secundario, en donde se completa su maduración, y presentarlos en el contexto de moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (*Revy et al, 2001*).

En este proceso de activación de linfocitos T, las células dendríticas expresan moléculas de superficie (CD80, CD83, CD86, MHC-I y MHC-II) y liberan otras moléculas que polarizan la respuesta de los linfocitos activados, como para secretar citocinas de tipo Th1, como en el caso de las células que secretan IFN- γ y TNF- β , o citocinas de tipo Th2 como IL-4, IL-5, IL-9 o IL-13 (*Jankovic, 2001; Lanzavechia, 2001; Romagnani, 2000*).

El ejemplo claro de una citocina secretada por la célula dendrítica y que participa en la regulación de la respuesta linfoide, es la IL-12. Cuando la célula dendrítica secreta IL-12, los linfocitos se convierten en las células Th1. En contraste, si la producción de IL-12 por células dendríticas es baja o negativa, la respuesta linfoide puede ser sesgada hacia Th2 (*Langenkamp, 2000; Lanzavechia, 2001*).

La capacidad de las células dendríticas para regular la respuesta inmune celular ha despertado gran interés, debido a que pueden participar en los mecanismos inmunopatológicos de diferentes enfermedades y se utilizan como herramientas para el desarrollo de protocolos para la investigación de procesos infecciosos, alérgicos, y cáncer (*Kugler, 2000*).

Por otra parte se ha evidenciado una baja de la expresión de moléculas MHC-I en tumores debidas a la pérdida de la expresión de TAP-1 y esto a su vez con el grado de malignidad, lo que sugiere que la inhibición de TAP es una estrategia potencial de las células malignas para evadir la respuesta inmune (*Harald, 2000*).

3.1 CÁNCER.

El cáncer es un fenómeno que se produce cuando células normales a consecuencia de la alteración de su ciclo celular e inhibición de la apoptosis, producidos por mutaciones o infecciones virales, proliferan sin control. Estas células pueden dividirse hasta formar tumores que posteriormente pueden llegar a invadir tejidos vecinos, mediante un mecanismo llamado metástasis (*Scaffidi, 1999*).

Estas células cancerosas se comportan como parásitos, extrayendo del organismo todo lo indispensable para sobrevivir. En los últimos años, el cáncer es una de las causas más importantes de mortalidad en el mundo junto con enfermedades cardiovasculares. En México en Cáncer Cervical junto con el cáncer de mama son la primera causa de muerte en mujeres, pues afecta a mujeres de entre 35-44 años. Dentro del total de muertes el Cáncer Cervico Uterino es responsable del 8.5% de defunciones en el país (Secretaría de salud 2007).

Por otra parte en ninguna variedad de cáncer se comprueban mejor los notables efectos de la prevención, del diagnóstico precoz y del tratamiento radical sobre la tasa de mortalidad como en Cáncer de Cervix. (*Roitt et al, 2001*).

3.1.1 Virus de Papiloma Humano y Cáncer Cervico Uterino.

Desde el punto de visto etiológico se ha establecido que el carcinoma cervical es una enfermedad de transmisión sexual, causada por la infección con el Virus de Papiloma Humano asociado en un 99% (*Scaffidi, 1999*). El HPV tipo 16 es el más frecuente pues se encuentra en el 50% de los tumores, siguiéndole el tipo 18 en un 14%. Sin embargo la infección por HPV no necesariamente causará cáncer ya que se necesitan otros factores como: la edad de inicio de la actividad sexual y el número de compañeros sexuales durante la vida, son los factores de riesgo más importantes para este padecimiento (*Muñoz, 2000; Walboomers et al, 1999*). Recientemente se han descrito otros factores como son la inmunosupresión, influencias hormonales (esteroides) que favorecen la integración del Virus del papiloma humano (*Hubert et al, 2001*).

El cáncer cérvico uterino es un importante problema de salud pública pues en el mundo es la segunda causa de mortalidad, y tiene la mayor tasa de incidencia en los países en vías de desarrollo (*Parkin et al, 2004*).

3.1.2 Virus de Papiloma Humano.

Los virus de papiloma humano (HPV) son pequeños virus oncogénicos que pertenecen a la familia *Papillomaviridae*, de la familia *Papovaviridae*. Los Papilomavirus tienen un diámetro de 55 nm y están compuestos de 72 capsómeros, los cuales están formados por la proteína L1 y la proteína L2 (Figura 10); el virus presenta una estructura icosaédrica no envuelta, y contiene moléculas de doble cadena de DNA circular de aproximadamente 7200 a 8000 pares de bases que se encuentra en el interior de la cápside, asociadas a proteínas tipo histona. El genoma contiene ocho marcos de lectura abierta (ORF).

es decir, una serie de bases nitrogenadas que se pueden leer en diferente secuencia, lo que conduce a la traducción de diferentes proteínas (Figura 10). Se sabe que durante la transcripción sólo una de las hebras del DNA se encuentra en forma activa en este proceso (*Margaret et al, 1998; Stubenrauch y Laiminis 1999; Panduro, 2000*).

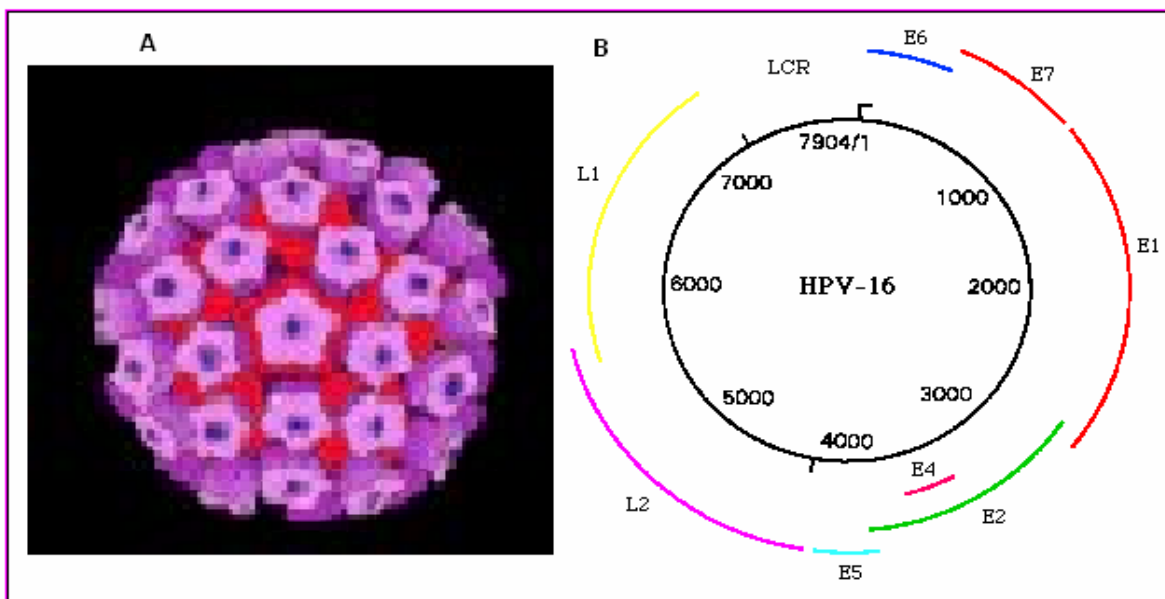


Figura 10 Diagrama de Virus de Papiloma Humano (A) Estructura icosaohédrica (B) Genoma viral donde se muestran las diferentes proteínas que sintetiza (Tomado de Health on the Net Foundation).

El DNA de Papiloma Virus codifica para dos grupos de genes: los de transcripción tardía (L del Inglés Late) ó temprana (E del Inglés Early). Los genes E son expresados durante todo el ciclo viral, mientras que los genes L son expresados solo durante la fase productiva. Se pueden clasificar estos genes funcionalmente en tres grupos: 1) los que codifican a las proteínas reguladoras E1 y E2 que controlan la replicación del DNA y la expresión de los genes virales; 2) los que codifican para las proteínas E6, E7 y E5 que controlan el

crecimiento celular y 3) los componentes virales estructurales L1 y L2 (*Laiminis, 1998*). Existe además una región que precede a los genes tempranos llamada región larga de control (RLC o LCR) y contiene secuencias promotoras y aumentadoras de la transcripción, así como secuencias que controlan el inicio de la replicación. (*Zur Hausen, 1999, 2000; Kammer et al, 2000*).

3.1.3 Tipos y Clasificación de HPV's.

Hasta el momento han sido descritos más de 100 tipos virales, 40 de los cuales se encuentran asociados a infecciones del tracto anogenital (*De Villers et al, 1994; Myers, 1996*). Existen variaciones entre los genomas de un mismo tipo de HPV. Un tipo viral de HPV se define como aquel cuyo DNA tiene menos del 90% de homología en la secuencia con cualquier otro tipo de HPV (*Van Ranst et al, 1993; Zur Hausen et al, 2000*), cuando los virus varían uno de otro de 2 al 10% en su genoma, son clasificados como subtipos, cuando las diferencias son menores al 2%, en la región codificable y 5% en la región no codificable del genoma viral con respecto al prototipo aislado se clasifican como variantes intratípicas (*Bernard et al, 1994*). Estas variaciones confieren a los diferentes tipos, subtipos y variantes de HPV diferente capacidad antigénica y diferente potencial oncogénico (*Brady et al, 1999; Hildesheim and Wang, 2002*). Se ha descrito que la recombinación entre variantes es muy rara o no existe (*Ho et al, 2002; Yamada et al, 2005, 1997; Villa et al, 2000*).

Los tipos virales del HPV se clasifican en grupos de bajo, intermedio y alto riesgo, de acuerdo a la frecuencia con que se encuentran asociados a lesiones premalignas o con el cáncer invasor. Los tipos virales de HPV-16 y HPV-18, son considerados tipos de <<alto riesgo>> ya que son comúnmente detectados en lesiones displásicas severas y en el cáncer invasor (*Picconi et al 2000*).

Los tipos virales como el HPV-6 y HPV-11 entre otros son denominados de <<bajo riesgo>> por hallarse principalmente asociados a condilomas (verrugas genitales) y displasias leves (Cuadro 1) (*Zur Hausen, 2000; Toshiniko et al, 2001*).

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

Cuadro 1 Se muestra algunos tipos de HPV y su clasificación de acuerdo al riesgo oncogénico que representan (*Picconi et al, 2000; Zur Hausen, 2000*).

También se pueden clasificar de acuerdo al tipo de lesión que provoca así como el lugar donde los diferentes tipos son capaces de infectar: Piel lo que puede provocar tumores de cabeza y cuello y el área anogenital (Cuadro 2); ya que no todos los tipos virales de HPV infectan el cervix (*Howley et al 1991; Breitburd et al, 2003*).

En la mayoría de estas lesiones se ha confirmado la etiología viral mediante estudios citológicos e histológicos (*Seedorf et al, 1999; Kurmman et al, 1998; Storey et al, 1990*). Los HPV's tipo 5 y 8 están comúnmente asociados con epidermodisplasias que pueden progresar a cáncer de piel (Cuadro 2) (*Howley, 2001*).

TIPO DE LESION	TIPO DE HPV
PIEL	
Verrugas	1-4,10,26-29,38,41,48,49,57
Quiste epidermoide	60
Verruga de carnicero	2-7
Epidermodisplasia	2,3,5,8,9,10,12,14,15,17,19-34,35
Cambios bowenoides	16, 43, 35
Carcinoma de células epidermoides	5,8,14,17,20,41,47
GENITAL	
Condiloma acuminado	6,11,42-44,51,55,58,67,74
Neoplasia intraepitelial bajo grado	6,11,16,18,30,31,33-35,39,40
Neoplasia intraepitelial alto grado	51,52,56-59,68
Carcinoma cérvico uterino	16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,5
TUMORES DE CABEZA Y CUELLO	
Papilomatosis	2,6,7,11,32,57
Hiperplasia epitelial focal	13,32
Carcinoma de amígdala	16,33

Cuadro 2 Tipos de lesiones causadas por los distintos tipos virales

Además en los últimos años han encontrado que el HPV-16 tiene 5 grandes ramas dos presentes en África, una en Asia, una en Europa y una en Asia y América, las cuales se distribuyen en los cinco continentes de diferente forma (Cuadro 3) una pequeñísima variante se ha reportado en Norte Americana (NA1) centro y Sudamérica (Ho et al, 2002; Yamada et al, 2005). La distribución de las variantes de HPV-16 en el continente americano revela la colonización del nuevo mundo por europeos y africanos (Ho et al, 2002).

Se ha realizado esta variación geográfica con la prevalencia de HPV genital (*Eschele et al, 1992; Lorinz et al, 1992; Nindl et al, 1999; Ferrera et al, Herrero et al, 2000; Jacobs et al, 2000*).

VARIANTE DE HPV-16	DISTRIBUCIÓN MUNDIAL
Asiático-Americana (AA)	Centro, Sudamérica y España
Africana (Af1 y Af2)	África
Asiática (As)	Sudeste de Asia
Europea (E9)	En todas las regiones excepto África

Cuadro 3 Distribución mundial de las variantes de HPV-16 (*Yamada et al, 1997*).

En México se han realizado pocos estudios entorno a las variantes de HPV, por lo que es muy poca la información que existe al respecto. En pacientes mexicanas con infección de HPV-16, las variantes predominantes son las Asiático Americanas y las variantes Europeas (Cuadro 4), y un pequeño porcentaje de una variante Africana (*Berumen et al, 2001*).

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

Cuadro 4 Variantes de HPV-16 descritas en México, y la proporción en que se encuentran (*Berumen et al, 2001*).

3.2 INFECCION POR HPV.

3.2.1 Anatomía del Útero.

Es un órgano muscular de forma piriforme que mide 8 cm de largo, 5 cm de ancho y 3 cm en sentido anteroposterior (Figura 11).

Las capas de afuera hacia adentro son:

1. La serosa o peritoneo visceral, cubre solamente el cuerpo
2. La muscular o miometrio, es la capa más consistente, formado por fibras musculares lisas que son reemplazadas en el cuello por fibras colágenas.
3. La mucosa que tiene dos componentes:
 - * Endometrio que reviste el cuerpo
 - * Epitelio Endocervical que se localiza en el cuello uterino.

Estos dos componentes de la mucosa determinan la división funcional del útero en dos partes:

1. Cuerpo: es la parte más globulosa del útero, está delimitado lateralmente por las trompas y los ligamentos anchos. Contiene la cavidad uterina cuya importancia radica en los eventos del ciclo concepcional que aquí ocurren.
2. Cuello: es lo queda entre el cuerpo uterino y la vagina, es donde toma contacto con el útero el elemento de soporte más importante: la fascia pélvica. Funcionalmente su importancia está determinada por su ciclo que es fundamental para la fertilidad humana (*Harold 2000; Ortis 2000; Stanley et al 2000*).

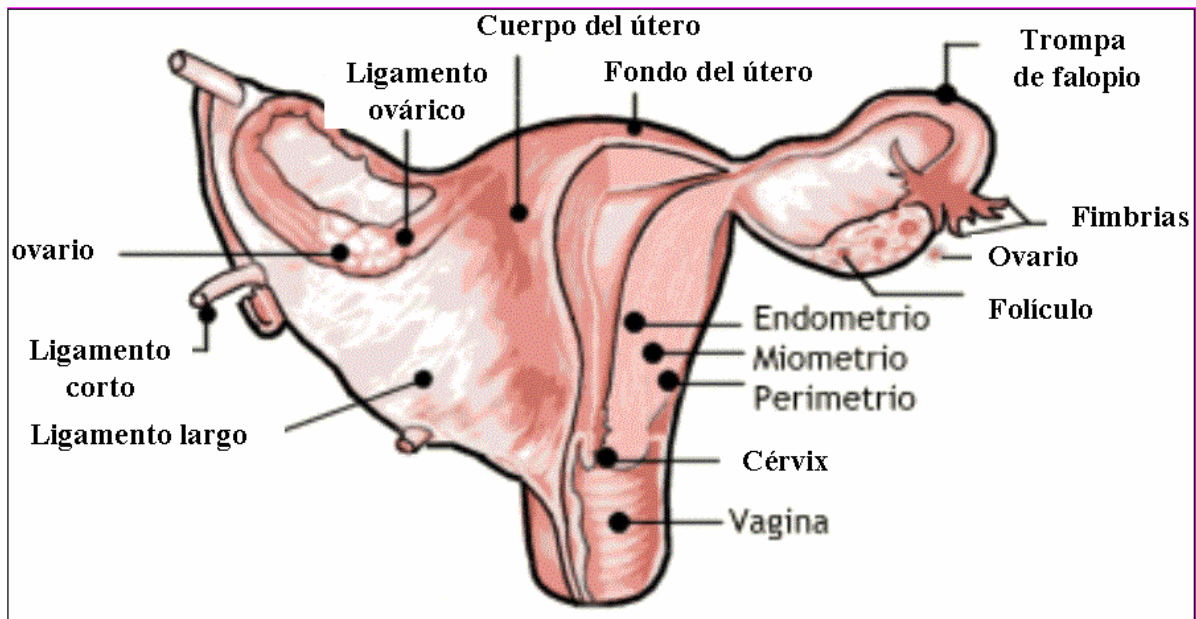


Figura 11 Anatomía del útero (Instituto Nacional del Cáncer, 2007).

