



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA  
CARRERA DE BIOLOGÍA**

**“Análisis de expresión mediante PCR en tiempo real de los ligandos MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3 del receptor NKG2D, en líneas celulares de cáncer cérvico uterino”.**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**B I Ó L O G O**

**Alberto Checa Rojas**

Director de Tesis: Jorge Flavio Mendoza Rincón

México, D.F.

[2008]





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.

*“Y creó Dios al hombre... varón y hembra los creó. Y los bendijo Dios, y les dijo: fructificad y multiplicaos, llenad la tierra, y sojuzgadla, y señoread en los peces del mar, en las aves de los cielos, y en todas las bestias que se mueven sobre la tierra...”*

*Génesis 2:27-28.*

## ***Agradecimientos***

*A mis padres a quienes agradezco su amor y comprensión a lo largo de mi vida.*

*Agradezco al Dr. Jorge Flavio Mendoza Rincón por la dirección y apoyo de este trabajo.*

*Al laboratorio de genética humana del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XX, IMSS en especial al Dr. Diego Arenas por su apoyo brindado para la realización de esta tesis, y al Dr. Normand García Hernández por la revisión y asesoría en este trabajo.*

*Dr. Benjamín Garrido, del Departamento de Genética y Biología molecular del CINVESTAV por las muestras donadas.*

*A mis profesores y compañeros de la carrera de Biología de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, que compartieron sus conocimientos y su amor por la biología.*

*Un agradecimiento en especial a mis profesores de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer (UIDCC), de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM ya que despertaron mi interés por la biología molecular y el cáncer.*

*Agradezco el apoyo económico proporcionado por el CONACyT a través del proyecto 41793-M, para la elaboración de esta tesis.*

Índice	
<b>Resumen</b> .....	4
<b>Introducción</b> .....	5
Generalidades del Cáncer.....	5
Las células tumorales .....	5
Cromosomas en las neoplasias malignas .....	5
La angiogénesis y metástasis: Invasión Tumoral .....	5
<b>Cáncer cérvico uterino</b> .....	6
Cáncer cérvico uterino en México .....	6
Clasificación del cáncer cérvico uterino .....	7
Factores de riesgo y etiología .....	8
<b>El virus del papiloma humano</b> .....	9
Características moleculares y genoma de los papilomavirus .....	9
Oncogenes de HPV: E6 y E7 .....	10
Factores que interactúan con la transcripción de los oncogenes .....	11
<b>Líneas celulares tumorales</b> .....	11
<b>Sistema Inmunológico</b> .....	12
Inmunidad frente a los virus .....	12
Inmunidad innata frente a los virus .....	13
Receptores de NKG2D.....	14
Genes relacionados con el Complejo Mayor de Histocompatibilidad .....	14
Características moleculares de los genes MICA y MICB .....	15
Genes ULBP's .....	15
Modelos de expresión en ligandos de NKG2D .....	16
El estímulo de células inmunes por NKG2D .....	16
Rutas de activación para NKG2D .....	17
Rol de vigilancia de los ligandos de NKG2D en células tumorales .....	19
NKG2D: Tumores e inmunidad de virus .....	20
<b>Justificación</b> .....	21
<b>Hipótesis</b> .....	22
<b>Objetivo general</b> .....	23
Objetivos particulares .....	23
<b>Material y Métodos</b> .....	24
Líneas celulares .....	24

Cultivo celular .....	24
Líneas celulares infectadas con el virus del papiloma humano tipo 16 .....	24
Líneas celulares infectadas con el virus del papiloma humano tipo 18 .....	24
Líneas celulares negativas al virus del papiloma humano.....	24
Siembra .....	25
Cosecha .....	25
Determinación de la densidad celular .....	27
Extracción del RNA total .....	27
Electroforesis.....	29
Transcripción reversa (RT).....	29
Cuantificación del cDNA.....	31
Oligonucleótidos para la amplificación de MICA, MICB, ULBP's.....	31
Reacción en cadena de la polimerasa .....	31
Desnaturalización.....	32
Hibridación .....	32
Extensión .....	32
PCR en tiempo real .....	33
Amplificación por PCR-tiempo real .....	33
Preparación de las muestras de amplificación.....	34
Condiciones de la PCR .....	34
<b>Resultados</b> .....	<b>35</b>
<b>Discusión de resultados</b> .....	<b>45</b>
<b>Conclusión</b> .....	<b>47</b>
<b>Lista de referencia</b> .....	<b>48</b>

## RESUMEN

La expresión de los ligandos de NKG2D se ha demostrado en algunas células de origen epitelial o fibroblástico. Sin embargo, la función biológica de la expresión de estos genes en células de tejido epitelial o conectivo no es clara, y específicamente en células de cáncer de cérvix no han sido estudiados. Estudios posteriores han demostrado que pueden considerarse como genes que sintetizan proteínas de estrés fisiológico ya que su expresión está regulada por promotores de choque térmico. En este estudio, analizamos la expresión y la importancia funcional del MHC clase I relacionado con la cadena A y B (MICA, MICB) y las proteínas de unión a UL16 (ULBP1, ULBP2, ULBP3), que son los ligandos principales para el receptor NKG2D, en líneas celulares de tumor de origen cérvico uterino positivas al virus HPV del tipo 18,16; líneas celulares no infectadas comparadas con tejido normal.

## Introducción

### Generalidades del cáncer

Un rasgo principal de todos los organismos eucariontes superiores a lo largo de su vida útil, es la proliferación de las células somáticas, cuyo crecimiento y división está estrictamente regulado; cuando las células han perdido su control de crecimiento habitual surgen las células cancerígenas. El cáncer es el resultado de una serie de mutaciones somáticas y en ciertos casos de una predisposición hereditaria. Su capacidad de crecer sin restricción y diseminación, puede ser mortal para el organismo en el cual ocurre [1].

### Las células tumorales

Los tumores surgen con mucha frecuencia en animales y humanos de edad avanzada, muchos de ellos representan poco riesgo para el organismo, debido a que son localizados. Estos tumores se denominan “**benignos**”, se convierten en un grave problema médico si interfieren con las funciones normales del organismo; o si secretan sustancias biológicamente activas como hormonas. Los tumores se convierten en una amenaza para la vida si crecen, proliferan, se diseminan e invaden el cuerpo (metástasis) [2,3]. La metástasis es un proceso que implica la invasión de tejidos, la diseminación a través del sistema circulatorio o linfático y el establecimiento en sitios distantes de células provenientes del tumor primario [4]. En un tejido blanco, las células cancerosas manifiestan crecimiento rápido y una estructura “*poco especializada*” [5].

### Cromosomas en las neoplasias malignas

Un cariotipo de un tumor pocas veces es normal, mostrando anomalías numéricas y estructurales [6]. Pueden presentarse aneuploidias y poliploidias por error en la división mitótica. Las anomalías estructurales de los cromosomas, no son iguales en todos los tumores individuales, pero cada tumor puede presentar una línea clonal predominante. En la carcinogénesis, los tumores primarios se caracterizan por poseer células tumorales que tienen cariotipos distintos. A pesar de las fluctuaciones numéricas, en ocasiones los marcadores cromosómicos se mantienen [3]. Estas aberraciones cromosómicas ocasionan errores en la transcripción y en la regulación génica, algunos de los genes afectados son oncogenes o genes de reparación de DNA; pero la mayoría son genes supresores de tumores. Algunos supresores tumorales, regulan la transcripción, mientras otros funcionan en la transducción de señales que están implicadas en la regulación de los procesos de nacimiento, diferenciación y muerte celular [6].

### Angiogénesis y metástasis: Invasión tumoral

La angiogénesis es la generación de nuevos vasos capilares, y es promovido por un estímulo que involucra varios pasos; y ésta es necesaria para el crecimiento de tejidos normales y tumorales [7]. Las células endoteliales van migrando hacia los estímulos angiogénicos creando vasos capilares, y en el último paso la aparición de una luz. La angiogénesis es una determinación crítica de metástasis, donde las células tumorales no penetran en el sistema circulatorio en un número significativo, sino hasta que la angiogénesis ha ocurrido, vertiendo un gran número de células tumorales dentro del flujo sanguíneo. La aparición de la actividad angiogénica en una lesión tumoral, es un indicador para una invasión del cáncer. La formación de



nuevos vasos sanguíneos son los implicados de la migración, la proliferación y diferenciación de células del endotelio vascular. Este proceso es fisiológicamente controlado por factores de crecimiento y factores moduladores del crecimiento (TGFs), componentes relacionados en la regulación de la angiogénesis. La angiogénesis del tumor, se desarrolla cuando requiere un crecimiento progresivo. La formación de nuevos vasos sanguíneos, permite la expansión de la masa tumoral. Los tumores prevasculares están restringidos por los límites de difusión de nutrientes y oxígeno. En contraste, los tumores vascularizados se expanden por metástasis [7].

### **Cáncer cérvico uterino**

De acuerdo con informes emitidos por la OMS, la frecuencia global de cáncer sigue aumentando. En el año 2000, 5.3 millones de hombres y 4.7 millones de mujeres desarrollaron un tumor maligno; y 6.2 millones murieron a causa de la enfermedad. Anualmente surgen más de 10 millones de nuevos casos y se estima que el número se incremente en un 50% durante los próximos 20 años; esperándose alrededor de 15 millones para el año 2020. Internacionalmente, las primeras tres causas de muerte por cáncer en mujeres corresponden en orden descendente a cáncer de mama, cáncer de pulmón y cáncer cérvico uterino (CaCu) [8,9].

El CaCu es el segundo cáncer más común en mujeres de todo el mundo, con aproximadamente 493,000 casos nuevos y 274,000 muertes en el 2002. Aproximadamente el 83% de los casos ocurren en países en vías de desarrollo, donde el CaCu representa el 15 % de los cánceres femeninos, con un riesgo del 1.5 % antes de los 65 años, mientras que, en países desarrollados esto representa sólo el 3.6 % de los cánceres [9,10]. El CaCu es una alteración celular que se origina en el epitelio del cuello del útero, que se manifiesta inicialmente a través de lesiones precursoras de lenta y progresiva evolución; se pueden suceder en etapas de displasia leve, moderada y severa. El cáncer puede evolucionar *in situ* (circunscrito a la superficie epitelial) o ser cáncer invasor (que traspasa la membrana basal) [11].

### **Cáncer cérvico uterino en México**

En México el CaCu se encuentra en el onceavo lugar de los padecimientos y muertes en mujeres mexicanas en edad productiva (15-65 años), ocupa el primer lugar de muerte en todos los cánceres en mujeres mexicanas [12].

**Clasificación del cáncer cérvico uterino**

El CaCu es una enfermedad progresiva dividida en estadios de la cero (0) y de I a IV (Ver Tabla 1) [13].

**Tabla 1| Estadios clínicos del cáncer cérvico uterino\*.**

<b>Estadio 0</b>		<b>Carcinoma <i>in situ</i>, intraepitelial</b>
<b>Estadio IA</b>		<b>Carcinoma invasor, diagnóstico sólo al microscopio</b>
	IA 1	<b>Invasión limitada al estroma no mayor de 3mm de profundidad y no más de 7mm de ancho</b>
	IA 2	<b>Invasión limitada al estroma entre 3-5mm de profundidad y no más de 7mm de ancho</b>
<b>Estadio IB</b>		<b>Carcinoma invasor confinado al cérvix, diagnóstico macroscópico</b>
	IB1	<b>Tumor no mayor de 4cm</b>
	IB2	<b>Tumor mayor de 4cm</b>
<b>Estadio II</b>		<b>Tumor que se extiende por fuera del cérvix, sin llegar a la pared pélvica o tercio inferior de la vagina</b>
	IIA	<b>Sin invasión parametrial</b>
	IIB	<b>Con invasión parametrial</b>
<b>Estadio III</b>		<b>Tumor que se extiende a la pared pélvica o tercio inferior de la vagina</b>
	IIIA	<b>Invade un tercio inferior de la vagina</b>
	IIIB	<b>Se extiende a la pared pélvica</b>
<b>Estadio IV</b>		<b>Se extiende al recto y a la vejiga, o a órganos distantes</b>
	IVA	<b>Invade la mucosa de la vejiga o del recto</b>
	IVB	<b>Presenta metástasis en órganos distantes</b>

\*Sistema de clasificación de la FIGO, 1994 [13].

Los conceptos de displasia, neoplasia intraepitelial cervical (NIC por sus siglas en inglés), lesión escamosa intraepitelial (LEI) y carcinoma *in situ*, sirven para identificar la transformación maligna y gradual de los epitelios normales del *exocérvix* y del *endocérvix*. El término displasia significa crecimiento anormal, implica una alteración de las características morfológicas, cubre un rango muy amplio de alteraciones epiteliales, de distintos grados. A raíz de lo anterior surge la clasificación que se mantiene hasta el día de hoy, de displasia leve, moderada y carcinoma *in situ* (Ver Tabla 2) [14].

Tabla 2| Clasificación de las Displasias.

<p><b>Displasia leve:</b> La morfología esta poco alterada, los núcleos son grandes, irregulares e hiper Cromáticos, se pueden observar mitosis y a veces anomalías en el tercio inferior del epitelio.</p> <p><b>Displasia moderada:</b> Las anomalías epiteliales se sitúan entre las displasias leves y las displasias severas.</p> <p><b>Displasia severa:</b> Pérdida de la morfología, células pequeñas con núcleos muy grandes e hiper Cromático, con mitosis a veces atípicas, estas células se encuentran en todas las capas, las células superficiales presentan un cierto grado de diferenciación.</p> <p><b>Carcinoma <i>in situ</i>:</b> el epitelio tiene las características del carcinoma lesión maligna pero no hay invasión del estroma.</p>
--

En 1968 se propone el sistema de nomenclatura NIC, donde se funde en un solo concepto a las displasias y carcinomas *in situ* bajo la denominación de neoplasia intraepitelial cervical. Las neoplasias cervicales intraepiteliales aparecen con frecuencia en la zona de transición de los epitelios, así como en la zona de transformación [14].

El diagnóstico del NIC se establece mediante la obtención de un fragmento de tejido, son definidas

como alteraciones que comienzan con una formación atípica mínima y progresan hacia estadios de mayor anomalía intraepitelial, hasta un carcinoma epidermoide invasor. En 1988 aparece el sistema Bethesda, con la nomenclatura LEI, clasificada como de bajo y alto grado. La LEI de bajo grado unifica el condiloma plano, NIC I y displasia leve; y la LEI de alto grado unifica el NIC II, NIC III y la displasia moderada [14].

El carcinoma de cérvix tiene un desarrollo gradual, a partir de sus precursores preinvasores en las cepas intraepiteliales del cérvix, que *in situ* puede permanecer asintomático por varios años. Se considera que la lesión precursora del CaCu es la NIC, empiezan con una lesión bien diferenciada NIC I o displasia leve; pasan por una fase menos diferenciada NIC II o displasia moderada; luego una lesión intraepitelial indiferenciada NIC III (displasia severa o carcinoma *in situ*) y finalmente terminan en carcinoma invasor, cuando las células neoplásicas del epitelio cervical han atravesado a la membrana basal, e invadido el tejido subyacente. Existen lesiones preinvasoras que permanecen inalterables durante toda la vida, y solo un pequeño porcentaje progresa hacia CaCu. El periodo en el cual las lesiones que progresan de NIC I hacia NIC III, y hacia carcinoma invasor es muy variable, siendo generalmente de 10 a 20 años la edad en que las mujeres que presentan NIC I; y carcinoma invasor de 25 y 50 años [14]

#### Factores de riesgo y etiología

Las causas que establecen una posible relación para desarrollar CaCu son: el uso de anticonceptivos, factores higiénicos y el comportamiento sexual. Estando estrechamente asociado con infecciones virales, causadas por ciertos tipos de virus del papiloma humano (HPV) [14,15]. Por otra parte, un gran número de estudios químico-patológicos y moleculares, indican que el CaCu es una enfermedad de transmisión sexual y que el HPV es el agente transmisor [16].

### Virus del papiloma humano (HPV)

La clasificación taxonómica de los HPV es: Virus de DNA de doble cadena (dsDNA); no etapa de RNA; Papilomaviridae; Alphapapilomavirus; Papilomavirus Humano. Los papilomavirus son responsables del desarrollo de las lesiones epiteliales en mamíferos [17]. Hay aproximadamente 100 tipos de HPV's que infectan al ser humano, algunos de ellos están asociados a crecimientos benignos responsables de la aparición de las verrugas genitales o condilomas, como los tipos 6 y 11; mientras que otros están estrechamente asociados con la aparición y desarrollo del cáncer (figura 2), que constituye la enfermedad venérea de origen viral más difundida en el mundo. El genoma del HPV contiene 7904 pares de bases (pb), la cual incluye una región de control de aproximadamente 1000 pb, en la que se han identificado secuencias estimuladoras y represoras de la transcripción viral, así como el origen de replicación [18]. En los tipos de alto riesgo, se incluyen el 16, 18, 33, 35, 45, 52, entre otros; estos virus se han detectado en lesiones premalignas y malignas del tracto ano-genital. Recientes estudios epidemiológicos han demostrado que los tipos 16, 18 y 33 son agentes etiológicos del cáncer del cérvix, sus ácidos nucleicos se han detectado en un 90% de los casos [1,16]

### Características moleculares de los papilomavirus (HPV)

Los HPV son una familia de virus con una cadena pequeña de DNA y que inducen el desarrollo de tumores de epitelios y fibroblastos de piel. Estos inducen tumores, llamados papilomas generalmente son benignos y presentan un crecimiento limitado que frecuentemente sufre una regresión espontánea.

