

2006B

397471738

---

---

# **UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

**Centro Universitario de Ciencias Biológicas y  
Agropecuarias**

---

---



Tesis

**"EXPRESIÓN DE MICA/B EN LÍNEAS CELULARES DERIVADAS  
DE CÁNCER CÉRVICO-UTERINO"**

Sede del estudio

**LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA  
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS DE LA SALUD**

Presenta

**DAVID URIBE RODRÍGUEZ**

Director de tesis

**DR. EN C. SUSANA DEL TORO ARREOLA**

**LAS AGUJAS, ZAPOPAN JAL., DICIEMBRE DE 2006.**

**“EXPRESIÓN DE MICA/B EN LÍNEAS CELULARES  
DERIVADAS DE CÁNCER CÉRVICO-UTERINO”**

Presenta

**DAVID URIBE RODRÍGUEZ**

Director de tesis

**DR. EN C. SUSANA DEL TORO ARREOLA**

Asesores

**M. EN C. ALICIA DEL TORO ARREOLA  
QFB. NAELA ALEJANDRA ARREYGUE GARCÍA**

Sede del estudio

**LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA  
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS DE LA SALUD  
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**



**Universidad de Guadalajara**  
**Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias**

*Coordinación de Titulación y Carrera de Licenciatura  
en Biología*  
948/ C. C. BIOLOGÍA

**C. DAVID URIBE RODRÍGUEZ**  
**PRESENTE**

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de: **Tesis e Informes** opción **Tesis** con el título: **"EXPRESIÓN DE MICA/B EN LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE CÁNCER CÉRVICO-UTERINO"** para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director / a de dicho trabajo el/la: **DRA. SUSANA DEL TORO ARREOLA** y el asesor/es es el/la: **M en C. ALICIA DEL TORO ARREOLA** y el/la: **QFB. NAELA A. ARREY GUE GARCÍA**

Sin más por el momento, le envío un caluroso saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"PIENSA Y TRABAJA"**

Las Agujas, Zapopan., 18 de Diciembre del 2006.

**"2006. Año del Bicentenario del natalicio del Benemérito de las Américas.  
Don Benito Juárez García"**

  
**DR. CARLOS ÁLVAREZ MOYA**  
**PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN  
SECRETARÍA DE CULTURA Y PATRIMONIO

  
**M en C. ISELA LETICIA ÁLVAREZ BARAJAS**  
**SECRETARÍA DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

**BIBLIOTECA CUCBA**

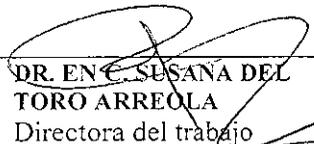
**Dr. Carlos Álvarez Moya.**  
**Presidente del Comité de Titulación.**  
**Carrera de Licenciado en Biología.**  
**CUCBA.**  
**Presente:**

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad **TESIS E INFORMES**, opción **TESIS** con el título: **“EXPRESIÓN DE MICA/B EN LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE CÁNCER CÉRVICO-UTERINO”**, que realizó el pasante **DAVID URIBE RODRÍGUEZ** con número de código **397471738** consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

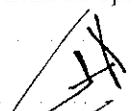
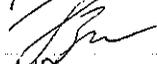
**ATENTAMENTE**

Las Agujas, Zapopan, Jal., 11 de Diciembre del 2006

  
**DR. EN C. SUSANA DEL TORO ARREOLA**  
 Directora del trabajo

  
**M. en C. ALICIA DEL TORO ARREOLA**  
 Asesora

  
**QFB. NAELA ALEJANDRA ARREYGUE GARCÍA**  
 Asesora

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dr. Alfonso Enrique Islas Rodriguez		13 Dic/06
Dra. Galina Petrovna Zaitseva		11. 12. 06
Dr. Edgardo Flores Torales		11/dic/06
Supl. Dr. Jorge Peregrina Sandoval		13/dic/06

*Vo Bo*  
*14/12/06*  
*Cat...*

# ÍNDICE DEL CONTENIDO

• Introducción	1
• Antecedentes	2
○ Generalidades en cáncer	2
○ Cáncer cérvico-uterino	3
○ Respuesta inmune en cáncer cérvico-uterino	6
○ Biología del receptor NKG2D	8
○ Una nueva familia de moléculas en el MHC: MICA/B	8
• Justificación y planteamiento del problema	14
• Objetivos	16
○ General	16
○ Particulares	16
• Metodología	17
○ Plan general	17
○ Universo de estudio	17
○ Análisis estadístico	17
○ Metodología para desarrollar la etapa 1	18
○ Metodología para desarrollar las etapas 2-5	20
• Resultados	23
○ Resultados de la etapa 1 (cultivos celulares)	23
○ Resultados de las etapas 2-5 (detección de MICA/B)	24
• Discusión	30
• Conclusiones	36
• Referencias bibliográficas	37

## INTRODUCCIÓN

El virus del papiloma humano (VPH) se considera el principal factor etiológico en el desarrollo del cáncer cérvico-uterino. Aun cuando el DNA viral se ha detectado prácticamente en el 100% de los casos, son pocas las infecciones por VPH que progresan a cáncer. Se piensa que en algunas mujeres, esta progresión involucra un ambiente en el cual la respuesta inmune es estimulada de manera inapropiada.

El sistema inmune innato juega un papel primordial en la eliminación temprana de las células malignas. Algunas células de la respuesta innata contra tumores involucra a los macrófagos, los cuales llevan a cabo su actividad antitumoral a través de citoquinas (como el factor de necrosis tumoral- $\alpha$ ), la secreción de metabolitos reactivos (como el óxido nítrico) e incluso se ha demostrado que son capaces de fagocitar células tumorales completas. Otro tipo celular importante lo constituyen las células NK, las cuales son capaces de destruir directamente a células infectadas por virus o a células tumorales. Su actividad es controlada por un balance de receptores de inhibición y de activación. Entre estos últimos se encuentra el receptor NKG2D.

NKG2D reconoce a miembros de la familia MIC (MICA y MICB). Estas moléculas están relacionadas a las moléculas MHC-I, pero a diferencia de éstas, MICA/B no presentan antígenos; además, en condiciones fisiológicas, su patrón de expresión está confinado al epitelio gastrointestinal. Aunque de manera interesante, se reportó que MICA/B son inducidas en la superficie de células tumorales nacientes; por lo cual en teoría, la interacción de NKG2D con MICA/B podría evocar una respuesta citotóxica antitumoral efectiva.

Lo anterior ha sido reportado en especímenes de cáncer de colon, cáncer gástrico, de próstata y en algunos tumores ginecológicos, incluyendo el de cérvix. Sin embargo, lo que hasta el momento se ha descrito en cáncer cérvico-uterino, no toma en cuenta la participación de la infección con VPH, por lo que es interesante estudiar la expresión de MICA/B en líneas celulares derivadas de cáncer de cérvix con diferentes tipos de VPH.

## ANTECEDENTES

**Generalidades en cáncer.** La palabra cáncer se refiere no sólo a una enfermedad, sino que ésta engloba alrededor de un centenar de cuadros clínicos distintos. Sin embargo, todos ellos comparten una característica exclusiva que es la proliferación de las células en una manera rápida y desorganizada, dando como resultado la aparición del llamado tumor maligno o cáncer; el cual, en un principio aparecerá localizado en un órgano determinado, pero conforme avance su crecimiento, éste puede llegar a invadir a tejidos vecinos o viajar a través de la sangre o la linfa y formar tumores secundarios (metástasis) en órganos distantes al sitio primario de origen. (Hanahan 2000; Kufe 2003).

Diversos estudios experimentales, clínicos y epidemiológicos, han mostrado que durante el desarrollo del cáncer participan diversos factores; por lo cual, se considera que su etiología es multifactorial. De manera importante se encuentran implicados algunos factores hereditarios y ambientales, nutrición y edad avanzada (Schwartz 1999; Frazier 2001).

Además de todos los factores mencionados, también se han asociado ciertas infecciones virales con un riesgo elevado de desarrollar algún tipo de cáncer; tal como ocurre con la infección del virus del papiloma humano (VPH), el cual se ha implicado como causa primaria en el desarrollo del cáncer cérvico-uterino (zur Hausen 1996; Munoz 2000; Bosch 2002).

**Cáncer cérvico-uterino.** Consiste en una enfermedad en la cual se encuentran células malignas en los tejidos del cérvix (cuello uterino). Antes de que el cáncer aparezca, los tejidos normales pasan por un proceso conocido como displasia, durante el cual empiezan a aparecer células anormales. Después que ha pasado un período que puede tomar varios años o incluso hasta una década, las células cancerosas comenzarán a crecer y se diseminarán con mayor profundidad en el cérvix y en las áreas circundantes para convertirse en un cáncer con capacidad de invadir e incluso llegar a formar metástasis (Franco 2001).