3.2.2 Histología del Cérvix.

El canal está revestido por epitelio cilíndrico alto cuyos núcleos se localizan cerca de la base de células, mientras que la mayor parte del citoplasma está lleno de moco. La mucosa contiene muchas glándulas grandes, que difieren del cuerpo y del istmo por el hecho de que están notablemente ramificadas y revestidas por células cilíndricas altas, secretoras de moco, semejantes a las del epitelio superficial. Hay de vez en cuando células ciliadas (*Zur Hausen, 1999*).

La superficie externa de la porción vaginal del cuello es lisa y está recubierto por epitelio desde plano simple hasta estratificado, dividido en cuatro estratos, que desde su porción más interna hasta la más externa que se encuentra totalmente diferenciada son: la basal, la espinosa o suprabasal, granuloso y escamosa o córnea (Figura 12). Las células de este epitelio son ricas en glucógeno. La transición entre el epitelio cilíndrico muco secretor del canal cervical y el epitelio plano estratificado de la porción vaginal es brusca. Por regla general, la frontera está justamente dentro del orificio externo del cuello (*Harold H, 2000*).

En algunas mujeres, sin embargo, particularmente después de haber tenido niños, hay placas de epitelio cilíndrico del endocervix que se extiende por la porción vaginal hasta distancias variables. Se les llama de modo inapropiado “erosiones cervicales”. Son particularmente susceptibles a las reacciones inflamatorias y son causa frecuente de flujo vaginal o leucorrea. Si no se las trata, las erosiones cervicales y la inflamación crónica pueden predisponer al cáncer cervico uterino (*Ronald et al 1999*)

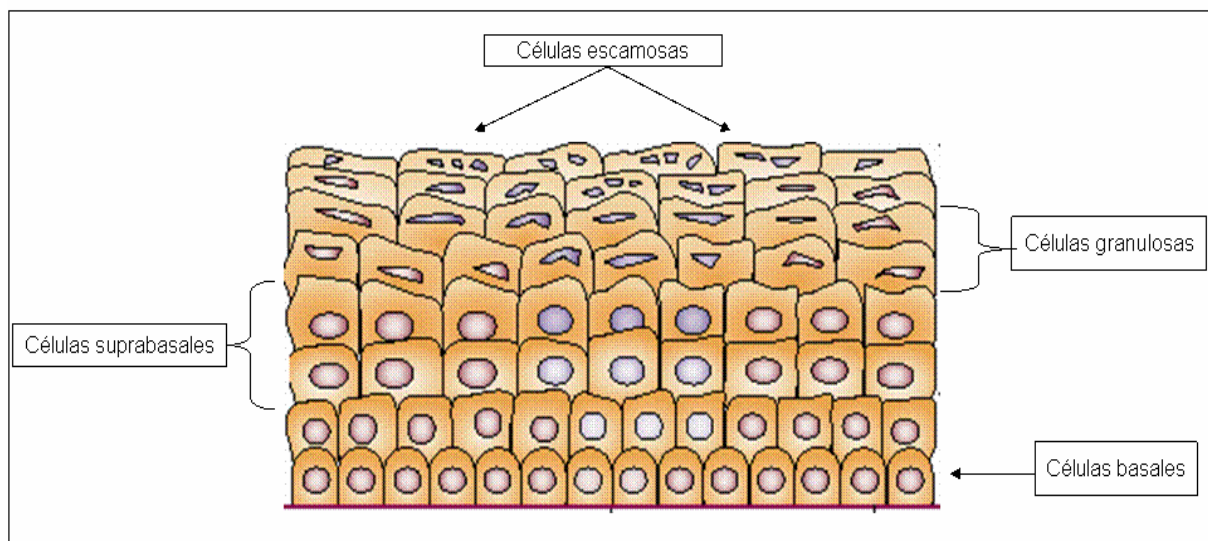


Fig. 12 Histología del epitelio del cérvix, células basales, suprabasales, granulosa y escamosas o córneas. (Imagen de Harald Zur Hausen, 2002).

La zona límite entre ambos epitelios, denominada unión escamocilíndrica o escamocolumnar, reviste especial interés por ser el asiento más frecuente de sus lesiones neoplásicas. Es preciso distinguir entre límite epitelial y límite mucoso, los cuales, si bien en teoría deberían coincidir, en la práctica casi nunca lo hacen. Puede aparecer un límite lineal en las niñas y las mujeres vírgenes, como una simple línea que separa el epitelio estratificado del cilíndrico, o un límite transicional entre los dos epitelios maduros con una

zona de transición ocupada por epitelio metaplásico inmaduro en el 73 por ciento de las adultas no vírgenes y nuligestas (88 por ciento de las mujeres con hijos y 83 por ciento de las menopáusicas). La zona de transición constituye la avanzadilla, siempre móvil, de una reepitelización. Esta zona de transformación es el lugar donde suelen aparecer las lesiones preneoplásicas. Cerca del 90 por ciento de los carcinomas de cérvix uterino se originan sobre la zona de transición del epitelio cervical pavimentoso, en el epitelio columnar endocervical (*Fawett 1999*).

3.2.3 Ciclo Viral.

El ciclo de vida de todos los virus del papiloma humano se inicia en la diferenciación celular. La infección inicial por el HPV ocurre dentro de las células germinales epiteliales o en células de desarrollo transitorio localizadas en las capas bajas del epitelio estratificado. Estas células producen células hijas las cuales al terminar su ciclo celular, migran lejos de la capa basal. Después de la entrada del virus a la célula, el genoma del HPV se establece en los elementos extracromosomales del núcleo y numerosas copias son incrementadas (aproximadamente de 50 a 100 copias por célula). La célula infectada se divide, el DNA viral es distribuido entre ambas células hijas. Una de las células hijas migra lejos de la capa basal y provee un repertorio de DNA viral a otra célula que posteriormente se dividirá (*Mao. 2006*). Dado que la producción de virus de papiloma humano es limitado en las células suprabasales, es la razón por lo cual continúan proliferando (Figura 13). Esta dependencia en la proliferación permite a la célula infectada persistir en las capas basales por períodos muy prolongados, hasta años (*Stubenrauch y Laiminis, 1999*).

En un epitelio normal, las células de desarrollo transitorio se dividen, dando origen a células hijas que salen del ciclo celular y estas comienzan a diferenciarse. Entonces los HPV's cuentan con enzimas celulares que replican estos genomas, la principal consecuencia de la infección del HPV es bloquear la salida del ciclo celular. Las células infectadas con HPV experimentan una última fase S en la diferenciación suprabasal. Las células replican el genoma del HPV en grandes cantidades antes de empaquetarse nuevamente en la cápside. En los tipos de HPV de alto riesgo, el bloqueo en la salida del ciclo celular y la inducción de la fase S en la célula suprabasal son mediadas por las proteínas E6 y E7 (*Fawett 1999*).

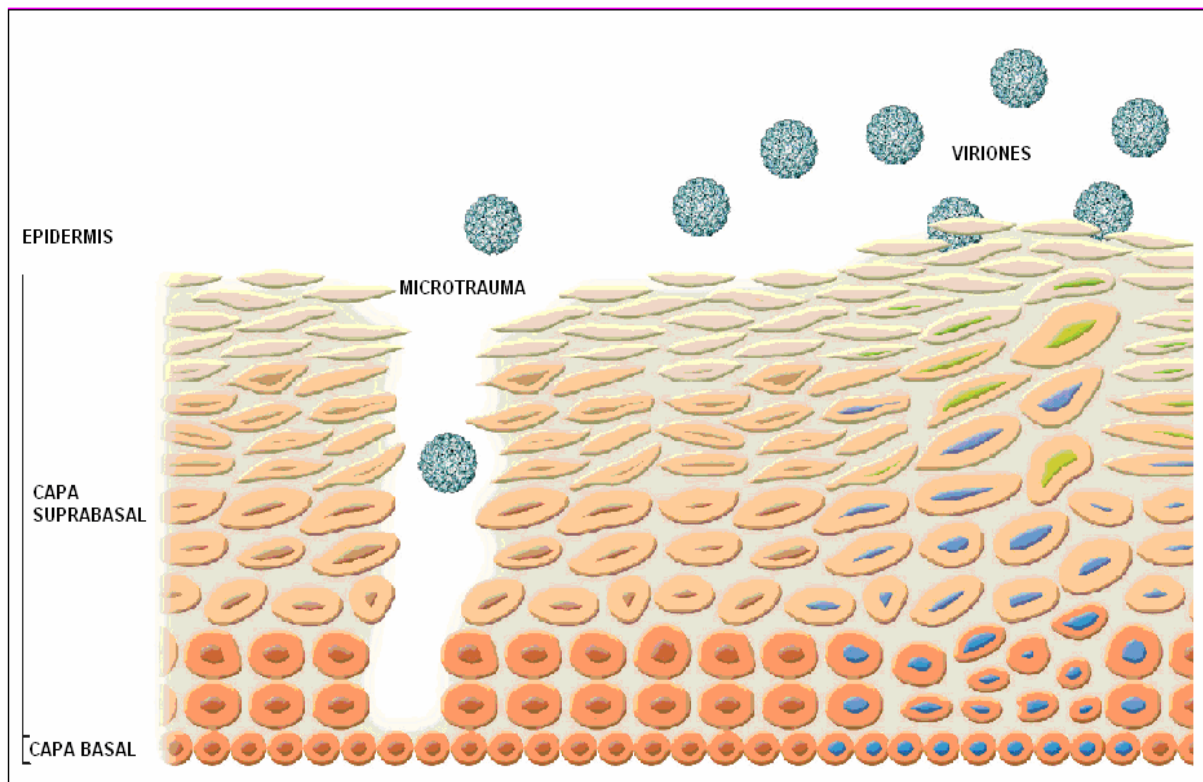


Fig. 13 Ciclo de vida de papilomavirus, se muestra como el virus es capaz de infectar la capa basal entrando mediante un microtrauma, su genoma se mantiene en las células basales por lo que las proteínas oncogénicas son pobremente expresadas; la replicación viral se lleva a cabo en la capa suprabasal en donde las células se encuentran en procesos de diferenciación (*Tomado de Douglas R. et al 2006*).

Se ha propuesto que las proteínas E6 y E7 del HPV, tiene dos funciones críticas en el desarrollo de neoplasias. Primero se ha visto que la proteína E6 de los HPV's de alto riesgo para el desarrollo de CaCu (por ejemplo HPV-16 y 18), está asociada con la proteína p53 (proteína supresora del tumor) y es capaz de inactivarla; al regular el paso entre G1/S y G2/M. E6 recluta la proteína celular E6AP, que funciona como la ubiquitina ligasa que une p53. Este resultado de reunión en la ubiquitinización de p53 es seguida por una rápida degradación de la proteína p53, mediante el proteasoma 26S (Figura 4). E6 también presenta una activa función de tolerancia además de asociarse con el calcio unido a la proteína ERC-55, factor de respuesta de interferón, IRF3, y la integrina asociada a la proteína paxilina. La proteína E7 de los HPV 's de alto riesgo se une a la familia de las proteínas Rb, p107 y p130 que regulan la activación constitutiva del factor de transcripción E2F. Segundo, la proteína E7 puede interactuar y evitar las actividades de inhibidores del ciclo celular (inhibidores cdk) que interactúan con los complejos cdk/ciclina tales como p27^{kip1} y p21^{waf1/Cip1}. Además E7, al igual que otras proteínas oncogénicas de virus tumorales (SV40Tag y Ad5E1A), pueden inactivar a la proteína pRB, fosforilándola, para liberar el factor de transcripción E2F y el ciclo celular puede avanzar de G1 a S, G2 y M. En condiciones normales, en la fase M la pRB se desfosforila por acción de una fosfatasa; entonces, la proteína pRB puede unirse nuevamente a E2F y bloquear el ciclo celular en G1. Después del rompimiento del control del ciclo celular, las células epiteliales proliferantes, disminuyen los marcadores de diferenciación y son blancos de alteraciones genéticas adicionales por convertirse en células neoplásicas (Stubenrauch y Laiminis, 1999; Galloway y McDougal, 1996; Jones y Munger, 1999).

3.2.4 Etapas del Cáncer Cervico Uterino.

Según la federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO), 1995, las etapas del cáncer cérvico uterino son las siguientes:

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.

ETAPA I

- Etapa IA: Se detecta una cantidad muy pequeña de cáncer que no puede verse sin un colposcopio en los tejidos del cuello del uterino. El cáncer no tiene más de 5 milímetros de profundidad (menos de $\frac{1}{4}$ pulgada) y su ancho no supera los 7 milímetros (aproximadamente $\frac{1}{4}$ pulgada).
- Etapa IB: Puede verse con un colposcopio y tiene más de 5 milímetros de profundidad (menos de $\frac{1}{4}$ pulgada) o su ancho supera los 7 milímetros aproximadamente $\frac{1}{4}$ de pulgada) o podría verse sin un colposcopio y puede ser más grande que 4 centímetros (aproximadamente $1 \frac{1}{4}$ pulgadas).

ETAPA II

En la etapa II 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 en el abdomen, el hígado, el tubo intestinal o los pulmones (Instituto Nacional de Cáncer, 2007).

3.2.5 Evasión de la Respuesta Inmune.

A pesar de que el sistema inmune es altamente eficiente en su respuesta contra el cáncer, existen mecanismos generados por los propios tumores que les permiten evadir dicha respuesta y desarrollarse en el organismo. Entre ellos podemos mencionar.

1. Falta de expresión de antígenos tumorales
2. Disminución de la expresión de genes de moléculas MHC-I
3. Disminución de la expresión de genes que codifican para las proteínas TAP1/TAP2 (proteínas transportadoras de antígeno).
4. Secreción de bajos niveles de citocinas
5. Secreción de IL-10 (citocina supresora que inhibe la activación de los linfocitos T CD8+ citotóxicos y células asesinas naturales y/o la liberación de receptores solubles TNF- α)
6. Falta de respuesta de linfocitos T citotóxicos a IL-2
7. Inhibición de la expresión de IL-7
8. Falta de correlación entre la presencia de anticuerpos antitumorales y el desarrollo del tumor (*Bauer, 2000*).

Además se ha encontrado que la expresión de β -2-microglobulina está disminuida en una gran proporción de tumores avanzados en relación con el epitelio normal, lo cual concuerda con la falta de expresión de MHC-I en tumores que ya han penetrado las membranas basales.

Por otra parte se ha evidenciado la pérdida de la expresión de moléculas de MHC-I en tumores por la pérdida de la expresión de TAP-1 y esto a su vez con el grado de malignidad, lo que sugiere que la inhibición de TAP es una estrategia potencial de las células malignas para evadir la respuesta inmune (*Harald, 2000; Stanley Margaret, 2005*).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En ningún tipo de cáncer se comprueban mejor los notables efectos de la prevención, del diagnóstico precoz y del tratamiento radical sobre la tasa de mortalidad como en el cáncer de cérvix. Sin embargo, el cáncer Cérvico-uterino representa la neoplasia más frecuente en nuestro país (aproximadamente 35% de las neoplasias en la mujer), y a pesar de las campañas de detección oportuna como puede ser la prueba Papanicolau, no se ha podido evitar una alta incidencia de este problema de salud.

El HPV se encuentra asociado a más del 99% de los tumores de cérvix. De aquí, que se han propuesto diversos protocolos con proteínas derivadas del HPV como candidatas para generar una respuesta inmune celular específica contra el virus. Entre ellas, la proteína L1 constituye gran parte de la cápside viral y tiene un papel importante en el inicio de la infección en el epitelio cervical y en la propagación de la enfermedad; por tanto, es importante evaluar si existen linfocitos T CD8+ específicos hacia péptidos de la proteína L1 en etapas tempranas de la enfermedad. Para ello, en este trabajo fueron generadas células dendríticas capaces de presentar antígenos de L1 a linfocitos T CD8+ de pacientes con lesión por HPV del Hospital General de México para entonces evaluar su reactividad hacia péptidos derivados de esa proteína y por tanto, la existencia de memoria inmune específica.

HIPÓTESIS.

