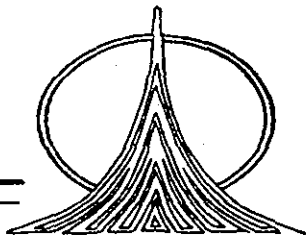


51262



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

U. DE INVESTIGACION EN DIFERENCIACION CELULAR
Y CANCER
LABORATORIO DE INMUNOBIOLOGIA

ESTUDIO DE LA EXPRESION DE MOLECULAS DEL
COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD
CLASE I Y DEL PROCESAMIENTO DE ANTIGENOS EN
LINEAS CELULARES DERIVADAS DE CANCER
CERVICAL INFECTADAS Y NO INFECTADAS
CON HPV.

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
(BIOLOGIA DE LOS SISTEMAS HUMANOS)

P R E S E N T A
JORGE HERNANDEZ MONTES

DIRECTOR DE TESIS: DR. ALBERTO MONROY GARCIA

JURADO DE EXAMEN: DR. VIANNEY F. ORTIZ NAVARRETE

DR. FERNANDO R. ESQUIVEL GUADARRAMA

DRA. MA. DE LOURDES MORA GARCIA

DR. BENNY WEISS STEIDER



DE ESTUDIOS

SUPERIORES

ZARAGOZA

DIVISION DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E
INVESTIGACION

MEXICO, D. F.

2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Inmunobiología de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y cáncer, de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. Fue conducido por el Dr Alberto Monroy García y el Dr Benny Weiss Steider, y asesorado por el Dr. Vianney Ortiz Navarrete, el Dr. Fernando R Esquivel Guadarrama y la Dra M. De Lourdes Mora García

A mis padres

Con la profunda gratitud de siempre.

A Elsa,

Con Amor.

JHM, marzo del 2002.

RECONOCIMIENTOS.

Quiero manifestar mi agradecimiento a las siguientes personas:

Dr. Alberto Monroy García y Dr. Benny Weiss Steider por la conducción de este trabajo.

Dr. Vianney Ortiz Navarrete, Dra. Lourdes Mora García y Dr. Fernando R. Esquivel Guadarrama por la atinada y revisión del mismo.

A los compañeros del Laboratorio de Inmunobiología y de la U de investigación en diferenciación celular y cáncer de la FES Zaragoza

Agradezco encarecidamente el desinteresado apoyo del Dr. Armando Isibasi Araujo y del Dr. José Moreno Rodríguez de las U. de Investigación en Inmunoquímica y de Enfermedades Autoinmunes del Hospital de Especialidades del CMN Siglo XXI.

A Alma Delia Chávez Blanco del Departamento de Investigación Básica del INCAN y Patricia Rojo de la Unidad de Investigación en Enfermedades Autoinmunes del CMN SXXI. Al personal del Laboratorio de Hormonas del H. de Especialidades del CMN Siglo XXI.

El valioso apoyo técnico de los Sres. Ranulfo Pedraza Gamelo y José Chavarría.

Durante el desarrollo de este proyecto conté con el apoyo de una Beca-Tesis por parte del CONACYT

La realización de este trabajo fue posible con el apoyo financiero de los proyectos DGAPA PAPIIT IN216597 e IN210501 y los proyectos CONACYT 34835M y 32852M, así como el apoyo institucional de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM

ÍNDICE

Resumen	1
Marco Teórico	
- I. Inmunidad innata e inmunidad específica	3
- II. Complejo Principal de Histocompatibilidad	4
- III. Procesamiento y presentación de antígenos	7
- IV. Cáncer cérvico-uterino.....	19
- V. Respuesta inmune en contra del cáncer cérvico-uterino	24
- Wvasión de la respuesta inmune en el cáncer cervical	28
Justificación	32
Hipótesis	34
Objetivos	35
Materiales y métodos.....	36
Resultados	
- La línea celular C33 (HPV-) presenta menor expresión de HLA-I total en comparación con epitelio cervical normal	41
- La expresión de moléculas de ratón H-2 ^d se induce con menor intensidad en la línea celular C33.....	43
- Las líneas celulares derivadas de cáncer cervical sin HPV expresan deficientemente las moléculas LMP en comparación con las positivas para HPV.....	46
- La baja expresión de moléculas de histocompatibilidad en la línea celular C33 impide su reconocimiento por parte de linfocitos efectores específicos.....	50
- La línea celular C33 expresa proteínas del virus vaccinia recombinante HA y la núcleo-proteína de influenza con menor intensidad que el resto de las líneas celulares	52
Discusión	55
Conclusiones	62
Perspectivas	63
Bibliografía	65

RESUMEN

Las moléculas de histocompatibilidad clase I (MHC-I) se expresan en la superficie celular asociadas a péptidos provenientes de la degradación de proteínas intracelulares; dependiendo de la naturaleza de esas proteínas. Los complejos formados por las moléculas MHC-I con los péptidos pueden estimular a los linfocitos T citotóxicos, uniéndose a sus receptores específicos. El cáncer cérvico-uterino (Cacu) se asocia a la infección de virus de papiloma humano (VPH) en casi el 100 % de los casos analizados y las células transformadas pueden exponer péptidos derivados de este virus asociados a las moléculas MHC-I, lo que conduciría a su eliminación después de ser reconocidas por linfocitos T citotóxicos específicos. Un impedimento para la erradicación del Cacu puede ser la regulación negativa de la expresión de las moléculas MHC-I en tales células.

En el presente trabajo evaluamos la capacidad de ocho líneas celulares derivadas de Cacu, infectadas y no infectadas con HPV, para expresar moléculas MHC-I.

Observamos que la expresión de las moléculas MHC-I constitutivas es comparable con la de epitelio de cérvix normal en siete de las líneas analizadas. Esas mismas líneas expresaron eficientemente tres alelos de moléculas MHC-I de ratón inducidas por virus vaccinia recombinantes, y fueron lisadas por linfocitos de ratón inmunizados con virus vaccinia en un ensayo de citotoxicidad específica; en contraste, la línea celular C33, carente de secuencias de HPV, mostró una baja expresión de moléculas MHC-I constitutivas así como de los alelos de ratón inducidos por vaccinia recombinante, y no fue lisada específicamente en el ensayo de citotoxicidad. Las células que expresaron eficientemente las moléculas MHC-I expresaron también el ARNm de moléculas relevantes para el procesamiento de antígenos, a diferencia de C33 que no expresó el ARNm para las moléculas LMP7 y LMP10.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Mediante citometría de flujo se detectó una deficiente expresión en la línea C33 de proteínas de virus vaccinia y de la proteína nuclear de influenza inducida por infección con virus vaccinia recombinante, lo que sugiere que la baja expresión de los alelos de MHC-I de ratón por parte de esas células puede deberse a una baja infectabilidad por parte del virus vaccinia o puede reflejar un metabolismo deficiente en esa línea celular, implicando una baja síntesis de proteínas.

Finalmente, se discute la importancia de que las células de Cacu mantengan la capacidad para expresar moléculas MHC-I, en relación con el desarrollo de estrategias inmunoterapéuticas; también es importante evaluar a profundidad el papel que en estas células tiene la expresión aparentemente constitutiva de las moléculas del procesamiento de antígenos, regularmente inducidas por interferón- γ en la generación de péptidos antigénicos.

MARCO TEÓRICO

I. Inmunidad innata e inmunidad específica.

El sistema inmune de los organismos vertebrados está constituido por los productos de un amplio número de genes que codifican tanto para elementos celulares como para elementos humorales; las proteínas resultantes interactúan de manera compleja en los procesos de reconocimiento y respuesta a parásitos de diversas clases y a fenómenos de transformación celular, como los que ocurren en el cáncer. Así, el sistema inmune realiza un sistema de vigilancia y coadyuva a la determinación de la identidad del individuo

Tradicionalmente, se ha clasificado a los elementos del sistema inmune en dos grandes ramas: la de la inmunidad natural o innata y la de la inmunidad específica o adquirida. En la primera se agrupan a los elementos de respuesta inmediata, que no requieren de un previo contacto con los antígenos y tienen un carácter limitado; esta respuesta es propia de los granulocitos y macrófagos, que son capaces de fagocitar a los microorganismos patógenos, generalmente bacterias comunes. La segunda, se refiere a respuestas más sofisticadas donde participan los linfocitos, cuya activación se lleva a efecto como respuesta a la exposición de antígenos específicos, puede afinarse, y persiste como memoria inmunológica durante cierto tiempo

A su vez, la respuesta mediada por los linfocitos es de dos tipos: humoral o celular. La respuesta humoral se efectúa por parte de los linfocitos B mediante la secreción de los anticuerpos: moléculas que pueden asociarse físicamente a antígenos específicos y con ello conducir a la eliminación o neutralización del patógeno correspondiente. Por otro lado, la respuesta mediada por los linfocitos T se efectúa cuando su receptor específico (propio de cada clona) reconoce a un

antígeno en forma de péptido, asociado a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, del inglés: *major histocompatibility complex*), en la superficie de las células blanco; el contacto mediado bajo las condiciones adecuadas conduce a la activación linfocitaria. Los linfocitos T portadores de la molécula CD8 reconocen a péptidos asociados a las moléculas MHC clase I (Norment, et al, 1988) en tanto que los linfocitos T que portan la CD4 interactúan con moléculas del MHC clase II (Doyle et al, 1992).

II. Complejo principal de histocompatibilidad.

El complejo principal de histocompatibilidad en el humano (HLA, del inglés *human leukocyte antigens*) se localiza en el brazo corto del cromosoma 6 y ocupa una larga región de aproximadamente 3500 kb (Figura 1). Dentro de ella se ubican las regiones donde se codifican las moléculas presentadoras de antígenos clase I y clase II, y una región intermedia denominada como clase III (York y Rock, 1996).

La región de la clase II ocupa la posición más centromérica y es donde se localizan los genes DP, DQ, y DR, en ese orden. Para cada una de estas moléculas se codifica una sola cadena α , así como dos o tres β , lo que implica, sobre todo para la molécula HLA-DR, que pueden presentarse más de dos formas alélicas en una misma célula (Rollini et al, 1985; Andersson et al, 1987). Dentro de esta región también se codifican otras moléculas, relevantes para la presentación de péptidos antigénicos asociados a las moléculas clase I: los TAP's (proteínas transportadoras de antígenos) y los LMP's (subunidades constituyentes del complejo enzimático proteasoma), cuya naturaleza y función serán descritas más adelante.

La región de la clase III guarda una posición telomérica respecto a la de la clase II y en ella se codifican varias moléculas componentes del Sistema del

Complemento, el cual constituye una de las ramas humorales del sistema inmune innato. También se localizan los genes de proteínas de choque térmico, de hormonas y de citocinas como el Factor de necrosis tumoral (TNF, del inglés *Tumor necrosis factor*) y la linfotóxina (LT) (White et al, 1984; Browning et al. 1993; Lawton et al, 1995)

La porción más telomérica corresponde a la región clase I, donde se ubican los genes para las cadenas α de los alelos B, C y A. En este caso, cada individuo sólo expresará seis productos alélicos, tres derivados de cada progenitor. La cadena β de las moléculas clase I es la molécula ubicua β -2-microglobulina, la cual se codifica en el cromosoma 17 en el genoma humano.

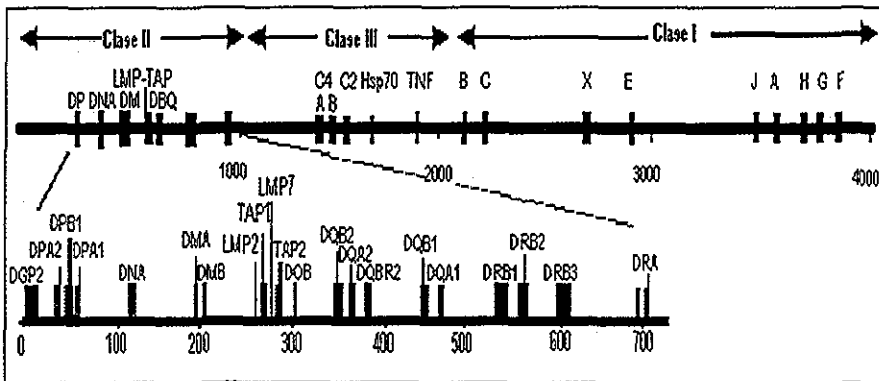


Figura 1. Organización del complejo mayor de histocompatibilidad en el humano (HLA: *human leukocyte antigens*). Comprende aproximadamente 3600 kb y se ubica en el cromosoma 6. La región clase II codifica para las moléculas HLA-DP, -DQ y -DR; asimismo, se codifican las moléculas relevantes en el procesamiento de antígenos LMP2, LMP7, TAP1 y TAP2. Por su parte, en la región clase I se codifican las moléculas clásicas clase-I HLA-A, HLA-B y HLA-C. Tomado de Breifturd et al, 1996

Además de las moléculas clásicas se localizan dentro del MHC una gran cantidad de pseudogenes y otras moléculas homólogas no polimórficas y cuya

función está siendo dilucidada actualmente (HLA E, F y G). Se especula que el elevado número de pseudogenes y genes no polimórficos constituyan un reservorio de material genético para preservar e incluso aumentar la naturaleza polimórfica de las moléculas codificadas por el MHC, con la finalidad de presentar eficientemente un amplio repertorio de péptidos antigénicos (Le Bouteiller y Lenfant, 1996; Wei y Orr, 1990)

Por otro lado, el MHC de ratón (H-2) se ubica en el cromosoma 17 y presenta una estructura semejante al HLA, con la salvedad de que una molécula clase-I (H-2K) tiene la posición más centromérica, en tanto que el resto de las moléculas clase-I (H-2D y H-2L) y las moléculas clase-II conservan una posición relativa semejante a la del MHC del humano (Klein y Figueroa, 1986; Lawlor et al, 1990).

Las moléculas del MHC clase-I están constituidas por dos cadenas denominadas como pesada (α) y ligera (β) (Figura 2) La cadena pesada es una glicoproteína transmembranal de aproximadamente 45 kDa. Además de los dominios citoplásmico y transmembranal pueden identificarse en esta proteína tres dominios extracelulares formados por el plegamiento de la misma (Lawlor et al, 1990); el dominio α_1 , el más próximo a la membrana, tiene la estructura propia que caracteriza a la familia de las inmunoglobulinas. En tanto, los dominios distales α_2 y α_3 se pliegan de una manera peculiar de tal modo que mediante dos hojas β -plegadas y dos hélices- α se forma un surco que es el sitio donde se aloja el péptido asociado a la molécula MHC-I, cuya longitud oscila entre 8 y 10 residuos de aminoácidos (Bjorkman et al, 1987) La cadena β (denominada β -2-microglobulina), es una proteína no transmembranal con una estructura globular, y se codifica fuera del MHC.

Por lo que respecta a la molécula clase-II, está formada por dos cadenas, denominadas α y β , (Lawlor et al, 1990) ambas codificadas en el MHC; estas

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

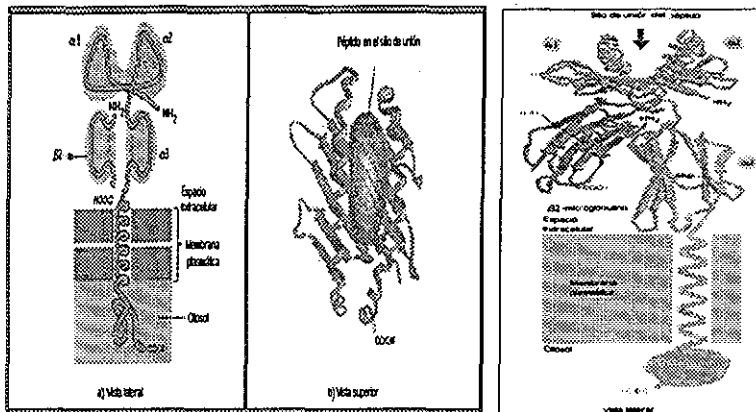


Figura 2. Estructura de las moléculas de MHC clase I. (a) Vista lateral mostrando los dominios α_1 , α_2 , α_3 y a β_2 -m. (b) Vista superior para mostrar el péptido en el sitio de unión. Tomado de Alberts et al, 1994

cadena son transmembranales y cada una presenta dos dominios: los más proximales, α_1 y β_1 , tienen la estructura típica de las inmunoglobulinas, y los distales, α_2 y β_2 , se acomodan en tal forma que forman un surco para alojar al péptido antigénico, con una estructura semejante a la que se encuentra en la molécula clase I (Brown et al, 1988; Brown et al, 1993). Sin embargo, este surco está más abierto que el formado por la molécula clase-I y por lo tanto aloja péptidos más largos, de hasta 25 residuos de aminoácidos, o más.

III. Procesamiento y presentación de antígenos.

El conjunto de procesos intracelulares que conducen finalmente a la exposición de péptidos en la superficie celular en asociación con las moléculas del MHC-I es conocido colectivamente como *procesamiento de antígenos* (Pamer y Cresswell, 1998) (Figura 3) Esquemáticamente, puede dividirse a este fenómeno biológico en cuatro etapas: la degradación de proteínas citosólicas la translocación de

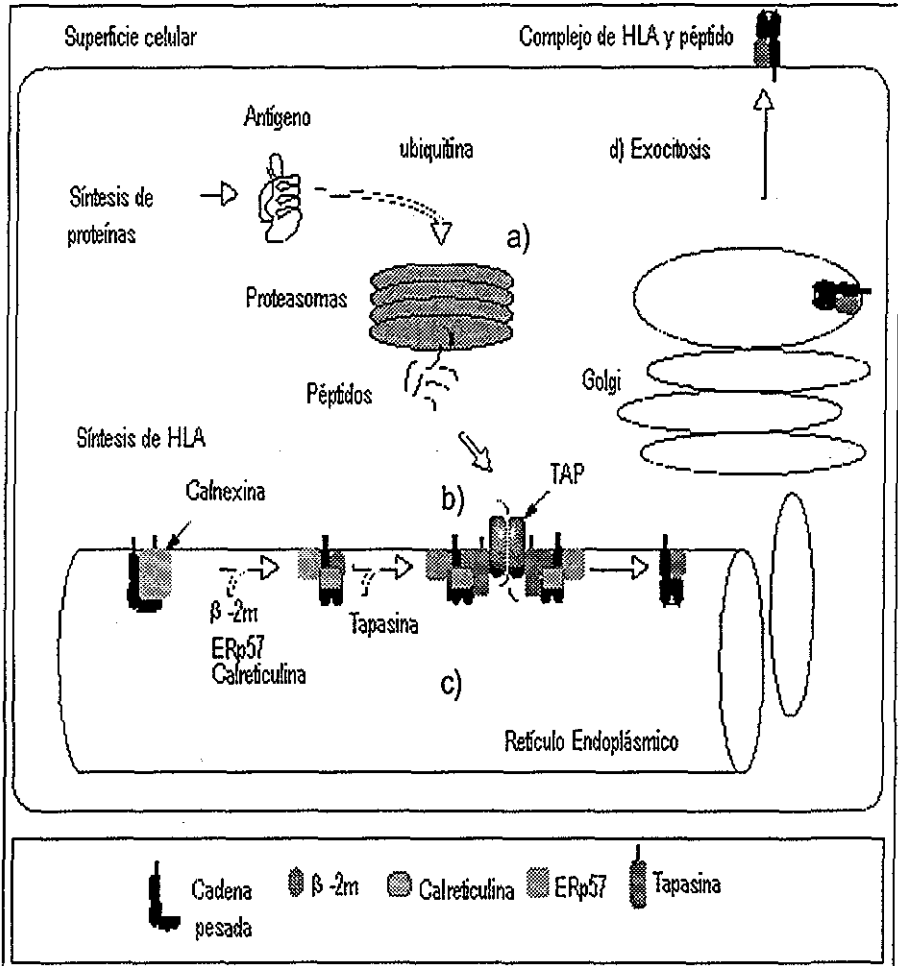


Figura 3 Esquema del proceso intracelular de generación o procesamiento y presentación de péptidos en el contexto MHC clase I. Este proceso requiere de tres pasos principales: a) la generación de péptidos antigénicos por el proteasoma y otras proteasas citosólicas; b) el transporte de péptidos del citosol al retículo endoplásmico mediado por el dímero de TAP y c) el ensamblaje de péptidos con las moléculas HLA clase I, lo cual es asistido por varias "chaperonas" tales como la calnexina, la calreticulina, la ER60 y la tapasina. Tomado de van Endert, 1996.

los péptidos resultantes al interior del retículo endoplásmico, la asociación de los péptidos a las moléculas MHC-I recién formadas y finalmente, el traslado del complejo molecular hacia la superficie celular

El primer paso en el procesamiento de antígenos es la degradación de proteínas intracelulares, esencialmente citosólicas, cuyo origen puede ser propio de la célula o bien, derivado de la infección de agentes patógenos intracelulares tales como virus. El principal mecanismo de degradación de proteínas citosólicas implica la acción de un complejo multienzimático conocido como proteasoma (Hershko et al, 1992), algunas de cuyas subunidades que lo componen son codificadas en el MHC.

La estructura básica del proteasoma, conocida como complejo 20S debido a su coeficiente de sedimentación, es la de un cilindro formado por cuatro anillos apilados, cada uno conformado a su vez por siete subunidades (Figura 4). Los dos anillos centrales son conocidos como unidades β y los dos exteriores como unidades α (Baumeister et al 1998; Coux et al, 1996). Asimismo, el complejo 20S puede sufrir modificaciones que alteran su actividad. Por ejemplo, las subunidades β originales $X(MB1)$ e $Y(\delta)$ son sustituidas por las más eficientes LMP2 y LMP7, cuyos genes se localizan dentro de la región de las moléculas del MHC-II, y cuya expresión es inducida por efecto del interferón- γ (Ortiz et al 1991; Beninga y Goldberg, 1998), como es característico de la mayoría de los elementos codificados en el MHC.