A nivel mundial, el cáncer cérvico-uterino se considera como la segunda o incluso la primera neoplasia maligna en la mujer; esto ocurre de manera especial en países en vías de desarrollo, tales como algunos países latinoamericanos y asiáticos, donde la incidencia de casos es mayor que la observada en países como Estados Unidos (Bermudez 2005), tal como se muestra en la Figura 1.



**Incidencia en América Latina vs USA 1996–1998**

	Nuevos casos (por año)	Incidencia (por año por 10000 mujeres)
USA	13000	7.8
América Latina	52000	37.0

**Figura 1.** Datos epidemiológicos que muestran la proporción anual de nuevos casos de cáncer cérvico-uterino en países donde éste representa la principal neoplasia maligna en mujeres. Se muestran también los datos para el caso de Estados Unidos (datos tomados de Bermudez 2005).

Según datos epidemiológicos emitidos por la Secretaría de Salud en México, en el año 2005 se presentaron 4,270 defunciones debidas a este tumor, con una tasa de 8.0 por cada 100 000 mujeres. Sin embargo, la tasa fue más alta conforme la edad fue avanzando (28.9 por cada 100 000 mujeres mayores de 65 años). Lo anterior ubica a este tumor como la causa número uno de muertes por cáncer en la mujer (Secretaria de Salud 2006)

Se han implicado diversos factores de riesgo asociados al desarrollo de cáncer del cérvix; sin embargo (como ya previamente se mencionó), la infección con ciertos tipos de VPH se considera el factor etiológico más importante en el desarrollo de esencialmente todos los casos de carcinomas que se originan en el cérvix (zur Hausen 1996; Munoz 2000; Bosch 2002).

Desde hace algunas décadas se demostró que la transfección del genoma de ciertos VPH a queratinocitos normales, podía extender indefinidamente la capacidad proliferativa de estas células (proceso comúnmente referido como "inmortalización"). Posteriormente, se trató de definir que genes del VPH tenían la capacidad de inducir la inmortalización en las células y se demostró que las oncoproteínas E6 y E7 de VPH-16 cooperan en este proceso (Hawley-Nelson 1989).

Más evidencias que de manera contundente revelaron la asociación entre VPH y el desarrollo de cáncer cérvico-uterino, fueron los estudios epidemiológicos y moleculares en un elevado número de pacientes (en todo el mundo), donde se

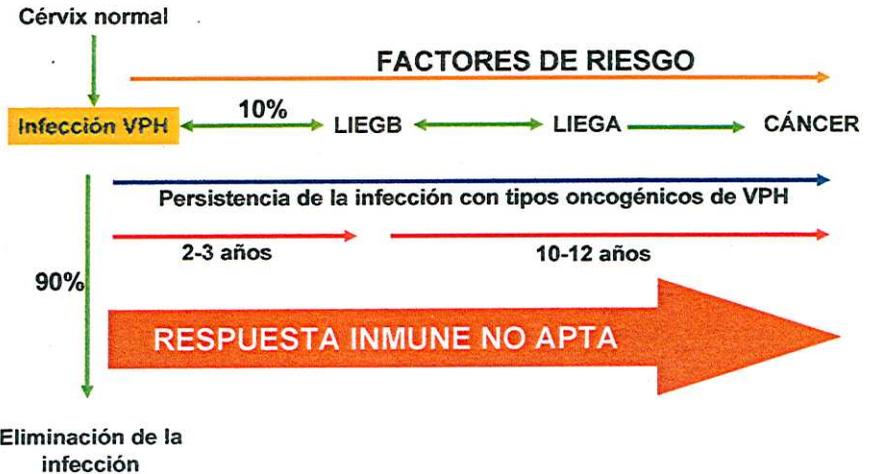
demonstró la presencia del VPH en más del 90% de los especímenes estudiados (actualmente se sabe que el DNA del virus se encuentra en el 99.7% de los carcinomas cervicales) (Walboomers 1999).

Estudios epidemiológicos a nivel molecular han subdividido a los tipos de VPH que infectan el tracto genital en dos grupos: los de bajo riesgo, asociados principalmente con el desarrollo de verrugas genitales (tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 y CP6108) y aquellos considerados de alto riesgo por su potencial oncogénico (tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82) (Pang 2002; Chakrabarti 2003; Muñoz 2003).

Aun cuando existen evidencias que demuestran la presencia del DNA viral en casi todos los carcinomas cervicales, pocas son las infecciones por VPH que progresan a cáncer (Walboomers 1999; Richardson 2005). Así, la infección por VPH es en la mayoría de los casos, un fenómeno transitorio que resulta en la eliminación del virus, sin evidencias clínicas o conduciendo a lesiones de grado bajo que a menudo mostrarán una regresión espontánea (Ho 1998; Franco 1999; Giuliano 2002).

La presencia de VPH es así una causa necesaria pero no suficiente en el desarrollo de lesiones cervicales; es precisamente la persistencia de la infección, lo que parece ser un prerrequisito para el desarrollo de neoplasia intraepitelial grado III y posteriormente de cáncer cérvico-uterino (Snijders 2006; Brummer 2006). Se cree que la progresión de las lesiones podría involucra un ambiente

inmune adverso, en el cual la respuesta inmune local es incapaz de erradicar a las células malignas (Figura 2).



**Figura 2.** Datos que muestran la historia natural del desarrollo del cáncer cervicouterino y donde se observa que una respuesta inmune incapaz de eliminar la infección por VPH, será un factor primordial en definir el destino de la lesión (datos tomados de Tindle 2002).

**Respuesta inmune en el cáncer cervicouterino.** Aun cuando la respuesta inmune en el cáncer cervicouterino no ha sido completamente dilucidada, queda claro que la inmunidad adaptativa de tipo celular (mediada por linfocitos T) asume un papel primordial en la erradicación de células transformadas por VPH. Al menos, esto ha sido demostrado de manera contundente en pacientes coinfectadas con virus de la inmunodeficiencia humana, quienes han revelado una prevalencia incrementada de lesiones anogenitales debidas a la infección por VPH (Hillemanns 1996). Sin embargo, previo al desarrollo de la inmunidad adaptativa,

debe desencadenarse una respuesta efectiva de tipo natural (innata). La respuesta innata se considera la primera línea de defensa en superficies mucosas

Al ser las infecciones por VPH exclusivamente intraepiteliales (recordar que el VPH genital es un virus con tropismo a epitelios mucosos), teóricamente, el ataque viral debe ser iniciado por las células presentadoras de antígeno (APCs) en el epitelio escamoso (Mota 1999). Estas células centinela incluyen a las mismas células epiteliales (APCs “no profesionales”) y las APCs “profesionales” como son las células dendríticas y las células de Langerhans; éstas últimas realizan su función a través de la producción de citoquinas con potente actividad antitumoral (como el factor de necrosis tumoral- $\alpha$ ), a través de la secreción de metabolitos reactivos como el óxido nítrico, incluso llegan a fagocitar células tumorales completas (Jackson 2000; Igawa 2004). Otras células importantes en el control temprano del crecimiento tumoral son las células NK, las cuales pueden destruir directamente a células tumorales o infectadas por virus (Smyth 2005).

El papel de las células NK en cáncer cérvico-uterino no está completamente esclarecido, a pesar de que durante la última década ha habido un gran avance en el entendimiento de los mecanismos que regulan su actividad (la cual está regida por un fino balance entre receptores de inhibición y de activación). Sin embargo, ya se sabe que pacientes con cáncer cérvico-uterino muestran disminución de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC por sus siglas en inglés: *antibody-dependent cell cytotoxicity*) en estadios avanzados de la enfermedad

(Pillai 1988). Este mecanismo de citotoxicidad lo realizan a través del receptor CD16, el cual reconoce la porción Fc de algunas inmunoglobulinas que previamente han reconocido antígenos en la superficie de la célula tumoral (Trinchieri 1993; Smyth 2005). Recientemente, en nuestro laboratorio también hemos encontrado defectos en la expresión de otro importante receptor de activación, el receptor NKG2D (datos aun no publicados).

***Biología del receptor NKG2D.*** Este receptor pertenece a la familia de receptores tipo lectina y se encuentra codificado en el cromosoma 12 (en humanos) en una región conocida como “complejo de genes NK” (Glienke 1998). Inicialmente fue identificado como un receptor con capacidad para reconocer y eliminar células tras interactuar con ligandos no constitutivos; esto es, inducidos ante una situación de stress celular, tal como ocurriría después de una infección viral o durante la transformación maligna (Vivier 2002; Watzl 2000). Entre los ligandos mejor descritos para NKG2D se encuentra un grupo de moléculas denominadas moléculas MIC (por sus siglas en inglés: MHC class I Chain-related gene) (Strong 2001; Stephens 2001).