El desarrollo del cáncer cervical uterino se asocia estrechamente con la infección por HPV, y por tanto, se ha propuesto que la capacidad de generar una respuesta inmune específica determina la eliminación de tal infección o su derivación hacia cáncer. Por consiguiente, como alternativa terapéutica se desarrollan vacunas basadas en el reconocimiento de proteínas derivadas del HPV, y para ello, es importante conocer antígenos específicos hacia los cuales dirigir la respuesta o que permitan monitorear la eficacia de la misma. Tomando en consideración que las células dendríticas son excelentes presentadoras de antígenos, el co-cultivo de linfocitos TCD8+ provenientes de pacientes con infección por HPV con células dendríticas “cargadas” con péptidos derivados de la proteína L1 de HPV-16 y HPV18 afines a la molécula HLA-A2, conducirá a la generación de una respuesta inmune *in vitro* que reflejará la existencia de linfocitos T CD8+ específicos relevantes para el estudio y eventualmente el tratamiento de la enfermedad.

OBJETIVOS.

Objetivo General.

Identificar linfocitos CD8+ específicos contra péptidos derivados de la proteína L1 de HPV-16 y HPV-18 asociados a la molécula HLA-A2.

Objetivos Particulares.

- a) Cuantificar la proliferación de leucocitos de sangre periférica de pacientes y donadores normales como respuesta de activación hacia dos péptidos derivados de la proteína L1 de HPV-16 y uno de HPV-18, afines hacia la molécula HLA-A2, además de uno del virus de influenza.
- b) Medir la producción de interferón- γ como respuesta de la estimulación de leucocitos de sangre periférica con los diferentes péptidos mediante la técnica de ELISA.
- c) Identificar linfocitos T CD8+ específicos hacia péptidos derivados de la proteína L1 de HPV-16 y HPV-18, por medio de la tinción con tetrámeros de moléculas HLA-A2 específicos
- d) Evaluar la capacidad citotóxica de linfocitos T CD8+ específicos hacia péptidos derivados de la proteína L1 de HPV-16 y HPV-18

MATERIAL Y METODOS.

Predicción de epítopes de la proteína L1 de HPV-16 y 18 y síntesis de tetrámeros.

Mediante algoritmos vía Internet (<http://www.clustalw>) se realizó la predicción de péptidos de 9 y de 10 aminoácidos derivados de la proteína L1 de HPV-16 y -18 con alta afinidad hacia moléculas HLA-A2, alelo con alta frecuencia en la población mexicana (*De Leo et al, 1997* y *Wecman et al, 1997*). A partir de estos datos, fueron sintetizados tres complejos tetraméricos de HLA-A2 y péptido con las secuencias más convenientes, de acuerdo con la opinión del proveedor (Proimmune Limited, UK). Además, se incluyó el péptido GILGFVFTL específico para HLA-A2 de la proteína M1 de influenza, considerado la alta probabilidad de encontrar respuestas T CD8+ contra ese virus (Cuadro 5).

No	PÉPTIDO.	PROTEÍNA	VIRUS	POSICIÓN	T1/2 DISOC.
1	SLVDTYRF	L1	HPV-18	475	470.519
2	ILEDWNFGV	L1	HPV-18	460	179.949
3	ILEDWNFGL	L1	HPV-16	424	55.270
4	GILGFVFTL	M1	INFLUENZA	58	2666

Cuadro 5 Secuencias de péptidos sintetizados en unión a los complejos tetraméricos de moléculas HLA-A2, con su tiempo medio de disociación.

Obtención de sangre periférica y biopsia.

Las muestras de sangre y biopsias fueron obtenidas de pacientes con lesión por HPV del Hospital General de México. Mediante colposcopia se tomó una biopsia de la lesión cervical, la cual fue determinada clínicamente por vista colposcópica con ácido acético al 5%, esperando un minuto para que la lesión se hiciera visible. La biopsia fue retirada por el método quirúrgico denominado asa, y se trasladó al Laboratorio de Inmunobiología de la FES-Zaragoza en donde fueron analizadas para determinar el tipo de HPV. Por otra parte se obtuvieron 24 ml de sangre periférica conteniendo ACD para la obtención de linfocitos T y para la tipificación de los antígenos de histocompatibilidad MHC-I, para incluir a las muestras HLA-A2+.

Tipificación de HPV en las biopsias de lesiones.

A partir de las biopsias obtenidas, fue extraído el ADN genómico por medio de lisis alcalina y purificación por extracción con fenol (ver apéndice 1). El ADN así extraído y cuantificado fue utilizado como templado para un proceso de PCR con los oligonucleótidos generales MY09 y MY11 que amplificaron un fragmento conservado de la proteína L1 (MY09: CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC, MY11: GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG), que sirvió como indicio de la presencia de HPV en la muestra. Las muestras positivas en esta primera fase, fueron sujetas a PCR con oligonucleótidos específicos para los tipos 16 y 18 (ver apéndice 1 con la secuencia para cada uno de los tipos.) (Walboomers *et al*, 1999). En caso de no resultar positiva esta prueba, se procedió con los oligonucleótidos específicos para los tipos 31, 33, 39, 45, 52, y 58; asimismo fueron evaluados los tipo 6 y 11 (Naqvi *et al*, 2004).

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 con tapa de plástico y se agregó 50 µl de una suspensión de anticuerpos monoclonales anti CD2 unidos a perlas magnéticas (One Lambda Inc USA). Se colocó en un agitador horizontal por 3 minutos, luego se agregó un mililitro de solución desarrolladora al 10 % de solución amortiguadora de fosfatos y se homogenizó la muestra (One Lambda Inc, USA). Enseguida al tubo se colocó un magneto midi-MACS, el sobrenadante fue sustraído con una pipeta sexológica. Los linfocitos obtenidos se lavaron con PBS (ver apéndice 2) dos veces durante un minuto, para luego ser incubados por una hora en una placa de tipificación; al término, se agregó Fluoro Quench (Naranja de acridina y bromuro de etidio, One Lambda Inc USA) y se realizó la determinación de la viabilidad en un microscopio de fluorescencia.

Obtención de linfocitos T a partir de sangre periférica de pacientes con lesión por HPV y donadores normales.

La muestra de sangre periférica fue centrifugada a 2,000 revoluciones por minuto (RPM) durante 6 minutos, para obtener 2 fases: la fase superior (plasma) fue retirada para eliminar las plaquetas, proteínas y grasa; la fase restante (botón celular) fue resuspendido con PBS diluido 1:1 y las células mononucleares fueron separadas a través de un gradiente de densidad con 10 ml de Ficoll Histopaque 1.077 (Sigma-Aldrich, USA) y se centrifugó a 2000rpm durante 30 minutos. De esto se obtuvieron 3 fases una inferior (eritrocitos), una intermedia de Ficoll, junto con una banda blanca que contiene células mononucleares y linfocitos T; y una superior sólo con PBS. Fue retirada la banda blanca a la que después se le realizaron dos lavados con PBS, para su posterior siembra.

Cultivo de linfocitos T y generación de células dendríticas.

Previamente las células mononucleares fueron cultivadas durante una hora y posteriormente a las células adherentes se les agregó 40ng de rhIL-4, (R & D System, USA) junto con 40ng de rhGM-CSF (R & D system, USA); cultivadas en 3ml de medio IMDM (Sigma-Aldrich, USA) al 10% de plasma humano previamente desactivado (a 56°C por 30mn) durante 5 días. Después se agregó 500 ng/ml de LPS más 30µg de rhTNF- α (R & D system, USA) para su maduración. Una parte de las células no adherentes fueron congeladas (ver apéndice 3) ya que éstas fueron posteriormente utilizadas para la estimulación de linfocitos T CD8+, el descongelamiento se realizó hasta que las células dendríticas estuvieron listas.

Activación de linfocitos T usando péptidos inmunogénicos y tetrámeros.

La activación de linfocitos *in vitro* fue realizada por medio de la estimulación con células dendríticas las cuales después de ser maduras fueron cargadas con los diferentes péptidos a una concentración de 100µl/ml durante 24 horas y posteriormente lavadas para eliminar el exceso del péptido, a la vez fueron descongelados los linfocitos de las paciente para el cocultivo (linfocitos y células dendríticas). Al cabo de 2 días se agregó al cocultivo rhIL-15 100µl/ml (R & D system, USA) para la expansión de células efectoras y permanecieron en cultivo por alrededor de 8 días. La detección y determinación de linfocitos T CD8+ específicos contra los péptidos se llevo a cabo de acuerdo con el protocolo sugerido por el proveedor (Proimmune Limited, UK). Brevemente, los linfocitos fueron incubados con los tetrámeros (complejo de cuatro moléculas HLA-A2 unidas, las cuales contienen solo un péptido específico :P1, P2, P3, o P4) marcados con ficoeritrina durante 15 min a 37°C, antes de la adición de anti CD8+-FITC (Proimmune Limited, UK) e incubación por otros 15 mn a 4°C, seguidos de dos lavados con PBS suplementado al 2% suero fetal de bovino

(SFB). Después fue agregado anticuerpo secundario IgG cabra anti-ratón acoplado a fluoresceína 1:100. A continuación las células fueron fijadas con PBS conteniendo paraformaldehído al 2% y SFB al 2% para su análisis en un citómetro FACS (Becton Dickinson, Mountain View, CA) en el Departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV, IPN (ver apéndice 5).

Ensayos de proliferación y detección de interferón- γ .

El ensayo de proliferación fue realizado con leucocitos totales de sangre periférica los cuales fueron cultivados en placas de 96 pozos 2×10^5 células por pozo en presencia del péptido correspondiente a una concentración de 25 μM , en 200 μl de medio IMDM durante cinco días. Transcurrido este tiempo fueron retirados 100 μl de medio; entonces el cultivo fue incubado con 1 μCi de timidina tritiada por 16 horas para determinar la proliferación celular. La proliferación es referida como índice de proliferación, mediante la formula $IP = (\text{cpm exp} / \text{cpm control}) - 1 \times 100$. Por otro lado, antes de la incubación con timidina fueron traspasados 100 μl a placas de ELISA, la cual fue incubada a 37° C por una hora y posteriormente a 4° C toda la noche, al siguiente día se le realizaron dos lavados con TBS-TWEEN (TBS- tris-boratos, Tween 20 al 1% Sigma, USA) posteriormente se adicionó bloqueador (TBS-TWEEN al 2% de leche descremada, Svelty). Fue incubado por una hora a 37° C para ser lavada la placa 3 veces con TBS-TWEEN, se agregó anticuerpo primario anti-interferón- γ 1:100 en buffer de bloqueo, se incubó por dos horas a 37° C, se le realizaron 3 lavados para su posterior adición de anticuerpo secundario 1:2500 anti IgG, se incubó por 2 horas y se le realizaron 4 lavados con TBS-TWEEN para agregar 0.4 mg/ml de OPD en buffer de citratos (ácido cítrico 0.1 M y fosfato de sodio monobásico 0.1M Aldrich, Germany) durante 30 mn para su lectura a 405 nm.

Líneas celulares.

Se utilizó la línea celular T2, la cuales una línea linfocítica con expresión deficiente de TAP1, TAP2, LMP2 y LMP7. Los cultivos fueron mantenidos en medio RPMI (Gibco, USA) complementado con SFB al 10% (Gibco o Hyclone, USA) dentro de un incubador biológico (Forma Científica, USA) a 37° C, con 5% de CO₂ en un ambiente de humedad saturante (ver apéndice 4).

Ensayos de citotóxicidad.

La línea celular T2 fue “cargada” con péptidos específicos e incubada con ⁵¹Cromo en forma de cromato de sodio por aproximadamente una hora a 37°C. Después de lavar los excedentes, fueron cultivadas por 4 horas en presencia de linfocitos TCD8+ previamente estimulados y activados. Transcurrido el tiempo, fueron recuperados 100µL del sobrenadante para medir la liberación de cromo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{citotoxicidad} = (\text{cpm exp} - \text{cpm esp} / \text{cpm tot} - \text{cpm esp}) \times 100.$$

cpm= cuentas por minuto

exp= experimentales

esp= espontáneas

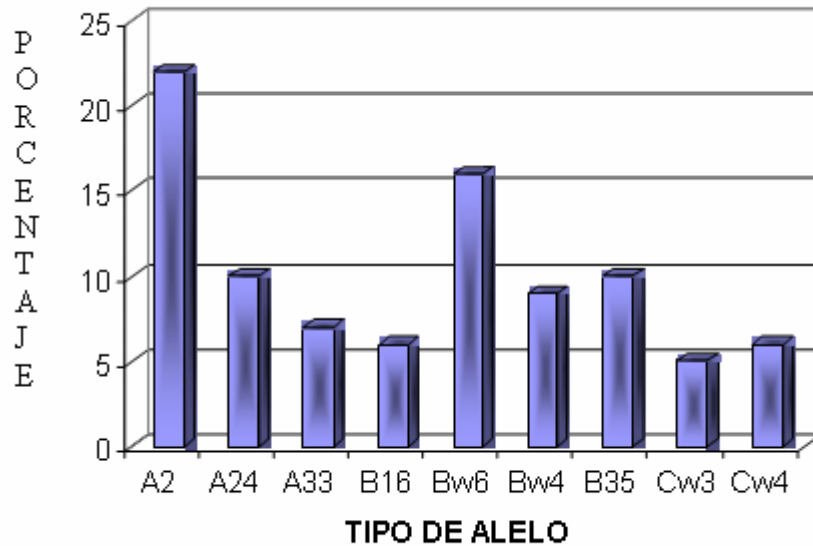
tot= totales.

RESULTADOS

Frecuencias alélicas de HLA clase I en pacientes con lesión por HPV.

En este estudio se incluyeron muestras de sangre periférica y biopsias de 22 pacientes que presentaban lesión por HPV y cuya tipificación indicó que eran HLA-A2+. Sólo 11 biopsias pudieron ser analizadas para conocer el tipo de virus de papiloma humano, mediante la técnica RT-PCR; (Cuadro 6).

De acuerdo con la tipificación de los haplotipos de histocompatibilidad clase I de las 22 pacientes, se observó que los alelos más frecuentes fueron: HLA-A2, expresado en 22 pacientes (55%); el alelo HLA-A33 se encontró en 7 de las pacientes (17.5%)y el alelo HLA-A24 en 10 de las pacientes(25%); para el locus HLA-B , los alelos más frecuentes fueron HLA-Bw6 en 16 de las pacientes, (40%); para el alelo HLA-Bw4 se encontró en 9 de las pacientes (22.5%)y para el alelo HLA-B35 fue en 10 (25%) de las pacientes. Finalmente para el locus HLA-C, los alelo más frecuentes son HLA-Cw3 en 5 de las pacientes (12.5%) y el alelo HLA-Cw4 en 6 de las pacientes (15%) (Gráfica 1). En las 22 pacientes, se encontró al menos uno de los alelos de mayor frecuencia reportada previamente por *Vargas-Alarcón et al, 1999*.



Gráfica 1. Frecuencia de los alelos HLA-A, HLA-B y HLA-C en pacientes con lesión cervical causada por la infección del Virus del Papiloma Humano incluidos en este estudio.

Debido a causas propias de la naturaleza y de la cantidad y calidad de las muestras incluidas en este protocolo, no fue posible realizar todos los ensayos para todas las muestras. En el Cuadro 6 se indican las pruebas que fueron realizadas para cada muestra así como datos clínicos asociados a las mismas.

PACIENTE	DIAGNOSTICO	HAPLOTIPO HLA-I	TIPO DE HPV	ENSAYO		
				P	T	IFN- γ
1	I-VPH	A2, B16, B27,Bw6	HPV-16		X	
2	I-VPH	A2, A28, B48, Bw6, Cw4	HPV-16		X	
3	I-VPH	A2, B16, Bw4, Bw6	HPV-18		X	
4	I-VPH	A2, A11, B52, Bw6	L1 +		X	
5	I-VPH	A2, A24, B16, Bw6	L1 +	X	X	
6	I-VPH	A2, B52, Bw4, Bw6	HPV-31 y HPV-33	X	X	
7	I-VPH	A2, B35, B53,Bw6	HPV-16	X		
8	I-VPH	A2, B49, Bw4	HPV-16	X		
9	I-VPH	A2, B13, B16, Bw6, Cw4	HPV-18	X		
10	I-VPH	A2, B7 Bw6, Cw3	L1 +	X		
11	I-VPH	A2, B16, B35, Bw6	L1 +	X		

Cuadro 6. Datos clínicos y haplotipos de histocompatibilidad HLA-I de las pacientes con lesión causada por la infección por HPV y positivas para la molécula HLA-A2. Se marca con una X los ensayos realizados para cada muestra. P: proliferación; T: tinción con tetrámeros HLA-A2 específicos; IFN: secreción de interferón gamma. L1+: Positividad para HPV.