El DNA de los HPV es de doble cadena, circular y contiene aproximadamente 8000 pb. Los genomas de los diferentes tipos virales presentan una estructura básica muy similar, con homología en sus secuencias que van de moderada (45%), a alta (85%). Se han identificado marcos de lectura abierta (ORF), organizados en regiones de expresión temprana (E) y tardía (L) (figura 1; genoma de HPV). Los primeros codifican para proteínas relacionadas con la replicación (E1), transcripción (E2), y transformación celular (E6 y E7); los segundos codifican proteínas de la cápside (L1 y L2) [18].

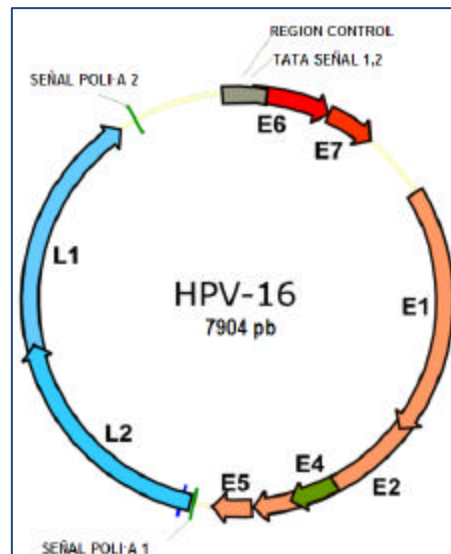
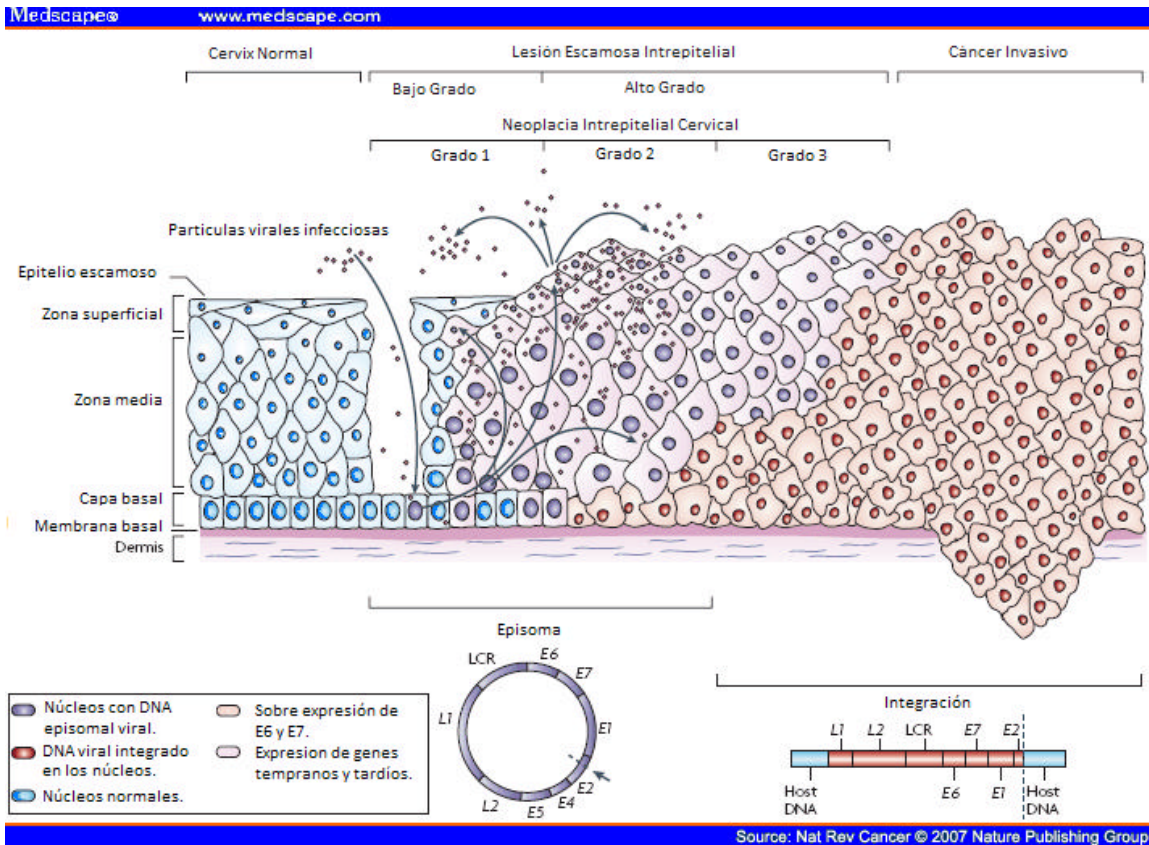


Figura. 1 | Genoma de HPV-16  
7904pb



**Figura. 2 | Progresión del HPV a cáncer cervical.** | Las células del epitelio basal cervical descansan sobre la membrana basal, que está apoyada en la dermis. El papilomavirus humano (HPV), como se piensa accesa al epitelio cervical por medio de microabrasiones a las células basales. Después de la infección, los genes tempranos; E1, E2, E4, E5, E6 y E7 son expresados y el DNA viral es replicado en el DNA episomal (núcleos púrpuras). En las partes más lejanas, (capas superiores del epitelio, zona media y zona superficial) el genoma viral es replicado, los genes tardíos L1, L2 y el gen temprano E4 son expresados. L1 y L2 encapsulan el genoma viral para formar los viriones progenitores en el núcleo. El virus entonces puede iniciar una nueva infección. Las lesiones intraepiteliales de bajo grado favorecen la replicación viral. Un número desconocido de infecciones de HPV de alto riesgo progresan a una neoplasia intraepitelial cervical de grado alto (NIC III). Las lesiones no tratadas progresan en un cáncer microinvasivo e invasivo y son asociadas con la integración del genoma del HPV dentro de los cromosomas del hospedero (núcleos rojos), con la pérdida asociada o la interrupción de E2 y por lo tanto la sobre regulación de la expresión de los oncogenes E6 y E7. LCR, es el gen largo de región control. Esquema modificado de Nat Rev Cancer, REF: [21].

### Oncogenes de HPV: E6 y E7

La capacidad de estos virus en transformar células normales en tumorales radica en unos genes particulares que forman parte del genoma viral llamados oncogenes. El nombre de oncogenes se dio por su habilidad para convertir células normales a un estado tumoral u oncogénico. El virus libera un mecanismo regulador que cambia las propiedades de crecimiento de la célula blanco. Los oncogenes de HPV son E6 y E7, que codifican proteínas multifuncionales que se unen e inactivan los genes supresores tumorales p53 y pRb respectivamente, además de que son capaces de immortalizar a las células blanco (figura 2) [1].

El gen E6, de aproximadamente 450 a 500 pb, codifica para una proteína de casi 150 aminoácidos con un peso molecular de 16 a 18 kDa. La proteína tiene un potencial oncogénico débil en algunas líneas celulares y coopera con E7 para la plena capacidad transformante e inmortalizante. E6 es de las que se expresan muy tempranamente durante una infección por HPV. Esto le confiere varias funciones que alteran el ambiente celular, como por ejemplo el bloqueo de la apoptosis mediante la degradación de p53, la alteración de la transcripción de genes celulares a través de la interacción con p300 y CBP, e incremento de la vida celular por la sobre activación de la telomerasa.

La acción clave de E6 de los VPH de alto riesgo (E6 – AR) es inhibir la función de p53, una proteína supresora de tumores, mediante su degradación por ubiquitinación [19,20]. Para ello E6 requiere a la proteína celular asociada a E6 (E6-AP). Esta proteína reemplaza a Mdm2, que en células normales no infectadas es quien degrada a p53. Este cambio reduce dramáticamente la vida media de p53 y el nivel de proteína en las células de CaCu a menos de la mitad del nivel presente en las células normales. La mayoría de las proteínas E6 de los HPV's de bajo riesgo (E6–BR) no se unen a p53 o lo hacen débilmente y no lo degradan. E6 también puede retener a p53 en el citoplasma bloqueando su translocación al núcleo y así inhibiendo su función independientemente de su degradación. En consecuencia E6 inhibe la capacidad de p53 para activar o reprimir la transcripción de sus genes blanco. E6 puede superar la apoptosis dependiente e independiente de p53. A este último respecto se ha visto que E6 interactúa con Bak, una proteína pro-apoptótica que se expresa en altos niveles en las capas superiores del epitelio en diferenciación. El incremento de p53, que se daría por la proliferación inducida por el VPH, así como la consecuente inducción de apoptosis, probablemente mataría a una célula infectada por VPH antes de que la replicación de este ocurriera. Por tanto la modulación de los niveles de P53 por parte de E6 es importante para una infección productiva [19,20].

#### **Factores que interactúan con la transcripción de los oncogenes**

Los oncogenes E6 y E7 se expresan selectivamente en líneas derivadas de tumores humanos y se conservan intactos durante la integración del DNA viral al genoma celular. [18,19] La proteína E6 tiene una gran afinidad por el DNA y se ha encontrado tanto en el núcleo como en la membrana plasmática [20]. La proteína E7 es una fosfoproteína que se ha localizado en el citoplasma y en el núcleo [21]. El gen temprano E2, participa en el control de la expresión de estos oncogenes. Varios factores proteicos, de origen tanto viral como celular, interactúan con la región reguladora del HPV, y participan en la regulación de la transcripción de los oncogenes: E6 y E7. Se ha demostrado que esta proteína E2 activa fuertemente la transcripción de diversos papilomavirus. Factores celulares, tales como el sistema inmune, oncogenes ó antioncogenes; parecen jugar un papel importante en la carcinogénesis asociada con los HPV's [22].

#### **Líneas celulares tumorales**

Durante décadas, las líneas celulares inmortales humanas de cáncer han constituido un modelo biológico accesible para investigar el cáncer y explorar la eficacia potencial de medicamentos anticáncer. Sin embargo, las líneas celulares han sido sujetas a la crítica porque pueden representar un subgrupo sumamente seleccionado de las clases de cánceres de las cuales originaron o pudieron haber adquirido anomalías genéticas adicionales *in vitro*. Además, que ciertas líneas celulares de cáncer se han contaminado con otras líneas y así la procedencia de una línea celular no siempre es clara [23]. La mayoría de los estudios sobre las bases moleculares del cáncer utiliza células en cultivo, es importante observar primero estas células, para

posteriormente observar tumores en animales de experimentación y en el hombre. De esta manera se pueden ver la mayoría de las propiedades de este mal, que en último término deben ser explicadas mediante el análisis celular y molecular [2].

### **Sistema Inmunológico**

El sistema inmunológico se encarga de la vigilancia y protección del organismo, eliminando microorganismos, virus, sustancias y moléculas externas que actúan como antígenos. El sistema inmunológico tiene la capacidad de reconocer diferentes antígenos y generar una respuesta contra ellos, además de mantener a su vez, una tolerancia con los componentes del propio organismo. Existen dos mecanismos a través de los cuales el sistema inmunológico genera una respuesta para defender al organismo: uno es la inmunidad innata y el otro es la inmunidad adaptativa. La finalidad de ambos mecanismos es la eliminación de antígenos, cada uno de estos mecanismos difieren en la manera específica de reconocer antígenos [24].

La inmunidad innata se refiere a la fisiología normal y mecanismos anatómicos de protección, no requiere características de memoria o especificidad, los mecanismos limitan el acceso al cuerpo iniciando con una respuesta inflamatoria, y con la adquisición de la respuesta inmune, eliminando y aislando antígenos. Esta se caracteriza por ser la primera línea de defensa del organismo, en ella participan los neutrófilos, macrófilos-monocitos y células asesinas naturales (NK); el mecanismo que emplean para lograr su función es la inhibición y eliminación del antígeno [25].

Las funciones de la inmunidad innata no son independientes de la inmunidad adquirida. En la inmunidad adquirida participan los linfocitos T, linfocitos B y moléculas de membrana; que promueven la lisis, la inhibición y muerte de las células antigénicas blanco. Este mecanismo se subdivide en inmunidad adquirida humoral e inmunidad adquirida celular, dependiendo de las células participantes en cada uno de estos procesos [24].

### **Inmunidad frente a los virus**

Los virus son entes intracelulares obligados, se replican dentro de las células utilizando con frecuencia la maquinaria de síntesis de ácidos nucleicos y proteínas del hospedero. Típicamente los virus infectan una amplia variedad de poblaciones celulares, utilizando moléculas normales de la superficie celular como receptores, para penetrar a las células; una vez que penetran la célula los virus producen lesión tisular y/o enfermedades por varios mecanismos. La replicación viral interfiere con la síntesis proteica celular normal y con su función. Este es un tipo de efecto citopático de los virus y se dice que la infección es lítica, porque la célula infectada muere. Los virus no citopáticos, producen infecciones latentes, durante las cuales residen en las células del hospedero y elaboran proteínas que son extrañas para el hospedero y que estimulan la inmunidad específica. Los virus citopáticos y no citopáticos pueden desarrollar diferentes tipos de respuestas inmunitarias específicas [24].



### Inmunidad innata frente a los virus

En respuesta a la infección viral existen dos mecanismos principales de inmunidad innata: la producción de IFN de tipo I por las células infectadas, que inhiben la replicación viral y las células NK que lisan una amplia variedad de células infectadas por virus, puede ser uno de los mecanismos fundamentales de inmunidad frente a los virus al inicio del curso de la infección, antes de que se desarrollen respuestas inmunitarias específicas. Las células NK también reconocen y lisan eficazmente células infectadas en la que los virus pudieron haber inhibido antígenos y la expresión de Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I (MHC-I, por sus siglas en inglés) [24].

Las células NK son elementos linfoides con la capacidad de destruir una amplia variedad de elementos tumorales, especialmente tumores hematopoyéticos *in vitro* y células infectadas por virus, son distintas a los linfocitos T o B; no requieren un proceso de maduración intra-tímica, no sufren arreglos del receptor de células T, no expresan el antígeno CD3; aunque sí expresan CD2, poseen receptores de baja afinidad para el fragmento Fc de la IgG (CD16), expresan las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  del receptor de interleucina 2 (IL-2). A diferencia de las células B, no expresan CD19, CD20, CD21 ni inmunoglobulina de superficie, no sufren arreglos en los genes que codifican inmunoglobulinas y finalmente son fagocíticas [26].

La aparición de los linfocitos T citotóxicos (CTLs por sus siglas en inglés) se estimula preferencialmente por antígenos tumorales, por productos del MHC-I expresados en la superficie celular y por antígenos virales. Los CTLs requieren contacto íntimo con la célula blanco para ejercer su acción letal, aunque éste contacto no necesita ser mayor de un minuto. La interacción CTLs-célula blanco, requiere varias condiciones para ser eficiente: el CTLs debe ser viable y metabólicamente activo, debido a que la adherencia a la célula blanco requiere energía, el medio debe contener cationes divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ). Por otro lado la célula blanco funciona únicamente como portadora del antígeno. Mediante técnicas de micromanipulación se ha demostrado que un solo CTLs puede destruir varias células blanco en forma secuencial [26].

El "golpe letal" con que el linfocito provoca la muerte de las células blanco, actúa por dos distintos mecanismos; en el primero se observa que pocos minutos después de establecido el contacto con un CTLs, la célula blanco se hincha, perdiendo moléculas. En el segundo, la señal mediada probablemente por la subunidad  $\beta$  de la linfoxina, actúa como ligando del antígeno Fas, induciendo el proceso de apoptosis de la célula blanco [26]. Las células NK comparten con los CTLs su capacidad para destruir directamente ciertas células en ausencia de anticuerpo, pero difieren de esos linfocitos en que no requieren sensibilización previa y no muestran especificidad inmunológica clásica. Las células NK son susceptibles de activarse por diversas citocinas sin tener que cumplir el requisito, que han de llenar las células CTLs, de haberse activado previamente por un antígeno. La actividad de las células NK se incrementa en presencia de Interferones, IL-2, IL-12 y el factor de necrosis tumoral (TNF) [26].