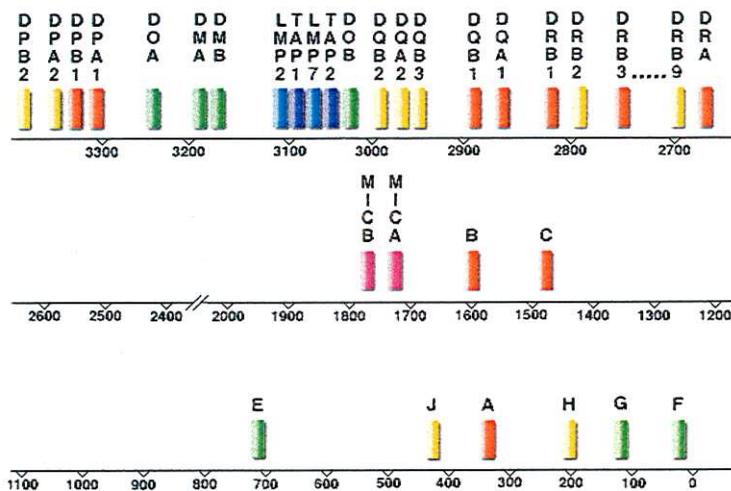
***Una nueva familia de moléculas en el MHC: MICA/B.*** El complejo principal de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés: Major Histocompatibility Complex) es un complejo de genes que se localiza en el brazo corto del cromosoma seis. (Abbas 2002; Zwirner 2006). Existen tres regiones de genes dentro del MHC; los productos de clase III que son heterogéneos, ya que incluyen a varios componentes del complemento, a la proteína de choque térmico-70 y al

factor de necrosis tumoral- $\alpha$ ; estas moléculas participan de manera importante en procesos de inflamación. Además están localizados los genes que codifican para proteínas clásicas de clase II y I, cuya función principal es la de presentar péptidos antigénicos a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, respectivamente. Además de los genes clásicos del MHC-I (HLA-A, HLA-B Y HLA-C), en esta región también se encuentran codificadas moléculas no clásicas como HLA-E, HLA-F, HLA-G y una familia de moléculas recientemente descrita y que fue denominada como familia de genes MIC (Horton 2004).

En particular, las moléculas MICA (el miembro mejor estudiado de la familia MIC) fueron descubiertas en 1994, cuando se describió una nueva familia de genes polimórficos localizados dentro de la región del MHC-I (Figura 3). Más tarde se observó que esta molécula forma parte de una familia completa denominada MIC (como ya se mencionó en el párrafo anterior), la cual comprende dos genes funcionales (MICA y MICB) y varios pseudogenes designados desde MICC hasta MICE (Stephens 2001).

La molécula MICA comparte una homología general del 83% con MICB, pero su homología con las moléculas clásicas MHC-I es bastante baja, (entre el 15 y 35%), aun cuando la estructura predicha se consideró similar por contener tres dominios externos ( $\alpha$ 1-3), un dominio transmembranal y un dominio citoplásmico; (Bahram 1994; Stephens 2001; Zwirner 2006). Además, a diferencia de las moléculas del MHC-I, MICA no se asocia a la  $\beta$ 2-microglobulina; es estable en la superficie

celular en ausencia de ligandos (es decir, no muestra péptidos generados por el procesamiento de antígenos endógenos) y su distribución en condiciones normales está fundamentalmente confinada a la superficie del epitelio gastrointestinal (Groh 1996). Sin embargo, durante el desarrollo de tumores, sobre todo aquellos de origen epitelial, también se ha observado la expresión de MICA (y recientemente también de MICB), y se ha postulado que esto podría representar una señal de daño celular (Groh 1999; Jinushi 2003; Watson 2006).



**Figura 3.** Región del MHC (cromosoma 6 en el humano) mostrando los genes que codifican para las moléculas clásicas (HLA-A, -B y -C) y no clásicas del MHC-I como MICA y MICB. Los genes que codifican para éstas últimas se localizan adyacentes a HLA-B (tomado de [www.anthonynolan.org.uk/HIG/data](http://www.anthonynolan.org.uk/HIG/data))

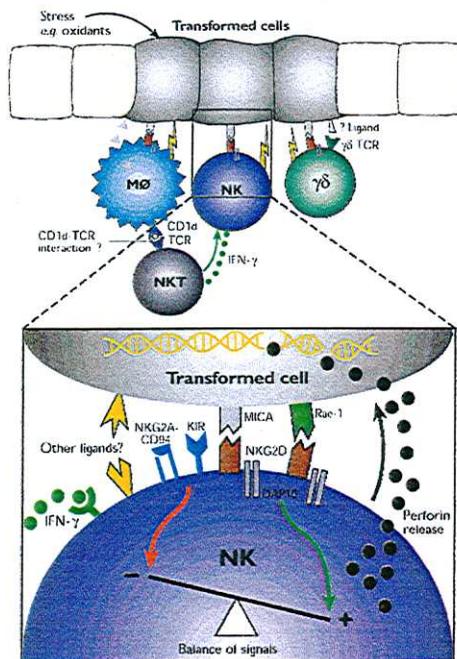
Lo anterior, al menos ha sido documentado en muestras de cáncer de pulmón, mama, ovario, próstata, colon, así como en algunas leucemias (Groh 1996; Groh 1999; Vetter 2002; Pende 2002; Salih 2003; Doubrovina 2003; Carbone 2004; Wu

2004; Watson 2006). Por lo mismo, se ha puesto interés en MICA/B como inductores de una respuesta citotóxica contra tumores originados de distintas estirpes celulares.

En teoría, la expresión de MICA y MICB en la superficie de células tumorales podría promover una respuesta citotóxica efectiva al ser reconocidas por el receptor NKGD2 expresado en la superficie de las células NK (así como en algunos linfocitos T citotóxicos, como ya previamente se mencionó). Al menos, ya se sabe que tras la interacción de NKGD2 con sus ligandos expresados en la superficie de la célula blanco (una célula tumoral o infectada por virus), se potenciarán las funciones efectoras de las células NK, lo cual conducirá a un incremento en la capacidad citotóxica de las mismas, así como a un aumento en la producción de importantes citoquinas con acción antineoplásica como sería el caso del IFN- $\gamma$  (Groh 1999, Seliger 2003, Vivier 2002), según puede ser observado con más detalle en la Figura 4.

No obstante lo anterior, evidencias recientes han mostrado la capacidad de algunos tumores para liberar MICA desde la superficie celular hacia la circulación, de tal forma que esta forma soluble deja a la célula tumoral menos inmunogénica (al no presentar señales de daño en la superficie), además de que esta forma soluble al interactuar con NKGD2 facilita la interiorización y degradación lisosomal de este importante receptor de activación, lo que en consecuencia, comprometería la respuesta inmune antitumoral haciendo con esto, un nuevo mecanismo de

evasión tumoral (Groh 2002; Yokoyama 2002; Holdenrieder 2006). Así mismo, un estudio reciente reportó que MICB es cortado desde la superficie de células tumorales y está presente en altas cantidades en el suero de pacientes con tumores gastrointestinales (Salih 2006).



**Figura 4.** La interacción de receptores de activación sobre la célula NK (como NKG2D), conducirá a la liberación del contenido de sus gránulos (perforinas y granzimas) que en acción conjunta, conducirán a la inducción de apoptosis en la célula blanco. Adicionalmente, la célula NK puede también actuar de manera indirecta a través de la secreción de citoquinas anti-neoplásicas como es el IFN- $\gamma$  (datos tomados de Smyth 2001).

Por otro lado, resultados obtenidos en nuestro laboratorio, han demostrado que pacientes con cáncer cérvico-uterino muestran niveles elevados de MICA en suero, comparados con los niveles detectados en suero de mujeres sanas (datos

aun no publicados). Por lo cual, es importante estudiar la expresión tanto de MICA como de MICB en líneas celulares derivadas de cáncer cérvico-uterino con diferente número de copias integradas de VPH-16 o -18 (los tipos más frecuentes encontrados en este tipo de cáncer), así como en líneas celulares también de cáncer de cérvix pero sin datos de infección por VPH, para así tratar de entender si el patrón de expresión de estas moléculas pudiese estar alterado según el tipo de infección en pacientes con este tumor. El trabajo propuesto en esta tesis, fue un estudio piloto descriptivo, por lo cual no manejamos una hipótesis y de acuerdo a los resultados que obtuvimos (como se verá más adelante en este documento), la siguiente fase para estudios futuros será estudiar el significado biológico de las diferencias encontradas en la expresión de MICA/B según la línea tumoral estudiada.

## JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad, el cáncer cérvico-uterino continúa siendo en nuestro país la principal causa de muerte debida a neoplasias malignas en la mujer. Según datos reportados por la Secretaría de Salud en México, en el 2005 se presentaron 4270 defunciones, con una tasa de 8.0 por cada 100 000 mujeres. La infección con tipos oncogénicos del VPH se considera la causa primaria en el desarrollo de esta neoplasia. Se piensa que es la persistencia viral lo que conducirá a la progresión de las lesiones que van desde una lesión de grado bajo que después progresará a una de grado alto y eventualmente a cáncer invasor. Esta progresión involucra un ambiente donde la respuesta inmune pudiera ser incapaz de erradicar a las células malignas.