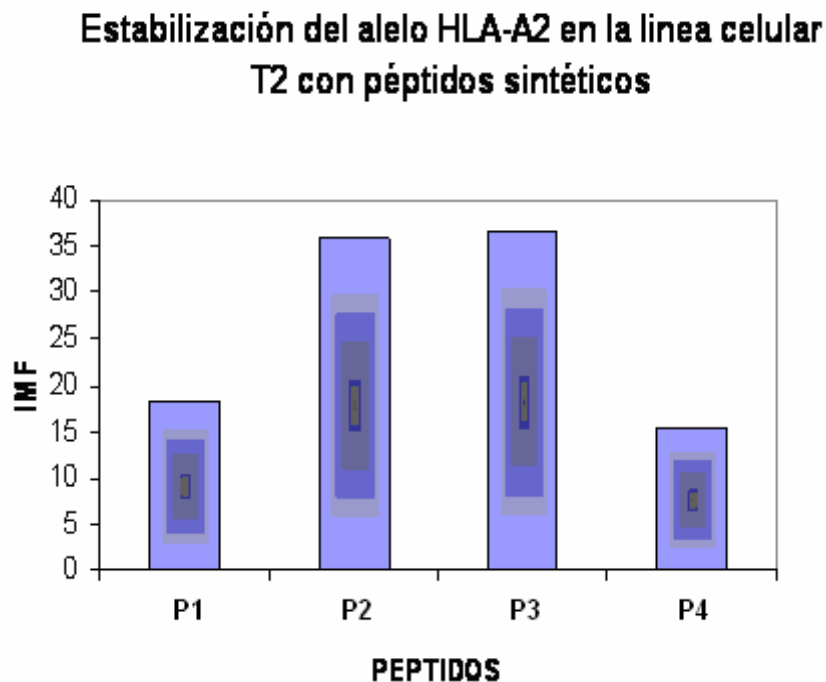
PACIENTE	DIAGNOSTICO	HAPLOTIPO HLA-I	TIPO DE HPV	ENSAYO		
				P	T	IFN- γ
12	I-VPH	A2, A28, B16, Bw6	L1 +	X		
13	I-VPH	A2, A24, B16, Bw6	L1 +	X		X
14	I-VPH	A2, A24, B40, Cw4	HPV-18	X		X
15	I-VPH	A2, Bw6, Cw3	HPV-16	X		X
16	I-VPH	A2, A3, B5, Cw6	HPV-16	X		X
17	I-VPH	A2, A11, B50, B35. Cw3	L1 +	X		X
18	I-VPH	A2, B5, Bw4, Bw6	L1 +	X		X
19	I-VPH	A2, B5, B51, Bw4	L1 +			X
20	I-VPH	A2, B16, Bw6	HPV-16			X
21	I-VPH	A2, A29, Bw4	L1 +			X
22	I-VPH	A2, A19, B50, B40. Cw3	L1 +			X

Cuadro 6. (Continuación). Datos clínicos y haplotipos de histocompatibilidad HLA-I de las pacientes con lesión causada por la infección por HPV y positivas para la molécula HLA-A2. Se marca con una X los ensayos realizados para cada muestra. P: proliferación; T: tinción con tetrameros HLA-A2 específicos; IFN: secreción de interferón gamma. L1+: Positividad para HPV.

Estabilización de moléculas HLA-A2 en células T2 con péptidos sintéticos.

La línea celular T2 (HLA-A2+) tiene una expresión deficiente de las moléculas TAP1, TAP2, LMP2 y LMP7, importantes en el procesamiento y presentación de antígenos, y por tanto, en la superficie de estas células son inestables las moléculas MHC-I, y están “vacías” de péptidos. La incubación de las células T2 con péptidos afines estabiliza por unión a estas moléculas y entonces pueden ser detectadas mediante citometría de flujo.

Este sistema permite verificar experimentalmente la afinidad de péptidos hacia la molécula HLA-A2, calculada por logaritmos. Como se observa en la Gráfica 2, los péptidos que presentan una mayor afinidad hacia el alelo HLA-A2, son los péptidos P2 de HPV-18 y el P3 de HPV-16. Estos péptidos son homólogos con la diferencia un único aminoácido.



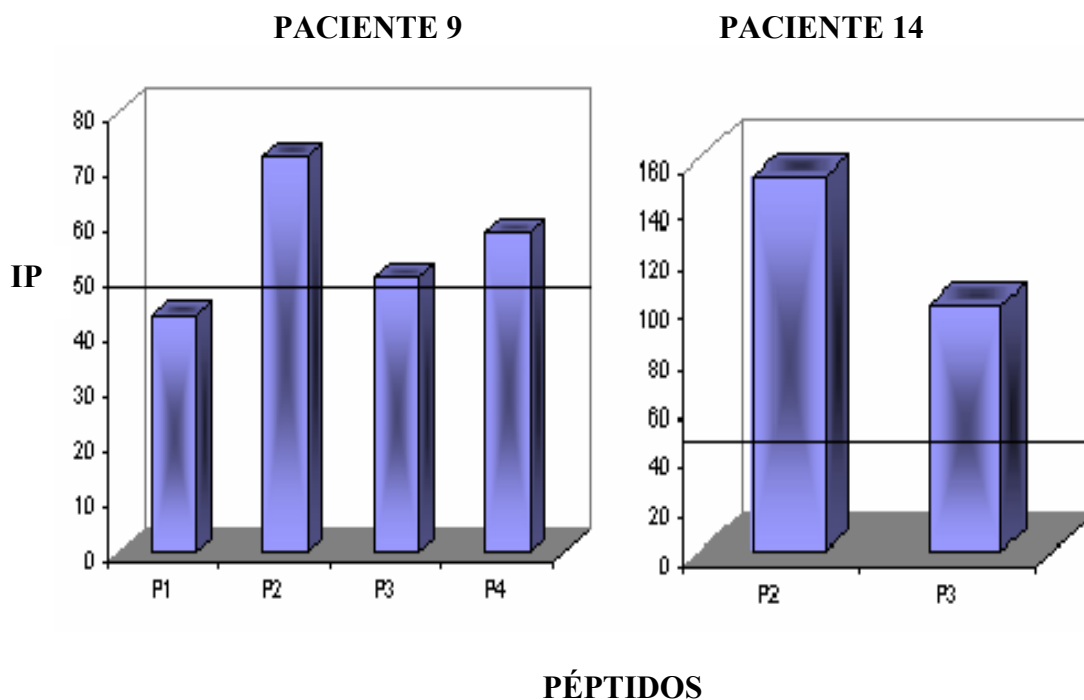
Gráfica 2 Muestra los resultados de la afinidad de los péptidos en la molécula HLA-A2 en células T2 en donde IMF: índice medio de fluorescencia. Los péptidos homólogos P2 y P3 muestran mayor afinidad. 10^4 eventos fueron leídos en cada ensayo.

Ensayos de estimulación a la proliferación de linfocitos T de pacientes con lesión por HPV con péptidos sintéticos.

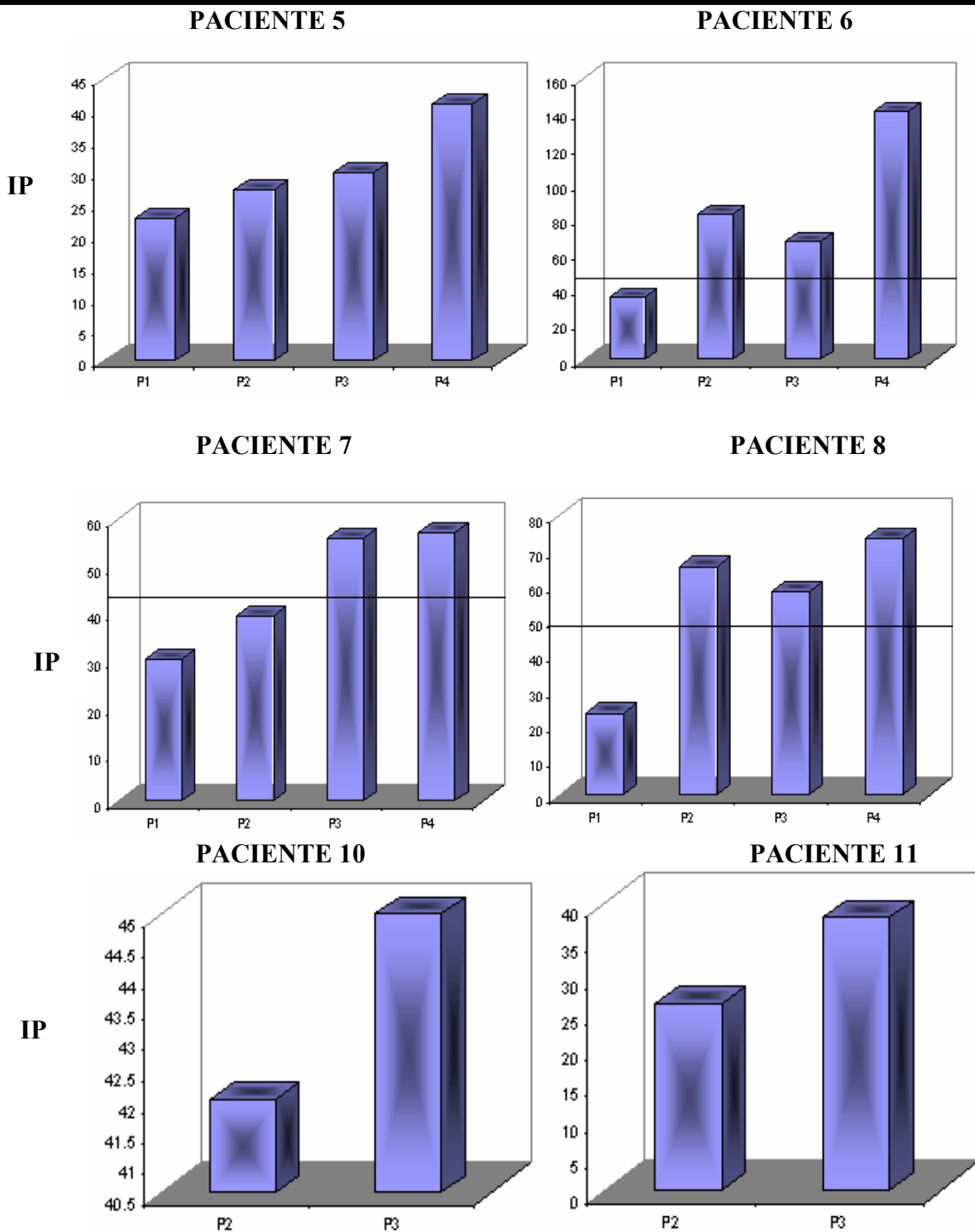
Con la finalidad de evaluar la respuesta proliferativa de linfocitos T de sangre periférica de pacientes con lesión causada por la infección por HPV que expresan el alelo HLA-A2, 1.5×10^5 leucocitos totales fueron cultivados con 100 μ l de cada uno de los péptidos sintéticos incluidos en este estudio. La estimulación de linfocitos T inducida con los péptidos sintéticos fue considerada como positiva cuando esta se encontraba con un índice de proliferación (IP) ≥ 50 , tal como lo considera Rensing et al, 1996. El péptido P2 (ILEDWNFGV) derivado de la proteína L1 de HPV-18, indujo la proliferación de los linfocitos de 10 pacientes (71.4%) (Gráficas 3, 4 Y 5) y el péptido P3 (ILEDWNFGL) derivado de la proteína L1 de HPV-16 estimuló en 11 pacientes (78%) (Gráficas 4 y 5). El péptido P4 (GILGFVFTL), derivado de influenza estimuló a 8 (88.8%) de nueve pacientes. El índice de proliferación (IP) más alto se observó en los linfocitos de la paciente número 14 con los péptidos homólogos P2 y P3, siendo aún más altos que el obtenido con el péptido de influenza. Por otro lado, sólo 2 (14.28%) linfocitos de pacientes fueron estimuladas con el péptido P1 (SLVDTYRF). Sin embargo, no fue observada una correlación absoluta entre el índice de proliferación y el origen de los péptidos empleados; por ejemplo, en la paciente 2 sus linfocitos fueron estimulados con los péptidos 2 y 3 aún cuando la lesión de la paciente fue tipificada para HPV con tipos diferentes (HPV-31 y HPV-33).

Por otra parte, al analizar la proliferación de los linfocitos T de donadores normales que expresaron el alelo HLA-A2 se observó que los péptidos derivados de la proteína L1 de HPV-16 y HPV-18 no indujeron un índice de proliferación (IP) mayor de 30 el cual esta por debajo del índice de proliferación (IP) 50 considerado como positivo en este trabajo. Al analizar los linfocitos de los donadores normales se observa una estimulación sólo con el péptido de influenza; aún así, estos apenas rebasa en índice de proliferación (IP) 50 (Gráficas 3, 4 y 5).

INDICE DE PROLIFERACION

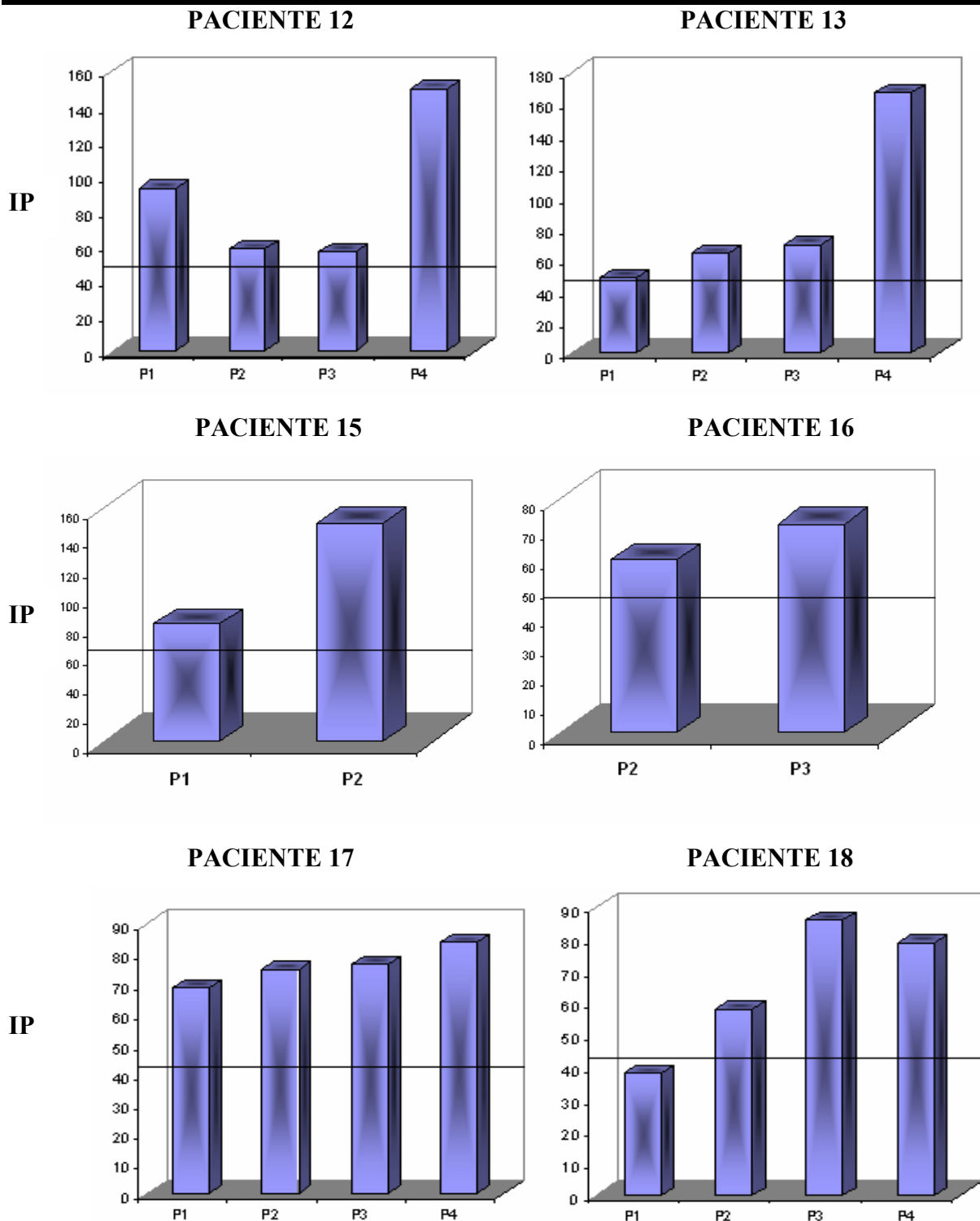


Gráfica 3. Proliferación inducida por péptidos sintéticos de linfocitos T de sangre periférica de pacientes HLA-A2+ con lesión por HPV18. Los linfocitos de las pacientes en presencia de los diferentes péptidos. Para la paciente 9 los linfocitos fueron cultivados con los 4 péptidos y para la paciente 14 solo fueron cultivados con dos péptidos. Las dos pacientes fueron tipificadas con HPV-18. La proliferación fue evaluada a los 7 días de cultivo mediante la incorporación de timidita tritiada. Los cultivos en los cuales se obtuvieron IP superiores a 50, fueron considerados como positivos.



