

Cáncer cévico-uterino. Influencia de los genes celulares y de los virales.

Implicaciones en el desarrollo de vacunas

Patricio Gariglio*

Resumen

El cáncer humano constituye un importante problema de salud, en particular, el cáncer cévico-uterino es frecuente en países latinoamericanos. Los oncogenes activados (myc y ras, por ejemplo) y los anti-oncogenes (p53 o Rb), al inactivarse participan en los múltiples pasos de la carcinogénesis. Además, algunos virus están asociados con el cáncer humano. Por ejemplo, los papilomavirus humanos (PVH) de alto riesgo están involucrados en carcinoma cévico-uterino. La tipificación del PVH es importante para el diagnóstico y el pronóstico de esta enfermedad. El entendimiento de la bioquímica y de la genética molecular de los genes supresores de tumor, de los oncogenes celulares y de los virus tumorogénicos, abre nuevas posibilidades en el diagnóstico, la vacunación, así como en la terapia del cáncer cévico-uterino.

Palabras clave: Carcinogénesis, PVH, diagnóstico, vacunas, cáncer cévico-uterino, oncogenes.

Summary

Human cancer is a major public health problem, in particular, uterine-cervix carcinoma is frequent in Latin American countries. Activated cellular oncogenes (myc and ras, for example) and inactivated anti-oncogenes (p53 or Rb) participate in multistep carcinogenesis. In addition, some viruses are associated with human cancer. For example, high risk human papillomaviruses (HPV) are involved in uterine-cervix carcinomas. Typification of HPV is important for clinical diagnosis and prognosis of this disease. The understanding of the biochemistry and molecular genetics of tumor suppressor genes, cellular oncogenes and tumor viruses has opened up new possibilities for diagnosis, vaccination and therapy of uterine-cervix carcinoma.

Key words: Carcinogenesis, HPV, diagnosis, vaccines, uterine-cervix carcinoma, oncogenes.

Introducción

El cáncer representa un serio problema de salud. En México ocupa el segundo lugar como causa de muerte de la población. En particular, es frecuente el cáncer cévico-uterino en las mujeres y las leucemias en los niños y en los jóvenes. Con

base en lo anterior, resulta importante entender las bases moleculares del cáncer, diseñar sondas para el diagnóstico y elaborar estrategias para su prevención y terapia.

Por fortuna, los avances recientes de la biología molecular y de la ingeniería genética están permitiendo el aislamiento y la caracterización funcional

* Departamento de Genética y Biología Molecular. Programa de Biomedicina Molecular. CINVESTAV, IPN, México, D.F.
Correspondencia/V solicitude de sobretiros: Av. Instituto Politécnico Nacional No. 2508 Col. San Pedro Zacatenco C.P. 07300 México D.F. Tel. 747-70-00 Ext 5307

de oncogenes y de genes supresores de tumor (anti-oncogenes), los cuales están involucrados en el desarrollo de las distintas neoplasias.

Asimismo, los avances de la virología molecular nos están ayudando a entender tipos de cánceres, tales como el anogenital, en los que intervienen virus tumorales. En este artículo enfatizaremos los aspectos moleculares del cáncer cérvico-uterino y su relación con los papilomavirus humanos (PVH). Es obvio que estos estudios y los relacionados con el sistema inmune deberán tomarse en cuenta en el desarrollo de vacunas preventivas y terapéuticas contra el cáncer genital.

Carcinogénesis en etapas múltiples

El desarrollo del cáncer es un proceso complejo en etapas múltiples. Al parecer en humanos deben alterarse 5 o 6 genes durante el desarrollo de un tumor maligno y otro par de genes durante el proceso de metástasis.

Con el descubrimiento de los oncogenes (y de sus formas normales, los proto-oncogenes) en la década pasada y más recientemente de los genes supresores de tumor, se ha podido explicar el cáncer a nivel molecular. Debido a que los oncogenes representan formas mutadas de genes celulares normales, ellos ofrecen una indicación clara de los blancos genéticos que se alteran por agentes cancerígenos. Los proto-oncogenes desempeñan funciones importantes para el crecimiento celular. Codifican para factores de crecimiento, receptores a dichos factores, transductores de señales y proteínas nucleares que actúan como factores de replicación o de transcripción, activando genes importantes en el crecimiento normal de la célula. Por ejemplo, la proteína c-myc participa en la replicación del genoma celular y es un importante factor de transcripción; la proteína ras actúa en la transducción de señales transmitiéndolas desde receptores a factores de crecimiento ubicados en la superficie celular, al interior de las células después de formar el complejo activado GTP-ras (Figura 1). Cuando los proto-oncogenes se alteran de forma molecular se transforman en oncogenes activados; entre las alteraciones más frecuentes tenemos: la mutación, el rearrreglo genético y la

amplificación; por ejemplo, el gen myc se encuentra amplificado en diversos tumores (es decir, existen varias copias del gen en cada célula); ras está con frecuencia mutado en el codón 12 o 61 y abl se rearrregla para formar el gen híbrido bcr-abl en leucemia mieloide crónica (Figura 2).