### Receptor NKG2D

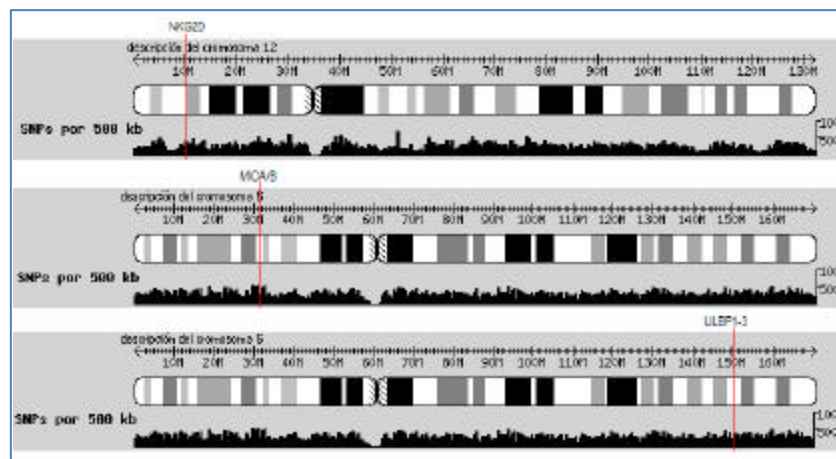
El receptor NKG2D fue el primer cDNA clonado de células NK y fue relacionado con NKG2A y NKG2C. Sin embargo, NKG2D es distinto a las otras moléculas de NKG2 por muchas razones; está constituida por un



enlace homodimérico de disulfuro en células NK-T, células  $\gamma\delta$  T, células CD8+T, células T y macrófagos [27]. NKG2D no tiene arreglos citoplasmáticos conocidos y fue el primero en el que se demostró su asociación preferencial con una cadena de señalización conocida como DAP10. NKG2D podría comportarse como una molécula co-estimuladora sobre las células T [28]. En humanos, los ligandos NKG2D son proteínas relacionadas con aquellas de MHC clase-I, MICA, MICB y la familia de proteínas de unión a UL-16, (ULBP) [27,29]. Los genes MICA y MICB están relacionados a la región de HLA y tienen una expresión limitada a células epiteliales y endotelio vascular, mientras parece que las moléculas de ULBP están expresadas adicionalmente por un arreglo más amplio de tejido [30].

### Genes relacionados con el Complejo Mayor de Histocompatibilidad

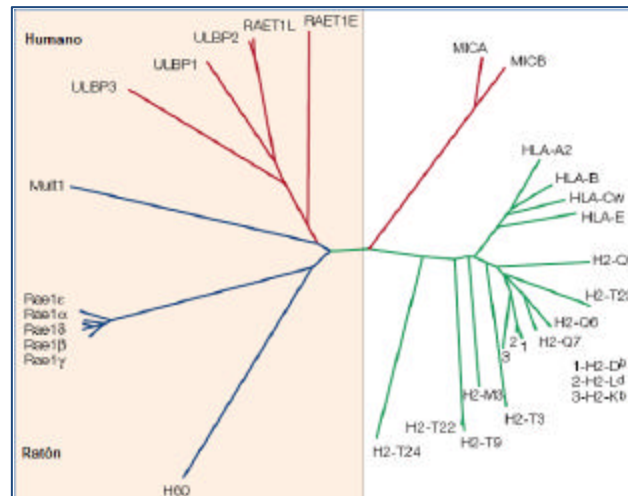
La búsqueda de nuevas secuencias codificadoras en la región cercana al locus HLA-B para dilucidar la asociación entre el HLA-B27 con enfermedades reumatoides e inflamatorias condujo al descubrimiento de una nueva familia, los genes MIC consisten en siete miembros, MICA, MICB, MICC, MICD, MICE, MICE y MICEG [31-35]; de los cuales sólo MICA y MICB codifican para transcritos de mRNA, mientras que MICC, MICD, MICE, MICE y MICEG son pseudogenes [31,36]. En contraste con el amplio conocimiento de los genes clásicos del MHC que han estado bajo intensa investigación, poco es lo que se conoce de los genes MIC. Recientemente se ha publicado su estructura [37] y se han comenzado a hacer investigaciones en cuanto a la regulación de su expresión, su distribución en los tejidos y su variabilidad alélica [38]. Se han encontrado miembros de una nueva familia de moléculas relacionados con MHC clase-I, los ULBP's. Los ULBP's y los MIC tienen la característica de unirse al receptor NKG2D/DAP10 y proporciona una señal positiva para la activación de la citotoxicidad de la célula NK. Las formas solubles del ULBP's pueden unir a las células NK e inducir citocinas y producir quimiocinas, su ubicación cromosómica al igual que los genes MIC se encuentra en el cromosoma 6 (figura 3) [39].



**Figura 3 | Ubicación de los ligandos de NKG2D.** Representación esquemática de la ubicación de los genes MICA, MICB, ULBP1, ULBP2 y ULBP3; donde además se muestra los SNP's por 500kb. **Figura reproducida con precisión de Perlegen Genotype Browser, REF: 39.**

### Características moleculares de los genes MICA y MICB

MICA y MICB son los miembros más divergentes de los genes humanos del MHC clase I identificados hasta el momento y se ha sugerido que los MIC se conserva en la mayoría de las especies de mamíferos. La excepción más difundida es la del ratón en el que no se ha detectado la presencia de esta familia de genes en su genoma, aunque se cree que posiblemente se encuentra su contraparte evolutiva que compensa su ausencia [40]. El análisis filogenético de MICA sugiere que este gene es divergente de los demás genes del MHC- I después de la aparición de los anfibios pero antes de la separación de mamíferos marsupiales y placentarios [41,42].



**Figura 4| Diversidad de ligandos de NKG2D.** Representación de un dendrograma que relaciona los diferentes ligandos de NKG2D, moléculas del MHC-I y otras. La extensión de las secuencias relacionadas entre dos proteínas es demostrada por el total de distancia de las líneas que conectan esas proteínas. Como conclusión, el transcrito temprano de ácido retinoico 1 (Rae1) y las proteínas H60 tienen de un 20–28% de compatibilidad en sus niveles de aminoácidos. Los ligandos de NKG2D que se muestran en azul son de ratón y rojo de humano. Los grupos que se encuentran en el gráfico consisten en una larga familia de proteínas humanas y de ratón Rae1, H60, Mult1, ULBP y RAET1 y se distinguen de las proteínas relacionadas a MHC-I, MICA y MICB. **Figura reproducida con precisión de REF: 42.**

La organización genómica de MICA y MICB es muy similar entre sí, pero completamente diferentes de otros genes de clase I. Ambos genes comparten una homología del 90% en sus regiones codificadoras [40]. MICA y MICB son similares en estructura, aunque si los comparamos con las moléculas del MHC clase I sólo comparten una similitud del 19%, 25% y 35% con respecto a los dominios a1, a2 y a3 [31]. Las moléculas de MICA y MICB no se asocian con la  $\beta$ -2-microglobulina para su expresión fisiológica en la superficie celular [43], sus niveles de mRNA no son afectados por el Interferón gamma, que es un inductor clásico para las moléculas de clase I [37].

### Genes ULBP

Se identificaron tres proteínas humanas que unen a la proteína UL16 relacionada con el citomegalovirus humano (HCMV), que son codificadas por una familia génica que es homóloga a la familia de genes en el ratón, Rae1/H60/Mult1 [29]. La proteína UL16 fue estudiada porque fue una proteína viral candidata

involucrada en la evasión de la respuesta inmune. Las proteínas que se unen a UL16 fueron designadas como proteínas de unión de UL16, ULBP's o RAET1 [44]. La mayor parte de las proteínas RAET1 están unidas a la membrana celular y al NKG2D. Sin embargo dos miembros de la familia, RAET1E (ULBP4) y RAET1G, presentan dominios transmembranales [44,45].

### **Modelos de expresión en ligandos de NKG2D**

Si bien muchos de los estudios sobre modelos de expresión de los diferentes ligandos se realizan en células normales en adultos, estos se encuentran generalmente ausentes o en niveles bajos; pero en condiciones patológicas su expresión es a menudo mayor. Esto es claramente ejemplificado en personas normales, MICA y MICB están expresados sólo por células epiteliales intestinales, quizá como una consecuencia del estímulo de la flora bacteriana [46]. En contraste la expresión del mRNA de MICA y MICB en células normales es menor, mientras que la de las ULBP's es mucho más baja. La expresión de la proteína en la superficie de las células es baja o no ha sido documentada. Sin embargo, las ULBP's son expresadas en niveles funcionales sobre la superficie celular de numerosas líneas celulares tumorales, indicando que, estas moléculas podrían ser reguladas a otro nivel de transcripción [47]. MICA y MICB se encuentran sobre-expresadas en muchas líneas celulares tumorales y por tumores primarios de origen epitelial [48]. Su sobre-expresión se cree que es resultado de la activación de elementos transcripcionales en los promotores de choque térmico [46]. A diferencia de MICA y MICB que su expresión está regulada por la participación del gen HSP70, promotor de proteínas de choque térmico, los ULBP's no han sido implicados en la regulación de su expresión [49].

La expresión de los ligandos de NKG2D está también sobre-expresada en células que han sido infectadas con patógenos. La inducción de expresión de MICA, MICB y ULBP's por las células infectadas se ha observado en cultivos primarios de fibroblastos y células endoteliales [50]. La expresión de MICA fue sobre-expresada en células infectadas con *Escherichia coli* y *Mycobacterium tuberculosis* [51]. La sobre regulación de la expresión de los ligandos de NKG2D por células tumorales o células infectadas indica que el sistema es activado por una respuesta de señalización o por una combinación de eventos de señalización que ocurren en células estresadas pero no en células normales. Otro aspecto que llama la atención es que la expresión de MICA no se registra en células del linaje linfohematopoyético, aunque si son estimuladas con el activador de proliferación fitohemaglutinina se induce su expresión [52].

### **El estímulo de células inmunes por NKG2D**

Se ha reportado que los ligandos se diferencian cuantitativamente en sus efectos por su afinidad por el receptor NKG2D (figura 5) [53]. Actualmente, la importancia de tales diferencias no ha sido documentada en humanos [54]. En general, la lisis de las células tumorales se da por la expresión de los ligandos de NKG2D, indicando que es un importante receptor en el reconocimiento de células blanco [47]. En las células NK, el entrecruzamiento del anticuerpo NKG2D con ligandos multivalentes solubles como los ULBP's estimula la producción de varias citocinas incluyendo IFN- $\gamma$ , el factor de necrosis de tumoral (TNF), linfotoxinas y el factor de estimulación colonial de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), así como quimiosinas como; CCL4 (proteínas inflamatorias de macrófagos 1  $\beta$ , MIP1 $\beta$ ) y CCL1 (I-309) [55]. Interesantemente la células blanco que expresan ligandos de NKG2D, expresan niveles normales de MHC clase-I,[47].

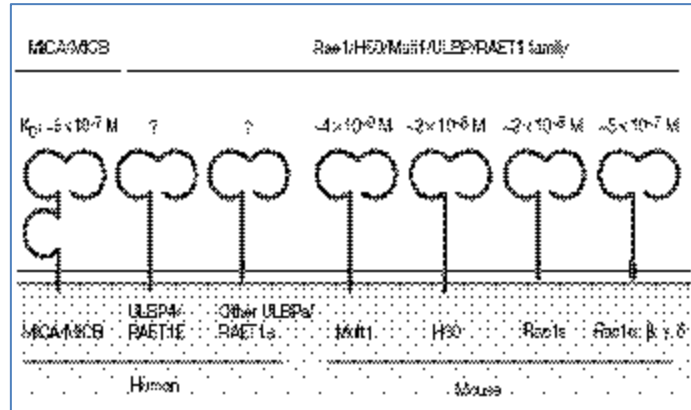


Figura 5] Estructuras de dominio y afinidad de varios ligandos de NKG2D. MICA y MICB, tienen un dominio  $\alpha 3$  por el contrario de los otros ligandos. A pesar de la presencia del dominio  $\alpha 3$  las moléculas de MHC-I, no se unen a  $\beta 2$ -microglobulina. Algunos de los ligandos, como el transcrito temprano del ácido retinoico 1 (Rae1) y algunas proteínas de unión a UL16 (ULBP's) están unidas por un glicosilfosfatidilinositol (GPI) a la membrana (vistos en rojo), MICA, MICB, H60, Multi1 y algunos ULBP's son proteínas transmembranales tipo 1. La afinidad de los ligandos de NKG2D, están representados con la constante de equilibrio de disociación (KD). REF: 53.

### Rutas de activación para NKG2D

Muchos receptores de reconocimiento primarios, del sistema inmunológico son moléculas que contienen subunidades responsables del reconocimiento del ligando asociado a la señalización ('adaptador'). Las subunidades de reconocimiento generalmente contienen un residuo cargado en el dominio transmembranal que permite interacciones con residuos opuestos, cargados en los segmentos transmembranales de las moléculas del adaptador. La mayor parte de estas subunidades del adaptador incluyen las moléculas CD3 o proteína activada DNAX de 12 kDa (DAP12), que contienen un inmunoreceptor citoplasmático ITAM, (inmunoreceptor activador del arreglo de la tirosina base). El receptor induce la fosforilación de la tirosina del ITAMS, el reclutamiento y la activación de SYK o la cadena-? asociada a la proteína 70 kDa (ZAP70) [28].

La presencia de un aminoácido cargado en el dominio citoplasmático implica un papel estimulador para NKG2D, mostrando una asociación con una molécula adaptador conocida como proteína activada DNAX de 10 kDa (DAP10) [28], que es inusual porque carece de un ITAM en su dominio citoplasmático y en cambio contiene un adorno diferente de tirosina que es similar a los encontrados en receptores de co-estimulación como CD28, moléculas de inducción co-estimuladora (ICOS) y CD19 [28,56]. Los genes ortólogos de MICAB y los ULBP's, son las moléculas de adhesión intracelular ICAM1/2 y CD48 molécula de la familia CD2, ambos de la superfamilia de la inmunoglobulina (figura 6) [57].



### **Justificación**

Los ligandos MICA, MICB y ULBP's, al unirse a su receptor NKG2D/DAP10 proporcionan una señal para la activación de la citotoxicidad de las células NK y linfocitos T citotóxicos [39]. Estudios previos han demostrado que estos ligandos están ausentes en células normales o son expresados en niveles bajos [46]. Además, se ha visto que hay una desregulación de la expresión en células tumorales, células infectadas y en tumores estimulados por carcinógenos, indicando que la expresión de estos ligandos es inducida después de la tumorigénesis [60]. Investigar la expresión de los ligandos de NKG2D: MICA, MICB, ULBP1, ULBP2 y ULBP3; y si están regulados en el cáncer cérvico uterino, en particular por líneas celulares con HPV 16, 18 y negativas; aportará un conocimiento sobre la biología de los tumores asociados a infecciones virales y un indicio del porque no son eliminados.

### **Hipótesis**

La células derivadas de cáncer cérvico uterino podrían inducir una desregulación en la expresión de los ligandos del receptor NKG2D, y por lo tanto lo anterior podría estar evadiendo al sistema inmune.

### **Objetivo general**

Determinar la expresión de los ligandos del receptor NKG2D: MICA, MICB y ULBP's, en líneas derivadas de carcinoma de cérvix.

### **Objetivos particulares:**

Analizar el patrón de expresión de MICA, MICB, ULBP-1, ULBP-2 y ULBP-3, mediante RT-PCR en tiempo real, en las líneas celulares: ViBo, C-33, Ca Ski, SiHa, Vipa, Rova, InBL, HeLa, CaLo, con respecto al mRNA de células epiteliales negativas a HPV y al cáncer.



## Material y Métodos

### Líneas celulares

El material biológico consistió de nueve líneas celulares de CaCu, obtenidas del Laboratorio de Oncología, de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer (UIDCC), de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. Las células se encontraban almacenadas en una solución de medio RPMI y dimetilsulfóxido 10% (DMSO), en un criocontenedor con nitrógeno líquido, a una temperatura de -195 °C. De estas líneas cinco eran positivas para el HPV tipo 18 (CaLo, HeLa, INBL, Rova, Vipa); dos líneas con el HPV tipo 16 (Ca Ski, SiHa) y dos líneas negativas para el virus (ViBo, C-33) [70]. Se utilizó RNA total de tejido de cérvix no afectado como control negativo para el HPV; proporcionado por el Dr. Benjamín Garrido, del Departamento de Genética y Biología molecular del CINVESTAV.

### Cultivo celular

El cultivo celular es una técnica usada en la mayoría de los procedimientos bioquímicos y moleculares, requiriendo la obtención de una gran cantidad de células para después aislar sus componentes, y así obtener la mayor información de un tipo celular. El cultivo celular es el proceso por el cual las células crecen bajo condiciones controladas en medios de cultivo líquidos o sólidos [64]. Las líneas celulares humanas de cáncer, han constituido accesibles modelos biológicos para investigar la biología del cáncer [65]. El conocimiento previo de sus anomalías genéticas puede permitir una opción más detallada del comportamiento de las células cancerígenas *in vivo* en experimentos biológicos [2].