Las subunidades LMP2 y LMP7 modifican la capacidad catalítica del proteasoma, influyendo por tanto, en el repertorio de péptidos disponibles que pueden ser restringidos por las moléculas MHC-I para su presentación. La importancia de estas moléculas quedó manifiesta en ensayos de "knock out" para

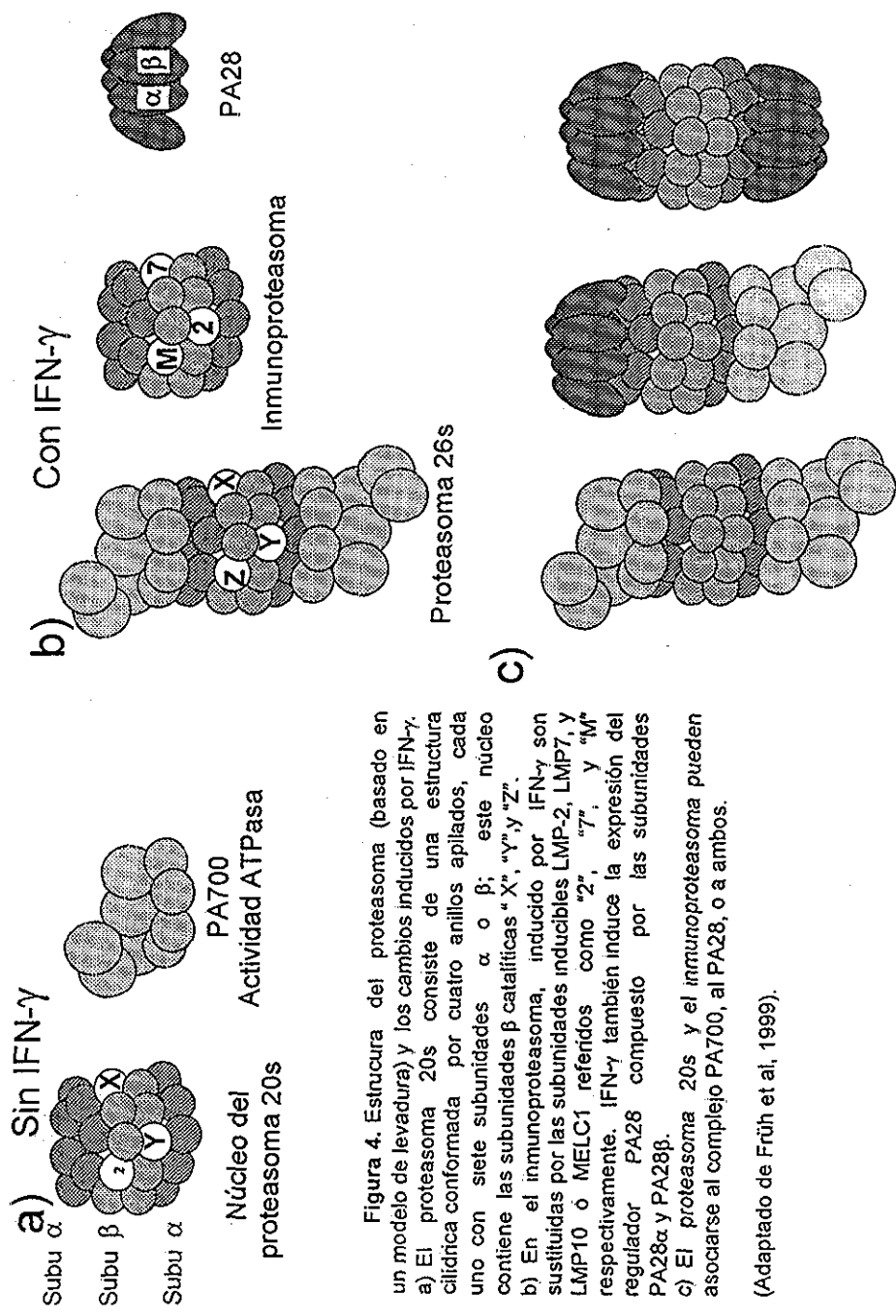


Figura 4. Estructura del proteasoma (basado en un modelo de levadura) y los cambios inducidos por IFN- γ .
 a) El proteasoma 20s consiste de una estructura cilíndrica conformada por cuatro anillos apilados, cada uno con siete subunidades α o β ; este núcleo contiene las subunidades β catalíticas "X", "Y" y "Z".
 b) En el inmunoproteasoma, inducido por IFN- γ son sustituidas por las subunidades inducibles LMP-2, LMP7, y LMP10 o MELC1 referidos como "2", "7", y "M" respectivamente. IFN- γ también induce la expresión del regulador PA28 compuesto por las subunidades PA28 α y PA28 β .
 c) El proteasoma 20s y el inmunoproteasoma pueden asociarse al complejo PA700, al PA28, o a ambos.
 (Adaptado de Früh et al, 1999).

ambas moléculas donde se observó una disminución en la expresión de moléculas MHC-I en la superficie celular, lo cual en el caso de LMP2, significó también una reducción en la generación de precursores de linfocitos T citotóxicos específicos contra péptidos derivados de virus vaccinia (van Kaer et al 1994; Fehling et al, 1994; van Endert, 1996). Posteriormente se describió otra subunidad de proteasoma conocida como LMP10 (CMLP1) que es codificada en el brazo largo del cromosoma 16, cuya expresión se induce con interferón- γ (Tanaka et al, 1997), la cual aumenta la actividad del complejo al desplazar a la subunidad original Z (Nandi et al, 1996; Groettrup et al, 1996)

Por otro lado, tomando como base el complejo 20S puede conformarse un complejo 26S, de unos 1500 kDa, mediante la asociación de las subunidades PA28(11S) ó 19S que compiten en equilibrio dinámico (Coux et al, 1996; Rechsteiner et al, 1993) Ambas subunidades son capaces de sinergizar con LMP2 y LMP7 haciendo más eficiente la capacidad proteolítica del complejo, principalmente en posiciones de la proteína blanco subsecuentes a un aminoácido hidrófobo (Groettrup et al, 1996a; Ustrell et al, 1995) Mediante el uso de microscopía electrónica se ha ubicado a los extremos del complejo 20S como el lugar donde se asocia PA28. Esta subunidad tiene un peso molecular de entre 29 y 31 kDa y se conforma como un anillo compuesto de seis subunidades, de las cuales existen dos especies denominadas PA28 α y PA28 β , que se encuentran en proporciones semejantes (Mott et al, 1994)

Se ha descrito también un complejo formado por 16 polipéptidos, con un peso de aproximadamente 700 kDa, denominado PA700, que al asociarse con el complejo 20S del proteasoma aumenta la capacidad de acción de éste en un factor de ocho veces PA700 tiene actividad ATPasa contenida en múltiples sitios de unión de ATP y se especula que el aporte de este complejo a la actividad del proteasoma sea el despliegue y degradación de proteínas blanco potenciales (Ma et al, 1994; DeMartino et al, 1996)

En cuanto a la actividad específica de los proteasomas se han descrito: a) una actividad semejante a quimiotripsina, b) una actividad semejante a tripsina, c) una actividad peptidilglutamil-péptido-hidrolizante, d) una actividad preferente de aminoácidos ramificados y e) una actividad preferencial por aminoácidos neutros pequeños (Orlowski et al, 1993; Eleuteri et al, 1993).

Un paso importante en el proceso de fragmentación de las proteínas citosólicas es la ubiquitinación previa de la proteína blanco. La ubiquitina es un polipéptido pequeño que se une a su sustrato o a otras ubiquitinas en residuos de lisina, mediante un enlace isopeptídico, con lo que la proteína queda marcada para su degradación. Este proceso requiere de ATP y es catalizado por varias subunidades enzimáticas: una enzima activadora de la ubiquitina (E1), una enzima acarreadora de proteínas (E2) y una enzima ligasa del complejo Ub-proteínas (E3) (Groettrup et al, 1996). Por su parte, entre las subunidades reguladoras del complejo 20S se encuentran dominios que favorecen la degradación de las proteínas ubiquitinadas, por ejemplo: un receptor de ubiquitina que funciona como un sitio de unión de polipéptidos multiubiquitinados (Deveraux et al, 1994) y una isopeptidasa que contribuye a la reutilización de residuos de ubiquitina (Hochstrasser, 1995).

Se ha propuesto que otras proteasas pudieran ser relevantes para la generación de péptidos antigénicos, además del proteasoma. Por ejemplo, Elliot y colaboradores (1995) encontraron en el análisis de fragmentos de proteínas, que éstos no mostraban un patrón consistente con la actividad del proteasoma, sugiriendo la acción de proteasas diferentes. Geier et al (1999) han reportado una proteasa alternativa candidata: peptidasa tripeptidil II (TPII), la cual es una abundante proteasa con múltiples subunidades, y gran tamaño, que co-purifica con proteasomas durante procedimientos de separación basados en el tamaño. La noción de la existencia de proteasas diferentes al proteasoma que participan

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

en la generación de péptidos proviene también de la observación de que la presentación de un gran número de antígenos virales no es afectada por la presencia de inhibidores del proteasoma a concentraciones que inhiben la degradación de sustratos modelo

Una vez que se generan los péptidos en el citosol mediante la acción del proteasoma, son transportados al interior del retículo endoplásmico, aceptándose por consenso que el heterodímero proteico formado por las proteínas TAP1 y TAP2 tiene una función esencial en este proceso. TAP1 y TAP2 son proteínas de 76 y 70 kDa respectivamente, cuyos genes se localizan en el MHC, dentro de la región de las moléculas clase II, en una posición muy próxima a la de los genes de LMP2 y LMP7 (Monaco et al, 1990; Deverson, 1990). Cada una de estas subunidades está constituida por una cadena polipeptídica cuya conformación da lugar a seis dominios transmembranales, además de un dominio de unión de ATP. La asociación de TAP1 y TAP2 no es covalente y se presume que forma un poro selectivo (Trowsdale et al, 1990; York et al, 1996). Estudios citoquímicos han ubicado la posición de este dímero en el retículo endoplásmico y en el Complejo de Golgi, es decir, co-localizado con las moléculas del MHC clase-I, lo cual refuerza la suposición de que cumple una función importante en el procesamiento y presentación de antígenos (Kleijmeer et al, 1992). Estos transportadores muestran cierta homología con una familia de proteínas que poseen un dominio ABC (del inglés *ATP binding cassette*), que transportan compuestos de bajo peso molecular, entre los que se encuentran las proteínas que confieren resistencia múltiple a drogas.

La capacidad de los TAP para el traslado de péptidos se hizo manifiesta cuando la transfección del material génico de estas dos moléculas permitió la reconstitución de la actividad procesadora y presentadora de antígenos en células inicialmente deficientes (Hosken et al, 1990; Monaco, 1992; y Momburg et al, 1994). Asimismo, en ensayos de purificación de membranas celulares se

demonstró un transporte de péptidos al lumen microsomal a través de membranas provenientes de células funcionalmente óptimas, y no así a través de membranas provenientes de células con defectos en la presentación de antígenos (Koppelman et al, 1992)

La asociación de los péptidos con los TAP ocurre espontáneamente una vez que aquellos son liberados del proteasoma; sin embargo, el traslado al interior del RE mediado por los TAP requiere del aporte energético del ATP. Con el empleo de péptidos fotomarcados se ha evaluado cuáles son los dominios relevantes en los TAP para la unión de péptidos: se concluyó que se requiere de la participación de ambas unidades del dímero en este proceso, puesto que la presencia de un único TAP no registra la asociación con los péptidos (Nijenhuis et al 1996; Androlewicz et al, 1992). Ensayos más específicos han revelado la existencia de cuatro puntos de asociación con péptidos en los TAP, que se localizan en las regiones transmembranales (TM) 5 y 6 de ambos TAP, así como en sus prolongaciones citoplasmáticas. Estas regiones conforman, presuntamente, la estructura en forma de poro mencionada previamente, y este modelo es consistente con la idea de transporte a través de los TAP (Nijenhuis et al, 1996b)

Por otro lado, para determinar cuáles residuos de los péptidos son importantes para la unión con los TAP, se ha hecho uso de variantes peptídicas en ensayos de afinidad; de esta manera, se ha sugerido la importancia de residuos hidrófobos en la posición 3 de los péptidos (P3), así como de residuos hidrófobos o cargados de la posición 2 (P2). En forma más general se ha sugerido que los aminoácidos consenso que permiten el anclaje de los péptidos a la molécula MHC clase I son también importantes para la asociación con los TAP (van Ender et al, 1995; Androlewicz et al, 1996).

En ensayos *in vitro* se determinó también que la longitud de los péptidos que son preferentemente transportados por los TAP está entre 8 y 15 residuos de aminoácidos, con algunas excepciones (Momburg et al 1994). Esta longitud es consistente con el tamaño de los péptidos asociados a la molécula MHC clase I para su presentación, que es en su mayoría de nueve aminoácidos.

Los transportadores antigénicos muestran un polimorfismo limitado, sobre todo si se le compara con el polimorfismo de las moléculas MHC-I. El mayor y más significativo grado de polimorfismo se detectó en la rata cuando dos variantes alélicas denominadas *cim^a* y *cim^b* mostraron una clara influencia en la presentación de péptidos antigénicos asociados a las moléculas MHC-I de rata, RT1A^a (Livingstone et al, 1991; Powis et al, 1991). La variante de transportador antigénico *cim^a* se correlacionó con una abundante exposición de la molécula RT1A^a en la superficie, en tanto que lo contrario ocurrió en presencia de la variante *cim^b*. De hecho, la diferencia entre las variantes influye en el repertorio de péptidos disponible, siendo más hidrófobos en presencia de *cim^a*. Los TAP en ratón y en humano también muestran un cierto grado de polimorfismo. En ratón se han descrito 4 formas de TAP1 y 7 formas de TAP2 (Marusiana et al, 1997). En el caso de los TAP humanos, se han detectado por análisis de cadena sencilla de ADN 4 presuntas formas de TAP1 y 8 formas de TAP2 además, un análisis por PCR de líneas homocigotas y donadores caucásicos control dio como resultado la identificación de 3 alelos de TAP1 y 5 alelos de TAP2 (Carrington et al 1993; Powis et al, 1992; Powis et al, 1993). Sin embargo, al parecer el polimorfismo en estas dos especies no representa una importancia significativa para la presentación de antígenos en el contexto de las moléculas MHC-I (Daniel et al, 1997).

Alternativamente a la ruta de transporte de péptidos antigénicos ampliamente aceptada que involucra la actividad de proteasomas y TAP, se ha propuesto la existencia de otras fuentes de péptidos en el retículo endoplásmico,

dado que aun en células deficientes de TAP se detecta la existencia de un gran número de péptidos en el retículo endoplásmico. Por ejemplo, las proteínas que serán expuestas en la membrana de la célula (incluyendo a las de MHC-I) son transportadas al interior del retículo endoplásmico mediante el reconocimiento de un péptido señal que une a un receptor en la membrana de ese organelo. Una vez dentro, precursores de gran tamaño pueden ser blancos de exopeptidasas, dando lugar a péptidos potencialmente antigénicos. Como ejemplo, puede ser citada la proteína Jaw1 cuya expresión se restringe a células del linaje hematopoyético y que tiene actividad endopeptidasa en su ubicación, dentro del retículo endoplásmico (Pamer y Cresswell, 1998). Incluso, se ha citado que puede ocurrir que péptidos generados en el retículo endoplásmico sean expulsados hacia el citosol y entonces transportados nuevamente hacia el interior por medio de la actividad de los TAP (Roelse et al, 1994).

El aporte de péptidos con afinidad por las moléculas MHC-I parece ser un requisito para la estabilización de esas moléculas. Aun cuando las moléculas MHC-I pueden estabilizarse *in vitro* mediante la adición de péptidos adecuados, el transporte hacia la superficie celular implica una conformación previa del complejo MHC-I / β -2-microglobulina / péptido. Sin embargo, estudios precisos han demostrado que en primera instancia, ocurre la asociación entre las moléculas MHC-I con la proteína β -2-microglobulina y este complejo se asocia con el péptido, lo que refuerza la conformación de las moléculas (Burshtyn et al, 1993; Neefjes et al, 1993).

Se ha propuesto que varias moléculas participan en la "asistencia" a la conformación del complejo MHC-I/péptido. Una de ellas, ampliamente estudiada, es llamada calnexina (Galvin et al, 1992; Ahluwalia et al, 1992). La calnexina es una molécula de 88 kDa en los humanos (p88) y de 90 kDa (IP90) en el ratón. Se asocia a las moléculas MHC-I cuando son recién sintetizadas, ya sea en presencia de β -2-microglobulina en el ratón, o como ocurre en células humanas

preferentemente en ausencia de aquella. En estas células no es la presencia del péptido sino de la β -2-microglobulina la que disocia a la calnexina de la molécula MHC-I. Si no llega a ocurrir la formación del complejo trimolecular, las moléculas MHC-I se mantienen asociadas a esta molécula "chaperona" hasta su degradación; en caso contrario, bajo condiciones óptimas, la asociación es transitoria (Degen et al, 1992; Rajagopalan et al, 1994). Sin embargo, se ha demostrado un adecuado ensamblaje y una adecuada presentación de antígenos en una línea celular carente de expresión de calnexina, lo que sugiere que la participación de esta molécula es importante pero no crítica en este proceso. Otra "chaperona", denominada BiP, muestra una actividad semejante a la calnexina, con una asociación específica a las cadenas pesadas de las moléculas MHC-I (Balow JP et al, 1995).

La calreticulina es una molécula de 46 kDa con cierto grado de homología con la calnexina y con una actividad semejante (Sonnichsen et al, 1994). Muestra alta afinidad por iones calcio, comunes en el retículo endoplásmico, y se asocia a glicanos monoglucosilados por medio de enlaces N-terminales. Funciona como "chaperona" de proteínas tales como mieloperoxidasa, hemaglutinina de influenza y transferrina. A pesar de la homología con calnexina, la calreticulina muestra la diferencia sustancial de que preferentemente se asocia a la cadena pesada de las moléculas MHC-I cuando ésta se encuentra unida a β -2-microglobulina (Sadasivan et al, 1996).

Por otro lado, en ensayos de inmunoprecipitación de los complejos formados por las moléculas MHC-I con los TAP, coprecipitó una proteína de 48 kDa a la cual se le asignó la función conectiva de aquellas moléculas y se le denominó tapasina (Ortmann et al, 1994; Sadasivan et al, 1996). El gene que codifica para tapasina se localiza dentro de la región del MHCII a una distancia de 500 kpb de los genes para TAP1 y TAP2. Se trata de una proteína transmembranal de 428 aminoácidos que en su segmento hidrófobo incluye un

residuo de lisina que le permite una interacción con otras proteínas, como es el caso de TAP1. La tapasina forma tetrámeros al asociarse con TAP1; moléculas individuales o dímeros pueden asociarse con TAP1 o con TAP2. Lo más sobresaliente es su capacidad para mantener unido un complejo formado por la cadena alfa de las moléculas MHC-I y TAP1, tal vez en asociación con calreticulina. La función más probable para la tapasina es la de facilitar el "cargado" de las moléculas MHC-I una vez que los péptidos son transportados al interior del retículo endoplásmico por los TAP, aumentando la probabilidad de su encuentro (Ortmann et al, 1997)

La última etapa del procesamiento de antígenos es el paso del complejo trimolecular formado por la cadena pesada, el péptido y la β -2-microglobulina desde el retículo endoplásmico hacia el aparato de Golgi. En este organelo, es englobado en vesículas membranales que se dirigen a la superficie celular donde se fusionan en tal modo que queda expuesto, "presentando" al péptido para su reconocimiento por los linfocitos T.

La mayoría de las moléculas MHC-I que no se asocian con péptidos o β -2-microglobulina no salen del retículo endoplásmico, de modo que el porcentaje de moléculas vacías en la superficie celular es mínimo, evitando la unión de péptidos exógenos (Rock et al, 1991); esta dificultad se refuerza por el hecho de que las moléculas MHC-I que pierden su péptido se disocian rápidamente de la β -2-microglobulina y por tanto, se desnaturalizan. Una vez en la superficie, la estabilidad de diferentes moléculas MHC-I bien conformadas es variable: mientras en linfoblastos T es de 5 horas, en linfoblastos B se trata de 20 horas; la molécula H-2K^k puede permanecer en la superficie durante más de 20 horas en tanto que la molécula H-2L^d no es estable por más de 2 horas (Machy et al, 1989), quizá debido a la poca variedad de péptidos afines por ella. Cuando se disocia el complejo trimolecular, las cadenas pesadas suelen ser endocitadas. El complejo íntegro puede ser internalizado hacia el citoplasma como una respuesta a la

estimulación por complejos multivalentes En macrófagos y linfocitos T las moléculas MHC-I pueden ser endocitadas espontáneamente mediante moléculas de clatrina con una previa señalización de sus dominios citoplasmáticos (Tse et al, 1984; Machy et al, 1987; Dasgupta et al, 1988; Vega et al, 1989).

IV. Cáncer cérvico- uterino.

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) es la neoplasia con mayor índice de mortalidad en el Mundo, así como en nuestro País, y afecta a un gran número de mujeres en edad reproductiva (Meneses et al, 1994).