PÉPTIDOS

Gráfica 4. Proliferación de linfocitos T de sangre periférica de pacientes HLA-A2+ con lesión por HPV. Las pacientes 7 y 8 fueron tipificadas para HPV-16 y la paciente 6 fue tipificada para HPV-31 y HPV-33; las pacientes 5, 10 y 11 fueron positivas para la infección pero no pudo ser determinado el tipo de HPV.

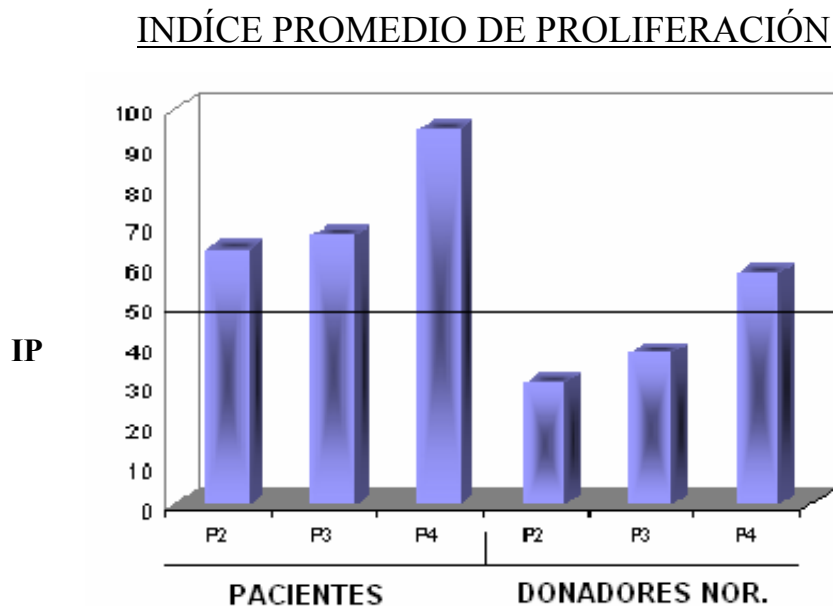


PÉPTIDOS

Gráfica 5. Proliferación de linfocitos T de sangre periférica de pacientes HLA-A2+ con lesión por HPV. Las pacientes 15 y 16 fueron tipificadas para HPV-16 mientras que las pacientes 12, 13, 17 y 18 resultaron positivas para la infección pero no pudo ser determinado el tipo de HPV.

Asimismo, aun cuando no pudo ser determinado el tipo de HPV para los linfocitos de las pacientes 12 y 13 (Gráfica 5), en ambos casos fue observada una proliferación considerable, sobre todo en los linfocitos de la paciente 12 como respuesta al péptido P1 (SLVDTYRF). Los linfocitos de las pacientes 17 y 18, que tampoco fueron tipificadas para HPV, fueron estimulados con los péptidos homólogos (el P2 y el P3), siendo mayor el efecto con el P3 (ILEDWNFGL), lo cual sugiere que estuviera presente en la lesión algún de los tipos de HPV de alto riesgo, como el HPV-16.

La gráfica 6 muestra una comparación del promedio de la proliferación de los linfocitos de donadores normales con respecto al promedio del índice de proliferación obtenido con los linfocitos de las pacientes con los péptidos P2 (ILEDWNFGV) y el péptidos P3 (ILEDWNFGL); en aquellos, el efecto observable se debe al péptido (GILGFVTL) derivado de la proteína M1 del virus de Influenza.



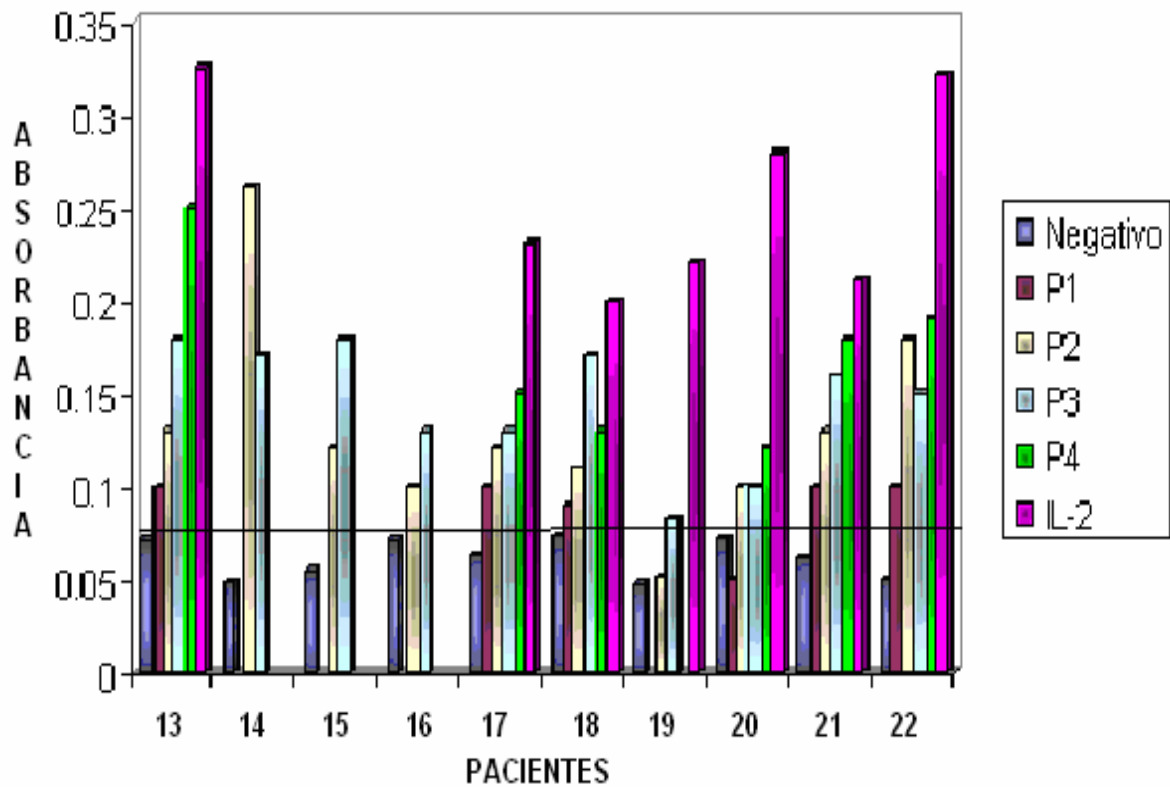
Gráfica 6. Promedio del índice de la proliferación celular de los linfocitos de las pacientes y los donadores normales con los péptidos P2 y P3 de la proteína L1 de HPV-18 y HPV-16, respectivamente.

Ensayos de ELISA para la detección de IFN- γ en pacientes con lesión por HPV.

Una consecuencia de la activación de los linfocitos TCD8⁺ es la secreción de una citocina llamada IFN- γ : un homodímero de 34 kD, cuyo origen son los linfocitos Th1, células NK y linfocitos T citotóxicos; estos últimos secretan la citocina al ser estimulados mediante un antígeno, y entre sus funciones destaca la inducción de las moléculas MHC-I y MHC-II, por lo que sus células blanco son macrófagos y linfocitos T citotóxicos, pues también funciona como activador para la proliferación de éstos (Regueiro et al 2004).

Los ensayos de ELISA para la detección de IFN- γ se realizaron sólo en 10 pacientes. El valor de corte fue calculado con base a la distribución de absorbancias del grupo control y fue definido como la media de la absorbancia + tres desviaciones estándar (DS). La finalidad de la detección de IFN- γ es evaluar la existencia de linfocitos T CD8⁺ que responden a los antígenos evaluados. Como control positivo fueron incluidos linfocitos incubados con 10 ng de IL-2.

En los resultados obtenidos se observa que en todas las muestras hay respuesta por encima del valor de corte definido en por lo menos uno de los péptidos evaluados (Gráfica 7). El mayor valor de densidad óptica fue alcanzado con la estimulación con la IL-2 recombinante, citocina que es nuestro punto de comparación positivo; el péptido P1 produjo respuesta por encima del valor de corte en 5 de las 10 muestras estudiadas, el P2 en 9 de 10, el P3 en 10 de 10 y el péptido derivado del virus de influenza en 7 de 10. En 6 muestras fueron realizados ensayos tanto de proliferación como de detección de IFN-gamma, encontrándose correlación en la respuesta observada.



Gráfica 7. Detección de IFN- γ en el medio condicionado producido por linfocitos de 10 pacientes con lesión por HPV.

En general los resultados obtenidos en las ELISAS para medir la presencia de IFN- γ superan al control negativo. La línea marcada en la gráfica 7 es donde a partir de ahí tomamos como positivo.

Identificación de linfocitos T CD8+ específicos para péptidos de la proteína L1 de HPV-16 y HPV-18 por medio de la tinción con tetrámeros.

Los tetrámeros están compuestos por cuatro moléculas HLA definidas “cargadas” con un péptido afín. En nuestro caso, se trata de tetrámeros de HLA-A2 asociadas con cada uno de los péptidos denominados como P1, P2, P3 y P4, derivados de la proteína L1 de HPV-16 y 18 y de la M1 del virus de influenza. La metodología seguida para detectar linfocitos T específicos hacia esos péptidos se ve sintetizada en el diagrama de flujo 1. Sólo se realizó la tinción en 6 pacientes, de las cuales sólo cuatro pudieron ser tipificadas. Las gráficas se realizaron mediante el programa WinMDI. 6.0 (Gráficas 8-10).

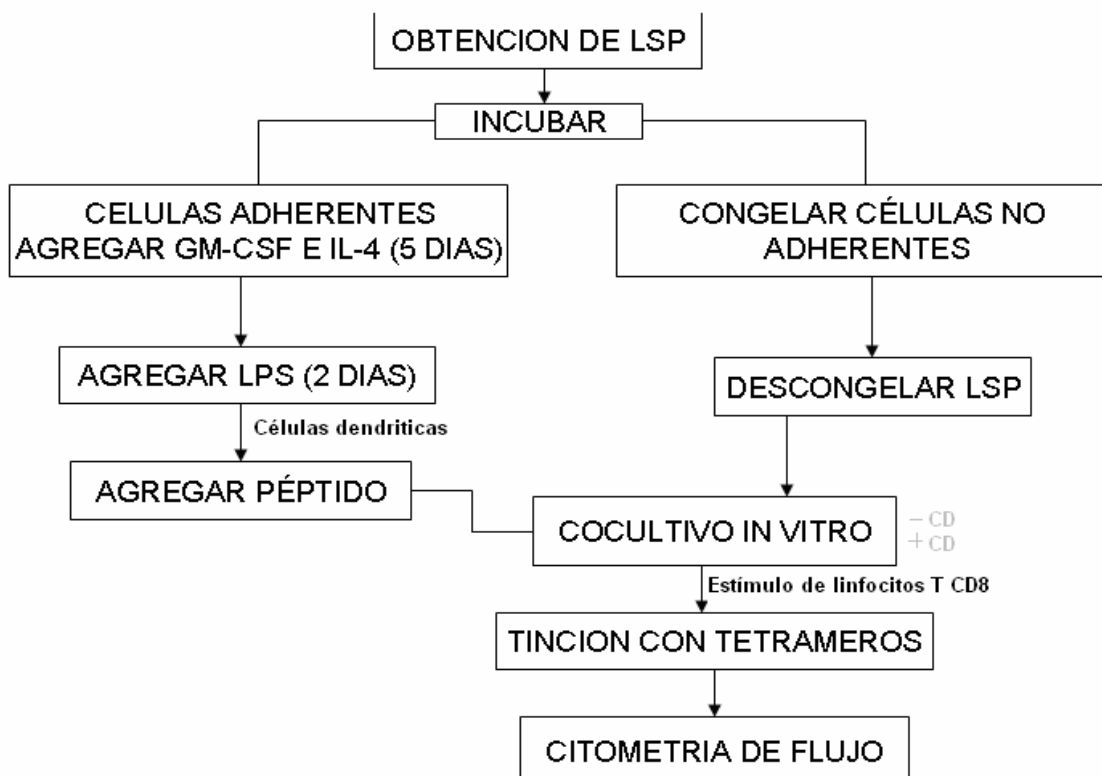
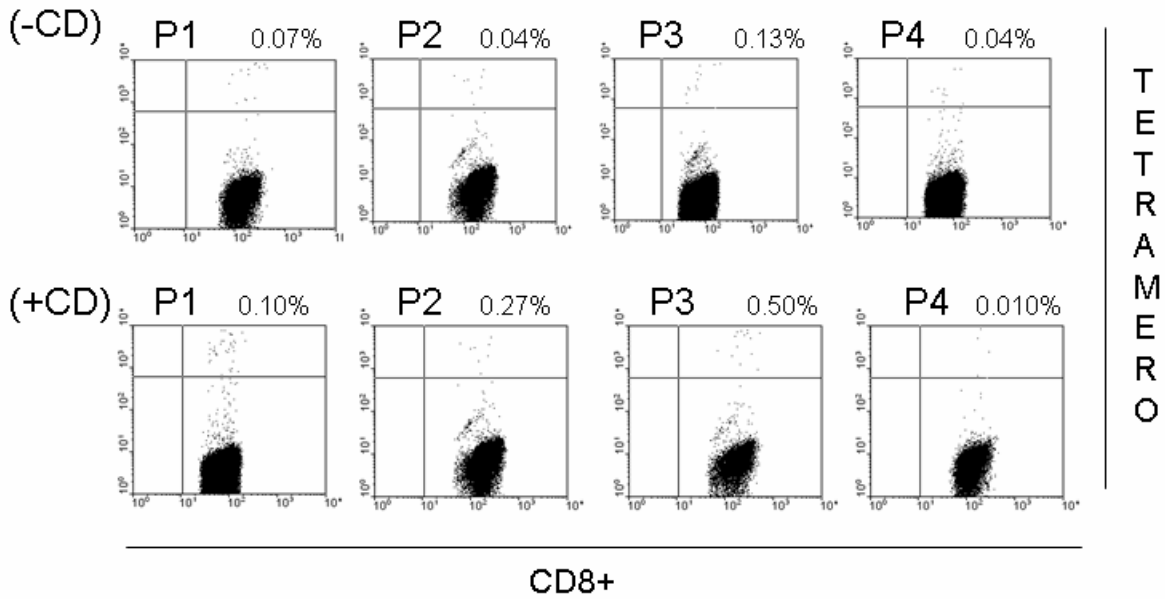
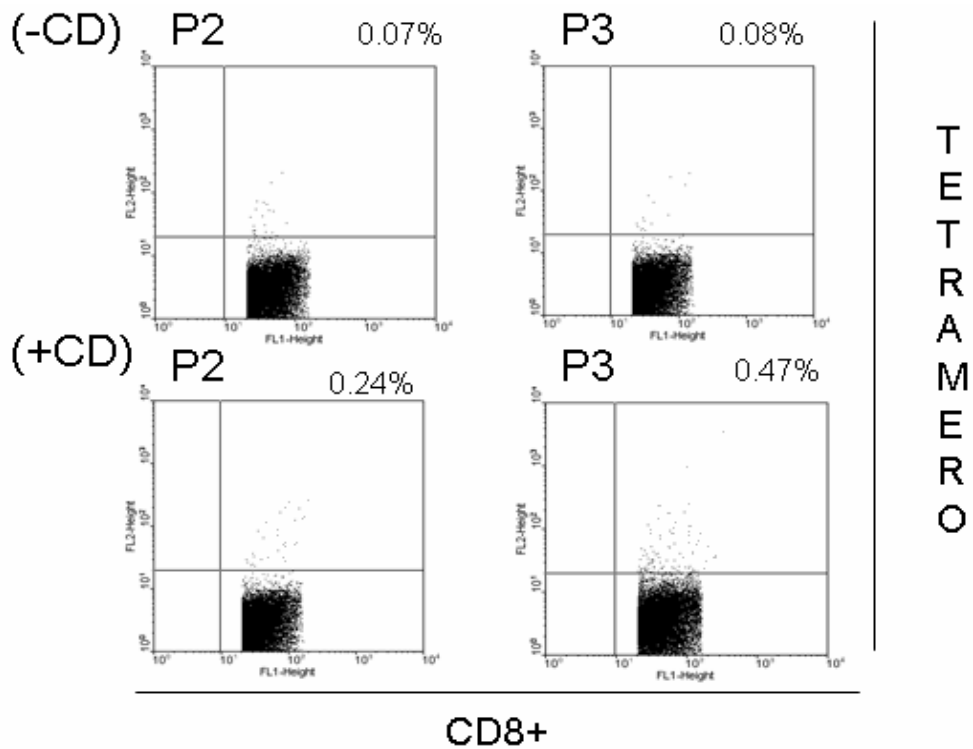


Diagrama 1. Procedimiento para activación de linfocitos T CD8 específicos y marcaje con tetrámeros.