### Líneas celulares infectadas con el virus del papiloma humano tipo 16

La línea celular SiHa establecida en el año 1975, tiene una identidad étnica asiática. Esta línea celular es de origen de carcinoma de cérvix, establecida de fragmentos de una muestra de tejido escamoso primario quirúrgicamente obtenida, tiene un estadio clínico II. La línea esta reportada con el virus del papiloma humano (HPV-16, de una a dos copias por célula) integrado en el contenido de su genoma [66,67]. La línea celular Ca Ski establecida en el año 1977, tiene una identidad étnica caucásica. Esta línea celular se originó de tejido cérvico uterino por un carcinoma epidermoide, derivada de células metastásicas producidas por el intestino delgado mesentérico. Las células están reportadas con el HPV-16, con alrededor de 600 copias por células [66-68].

### Líneas celulares infectadas con el virus del papiloma humano tipo 18

La línea celular Hela, tiene una identidad étnica africana. Tiene un origen de adenocarcinoma metastásico, con un diagnóstico clínico estadio IVB [67]. Las líneas celulares con una identidad étnica mestizas: CaLo, con un diagnóstico clínico de carcinoma epidermoide de células grandes, no queratinizadas y un estadio clínico; IIIB [69,70]. La línea celular InBL, tiene un diagnóstico, de carcinoma epidermoide de células grandes, no queratinizadas, con un estadio clínico IVB. Las líneas con un estadio IIB, y con un diagnóstico clínico de carcinoma epidermoide son ViPa y Rova [69].

### Líneas celulares negativas al virus del papiloma humano

La línea celular C-33 establecida en el año de 1964, tiene una identidad étnica caucásica. Es derivada de una biopsia de cáncer cervical. Sus células son negativas para DNA y RNA del HPV [67]. La línea celular ViBo, su identidad étnica es mestiza y se deriva de un carcinoma epidermoide. Sus células son negativas a HPV [70].

### Siembra

Las líneas celulares de CaCu, se cultivaron en un medio líquido RPMI 1640 (Gibco BRL, USA), con rojo fenol y antibiótico (Pengesed: bencilpenicilina de  $5 \times 10^6$  unidades), suplementado con suero fetal bovino (SFB, Gibco BRL, USA) al 10% v/v e inactivo. El SFB se descongeló, a temperatura ambiente, y se colocó a baño María a  $56^\circ\text{C}$  durante 30min., para inactivar algunas proteínas de bajo peso molecular, como las proteínas del complemento, obteniendo una mayor eficiencia en la nutrición celular. Se recomienda hacer alícuotas de 50mL y almacenarlas a  $4^\circ\text{C}$ . Las células se mantuvieron en una incubadora (From Scientific, USA) en una atmósfera de 5%  $\text{CO}_2$ ; a una temperatura de  $37^\circ\text{C}$  y un ambiente saturado de humedad.

### Cosecha

Para desprender las células tumorales adherentes, se empleó verseno y/o tripsina, que son [enzimas](#) que rompe los enlaces peptídicos mediante [hidrólisis](#) para formar [péptidos](#). Las células fueron cosechadas hasta alcanzar confluencia. Para preparar un litro de solución de verseno, pH a 7.7 (se esteriliza a 120lb de presión, durante 20min), se disuelven en 800mL de agua bidestilada y se afora a 1000mL los siguientes reactivos:

- |  |       |
|--|-------|
| ▪ Tris (Sigma, Chem, USA)                              | 3.04g |
| ▪ Cloruro de Sodio (Sigma, Chem, USA)                  | 8.00g |
| ▪ Cloruro de Potasio (Sigma, Chem, USA)                | 0.40g |
| ▪ Ácido-etilen-diamin-tetra-acético (Sigma, Chem, USA) | 0.40g |

La Tripsina se filtra con una membrana de  $0.22\mu\text{m}$  en un recipiente previamente esterilizado. (*Se recomienda hacer alícuotas de 50mL y almacenar a  $4^\circ\text{C}$  hasta su utilización*). Para preparar 500mL se disuelven en PBS los siguientes reactivos:

- |   |        |
|---|--------|
| ▪ Tripsina (Sigma, Chem, USA)                         | 1.250g |
| ▪ Ácido-etilen-diamin-tetra-acético(Sigma, Chem, USA) | 0.075g |

Una vez cosechadas las células se observaron en un microscopio invertido de contraste (DM IL Leica, Alemania). Las células se centrifugaron a  $12.000g$  durante 5min. Se retiró el sobrenadante y se diluyó el botón celular agregando un volumen de 2mL de RPMI. Se colocó  $100\mu\text{L}$  de la muestra diluida en una cámara de Neubauer (American Optical, USA); se observó en el microscopio óptico (EC3 Leica, Alemania), de forma que se cubrió un área de  $1\text{ mm}^2$  (objetivo 10X). El área del cuadro central es de  $1\text{ mm}^2$  y se encuentra subdividida en 25 cuadrantes. Cada uno de estos cuadrantes mide 0,2 mm de lado, por lo que el área de cada uno será de  $0,04\text{ mm}^2$ . Al colocar el cubreobjetos sobre el portaobjetos se tiene una profundidad de 0,1mm (figura 6), de forma que el volumen contenido en cada uno de los cuadrados grandes será  $0,1\text{ mm}^3$  ( $1,0\text{ mm}^2 \times 0,1\text{ mm} = 0,1\text{ mm}^3$ ).

El conteo con la cámara se llevó a cabo de la siguiente forma: Se limpió con papel de arroz la cámara de Neubauer. Se colocó el cubreobjetos sobre los canales, tal como se indica en la figura 6. Se agitó con vortex

la muestra diluida. Con ayuda de una micropipeta se toma 100  $\mu$ L. Se colocó la cámara en la platina del microscopio y se enfocó con el objetivo 10x. Se localizó el cuadro central (ubicando la cuadrícula de 25 cuadros de 0,04  $\text{mm}^2$ ), y se hizo el cambio al objetivo 40x y se contaron las células (figura 8), en el cuadrado central tomando precauciones para evitar contar dos veces la misma célula u omitir alguna [72].

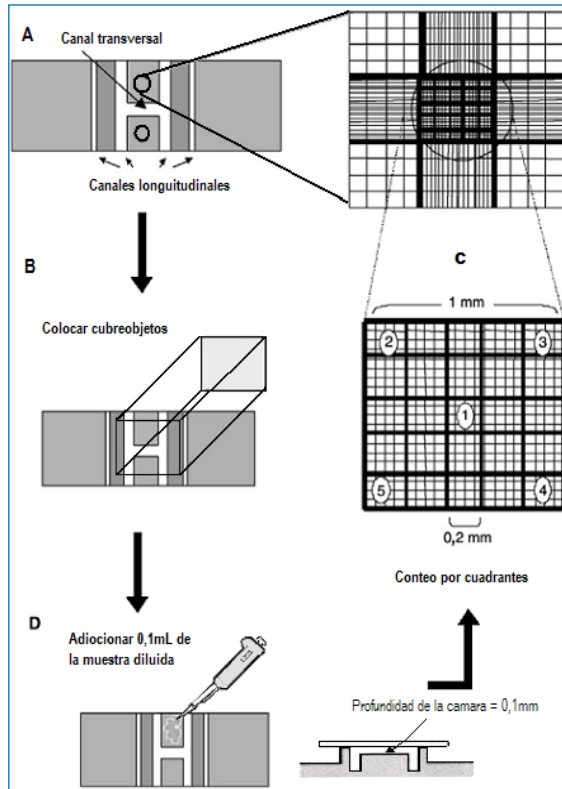


Figura8 | Esquemización del procedimiento para el uso de la cámara de Neubauer. **A.** cámara donde se muestra el cuadrante que se emplea para el conteo celular, visto desde el microscopio, **B.** Se coloca un cubre objetos, **C.** En caso de que haya muchas células se utilizan los cuadrantes 1, 2, 3, 4 y 5, de lo contrario se cuentan todos. **D.** Se adicionan 0.1mL de la muestra en ambos cuadrantes para obtener la media aritmética de ambos cuadrantes.

**Determinación de la densidad celular**

Se calculó el número de células aplicando la fórmula:

$$Nc = \frac{Ct(10000)(\bar{X})(V)}{Cc}$$

Donde:

Nc: número de células

Ct: cuadrantes totales

Cc: cuadrantes contados

10,000: factor de conversión

X: la media aritmética del número celular contado en los cuadrantes de ambos campos.

V: volumen colocado en el botón celular

**Extracción de RNA**

La extracción del RNA de las células cultivadas, se realizó utilizando el paquete comercial "Perfect RNA mini", (Eppendorf, Alemania) (Ver Tabla 3 y 4). Teniendo el número celular deseado, se procedió con la extracción de RNA. Se tomaron las precauciones necesarias para no contaminar los componentes del paquete comercial y el RNA de las muestras con RNasas, utilizando guantes durante todo el procedimiento. Todo el material de cristal se esterilizó con una autoclave a 120lb de presión durante un periodo de 20min y se lavó con una solución al 10% de dietilpirocarbonato (DEPC) a temperatura ambiente.

**Tabla 3. | Materiales suministrados en el paquete.**

<b>Componentes</b>	<b>Cantidad</b>
Solución de Lisis	17.5 ml
Solución Perfect RNA Binding Matrix	10.0 ml
Solución de lavado 1	35.0 ml
Solución de lavado 2 Concentrado	12.0 ml
Agua grado molecular	1.50 ml
Columnas de centrifuga, libres de RNasa	50
Tubos colectores de 1.9mL, libres de RNasa	100

Antes de utilizar el paquete comercial, se adicionaron 17.5µL de β-Mercaptoetanol (14.5M) a la solución de lisis, se mezcló bien y se almacenó a temperatura ambiente. Se realizó una dilución de la solución de lavado 2; justo antes de utilizarla, y se combinó con 4 volúmenes de etanol al 95%. Se mezcló y se guardó la dilución a temperatura ambiente. De la solución de lavado 2, se requirió 1mL para cada muestra procesada (se utilizan ~1x10<sup>6</sup> células). Antes de usarse la solución "Binding Matrix" se mezcló minuciosamente, ya que, ésta solución está en suspensión.

**Tabla 4. | Material requerido**


---

Vortex
β-Mercaptoetanol (14.5 M)
70% Etanol
95% Etanol
1.5 ml tubos de microcentrífuga
Microcentrífuga
Baño maría o incubadora a 50°C

---

Lisis de las muestras: Para extraer el RNA total del botón celular, se agregó 350µL de solución de lisis por cada  $1 \times 10^6$  células, se mezcló vigorosamente con vortex (Vortex-Genie 2, Daigger, USA) resuspendiendo varias veces. Se transfirió la muestra a un tubo de 1.5mL y se centrifugó a 12,000 x g, durante 5 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo de 1.5mL, teniendo cuidado de no transferir ningún material sólido. Al sobrenadante se le agregó 350µL de etanol al 70% y se mezcló gentilmente por inversión repetidamente. *Nota: si el mezclado es muy vigoroso la producción podría decrecer 2 o 3 veces. Un fino precipitado podría verse en este punto, esto es normal y no interfiere con el procedimiento posterior.*

Se adicionó 200µL de la solución "Binding Matrix" a la mezcla anterior y se mezcló generosamente por inversión. Se colocó una columna del paquete comercial "Perfect RNA mini" dentro de un tubo nuevo de 1.5mL, con cuidado se tomó el mezclado de lisis/Binding Matrix con una pipeta y se colocó dentro de la columna. Se centrifugó a 12,000x g durante 30 segundos, se descartó el filtrado del tubo de colección y se regresó a la columna al mismo tubo de microcentrifugación. Se realizaron lavados agregando 700µL de la solución de lavado 1 y se centrifugó a 12,000x g durante 30 segundos. Se descartó el filtrado y se regresa la columna al mismo tubo colector. Se centrifugó durante 30 segundos para quitar cualquier solución de lavado 1 residual de la columna. *Nota: un error en estos pasos causaran un resultado inaceptable en la pureza del RNA.*

Se colocó la columna en un tubo de colección de 1.5mL nuevo, se lavó el RNA añadiendo 500µL de la Solución de Lavado 2 Diluido, en la columna y se centrifuga a 12,000x g durante 15 segundos, descartando el filtrado y se regresa la columna al mismo tubo colector. Se lavó el RNA por segunda vez añadiendo 500µL de la solución de lavado 2 diluido en la columna, se centrifuga a 12,000x g durante 15 segundos. Se descartó el filtrado y se regresó la columna al mismo tubo colector. Se centrifugó nuevamente a 12,000x g durante 30 segundos para remover cualquier residuo de la solución de lavado 2 en la columna. Se transfirió a la columna a un tubo colector de 1.5mL nuevo libre de RNasas y se eluyó añadiendo 50µL de agua (grado molecular) directamente a la matriz. Se mezcló con vortex por un segundo para humedecer completamente la matriz. Se incubó la columna a 50 °C por 5 minutos y se mezcló con vortex durante 5 segundos e inmediatamente se centrifuga a 12,000x g durante 2 minutos; el RNA se almacena a -80 °C, para su uso posterior [73].

### Electroforesis

La integridad del RNA se determinó corriendo 1  $\mu$ l en un gel de agarosa al 2% durante 1 h, usando los siguientes reactivos como se describen en la Tabla 5, al término de lo cual fue visualizado en un transiluminador.

**Tabla 5. Reactivos para geles de agarosa al 2%**

RNA Experimental	2 $\mu$ L
TBE 1X	100mL
Agarosa	1g

La agarosa se mezcló con el TBE en un matraz Erlenmeyer de 250mL y se calentó durante 1 minuto y se agregó el bromuro de etidio para visualiza los productos de la extracción. Se colocó el gel en la charola de la cámara de electroforesis y se dejó enfriar. Posteriormente se colocaron las muestras con una solución amortiguadora de carga y se observó el gel en un transiluminador (UV, USA) y se fotografió para observar la calidad del RNA.

### Transcripción reversa (RT)

Se llevó a cabo la reacción de transcripción reversa (RT) (Ver figura 7), usando el Sistema de Transcripción Reversa Improm-II (Promega, USA), de acuerdo al protocolo del fabricante la reacción experimental se preparó como se muestra en Tabla 6.

**Tabla 6. Reacción experimental RNA y oligo (dT)**

RNA Experimental	2 $\mu$ L
Oligo (dT) 15, 0.5 $\mu$ g/ $\mu$ L (0.5 $\mu$ g/reacción)	1 $\mu$ L
Agua libre de Nucleasas	<u>2<math>\mu</math>L</u>
Volumen Final	5 $\mu$ L

Los tubos se colocaron en un bloque precalentado a 70°C durante 5 minutos, e inmediatamente se enfriaron en hielo durante 5 minutos. Se centrifugaron los tubos durante 10 segundos para recoger el condensado y mantener el volumen original. Se mantuvieron los tubos cerrados sobre el hielo hasta que la mezcla de reacción de transcripción fue añadida.

Se preparó la mezcla de reacción en un tubo estéril de 1.5mL sobre el hielo, para un volumen de 15 $\mu$ L por cada reacción de síntesis de cDNA, de acuerdo a los volúmenes de la tabla 7.

**Tabla 7. | Mezcla Maestra de RT.**

Agua libre de Nucleasas	7.0µL
Amortiguador de Reacción, ImProm-II 5X	4.0µL
MgCl <sub>2</sub> , 25mM	2.0µL
Mezcla de dNTP, 10mM	1.0µL
Enzima RT, ImProm-II	<u>1.0µL</u>
Volumen Final	15.0µL

Se agregó a cada reacción 5µL de la reacción experimental de RNA, resultando un volumen final de 20µL por tubo.

- *Molde*: se colocaron los tubos en un bloque caliente a una temperatura de 25°C y se incubó por 5 minutos.
- *Extensión*: se incubaron los tubos en un bloque a 42°C por 1 hora.
- *Inactivación de la Transcriptasa Reversa*: la transcriptasa reversa fue termalmente inactivada antes de la amplificación por PCR incubando los tubos de reacción en un bloque controlado de temperaturas a 70°C durante 15 minutos [74].

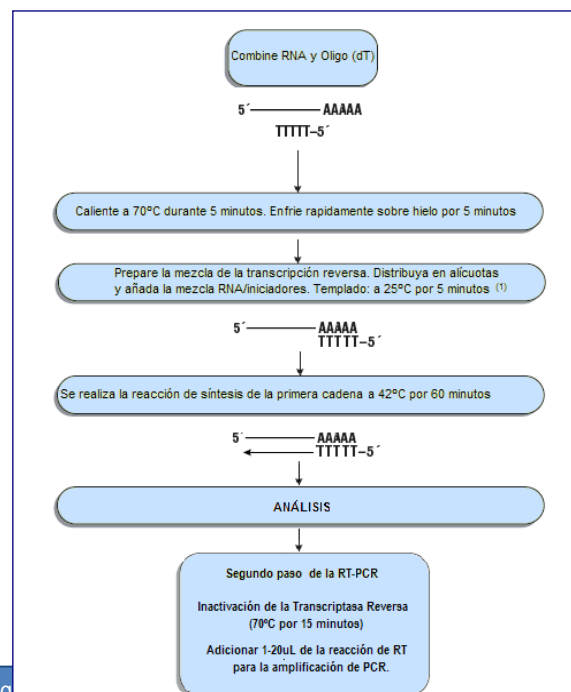


Fig. 7.4. Protocolo de RT-PCR usando el Sistema de Transcripción Reversa, ImProm-II. REF: 74

### Cuantificación del cDNA

Para la cuantificación del cDNA se utilizó un Biofotómetro (Eppendorf, Alemania), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se realizó una dilución en 1:100 de todas las muestras con agua libre de DNasas. Se calibró con una muestra blanco, agua libre de DNasas y se obtuvieron las absorbancias en la longitud de onda en 260 y 280 nanómetros para determinar la pureza, reportándose de manera automática la concentración.