La vigilancia inmune local y sistémica juega un papel importante durante el establecimiento del tumor. En otras palabras, la interconexión entre los mecanismos de inmunidad innata y adaptativa dictará un papel crítico en definir la inhibición o la progresión del tumor. Las células NK son los efectores innatos encargados de destruir células infectadas por virus o células tumorales. Un receptor importante por el cual las células NK y linfocitos T se activan es el receptor NKG2D, el cual tras interaccionar con moléculas MICA/B (expresadas sobre la superficie de células tumorales) promoverá la eficiente activación de estas células inmunes. No obstante, existen datos en la literatura donde se demuestra la capacidad de algunos tumores para liberar MICA a la circulación, y esta molécula

en forma soluble, más que promover una activación de las células NK o linfocitos T a distancia, causará una desregulación en la expresión de NKG2D, por lo que este mecanismo podría representar una nueva estrategia de evasión tumoral.

De manera interesante, resultados recientes obtenidos en nuestro laboratorio, han demostrado que pacientes con cáncer cérvico-uterino muestran niveles elevados de MICA en suero, comparados con los niveles detectados en mujeres sanas. Sin embargo, desconocemos si el patrón de expresión de esta molécula MICA, así como MICB, puede verse alterado en la superficie de células tumorales derivadas de este tumor, por lo que un abordaje en el estudio de estas moléculas sobre la superficie celular de líneas celulares derivadas de cáncer cérvico-uterino con diferente número de copias integradas VPH-16 o -18, así como en líneas celulares también de cáncer de cérvix pero sin datos de infección por VPH, aportará datos iniciales para entender si estas moléculas se ven afectadas según la lesión va progresando, además de la participación que pueda tener el tipo de VPH (o incluso la carga viral) presente en la lesión.

## OBJETIVOS

### *General*

Describir el patrón de expresión de las moléculas MICA/B en diferentes líneas celulares derivadas de cáncer cérvico-uterino, así como en una línea de queratinocitos con características normales de crecimiento.

### *Particulares*

1. Establecer los cultivos de líneas de cáncer cérvico-uterino con diferente número de copias integradas de VPH-16 o -18, así como líneas celulares sin copias de VPH.
2. Medir el porcentaje de expresión de MICA/B en la superficie celular de líneas tumorales derivadas de cáncer cérvico-uterino y con secuencias de VPH-16 (células SiHa y células CaSki).
3. Medir el porcentaje de expresión de MICA/B en la superficie celular de líneas tumorales derivadas de cáncer cérvico-uterino y con secuencias de VPH-18 (células HeLa y células SW756).
4. Medir el porcentaje de expresión de MICA/B en la superficie celular de una línea tumoral de cáncer cérvico-uterino carente de secuencias de VPH (células C-33).
5. Medir el porcentaje de expresión de MICA/B en la superficie celular de una línea de células de queratinocitos considerados normales (HaCaT).

## **METODOLOGÍA**

### ***Plan general***

En este estudio con carácter descriptivo estudiamos el patrón de expresión de MICA/B en diversas líneas celulares derivadas de cáncer cérvico-uterino. Para esto, utilizamos líneas derivadas de lesiones primarias de cáncer del cérvix (células HeLa y SW756 que poseen copias integradas del VPH-18 y células SiHa con VPH-16), también se trabajó con C-33 A que es una línea celular sin VPH, pero tiene mutación en el gen supresor de tumor p53. La línea CaSki usada en algunos experimentos fue derivada desde una metástasis (en intestino delgado) originada de un tumor primario en el cérvix; esta línea posee un alto número de copias de VPH-16. Finalmente, como control de queratinocitos normales usamos la línea celular HaCaT, que aun cuando es una línea inmortalizada, sus características de crecimiento se aproximan a las de un queratinocito normal.

### ***Universo de estudio***

Líneas celulares derivadas de carcinomas (o adenocarcinomas) del cérvix uterino, así como de queratinocitos considerados normales.

### ***Análisis estadístico***

Al haber sido éste, un estudio con carácter descriptivo y sin asociación de variables, no se requirió de un análisis estadístico para validar matemáticamente nuestros resultados.

## Metodología para desarrollar la etapa 1

Mantenimiento de las líneas celulares. Se usaron diferentes líneas celulares, todas ellas derivadas de carcinomas (o adenocarcinomas) del cérvix uterino según se muestra en el Cuadro I. También se usó la línea de queratinocitos HaCaT considerada como normal.

**Cuadro I.** Características generales de las líneas celulares empleadas en este estudio.

Nombre	Órgano	Origen	VPH	Carga viral (copias/célula)	Tipo	Observaciones
HeLa	Cérvix	Adenocarcinoma epitelial	+	20-50	18	-
SiHa	Cérvix	Carcinoma de células escamosas	+	1-2	16	-
SW756	Cérvix	Carcinoma de células escamosas	+	20-50	18	-
CaSki	Cérvix	Metástasis a intestino delgado	+	600	16	-
C-33 A	Cérvix	Carcinoma	-	-	-	p53 elevado y mutado(Arg-Cis)
HaCaT	Piel	Queratinocitos	-	-	-	Línea celular inmortalizada

Las diferentes líneas originalmente se conservaron en nitrógeno líquido hasta su uso; una vez que se procedió a la realización de los cultivos, éstas se descongelaron de forma gradual. Brevemente, después de que se extrajeron del

nitrógeno se mantuvieron a una temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$  durante 12 horas. Posteriormente, se transfirieron a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  por 4 horas; por último, se depositaron en un contenedor con hielo manteniéndolas a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su descongelamiento total. Con el fin de eliminar el exceso de dimetil-sulfóxido (DMSO) las células fueron lavadas con medio de cultivo D-MEM mediante centrifugación a 2000 rpm durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, se retiró el sobrenadante, y una vez que se confirmó una viabilidad adecuada (arriba del 90%) se procedió a cultivar a las diferentes líneas celulares.

Condiciones del cultivo. A cada frasco de cultivo se le adicionaron 5 ml de medio de cultivo D-MEM suplementado con 20% de suero fetal de bovino y 1% de antibiótico-antimicótico de la marca comercial GIBCO. Las células tumorales de las diferentes líneas (previamente descongeladas como se mencionó en el párrafo anterior) se colocaron en los frascos de cultivo. Después, se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  con una concentración de 5% de  $\text{CO}_2$  y una atmósfera con 90% de humedad. A las 24 horas, se reemplazó el medio de cultivo y los frascos se mantuvieron en las mismas condiciones de cultivo. Se observó el crecimiento de las células en monocapa y se realizaron los cambios de medio necesarios hasta alcanzar una confluencia cercana al 100%.

Tripsinización de las células. Una vez alcanzada la confluencia adecuada (cercana al 100%), se retiró el medio de cultivo por aspiración y se realizó un lavado con 1 mL de PBS por 30 segundos. Se agregó 1 mL de tripsina (previamente activada)

para el desprendimiento de las células hasta observar un desprendimiento total de la monocapa celular. Inmediatamente después se agregan 2 mL de medio de cultivo para inactivar la tripsina y se realiza un lavado.

Se agregaron 500  $\mu$ L de PBS+EDTA por 10 minutos y se realizó un raspado con un gendarme para resuspender la monocapa de las células tumorales. Se observó continuamente en el microscopio invertido para asegurar el máximo desprendimiento de las células desde la superficie de los frascos. Se obtuvo el total del volumen en un tubo y se centrifugó a 2000 rpm durante 7 minutos a temperatura ambiente.

## **METODOLOGÍA PARA DESARROLLAR LAS ETAPAS 2-5**

Incubación celular. Una vez llevada a cabo la etapa de los cultivos y que se procedió a obtener las células por centrifugación de los medios de cultivo, éstas se resuspendieron y se cuantificó el número de células y la viabilidad. Se agregaron un millón de células por placa y se incubaron durante 24, 48 y 72 horas.

Marcaje con el anticuerpo. Después de transcurrido el tiempo se agregaron 300  $\mu$ L de medio de cultivo a cada uno de los paquetes celulares. Después, se agregaron 100  $\mu$ L de la suspensión celular a cada tubo de citometría y se les agregaron 10  $\mu$ L del isotipo y del anticuerpo a los tubos correspondientes. Los tubos se incubaron durante treinta minutos a temperatura ambiente protegidos de la luz.

Para la compensación de colores y el marcaje de MICA/B en las células de las diferentes líneas, se procedió a seguir el acomodo de los tubos como se describe en el Cuadro II.