PACIENTE 1

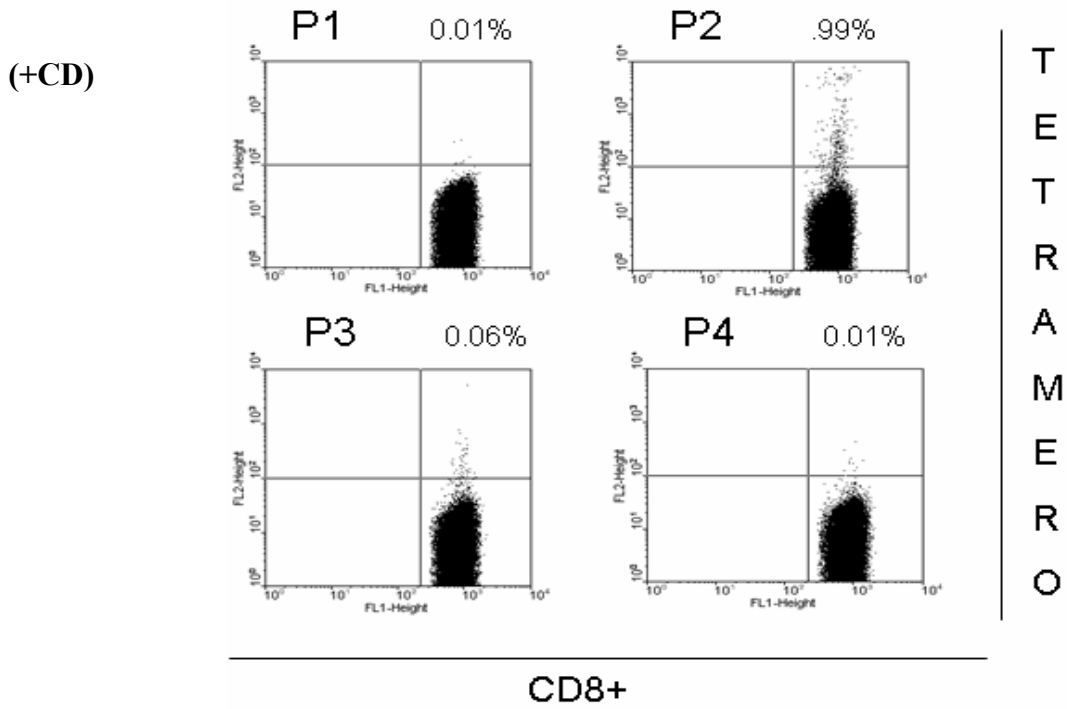


PACIENTE 2

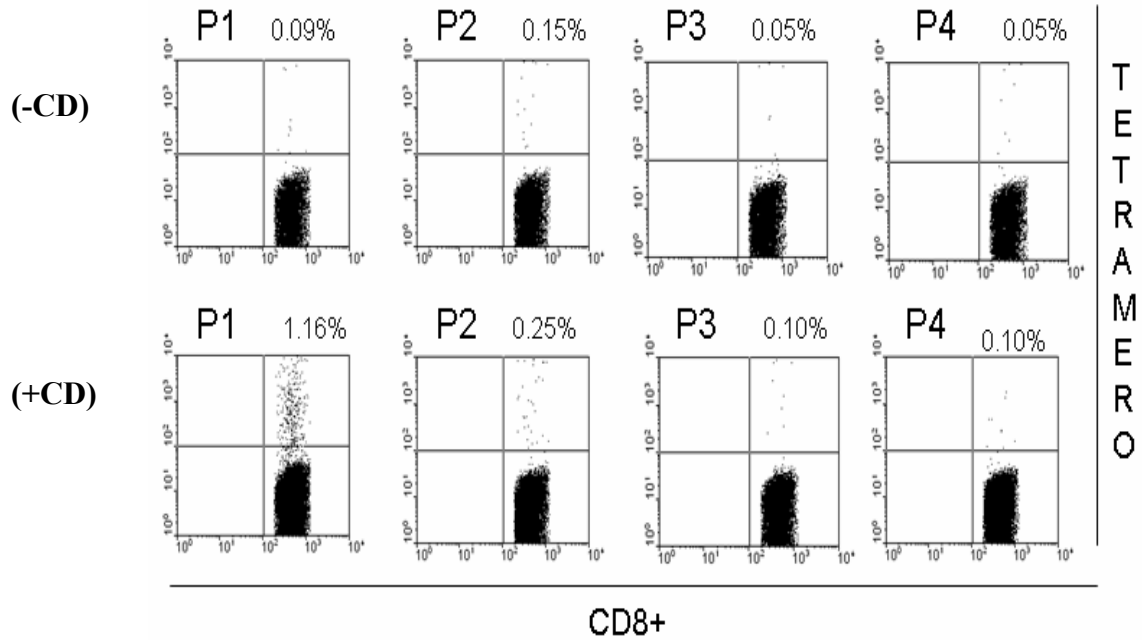


Gráfica 8. Marcaje con tetrámeros de linfocitos T CD8 de dos pacientes tipificadas para HPV-16.

PACIENTE 3

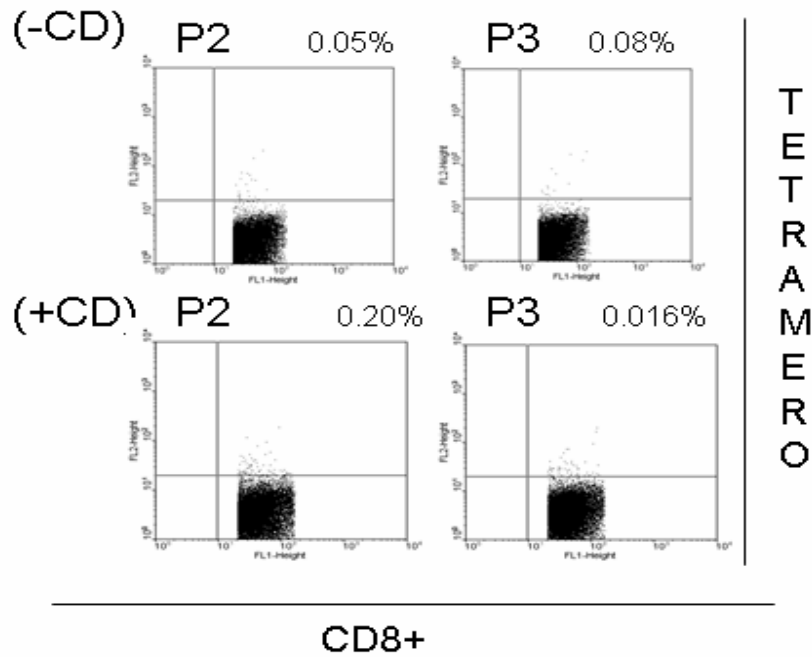


PACIENTE 4

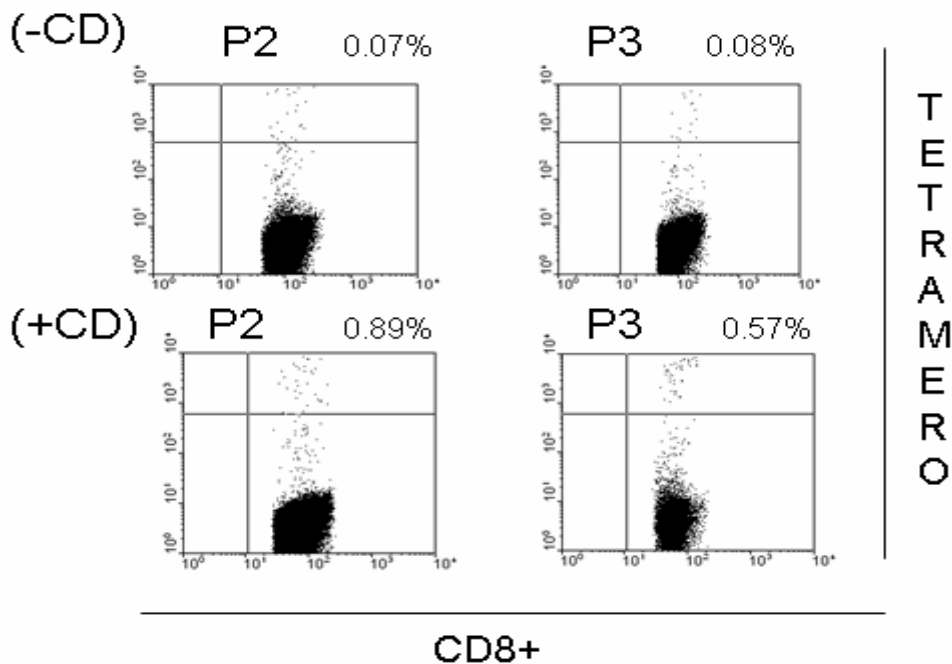


Gráfica 9. Marcaje con tetrámeros de linfocitos T CD8 de una paciente tipificada para HPV-18 (Paciente 3) y una paciente positiva para HPV pero cuyo tipo no pudo ser determinado.

PACIENTE 5



PACIENTE 6



Gráfica 10. Marcaje con tetrámeros de linfocitos T CD8 de una paciente tipificada para HPV-31,33 (Paciente 6) y una paciente positiva para HPV pero cuyo tipo no pudo ser determinado.

En general, 5 de 6 pacientes mostraron una diferencia en los porcentajes de linfocitos T CD8+, entre células estimuladas comparadas con los controles (linfocitos no estimulados con células dendríticas), al analizar un mínimo de 200,000 eventos. Dos pacientes no pudieron ser tipificadas y de las restantes sólo 2 coinciden con las pacientes utilizadas en los ensayos de proliferación. Los datos presentados son similares a los datos reportados por *Hermann R. Bohnenkamp et al 2004*, en donde los porcentajes no rebasan el 1% de los linfocitos CD8+ específicos para un antígeno determinado. Además, existe una alta correlación entre el tipo de HPV determinado y la respuesta con los péptidos derivados de las proteínas correspondientes, como el caso de las pacientes 1 y 2 donde en mayor porcentaje de linfocitos T CD8+ se da en el péptido 3 correspondiente al tipo viral tipificado (HPV-16). La paciente 3 mostró un mayor porcentaje en el péptido correspondiente al tipo viral que infecto a la paciente. La paciente 4 no pudo ser determinado el tipo de HPV, sin embargo se muestra una estimulación en el P1 el cual corresponde al tipo viral HPV-18, lo que sugiere que la paciente probablemente tenía la infección por este tipo viral. La paciente 5 no muestra un gran estímulo, pero existe una diferencia de al menos el doble entre los linfocitos estimulados con células dendríticas y los no estimulados con estas células. Por último la paciente 6 muestra estímulo con los péptidos P2 y P3 sin embargo el tipo viral es diferente del que pertenecen los péptidos trabajados. Los resultados obtenidos se resumen en el cuadro (7).

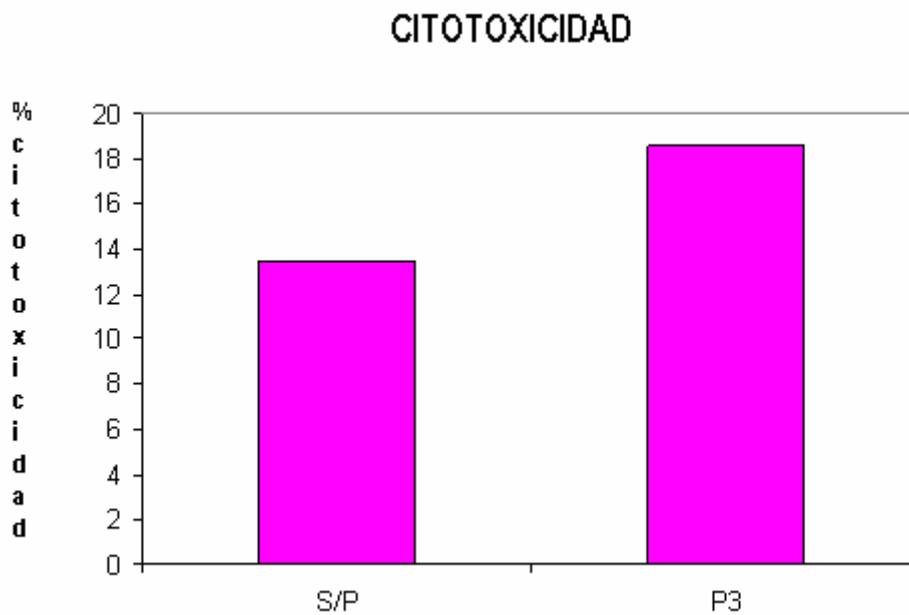
PACIENTE	P1	P2	P3	P4
1	1.42	6.75	3.84	2.5
2	-----	3.42	5.87	-----
3	-----	-----	-----	-----
4	12.88	1.66	2	2
5	-----	4	2	-----
6	-----	12.71	7.12	-----

Cuadro 7. Número de veces que aumentó el porcentaje de linfocitos T CD8+ específicos hacia cada péptido en los ensayos de detección con tetrámeros para linfocitos estimulados con células dendríticas con respecto a los controles.

De esta forma vemos que el mayor aumento en el porcentaje es para el péptido P1 con la paciente 4, posteriormente la paciente 6 con los péptidos P2 y el P3 en menor porcentaje. Las pacientes que mostraron un menor porcentaje fueron la paciente 4 para el péptido P3, y de forma similar la paciente 5.

Ensayo de citotoxicidad.

Para evaluar si el cargado de células dendríticas con los péptidos empleados inducía la actividad citotóxica de linfocitos estimulados se procedió a estimular a los linfocitos de forma semejante al ensayo de marcaje con tetrámeros para finalmente co-cultivarlos con las células T2 “cargadas” con los péptidos, que funcionaron como blancos para la citotoxicidad. La gráfica 11 muestra dos barras, la primera corresponde a la citotoxicidad sobre células T2 que no fueron cargadas con péptido y en la segunda barra que muestra un incremento del 5% se muestra la citotoxicidad sobre la línea celular T2 cargada con el péptido P3. El ensayo fue realizado en linfocitos de un donador después de tres re-estímulos *in vitro*.



Gráfica 11. Citotoxicidad con leucocitos de un donador normal estimulados con péptidos. S/P: células T2 sin péptido; P3 células T2 “cargadas” con péptido 3.

Cuadro de resultados para la estimulación de linfocitos T en pacientes con lesión causada por HPV.

El cuadro 8 muestra en resumen el número de pacientes que fueron estimuladas en cada ensayo; el primer valor representa el número de pacientes estimuladas y el segundo es el número de pacientes utilizadas para el ensayo.

PÉPTIDOS	PROLIFERACION	IFN- γ	TETRÁMEROS
P1	2/9	5/5	1/6
P2	10/14	9/10	4/6
P3	11/14	10/10	3/6
P4	8/9	6/6	-----

Cuadro 8 Muestra el número de linfocitos de pacientes estimuladas para cada ensayo, representado por el primer número así como el número de linfocitos de pacientes utilizadas para cada ensayo, siendo el segundo número.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.

El sistema inmune juega un papel determinante en la eliminación de patógenos y células transformadas; péptidos derivados de las proteínas de HPV pueden actuar como antígenos para linfocitos T, teniendo como consecuencia, la regresión de la infección en el cérvix. Por esta razón, procedimos a evaluar la presencia de linfocitos T CD8 específicos hacia péptidos derivados de la proteína L1 de ese virus en pacientes con infección temprana por HPV.