### Oligonucleótidos

Se amplificaron los fragmentos del cDNA de los genes MICA, MICB, ULBP1, ULBP 2, ULBP3; utilizando oligonucleótidos previamente reportados (Ver Tabla 8) [75]. Los iniciadores fueron seleccionados para flanquear un intron, donde la especificidad fue validada usando un clon para los ligandos MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3 [75].

**Tabla 8. Gen endógeno, (house keeping) y ligandos de NKG2D, (NKG2DLs)**

Iniciadores	Long.	CG%	TM (°C)
<b>18S rRNA:</b>			
Frw: 5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3'	20	55	62
Rev: 5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'	18	61	58
<b>MICA:</b>			
Frw: 5'-CCTTGCCATGAACGTCAGG-3'	20	60	64
Rev: 5'-CCTCTGAGGCCTCRCTGCG-3'	19	71	65
<b>MICB:</b>			
Frw: 5'-ACCTTGCTATGAACGTCACA-3'	21	48	52
Rev: 5'-CCCTCTGAGACCTCGCTGCA-3'	20	65	66
<b>ULBP1:</b>			
Frw: 5'-GTACTGGGAACAAATGCTGGAT-3'	22	45	52
Rev: 5'-AACTCTCCTCATCTGCCAGCT-3'	21	52	52
<b>ULBP2:</b>			
Frw: 5'-TTACTTCTCAATGGGAGACTGT-3'	22	41	58
Rev: 5'-TGTGCCTGAGGACATGGCGA-3'	20	60	64
<b>ULBP3:</b>			
Frw: 5'-CCTGATGCACAGGAAGAAGAG-3'	21	52	51
Rev: 5'-TATGGCTTTGGGTTGAGCTAAG-3'	22	45	53

### Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), permite amplificar más de un millón de veces un DNA obtenido a partir de una región seleccionada del genoma, siempre y cuando se conozca una parte de su secuencia de nucleótidos. Esta técnica fue ideada en 1983 por Kary B. Mullis que obtuvo el premio Nobel de Química en 1993 por dicho invento.

La PCR utiliza dos oligonucleótidos sintéticos de unos 15-20 nucleótidos que son complementarios a las zonas flanqueantes de la región que se quiere amplificar. Estos oligonucleótidos o iniciadores (conocidos por su nombre en inglés, "primers") actúan como cebadores para la síntesis *in vitro* de DNA la cual está habitualmente catalizada por una enzima llamada *Taq polimerasa*. Dicha enzima se aísla de una bacteria termófila, denominada *Thermus aquaticus*, que es capaz de crecer a temperaturas elevadas (79 - 85 ° C) [71]. A esta temperatura dicha enzima es capaz de mantener una extensión de más de 60 nucleótidos por segundo en regiones ricas en uniones G-C. La temperatura óptima a la que actúa la *Taq polimerasa* permite el uso de elevadas temperaturas para la unión de los iniciadores y para la extensión, de esta manera se aumenta el nivel de exigencia de la reacción y se reduce la extensión de los iniciadores unidos inespecíficamente al DNA.



La reacción se llevó a cabo en una serie de ciclos cada uno de los cuales incluyó tres fases o pasos:

**Desnaturalización:** Para que comience la reacción es necesario que el DNA molde se encuentre en forma de cadena sencilla. Esto se consiguió aplicando temperaturas de 90 a 95°C que producen la ruptura de los puentes de hidrógeno y por lo tanto la separación de ambas cadenas. Para conseguir la completa separación de las hebras de toda la muestra ésta temperatura se mantuvo unos minutos. Si el DNA solo se desnaturaliza parcialmente éste tenderá a renaturalizarse rápidamente, evitando así una eficiente hibridación de los iniciadores y una posterior extensión.

**Hibridación:** Esta fase se denomina también fase de emparejamiento o de “annealing”. Una vez que el DNA se desnaturalizó se disminuyó la temperatura hasta un rango entre los 40 y los 60°C para producir la unión de los iniciadores a las secuencias flanqueantes del fragmento que se va a amplificar. La  $T_m$  es la temperatura de fusión ( $T_m$ , “melting temperature”) es específica para los primers. La longitud de los iniciadores y la secuencia son críticas en la designación de los parámetros de una amplificación, una fórmula simple para calcular la  $T_m$  es la siguiente:

$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T).$$

No obstante, cada primer exigió una serie de estudios experimentales para determinar su temperatura de fusión específica ya que si la temperatura es muy baja la unión se hará de forma inespecífica y si es muy alta no se producirá una unión completa.

**Extensión:** Durante este paso la Taq polimerasa incorporó nucleótidos en el extremo 3' del iniciador utilizando como molde la cadena de DNA previamente desnaturalizada. La temperatura a la que se lleva a cabo este paso fue de 72°C ya que es la temperatura a la que la Taq polimerasa alcanza su máxima actividad. Normalmente una extensión de 30 segundos es suficiente para fragmentos menores de 500 pb, y 40 segundos para fragmentos por encima de 1.2Kb.

En la presencia de magnesio, y con las condiciones adecuadas de sales y fuerza iónica, la enzima muestra actividad de polimerización del DNA, utilizando como anclaje iniciadores de secuencia específica y una molécula de DNA como molde [71].

### PCR-tiempo real

La técnica de amplificación en tiempo real se ha convertido en los últimos años en una herramienta esencial para la identificación y cuantificación de secuencias de cDNA, especialmente en aquellos casos en que dichas secuencias se encuentran por debajo del límite de detección de las técnicas de identificación convencionales.

La detección en tiempo real de los productos amplificados se realizó mediante el monitoreo ciclo a ciclo de la señal de fluorescencia generada durante el proceso de amplificación. Dicha señal fue generada por la incorporación de SYBR-Green que es un marcador de fluorescencia para los productos amplificados durante el proceso. Así, el nivel de fluorescencia es proporcional al producto amplificado en cada ciclo. *Nota: En la fase exponencial de amplificación existe una correlación entre el producto amplificado y el cDNA de partida. Dicha*

*correlación se puede perder en las fases finales del proceso de amplificación, en la que la reacción entra en una fase plateau por saturación de producto [71].*

Los dos métodos comúnmente usados para analizar datos experimentales de PCR en tiempo real cuantitativos son, la cuantificación absoluta y la cuantificación relativa. La cuantificación absoluta determina el número de copia de entrada, por lo general relacionando la señal de PCR a una curva estándar. La cuantificación relativa describe el cambio de la expresión, relacionando la señal de PCR de la transcripción de un gen blanco con otro de referencia como una muestra control [80].

El método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  fue un conveniente análisis para los cambios relativos en la expresión de genes de experimentos de PCR cuantitativos en tiempo real. La cuantificación de los cambios relativos en la expresión de genes usando PCR-en tiempo real, requirió ciertas ecuaciones con exponentes para analizar apropiadamente los datos.

### **Amplificación por PCR-tiempo real**

La amplificación se llevó a cabo con la química SYBR-Green, (QuantiMix EASY SYG BIOTOOLS, Biotechnological & Medical Laboratories, España). El paquete comercial contiene las enzimas y los amortiguadores necesarios para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se utilizó el sistema de detección Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Mortlake-Australia). Las amplificaciones se realizaron de acuerdo en lo descrito en la tabla 9, evitando la exposición a la luz. El calibrador y el control endógeno se procesaron en paralelo bajo condiciones de ciclos termales iguales con las muestras experimentales y genes blanco en la misma corrida de PCR. Esto es, para hacer un ajuste en las diferencias cuantitativas y cualitativas del RNA de las muestras. Se mezcló la reacción evitando hacer burbujas, y se llevó a cabo la PCR en tiempo real en el termociclador. El programa nos permitió además visualizar la calidad de la amplificación por medio de la curva de "Melt", que realizó el análisis en tiempo real de la desnaturalización para determinar la calidad de las muestras. Primero se calentó a una temperatura inicial de desnaturalización, comenzando de 70 grados hasta 90 grados. De estos datos, se generó una curva y automáticamente fue analizada (graf.4). La interpretación de los resultados se realizó en base al software específico del equipo utilizado Rotor-Gene versión 6.0 y la generación de una base de datos en una hoja de cálculo Excel 2007 (Microsoft, USA); para su posterior análisis usando el método  $\Delta\Delta CT$  para la cuantificación relativa.

### **Preparación de las reacciones de amplificación**

Se colocó los tubos en una campana para PCR y se mezcló la reacción suavemente mediante inversión. Se mantuvieron los tubos protegidos de la luz, se añade 10 $\mu$ L del QUANTIMIX al cDNA problema y los iniciadores hasta un volumen final de 20 $\mu$ L. Se mezcló suavemente la reacción sin hacer burbujas. Se centrifugaron las reacciones brevemente y se colocaron en el termociclador.

### **Condiciones de la PCR en tiempo real**

Para la reacción en cadena de la polimerasa se utilizó 250ng de cDNA para la amplificación de los genes MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3 y 18S; con iniciadores específicos (como se describen en la tabla 8). Las condiciones de la PCR para la amplificación de los genes fue a una temperatura de 94°C durante 4 min, un calentamiento inicial de 94°C durante 30 segundos, 65°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos por 30 ciclos (punto en el que se llevó a cabo la adquisición de la señal emitida por la fluorescencia del SYBR

Green) y finalmente un ciclo para la curva “melting”. Todas las reacciones se hicieron por duplicado y se incluyó un control negativo sin cDNA. Finalmente, se obtuvieron las diferencias entre los niveles de expresión de los genes analizados, con el programa incluido en el Rotor Gene (Corbett Research).

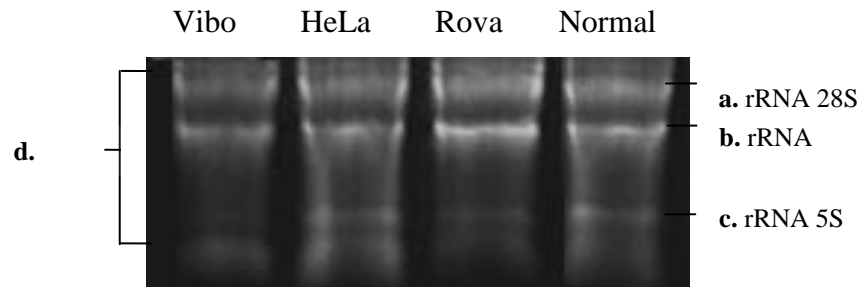
**Tabla 9. Reacciones de la PCR en tiempo real**

Mezcla SYBR Green	10.0µL
DNA problema	250ng
Iniciadores	10.0pmol
Volumen final	20.0µL



### Resultados

El material biológico que consistía en líneas celulares C-33, Vipa, Ca Ski, SiHa, Rova, InBL, HeLa, CaLo, fueron cultivadas y cosechadas según como se describió en métodos, entre los 4 a 5 días o hasta llegar a la confluencia. Se determinó el número celular para realizar la extracción del RNA, obteniendo un número de  $\geq 1 \times 10^7$  células, extraído el RNA que se observó en un gel de agarosa al 2% (Ver figura 8), observándose el rRNA 28S, rRNA 18S, rRNA 5S y el mRNA. Usando el paquete de Transcripción Reversa (Promega, USA), se sintetizó cDNA y se cuantificó según el protocolo del fabricante. (ver tabla 12)



**Figura8 | Gel representativo de las líneas celulares estudiadas.** Se preparo un gel de agarosa al 2% para ver la calidad del RNA de las líneas celulares de CaCu a continuación se observan solo algunas muestras analizadas. **a. rRNA 28S, b. rRNA 18S, c. rRNA 5S, d. El mRNA se ve como un barrido.** Los ribosomas de eucariotes contienen cuatro moléculas diferentes de rRNA: 28S, 18S, 5.8S y 5S. Tres de las moléculas rRNA son sintetizadas en el núcleo y son sumamente abundantes al menos el 80 % de las moléculas de RNA encontradas en una célula típica eucariotica.

### Cuantificación del cDNA

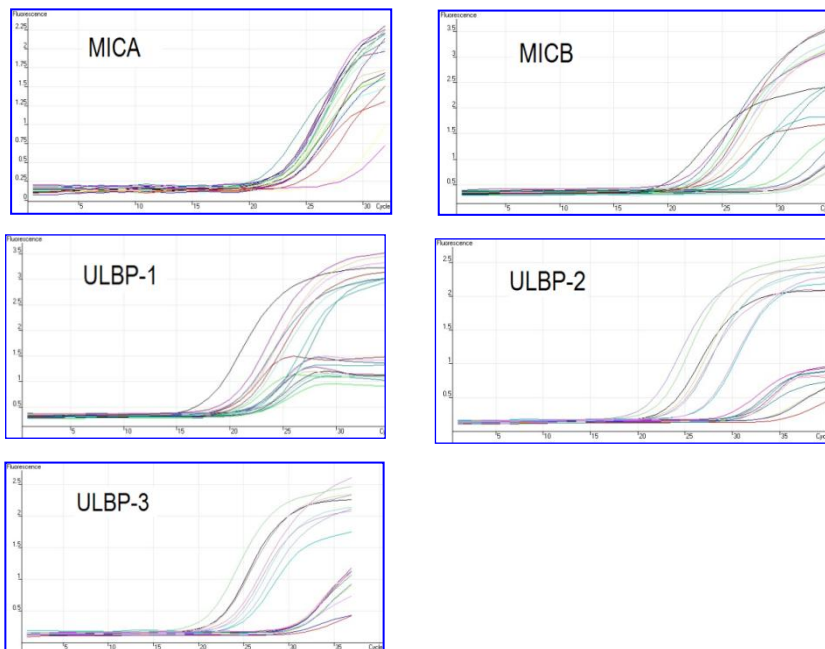
La concentración del cDNA se verificó mediante espectrofotometría en un espectrofotómetro BioPhotometer (Eppendorf) (tabla12), dando los siguientes resultados de concentración:

**Tabla 12. | Datos de la cuantificación del cDNA de las líneas celulares de CaCu.**

cDNA	Concentración $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Dilución 1:100	
		cDNA	Concentración $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
CaLo	2.02	SiHa	1.71
HeLa	1.99	Vibo	1.06
InbL	2.50	Vipa	1.88
C-33	1.14	Ca Ski	1.40
Rova	1.38	Normal	1.72

### Amplificación en tiempo real

La reacción de RT-PCR en tiempo real, mostró los valores de Ct de las amplificaciones de los genes blanco (MICA/B, ULBP's), utilizando los oligos y el sistema de detección Rotor-Gene 3000 que se describen en los métodos. La amplificación se muestra en una gráfica como curvas de amplificación (Grafica 1). Estas fueron normalizadas con una muestra calibrador (RNA total de tejido normal) y un gene endógeno control (rRNA 18S), usando el método de  $\Delta\Delta Ct$  [118] y colocadas en una tabla ex profeso para su posterior análisis. El software genero una hoja de cálculo con los datos de las amplificaciones (ver tabla 13).



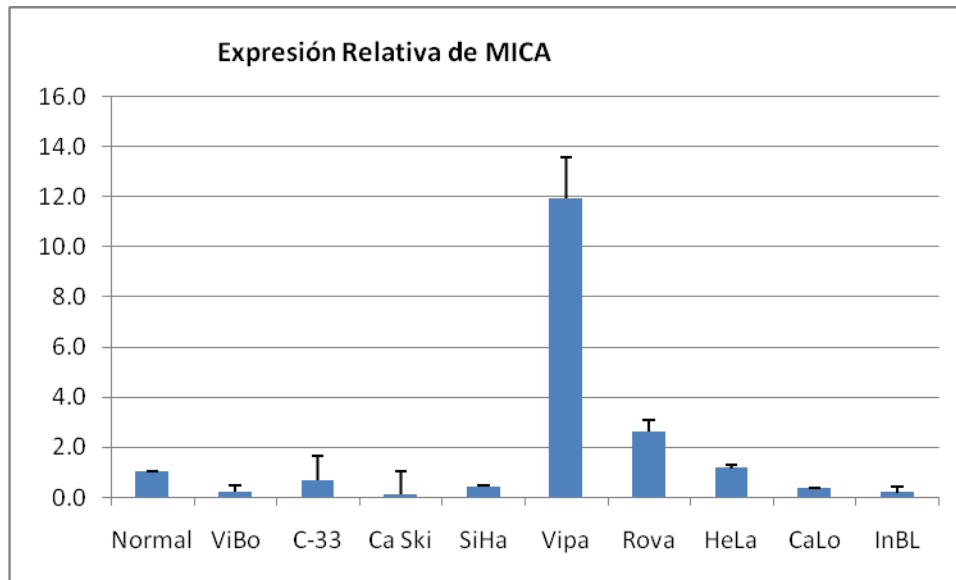
**Grafica1** | Amplificación en tiempo real de los genes: MICA, MICB, ULBP-1, ULBP-2, ULBP-3 vs 18S, curvas de fluorescencia de todas las muestras de líneas celulares de CaCu y tejido sano. Para obtener la expresión relativa, se amplifica las muestras dando una relación de la señal de PCR de la transcripción de un gen blanco con el de referencia 18S y la muestra control [80].