**Cuadro II.** Diferentes condiciones para la compensación de colores y marcaje de MICA/B en las diferentes líneas celulares (\*PE-ficoeritina).

TIEMPO	TUBO	CÉLULAS UTILIZADAS (Hela, SiHa, CaSki, SW756, C-33 y HaCaT)	FLUOROCROMO
24HRS	1	Células	---
	2	Isotipo IgG1	*PE
	3	Anticuerpo anti-MICA/B para humano	PE
48HRS	1	Células	---
	2	Isotipo IgG1	PE
	3	Anticuerpo anti-MICA/B para humano	PE
72HRS	1	Células	---
	2	Isotipo IgG1	PE
	3	Anticuerpo anti-MICA/B para humano	PE

Se realizó un lavado con 1 mL de PBS centrifugando a 2000 rpm por 7 minutos. Después, a cada tubo se le agregaron 500  $\mu$ L de solución fijadora (formaldehído al 0.05% preparado en PBS) y se mantuvieron a 4°C protegidos de la luz hasta su lectura en el citómetro de flujo (se utilizó un citómetro Epics XL-MCL, Beckman

Coulter). Es importante señalar que la lectura de las muestras en el citómetro se realizó dentro de los tres días posteriores al procesamiento de las mismas, por lo cual no hubo pérdida de la intensidad de fluorescencia.

Una vez obtenidos los resultados en el citómetro, éstos se expresaron como porcentajes de células positivas, así como también se obtuvieron los valores de la intensidad media de fluorescencia usando un software especial para el análisis de los datos obtenidos (winMD).

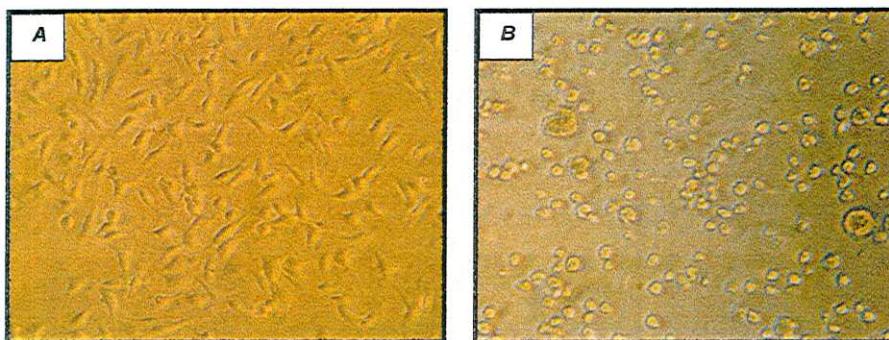
## RESULTADOS

### *Resultados de la etapa 1 (cultivos celulares)*

Para el establecimiento de los cultivos con las diferentes líneas celulares se procedió al descongelamiento gradual de las mismas y a su estabilización en el medio de cultivo. En primer término se intentó realizar el cultivo con cada línea en una placa de cultivo de 6 pozos y después desprender las células por un procedimiento mecánico, mediante un raspado con un gendarme. Sin embargo, esto dio como resultado una cantidad celular muy baja, insuficiente para hacer la detección de MICA/B. Por lo anterior se procedió a realizar los cultivos en frascos, ya que éstos presentan un área de superficie más amplia. Además, se agregó PBS con una concentración baja de tripsina (a: 0.25%) para obtener la mayor cantidad de células posibles y al mismo tiempo, evitar el riesgo de pérdida en la expresión de MICA/B debido a un procesamiento proteolítico. Así, aun cuando ya se ha demostrado que tripsina no corta a la molécula MICA, nosotros también observamos que efectivamente no hubo pérdida en la expresión de estas moléculas; de este modo pudimos obtener una cantidad suficiente de células para todos nuestros ensayos de detección de MICA/B.

Durante la etapa de crecimiento de los cultivos se observaron marcadas diferencias entre las distintas líneas celulares. Principalmente hubo diferencias en cuanto al tiempo de alcanzar la confluencia esperada, siendo HeLa la línea celular que presenta una confluencia cercana al 100% en un corto lapso de tiempo

(Figura 5A). Por su parte, CaSki presentó una confluencia cercana al 100% en un mayor lapso de tiempo; además, la morfología observada al microscopio mostró severas alteraciones; esto es, células pequeñas con dificultad para adherirse al fondo de los frascos de cultivo (Figura 5B), por lo que se observó una gran cantidad de células flotantes en el medio.



**Figura 5.** Imágenes microscópicas del crecimiento de dos diferentes líneas celulares. A. Línea celular HeLa, quien mostró una confluencia rápida del 100%; las células se muestran adheridas al fondo del frasco, sin problemas de crecimiento y con buena viabilidad (97-99%). Adicionalmente, se menciona que no se tuvo contaminación de ningún tipo. B. Línea celular CaSki, quien presentó un crecimiento muy lento por lo que su manejo se torna difícil. Líneas celulares observadas en microscopio invertido con un aumento 20X.

### **Resultados de las etapas 2-5 (detección de MICA/B)**

Diversos estudios en tumores de origen epitelial han reportado la expresión de moléculas MICA, MICB y las proteínas ULBPs; todas ellas son reconocidas por el receptor de activación NKG2D iniciando así una respuesta antitumoral efectiva mediada por células NK y linfocitos T.

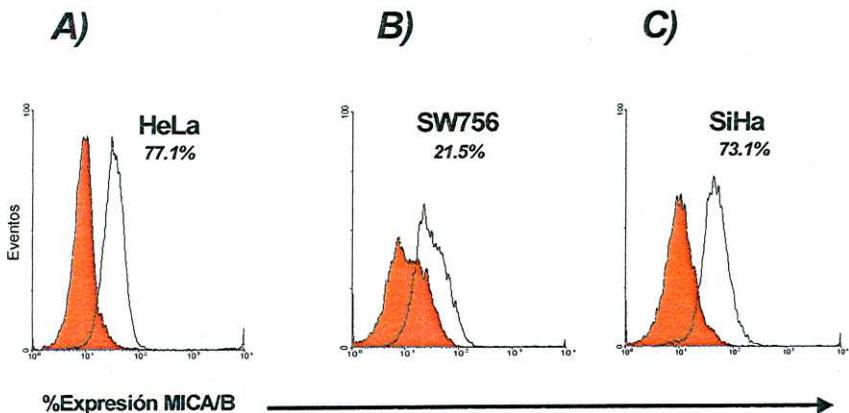
Actualmente, en nuestro laboratorio se están realizando investigaciones donde se busca la expresión de MICA/B en pacientes con cáncer cérvico-uterino y lesiones

precursoras. Por esta razón, el presente trabajo con las distintas líneas celulares donde se buscó la expresión de los ligandos de mayor afinidad (MICA/B) para NKG2D, fue un estudio piloto que arrojó resultados que nos ayudarán a interpretar y buscar un significado biológico de los resultados obtenidos hasta el momento con las pacientes.

Las líneas celulares empleadas en nuestro estudio han sido previamente derivadas de carcinomas cervicales (según se muestra con más detalles en el cuadro I), a excepción de la línea HaCaT, la cual fue derivada de piel. La finalidad de usar esta línea fue precisamente la de emplearla como un control negativo, ya que por sus características, esta línea a pesar de estar inmortalizada se considera con un comportamiento similar al de queratinocitos normales. También se buscó que las líneas celulares presentaran diferentes características en cuanto al tipo y número de copias de VPH que poseen. Adicionalmente, se eligió una línea de cáncer cervical negativa a la presencia de cualquier tipo de VPH; en su lugar, esta línea ha sufrido una mutación en el gen p53 (Cuadro I). Por todo esto, se pretendió describir la expresión de MICA/B en las líneas mencionadas y ver si las diferentes características entre todas ellas pudieron influir sobre la expresión de estas moléculas.

El porcentaje de expresión de MICA/B se evaluó por medio de citometría de flujo (según se describió en metodología). Los resultados obtenidos muestran que el porcentaje de células positivas a MICA/B es diferente según la línea celular analizada. En el caso de las líneas HeLa, SW756 y SiHa, estas presentan un

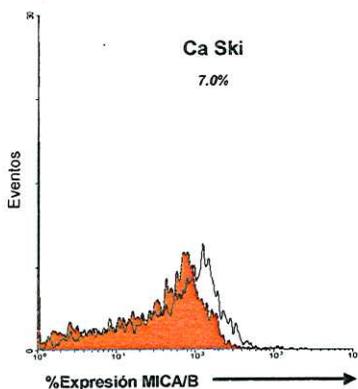
número bajo de copias del VPH. Los porcentajes obtenidos son como siguen: HeLa un 77.1%, SW756 un 21.5% y SiHa mostró el 73.1%. De manera interesante se encontró que aun cuando HeLa y SW756 tienen el mismo tipo de virus y mismo número de copias (ver Cuadro I), el porcentaje de expresión fue completamente diferente entre ambas líneas analizadas según puede apreciarse en la Figura 6.