Esta enfermedad es transmitida sexualmente y por lo tanto, la edad de inicio de las relaciones sexuales y el número de parejas sexuales constituyen los dos factores de riesgo más importantes. Además de ello, existen otros factores que influyen en la susceptibilidad para desarrollar este cáncer: nutrición, competencia inmunológica, metabolismo hormonal, regímenes hormonales (como es el caso de anticonceptivos orales), entre otros (Muñoz y Bosch, 1997)

Desde la década de los 60's y 70's, se detectó la concurrencia de infecciones virales con este padecimiento, como es el caso del herpes y el citomegalovirus, lo que llevó a pensar en que existía una etiología viral para el mismo (Werness, 1995). Actualmente es aceptado por consenso que el virus de papiloma humano tiene una participación preponderante en la etiología de esta neoplasia, lo cual está fuertemente fundamentado mediante la tecnología de PCR con la que es posible detectar ADN de la proteína L1 de este virus en más del 90% de los casos de cáncer cérvicouterino (Bosch et al, 1995) (Figura 5); cuando además de la secuencia genética que codifica para la proteína L1, se evalúan las de las proteínas E6 y E7, pueden detectarse secuencias génicas virales casi en el 100% de las muestras analizadas (Walboomers et al, 1999).

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

El grupo de los virus de papiloma humano (VPH) está constituido por aproximadamente 100 variantes que difieren significativamente respecto de su importancia para el desarrollo del cáncer cévico-uterino (Zur Hausen, 1991). La neoplasia de cérvix así como la de cuello del útero en sus diferentes estadios se han asociado a los tipos 11, 16, 18, 31,33, 35 y 45. Otros tipos de HPV pueden inducir lesiones cutáneas que van desde verrugas hasta cáncer de la piel. En los países en vías de desarrollo, en forma semejante a la tendencia mundial, el tipo 16 se encuentra en aproximadamente el 50% de los casos de CaCu, y el tipo 18 en aproximadamente el 12% (Muñoz y Bosch, 1997).

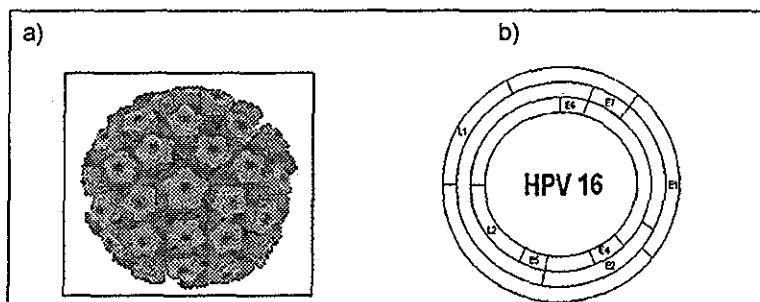


Figura 5. Representaciones de la cápside (a) y del genoma (b) del virus de papiloma humano. La cápside se conforma por el ensamblaje de las proteínas L1 y L2. El genoma, de forma circular, consiste de aproximadamente 8 Kpb y contiene los marcos de lectura para las proteínas de expresión tardía L1, L2 y para las proteínas de expresión temprana E1, E2, E4, E5, E6 y E7, los cuales en algunos casos se traslapan. Tomados de Stannard, 1995 y Tindle, 1996, respectivamente.

Otras evidencias de que los HPV participan en la generación del CaCu provienen del estudio de la estructura de su genoma. Actualmente es sabido que el ADN del HPV es una doble cadena circular de aproximadamente 8000 pares de bases. Este material genético contiene marcos de lectura abierta que pueden dar lugar a ocho diferentes proteínas: E1, E2, E4, E5, E6, E7, L1 y L2. Las proteínas E (del inglés *early*, temprano), toman su nombre por ser las primeras en

expresarse dentro del ciclo de replicación del virus (Villa et al, 1990; Howley, 1991; García-Carrancá y Gariglio, 1993; Tzyy-Chou, 1994). E1 es una proteína reguladora de la replicación debido a su capacidad de unirse a la polimerasa α ; en tanto, E2 es capaz de unirse al ADN y controlar la replicación E5 potencia al receptor del Factor de proliferación epidermal (EGF, del inglés *epidermal growth factor*) y del Factor de proliferación derivado de plaquetas (PDGF, del inglés *platelet derived growth factor*) (Tindle, 1996). E6 y E7 participan de manera determinante en la transformación de las células hospederas, como se describirá más adelante. Por su parte, las proteínas L (del inglés *late*) se expresan sólo en la última etapa de la replicación viral y dan lugar a la cápside, estructura proteica que contiene al material genético en los viriones recién formados, capaces de infectar células adyacentes después de la lisis de la célula hospedero (Tindle, 1996).

El ciclo de replicación del HPV dentro del epitelio cervical tiene características singulares (Tindle, 1996) (Figura 6). La infección ocurre en el estrato celular escamoso-columnar de la transición entre el útero y la vagina, de tal modo que alcanza a células no diferenciadas en el nivel suprabasal. En este estadio el genoma viral permanece en una conformación episomal, y se transcriben principalmente los genes E1, E2, E4, y E5, y sólo muy discretamente E6 y E7 (Lehn et al, 1988). Conforme las células epiteliales basales cambian del estado proliferativo al de diferenciación y se mueven hacia la luz cervical, se da la formación de viriones; sin embargo, la producción de viriones es tan sutil que no alcanza a haber una lisis importante de las células y por consiguiente, se presentan pocos viriones libres. Este estado puede permanecer casi inalterado durante varios años, produciendo a veces sólo algunas alteraciones celulares en forma de displasia

Sin embargo, en algún momento puede ocurrir de manera aleatoria la integración del genoma viral al genoma del hospedero lo que provoca una más

profunda alteración celular. El genoma del HPV tiende a seccionarse en la región de los marcos de lectura abierta de E1 y E2 (Schwarz et al, 1985; Chen et al, 1994). Si la ruptura ocurre dentro de la región de E2, deja de producirse esta proteína, que regula negativamente la expresión de E6 y de E7, dando como resultado una vigorosa expresión de estas proteínas, lo cual es un factor fundamental en el desarrollo de una neoplasia avanzada, dada su actividad transformante (Schwarz et al, 1985). La proteína E6, mediante una ligasa de ubiquitina "marca" a la proteína p53 induciendo a su degradación por parte del complejo del proteasoma (Werness et al, 1990; Scheffner et al, 1990). La p53 por su parte, es una proteína antitumoral que impide la replicación de las células bajo condiciones de alteración genética; así, la proteína E6 elimina un mecanismo preventivo y aumenta la susceptibilidad de la célula infectada para sufrir una transformación. Asimismo, existen evidencias de que la proteína E6 del HPV-16 induce la actividad telomerasa, y se asocia al factor de respuesta a interferón IRF3, entre otras actividades (Klingelhutz et al, 1996; Ronco et al, 1998).

Por su parte, la proteína E7 tiene la capacidad de interactuar con proteínas encargadas de la regulación del ciclo celular, principalmente inhibidores de las ciclinas (proteínas conductoras del ciclo celular) como lo son el p27 y el p21 (Galloway et al 1997, McIntyre et al 1996). Además, una de las actividades más notables de E7 es su capacidad de asociarse y fosforilar a la proteína Rb, la cual constituye un "freno" a la progresión del ciclo celular (Dyson et al, 1989). Durante la mitosis (M) la proteína Rb no está fosforilada y puede asociarse con el factor regulador E2F. Esta asociación impide la progresión del ciclo celular y detiene a las células en la fase G1; sin embargo, la fosforilación inducida por la proteína E7 evita la asociación de la proteína Rb con el factor E2F. La actividad de E7 favorece el rompimiento del control del ciclo celular con lo que las células altamente proliferantes pierden marcadores de diferenciación y devienen blancos de alteraciones genéticas adicionales dirigiéndose entonces hacia la formación de una neoplasia.

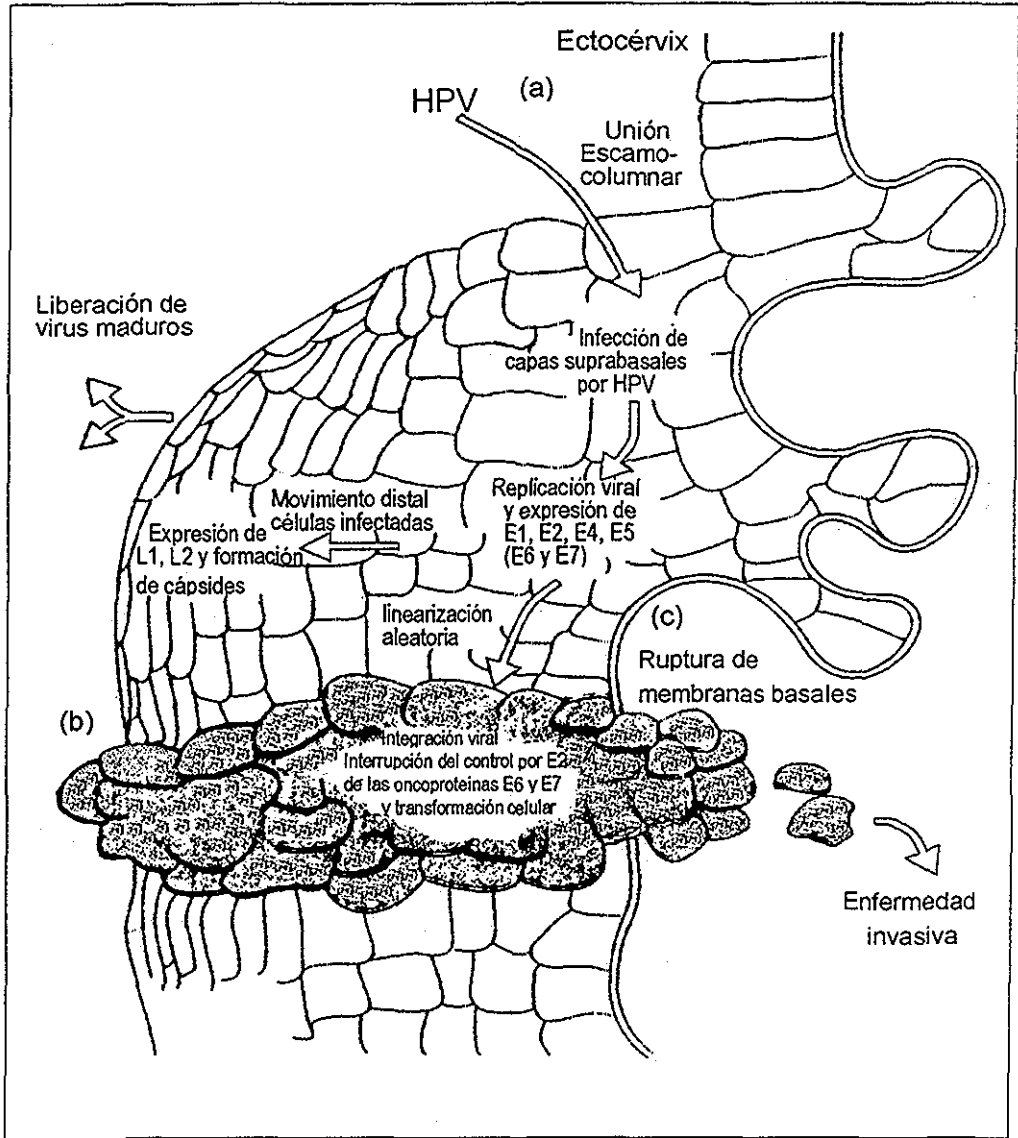


Figura 6. Ciclo de replicación del virus de papiloma humano en el cérvix señalando su integración aleatoria en el genoma del hospedero y su papel en la carcinogénesis (Ver texto) Tomado de Tindle, 1997.

Existen dos evidencias adicionales de que el HPV participa en la etiología del cáncer cervical, además de las mencionadas anteriormente. Una de ellas es la capacidad que tienen las proteínas E6 y E7 para transformar cultivos celulares *in vitro* (McDougal, 1994); la otra es el hecho de que las secuencias de ADN que codifican para estas proteínas persisten en las células transformadas aun cuando se pierdan otras, lo que parece ser una condición necesaria, aunque no suficiente para mantener el estado de transformación celular (Pater y Pater, 1985).

V. Respuesta inmune en contra del cáncer cérvico-uterino.

Existen evidencias circunstanciales que permiten suponer que la respuesta inmune juega un papel determinante en el destino que alcance una infección con HPV. Por ejemplo, la aparición de verrugas ocasionadas con ciertos tipos de HPV es significativamente más frecuente en personas con características de inmunosupresión: mujeres embarazadas, pacientes sometidos a terapias inmunosupresoras para recibir un transplante, o enfermos de SIDA (Benton et al, 1992). Asimismo, se ha reportado que tales verrugas desaparecen comúnmente cuando es posible revertir la inmunosupresión. De esta manera, es probable que en los primeros estadios de las lesiones causadas por tipos de HPV de alto riesgo como lo son los condilomas y las displasias, el sistema inmune logre neutralizar al HPV y, consecuentemente, se produzca la regresión de la lesión. Una evidencia más en el mismo sentido es el hecho de que en algunos análisis de lesiones producidas por HPV se han encontrado infiltrados de células relevantes para la respuesta inmune: linfocitos T citotóxicos, macrófagos y células asesinas naturales (Tay et al, 1987; Fierlbeck et al, 1989)

La complicada evolución del ciclo replicativo del HPV, descrito anteriormente, hace difícil la aparición de una respuesta inmune humoral eficaz dado que la liberación de los viriones es sumamente restringida. Sin embargo,

diversos estudios han dado cuenta de la existencia de títulos de anticuerpos específicos contra proteínas del HPV (Yamada et al, 1995; Cheng et al, 1995) No resulta claro si estos anticuerpos se generan a partir del reconocimiento de los pocos viriones que se liberan durante la replicación viral o si se generan a partir del reconocimiento de viriones liberados después de la lisis de las células infectadas

La cápside del HPV está compuesta por las proteínas de expresión tardía L1 (en un 90%) y L2, que constituyen el blanco más accesible para los anticuerpos, aunque también se han encontrado anticuerpos contra proteínas de expresión temprana. En modelos de conejo y bovinos se ha demostrado la protección efectiva en contra de la infección por virus de papiloma por medio de la inmunización con proteínas virales L1 y L2 desnaturalizadas, sin conocerse aun con certeza los mecanismos de inmunidad involucrados que impiden la infección epitelial (Campo, 1995; Lin, et al, 1992).

Por otro lado, en pacientes de CaCu con infección de HPV se han detectado anticuerpos capaces de reconocer a partículas tipo virales (VLP del inglés *virus-type particles*). Este ha sido el caso para el 50% de mujeres con infección por HPV-16 bajo estudio (Cheng et al, 1995) Aparentemente, la presencia de estos anticuerpos coincide con etapas de infección severa, desapareciendo después de transcurrida ésta, posiblemente en ausencia de una producción de viriones efectiva (Berumen y Villegas, 1997)

Como se mencionó, también se han detectado títulos de anticuerpos específicos para proteínas virales tempranas en el suero de las pacientes con CaCu; por ejemplo, frecuentemente se han encontrado anticuerpos contra la proteína E7 de HPV-16 y HPV-18 (Muller et al, 1992; y Nindl et al, 1994) De forma paralela, se han detectado anticuerpos contra la proteína E2 de HPV-16 y HPV-18 (Lentinen et al, 1992; y Dillner, 1994), así como contra E4 (Villa et al,

1990; Kanda et al, 1992; Onda et al, 1993) y E6 de HPV-16 en suero de pacientes con CaCu (Ghosh et al, 1993; y Nindl et al, 1994). Además se ha sugerido que los títulos de anticuerpos contra las proteínas E2, E6 y E7 se asocian en forma estrecha con la evolución de la enfermedad (Dillner, 1988; Viscidi et al, 1993)

Aun hoy, no resulta claro si estos anticuerpos tienen un papel efectivo en el control de la enfermedad y por otro lado, su valor pronóstico también es motivo de controversia. Por una parte, como se mencionó anteriormente, el título de anticuerpos depende del momento en que se ubique la infección viral, y por tanto, se ha sugerido que este título se relaciona estrechamente con el desarrollo de la enfermedad (Ghosh et al 1993; Viscidi et al, 1993). Sin embargo, existen resultados divergentes entre distintos estudios respecto de títulos de anticuerpos contra HPV detectados, debido a las diferentes características de cada uno de ellos: el antígeno estudiado, el método de detección, la edad de las pacientes incluidas en el estudio entre otros criterios de selección, los factores hormonales que puedan afectar a las mujeres sujeto de estudio, etc. Concluyendo, si las proteínas virales funcionan como antígenos para el tratamiento de la enfermedad o para indicar el riesgo de inicio o el posible desarrollo de la neoplasia, queda aun por ser determinado (Devesa et al, 1986; Dillner et al, 1989).

Por otro lado, los primeros indicios de que el sistema inmune puede efectuar una respuesta celular en contra de una infección por HPV provinieron del análisis de casos de infección cutánea por HPV así como de ensayos de proliferación linfocitaria in vitro (Steele et al, 1993; Chambers et al, 1994). En otros ensayos, consistentes en la inoculación de proteínas recombinantes derivadas de HPV-16 en la piel de mujeres con neoplasia intracervical, se observó una respuesta inflamatoria debida a la proteína L1 de la cápside, pero no ocurrió lo mismo como respuesta a la proteína de expresión temprana E4 (Höpfl et al, 1991); sin embargo, cuando se hicieron pruebas semejantes en voluntarios

asintomáticos, se observó una respuesta cutánea debida a ambas proteínas (Steele et al, 1993)

En la respuesta celular hacia el HPV convergen diferentes tipos celulares que son detectados al analizar el infiltrado de las lesiones producidas por la infección; se encuentran células asesinas naturales (NK, del inglés *natural killer*), macrófagos, células de Langherhans, linfocitos T cooperadores, así como linfocitos T citotóxicos. Las células NK son pobremente específicas, pero son capaces de eliminar a células infectadas con virus; a pesar de ello, y de encontrarse en los infiltrados de lesiones producidas por la infección con HPV, es común encontrar células cervicales transformadas resistentes a la acción de las NK (Gildlund et al, 1981; y Ortaido et al, 1995) Las células de Langherhans actúan como células dendríticas presentando antígenos a las células efectoras del sistema inmune con una alta eficiencia, la cual puede quedar anulada cuando las células blanco expresan deficientemente a las proteínas del MHC, como suele ocurrir con variada intensidad en los diferentes estadios del cáncer cervical

Por otra parte, como se mencionó anteriormente, después de la integración del genoma viral a la célula huésped existe una expresión constitutiva de las proteínas virales E6 y E7, presuntamente al quedar exentas del control que sobre ellas ejerce inicialmente la proteína E2. Por tal motivo, las proteínas E6 y E7 son consideradas como candidatas para funcionar como marcadores tumorales específicos. Concretamente, se supone que pueden ser presentados péptidos antigénicos derivados de tales proteínas en el contexto de las moléculas de histocompatibilidad clase I. En diversos trabajos realizados en este sentido, se han identificado péptidos con secuencias derivadas de E6 y E7 con una potencial capacidad antigénica. El entendimiento de la inmunidad mediada por células hacia infecciones de HPV ha sido facilitado por la identificación de epítopes o péptidos provenientes de HPV que se unen a las moléculas Clase I y II del MHC (Tzyy-Choou, 1994). Varios grupos han intentado identificar epítopes de linfocitos

Th a partir de proteínas de HPV en ratón (Davies et al, 1990; Comerford et al, 1991; Tindle et al, 1991; y Shepherd et al 1992) y en humano (Steele et al, 1993). Tindle y colaboradores (1991), identificaron un péptido para linfocitos Th de ratón a partir de la proteína E7 de HPV-16 (aminoácidos 48-54). Este epítipo fue reconocido en asociación con cinco alelos MHC-II de tipo I-A e I-E, además de proveer ayuda para la producción de anticuerpos para varios epítopes de linfocitos B, incluyendo a un epítipo de la proteína E7 de HPV-18 para linfocitos B. Aunado a ello, varios investigadores, han identificado epítopes para linfocitos T citotóxicos tanto en ratón (Stauss et al, 1992; Feltkamp et al, 1993; y Sadovnikova et al, 1994) como en humanos (Kast et al, 1993; Kast et al, 1994; y Tarpey et al, 1994) a partir de proteínas de HPV. El grupo de Feltkamp (1993) ha identificado un epítipo de la proteína E7 de HPV-16 que se une a moléculas H-2K^b y H-2D^b en estudios de unión de péptidos en un modelo de ratón. De manera similar, el grupo de Kast (1994), ha identificado varios péptidos que se unen con alta afinidad en alelos de tipo HLA-A derivados de las proteínas E6 y E7 de HPV-16.