En los ensayos de proliferación, observamos una respuesta en 11 de 14 pacientes, principalmente inducida por los péptidos homólogos ILEDWNFGV e ILEDWNGFL, derivados de la secuencia de L1 de HPV-16 y 18, respectivamente. Los linfocitos de cinco pacientes cuyas biopsias fueron tipificadas con HPV-16 respondieron más hacia el péptido ILEDWNFGV, derivado de HPV-16, lo que indica especificidad. Sin embargo, estos linfocitos también respondieron al péptido P2, el cual corresponde al HPV-18, sugiriendo un reconocimiento en forma “cruzada”; Algo semejante fue observado en los linfocitos de las dos pacientes tipificadas para HPV-18: los linfocitos de la paciente 14 respondieron hacia el péptido P3 y en menor medida hacia P2, lo que indica que también hubo una reacción cruzada. Una reacción cruzada es probable, dado que los péptidos correspondientes difieren en un único residuo de aminoácidos, que por su ubicación terminal probablemente no participe en el reconocimiento del receptor de los linfocitos T hacia el complejo HLA-A2/péptido. El cambio de V por L entre los péptidos P2 y P3 en el aminoácido carboxilo terminal puede ser importante, resultados con un cambio de aminoácido son reportados por *Schreurs W. J. et al 2005* el usa dos péptidos en donde sus aminoácido terminales son T y V respectivamente.

De todas las muestras analizadas sólo los linfocitos de la paciente 12 y 13 respondieron hacia el péptido P1, aun cuando la paciente 13 respondió de igual forma a los otros péptidos, dejando por evaluar si realmente este péptido es menos inmunogénico que los homólogos.

Los resultados obtenidos en la detección de IFN- γ , correlaciona con los obtenidos para la proliferación, pues la concentración de esta citocina fue mayor en las muestras estimuladas con los péptidos homólogos, aun cuando la mayor respuesta se dio en las muestras control, estimuladas con IL-2, puesto que esta citocina participa de manera determinante en la activación de las células T. La secreción de IFN- γ como respuesta inmune celular hacia péptidos derivados de la proteína L1 de HPV ha sido bien documentada por otros autores, por ejemplo, *Pinto a. L. et al, 2006*.

Es ampliamente aceptado que la presentación de péptidos antigénicos asociados a moléculas HLA tiene gran importancia para la eliminación de células cancerosas (*Wolfgang M. J. et al, 1999*), y coincidentemente está reportada la baja expresión de la molécula HLA-I en diversos carcinomas incluyendo el cérvico uterino; es por ello que las células dendríticas, con su capacidad para entrenar a los linfocitos T para este reconocimiento, pueden jugar un papel determinante en la erradicación de infecciones como el HPV (*Breitburd et al, 2003*). La inclusión de células dendríticas “cargadas” con péptidos de la proteína L1 de HPV-16 y HPV-18 en este trabajo, indujo una respuesta inmunógena in vitro con linfocitos de pacientes con infección por HPV, además de reafirmar la eficacia de este tipo celular en la activación linfocitaria.

Este ensayo fue realizado en 6 pacientes y pudo ser determinado el tipo viral para 3 de ellas; en las pacientes 1 y 2 (HPV-16+) se observó un mayor porcentaje de linfocitos específicos con el péptido P3 y menor con el péptido P2, aunque nuevamente sugiere una estimulación cruzada con estos péptidos homólogos. En la paciente 3 se tiene un mayor porcentaje con el péptido P2 aunque no pudo ser tipificada la biopsia de la paciente.

Sólo los linfocitos de la paciente 4 respondieron al péptido P1; sin embargo, es la que representa el mayor porcentaje de todas las pacientes pues es el único que rebasó el 1% lo que sugiere una posible infección con HPV-18, sin embargo no parece haber efecto en los linfocitos estimulados con el péptido P2 que también deriva de la proteína L1 de este tipo viral. Los linfocitos de la paciente 6 tipificada como HPV-31+ y HPV-33+, fueron estimulados por los péptidos P2 y P3, en mayor porcentaje para el primero, lo que representa la misma tendencia que en el ensayo de proliferación. Nuestros resultados muestran un incremento de linfocitos T CD8+ en las muestras de células que fueron estimuladas con células dendríticas aunque en porcentajes menores a los reportados en otros estudios; mediante tinción con tetrameros para la identificación de linfocitos T CD8+ en líneas celulares con melanoma se ha obtenido hasta el 2% de identificación de linfocitos específicos (*Pittet M. J. et al, 2001*).

En el ensayo de citotoxicidad se observó una baja respuesta; esto puede atribuirse a que fueron empleados leucocitos de un donador sin signos evidentes de infección debido a la limitación en la toma de muestras de pacientes. En este caso, se trata de una inmunización *in vitro*, más que de la evocación de la memoria inmunológica como puede ocurrir en los linfocitos de las pacientes con infección. Para aumentar la respuesta se requiere de un mayor número de rondas de estimulación, tal como lo reporta *Chirivia et al en el 2002*, donde con tres rondas de estimulaciones obtuvieron una citotoxicidad del 60%.

Con los resultados obtenidos en los diferentes ensayos podemos deducir que existen células T CD8+ específicas para la respuesta inmune contra la proteína L1 de HPV en las pacientes con infección por HPV en etapas tempranas, lo cual indica que en principio existe una activación eficaz por parte de células dendríticas, como lo son las Langerhans que residen en medio del tejido epitelial y son las primeras células inmunes con quien tiene contacto el HPV (*Bousarghing L. et al, 2005*). Además, por medio del ensayo de citotoxicidad fue evidenciado que células activadas por el péptido P3 tienen actividad efectora. Esta evidencia es importante porque generalmente se ha documentado principalmente la existencia de la respuesta humoral (anticuerpos).

Finalmente, aun cuando es inminente la salida comercial de vacunas contra HPV, aun quedan por ser dilucidados los mecanismos moleculares que sustentan la respuesta inmune inducida; entre ellos, es necesario evaluar más profundamente la participación de células T citotóxicas en la erradicación de células infectadas así como la definición de los epítopes específicos hacia los que se dirige tal respuesta. Por otra parte, estas vacunas actualmente resultan sumamente costosas y por tanto inaccesibles a la mayor parte de la población, por lo que es conveniente evaluar más formas de prevención y erradicación de la infección por VPH, mediada por la respuesta inmune.

CONCLUSIONES.

- Linfocitos de sangre periférica provenientes de pacientes con infección por HPV estimulados in vitro con péptidos derivados de HPV 16 y 18 responden proliferando y secretando interferón- γ .
- Los linfocitos estimulados por los péptidos derivados de la proteína L1 de HPV, al menos para el péptido ILEDWNFGL tuvieron capacidad efectora.
- La mayor respuesta en las pruebas realizadas fue obtenido con los péptidos homólogos P2 (ILEDWNFGV) correspondiente al HPV-18 y el péptido P3 (ILEDWNFGL) correspondiente al HPV-16.
- Los resultados anteriores permiten sugerir que existen células de T CD8⁺ de pacientes con infección por HPV en etapas tempranas, específicos hacia péptidos de la proteína L1.

Apéndice 1

Extracción de ADN genómico

Lavar la biopsia dos veces con PBS estéril y fragmentar lo más posible. Colocar en un tubo para microcentrifuga con 400µl de buffer de lisis. En este paso puede almacenarse la muestra en congelación hasta su procesamiento.

Adicionar 5µl de proteinasa K (10mg/ml) e incubar toda la noche a 37°C. Al terminar la incubación, homogenizar completamente.

Adicionar 40µl de Tris 1M pH 9.4 y homogenizar. Agregar entonces 400µl de fenol saturado en agua y agitar vigorosamente con la mano. Centrifugar 10 mn a 8000 rpm. Recuperar la fase superior (acuosa) y transferir a un tubo nuevo. Si se formó una gran cantidad de interfase repetir este paso.

Mezclar la muestra recuperada con un volumen igual de cloroformo-alcohol isoamílico (25:1) agitar vigorosamente con la mano y centrifugar 10 mn a 8000 rpm. Recuperar la fase superior y transferir a un tubo nuevo.

Adicionar la muestra recuperada en un volumen medio de acetato de amonio 7.5M y homogenizar. Agregar 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío y mezclar por inversión. En este paso debe ser evidente la precipitación de ADN en forma de finos hilillos. Centrifugar 10 mn a 5000 rpm a 4° C. Descartar sobrenadante.

Enjuagar el botón formado con etanol al 75%, centrifugar 10 mn a 5000rpm a 4°C y descartar sobrenadante. Si el botón es muy grande, repetir este paso. Finalmente es conveniente dar una rápida centrifugación para concentrar los residuos de etanol con la finalidad de retirar la mayor cantidad posible de este reactivo.

Dejar secar el botón de ADN durante 10 mn, con el tubo destapado. Transcurrido este tiempo, disolver con agua ultra pura en cantidad dependiente del tamaño del botón. Incubar 30 mn a 56°C. Cuantificar por espectrofotometría.

Buffer de lisis

NaCl 100mM

Tris 10m M pH 8.0

EDTA 25mM pH 8.0

SDS0.5%

PCR con oligonucleótidos MY09/MY11

Reactivo	μl
Amortiguador PCR	4
MgCl ₂ (30mM)	2
d`NTP`s (2mM)	4
MY09 (10μM)	2
MY11 (10μM)	2
Taq	0.25
H ₂ O+ADN	25.75

AND: 2μg

Correr 8 μl de muestra en un gel de agarosa al 3% (aproximadamente hasta un tercio del gel), para verificar el producto de PCR (aproximadamente 450pb).

Condiciones

95° C 5 min.

95° C 30 seg.

45° C 60 seg.

72° C 90 seg.

72° C 10 min.

} 30 ciclos

Para determinar el HPV-16 y 18 se utiliza el siguiente programa:

95°C 5 min.	}	40ciclos
95°C 60 seg.		
55°C 120 seg.		
72°C 90 seg.		
72°C 10 min.		

Los oligonucleótidos utilizados fueron:

HPV	Proteína	Secuencia
+ HPV	L1(MYO9)	CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC
+HPV	L1(MY11)	GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG
HPV-16	E7 A (sentido)	GAT GAA ATA GAT GGT CCA GC
HPV-16	E7 B (antisentido)	GCT TTG TAC GCA CAA CCG AAG C
HPV-18	E7 A (sentido)	AAG AAA ACG ATG AAA TAG ATG GA
HPV-18	E7 B (antisentido)	GGC TTC ACA CTT ACA ACA CA
HPV-31	E7 A (sentido)	GGG CTC ATT TGG AAT CGT GTC
HPV-31	E7 B (antisentido)	AAC CAT TGC ATC CCG TCC CC
HPV-33	E7 A (sentido)	TGA GGA TGA AGG CTT GGA CC
HPV-33	E7 B (antisentido)	TGA CAC ATA AAC GAA CTG TG

Apéndice 2

Preparación de PBS

Solución de fosfatos se prepara de la siguiente manera:

En 800ml de agua bidestilada, se disuelven las siguientes sustancias:

Cloruro de sodio.....8.0 gramos

Fosfato de sodio monobásico.....2.16 gramos

Fosfato de potasio monobásico.....0.20 gramos

Cloruro de potasio.....0.20 gramos

El pH se ajusta a 7.2 con ácido clorhídrico 10 Normal, se lleva el volumen a 1 litro, en seguida se esteriliza en autoclave a 20 libras de presión durante 20 mn.

Apéndice 3

Criopreservación de células

La criopreservación celular se lleva a cabo en viales de 1.8 mililitros de capacidad, para esto las células que se desean preservar son resuspendidas en un medio de congelación compuesto por suero fetal de bovino en una proporción del 90% y suplementado con dimetil sulfóxido al 10% volumen a volumen.

Se recomienda que la resuspensión de las células en este medio se realice rápidamente, ya que la exposición de las células a esta solución durante varios minutos resulta ser tóxica.

Los viales conteniendo una densidad de $1-2 \times 10^6$ de células por mililitro de medio de congelación son introducidos rápidamente en un ultra congelador de -70°C durante por lo menos 12 horas.

A continuación es preferible descongelar un vial, lavar sus células y sembrarlas en una caja de cultivo para asegurarse de su viabilidad y capacidad de proliferación.

Después de asegurarse de ello, los viales resultantes podrán ser almacenados durante mucho tiempo en tanques especiales con nitrógeno líquido con una temperatura de -190°C para preservarse durante un tiempo indefinido.

Apéndice 4

Medios de cultivo

Comercialmente se puede disponer de diferentes medios de cultivo, los cuales contienen los nutrimentos mínimos requeridos para la proliferación celular, tales como: aminoácidos, vitaminas, sales y minerales.

Con la finalidad de evitar el crecimiento de microorganismos, los medios nutritivos deben estar suplementados con antibióticos como penicilina y estreptomina a 100 unidades por mililitro, y gentamicina a 24 microgramos por mililitro; también es recomendable adicionar algún antimicótico como Anfotericina B a 0.7 nanogramos por mililitro.

Las células son sembradas en cajas de 5ml de capacidad, son introducidas en una incubadora acondicionada con una atmósfera de 5% de bióxido de carbono, 95% de humedad saturante y 37°C de temperatura.

Apéndice 5

Citometría de flujo

Mediante esta técnica es posible identificar la estirpe celular, fase de maduración o el estado de activación de una célula analizando la expresión de superficie o intracelular de distintas moléculas. Esta técnica se efectúa tiñendo la célula con sondas fluorescentes específicas para la molécula a estudiar y midiendo la cantidad de fluorescencia que emite la célula.

El citómetro de flujo es un instrumento especializado que permite detectar la fluorescencia de células individuales en una suspensión y, por tanto, determinar el número de células que expresan la molécula a la que se une la sonda fluorescente. Las suspensiones de células se incuban con sondas fluorescentes y la cantidad de sonda unida a cada célula se mide haciendo pasar las células de una en una por un fluorímetro acoplado a un haz incidente generado por láser. Las cantidades relativas de una molécula concreta presente en distintas poblaciones celulares pueden compararse, tiñendo cada población con la misma sonda y determinando la cantidad de fluorescencia que emiten.

Además de detectar las señales fluorescentes, los citómetros de flujo también miden las propiedades de dispersión anterior y lateral de luz en las células, lo que permite calcular, respectivamente su tamaño y complejidad interna. Esta información es importante para distinguir varios tipos de células. Por ejemplo en comparación con los linfocitos, los neutrófilos producen una mayor dispersión lateral debido a sus gránulos citoplasmáticos, mientras que los monocitos originan una mayor dispersión anterior debido a su tamaño.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

Abbas A. K., Litchman A. H. Pober J. S. 2000. Cellular and molecular immunology. W.B Saunders company Pp. 63-89

Ahluwalia N., Bergeron J. M. Degen E., Williams D. B. 2002. The p88 molecular chaperone is identical to the endoplasmic reticulum membrane protein, calnexin J. Biol. Chem. 267:10914-10918.

Alonso P., Lazcano E., Hernández M. 2000 Cáncer cervico-uterino, diagnóstico, prevención y control. México. Editorial Médica panamericana p.p. 3-9.

Androlewicz M. J. Cresswell P. 1992. How selective is the transporter associated with antigen processing (TAP1 and TAP) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:12716-12720.

Aultman D., Adamashvili I., Yaturu K., Langford M., Gelder F., and McDonald John. 2002 Soluble HLA in human body fluids. Hum. Immunol. 60:239-244.

Austyn M. J., Wood K. J. 2004. Principles of cellular and molecular Immunology. Oxford. U.S.A. Pp. 85-92.

Barrera R. R., Peralta Z. P., Madrid M. V. 1998. Bases moleculares de la inmunología del cáncer. Salud Pública de México 37:45-50

Bauer M. 2000. HPV type 16 protein E7 HLA-A2 binding peptides are immunogenic but not processed and presented. Immunol. Lett. 71:49-55.

Bernard H. U., Ordóñez R. M., Lazcano E., Manos M. M., Ong C. K., Villa L. L., Delius H., Peyton C. L., Bauer H. M. and Wheeler C. M. 1994. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. J. Infect. Dis. 170:1077-1085.

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

Brady C. S., Duggan-Keen M. F., Davidson J. A., Varley J. M. and Ster P. L. 1999. Human papillomavirus type 16 E6 variants in cervical carcinoma: relationship to host genetic factor and clinical parameters. *J. Gen. Virol.* 80:3233-3240.

Breitburd F., Ramoz N., Salmon J., Orth G. 2003. HLA control in the progression of human papillomavirus infections. *Sem. Cancer Biol.* 7:359-371.

Brossart P., Bevan, M.J., 1997. Presentation of exogenous protein antigens on major histocompatibility complex class I molecules by dendritic cells: pathway of presentation and regulation by cytokines. *Blood* 90, 1594–1599.

Bousarghin L., Hubert P., Franzen E., Jacobs N., Boniver J., and Delvenne P. 2005. Human papillomavirus 16 virus-like particles use heparin sulfates to bind dendritid cells and colocalize with langerin in langerhans cells. *J. Virol.* 86:1297-1305.