**Tabla 13.** | Datos de la cuantificación relativa de los genes MICA, MICB por el método de  $\Delta\Delta Ct$ .

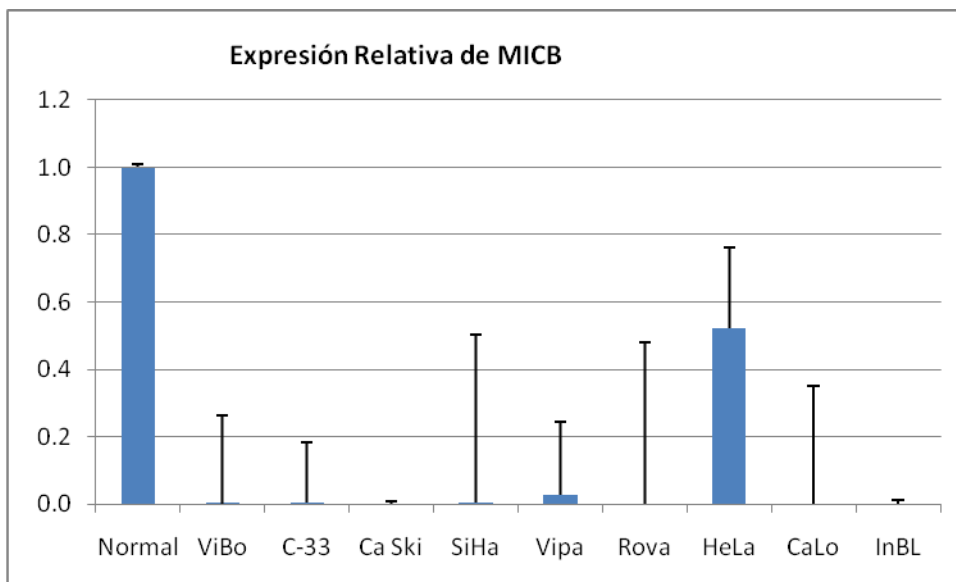
HPV	L. Cel.	MIC Ct promedio	18S Ct promedio	$\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$	Log2	Ct D. Est.
<i>MICA</i>								
Negativo	Normal	22.75	23.95	-1.20	0.00	1.00	0.00	0.06
	ViBo	22.76	21.65	1.11	2.31	0.20	-2.31	0.28
	C-33	21.52	22.15	-0.63	0.57	0.67	-0.57	0.98
HPV 16	Ca Ski	22.25	20.14	2.11	3.31	0.10	-3.31	0.96
	SiHa	22.00	21.9	0.10	1.30	0.41	-1.30	0.07
HPV 18	Vipa	22.14	26.92	-4.78	-3.58	11.96	3.58	1.62
	Rova	21.94	24.53	-2.59	-1.39	2.62	1.39	0.48
	HeLa	21.62	23.04	-1.42	-0.22	1.16	0.22	0.13
	CaLo	22.27	21.96	0.31	1.51	0.35	-1.51	0.01
	InBL	22.01	20.87	1.14	2.34	0.20	-2.34	0.23
<i>MICB</i>								
Negativo	Normal	22.92	22.70	0.22	0.00	1.00	0.00	0.01
	ViBo	30.29	21.35	8.95	8.72	0.0024	-8.70	0.26
	C-33	29.15	20.40	8.75	8.53	0.0027	-8.53	0.18
HPV 16	Ca Ski	30.57	17.73	12.84	12.62	0.0002	-12.29	0.01
	SiHa	30.39	21.62	8.77	8.55	0.0027	-8.53	0.50
HPV 18	Vipa	30.19	24.71	5.49	5.27	0.0259	-5.27	0.22
	Rova	30.88	21.72	9.16	8.94	0.0020	-8.97	0.48
	HeLa	22.22	21.06	1.16	0.94	0.5212	-0.94	0.24
	CaLo	29.46	19.90	9.57	9.35	0.0015	-9.38	0.35
	InBL	30.20	19.67	10.53	10.31	0.0008	-10.29	0.01

\*Cálculos del método  $\Delta\Delta Ct$ .  $\Delta Ct = (\text{prom. MICA CT} - \text{prom. 18S CT})$ ,  $-\Delta\Delta Ct = -(\text{prom. } \Delta Ct - \Delta Ct \text{ Normal})$ .

La expresión de las líneas celulares fue con el cálculo de la  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  y al graficar el valor a  $\text{Log}_2$  en donde las muestra la expresión de los transcrito de los ligandos de NKG2D. Las líneas Vipa y Rova se caracterizan por tener un estadio IIB, y un diagnostico clínico de carcinoma epidermoide en el caso del gen MICA son las que se encuentran sobre-expresadas.

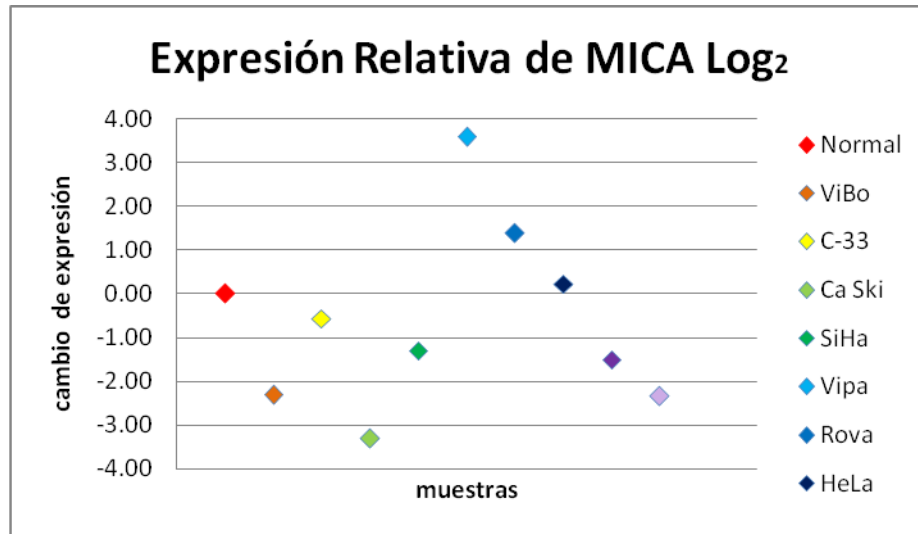


**Grafica 2** | Expresión del gene: MICA en las líneas celulares de CaCu y tejido sano. En el caso de MICA las líneas Vipa y Rova son las que se encuentran sobre-expresadas. En el caso de MICB se muestra una marcada sub-expresión en las líneas celulares.

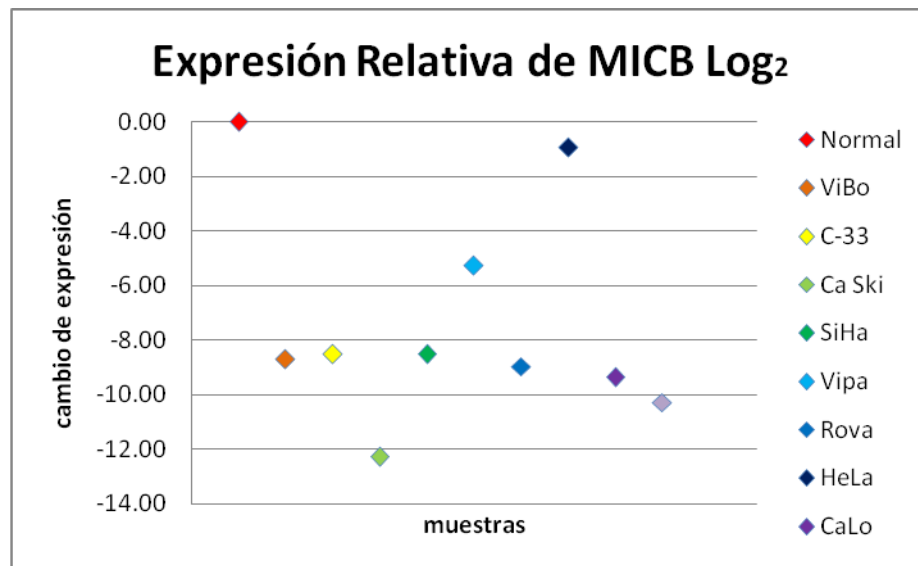


**Grafica 3** | Expresión del gen MICB en las líneas celulares de CaCu y tejido sano. En el caso de MICB se muestra una marcada sub-expresión en las líneas celulares.





Grafica 4 | Graficando los valores de Log<sub>2</sub> del gen MICA se puede observar con más claridad la expresiones de los genes MIC en las líneas celulares de CaCu. En el caso del gen MICA la línea Vipa se encuentra sobre-expresada con 3.6 veces y Rova con un incremento de expresión de 1.39 veces con respecto a la muestra normal. Mostrando una expresión normal las líneas C-33 y HeLa, y sub-expresadas las restantes. Se consideraron expresiones normales en el rango de -1 a 1.



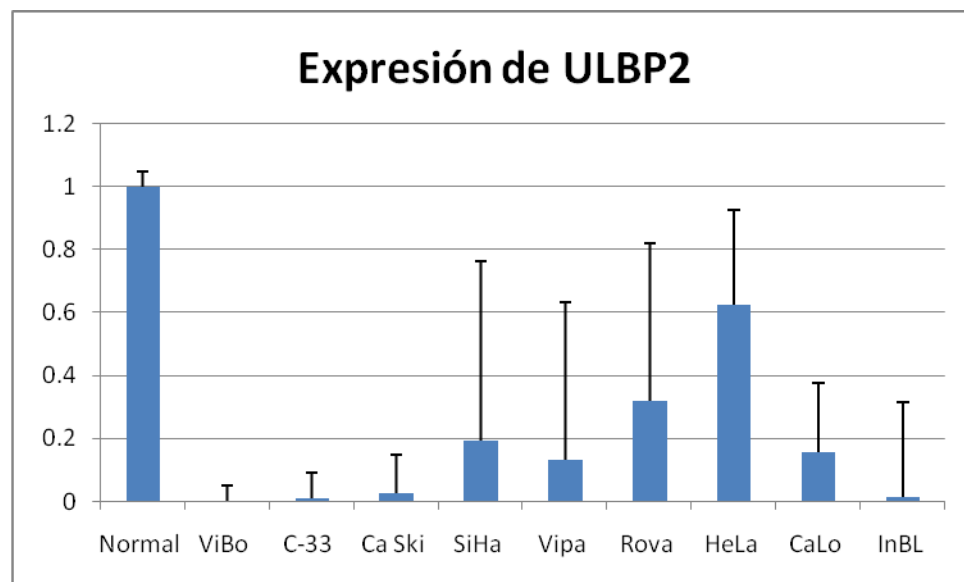
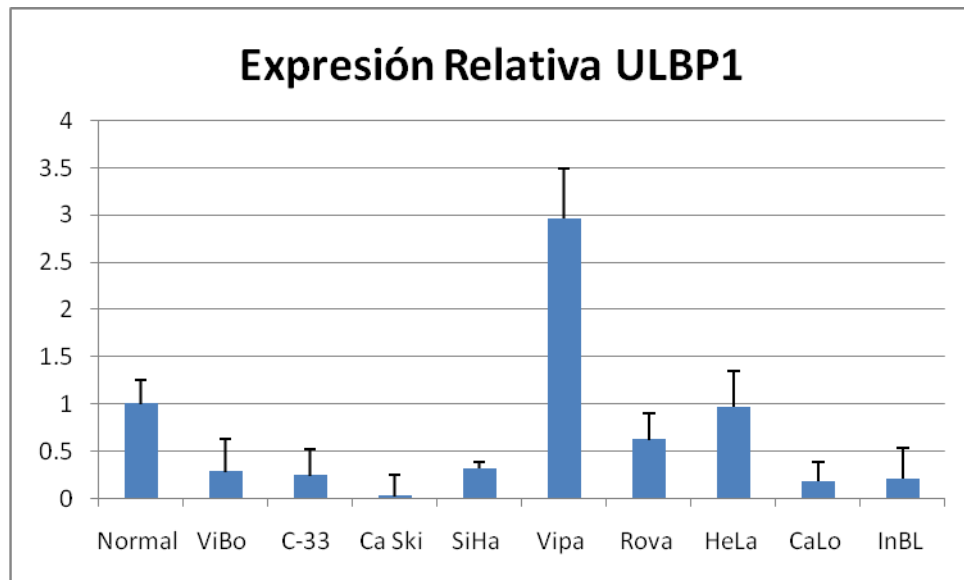
Grafica 5 | Grafica del gen MICB valores de Log<sub>2</sub>. Todas las líneas celulares se encuentran sub-expresadas con respecto al tejido no afectado analizado.

**Tabla 14.** | Datos de la cuantificación relativa de los genes ULBPs por el método de  $\Delta\Delta Ct^*$ .

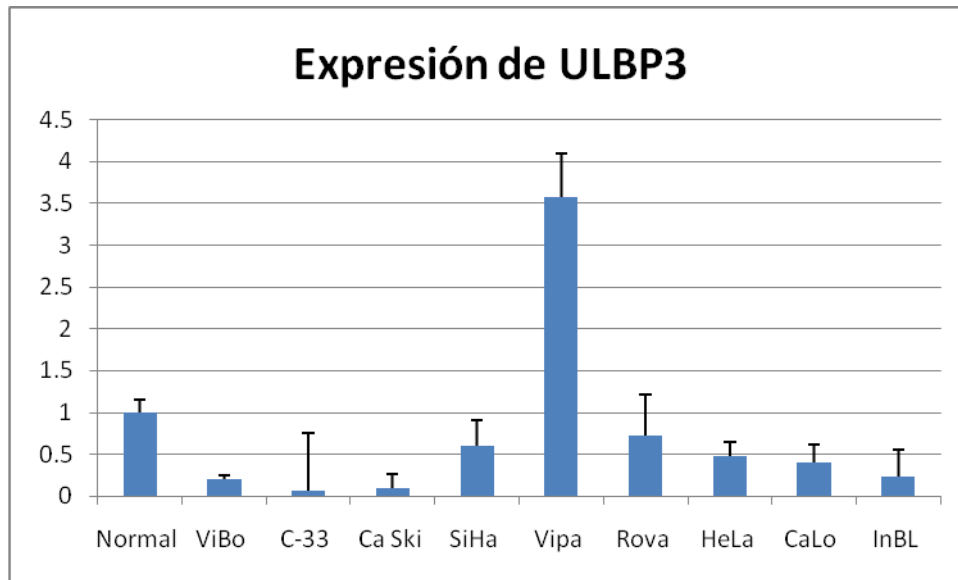
HPV	Líneas	ULBP Ct	18S Ct	$\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$	Log2	Ct Dev.
	Celulares	promedio	promedio					Est.
<i>ULBP1</i>								
Negativo	Normal	20.85	23.38	-2.53	0.00	1.0000	0.00	$\pm 0.25$
	ViBo	21.46	22.15	-0.69	1.84	0.2793	-1.84	$\pm 0.35$
	C-33	20.50	20.97	-0.47	2.06	0.2398	-2.06	$\pm 0.28$
HPV 16	Ca Ski	21.35	18.43	2.92	5.45	0.0229	-5.45	$\pm 0.22$
	SiHa	21.40	22.27	-0.87	1.66	0.3164	-1.66	$\pm 0.07$
HPV 18	Vipa	21.29	25.39	-4.10	-1.57	2.9690	1.57	$\pm 0.53$
	Rova	20.54	22.38	-1.84	0.69	0.6199	-0.69	$\pm 0.28$
	HeLa	19.20	21.69	-2.49	0.04	0.9727	-0.04	$\pm 0.37$
	CaLo	20.43	20.48	-0.05	2.48	0.1792	-2.48	$\pm 0.20$
	InBL	20.10	20.34	-0.24	2.29	0.2045	-2.29	$\pm 0.33$
<i>ULBP2</i>								
Negativo	Normal	27.11	21.54	5.57	0.00	1.0000	0.00	$\pm 0.05$
	ViBo	34.13	19.80	14.33	8.76	0.0023	-8.76	$\pm 0.05$
	C-33	32.49	20.29	12.20	6.63	0.0101	-6.63	$\pm 0.08$
HPV 16	Ca Ski	29.21	18.45	10.76	5.19	0.0274	-5.19	$\pm 0.12$
	SiHa	28.46	20.52	7.94	2.37	0.1934	-2.37	$\pm 0.57$
HPV 18	Vipa	32.10	23.61	8.49	2.92	0.1321	-2.92	$\pm 0.50$
	Rova	28.07	20.85	7.22	1.65	0.3186	-1.65	$\pm 0.50$
	HeLa	29.62	23.37	6.25	0.68	0.6242	-0.68	$\pm 0.67$
	CaLo	28.65	20.40	8.25	2.68	0.1560	-2.68	$\pm 0.22$
	InBL	28.96	17.19	11.77	6.20	0.0136	-6.20	$\pm 0.30$
<i>ULBP3</i>								
Negativo	Normal	27.07	20.04	7.03	0.00	1.0000	0.00	$\pm 0.15$
	ViBo	29.32	17.40	11.92	4.89	0.2010	-2.31	$\pm 0.05$
	C-33	28.38	17.45	10.93	3.90	0.0670	-3.90	$\pm 0.68$
HPV 16	Ca Ski	26.40	15.89	10.51	3.48	0.0896	-3.48	$\pm 0.17$
	SiHa	27.33	19.55	7.78	0.75	0.5946	-0.75	$\pm 0.32$
	Vipa	26.98	21.79	5.19	-1.84	3.5801	1.84	$\pm 0.52$
HPV 18	Rova	26.82	19.33	7.49	0.46	0.7270	-0.46	$\pm 0.49$
	HeLa	26.84	18.74	8.10	1.07	0.4763	-1.07	$\pm 0.17$
	CaLo	26.74	18.41	8.33	1.30	0.4061	-1.30	$\pm 0.21$
	InBL	26.62	17.46	9.16	2.13	0.2285	-2.13	$\pm 0.32$