VI. Evasión de la respuesta inmune en el cáncer cervical.

La deficiencia en la respuesta inmune para combatir a las células tumorales puede asociarse con múltiples fallas de los componentes del sistema inmune o bien, de las propias células blanco. Las células malignas en utilizan cuando menos tres caminos para evadir la respuesta inmune citotóxica: a) la modulación de la expresión de moléculas del MHC; b) la modulación de otras moléculas de unión y co-estimulación en la superficie celular, y c) la modulación de la secreción de citocinas celulares. Estos cambios, que pueden ir acumulándose durante la evolución de la enfermedad, repercuten sobre las células inmunocompetentes de tal manera que reducen su número y capacidad de respuesta específica, lo cual puede contribuir a la progresión tumoral de las lesiones cervicales inducidas por el HPV (Tzyy Choou, 1994; Berumen et al, 1997)

Las moléculas del MHC tienen la capacidad de presentar antígenos virales que son potencialmente reconocidos por los linfocitos T, lo que debe inducir una respuesta específica para eliminar al tumor. Hay varios mecanismos que pueden alterar la expresión de moléculas MHC-I, como son: mutaciones o arreglos en el gene de la β_2 -microglobulina, cambios en la metilación y estructura de los genes de clase I, regulación negativa de la expresión de moléculas MHC-I por oncogenes o por proteínas virales, inhibición en el transporte o glicosilación de moléculas MHC, mutación en los genes de TAP's, entre otros (Garrido et al, 1993; Cromme et al. 1993a; Hilders et al. 1994; Hilders et al, 1995)

Respecto a las lesiones asociadas al HPV, la expresión de las moléculas MHC-I y β_2 -microglobulina, se ha encontrado ligeramente disminuida en los condilomas (Viac et al, 1993), disminuida de manera importante en las lesiones premalignas, y muy heterogénea o ausente en 75% de los carcinomas invasores (Carina et al, 1995; Connor et al, 1990; Cromme et al, 1993a/b; Glew et al, 1992; Glew et al, 1993;)

Se ha encontrado también que la expresión de β_2 -microglobulina está disminuida en una gran proporción de tumores avanzados (90%) en relación con epitelio normal, lo cual concuerda con la falta de expresión de MHC-I en tumores que ya han penetrado las membranas basales (Petersen et al, 1993); esta disminución ocurre principalmente a nivel postranscripcional y se ha tratado de relacionar con la presencia de HPV-16 (Keating et al, 1995), aun cuando actualmente no hay indicios de que el HPV influya en este fenómeno. Las lesiones premalignas y malignas suelen presentar una expresión negativa específica del locus MHC-I (HLA-A, B, y C) (Cromme et al, 1993a). Se ha encontrado una expresión reducida de moléculas MHC-I en el 70% de los tumores estudiados, con un 50% de disminución en la expresión del alelo HLA-A2, 66% en A3, 56% en Bw4 y 37% en Bw6 (Hilders et al, 1994). De igual manera, se ha observado que la disminución de la expresión de moléculas MHC-I en células de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

tumores cervicales con metástasis es de 60%, mientras que en tumores primarios es de 21%, lo cual también se ha encontrado correlacionado con una disminución en la presencia de linfocitos infiltrantes del tumor, lo que sugiere que la pérdida de la expresión de MHC-I juega un papel decisivo en la vigilancia inmune, aumentando con ello el potencial metastásico de las células tumorales (Hilders et al, 1995).

Por otra parte, se evidenció que la pérdida de expresión de moléculas MHC-I en tumores, está relacionada con la pérdida de expresión de TAP-1 y esto a su vez con el grado de malignidad (Restifo et al, 1993; Kaklamanis et al, 1995; Hailei et al, 1995; Sanda et al, 1995). Algunos estudios encuentran que la expresión de los alelos HLA-A y HLA-B por células tumorales es regulada negativamente en por lo menos el 73% de carcinomas cervicales, y aproximadamente un 50% de estos tumores presentó la pérdida de la expresión de TAP, sugiriendo que la inhibición de TAP es una estrategia potencial de las células malignas para evadir la respuesta inmune (Cromme et al, 1993a/b; Cromme et al, 1994a/b; Keating et al, 1995) Este resultado ha sido refutado recientemente al encontrarse una expresión normal de TAP-1 en estirpes celulares derivadas de CaCu (Brady et al, 2000) Sin embargo, en otros tipos de carcinomas humanos, se ha detectado una baja expresión de ARNm para las proteína TAP-1 y TAP-2 junto con la baja expresión de las subunidades del proteasoma LMP-2 y LMP-7 (Restifo et al, 1993; Sanda et al, 1995)

Un rasgo comúnmente asociado a la pérdida de la expresión de las moléculas MHC-I, es la pérdida de heterocigocidad de la región 6p.21-6p.123 (hasta en un 50%) que es donde se localiza el complejo principal de histocompatibilidad (Koopman et al, 2000). Esta pérdida puede significar una presión selectiva para eliminar alelos MHC-I que presenten antígenos relevantes para la eliminación de la célula tumoral. De acuerdo con ello, se ha sugerido la regulación negativa del alelo HLA-B7 se asocia con un pobre pronóstico para la

evolución del cáncer, y que la pérdida de los alelos HLA-B7/-40 se correlaciona con metástasis (Duggan-Keen, et al 1996, Honma et al 1994)

Recientemente, se ha propuesto que la anulación de la expresión de moléculas MHC-I en la superficie de células de carcinoma cervical puede deberse también a mutaciones puntuales en el gene de los alelos en cuestión, que introducen secuencias de paro que impiden la síntesis de un producto completo (Brady et al 2000; Koopman et al, 2000).

La infección celular por ciertos tipos de virus parece ser causa de la regulación negativa de la expresión de moléculas MHC-I, debido a la interacción entre proteínas virales con las propias moléculas MHC-I o con proteínas importantes para el aporte de péptidos antigénicos, como ocurre por ejemplo con el citomegalovirus. Sin embargo, en la actualidad no se conoce una actividad semejante para ninguna de las proteínas del HPV, cuya capacidad transformante reside en otras funciones.

JUSTIFICACIÓN

El cáncer cérvico-uterino es un serio problema de salud en el Mundo, y en México constituye una de las causas de morbilidad y mortalidad asociadas a una neoplasia con los más altos índices de incidencia. Aun cuando su prevención puede resultar relativamente sencilla mediante el monitoreo sistemático de muestras cervicales, las campañas de información y asistencia realizadas con esa finalidad resultan ineficientes y no se observa una disminución en las tasas de incidencia, debido a las condiciones socio-económicas de algunas regiones de nuestro País

Un gran número de grupos de investigación en todo el Mundo tratan de desarrollar vacunas en contra del cáncer cérvico-uterino, basadas en la respuesta inmune del organismo contra agentes infecciosos, pues la asociación de esta patología con el virus de papiloma humano (VPH) en casi el 100% de los casos hace sumamente atractiva esta estrategia. Una vacuna de esta naturaleza presentaría dos ventajas importantes: una mayor accesibilidad a amplios sectores poblacionales y una alternativa a los agresivos esquemas *empleados actualmente en el tratamiento de esta enfermedad en estadios avanzados*. Como ejemplo, han sido caracterizadas secuencias de péptidos derivadas de proteínas del VPH, capaces de asociarse con moléculas de histocompatibilidad y de generar protección en ensayos *in vitro*; sin embargo, actualmente no ha sido posible desarrollar una terapia con las características deseadas.

La falta de éxito en este campo se debe en parte a que la complejidad de la patología *in vivo* ha impedido que sean comprendidos cabalmente los mecanismos biológicos que se presentan en ella; la aplicación práctica hasta ahora ha reportado resultados limitados, y por tanto, se requiere profundizar en el conocimiento de la biología del cáncer cérvico-uterino para poder proponer estrategias que conduzcan a la elaboración de estrategias inmunoterapéuticas efectivas

El propósito del presente trabajo fue explorar la capacidad de ocho líneas celulares de cáncer cérvico-uterino para expresar eficientemente antígenos de histocompatibilidad clase-I. Para ello, se evaluó la expresión de las moléculas HLA-I constitutivas así como moléculas de ratón inducidas a expresarse mediante la infección con virus vaccinia recombinante, de acuerdo con un modelo descrito previamente. Asimismo, se evaluó la expresión de moléculas relevantes para el procesamiento de antígenos: TAPs, LMPs y PA28.

HIPÓTESIS

El sistema inmune por medio de los linfocitos T citotóxicos es capaz de reconocer y eliminar a células infectadas por virus. Tal reconocimiento implica la generación de péptidos derivados de proteínas intracelulares que se asocian a las moléculas de histocompatibilidad clase I que en la superficie celular son reconocidos por los receptores clonotípicos de los linfocitos T citotóxicos. La generación de péptidos implica la participación concertada de diversas proteínas que realizan la fragmentación de las proteínas y el transporte de los péptidos, en un el procesamiento de antígenos. Por otra parte, el cáncer cérvico-uterino se asocia en más del 90% de los casos con virus de papiloma humano, lo cual debería de conducir al reconocimiento y eliminación de las células tumorales. El establecimiento de un crecimiento tumoral requiere de la evasión de la actividad citotóxica de los linfocitos T, que puede atribuirse a defectos en los componentes del procesamiento antigénico.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la expresión de moléculas HLA-I y de moléculas relevantes para el procesamiento de antígenos en ocho líneas celulares derivadas de cáncer cérvico-uterino (CaCu).

OBJETIVOS PARTICULARES:

Evaluar la expresión constitutiva de moléculas HLA-I en líneas celulares derivadas de CaCu

Evaluar la expresión inducida de un alelo de histocompatibilidad común en ocho líneas celulares derivadas de CaCu

Evaluar la expresión de las moléculas TAP-1, TAP-2, LMP-2, LMP-7, LMP-10, PA28 α y PA28 β en líneas celulares derivadas de CaCu.

Evaluar la susceptibilidad de líneas celulares derivadas de CaCu para ser lisadas específicamente en un ensayo de citotoxicidad.

Comparar la capacidad de presentación de antígenos asociados a las moléculas de histocompatibilidad clase I en líneas celulares de CaCu infectadas con HPV con líneas celulares de CaCu no infectadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular

En este estudio se emplearon ocho líneas celulares derivadas de cáncer cérvico-uterino obtenidas comercialmente o generadas en la UIDCC de la FES-Zaragoza. Cuatro líneas celulares son positivas para la detección de virus de papiloma humano (HPV) tipo 18, en tres de ellas secuencias de HPV-16 y en las otras dos no se ha detectado alguna secuencia genómica de HPV de alto riesgo (Cuadro 1). Como controles positivos o negativos de la expresión de moléculas del MHC y del procesamiento de antígenos se utilizaron las líneas celulares T2, P815, y HTB9, además de cultivos primarios de epitelio normal de cérvix y linfocitos de sangre periférica. Todas las líneas celulares fueron mantenidas en medio de cultivo RPMI (Microlab, Mex) complementado con suero fetal de bovino (SFB) al 10% (Gibco o Hyclone, USA), dentro de un incubador biológico a 37°C, con 5% de CO₂ en un ambiente de humedad saturante. Donde correspondía, las células fueron incubadas en presencia de interferón- γ a una concentración de 400u/mL durante 48 horas.

TIPO CELULAR	CARACTERÍSTICAS
T2	Línea linfocítica con expresión deficiente de TAP1, TAP2, LMP2 y LMP7.
Linfocitos de sangre periférica (LSP)	Donadores normales
HTB9	Carcinoma de vejiga humana
Epitelio normal de cérvix (ENO)	Cérvix sin diagnóstico oncológico
Caski	Carcinoma epidermoide cervical metastásico (HPV-16)
Siha	Carcinoma escamoso de cérvix (HPV16)
Calo	Carcinoma epidermoide de células grandes no queratinizado; estadio clínico IIB. (HPV18)
Inbl	Carcinoma epidermoide de células grandes no queratinizado; estadio clínico IVB. (HPV18).
Hela	Carcinoma epiteloide (adenocarcinoma) (HPV18).
Vipa	Carcinoma IIA (HPV18)
C33A	Carcinoma de cérvix (HPV negativo)
Vibo	Carcinoma de cérvix (HPV negativo).

Cuadro 1

Citometría de flujo.

Para la detección de moléculas mediante citometría de flujo, las células fueron cosechadas y ajustadas a 5×10^5 células en 100 μL de solución amortiguadora de fosfatos (SAF) al 2% de SFB por pozo, en placas de 96 pozos. Después de centrifugar y descartar el sobrenadante, los botones celulares fueron resuspendidos en 100 μL de ascites al 10 % en SAF, con los anticuerpos W6/32 (alelos A, B y C del HLA) o SF1 1 (alelo K^d del H-2), y mantenidas a 4°C durante 30 min. Después de lavar las células dos veces con SAF al 2% de SFB, las células fueron incubadas con 100 μL de anticuerpo secundario fluoresceinado cabra anti-ratón (GAM-FITC, Gibco, USA) a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en SAF al 2% de SFB, por 15 minutos a 4°C. Después de dos lavados, las células fueron resuspendidas en 400 μL de SAF al 2% de SFB para ser analizadas mediante citometría de flujo (FacScan, Becton Dickinson, USA). Como referencia se empleó el marcaje celular sólo con anticuerpo secundario (marcaje inespecífico) y el procedimiento se realizó por duplicado. Para detectar a la núcleo-proteína de influenza y proteínas del virus vaccinia intracelularmente, el amortiguador de lavado e incubación fue SAF con 0.5% de SFB y 0.3% de saponina. En este caso, las células fueron previamente fijadas al resuspenderse durante 10 minutos en paraformaldehído al 4% en SAF, y como control se empleó la tinción de células infectadas con vaccinia recombinante vacc-HA.

Ensayo de transcripción reversa con reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

Obtención de ARN total

Para obtener el ARN total se empleó el reactivo Trizol (Gibco, USA) de acuerdo con las instrucciones remitidas por el proveedor. Brevemente, el cultivo celular confluyente en buenas condiciones de una caja de 6 cm de diámetro fue lavado con SAF y entonces lisado al agregar directamente 1 mL de Trizol que fue posteriormente transferido a un tubo para microcentrifuga de 1.5 mL de

capacidad En caso de células no adherentes, éstas fueron recuperadas mediante centrifugación, lavadas con SAF y lisadas directamente en el tubo Eppendorf A partir de este momento, se sometieron al proceso indicado consistente en la lisis con isotiocianato de guanidina y la extracción mediante la formación de una fase orgánica (fenol-cloroformo) y una fase acuosa donde se encontraba solubilizado el ARN. Se precipitó con isopropanol para recuperarlo y resuspenderlo en 40 μ L de agua tratada con dietilpirocarbonato Finalmente, fue cuantificado mediante una lectura de la absorbancia de la solución en un espectrofotómetro a 260nm de longitud de onda.

Transcripción reversa

La reacción de transcripción reversa se efectuó en tubos para PCR en un volumen de 100 μ L En cada tubo se agregaron los siguientes reactivos, cuya concentración final fue: ARN 10 μ g, MgCl₂ 5mM, Buffer RT 1X, dNTP's 4mM, inhibidores de RNAsas 25U, Oligo-dT 1 25 μ g, dithiothreitol (DTT) 25mM, enzima transcriptasa reversa M-MLV 200U, H₂O cbp 100 μ L (todos los reactivos empleados: Gibco, USA). La reacción se efectuó a 42°C durante 1 hora para finalizar a 95°C durante 5 minutos en un termociclador de marca Techné (USA)

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta reacción se efectuó en un volumen final de 25 μ L. Para tal efecto se mezclaron los siguientes reactivos, cuya concentración final resultó la siguiente: cDNA 5-10 μ L; amortiguador para la reacción de PCR 1X (Biotecnologías Universitarias, Mex), MgCl₂ 1.5mM (Biotecnologías Universitarias, Mex); dNTP's 0.8mM (Gibco, USA); enzima polimerasa de ADN (Biotecnologías Universitarias, Mex) 1 U, oligonucleótidos específicos para β -actina 0.1mM (Gibco,USA), H₂O cbp 25 μ L

Los oligonucleótidos empleados para dirigir la polimerización específica fueron los siguientes: β ACTINA: GGG TCA GAA GGA TTC CTA TG y GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG; TAP1: CAG AAT CTG TAC CAG CCC y CTG GCT GTT TGC ATC CAG G (Singal DP et al, 1998); TAP2: TAC CTG CTC ATA AG AGG GTG C y ATT GGG ATA TGC AAA GGA GAC (Seliger et al, 1997);

LMP2: GGG ATA GAA CTG GAG GAA CC y AGA TGA CAC CCC CGC TTG AG; LMP7: GAA CAC TTA TGC CTA CGG GGT C y TTT CTA CTT TCA CCC AAC CAT C; LMP10: ATT CTG GGC GCC GAT ACG CG y GCC AGG GCC GCG TCC TGA CC; PA28 α : GAG CCA GCT CTC AAT GAA GCC y CAC CAG CTG CCG ATA ATC ACC; PA28 β : CAC CCA AGG ATG ATG AGA TGG y GCT CAG CAT AGA AGG CCC TCA G (Johnsen et al, 1999).

Ensayo de citotoxicidad.

Generación de células efectoras

Ratones de la cepa Balb/c, con haplotipo H-2^d (Bioterio de la FES-Zaragoza, UNAM) fueron inmunizados intraperitonealmente con 10×10^6 unidades formadoras de placas (pfu) de virus vaccinia recombinante con hemaglutinina (vacc-HA) en 100 μ L de SAF. Después de por lo menos 15 días, los ratones fueron sacrificados y se les extrajo el bazo, que fue disgregado mecánicamente dentro de un cedazo estéril en presencia de RPMI sin SFB. Las células del bazo fueron recuperadas por centrifugación y los eritrocitos fueron lisados al resuspenderse en una solución hipotónica de cloruro de amonio. Posteriormente fueron lavadas con RPMI sin SFB, para después de ello, ser resuspendidas en un volumen no mayor a 5 mL de RPMI para calcular el número celular con la ayuda de una cámara de Neubauer y en presencia de azul tripano para evaluar la viabilidad celular. Una tercera parte de las células fue infectada con 5pfu/célula de vacc-HA durante toda la noche a 37°C a y después fueron lavadas tres veces. Finalmente, fueron incubadas en medio de cultivo de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM, Gibco, USA) con SFB al 10% y suplementado con piruvato de sodio 1mM, aminoácidos no esenciales 0 1mM y β -mercaptoetanol 5×10^{-5} M (Gibco, USA) a una densidad de 5×10^6 células por mL, a 37°C, 5% de CO₂ y humedad saturante, entre 4 y 6 días

Marcaje de las células blanco.

Las células fueron colectadas, lavadas con medio de cultivo y resuspendidas a una densidad de 5×10^5 en un volumen de 200 μ L de RPMI al 2% de SFB con 50 μ Ci de ^{51}Cr en forma de cromato de sodio en solución acuosa, correspondiendo a aproximadamente 10 μ L del lote (Amersham Pharmacia, England) Después de 90 minutos de incubación bajo condiciones de cultivo, las células fueron lavadas dos veces con RPMI al 10% de SFB y ajustadas a una densidad de 5×10^4 células/mL en IMDM al 10% de SFB suplementado como se indica anteriormente.

Citotoxicidad

Las células efectoras fueron recuperadas, lavadas en RPMI al 10% de SFB ajustadas a una densidad de 5×10^6 células/mL en IMDM con SFB al 10% suplementado. Las células efectoras y las células blanco fueron cocultivadas en un volumen de 200 μ L en placas de 96 pozos en proporciones de efectoras:blanco de 100:1 y de 50:1. Para medir la liberación espontánea de cromato de sodio se cultivaron células blanco en ausencia de efectoras y para medir la liberación máxima las células blanco en 100 μ L de medio de cultivo fueron lisadas con 100 μ L de SDS al 5%. Después de cuatro horas de incubación bajo condiciones de cultivo las placas fueron centrifugadas para obtener botones celulares compactos y entonces retirar 100 μ L de medio de cultivo de cada pozo, para evaluar la liberación de cromato de sodio mediante un contador de centelleo (Beckman, USA)

El porcentaje de citotoxicidad se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de citotoxicidad} = \frac{(\text{liberación experimental} - \text{liberación espontánea})}{(\text{liberación total} - \text{liberación espontánea})} \times 100$$

RESULTADOS

Existen evidencias de que las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase-I (MHC-I) pueden jugar un papel determinante en el curso de una neoplasia cervical y su expresión normal permitiría la eliminación de las células transformadas por parte de los linfocitos citotóxicos; sin embargo, la disminución o anulación de su expresión facilitaría al escape inmunológico, y por tanto, la progresión hacia estados oncológicos más avanzados. En el presente estudio se realizaron ensayos con la finalidad de analizar la capacidad de ocho líneas celulares derivadas de cáncer cérvico-uterino para presentar antígenos en el contexto de las moléculas MHC-I.

La línea celular C33 (HPV-) presenta menor expresión de HLA-I total en comparación con epitelio cervical normal.

Inicialmente se procedió a determinar mediante citometría de flujo la expresión total de moléculas MHC-I (HLA-I) en ocho líneas celulares derivadas de cáncer cervical, empleando el anticuerpo W6/32 (Figura 1). En todos los casos se tomó como referencia a las células marcadas sólo con anticuerpo secundario (histograma con línea delgada), además de incubadas en presencia de un anticuerpo de isotipo semejante pero con especificidad no relacionada (histograma con línea punteada). Como resultado, se observan valores de intensidades desde 72 hasta 1368 unidades de intensidad de fluorescencia (UIF). Los valores de Calo, Inbl, Vipa y Siha están por encima de las 1000 UIF, en tanto que los de Hela, Caski, C33, HTB9 y T2 están por debajo de 600 UIF, alrededor del valor obtenido para un cultivo de epitelio derivado de cérvix sin diagnóstico oncológico, con un valor de 788 UIF. El caso más notable fue el de la línea celular C33 cuyo valor de intensidad de fluorescencia fue de sólo 72 unidades, en tanto que el de la línea celular derivada de un carcinoma de vejiga fue de 344 UIF; de acuerdo con lo previsto, el valor para la línea celular T2, deficiente de TAP's y LMP-2 y -7 fue de sólo 15 UIF.