**Figura 6.** Histogramas representativos de líneas celulares derivadas de tumores originados en el cérvix. El número mostrado representa el porcentaje de células que expresan MICA/B. **A)** HeLa, 20-50 copias (por células) de VPH-18; **B)** SW756, 20-50 copias (por célula) de VPH-18; **C)** SiHa, 1-2 copias (por célula) de VPH-16. Sin relleno se muestra el control de isotipo, en rojo es MICA/B.

Los resultados anteriores nos muestran que más de la mitad de células HeLa y SiHa expresan MICA/B en la superficie celular y aun cuando en células SW756 se observa una marcada reducción en el número de células positivas, este porcentaje disminuyó de manera aun más dramática en células con un alto número de copias del VPH como lo es la línea CaSki que presenta hasta 600 copias (por célula) de VPH-16. En esta línea celular, nosotros observamos que el porcentaje de células expresando MICA/B disminuyó hasta un 7% (Figura 7). Es interesante señalar que

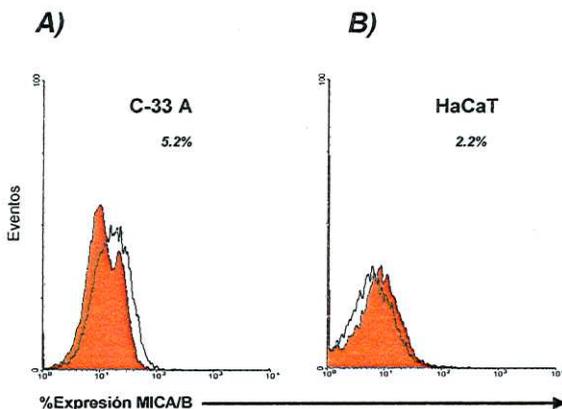
la medición se realizó a diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas), esto con la finalidad de ver si MICA/B pudo ser expresada en función del tiempo. Sin embargo, a pesar de haber crecido a las células CaSki hasta por 72 horas, no fue posible observar alguna expresión considerable de MICA/B en la superficie.



**Figura 7.** Histograma representativo de la línea celular CaSki derivada de una metástasis a intestino delgado (origen primario del tumor en cérvix). El número mostrado representa el porcentaje de células que expresan MICA/B. Sin relleno se muestra el control de isotipo, en rojo es MICA/B.

Las línea celular transformada pero negativa a VPH, es decir la línea C-33 presentó un porcentaje de expresión prácticamente nulo (C-33). Este mismo resultado fue también observado en la línea celular inmortalizada HaCaT, la cual mostró un porcentaje del 2.2%, según se aprecia en la Figura 8. Hay que recordar que la línea HaCaT se considera prácticamente normal; por lo que la expresión carente de MICA/B concuerda con lo señalado de que estas moléculas no se expresan en queratinocitos normales. Todos estos resultados también respaldan la técnica llevada a cabo; es decir, la funcionalidad del anticuerpo que se utilizó, el adecuado manejo metodológico del marcaje con anticuerpos anti MICA/B y sus

correspondientes controles de isotipo y finalmente, nos permitió ver en la mayoría de las líneas tumorales analizadas, que las moléculas MICA/B son expresadas como señal de daño.

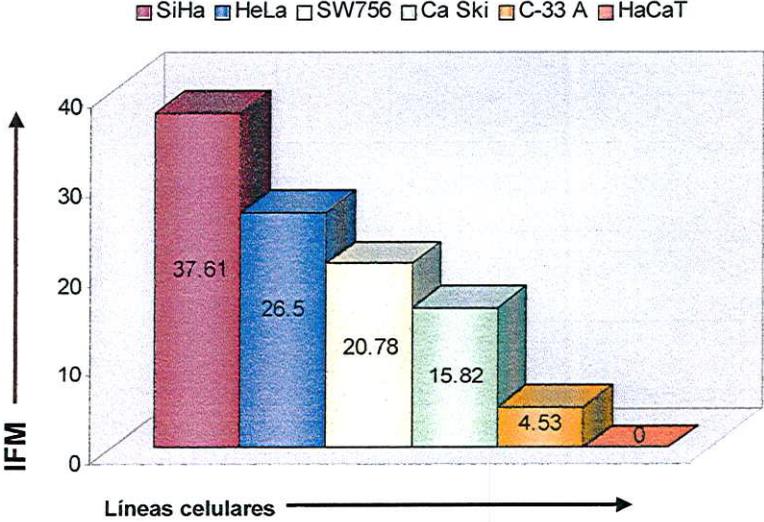


**Figura 8.** Histogramas representativos de la expresión de MICA/B en líneas celulares negativas a VPH. El número mostrado representa el porcentaje de células que expresan MICA/B. **A)** Línea tumoral C-33 sin copias de VPH, pero muestra mutación en el gen p53; **B)** Línea celular HaCaT (queratinocitos inmortalizados). Sin relleno se muestra el control de isotipo, en rojo es MICA/B.

Todos los datos anteriores nos muestran el número de células que expresan ligandos MICA/B; sin embargo, a pesar de que una célula resulte positiva a la expresión de un marcador, la densidad de los mismos puede variar, por lo que simultáneamente, también se realizó el cálculo de la intensidad de fluorescencia media (IFM) en cada una de las líneas celulares estudiadas.

Los resultados de este análisis muestran un comportamiento similar al obtenido cuando se evaluó el porcentaje de células positivas a MICA/B; es decir, las líneas con pocas copias de VPH como SiHa, HeLa y en menor grado SW756, presentan

un valor elevado de IFM: 37.61, 26.5, 20.78, respectivamente. Como se esperó, lo contrario ocurrió con la línea CaSki, donde el valor disminuye a 15.82 y es aun más pronunciado este descenso en la línea negativa a VPH (C-33), donde se obtuvo un valor de 4.53 y para HaCaT la intensidad de fluorescencia fue totalmente nula. Todos estos resultados se pueden apreciar de una manera más detallada en la Figura 9.



**Figura 9.** Valor de intensidad de fluorescencia media (IFM) en la densidad de expresión de ligandos MICA/B en la superficie celular de cada una de las diferentes líneas celulares. Cada barra representa una línea celular, la cual se indica con diferente color.

## DISCUSIÓN

La evolución biológica garantiza que diversos mecanismos de seguridad estén continuamente presentes para prevenir fallas en los procesos celulares de importancia crítica para la vida. Esta aseercción aplica para aquellos procesos destinados a prevenir el desarrollo del cáncer. Investigaciones recientes sugieren que una de las respuestas más temprana al daño ocasionado al DNA involucra dos mecanismos independientes de vigilancia antitumoral. El primero de ellos es la activación de la molécula pro-apoptótica p53, con el subsecuente suicidio celular; el segundo mecanismo reportado es la inducción de la expresión de ligandos para el receptor de activación NKG2D (Gasser 2005; Hoglund 2006).

En este estudio piloto (el cual forma parte de un estudio integral que actualmente se lleva a cabo en nuestro laboratorio) nosotros hemos descrito de una manera sistemática, la expresión de algunos ligandos para el inmuno-receptor NKG2D en cinco líneas celulares derivadas todas ellas de cáncer del cérvix; así mismo incluimos a la línea celular HaCaT, considerada tener un comportamiento similar a queratinocitos normales. Entre los ligandos estudiados, nosotros incluimos a las moléculas MICA/B localizadas en la región del MHC-I, pero a diferencia de las moléculas clásicas (HLA-A, -B y -C), MICA/B exhiben un patrón fisiológico altamente restringido a epitelio gastrointestinal (Groh 1996). Sin embargo, estas moléculas son ampliamente expresadas durante la transformación maligna, como ya se ha descrito en diversos tumores (Groh 1999; Jinushi 2003; Watson 2006).

En virtud de que en cáncer cérvico-uterino se tiene bien reconocido que ocurre una pérdida parcial o completa en la expresión de moléculas clase I (Connor 1990), esto en teoría, significaría que estas células deberían ser un blanco adecuado para ser destruidas por células NK. De allí la razón por la cual fue importante evaluar en una gama diversa de líneas derivadas de cáncer cérvico-uterino la expresión de ligandos reconocidos por éstas células inmunes.

Los resultados de los cultivos confirmaron las características de crecimiento previamente reportadas para las distintas líneas que estudiamos. Esto es, todas ellas presentaron propiedades de crecimiento adherentes y con morfología epitelial. En el caso particular de la línea celular CaSki, ésta mostró poca capacidad adherente; sin embargo, esto fue más bien debido a que la viabilidad de las células después de descongelarlas no fue mayor de un 80%, por lo cual una cantidad considerable de células fue población no viable. Esta dificultad para crecer puede ser en parte explicada por la alta carga viral presente en las células de la línea CaSki. De hecho, un estudio de clonación y análisis de integración del DNA de VPH-16 mostró que estas células contienen más de 600 copias del genoma viral con transcripción limitada predominantemente a los ORFs (del inglés "*open reading fragments*") E6 y E7 (estos dos genes codifican para las oncoproteínas responsables del fenotipo maligno) (Yee 1985; Baker 1987).