\*Para la amplificación de los ULBPs, se utilizaron varias concentraciones de  $MgCl_2$

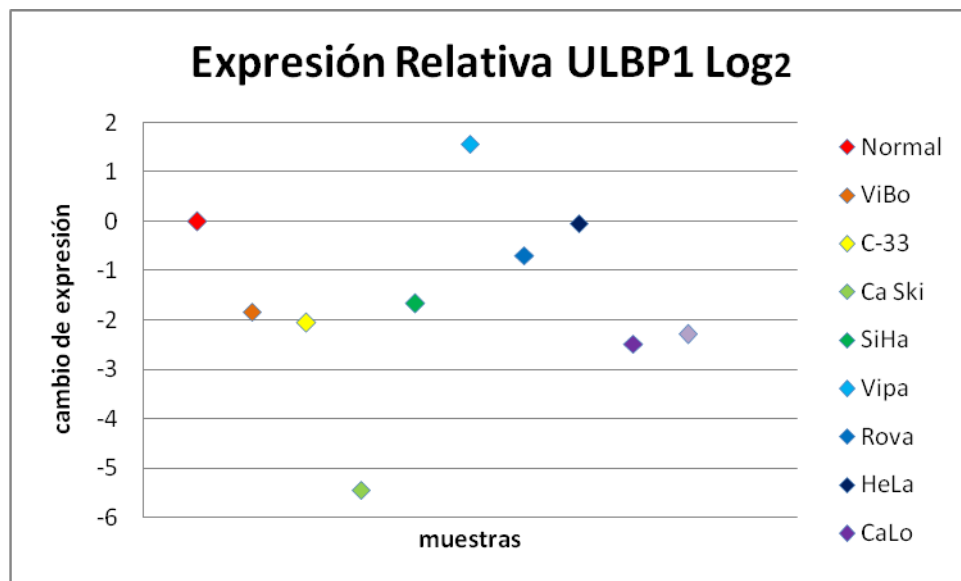
Se midió la expresión de los genes ULBP's por ser unos genes relacionados con el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y mantener la característica de asociarse al receptor NKG2D. La expresión del gen ULBP1 se observó una sobre expresión de la línea celular Vipa genero los siguientes datos de expresión grafica.



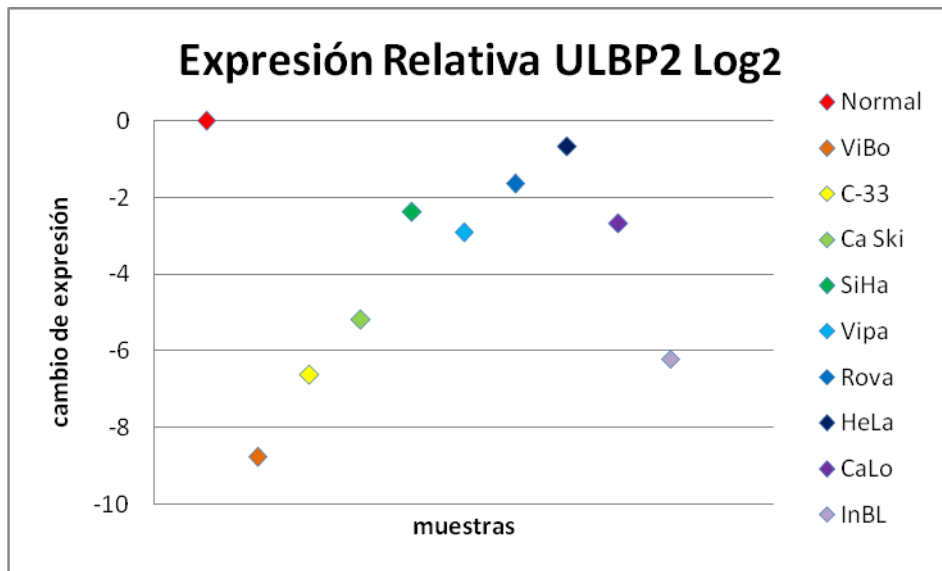
**Grafica 6 y 7.** Graficas de expresión de los genes ULBP1-2 en las graficas se muestra la expresión de todas las líneas celulares analizadas con respecto a la expresión del tejido normal. La grafica del gen ULBP1 se nota una clara sobre-expresión de la línea celular Vipa y una sobre expresión en el gen ULBP2.



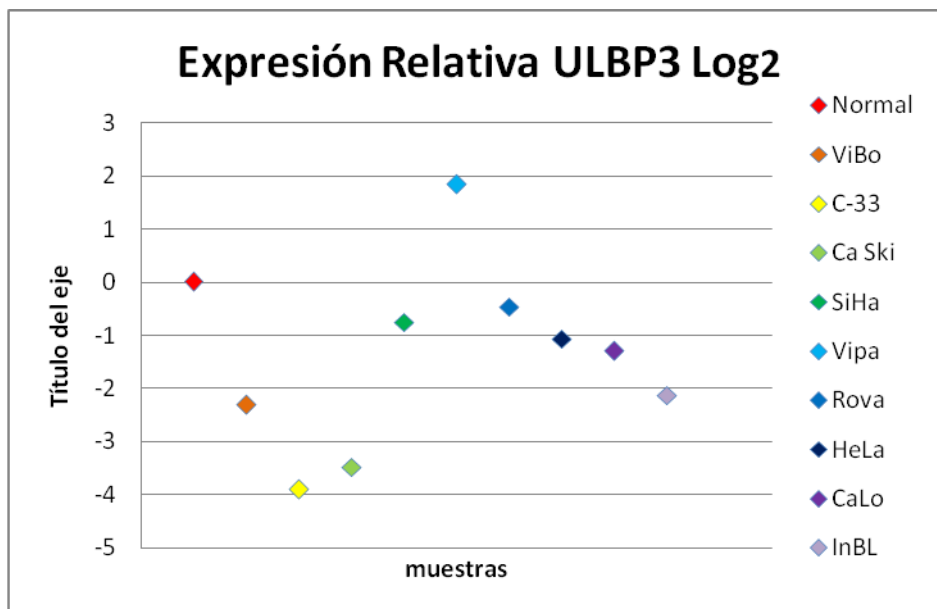
**Grafica 8.** Grafica de expresión del gene ULBP3 en las que se muestra la expresión de todas las líneas celulares analizadas con respecto a la expresión del tejido normal y se nota una clara sobre-exposición de la línea celular V10a.



**Grafica 9.** Grafica de expresión de los genes ULBP1 en las tres graficas se muestra la expresión de todas las líneas celulares analizadas con respecto a la expresión del tejido normal y se nota una clara sobre-exposición de la línea celular V10a.



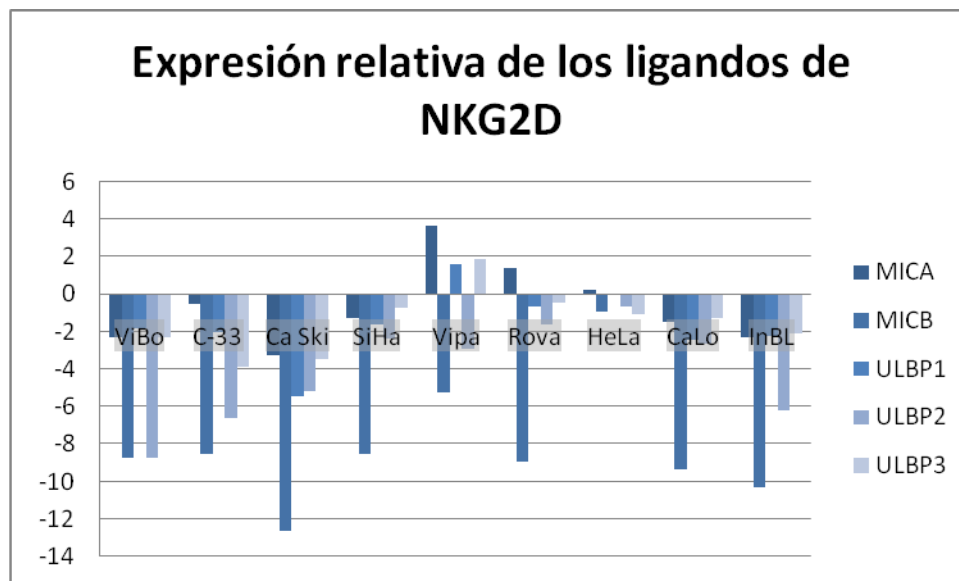
**Grafica 10.** Grafica de expresión del gene ULBP2 la grafica se muestra la expresión de todas las líneas celulares analizadas con respecto a la expresión del tejido normal. En el análisis de este gen se muestra que HeLa mantiene una expresión normal y las demás líneas tienen una sub-expresión del gen.



**Grafica 11.** Grafica de expresión del gene ULBP3. En este análisis se muestra una clara sobre-expresión de la línea celular Vipa. Las líneas SiHa, Rova y HeLa mantienen una expresión normal y las demás líneas tienen una sub-expresión del gen.

**Tabla 15.** | *Expresión de los ligandos NKG2DLs en líneas de CaCu*

Líneas celulares	MICA	MICB	ULBP1	ULBP2	ULBP3
ViBo	-2.31	-8.72	-1.84	-8.76	-2.31
C-33	-0.57	-8.53	-2.06	-6.63	-3.9
Ca Ski	-3.31	-12.62	-5.45	-5.19	-3.48
SiHa	-1.3	-8.55	-1.66	-2.37	-0.75
Vipa	3.58	-5.27	1.57	-2.92	1.84
Rova	1.39	-8.94	-0.69	-1.65	-0.46
HeLa	0.22	-0.94	-0.04	-0.68	-1.0
CaLo	-1.51	-9.35	-2.48	-2.68	-1.3
InBL	-2.34	-10.31	-2.29	-6.2	-2.13

**Grafica 11.** Grafica de las expresiones de los ligandos de NKG2D, en todas las líneas celulares. Se muestra que la línea Vipa presenta sobre expresiones en 3 de los 5 genes estudiados.

El método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  o también llamado el método de  $\Delta\Delta Ct$  es un modo conveniente para analizar los cambios relativos de la expresión génica de experimentos de PCR en tiempo real semicuantitativos. Los valores de Ct provinieron del equipo de detección en tiempo real que están representados en graficas de fluorescencia vs. número de ciclos y estos datos fueron fácilmente importados a un programa expofeso como Microsoft Excel. Este método no requirió la corrida de curvas estándar en cada experimento. Cada muestra primero fue normalizada por cada concentración del templado añadida por comparación relativa del gen endógeno control (rRNA 18S). Estos valores normalizados son además normalizados relativamente por una muestra calibrador (el tejido normal) [119]. El software nos permitió calcular la eficiencia de cada reacción dando un valor de  $E \geq 0.90$ .

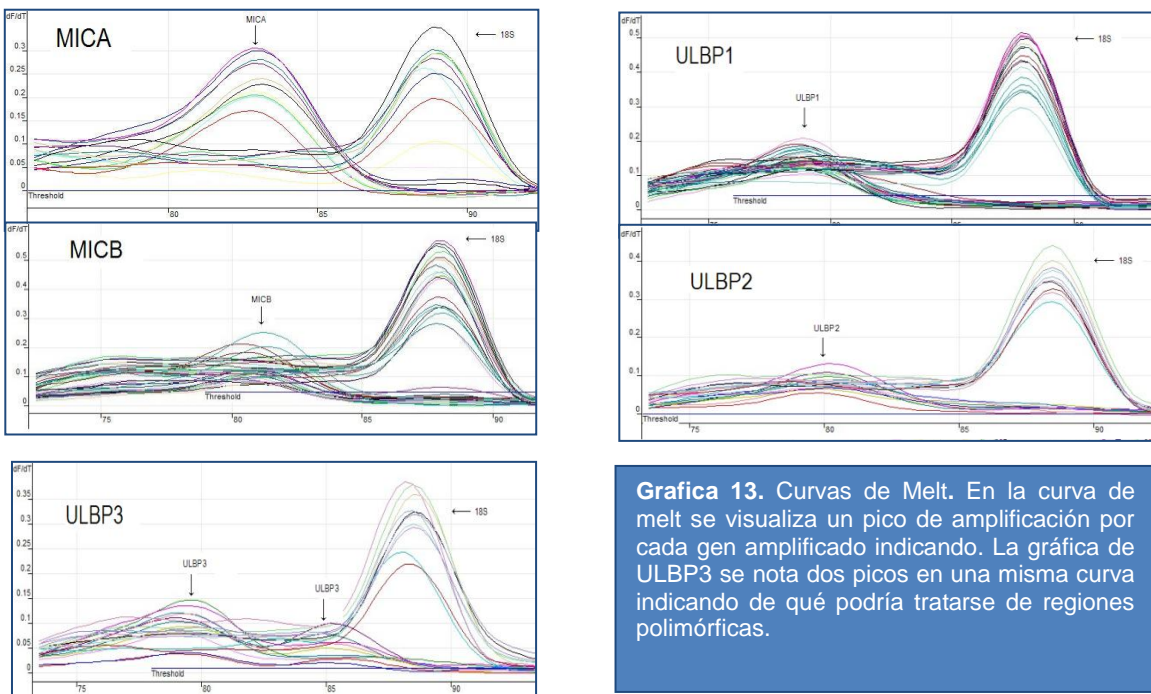
### Discusión de resultados

En los últimos años la técnica de PCR en tiempo real, se ha convertido en una herramienta esencial para la expresión y cuantificación de secuencias de cDNA. En ensayos convencionales de PCR en tiempo real, la expresión se normaliza con un gen endógeno (housekeeping gene de economía doméstica) sin embargo, un solo gen endógeno no puede ser utilizado para todos los estudios de expresión [79]. Uno de los puntos importantes de la técnica, es la elección de este gen endógeno que se utiliza como referencia para analizar la expresión del gen problema. Los genes endógenos o de referencia, además de presentar una eficiencia de amplificación similar al gen problema deben de ser estables en diferentes condiciones.

El gen endógeno más adecuado para la normalización de este estudio, junto con la amplificación de ligandos de NKG2D fue el rRNA 18S. En la RT-PCR en tiempo real, los valores observados de Ct de los genes blanco se normalizaron con una muestra calibrador (control de tejido normal) usando el método de  $\Delta\Delta Ct$  o también llamado  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

El calibrador y el control endógeno se procesaron en paralelo bajo condiciones de ciclos termales iguales con las muestras experimentales y genes blanco en la misma corrida de PCR. Esto es, para hacer un ajuste en las diferencias cuantitativas y cualitativas del RNA de las muestras.

El programa del equipo utilizado, Rotor-Gene versión 6.0 (Corbett Research, Australia), nos permitió además visualizar la calidad de la amplificación por medio de la curva de melt que realizamos el análisis en tiempo real de la desnaturalización para determinar la calidad de las muestras. Primero se calentó a una temperatura inicial de desnaturalización, comenzando de 70 grados hasta 90 grados. De estos datos, se generó una curva y automáticamente fue analizada (ver grafica 13).