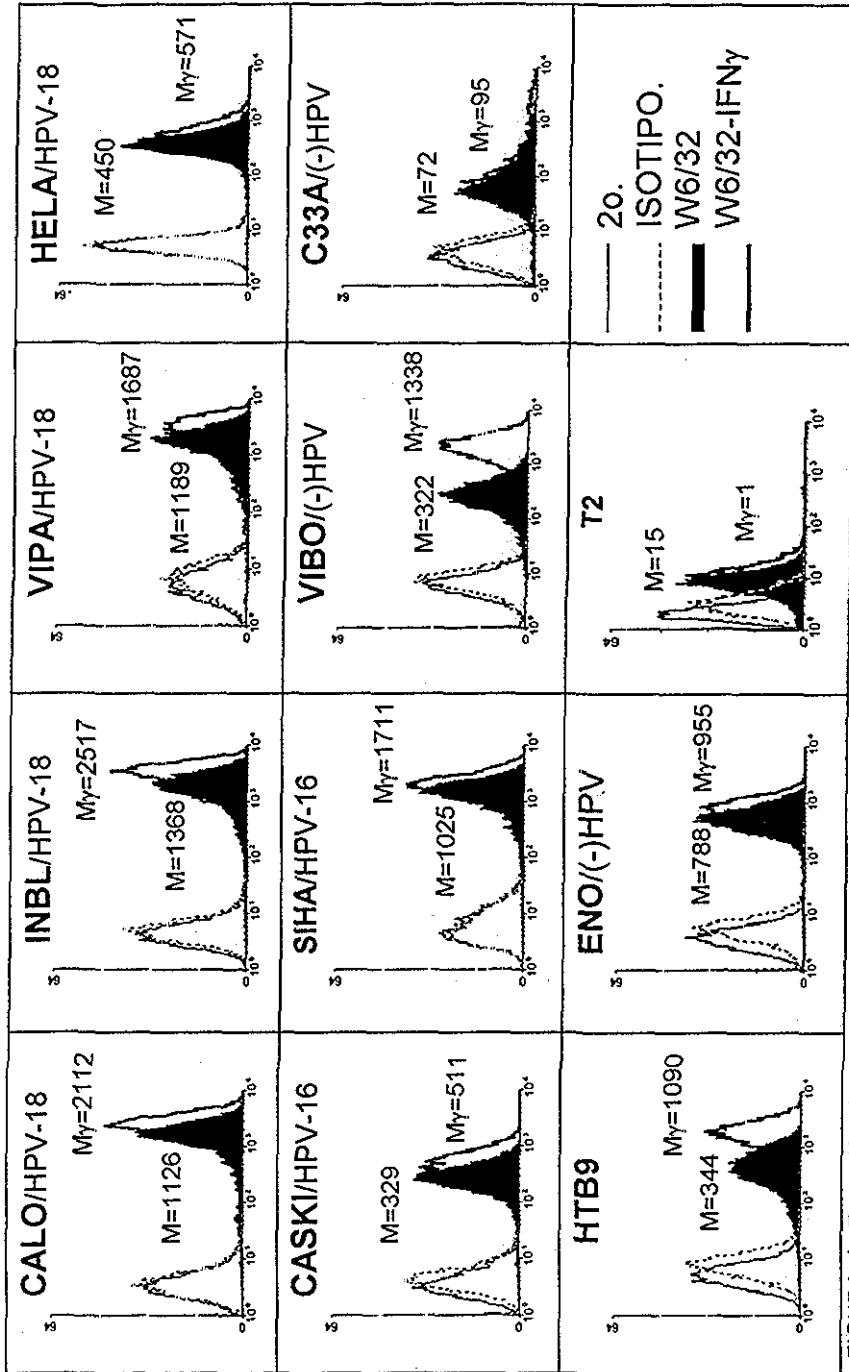


FIGURA 1. Expresión de moléculas clase I del complejo principal de histocompatibilidad en las líneas celulares de cáncer cérvico-uterino, en presencia y ausencia de 100U/ml de IFN- γ durante 48hrs. M, indica la media de la intensidad de fluorescencia en ambas condiciones.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Por otro lado, la incubación de las células en presencia de interferón- γ (Figura 1) indujo en todos los casos un aumento en la expresión de las moléculas HLA-I, aunque en porcentajes variables. El aumento para las células con intensidad de fluorescencia basales mayores de 1000 UIF osciló entre 40 y 90%, lo cual representa un aumento de varios centenares de unidades. Para las líneas celulares con valores basales menores de 600 UIF el comportamiento ante el interferón- γ fue más heterogéneo. La línea celular C33 tuvo un aumento de 31% en la intensidad de fluorescencia lo cual, sin embargo, nunca llegó a niveles comparables con los expresados por las células de epitelio normal. En contraste, la línea celular Vibo aumentó más de tres veces su expresión de HLA-I en presencia de interferón- γ , de 322 a 13238 UIF, la cual finalmente alcanzó un valor semejante al de las células con mayor intensidad de fluorescencia. El epitelio cervical mostró un aumento de 20% en tanto que la línea T2 prácticamente no varió en su expresión de HLA-I.

Por otro lado, no se encontró correlación entre algún tipo de HPV infectante de las células y la expresión de HLA-I, y destaca el hecho de que las células negativas para HPV, principalmente las C33, presentaron la menor expresión de HLA-I medida con el anticuerpo W6/32.

La expresión de moléculas de ratón H-2^d se induce con menor intensidad en la línea celular C33.

La heterogeneidad de los alelos de las moléculas HLA-I así como su posible expresión diferencial hace difícil comparar su expresión en las diferentes líneas celulares. Para profundizar en la comparación de la capacidad para expresar tales moléculas en las ocho líneas celulares de este trabajo, se procedió a evaluar la expresión de un alelo común, inducido a expresarse en todas ellas bajo condiciones semejantes. En la Figura 2 se muestra la detección del alelo de ratón H-2 K^d inducido a expresarse por la infección por diferentes títulos de vaccinia recombinante. En esta figura podemos observar que la mayoría de las

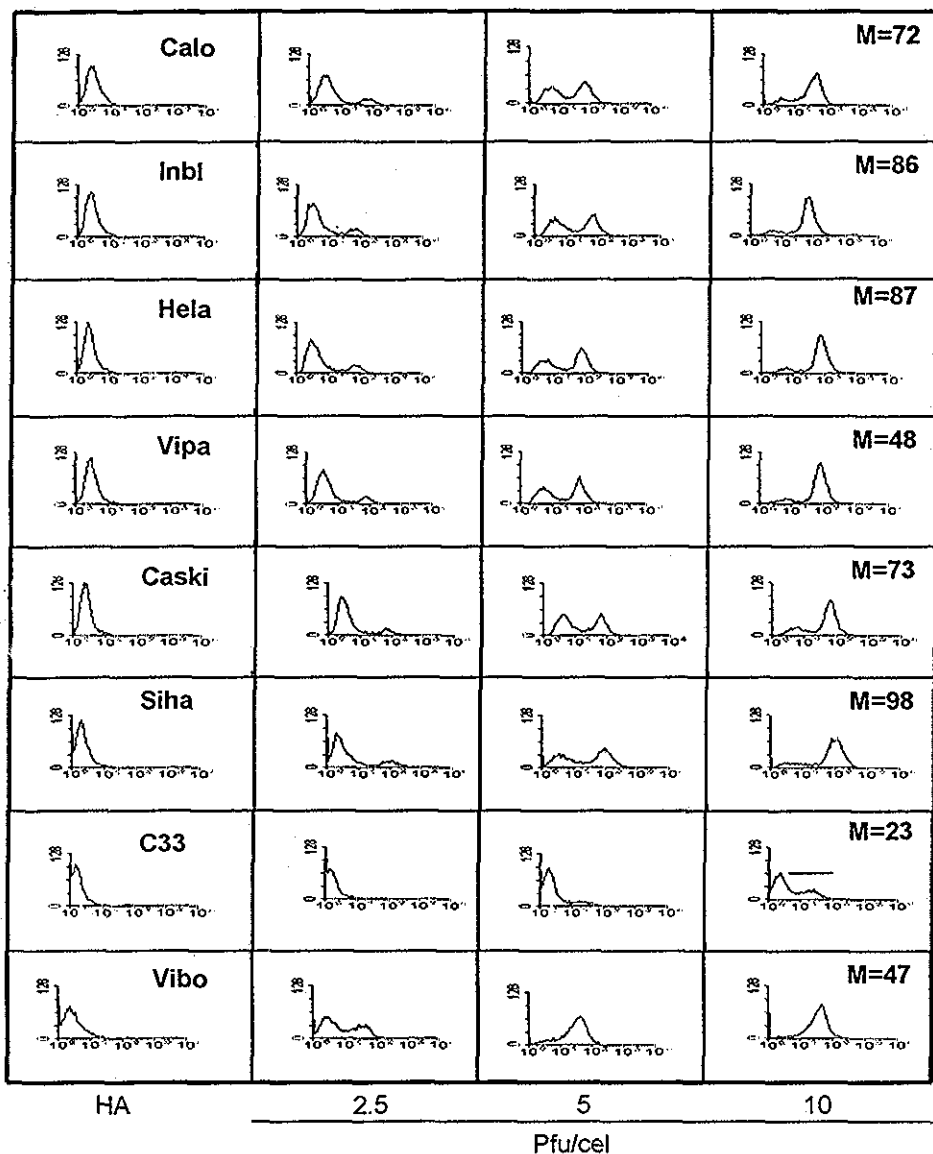


Figura 2 Inducción de la expresión del alelo H-2 Kd, por diferentes títulos de vaccinia recombinante (vacc Kd) en las líneas celulares de CaCu. "M" representa la media de intensidad de fluorescencia Pfu/cel indica la relación del número de unidades formadoras de placas por cada célula durante el período de infección in vitro. (Continúa).

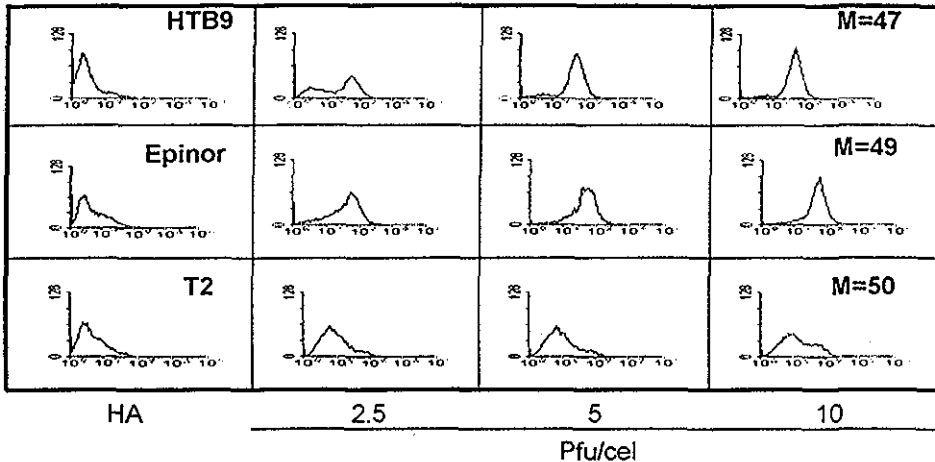


Figura 2. (Continuación). Inducción de la expresión del alelo H-2K^d, por diferentes títulos de vaccinia recombinante (vacc K^d) en las líneas celulares de CaCu

líneas celulares expresaron esta molécula cuando fueron infectadas con un título de vaccinia de 7 pfu/cel. La media de intensidad de fluorescencia inespecífica obtenida por la incubación con el anticuerpo secundario fue en todos los casos menor a 4 UIF. Con el mayor título empleado la intensidad fue mayor a 75 unidades en las líneas celulares Inbl, Vipa, Hela, Caski, Siha y Vibo. La línea celular Calo tuvo una media de intensidad de 40. Nuevamente, el caso más notable fue el de la línea C33 cuya intensidad media alcanzó únicamente 16 unidades. Además de ello, el título de vaccinia recombinante que fue suficiente para inducir la expresión de H-2K^d en el total de la población celular en la mayoría de las líneas fue insuficiente en C33A, pues sólo una porción de la población celular fue capaz de expresar al alelo H-2K^d.

Para determinar si el comportamiento observado en la línea C33 respecto a la baja expresión inducida se restringía al alelo K^d, se procedió a inducir la expresión de los alelos D^d y L^d en las líneas celulares de CaCu. Nuevamente, la expresión de estos alelos fue drásticamente menor en la línea celular C33, con respecto de las demás líneas (figura 3). Como dato interesante, se observa que el

alelo L^d es inducido a expresarse con menor intensidad que K^d y D^d , tal como ocurre de manera natural en células que expresan el haplotipo H-2^d

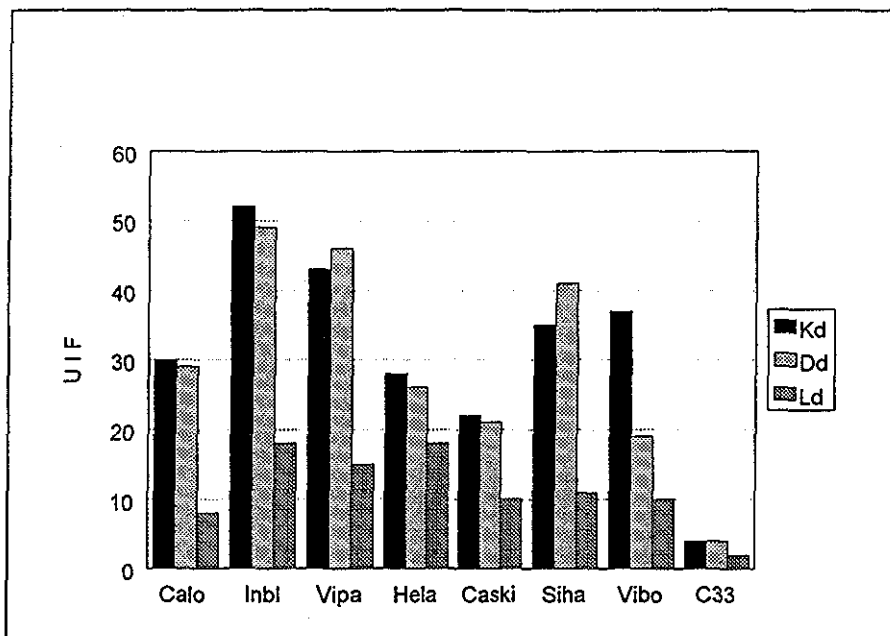


FIGURA 3 Expresión de los alelos H-2K^d, D^d y L^d inducidos en las líneas celulares de cáncer cervical mediante la infección con los virus vaccinia recombinantes vacc-K^d, vacc-D^d y vacc-L^d

Las líneas celulares derivadas de cáncer cervical sin HPV expresan deficientemente las moléculas LMP en comparación con las positivas para HPV.

Continuando el análisis de la capacidad de las células de cáncer cervical estudiadas para presentar moléculas de histocompatibilidad en la superficie, se procedió a evaluar en ellas la expresión de genes cuyos productos son relevantes en el procesamiento de antígenos, en virtud de que se ha demostrado que la generación y el transporte intracelular de péptidos adecuados son procesos críticos para el adecuado ensamblaje y posterior expresión superficial de las

moléculas MHC-I. En la figura 4 se muestra la evaluación, mediante la técnica de RT-PCR, de la expresión del ARNm para las proteínas TAP1 y TAP2, las cuales son importantes para el transporte de péptidos desde el citosol hacia el retículo endoplásmico. En el segmento a) podemos observar que TAP1 se expresó en todas las líneas celulares derivadas de cáncer cervical, de forma semejante al epitelio normal. De acuerdo con lo descrito previamente, la línea celular T2 funcionó como un testigo negativo para la expresión de TAP1 y 2 y LMP-2 y -7, debido a que presenta una deleción cromosomal en la región del MHC, y la mayor expresión observada correspondió a linfocitos de sangre periférica (LSP). Asimismo, tampoco se observó alguna diferencia entre la expresión de TAP2 en las líneas de cáncer cervical con respecto a la de los linfocitos de sangre periférica y a la del epitelio normal; nuevamente, las células T2, no expresaron ARN mensajero para esta molécula, debido a lo descrito anteriormente.

Actualmente es aceptado por consenso que el complejo multienzimático proteasoma juega un papel determinante en la generación de péptidos que serán transportados al interior del retículo endoplásmico, para ser asociados a las moléculas MHC-I. Por tal motivo fue evaluada la expresión de las moléculas LMP2, LMP7, LMP10 (figura 4b), PA28 α y PA28 β (Figura 4c). Las tres primeras son subunidades del proteasoma inducibles por efecto de interferón- γ y que al incorporarse a ese complejo multienzimático influyen en la composición de los péptidos generados en el citosol. El análisis de la expresión de estas subunidades mostró que LMP2 se expresa en una forma comparable a la de los LSP y el epitelio normal, sin ocurrir un cambio aparente cuando las líneas celulares fueron incubadas en presencia de interferón- γ . No obstante, C33 mostró una franca carencia de expresión de la molécula LMP7, que no se revirtió incluso por efecto de interferón- γ . En los casos anteriores la expresión en la línea celular T2 fue negativa, debido a la deleción en la región MHC mencionada anteriormente. Cuando se analizó la expresión de LMP10 se observaron dos tipos de deficiencias: en primer lugar una, deficiente expresión en la línea celular Inb,1

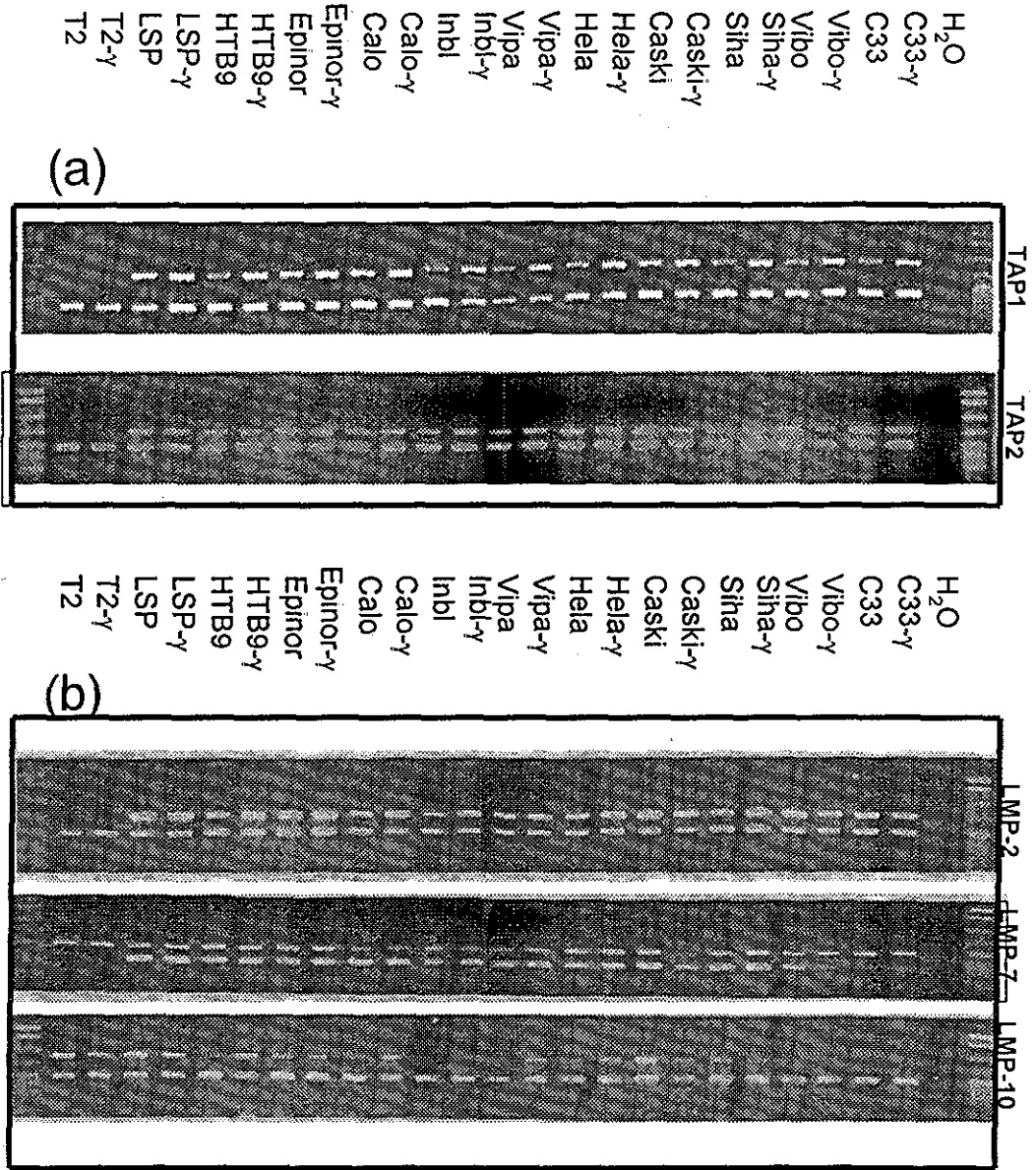


Figura 6.(Continúa).