En el caso de la línea celular HaCaT derivada de una biopsia de piel, ésta fue transformada de manera espontánea por pasajes repetidos (se generó en el Centro Alemán de Investigación en Cáncer en Heidelberg, Alemania). Sin

embargo, por sus características de crecimiento se considera como una línea con características similares a un queratinocito normal. Por lo mismo, con las células HaCaT pudimos demostrar que MICA/B no estuvo presente en la superficie celular. Estos resultados concuerdan con los de Zwirner *et al.*, quienes usando un panel con distintas células (fibroblastos, células endoteliales, monocitos y queratinocitos) reportaron ausencia de MICA en queratinocitos (Zwirner 1999). Así, se confirma que estas moléculas al menos en teoría, no se expresan en células sanas, sino que más bien, su expresión es inducida después de un daño celular, tal como ocurriría durante el desarrollo de tumores o tras una infección viral. Por lo cual, será importante diseñar experimentos donde se planee la transfección de células HaCaT con las oncoproteínas E6 y E7 (y posiblemente E5) y ver si las mismas (las cuales son responsables del fenotipo maligno en el epitelio cervical de lesiones de cáncer), pueden inducir la expresión ya sea de MICA o de MICB en la superficie celular. Esto ayudará en parte a entender el control de la expresión de MICA/B, debido a que el panorama de expresión de estos ligandos pudiera ser más complicado que sólo una simple respuesta a la transformación maligna.

Con los datos anteriores, esperábamos tener una alta expresión de MICA/B en células CaSki, sin embargo, sorprendentemente encontramos que tanto el porcentaje de células expresando MICA/B, así como la intensidad de fluorescencia media fueron relativamente nulos. Nosotros especulamos que la alta carga viral que poseen estas células, pudiera en parte ser responsable de la ausencia de señales de daño en la superficie celular. Al respecto, se ha demostrado que

proteínas virales del citomegalovirus humano (CMVH) son capaces de retener algunos ligandos de NKG2D incluidos MICA y MICB. Por ejemplo, la proteína UL16 de CMVH selectivamente retiene en retículo endoplásmico a miembros de la familia de ligandos ULBPs (reconocidos también por NKG2D) y a MICB (Welte 2003; Spreu 2006). Así mismo, un estudio también reciente mostró que el producto viral UL142 de CMVH es capaz de alterar la expresión en superficie de una forma completa de MICA, confiriendo a la célula infectada, la capacidad para evadir al ataque citotóxico mediado por las células NK (Chalupny 2006). Es interesante el hecho de que UL142 no altera la expresión de un alelo truncado de MICA (cabe señalar que al momento se han descrito más de 50 polimorfismos para MICA), por lo que se especula que desde el punto de vista evolutivo, este alelo podría haber sido seleccionado para resistir a los mecanismos de evasión utilizados por CMVH. Hasta el momento, los estudios de polimorfismos en los genes MIC se han enfocado principalmente a las diferencias encontradas en el dominio extracelular, lo cual pudiera afectar la afinidad de unión a NKG2D (Steinle 2001). Sin embargo, será importante estudiar polimorfismos en la región promotora y demostrar si esto, pudiera tener consecuencias biológicas en cuanto a los niveles de expresión de MICA/B, al cambiar la afinidad o especificidad de unión de factores de la transcripción o alterando la cinética del inicio de la transcripción en tejidos derivados de diferentes individuos

Los hallazgos anteriores nos conducen a realizar nuevas investigaciones para tratar de elucidar si realmente proteínas de VPH tienen la capacidad de asociarse con MICA/B y de este modo retenerlas en el interior celular o si es una variante de

MICA/B con mayor predisposición a dejar de expresarse en la superficie celular. Al respecto, en nuestras investigaciones futuras se tiene contemplado el estudio de polimorfismos de MICA en pacientes con cáncer cérvico-uterino.

Un hallazgo también interesante fue el hecho de no encontrar MICA/B en la superficie de las células C-33. Hay que señalar que esta línea no posee DNA de HPV; pero en su lugar es una línea que carece de p53. Es difícil explicar este hallazgo, en virtud de que aun no se conoce con precisión los mecanismos moleculares que regulan la expresión de MICA y menos aun aquellos que intervienen en la expresión de MICB. Sin embargo, es interesante notar que C-33 al igual que CaSki, tuvieron una expresión prácticamente nula de ligandos. Así, estimando la alta carga viral encontrada en CaSki, es plausible especular que si efectivamente hay un alto número de proteínas E6 funcionales, esto estaría entonces inactivando de manera importante a p53, y si realmente esta proteína (la cual como sabemos se expresa de manera temprana tras un daño ocasionado al DNA) asiste la regulación de ligandos de NKG2D, explicaría entonces el comportamiento similar entre C-33 (sin p53 funcional debido a una mutación) y CaSki con alta carga viral que podría estar inactivando a este gen supresor de tumor. Para demostrar esta hipótesis, tendrán que diseñarse experimentos que logren elucidar la cascada molecular involucrada en la inducción de señales de estrés celular.

Todos los datos en conjunto, nos sugieren que aun cuando trabajamos con líneas derivadas de tejido cervical, el comportamiento en la expresión de MICA/B fue

diferente según la línea analizada. La definición de la regulación de ligandos de NKG2D podrá tener implicaciones para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que logren revertir la inmunosupresión observada en pacientes con cáncer.

## CONCLUSIONES

1. Los resultados muestran que líneas celulares derivadas de cáncer cérvico-uterino con bajo número de copias de VPH-16 o -18 (SiHa y HeLa) muestran un importante nivel de expresión de ligandos MICA/B en la superficie celular.
2. Células con alto número de copias de VPH (como lo fue CaSki) muestran defectos en la expresión de MICA/B.
3. Células sin p53 funcional debido a una mutación (C-33) son negativas a la expresión de MICA/B.
4. Se confirma la no expresión de señales de daño (MICA/B) en células consideradas como normales (HaCaT).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, Abul, Andreaw H. Lichtman y Jordan S. Pober. *Inmunología celular y molecular*. McGraw Hill. Interamericana. 4ª edición. 2002.
- Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, Spies T. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, **91**:6259-6263.
- Baker CC, Phelps WC, Lindgren V, Braun MJ, Gonda MA, Howley PM. Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Virol* 1987, **61**:962-71.
- Base de datos. Secretaría de Salud México. <http://www.salud.gob.mx>. Noviembre 2006.
- Bermudez A. Can we do the same in the developing world? *Gynecol Oncol* 2005, **99**:S192-6.
- Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002, **55**:244-65.
- Brummer O, Hollwitz B, Bohmer G, Kuhnle H, Petry KU. Human papillomavirus-type persistence patterns predict the clinical outcome of cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol* 2006.
- Carbone E, Neri P, Mesuraca M, Fulciniti MT, Otsuki T, Pende D, Groh V, Spies T, Pollio G, Cosman D, Catalano L, Tassone P, Rotoli B, Venuta S. HLA class I, NKG2D and Natural Cytotoxicity Receptors regulate Multiple Myeloma cell recognition by Natural Killer cells. *Blood* 2004,**04**:1422.
- Chakrabarti O, Krishna S. Molecular interactions of "high risk" human papillomaviruses E6 and E7 oncoproteins: implications for tumour progression. *J Biosci* 2003, **28**:337-348.
- Chalupny NJ, Rein-Weston A, Dosch S, Cosman D. Down-regulation of the NKG2D ligand MICA by the human cytomegalovirus glycoprotein UL142. *Biochem Biophys Res Comm* 2006, **346**:175-81.
- Connor ME, Stern PL. Loss of MHC class-I expression in cervical carcinomas. *Int J Cancer* 1990, **46**:1029-34.
- Doubrovina E, Doubrovin M, Vider E, Sisson R, O'Reilly R, Dupont B, Vyas Y. Evasion from NK Cell Immunity by MHC Class I Chain-Related Molecules Expressing Colon Adenocarcinoma. *J Immunol* 2003, **171**:6891-6899.
- Franco E, Duarte-Franco E, Ferenczy A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *CMAJ*, 2001. **164**:1017-1025.
- Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM, Rousseau MC, Desy M, Rohan TE. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis* 1999, **180**:1415-23.