**Gráfica 13.** Curvas de Melt. En la curva de melt se visualiza un pico de amplificación por cada gen amplificado indicando. La gráfica de ULBP3 se nota dos picos en una misma curva indicando de qué podría tratarse de regiones polimórficas.



Estudios recientes indican que NKG2D participa en respuestas inmunes antitumorales, vigilancia inmune y la supresión de tumores inducidos experimentalmente [76]. Hay evidencia de que los miembros de la familia MICs son comúnmente co-expresados en tumores primarios humanos [77]. Pende, D. *et al. Cancer Res. 2002*, encontró que en humanos las proteínas MIC están sobre-expresadas por tumores epiteliales [47]. Yokoyama, W. M. *et al. Nature 2002*, demostraron que la forma soluble de MIC es detectable en la sangre de pacientes con cáncer y estaría reprimiendo la actividad del sistema inmune contra los tumores [59].

Nuestro estudio demostró que en el gen MICA, en la mayoría de las líneas celulares de CaCu está sub-expresado, mientras que en Vipa y Rova se encuentran sobre-expresadas 3.58 y 1.4 veces más del nivel normal; y solo HeLa presentó una expresión normal del gen. En el caso de MICB y ULBP2 se encuentran sub-expresados en todas las líneas celulares de CaCu excepto por HeLa. En los genes ULBP1 y ULBP3 las líneas celulares se encuentran sub-expresadas y solo Vipa tiene sobre-expresión de casi el doble, y HeLa presenta una expresión normal para el gen ULBP3.

Varios mecanismos se han propuesto para deducir cómo los tumores evitan el ataque inmunológico mediado por NKG2D. Uno está enfocado en la observación de que tumores liberan ligandos solubles de NKG2D y que pueden ser detectados en sangre en pacientes con cáncer [61]. Estudios en el medio líquido de las líneas celulares de CaCu que llevó a cabo Mendoza Rincón, demostraron que las proteínas de MIC se encuentran solubles. Esto confirmaría la posibilidad de que los ligandos solubles pueden unirse a NKG2D y desregular la expresión en células T y NK, bloqueando el reconocimiento inmune mediado por NKG2D en cáncer cérvico uterino [78].

### **Conclusión**

La sub-expresión de los ligandos de NKG2D en células transformadas confiere una barrera eficaz para la formación de tumores. Sin embargo, algunas líneas celulares de CaCu expresan dos mecanismos de evasión del sistema inmunológico, presentándose como:

1. Niveles bajos de los ligandos de NKG2D: no estimulan el rechazo por sistema inmune. Esto podría presentarse en procesos *in vivo* como una expresión baja en el desarrollo temprano del tumor y así no ser reconocidas por el sistema inmune, o las células tumorales con bajos niveles de expresión sean seleccionadas por el sistema inmune mientras el tumor se desarrolla.
2. La sobre expresión asociada a una forma soluble de las proteínas, bloquearía la interacción de NKG2D con los ligandos que estuvieran en membrana, y así las células del sistema inmune no recibirían la señal de co-estimulación y por lo tanto no podrían detectar la presencia de células tumorales.

## Referencias

1. Lewin B: *Genes VIII*. Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall; 2004.
2. Darnell JE: *Molecular Cell Biology*, 3rd ed edn??. New York: Scientific American Books; 1995.
3. DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA: *Cancer, principles & practice of oncology*, 7th ed edn. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
4. Oft M, Akhurst RJ, Balmain A: **Metastasis is driven by sequential elevation of H-ras and Smad2 levels.** *Nat Cell Biol* 2002, **4**: 487-494.
5. Alberts B: *Molecular biology of the cell*, 2nd ed edn. New York: Garland Pub; 1989.
6. Knudson AG: **Cancer genetics.** *Am J Med Genet* 2002, **111**: 96-102.
7. Voravud N, Charuruk N: **Tumor angiogenesis.** *J Med Assoc Thai* 1999, **82**: 394-404.
8. **The World Cancer Report--the major findings.** *Cent Eur J Public Health* 2003, **11**: 177-179.
9. Ferlay J: **Cancer Incidence in Five Continents. Processing of data.** *IARC Sci Publ* 1992, 39-44.
10. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P: **Estimating the world cancer burden: Globocan 2000.** *Int J Cancer* 2001, **94**: 153-156.
11. MINISTERIO DE SALUD. Guía Clínica Cáncer Cérvico uterino 2. Minsal **1st Ed. Santiago.** 2005.  
Ref Type: Serial (Book, Monograph)
12. SINAIS. Mortalidad 2006 <http://sinais.salud.gob.mx/mortalidad/>. 2007.  
Ref Type: Internet Communication
13. Ponten J, Adami HO, Bergstrom R, Dillner J, Friberg LG, Gustafsson L *et al.*: **Strategies for global control of cervical cancer.** *Int J Cancer* 1995, **60**: 1-26.
14. Rodríguez Cruz L: *Presencia del receptor para IL-2 en células de carcinoma de cervix: Efecto de IL-2 sobre la expresión de moléculas CAM-1 y del complejo principal de histocompatibilidad.* UNAM; 1999. Tesis de Licenciatura. (revisar como se citan las tesis)
15. Ibarra Sánchez MadJ: *Efecto de interleucina IL-2, interferón -  $\gamma$ , IFN -  $\gamma$ , y factor de necrosis tumoral- $\alpha$ , (TNF- $\alpha$ ) en la inducción de citotoxicidad específica de linfocitos T contra células tumorales de CaCu.* UNAM; 1994. Licenciatura.
16. Stanley M: **Chapter 17: Genital human papillomavirus infections--current and prospective therapies.** *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003, 117-124.

17. Garcia-Carranca A, Gariglio PV: **[Molecular aspects of human papillomaviruses and their relation to uterine cervix cancer]**. *Rev Invest Clin* 1993, **45**: 85-92.
18. Smotkin D, Wettstein FO: **Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986, **83**: 4680-4684.
19. Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A *et al.*: **Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells**. *Nature* 1985, **314**: 111-114.
20. Mallon RG, Wojciechowicz D, Defendi V: **DNA-binding activity of papillomavirus proteins**. *J Virol* 1987, **61**: 1655-1660.
21. Sato H, Watanabe S, Furuno A, Yoshiike K: **Human papillomavirus type 16 E7 protein expressed in Escherichia coli and monkey COS-1 cells: immunofluorescence detection of the nuclear E7 protein**. *Virology* 1989, **170**: 311-315.
22. Phelps WC, Howley PM: **Transcriptional trans-activation by the human papillomavirus type 16 E2 gene product**. *J Virol* 1987, **61**: 1630-1638.
23. Sanger Institute. Cancer Cell Project. 2007. Ref Type: Internet Communication
24. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS: **Immunity opposite to the micro organisms**. In *Cellular and molecular immunology*. McGraw-Hill; 2001:380-401.
25. Lydyard PM, Whelan A, Fanger MW: *Instant notes in immunology*. Oxford: BIOS Scientific; 2000.
26. Ramírez Arias J, Ruiz-Argüelles A: *Inmunopatología*. México, D.F.: INTERSISTEMAS, S.A. de C.V.; 1996.
27. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL *et al.*: **Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA**. *Science* 1999, **285**: 727-729.
28. Wu J, Song Y, Bakker AB, Bauer S, Spies T, Lanier LL *et al.*: **An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10**. *Science* 1999, **285**: 730-732.
29. Cosman D, Mullberg J, Sutherland CL, Chin W, Armitage R, Fanslow W *et al.*: **ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor**. *Immunity* 2001, **14**: 123-133.
30. Yokoyama WM, Plougastel BF: **Immune functions encoded by the natural killer gene complex**. *Nat Rev Immunol* 2003, **3**: 304-316.

31. Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, Spies T: **A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**: 6259-6263.
32. Gaudieri S, Leelayuwat C, Townend DC, Mullberg J, Cosman D, Dawkins RL: **Allelic and interlocus comparison of the PERB11 multigene family in the MHC.** *Immunogenetics* 1997, **45**: 209-216.
33. Gaudieri S, Giles KM, Kulski JK, Dawkins RL: **Duplication and polymorphism in the MHC: Alu generated diversity and polymorphism within the PERB11 gene family.** *Hereditas* 1997, **127**: 37-46.
34. Leelayuwat C, Pinelli M, Dawkins RL: **Clustering of diverse replicated sequences in the MHC. Evidence for en bloc duplication.** *J Immunol* 1995, **155**: 692-698.
35. Shiina T, Tamiya G, Oka A, Takishima N, Yamagata T, Kikkawa E *et al.*: **Molecular dynamics of MHC genesis unraveled by sequence analysis of the 1,796,938-bp HLA class I region.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**: 13282-13287. ¿et al???????hay que poner todos los autores
36. Ando H, Mizuki N, Ota M, Yamazaki M, Ohno S, Goto K *et al.*: **Allelic variants of the human MHC class I chain-related B gene (MICB).** *Immunogenetics* 1997, **46**: 499-508.
37. Bahram S: **MIC genes: from genetics to biology.** *Adv Immunol* 2000, **76**: 1-60.
38. Mendoza-Rincon J, Arguello JR, Perez-Rodriguez M, McWhinnie A, Marsh SG, Fischer G *et al.*: **Characterization of the MICA polymorphism by sequence-specific oligonucleotide probing.** *Immunogenetics* 1999, **49**: 471-478.
39. Perlegen Genotype Data. <http://genome.perlegen.com/>. 2007. Ref Type: Internet Communication
40. Fodil N, Pellet P, Laloux L, Hauptmann G, Theodorou I, Bahram S: **MICA haplotypic diversity.** *Immunogenetics* 1999, **49**: 557-560.
41. Kandil E, Noguchi M, Ishibashi T, Kasahara M: **Structural and phylogenetic analysis of the MHC class I-like Fc receptor gene.** *J Immunol* 1995, **154**: 5907-5918.
42. Diefenbach A, Hsia JK, Hsiung MY, Raulet DH: **A novel ligand for the NKG2D receptor activates NK cells and macrophages and induces tumor immunity.** *Eur J Immunol* 2003, **33**: 381-391.
43. Li P, Willie ST, Bauer S, Morris DL, Spies T, Strong RK: **Crystal structure of the MHC class I homolog MIC-A, a gammadelta T cell ligand.** *Immunity* 1999, **10**: 577-584.

44. Radosavljevic M, Cuillerier B, Wilson MJ, Clement O, Wicker S, Gilfillan S *et al.*: **A cluster of ten novel MHC class I related genes on human chromosome 6q24.2-q25.3.** *Genomics* 2002, **79**: 114-123.
45. Chalupny NJ, Sutherland CL, Lawrence WA, Rein-Weston A, Cosman D: **ULBP4 is a novel ligand for human NKG2D.** *Biochem Biophys Res Commun* 2003, **305**: 129-135.
46. Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M, Spies T: **Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**: 12445-12450.
47. Pende D, Rivera P, Marcenaro S, Chang CC, Biassoni R, Conte R *et al.*: **Major histocompatibility complex class I-related chain A and UL16-binding protein expression on tumor cell lines of different histotypes: analysis of tumor susceptibility to NKG2D-dependent natural killer cell cytotoxicity.** *Cancer Res* 2002, **62**: 6178-6186.
48. Groh V, Rhinehart R, Secrist H, Bauer S, Grabstein KH, Spies T: **Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**: 6879-6884.
49. Fodil N, Laloux L, Wanner V, Pellet P, Hauptmann G, Mizuki N *et al.*: **Allelic repertoire of the human MHC class I MICA gene.** *Immunogenetics* 1996, **44**: 351-357.
50. Welte SA, Sinzger C, Lutz SZ, Singh-Jasuja H, Sampaio KL, Eknigk U *et al.*: **Selective intracellular retention of virally induced NKG2D ligands by the human cytomegalovirus UL16 glycoprotein.** *Eur J Immunol* 2003, **33**: 194-203.
51. Das H, Groh V, Kuijl C, Sugita M, Morita CT, Spies T *et al.*: **MICA engagement by human Vgamma2Vdelta2 T cells enhances their antigen-dependent effector function.** *Immunity* 2001, **15**: 83-93.
52. Janeway CA, Jr., Medzhitov R: **Innate immune recognition.** *Annu Rev Immunol* 2002, **20**: 197-216.
53. Raulet DH: **Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands.** *Nat Rev Immunol* 2003, **3**: 781-790.
54. Diefenbach A, Jamieson AM, Liu SD, Shastri N, Raulet DH: **Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages.** *Nat Immunol* 2000, **1**: 119-126.
55. Sutherland CL, Chalupny NJ, Schooley K, VandenBos T, Kubin M, Cosman D: **UL16-binding proteins, novel MHC class I-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells.** *J Immunol* 2002, **168**: 671-679.

56. Chang C, Dietrich J, Harpur AG, Lindquist JA, Haude A, Loke YW *et al.*: **Cutting edge: KAP10, a novel transmembrane adapter protein genetically linked to DAP12 but with unique signaling properties.** *J Immunol* 1999, **163**: 4651-4654.
57. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. <http://www.genome.jp/kegg/>. 2007.  
Ref Type: Internet Communication
58. Wu J, Groh V, Spies T: **T cell antigen receptor engagement and specificity in the recognition of stress-inducible MHC class I-related chains by human epithelial gamma delta T cells.** *J Immunol* 2002, **169**: 1236-1240.
59. Yokoyama WM: **Immunology: catch us if you can.** *Nature* 2002, **419**: 679-680.
60. Girardi M, Oppenheim DE, Steele CR, Lewis JM, Glusac E, Filler R *et al.*: **Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells.** *Science* 2001, **294**: 605-609.
61. Groh V, Wu J, Yee C, Spies T: **Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation.** *Nature* 2002, **419**: 734-738.
62. Salih HR, Rammensee HG, Steinle A: **Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding.** *J Immunol* 2002, **169**: 4098-4102.
63. Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, Topp MS, Riddell SR, Spies T: **Costimulation of CD8alphabeta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells.** *Nat Immunol* 2001, **2**: 255-260.
64. Arshad Chaudry: **Cell Culture.** *The Science Creative Quarterly* 2007, **Issue Two**.
65. **Cancer Cell Line Project.** <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/CellLines/>. 2007.  
Ref Type: Internet Communication
66. European collection of Cell Cultures: <http://www.ecacc.org.uk/>. 2007.  
Ref Type: Internet Communication
67. ATCC: The Global Bioresource Center; <http://www.atcc.org>. 2007.  
Ref Type: Internet Communication
68. Pattillo RA, Hussa RO, Story MT, Ruckert AC, Shalaby MR, Mattingly RF: **Tumor antigen and human chorionic gonadotropin in CaSki cells: a new epidermoid cervical cancer cell line.** *Science* 1977, **196**: 1456-1458.
69. Alberto Monroy García: *"Citotoxicidad de linfocitos de sangre periférica sobre células provenientes de tumores de cáncer cérvico uterino en presencia de interlucina-2 recombinante humana"*. ENEP, Zaragoza - UNAM; 1991. Maestría en IBSH.

70. Jorge Hernández Montes: *Estudio de la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I y del procesamiento de antígenos en líneas celulares derivadas de cáncer cervical infectadas y no infectadas con HPV*. UNAM; 2002. Maestría en Ciencias.

71. **QUANTIMIX EASY SYG KIT for Real Time DNA amplification and quantification.**

<http://www.biotools.net/>. 2006.

Ref Type: Internet Communication

72. UNAM: *"Biología celular", Manual de prácticas*. México: Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.; 1986.

73. **Perfect RNA™ Eukaryotic, Mini Technical Manual.** <http://www.eppendorf.com>. 2007.

Ref Type: Internet Communication

74. **ImProm-II Reverse Transcription System Technical Manual.** <http://www.promega.com>. 2005.

Ref Type: Internet Communication (revisar formato de letra)

75. Salih HR, Antropius H, Gieseke F, Lutz SZ, Kanz L, Rammensee HG *et al.*: **Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia.** *Blood* 2003, **102**: 1389-1396.

76. Cerwenka A, Baron JL, Lanier LL: **Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**: 11521-11526.

77. Eagle RA, Traherne JA, Ashiru O, Wills MR, Trowsdale J: **Regulation of NKG2D ligand gene expression.** *Hum Immunol* 2006, **67**: 159-169.

78. Vetter CS, Lieb W, Brocker EB, Becker JC: **Loss of nonclassical MHC molecules MIC-A/B expression during progression of uveal melanoma.** *Br J Cancer* 2004, **91**: 1495-1499.

79. Abruzzo LV, Lee KY, Fuller A, Silverman A, Keating MJ, Medeiros LJ *et al.*: **Validation of oligonucleotide microarray data using microfluidic low-density arrays: a new statistical method to normalize real-time RT-PCR data.** *Biotechniques* 2005, **38**: 785-792.

80. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods* 2001, **25**: 402-408.

81. Rotor Gene 6. [6.0]. 23-11-2004. Corbett Research. Ref Type: Computer Program