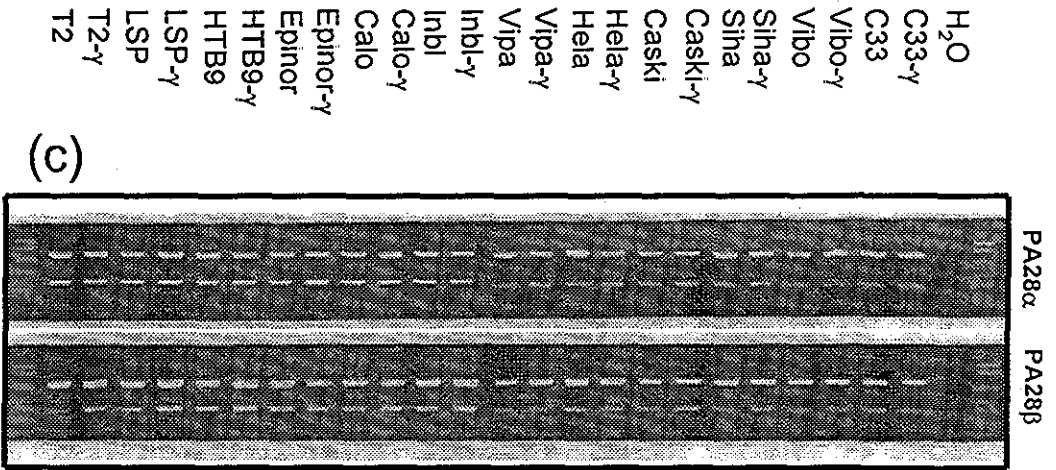


FIGURA 4. (Continuación). Análisis por RT-PCR de la expresión del ARNm de las moléculas relevantes para el procesamiento de antígenos TAP-1,-2 (a); LMP-2, -7, -10 (b) y Pa28 α , β (c). Como control interno en todos los casos se detectó la presencia del ARNm de β -actina, amplificada simultáneamente con la molécula problema

que fue revertida por la incubación con interferón- γ ; por otro lado observamos una expresión francamente deficiente en las líneas celulares Vibo y C33 con la característica de irreversibilidad. En este caso, congruentemente, la línea celular T2 sí expresó esta molécula debido a que se codifica fuera del MHC.

Por último, las moléculas PA28 α y β se expresan en todas las líneas celulares derivadas de CaCu con la misma intensidad que en los controles (Figura 4c), de manera semejante a lo que ocurre en otros estudios en los que se analizó su expresión en otros tipos tumorales.

La baja expresión de moléculas de histocompatibilidad en la línea celular C33 impide su reconocimiento por parte de linfocitos efectores específicos.

La expresión superficial de las moléculas MHC-I facilita la exposición de péptidos de origen intracelular que pueden interactuar con los receptores específicos de los linfocitos T, los cuales entonces eliminan a las células infectadas o portadoras de proteínas mutadas. Con la finalidad de evaluar si la expresión inducida de las moléculas MHC-I de ratón en las células derivadas de cáncer cervical las hace susceptibles de ser blanco de linfocitos efectores, se realizó un ensayo de citotoxicidad en el que se co-cultivaron las células de CaCu infectadas con virus vaccinia-K^d con linfocitos provenientes de ratones inmunizados con virus vaccinia; de esta manera, se estableció un sistema de citotoxicidad dirigida contra antígenos de vaccinia en el contexto H-2K^d (Restifo et al, 1993) Los resultados obtenidos muestran ligeros porcentajes de citotoxicidad específica que va desde aproximadamente 10%, hasta más de 30% en la línea celular Vibo; sin embargo, lo más notable fue que C33 no presentó ningún porcentaje de citotoxicidad específica, lo cual sugiere que los defectos en su expresión de moléculas LMP-2 y -10 influyen negativamente en su capacidad para presentar antígenos asociados a las moléculas HLA-I

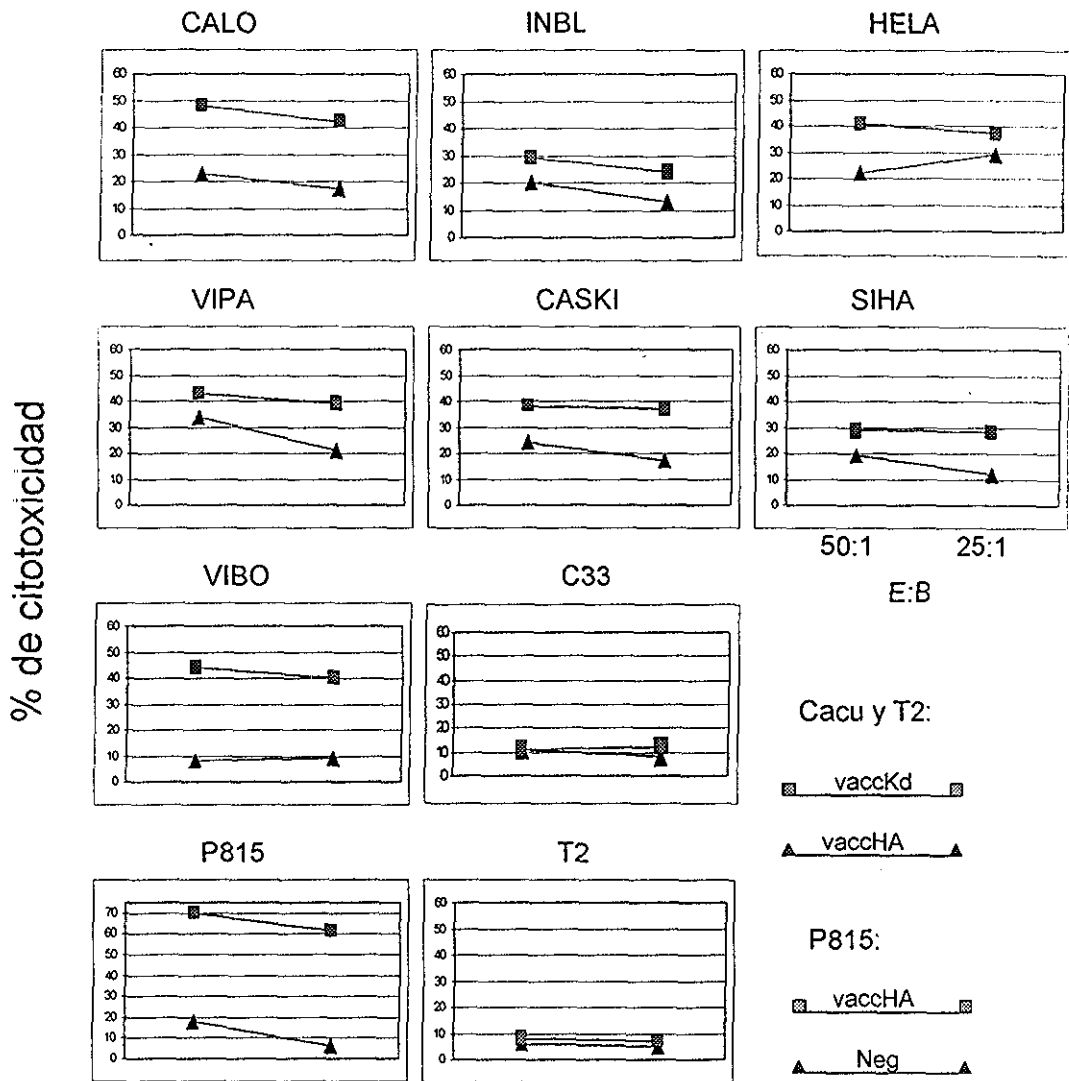


Figura 5. Citotoxicidad de las células de CaCu infectadas con vacck^d, empleando como células efectoras linfocitos de ratones Balb/c (haplotipo H-2^d) inmunizados con vaccinia. T2 funciona como testigo negativo y P815 (haplotipo H-2^d) como testigo positivo. Las proporciones de células blanco y efectoras (E:B) es de 50:1 y 25:1.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La línea celular C33 expresa proteínas del virus vaccinia recombinante HA y la núcleo-proteína de influenza con menor intensidad que el resto de las líneas celulares.

Con la finalidad de analizar si proteínas diferentes a la K^d inducidas a expresarse en C33 mediante la infección con virus vaccinia recombinante se expresaban con la misma intensidad que en el resto de las líneas celulares, se procedió a inducir la proteína nuclear de influenza (NP), que fue detectada mediante citometría de flujo. Como un comportamiento generalizado se observó que las poblaciones expresaban la proteína homogéneamente cuando eran infectadas con virus vaccinia-NP, con una intensidad de fluorescencia moderada entre, 10 y 20 UIF (figura 6). Sin embargo, en el caso de C33 se observó que la mayoría de la población la expresaba en menor grado, de acuerdo con la intensidad de fluorescencia, sugiriendo que no expresa a esta proteína con la misma eficiencia que el resto de las líneas celulares.

Para evaluar si este comportamiento es reflejo de una baja susceptibilidad de las células C33 a infectarse con el virus vaccinia, se procedió a detectar por citometría de flujo la expresión de antígenos de este virus después de la infección de las C33. El comportamiento fue básicamente idéntico al de la expresión de la proteína nuclear de influenza, respecto a que una buena parte de la población de las células C33 expresan con una muy baja intensidad a las proteínas del virus vaccinia (Figura 7). Este comportamiento nos sugiere que las células C33 se infectan deficientemente con virus vaccinia o bien, presentan una tasa de síntesis de proteínas por debajo del resto de las líneas celulares analizadas.

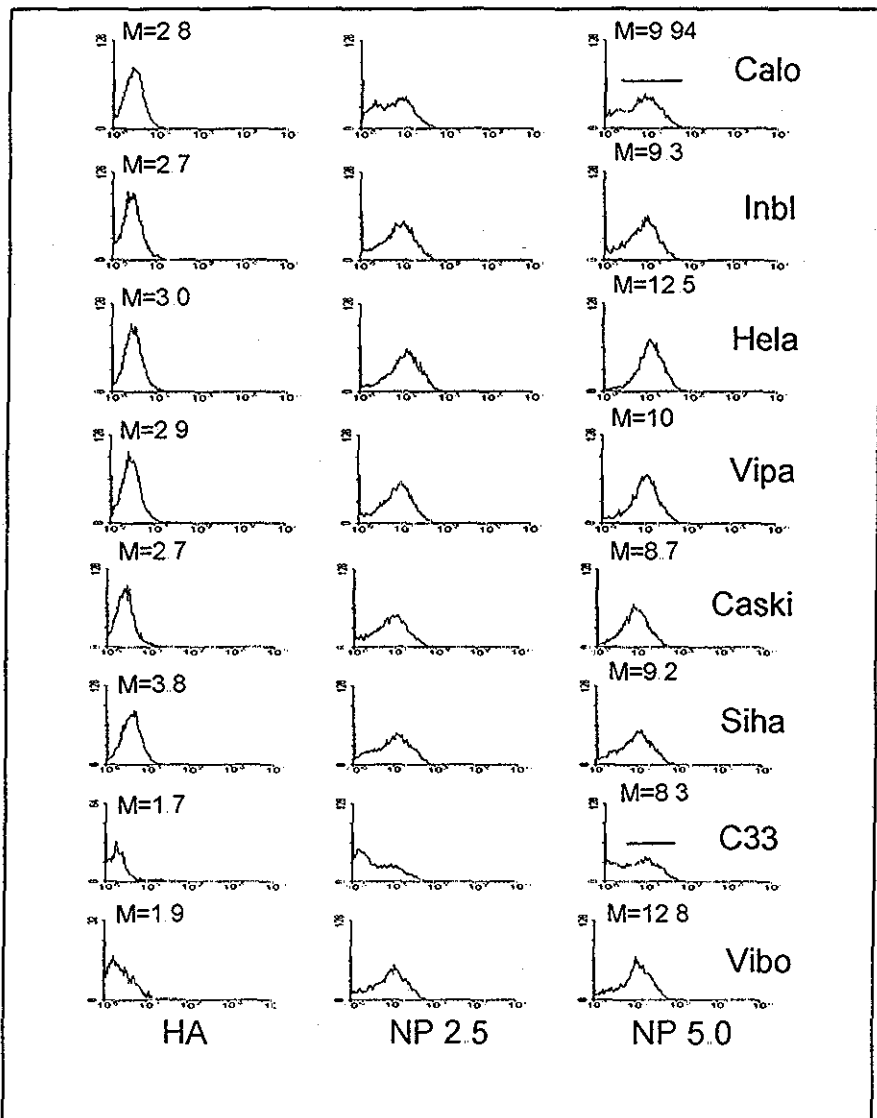


Figura 6 Expresión de la proteína nuclear de influenza (NP) inducida mediante la infección con virus vaccinia recombinante (Vacc NP) en células de cáncer cérvico-uterino. M= intensidad media de fluorescencia

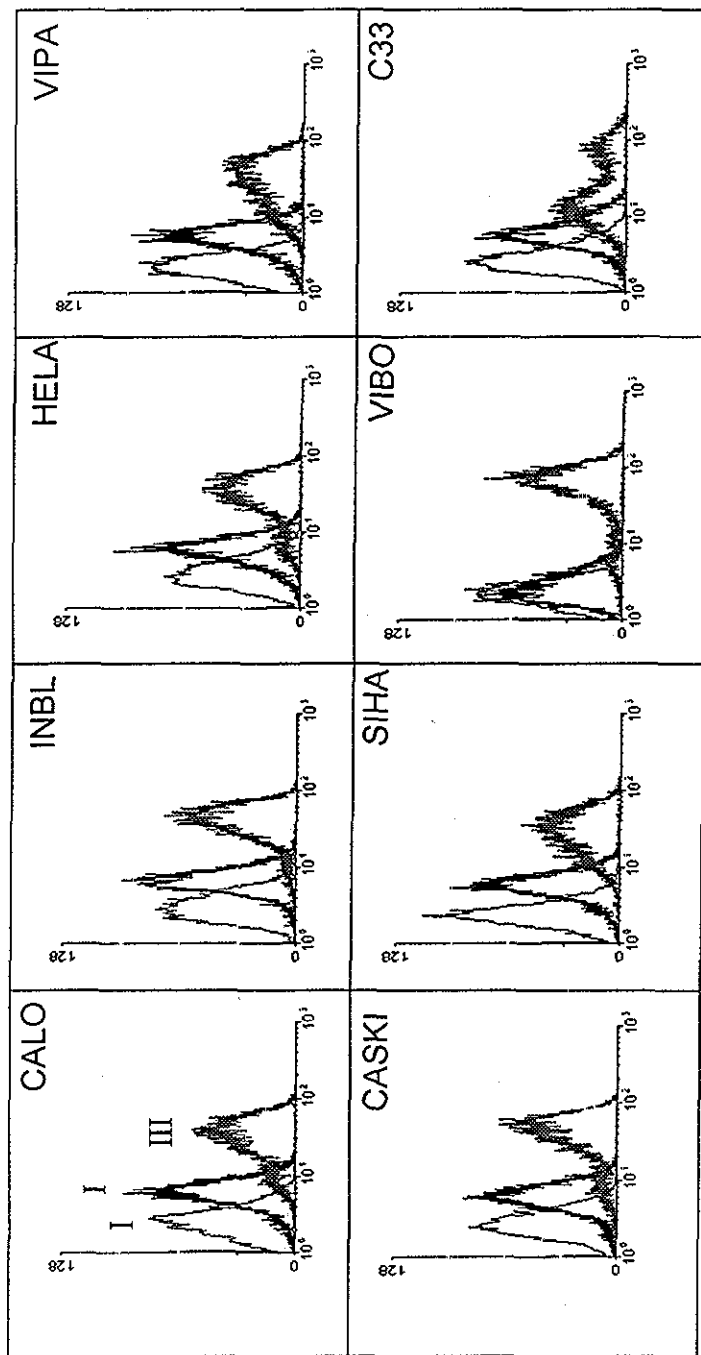


Figura 7. Detección de la expresión de proteínas de virus vaccinia en las líneas celulares de CaCu. En todos los casos las células fueron infectadas con virus vaccinia recombinante HA; (I) representa a las células teñidas sólo con anticuerpo secundario; (II) representa a las células incubadas previamente con suero de ratón preinmune; (III) representa a las células incubadas con antisuero de ratón anti-vaccinia.

DISCUSIÓN.

La respuesta inmune puede jugar un papel determinante en la eliminación de células transformadas, como lo son las células de cáncer cérvico-uterino (Cacu) Para ello, linfocitos citotóxicos específicos deben reconocer en la superficie de tales células a péptidos derivados de proteínas intracelulares, asociados a moléculas de histocompatibilidad clase I (MHC-I), que evidencien su estado transformado; así, el reconocimiento de péptidos derivados de proteínas virales o mutadas conduce a la eliminación de la célula presentadora.

La expresión de moléculas MHC-I (HLA-I en el humano) juega un papel central en la defensa inmune del organismo para erradicar a células transformadas; sin embargo, al mismo tiempo, una deficiente expresión de estas moléculas puede constituir un efectivo mecanismo para la evasión de la respuesta inmune que conduzca al establecimiento y progresión de una neoplasia hacia estadios avanzados de la enfermedad. La expresión anormal de HLA-I ha sido observada con alta frecuencia en muchos tipos tumorales diferentes, incluyendo al melanoma, cáncer de colon, de cérvix, de pecho, de pulmón, y de laringe, pudiendo ir desde la pérdida de un único alelo hasta la pérdida completa de la expresión de HLA-I (Garrido et al, 1993).

La detección de moléculas HLA-I constitutivas mostró una intensidad semejante a la del epitelio cervical normal en siete de las ocho líneas celulares de Cacu analizadas en este estudio. Sin embargo, debe ser tomado en cuenta que el anticuerpo empleado (W6/32) no discrimina entre distintos alelos y por tanto, no nos permite saber si existe una expresión deficiente de determinados alelos, aun cuando la intensidad de fluorescencia total sea semejante a la del control normal. La pérdida de la expresión de uno o más alelos de HLA-I en células de Cacu en comparación con el tejido normal adyacente fue demostrada al inicio de la década de los 90's mediante tinciones inmunohistoquímicas en cortes de tejido derivado

de Cacú (Connor y Stern, 1990); además, de que la intensidad de la pérdida de la expresión de estas moléculas se asoció con el grado de metástasis (Cromme et al 1994b)

Los resultados obtenidos al inducir la expresión de moléculas MHC-I de ratón (H-2^d) mediante la infección con un virus vaccinia recombinante, para comparar a un mismo alelo entre las distintas líneas celulares, concuerdan con la expresión de moléculas HLA-I constitutivas y permiten darnos cuenta de que la mayoría de las líneas celulares estudiadas mantienen una maquinaria de procesamiento de antígenos funcional. Esta capacidad potencial es independiente de que puedan presentar alteraciones restringidas en la expresión de uno o más alelos, y es importante porque se diferencian de otros tipos tumorales donde esta capacidad está perdida totalmente, como en el caso del cáncer de células pequeñas de pulmón. La relevancia descansa en el hecho de que distintos protocolos desarrollados para obtener una terapia alternativa se basan en la estimulación de la respuesta inmune con péptidos derivados de proteínas de HPV asociados a las moléculas HLA-I. La excepción es la línea C33, que en ambos casos mostró una expresión de moléculas HLA-I muy por abajo que el resto de las líneas celulares.

Los mecanismos moleculares que conducen a la pérdida de la expresión de alelos de HLA-I en las células de Cacú no han sido satisfactoriamente dilucidados. Se ha detectado la alteración de la expresión de ciertos alelos en células derivadas de este cáncer en un 75% de muestras estudiadas (Cromme et al, 1993a/b; Cromme et al, 1994a/b; Keating et al, 1995) y más recientemente hasta en un 90%, donde inclusive se proponen algunos mecanismos causantes de esa disminución: alteraciones tanto estructurales como funcionales asociadas al cromosoma 6p que incluyen desde mutaciones en las propias moléculas HLA-I, hasta la pérdida de la heterocigocidad (Koopman et al, 2000). En el mismo sentido, nuestro grupo ha propuesto que en las líneas celulares Calo e Inbl existe una expresión disminuida de los alelos B27 y A11, respectivamente, comparados

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

con los otros alelos, probablemente debido a un aporte de péptidos insuficiente o inadecuado (Monroy, sometido para publicación) De cualquier forma, aun no resulta claro si tales alteraciones en la expresión de las moléculas MHC-I son las causantes de la evasión de la respuesta inmune, o bien, si se trata de fenómenos secundarios resultantes de la transformación celular.

La deficiente expresión de moléculas de HLA-I en células de cáncer, también ha tratado de explicarse con base en alteraciones en la maquinaria de procesamiento de antígenos (Johnsen et al, 1998) Sin embargo, existen pocos datos respecto al comportamiento de las células derivadas de CaCu. En los estudios iniciales que reportaron la pérdida de la expresión de alelos en CaCu mediante inmunohistoquímica, se encontró también una disminución de la expresión de la molécula transportadora de péptidos TAP-1, lo cual sugirió que en algunos tumores existe una deficiencia en el aporte de péptidos y por consiguiente, la incapacidad para estabilizar moléculas HLA-I para que se expresen en la superficie (Cromme et al, 1994b). En contraste, Brady y colaboradores (2000) muestran recientemente que en las ocho estirpes celulares provenientes de cáncer cervical incluidas en su estudio se expresa la proteína TAP-1, y por tanto descartan la participación de esta molécula como un mecanismo esencial en la pérdida de alelos de HLA-I. En nuestro estudio, mediante la técnica de RT-PCR se obtuvo como resultado que todas las líneas celulares expresan ARN mensajero para TAP-1 de manera comparable con los controles de epitelio normal. Estos resultados contradictorios pueden explicarse en base a la eficacia o sensibilidad de las distintas técnicas y materiales empleados, o pueden sugerir que exista una cierta tendencia en el cáncer cervical uterino para expresar TAP-1 en forma deficiente aunque no llegue a ser nula. La importancia capital que tiene TAP-1 para la expresión de moléculas HLA-I (Hosken et al, 1990; Monaco, 1992; y Momburg et al, 1994) hace pertinente realizar una evaluación más profunda de su expresión, para determinar su participación en la respuesta inmune contra el CaCu

Respecto de las otras moléculas relevantes para el procesamiento de antígenos en la mayoría de las líneas celulares se detecta el ARNm para las moléculas del proteasoma LMP-2, -7 y -10, así como PA28 α y β ; en C33. en contraste con el resto de las líneas celulares, fue nula expresión de la LMP7. lo cual no fue revertido por efecto de interferón- γ . También se observó una deficiente expresión de la molécula LMP10 en tres de las ocho líneas celulares incluyendo a la propia C33. Estos datos coinciden con reportes previos, en que ha sido detectada en distintos tipos tumorales una deficiente expresión de la molécula LMP10, con mayor frecuencia respecto a otras moléculas relacionadas con el procesamiento de antígenos (Johnsen et al, 1998). De este modo, en la línea celular C33 coincidieron las deficiencias de LMP7 y LMP-10, lo cual puede ser considerado en principio, como un defecto notable en esta línea celular.