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

Cardozo C., Vinitzky, A., Michaud, C., Orłowski, M., 2004. Evidence that the nature of amino acid residues in the P3 position directs substrates to distinct catalytic sites of the pituitary multicatalytic proteinase complex (Proteasome). *Biochemistry* 33, 6483–6489.

Carrington M., Colonna, M., Spies, T., Stephens, J.C., Mann, D.L.1998. Haplotypic variation of the transporter associated with antigenprocessing (*TAP*) genes and their extension of HLA class II regionhaplotypes. *Immunogenetics* 37, 266–273.

Castellino F., Zhong, G., Germain, R.N., 2000. Antigen presentation by MHC class II molecules: invariant chain function, protein trafficking, and the molecular basis of diverse determinant capture. *Hum. Immunol.*54, 159–169

Castellanos M. R., Roberta L. H., Mitchell A. M. 2002. Synthetic peptides induce a cytotoxic response against human papillomavirus type-18. *Gynecol. Oncol.* 82:77-83.

De Leo C., Catelan N., López M., Gonzáles N., Wecman A., Melin-Aldana H., Vargas A., Bordes J., Alarcón S., Granados J., Ramírez E., Lisker R. 1997 HLA class I and class II alleles and haplotypes in mexican mestizos established from serological typing of 50 families. *Hum. Biol.* 69:809-818.

Deverson E. V., Gow I. R., Coadwell W. J., Monaco J. J., Butchner G. W. Howard J. C. 1998. MHC class II region encoding proteins related to the multidrug resistance family of transmembrane transporters. *Nature.* 348:738-741

De Viller E. M. 1994. Human pathogenic papilloma-virus types; an update. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 186:1-12

Douglas R., Lowy and John T schiller. 2006. Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J. Clin. Invest.* 116:1167-1169.

Doyle C, Strominger J.L. 2002. Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. *Nature* 330:256-259.

Eschele D., Durst M., Ter M. J., Luande J., Eberhardt H. C., Pawlita M., and Gissman L. 1992. Geographical dependence of sequence variation in the E7 gene of human papillomavirus type 16. *J. Gen. Virol.* 73:1829-1832.

Fawett D. 1999. *Tratado de Histología* Ed. Mc-Graw Hill P.p. 678-690.

Ferrera A., Velema J. P., Figueroa M., Bulnes R., Toro L. A., Claros J. M., De Barahona O. and Melchers W. J. G. 1999. Human papillomavirus infection, cervical displasia and invasive cervical cancer in Honduras: a case-control study. *Int. J. Cancer.* 82:799-803.

Galloway D., McDougal J. 1996 The disruption of the cell cycle checkpoints by papillomavirus oncoproteins contributes to anogenital neoplasia. *Sem. Cancer Biol.* 7: 309-315.

Galvin K., Krishna S., Ponchel F., Frohlich M., Cummings D. E. 2002. The major histocompatibility complex class I antigen-binding protein p88 in the product of the calnexin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:8452-8456.

Golsby R. A., Kindt T.J., Osborne B. A., Kuby J. 2004 Immunology. Mc Graw Hill. U.S.A. pp. 1-5.

Groll M., Ditzel., Lowe J., Stock D., Bochtler., Huber R. 2000. Structure of 20 S proteasome from yeast at 2.4 a resolution. Nature 386:463-471

Gromme M. and Neefjes J. 2002. Antigen degradation or presentation by MHC-I molecules via classical and no classical pathways. Mol. Immunol. 39:181-202

Harald Zur Hausen. (2000). Papillomavirus causing cancer: evasion from host cell in early events in cancerinogenesis. J. Cancer. 7: 309-315

Harold H.; Linder. 2000. Anatomía Clínica Ed. El manual Moderno. P.p. 123-145.

Hermann R. B., Coleman Julia., Joy M. B., Joyce T. P., Noll T. 2004, Breast carcinoma cell lysate-pulsed dendritic cells cross-prime MUC1-specific CD8+ T cells identified by peptide-MHC-class-I tetramers Cellular. Immunol. 231:112-125.

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

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

Ho G. Y., Tay S. K., Chan S. Y. and Bernard H. U. 2000. Sequence variants of human papillomavirus type 16 from couples seggest sexual transmission with low infectivity and polyclonality in genital neoplasia. J. of Inf. Dis. 168:803-809.

Howley P. M. 2001. Role of the human papillomaviruses in human cancer. Cancer Res. 51:5019-5022.

Hubert W. G. and Laimonis A. L. (2001). The action of E6 and E7 of Papillomaviruses in cellular immortalization and transformation. Mechanisms of DNA tumor virus transformation. Monogr. Virol. Basel. Karger. 23:44-63.

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

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

Jankovic D., Liu Z., Gause W. 2001. Th1 and Th2 cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. *TRENDS Immunol* 22:450-456.

Jardetzky T. 2002. Crystal structures of MHC class I and MHC class II molecules. In: Browning M. J., *HLA and MHC: Genes, Molecules and function.* Bios. Scientific Publishers Ltd., Oxford, Pp. 249

Jin Y., Shih, W.K., Berkower, I., 2002. Human T cell response to the surface antigen of hepatitis B virus (HBsAg). Endosomal and non endosomal processing pathways are accessible to both endogenous and exogenous antigen. *J. Exp. Med.* 168, 293–306.

Jones D., Munger K. 1996. Interactions of the human papillomavirus E7 protein with cell cycle regulators. *Sem. Cancer Biol.* 7:327-337.

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

Kloetzel P.M., 2001. Antigen processing by the proteasome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 179–187.

Kovacsovics-Bankowski M., Clark, K., Benacerraf, B., Rock, K.L., 2002. Efficient major histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 4942–4946.

Kugler A., Stuhler G., Walden P., Zoller G., Zobywalski A., Brossart P., Trefzer., U., Muller C. A., Becker V., Gross A. J., Hemmerlein B., Ringert R. H. (2000). Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. *Nat. Med.* 6:3332-6.

Kurman R. J., Schiffman M. H., Lancaster W. D., 1998. Analysis of individual human papillomavirus types in cervical neoplasia. A possible role for type 18 in rapid progression. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 159:293-296.

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

Langekamp A., Messi M., Lanzavechia A., Sallusto F. 2000. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of Th1, Th2 and non-polarized T cells. *Nat. Immunol.* 1:311-315.

Lanzavechia A., Sallusto F. 2001. The instructive role of dendritic cells on T cell responses: lineages, plasticity and kinetics. *Curr. Opin. Immunol.* 13:291-13298.

Liu T., Zhou, X., Orvell, C., Lederer, E., Ljunggren, H.G., Jondal, M. 2002. Heat-inactivated Sendai virus can enter multiple MHC class I processing pathways and generate cytotoxic T lymphocyte responses in vivo. *J. Immunol.* 154, 3147–3155.

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

Lowe J., Stock D., Jap B., Zwickl P., Huber R., 2005. Crystal structure of the 20s proteasome from the archeon. *Science* 268:533-539

Margaret F D K., Brown D. M., Stacey N. S., and Stern L. P. (1998). Papillomavirus vaccines. *Bios* 3:1192-1208.

Mao, C. 2006. Efficacy of human papillomavirus-16 vaccine to prevent cervical intraepithelial neoplasia: a randomized controlled trial. *Obstet. Gynecol.* 107:18–27.

Marques Soler Laura. 2001. Regulación de la expresión de los genes de tap1 y Imp 2. Tesis doctoral P.p. 22,34-38.

Monroy A., Weiss-Steider., Ortiz Navarrete., Montes H J., Bañuelos Pánuco, Acosta Araujo, Díaz Quiñónez, López Granel, G.Herbert, J. Granados, C. de Leo, Silva López, and Mora García. 2002 Identification of two homologous antigenic peptides derived from L1 HPV-16 and 18 proteins specific for HLA-B*3901 allele. *Arc. Virol.* 157:1933-1942

Moreno R. J. 2001. Respuesta Inmune y mecanismos de autoinmunidad Ed Limusa. México Pp. 112-115.

Myers G., Lu H., Calef Ch. And Leitner T. 1996 Heterogeneity of papillomaviruses. *Sem. Cancer Biol.* 7:349-358.

Muñoz N. 2000. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J. Sem. cancer Biol.* 7:349-358.

Naqvi S., Wajid S., Mitra A. 2004. Restriction fragment length polymorphism of L1 amplicon using Rsa I detects five different human papillomavirus types and their co-infections among women attending a gynecological outpatient department. *J. Virol. Metods.* 117:91-95.

Nindl I., Rindfleisch K., Lotz B., Schneider A. and Durst M. 1999. Uniform distribution of HPV 16 E6 and E7 variants in patients with normal histology, cervical intra-epithelial neoplasia and cervical cancer. *Int. J. Cancer.* 82:203-207.

Nijenhuis M., Hammerling G. J. 2002. Multiple region of the transporters associates with antigen processing (TAP) contribute to its peptide binding site. *J. Immunol.* 157:5467-5477.

Nossal G. 2000. Sistema inmunitario entre la vida y la muerte. *Invest. Cien Nov:* 9-12.

Ortis F Llorca 2000. Anatomía Humana Ed. Científica Médica. P.p.56-78.

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

Orlowski M., Cardozo, C., Michaud, C., 2003. Evidence for the presence of five distinct proteolytic components in the pituitary multicatalytic proteinase complex. Properties of two components cleaving bonds on the carboxyl side of branched chain and small neutral amino acids. *Biochemistry* 32, 1563–1572.

Ortmann B., Androlewicz M., Cresswell P. 2002. A critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes. *Science* 277:1306-1309.

Panduro A. (2000). *Biología Molecular en la clínica*. Mc Graw-Hill. Interamericana México p.p. 131-134.

Parkin D. M., Pisani P., Ferlay J. 2004 Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 49:33-64.

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

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

Pinto A. L., Viscidi R., Harro D. C., Kemp J.T., García A. J., Trivett M., Demuth F., Lowy D. R., Schiller J. T., Berzofsky J. A., Hildesheim A. 2006. Cellular immune responses to HPV-18,-31 and -53 in healthy volunteers immunized with recombinant HPV-16 L1 virus –Like particles. *J. Virol.* 353:451-462.

Pittet J. M., Speicer D. E., Valmori D., Rimoldi D. L., Lejeune F., Cerottini J. C., Romero P. 2001. Ex vivo analysis of tumor antigen specific CD8+ t cell responses using MHC/peptide tetramers in cancer patients. *Int. Immunol.* 1: 1235-1247

Ratcliffe D. R., Nolin S. L., Cramer E. B. 2002. Neutrophil interaction with influenza-infected epithelial cell. *Blood.* 72:149-149.

Regueiro Gonzáles, C. López Larrea, S. Gonzáles Rodríguez, E. Martínez Naves. 2004 *Inmunología Biología y patología del sistema inmune*. Ed. Medica Panamericana p.p. 113-131.

Resing M., Wilemien J., Esteban C., Alessandro S., Remco M., Jacqueline D. Geziena M., W Bram H., Gert J. Baptis J. Martín W. and Cornelis J. 1996 Occasional memory cytotoxic T-cell responses of patients with human papillomavirus type 16-positive cervical lesions against a human leukocyte antigen A 0201-restricted E7-encoded epitope. *Cancer Res.* 56:582-588.

Revy P., Sospreda M., Barbour B., Trautmann A., 2001. Functional antigen-independent synapses formed between T cells and dendritic cells. *Nat. Immunol.* 2:925-931

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

Robey E. Fowlkes B J. 2004. Selective events in the cell developed. *Annu. Rev. Immunol.* 12:675-705.

Rock K.L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D., Goldberg, A.L., 1995. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78, 761–771.

Rocha Z. L., Ambrosio P. J., Mora G. L., Cruz T. F., Steider W. B., Ortis N. V. and Monroy G. A. 2004 Detection of antibodies against a human papillomavirus (HPV) type 16 peptide that differentiate high-risk from low-risk HPV-associated low-grade squamous intraepithelial lesions. *J. Virol.* 85:1-8.

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

Roitt I. M., Brostoff J., Male D. 2001. *Inmunología.* Harcourt. Madrid. Pp.120-135.

Romagnani S. 2000. The role of lymphocytes in allergic disease. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 105:3999-408.

Ronald A Bergman; Adel K Afifi; Paul M. Heidger 1999. *Histología* Ed. Mac-Graw Hill P.p. 189-234.

Sadasivan B., Lehner P. J. Ortmann B., Spies T., Cresswell P. 2002 Roles for calreticulin and a novel glycoprotein tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP . Immunol. 5:103-114

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

Schreurs W.J., Kueter W. M., Scholten B. J., Lemonier A. F., Meijer J. L., Hooijberg E. 2005. A single amino acid substitution improves the in vivo immunogenicity of the HPV-16 oncoprotein E7(11-20) cytotoxic T lymphocyte epitope. J Vaccine 23:4005-4010.

Seedorf J., Scheindr H., Shah K. 1998. Detection of papillomavirus antigen and DNA in cell and tissue in “Viral Etiology of cancer cervical” Col Spring Harbor Lab Pp. 247-248.

Seemuller E., Lupas, A., Stock, D., Lowe, J., Huber, R., Baumeister, W., 2005. Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threoninprotease. Science 268, 579–582.

Stanley Margaret. 2005. Immune responses to human papillomavirus. Vaccine 1-7.

Stanley W.; Clarice Asworth; Francone; Walter J. Lossow. 1990. Anatomía y Fisiología Humana Ed. Interamericana P.p. 78-119.

Stites M. D., Daniel P., Parslow T.G. 2000 Inmunología básica y clínica. Manual Moderno. Pp.21-30.

Sonnichsen B., Fullenkrug J., Van P. N., Diekmann W., Robinson D. J., Mieskes G. 1994 Retention and retrieval: both mechanisms cooperate to maintain calreticulin in the endoplasmic reticulum J. Cell Sci. 107:2705-2717.

Storey A., Osborn K., Crawford L. 1990 Co-transformation by human papillomavirus type 6 and 11. J. Gen. Virol. 71:165-171.

Stubenrauch F. and Laiminis L. A. 1999. Human papillomavirus life cycle active and latent phases. Cancer Biol. 9:379-386.

Toshiniko M. and Motoyasu S. 2001 Relation between 80 human papillomavirus genotypes and different grades of cervical intraepithelial neoplasia: association and causality. Virol. 283:138-147.

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

Vargas-Alarcón G., Martínez L., Granados J., Díaz C., Gómez C., Alcocer V., Amaiz V. 1999. A new HLA-B35 allele found in a Mexican family of Nahuatl descent. *Hum. Immunol.* 45:148-151.

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

Vos J.C., Reits, E.A., Wojcik-Jacobs, E., Neefjes, J., 2002. Head-head/tail-tail relative orientation of the pore-forming domains of the heterodimeric ABC transporter TAP. *Curr. Biol.* 10, 1-7.

Vos J.C., Spee, P., Momburg, F., Neefjes, J., 1999. Membrane topology and dimerization of the two subunits of the transporter associated with antigen processing reveal a three-domain structure. *J. Immunol.* 163,6679-6685.

Walboomers J. M., Jacobs M. V., Manos M. ., Bosch F. X., Kammer J. A. Shan K. V. Snijders P. J., and Muñoz N. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer world wide. *J. Pathol.* 1:12-19.

Wecman A., Vargas A., López M., González N., De Leo C., Cautelan N., Bordes J., Alarcón S., Granados J., Ramírez E., Lisker R. 1997. Frequencies of HLA-A as HLA-B alleles in a Mexico city mestizo sample. *Am. J. of Hum. Biol.* 9:1-5.

Wenzel T., Baumeister, W., 1995. Conformational constraints in protein degradation by the 20S proteasome. *Nat. Struct. Biol.* 2, 199-204.

White W. L., Wilson S. D., Palmer-Hill F. J. Woods R. M., Ghim S. J., Hewitt L. A., Goldman D. M., Burke S. J., Jenson A. B., Koenig S., and Suzich J. A. 2003. Characterization of a major neutralizing epitope on human papillomavirus type 16 L1. *J. Virol.* 73:4882-4889.

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

York Ian A. y **Kenneth L. Rock**. 1999. Antigen processing and presentation by the class I major Histocompatibility complex. *Annu. Rev. Immunol.* 14:369-396

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

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

REFERENCIAS DE LA RED

Secretaría de salud, Cáncer cervico uterino [en línea] 2007/11/03. URL. Disponible en (www.salud.gob.mx).

Health on the Net Foundation accredited to the Economic and Social Council of the United Nations, Cancer [en línea] 2007/20/02. URL. Disponible en (www.hon.ch/index.com 2007).

Instituto Nacional de Cáncer [en línea] 2007/20/02. URL. Disponible en (www.NCI/PDQ/pacientes.com.mx 2007).