- Frazier ML, O'Donnell FT, Kong S, Gu X, Campos I, Luthra R, Lynch PM, Amos CI. Age-associated risk of cancer among individuals with N-acetyltransferase 2 (NAT2) mutations and mutations in DNA mismatch repair genes. *Cancer Res* 2001, **61**:1269-71.
- Gasser S, Orsulic S, Brown EJ, Raulet DH. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature* 2005, **436**:1186-90.
- Giuliano AR, Harris R, Sedjo RL, Baldwin S, Roe D, Papenfuss MR, Abrahamsen M, Insera P, Olvera S, Hatch K. Incidence, prevalence, and clearance of type-specific human papillomavirus infections: The Young Women's Health Study. *J Infect Dis* 2002, **186**:462-9.
- Glienke J, Sobanov Y, Brostjan C, Steffens C, Nguyen C, Lehrach H, Hofer E, Francis F. The genomic organization of NKG2C, E, F, and D receptor genes in the human natural killer gene complex. *Immunogenetics* 1998, **48**:163-73.
- Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M, Spies T. Cell estrés-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**:12445-50.
- Groh V, Rhinehart R, Secrist H, Bauer S, Grabstein KH, Spies T. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**:6879-84.
- Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 2002, **419**:734-738.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000, **100**:57-70.
- Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, Schiller JT. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J* 1989, **8**:3905-10.
- Hillemanns P., Ellerbrock TV, McPhillips S, Doie P, Alperstein S, Johnson D, Sun XW, Chiasson MA, Wright TC Jr. Prevalence of anal human papillomavirus infection and anal cytologic abnormalities in HIV-seropositive women. *AIDS* 1996, **10**:1641-7.
- Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998, **338**: 423-8
- Hoglund P. DNA damage and tumor surveillance: one trigger for two pathways. *Sci STKE* 2006, **2006**:pe2.
- Holdenrieder S, Stieber P, Peterfi A, Nagel D, Steinle A, Salih HR. Soluble MICA in malignant diseases. *Int J Cancer* 2006, **118**:684-7.
- Holdenrieder S, Stieber P, Peterfi A, Nagel D, Steinle A, Salih HR. Soluble MICB in malignant diseases: analysis of diagnostic significance and correlation with soluble MICA. *Cancer Immunol Immunother.* 2006 Dec;**55**(12):1584-9.
- Horton R, Wilming L, Rand V, Lovering RC, Bruford EA, Khodiyar VK, Lush MJ, Povey S, Talbot CC Jr, Wright MW, Wain HM, Trowsdale J, Ziegler A, Beck S. Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev Genet.* 2004, **5**:889-99.

- Igawa S, Hayashi I, Tanaka N, Hiruma H, Majima M, Kawakami T, Hirose M, Masuda N, Kobayashi H. Nitric oxide generated by iNOS reduces deformability of Lewis lung carcinoma cells. *Cancer Sci* 2004, **95**:342-347.
- Jackson PG, Evans SR. Intraperitoneal Macrophages and Tumor Immunity. *J Surg Oncol* 2000, **75**:146-154.
- Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Kanto T, Groh V, Spies T, Kimura R, Miyagi T, Mochizuki K, Sasaki Y, Hayashi N. . Expression and role of MICA and MICB in human hepatocellular carcinomas and their regulation by retinoic acid. *Int J Cancer* 2003, **104**:354-61.
- Kufe, Donald W.; Pollock, Raphael E.; Weichselbaum, Ralph R.; Bast, Robert C., Jr.; Gansler, Ted S.; Holland, James F.; Frei III. Emil, editors. 2003, 6th edition.
- Mota F, Rayment N, Chong S, Singer A, Chain B. The antigen-presenting environment in normal and human papillomavirus (HPV)-related premalignant cervical epithelium. *Clin Exp Immunol* 1999, **116**: 33-40.
- Muñoz N, Bosch FX, de San José S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJF, Meijer ChJLM. Epidemiologic classification oh human paillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Méd* 2003, **348**:518-527.
- Muñoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol* 2000, **19**:1-5.
- Pang T, Hu X, Mazurenko N, Kisseljev F, Pontén J. Múltiple variants of HPV16 E6 gene in cervical invasive squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2002, **22**:1011-1016.
- Pende D, Rivera P, Marcenaro S, Chang CC, Biassoni R, Conte R, Kubin M, Cosman D, Ferrone S, Moretta L, Moretta A. Major histocompatibility complex class I-related chain A and UL16-binding protein expression on tumor cell lines of different histotypes: analysis of tumor susceptibility to NKG2D-dependent natural killer cell cytotoxicity. *Cancer Res* 2002, **62**:6178-6186.
- Pillai M. R., P. Balaram, Pillai MR, Balaram P, Abraham T, Padmanabhan TK, Nair MK. Natural cytotoxicity and serum blocking in malignant cervical neoplasia. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1988, **16**:159-62.
- Richardson H, Abrahamowicz M, Tellier PP, Keisall G, du Berger R, Ferenczy A, Coutiee F, Franco EL. Modifiable risk factors associated with clearance of type-specific cervical human papillomavirus infections in a cohort of university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005, **14**:1149-56.
- Salih HR, Antropius H, Gieseke F, Lutz SZ, Kanz L, Rammensee HG, Steinle A. Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood* 2003, **102**:1389-96.
- Schwartz SJr, Yamamoto H, Navarro M, Maestro M, Reventos J, Perucho M. Frameshift mutations at mononucleotide repeats in caspase-5 and other target genes in endometrial and gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Cancer Res* 1999, **15**:2995:3002.

- Seliger B, Abken H, Ferrone S. HLA-G and MIC expression in tumors and their role in anti-tumor immunity. *Trends Immunol* 2003, **24**:82-87.
- Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SE, Yagita H, Takeda K, van Dommelen SL, Degli-Esposti MA, Hayakawa Y. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol* 2005, **42**:501-10.
- Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SE, Yagita H, Takeda K, van Dommelen SL, Degli-Esposti MA, Hayakawa Y. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol* 2005; **42**:501-10.
- Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nature Immunol* 2001, **2**:293-299.
- Snijders PJ, Steenbergen RD, Heideman DA, Meijer CJ. HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications. *J Pathol* 2006, **208**:152-64.
- Spreu J, Stehle T, Steinle A. Human cytomegalovirus-encoded UL16 discriminates MIC molecules by their  $\alpha 2$  domains. *J Immunol* 2006, **177**:3143-49.
- Steinle A, Li P, Morris DL, Groh V, Lanier LL, Strong RK, Spies T. Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics* 2001, **53**:279-87.
- Stephens HAF. MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved? *Trends Immunol* 2001, **22**:378-385.
- Strong RK. Asymmetric ligand recognition by the activating natural killer cell receptor NKG2D, a symmetric homodimer. *Mol Immunol* 2001, **38**:1029-1037.
- Tindle RW. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nature Rev Cancer* 2002, **2**:59-64.
- Trinchieri, G. and N. Valiante Receptors for the Fc fragment of IgG on natural killer cells. *Nat Immun* 1993, **12**: 218-34.
- Vetter CS, Groh V, Thor Straten P, Spies T, Brocker EB, Becker JC. Expression of stress-induced MHC class I related chain molecules on human melanoma. *J Invest Dermatol* 2002, **118**:600-5.
- Vivier E, Tomasello E, Paul P. Lymphocyte activation via NKG2D: towards a new paradigm in immune recognition? *Curr Opin Immunol* 2002, **14**:306-311.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 1999 Sep; **189**(1):12-9.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999 **189**:12-9.

- Watson NF, Spendlove I, Madjd Z, McGilvray R, Green AR, Ellis IO, Scholefield JH, Durrant LG. Expression of the estrés-related MHC class I chain-related protein MICA is an indicator of good prognosis in colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 2006, **118**:1445-52.
- Watzl C, Long EO. Exposing tumor cells to killer cell attack. *Nature Med* 2000, **6**:867-868.
- Welte SA, Sinzger C, Lutz SZ, Singh-Jasuja H, Sampaio KL, Eknigk U, Rammensee HG, Steinle A. Selective intracellular retention of virally induced NKG2D ligands by the human cytomegalovirus UL16 glycoprotein. *Eur J Immunol* 2003, **33**:194-203.
- Wu J, Higgins L, Steinle A, Cosman D, Haugk K, Plymate S. Prevalent expression of the immunostimulatory MHC class I chain/related molecule is counteracted by shedding in prostate cancer. *J Clin Invest* 2004, **114**: 560-568.
- Yee C, Krishnan-Hewlett I, Baker CC, Schlegel R, Howley PM. Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *Am. J. Pathol* 1985, **119**:361-366.
- Yokoyama WM. Catch us if you can. *Nature* 2002, **419**:679-680.
- zur Hausen H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1996, **1288**:F55-78.
- Zwirner NW, Dole K, Stastny P. Differential surface expression of MICA by endothelial cells, fibroblasts, keratinocytes, and monocytes. *Hum Immunol* 1999, **60**:323-30.
- Zwirner NW, Fuertes MB, Girart MV, Domaica CI, Rossi LE. Immunobiology of the human MHC class I chain-related gene A (MICA): from transplantation immunology to tumor immune escape. *Inmunología* 2006, **25**:25-38.