Al respecto, cabe considerar sin embargo, que el concepto de inmunoproteasoma establece que algunas de las subunidades que conforman constitutivamente al proteasoma son sustituidas por efecto del interferón- γ por otras con diferentes propiedades enzimáticas (LMP-2, -7 y -10) además de adicionarse el complejo PA700 constituido por las subunidades PA28, lo cual modifica el espectro de péptidos generados y por consiguiente, que pueden asociarse a las moléculas MHC-I. De este modo, resulta controversial si la ausencia de detección de la expresión de las subunidades del inmunoproteasoma significa una deficiencia o se trata del estado normal (Van den Eynde y Morel, 2001). Desde este punto de vista, resulta extraño que las líneas de Cacu expresen constitutivamente a estas subunidades del proteasoma. En el caso de C33, sin embargo, no puede considerarse como un comportamiento normal porque estas subunidades no son inducidas por efecto de interferón- γ . Así, es importante realizar una determinación de la expresión de estas moléculas en forma de proteína y no sólo como ARNm para obtener una idea más clara de cómo se expresan en las células de Cacu.

La modificación del perfil de péptidos producidos por el proteasoma constitutivo y el inmunoproteasoma es cualitativa, no cuantitativa y por tanto, a la luz del conocimiento actual sería difícil atribuir la baja expresión de moléculas HLA-I en la línea celular C33 a estas deficiencias; Por otro lado, sin embargo, resultaría interesante evaluar si la expresión de subunidades del proteasoma en las células de Cacu influye en la generación de péptidos antigénicos derivados de proteínas del HPV. Como ejemplo, podemos mencionar que se han descrito epítomos antigénicos incluidos algunos tumorales que no son procesados por el inmunoproteasoma, aunque si son procesados por el proteasoma constitutivo (Morel S, et al 2000) A final de cuentas, el perfil de los péptidos generados por la célula puede determinar si persiste o es erradicada

Alternativamente a la existencia de alteraciones en la maquinaria de procesamiento de antígenos, la baja expresión de los alelos MHC-I de ratón inducidos en la línea celular C33 puede deberse a que tiene una escasa susceptibilidad a la infección con virus vaccinia recombinante. Al respecto, encontramos que la núcleo-proteína de influenza y las proteínas de vaccinia, se expresan con una menor intensidad que en las otras líneas celulares, lo que nos podría sugerir inicialmente que la menor expresión de la molécula K^d observada en C33 se debe a que es menos susceptible de ser infectada por virus vaccinia recombinante; sin embargo, si consideramos el hecho de que C33 expresa también con baja intensidad proteínas que no son inducidas, como lo son las moléculas HLA-I constitutivas, también puede sugerirse que esta línea celular presenta deficiencia para la síntesis de proteínas. Una baja tasa de síntesis de proteínas puede dar como resultado una pobre presentación de moléculas HLA-I pues además de sintetizar a las propias moléculas HLA-I con una baja tasa, se propone actualmente que la mayor cantidad de péptidos que se asocian y estabilizan a estas moléculas proviene de los productos proteicos sintetizados *de novo* (Revisado en Yewdell y Bennink, 2001).

Por otro lado, las líneas celulares bajo estudio fueron lisadas específicamente en un ensayo de citotoxicidad aunque en proporción menor al control, que fueron las células de ratón P815 (haplotipo H-2^d). Esta diferencia puede deberse a que en el ensayo se mezclaron células de diferente origen y el reconocimiento molecular para la coestimulación no es tan eficiente como cuando se cocultivan células del mismo origen. De cualquier forma, el resultado fue congruente con las observaciones previas y, como era de esperarse, el bajo nivel de expresión de moléculas MHC-I en la C33 impidió que fuera reconocida por parte de las células efectoras. C33 es una línea celular que carece de secuencias genómicas de HPV, y que sin embargo acusa graves defectos en la presentación de antígenos, como se ha descrito previamente. La ausencia de HPV en tumores cervicales representa un pronóstico pobre para la evolución de la enfermedad (Higgins et al, 1991), lo cual podría implicar que mientras el desarrollo de la neoplasia asociado al HPV es gradual, la transformación celular cuando no está presente el virus se debe a cambios genéticos drásticos, como corresponde con las características de expresión genética observadas en C33.

Como se mencionó anteriormente, el interés actual por desarrollar terapias alternativas para el tratamiento del cáncer basadas en la estimulación del sistema inmune para lograr un recurso más específico y menos agresivo ha puesto nuevamente en primer plano la discusión acerca de la regulación negativa de las moléculas MHC-I en las células tumorales debido a que ésta puede significar el fracaso de la alternativa propuesta. Aun cuando el estudio de ocho líneas celulares es limitado para plantear conclusiones generales relativas a la biología del Cáncer, es posible emitir algunas consideraciones. La primera de ellas es que la infección con virus de papiloma humano no influye directamente en la expresión de las moléculas HLA-I. En este trabajo describimos una línea celular que no muestra infección por HPV pero tiene severas deficiencias en la presentación de antígenos, a tal grado que su expresión superficial está fuertemente inhibida. En segundo lugar, la pérdida total de alelos de HLA-I en este tipo de neoplasia es un evento raro, y un problema interesante que se plantea consecuentemente es

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

determinar si son perdidos selectivamente los alelos asociados con la presentación de antígenos relevantes, como lo son los péptidos derivados de proteínas de HPV. A este respecto, se ha sugerido que la pérdida de un antígeno dominante puede tener como consecuencia que no haya reconocimiento de otros antígenos asociados a los alelos restantes (Seung S et al, 1993) lo que conduciría a una evasión total de la respuesta inmune. Además, es probable que el grado de transformación de la célula exceda a la capacidad del sistema inmune para erradicarla, pues existen múltiples alteraciones en las células transformadas (Tang-Yuan Chu et al, 1999)

Es necesario continuar estudiando el proceso de la presentación de antígenos en las células tumorales para comprender los diferentes mecanismos por los que la inmunoterapia pueda quedar limitada. De acuerdo con nuestros resultados, en el cáncer cervical aun cuando existe la pérdida de alelos de HLA-I la maquinaria interna del procesamiento de antígenos es capaz de seguir produciendo antígenos que inducen una respuesta efectora.

CONCLUSIONES

- La mayoría de las líneas celulares derivadas de cáncer cérvico-uterino (Cacu) incluidas en el presente estudio mantienen su capacidad para presentar moléculas de histocompatibilidad clase-I (MHC-I), independientemente de que pudieran tener defectos en la expresión de ciertos alelos en particular
- A excepción de C33, las líneas celulares de Cacu expresan el ARN mensajero para las moléculas procesadoras del procesamiento de antígenos TAPs, LMPs y PA28s.
- La capacidad de las líneas celulares de Cacu para presentar moléculas MHC-I es independiente de la presencia de moléculas del virus de papiloma humano.
- La línea celular C33, carente de secuencias génicas de HPV, expresa pobremente moléculas MHC-I constitutivas e inducidas, probablemente como un reflejo de una baja tasa de síntesis de proteínas o una baja susceptibilidad a infectarse por el virus vaccinia recombinante

PERSPECTIVAS

Un gran número de grupos de trabajo se esfuerzan por desarrollar alternativas inmunoterapéuticas para el combate del cáncer cérvico uterino (Cacu), muchos de ellos enfocándose en la presentación de antígenos virales en el contexto de las moléculas HLA-I; sin embargo, se presenta el inconveniente de la regulación negativa de la expresión de estas moléculas en varios tipos de cáncer, incluyendo al Cacu.

De los resultados obtenidos en este trabajo, cabe resaltar el hecho de que la mayoría de las líneas celulares sean potencialmente capaces de expresar moléculas MHC-I, independientemente de que estén infectadas con el virus de papiloma humano (HPV). Por lo tanto, aunque existen evidencias de que es común la pérdida de alelos de moléculas HLA-I en el Cacu, cabe esperar que en la mayoría de los tumores existan moléculas HLA-I en la superficie celular capaces de presentar péptidos antigénicos. De este modo, para la línea de investigación de nuestro grupo de trabajo relativa a la identificación de péptidos derivados de proteínas de HPV potencialmente antigénicos, se deberá considerar el uso de péptidos para múltiples alelos, considerando incluso alelos a los que se les ha prestado poca atención, como lo son las moléculas HLA-C, con la finalidad de superar la posible pérdida frecuente de ciertos alelos, pero teniendo en cuenta que en este tipo de cáncer no es común la pérdida total de la capacidad para presentar moléculas HLA-I.

Por otro lado, respecto a la expresión de las moléculas relevantes para el procesamiento de antígenos, resultará interesante analizar su expresión en las células de Cacu en forma de proteína y no únicamente su ARNm, como lo realizamos en el presente trabajo. También habrá que profundizar en la determinación de si son inducibles por efecto del interferón- γ , pues contrariamente

a lo esperado de acuerdo a los conceptos actualmente aceptados, la expresión de su ARNm en las líneas celulares de Cacu es constitutiva sin depender de la inducción de esta citocina. La importancia de este estudio es que, probablemente, el perfil de expresión de estas moléculas en conjunto con los alelos del HLA-I expresados o regulados negativamente, puede determinar el tipo de péptidos que serán presentados por las células de Cacu. lo que a su vez, puede determinar la erradicación o la permanencia de esa célula. La mayor comprensión de los mecanismos del procesamiento de antígenos asociados a las moléculas MHC-I es una herramienta indispensable en el diseño de las alternativas terapéuticas basadas en la estimulación de la respuesta inmune del organismo.

BIBLIOGRAFÍA

Ahluwalia N, Bergeron JM, Degen E, Williams DB. 1992. The p88 molecular chaperone is identical to the endoplasmic reticulum membrane protein calnexin. *J Biol Chem* 267:10914-18

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson JD. Molecular Biology of the Cell. Ed. Omega. © 1994 by Bruce Alberts, Dennis Bray, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and James D. Watson

Andersson G, Larhammar D, Widmark E, et al 1987 Class II genes of the human major histocompatibility complex. Organization and evolutionary relationship of the DR-beta genes. *J Biol Chem* 262:8748-58.

Androlewicz MJ, Ortmann B, van Ender PM, Spies T, Cresswell P. 1992 Characteristics of peptide and class II β_2m binding to the transporters associated with antigen processing (TAP-1 and TAP-2). *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 12716-20.

Androlewicz JM, Cresswell P. 1996. How selective is the transporter associated with antigen processing? *Immunity* 5: 1-5

Balow JP, Weissman JD, Kearse KP. 1995. Unique expression of major histocompatibility complex class I protein in the absence of glucose trimming and calnexin association. *J Biol Chem* 270:29025

Baumeister W, Walz J, Zuhl F, Seemuller E. 1998 The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 92:367-80

Beninga J, Goldberg A. 1998. Function of the proteasome in antigen presentation. In *Ubiquitin and the Biology of the Cell*. ed. J Peters, J Harris, D Finley, pp. 191-221. New York: Plenum

Benton C, Shahidullah H, Hunter J. 1992 Human Papillomaviruses. *Papillomavirus Rep* 3:23-26.

Berumen C.J, Villegas N. 1997. Vacunas terapéuticas recombinantes contra el cáncer del cuello uterino. *Salud Pública de México* 39:288-97.

Bjorkman P.J, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. 1987. Structure of the human class I histocompatibility antigen HLA-A2. *Nature* 329:506-512.

Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV. 1995. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a world-wide perspective. International Biological study on cervical cancer (IBSCC) study group. *J Natl Cancer Inst* 87:796-802

Brady CS, Bartholomew JS, Burt DJ, Duggan-Keen, Glenville S, Telford N, Little AM, Davidson JA, Jimenez P, Ruiz-Cabello F, Garrido F, Stern PL. 2000 Multiple mechanisms underlie HLA dysregulation in cervical cancer. *Tissue antigens* 55:401-411.

- Breiturd F, Ramoz N, Salmon J, Orth G. 1996. HLA control in the progression of human papillomavirus infections. *Sem Cancer Biol* 7: 359-71
- Brown JH, Jardetzky T, Saper MA, Samraoui B, Bjorkman PJ, Wiley DC. 1988. A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules. *Nature* 332:845-850
- Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, et al. 1993. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364:33-39
- Browning JL, Ngam-ek A, Lawton P, et al. 1993. Lymphotoxin beta: a novel member of the TNF family that forms a heteromeric complex with lymphotoxin on the cell surface. *Cell* 72:847-856.
- Burshtyn DB, Barber BH. 1993. Dynamics of peptide binding to purified antibody-bound H-2D^b and H-2D^b β₂m complexes. *J Immunol* 151:3082-93
- Campo MS. 1995. Infection by bovine papillomavirus and prospects for vaccination. *Trends Microbiol* 3:92-97
- Carina GJM, Hilders M, Morgado MI, Nooyen Y, Jan FG. 1995. Altered HLA expression by metastatic cervical carcinoma cells as a factor in impaired immune surveillance. *Gynecologic Oncology* 57: 366-75
- Comerford SA, McCance DJ, Dougan G, Tite JP. 1991. Identification of T- and B-cell epitopes of the E7 protein of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol* 65:4681-90.
- Connor ME, Stern PL. 1990. Loss of MHC Class I Expression in Cervical Carcinomas. *Int J Cancer* 46:1029-34.
- Coux O, Tanaka K, Goldberg AL. 1996. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* 65:801-47
- Cromme FV, Airey J, Heemels M-T, Ploegh HL, Keating PJ, Stern PL, Meijer CJLM, Walboomers JMM. 1994a. Loss of transporter protein, encoded by the TAP-1 gene, is highly correlated with loss of HLA expression in cervical carcinomas. *J Exp Med* 179:335-40.
- Cromme FV, Meijer CJLM, Snijders P, Uyterlinde A, Kenemans P, Helmerhorst T, Stern PL, van den Brule AJC, Walboomers JMM. 1993a. Analysis of MHC class I and II expression in relation to presence of HPV genotypes in premalignant and malignant cervical lesions. *Br J Cancer* 67:1372-80.
- Cromme FV, Snijders PJF, van den Brule AJC, Kenemas P, Meijer CJLM, Walboomers JMM. 1993b. MHC class I expression in HPV 16 positive cervical carcinomas is post-transcriptionally controlled and independent from c-myc overexpression. *Oncogene* 8:2969-75
- Cromme FV, van Bommel PFJ, Walboomers JMM, Gallee MPW, Stern PL, Kenemans P, Helmerhorst TJM, Stukart MJ, Meijer CJLM. 1994b. Differences in MHC and TAP-1 expression in cervical cancer lymph node metastases as compared with the primary tumours. *Br J Cancer* 69: 1176-81

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Chambers MA, Wei Z, Coleman N, Nash AA, Stanley MA. 1994.** Natural presentation of human papillomavirus type 16 E7 protein to immunocompetent mice results in antigen-specific sensitization or sustained unresponsiveness. *Eur J Immunol* 24: 738-45
- Chen CM, Shyu MP, Au LC, Chu HW, Cheng WTK, Choo KB. 1994.** Analysis of deletion of the integrated human-papillomavirus-16 sequence in cervical cancer: a rapid multiplex polymerase-chain reaction approach. *J Med Virol* 44:206-211
- Cheng G, Icenogle JP, Kirnbauer R, Hubbert NL, St Louis ME, Han CL, Svare EL, Kjaer SK, Lowy DR, Schiller JT. 1995.** Divergent human papillomavirus type 16 variants serologically cross-reactive. *J Infect Dis* 172:1584-87
- Chu T-Y, Shen Ch-Y, Lee, H-S, Liu H-S. 1999.** Monoclonality and surface lesion-specific microsatellite alterations in premalignant and malignant neoplasia of uterine cervix: a local field effect of genomic instability and clonal evolution. *Genes, chromosomes & cancer* 24:127-134.
- Daniel S, Caillant-Zucman C, Hammer J, Bach J-F, van Endert PM. 1997.** Absence of functional relevance of human TAP polymorphism for peptide selection. *J Immunol* 159:2350-7
- Davies DH, Hill CM, Rothbard JB, Chain BM. 1990.** Definition of murine T helper cell determinants in the major capsid protein of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol* 71:2691-98.
- Degen E, Cohen-Doyle MF, Williams DB. 1992.** Efficient dissociation of the p58 chaperone from major histocompatibility complex class I molecules requires both β 2-microglobulin and a peptide. *J Exp Med* 175:1653-65.
- DeMartino GN, Proske RJ, Moomaw CR, Strong AA, Song X, Hisamatsu H, Tanaka K, Slaughter CA. 1996.** Identification, purification and characterization of a PA700-dependent activator of the proteasome. *J Biol Chem* 271:3112-18
- Deveraux Q, Ustrell V, Pickart C, Rechsteiner M. 1994.** A 26S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *J Biol Chem* 269:7059-61.
- Deverson EV, Gow IR, Coadwell WJ, Monaco JJ, Butcher GW, Howard JC. 1990.** MHC class II region encoding proteins related to the multidrug resistance family of transmembrane transporters. *Nature* 348:738-741.
- Devesa SS, Young JL Jr, Brinton LA, Fraumeni JF Jr. 1989.** Recent trends in cervix uteri cancer. *Cancer* 64:2184-90
- Dillner J, Dillner L, Robb J, Willems J, Jones Y, Lancaster W, Smith R, Leme RR. 1989.** A synthetic peptide defines a serologic IgA response to Human Papillomavirus-encoded nuclear antigen expressed in virus carrying cervical neoplasia. *Proc Nat Acad Sci USA* 86: 3838-41
- Doyle C, Strominger JL. 1987.** Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. *Nature* 330:256-259.
- Duggan-Keen MF, Keating P.J, Stevens FRA, Sinnott P, Snijders PJF, Walboomers JMM, Davidson S, Hunter RD, Dyer PA, Stern PL. 1996.** Immunogenetic factors in HPV-associated cervical cancer: Influence on disease progression. *Eur J Immunogenet* 23:275-284

Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. 1989 The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to retinoblastoma gene product. *Science* 243:934-937.

Eleuteri AM, Kahanski RA, Cardozo C, Orlowski M. 1997 Bovine spleen multicatalytic proteinase complex (proteasome). Replacement of X, Y and Z subunits by LMP2, LMP7 and MECL1 and changes in properties and specificity. *J Biol Chem* 272:11824-31.

Elliot T, Willis A, Cerundolo V, Townsend A. 1995. Processing of major histocompatibility class I-restricted antigens in the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* 181:1481-91

Fehling HJ, Swat W, Laplace C, Kühn R, Rajewsky K, Müller U, von Bohmer A. 1994 MHC class I expression in mice lacking the proteasome subunit LMP-7. *Science* 265:1234-1237.

Feltkamp MC, Smits HL, Vierboom MP, Minnaar RP, de Jongh BM, Brijfhout JW, Ter Schegget J, Melief CJ, Kast WM. 1993 Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope containing peptide containing against a tumor induced by human Papillomavirus type 16 - transformed cells. *Eur J Immunol* 23:2242-49

Fierlbeck G, Schiebel U, Müller C. 1989. Immunohistology of genital warts in different stages of regression after therapy with interferon. *Dermatologica* 179:191-95.

Früh K, Ann K, Paterson PA. 1997. Inhibition of MHC class I antigen presentation by viral proteins. *J Mol Med* 75:18-27.

García-Carrancá A, Gariglio P. 1993. Aspectos moleculares de los papilomavirus humanos y su relación con el cáncer cérvico-uterino. *Rev Inv Clin* 45: 85-92.

Garrido F, Cabrera T, Concha A, Glew S, Ruiz-Cabello F, Stern LP. 1993. Natural history of HLA expression during tumor development. *Immunol Today* 14: 491-99

Galvin K, Krishna S, Ponchel F, Frohlich M, Cummings DE. 1992. The major histocompatibility complex Class I antigen-binding protein p88 is the product of the calnexin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:8452-56.

Galloway DA, McDugall JK. 1996. The disruption of cell cycle checkpoints by papillomavirus oncoproteins contributes to anogenital neoplasia. *Semin Cancer Biol* 7:309-315

Geier E, Pfeifer G, Wilm M, Lucchiari-Hartz M, Baumeister W, Eichmann K, Niedermann G. 1999. A giant protease with potential to substitute for some functions of the proteasome. *Science* 283:978.

Ghosh AK, Smith NK, Stacey SN, Glew SS, Connor ME, Arand JR, Stern, P.L. 1993. Serological response to HPV-16 in cervical dysplasias and neoplasia: correlation of antibodies to E6 with cervical cancer. *Int J Cancer* 53:591-96

Gildlund M, Om A, Pattengal PK, Jansson M, Wigzell H, Nilsson K. 1981. Natural killer cells kill tumour cells at a given stage of differentiation. *Nature* 292:848

Glew SS, Connor EM, Snijders PJF, Stanbridge CM, Buckley CH, Walboomers JMM, Meijer CJLM, Stern PL 1993. HLA Expression in pre-invasive cervical neoplasia in relation to human papilloma virus infection. *Eur J Cancer* 29:1963-70.

Glew SS, Duggan-Keen M, Cabrera T, Stern PL 1992. HLA Class II Antigen expression in human papillomavirus- associated cervical cancer. *Cancer Research*, 52:4009-16.

Groettrup M, Kraft R, Kotska S, Standera S, Strohwasser R, Kloetzel PM 1996 A third interferon gamma-induced subunit exchange in the 20S proteasome *Eur J Immunol* 26:863-869.

Groettrup M, Sosa A, Kuckelkorn U, Kloetzel P-M 1996a Peptide antigen production by the proteasome: complex provides efficiency *Immunol Today* 9:429-35

Hailei LC, Grabrilovich D, Tamper R, Girgis KR, Nadai S, Carbone DP 1996. A functionally defective allele of TAP-1 results in loss of MHC class I antigen presentation in a human lung cancer. *Nature Genetics* 13: 210-13

Hershko A, Ciechanover A 1992 The ubiquitin system for protein degradation *Annu Rev Biochem* 61:761-807

Higgins GD, Davy M, Roder D, et al 1991. Increased age and mortality associated with cervical carcinomas negative for human papillomavirus RNA. *Lancet* 338:910-13

Hilders GJMC, Houbiers GAJ, Krul JTE, Fleuren GJ. 1994. The expression of Histocompatibility-related Leukocyte Antigens in the Pathway to cervical Carcinoma. *Am J Clin Pathol* 101: 5-12.

Hilders CG, Muñoz IM, Nooyen Y, Fleuren GJ, 1995 Altered HLA expression by metastatic cervical carcinoma cells as a factor in impaired immune surveillance *Gynecol Onco* 57:366-75.

Hochstrasser M. 1995 Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation. *Curr Opin Cell Biol* 7:215-23

Honma S, Tsukada S, Honda S, Nakamura M, Takakuwa K, Maruhashi T, Kodama S, Kanazawa K, Takahashi T, Tanaka K 1994. Biological-clinical significance of selective loss of HLA-class-I allelic product expression in squamous-cell carcinoma of the uterine cervix *Int J Cancer* 57:650-655.

Höpfel R, Sandbichler M, Sepp N, Heim K, Müller-Holzner E, Wartusch B, Dapunt O, Jochmus-Kudielka I, Ter M, Gissmann L, Fritsch P. 1991. Skin test for HPV Type 16 proteins in cervical intraepithelial neoplasia *Lancet* 337:373-74.

Hosken NA, Bevan M.J 1990. Defective presentation of endogenous antigen by a cell line expressing class I molecules. *Science* 248:367-70

Howley PM. 1991. Role of the human papillomaviruses in human cancer *Cancer Res* 51:5019-22.

Johnsen A, France J, Man-Sun-Sy Clifford VH. 1998. Down-Regulation of the transporter for antigen presentation proteasome subunits, and class I major histocompatibility complex in tumor cell lines. *Cancer Res* 58:3660-67.

- Kanda T, Onda T, Zanma S, Yasugi T, Furuno A, Watanabe S, Kawana T, Sugase M, Ueda K, Sonoda T. 1992. Independent association of antibodies against human Papillomavirus type 16 E1/E4 and E7 proteins with cervical cancer. *Virology* 190:724-32
- Kaklamani L, Leek R, Koukourakis M, Gatter KC, Harris AL. 1995. Loss of transporter in antigen processing 1 transport protein and major histocompatibility complex class I molecules in metastatic versus primary breast cancer. *Cancer Res* 55: 5191-94.
- Kast W, Brandt R, Sidney J, Drijfhout JW, Kubp RT, Grey HM, Melief CJ, Sette A. 1994. Role of HLA-A motifs in identification of potential CTL epitopes in human Papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins. *J Immunol* 152: 3904-12.
- Kast WM, Brandt R, Drijfhout JW, Melief CJ. 1993. Human leukocyte antigen-A2.1 restricted candidate cytotoxic T-lymphocyte epitopes of human papillomavirus type-16 E6-protein and E7-protein identified by using the processing-defective human cell line-T2. *J Immunother* 14:115-20.
- Keating PJ, Cromme FV, Duggan-Keen M, Sniders PJF, Walboomers JMM, Hunter RD, Dyer PA, Stern PL. 1995. Frequency of down-regulation of individual HLA-A and -B alleles in cervical carcinomas in relation to TAP-1 expression. *Br J Cancer* 72: 405-11
- Kleijmeer M, Kelly A, Geuze HJ, Slot JW, Townsend A, Trowsdale J. 1992. Location of MHC-encoded transporters in the endoplasmic reticulum and cis-Golgi. *Nature* 357:342-44.
- Klein J, Figueroa F. Evolution of the major histocompatibility complex. 1986. *Crit Rev Immunol* 6:295-386.
- Klingenhultz AJ, Foster SA, McDougall JK. 1996. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* 380:79-92
- Koppelman B, Zimmerman DL, Walter P, Brodsky FM. 1992. Evidence for peptide transport across microsomal membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:3908-12
- Lawlor DA, Zemmour J, Ennis PD, Parham P. 1990. Evolution of class-I MHC genes and proteins: from natural selection to thymic selection. *Annu Rev Immunol* 8:23-63
- Lawton P, Nelson J, Tizard R, Browning JL. 1995. Characterization of the mouse lymphotoxin-beta gene. *J Immunol* 154:239-246.
- Le Bouteiller P, Lenfant F. 1996. Antigen-presenting function(s) of the non-classical HLA-E-F and -G class I molecules: the beginning of a story. *Res Immunol*;147:301-313.
- Lehn H, Villa LL, Marziona F, Hilgarth M, Hillemans HG, Sauer G. 1988. Physical state and biological activity of human papillomavirus genomes in precancerous lesions of the female genital tract. *J Gen Virol* 69: 187-196.
- Lentinen M, Leminen A, Kuoppala T, Tiikkainen M, Lehtinen T, Lehtovirta P, Punnonen R, Vesterinen E, Paavonen J. 1992. Pre- and post-treatment serum antibody responses to HPV-16 E2 and HSV 2 ICP8 proteins in women with cervical carcinoma. *J Med Virol* 37:180-86

- Lin Y-L, Borestein LA, Selvakumar R, Ahmed R, Wettstein FO 1992. Effective vaccination against papilloma development by immunization with L1 or L2 structural protein of cottontail rabbit papillomavirus. *Virology* 187:612-19.
- Livingstone AM, Powis SJ, Günter D, Cramer DV, Howard JC, Butcher GW 1991. Cim: an MHC class II-linked allelism affecting the antigenicity of a classical class I molecule for T lymphocytes. *Immunogenetics* 34:157-63.
- Ma C-P, Vu JH, Proske RJ, Slaughter CA, DeMartino GN. 1994. Identificación, purificación and characterization of a high molecular weight ATP-dependent activator (PA700) of the 20S proteasome. *J Biol Chem* 269:3539-47.
- Machy P, Truneh A 1989. Differential half-life of major histocompatibility complex encoded class I molecules in T and B lymphoblasts. *Mol Immunol* 26:287-96
- McDougall JK. 1994. Inmortalization and transformation of human cells by human papillomavirus. *Curr Top Microbiol Immunol* 186:101-119.
- McIntyre MC, Ruesh MN, Laimins LA. 1996. Human papillomavirus E7 oncoprotein binds a single form of cyclin E in a complex with cdk2 and p107. *Virology* 215:73-82.
- Marusina K, Iyer M, Monaco JJ. 1997. Allelic variation in the mouse Tap-1 and Tap-2 transporter genes. *J Immunol* 158:5251-56.
- Meneses GF, Cos-A Ma T. 1994. Evaluación de las actividades de detección y seguimiento del Cáncer Cérvicouterino en población bajo cobertura de la Secretaría de Salud. Mexico 1992. *Rev Inst Nal Cancerología* 40:168-77.
- Mott JD, Pramanik BC, Moomaw CR, Afendis SJ, DeMartino GN, Slaughter CA. 1994. PA28, an activator of the 20S proteasome, is composed of two nonidentical but homologous subunits. *J Biol Chem* 269: 466-71
- Monaco JJ. 1992. Major Histocompatibility complex-linked transport proteins and antigen processing. *Immunol Res* 11:25-35.
- Monaco JJ, Cho S, Attaya M. 1990. Transport protein genes in the murine MHC: Possible implications for antigen processing. *Science* 250:1723-1726.
- Momburg F, Roelse, J., Howard, J.C., Butcher, G.W., Hammerling, G.W., Neefjes, J.J. 1994b. Selectivity of MHC-encode peptide transporters from human mouse and rat. *Nature* 367: 648-51.
- Morel S, Lévy F, Burtet-Schiltz O, Brasseur F, Probst-Kepper M, Peitrequin A-L, Monserrat B, Van Velthoven R, Cerottini J-C, Boon T, et al. 2000. Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells. *Immunity* 12:107-117.
- Muller M, Viscidi RP, Sun Y, Guerrero E, Hill PM, Shah F, Bosch FX, Munoz N, Gissmann L, Shah KV 1992. Antibodies to HPV-16 E6 and E7 proteins as markers for HPV-16-associated invasive cervical cancer. *Virology* 187:508-14.
- Muñoz N, Bosch FX 1997. Cervical cancer and human papillomavirus: epidemiological evidence and perspectives for prevention. *Salud Pública de México* 39:274-82.

Nandi D, Jiang H, Monaco JJ. 1996 Identification of MECL-1 (LMP-10) as the third IFN-gamma-inducible proteasome subunit. *J Immunol* 156:2361-2364

Neefjes JJ, Hämmerling GJ, Momburg F. 1993. Folding and assembly of major histocompatibility complex class I heterodimers in the endoplasmic reticulum of intact cells precedes the binding of peptide. *J Exp Med* 178:1971-80.

Nijenhuis M, Schmitt S, Armandola EA, Obst R, Brunner J, Hammerling GJ. 1996a. Identification of a contact region for peptide on the TAP-1 chain of the transporter associated with antigen processing. *J Immunol* 156:2186-95.

Nijenhuis M, Hämmerling GJ. 1996b. Multiple regions of the Transporter Associated with Antigen Processing (TAP) contribute to its peptide binding site. *J Immunol* 157: 5467-77.

Nindl I, Benítez-Bibriesca L, Berumen J, Farmanara N, Fisher S, Gross G, López-Carrillo L, Müller M, Tommasino N, Vázquez-Curiel A, Gissmann L. 1994. Antibodies against linear and conformational epitopes of the human papillomavirus (HPV) type 16 and E7 oncoproteins in sera of cervical cancer patients. *Arch Virol* 137:341-53

Norment AM, Salter RD, Parham P, Engelhard VH, Littman DR. 1988. Cell-cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules. *Nature* 336:79-81

Onda T, Kanda T, Zanma S, Yasugi T, Watanabe S, Kawana T, Ueda K, Yoshikawa H, Taketani Y, Yoshiike K. 1993. Association of the antibodies against human Papillomavirus 16 E4 and E7 proteins with cervical cancer positive for human Papillomavirus DNA. *Int J Cancer* 54:624-28.

Orlowski M, Cardozo C, Michaud C. 1993. Evidence for the presence of five distinct proteolytic components in the pituitary multicatalytic components cleaving bonds on the carboxyl side of branched chain and small neutral amino acids. *Biochemistry* 32:1563-73.

Ortaldo JR, Mason AT, O'shea JJ. 1995. Receptor-induced death in human natural killer cells: Involvement of CD16. *J Exp Med* 181: 339-44.

Ortiz-Navarrete V, Seelig A, Gemold M, Kloetz PM, Hammerling GJ. 1991. Subunit of the '20S' proteasome (multicatalytic proteinase) encoded by the major histocompatibility complex. *Nature* 353:662-664.

Ortmann B, Androlewicz M, Cresswell P. 1994. MHC class I/β₂ microglobulin complexes associated with TAP transporters before peptide binding. *Nature* 368:864-67

Ortmann B, Copeman J, Lehner PJ, Sadasivan B, Herbert JA, Grande AG, Riddell SR, Tampe R, Spies T, Trowsdale J, Cresswell P. 1997. A Critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes. *Science* 277:1306-9

Pamer E, Cresswell P. 1998. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol* 16:323-58

- Pater MM, Pater A. 1985. Human papillomavirus type 16 and 18 sequences in carcinoma cell lines of the cervix. *Virology* 145:313-318.
- Petersen BL, Petersen CL, Braendstrup O, Mourtsen S, Engel AM, Svane M, Werdeling O. 1993. Expression of beta 2-microglobulin by premalignant epithelium. *APMIS* 101:529-36.
- Powis S.J, Howard JC, Butcher GW. 1991. The major histocompatibility complex class II-linked aim locus controls the kinetics of intracellular transport of a classical class I molecule. *J Exp Med* 173:913-21
- Powis SH, Mockridge I, Kelly A, Kerr LA, Glynne R, Gileadi U, Beck S, Trowsdale J. 1992. Polymorphism in a second A B C transporter gene located within the class II region of the human major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1463-67
- Powis SH, Tonks S, Mockridge I, Kelly AP, Bodmer JG, Trowsdale J. 1993. Alleles and haplotypes of the MHC-encoded A B C transporters TAP-1 and TAP-2. *Immunogenetics* 37:373-80
- Rajagopalan S, Xu Y, Brenner MB. 1994. J Calnexin retains unassembled major histocompatibility complex Class I free heavy chains in the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* 180:407-12.
- Rechsteiner M, Hoffman L, Dubiel W. 1993. The multicatalytic and 26S proteases. *J Biol Chem* 268:6065-68
- Restifo PN, Esquivel F, Kawakam Y, Yewdeli JW, Múle JJ, Rosenberg SA, Bennink J R. 1993. Identification of human cancer deficient in antigen processing. *J Exp Med* 177: 265-72.
- Roelse J, Gromme M, Momburg F, Hammerling GJ, Neeffes J. 1994. Trimming of TAP-translocated peptides in the endoplasmic reticulum and in the cytosol during recycling. *J Exp Med* 180:1591-97
- Rollini P, Mach B, Gorski J. 1985. Linkage map of three HLA-DR beta chain genes: evidence for a recent duplication event. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:7197-201
- Ronco LV, Karpova AY, Vidal M, Howley PM. 1988. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev* 12:2061-72.
- Sadasivan B, Lehner. PJ, Ortmann B, Spies T, Cresswell P. 1996. Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity* 5:103-14.
- Sadovnikova E, Zhu KJ, Collins SM, Zhou J, Vousden K, Crawford L, Beverley P, Stauss HJ. 1994. Limitation of predictive motifs revealed by cytotoxic lymphocyte-T epitope mapping of the human papillomavirus E7 protein. *Int Immunol* 6:289-96
- Sanda MG, Restifo NP, Walsh JC. 1995. Molecular characterization of defective antigen processing in human prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 85:280-85

Scheffner M, Werness BA, Huibregste JM, Levin AJ, Howley PM. 1990 The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63:1129-1136.

Schwarz E, Freese UK, Guissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, Zur Hausen H. 1985. *Nature* 314: 111-114.

Seliger B, Dunn T, Schwenzer A, Casper J, Huber C, Schmoll HJ. 1997 Analysis of the MHC class I antigen presentation machinery in human embryonal carcinomas: evidence for deficiencies in TAP, LMP and MHC class I expression on their upregulation by IFN-g. *Scand J Immunol* 46:625.

Shepherd PS, Tran TT, Rowe AJ, Cridland JC, Comerford SA, Chapman MG, Rayfield LS. 1992. T cell responses to the human papillomavirus type 16 E7 protein in mice of different haplotypes. *J Gen Virol* 73:1269-74

Stannard LM. Principles of Virus Architecture 1995:
<http://www.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/virarch.html>

Steven S, Urban JL, Scheriber H. 1993 A tumor escape variant that has lost one major histocompatibility complex class I restriction element induces specific CD8+ T cells to an antigen that no longer serves as a target. *J Exp Med* 178 933-40.

Singal DP, Ye M, Bienzle D. 1998 Transfection of TAP1 gene restores HLA class I expression in human small cell lung carcinoma. *Int J Cancer* 75:112-16

Sonnichsen B, Fullenkrag J, Van PN, Diekmann W, Robinson DJ, Mieskes G. 1994. Retention and retrieval: both mechanisms cooperate to maintain calreticulin in the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* 107:2705-17.

Stauss HJ, Davies H, Sadovnikova E, Chain B, Horowitz N, Sinclair C. 1992 Induction of cytotoxic T lymphocytes with peptides in vitro: Identification of candidate T-cell epitopes in human papilloma virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:7871-75

Steele JC, Stankovic T, Gallimore PH. 1993. Production and characterization of human proliferative T-cell clones specific for human papillomavirus type 1 E4 protein. *J Virol* 67: 2799-806

Straight SW, Herman B, McCance DJ. 1995 The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes. *J Virology* 69:3185-92

Tanaka K, Tanahashi N, Tsurumi CH, Yokota K, Shimbara N. 1997. Proteasomes and antigen processing. *Adv Immunol* 64:1-38

Tarpey I, Stacey S, Hickling J, Dirley HDL, Renton A, McInode A, Davies DH. 1994 Human cytotoxic T lymphocytes stimulated by endogenously processed human papillomavirus type 11 E7 recognize a peptide containing a HLA-A2(A*0201) motif. *Immunology* 81:222-27.

Tay SK, Jenkins D, Singer A. 1987. Natural killer cells in cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus infection. *Br J Obstet Gynaecol* 94:901-906

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tindle RW, Fernando GJ, Sterling JC, Frazer IH. 1991. A "public" T helper epitope of the E7 transforming protein of human papillomavirus 16 provides cognate help for several E7 B-cell epitopes from cervical cancer-associated human papillomavirus genotypes *Proc Natl Acad Sci USA* 88:5887-91.

Tindle RW. 1996. Human papillomavirus vaccines for cervical cancer *Current Opin Immunol* 8: 643-50

Trowsdale J, Hanson I, Mockridge I, Beck S, Townsend A, Kelly A. 1990. Sequences Encoded in the class II region of the MHC related to the 'ABC' superfamily of transporter *Nature* 348: 741-44

Tzzy-Chouu, Wu. 1994. Immunology of the papilloma virus in relation to cancer *Curr Opin Immunol* 6: 746-54.

Ustrell V, Realini C, Pratt G, Rechsteiner M. 1995. Human lymphoblast and erythrocyte multicatalytic proteases: differential peptidase activities and responses to the 11S regulator. *FEBS Lett* 376:155-58.

Van den Eynde BJ, Morel S. 2001. Differential processing of class-I-restricted epitopes by the standard proteasome and the immunoproteasome. *Curr Opin Immunol* 13:147:153.

van Endert, P. M., Riganeli, D., Greco, Giulia., Fleschhauer, K., Sidney, J., Sette, A., Bach, J-F. 1995. The Peptide-binding motif for the human Transporter Associated with Antigen Processing. *J Exp Med* 182:1883-95.

Van Endert PM. 1996. Peptide selection for presentation by HLA class I: a role for the human transporter associated with antigen processing ? *Immunol Res* 15:256-279

Van Kaer L, Ashton-Rickard PG, Eichelberg M, Gaczynska M, Nagashima K, Rock KL, Goldberg AL, Doherty PC, Tonegawa S. 1994. Altered peptidase and viral-specific T cell response in LMP mutant mice *Immunity* 1:533-541

Viac J, Soler C, Chardonnet Y, Euvrard S, Schmitt D. 1993. Expression of immune associated surface antigens of keratinocytes in human papillomavirus-derived lesions. *Immunobiology* 188:392-402.

Villa LL, Brentani RR. 1990. Human papillomavirus up date. *Int J Cancer* 48:163-166

Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snidjers PF, Peto J, Meijer CJLM, Muñoz N. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189:12-19

Wei XH, Orr HT. Differential expression of HLA-E, HLA-F and HLA-G transcripts in human tissue. 1990 *Hum Immunol* 29:131-142.

Werness AB. 1995. Cáncer cervicouterino: en busca de una etiología infecciosa *Contemporary Oncology* Julio/Agosto:13-21

Werness B, Levin AJ, Howley PM. 1990. Association of human papillomavirus-types-16 and -18 E6 protein with p53. *Science* 248: 76-79

White PC, Chaplin DD, Weis JH, Dupont B, New MI, Seidman JG. 1984. Two steroid 21-hydroxylase genes are located in the murine S region. *Nature* 312:465-467.

Viscidi RP, Sun Y, Tsuzaki B, Bosch FX, Munoz N, Shah KV. 1993. Serologic response in human Papillomavirus-associated invasive cervical cancer. *Int J Cancer* 55:780-4.

Yamada T, Wheeler CM, Halpern AL, Stewart ACM, Hildesheim A, Jenison SA. 1995. Human papillomavirus-16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments. *J Virol* 69:7743-53.

Yewdell JW, Bennink JR. 2001. Cut and trim: generating MHC class I peptide ligands. *Curr Opin Immunol* 13:13-18.

York IA, Rock KL. 1996. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* 14:369-396.

Zur Hausen H. 1991. Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology* 184: 9-13.