La primera indicación de que los oncogenes pueden cooperar en las diferentes etapas del desarrollo de un tumor maligno derivó de los estudios con virus oncogénicos que poseen 2 oncogenes. Se demostró que dichas proteínas oncogénicas virales cooperan para inducir un fenotipo completamente tumorigénico.¹ Esto sugiere que cada

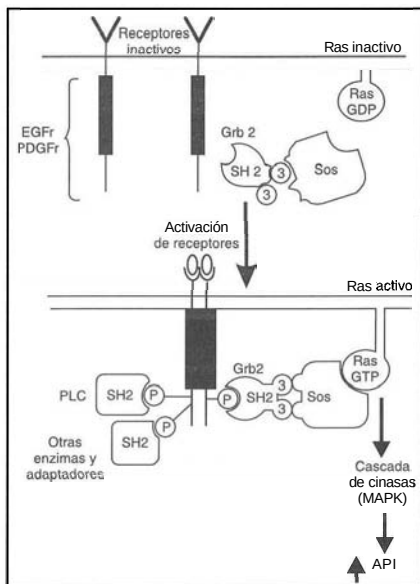


Figura 1. Transducción de señales provenientes de receptores a factores de crecimiento mediados por la proteína proto-oncogenica ras. Diversos receptores a factores involucrados en crecimiento celular (tales como el receptor al factor de crecimiento epitelial EGFr, o el receptor al factor de crecimiento derivado de plaqueta PDGFr) pueden autofosforilarse después de la unión específica con el ligando; la activación de estos receptores lleva a su vez a la unión de proteínas adaptadoras, y por último a la activación de ras, pasando de la forma inactiva ras-GDP a su forma activa ras-GTP. Esta forma es capaz de activar cinasas que envían señales mitogénicas hasta el núcleo celular.

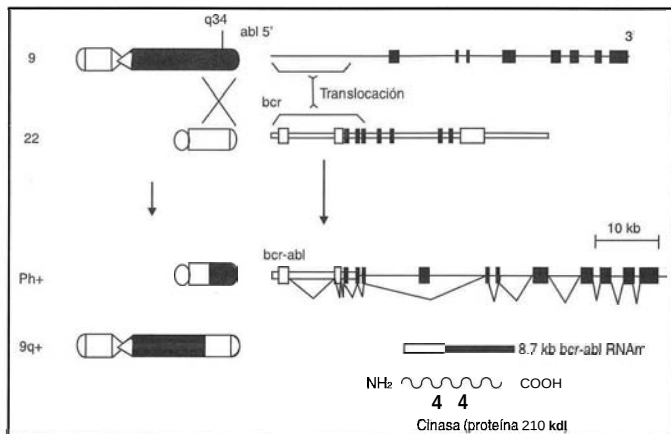


Figura 2. Rearreglo de oncógenos en leucemia mieloide crónica. El cromosoma Filadelfia (Ph+) es un marcador citogenético que permite reconocer a la leucemia mieloide crónica de otras leucemias. Esta translocación cromosómica recíproca (entre los cromosomas 9 y 22) se acompaña de una rotura en el extremo 5' del proto-oncogén *abl* y formación del gen híbrido *bcr-abl*. La proteína híbrida resultante tiene una actividad catalítica muy elevada que puede llevar a la transformación celular.

oncogén se especializa para inducir una parte de los fenotipos requeridos en la transformación maligna total. Este concepto fue luego extendido a un buen número de los oncogenes de origen celular. Así, ni el oncogén *ras* ni el *myc*, por separado, son capaces de inducir una transformación completa, en tanto que los dos oncogenes juntos pueden alcanzar dicho resultado² (Figura 3). Los genes que funcionan como *ras* (colaborando con *myc*) codifican proteínas citoplasmáticas, en tanto que aquellos que funcionan como *myc* (colaborando con *ras*) codifican proteínas nucleares. Esto sugiere que una parte del desarrollo del proceso maligno tiene que ver con fenómenos que ocurren en el citoplasma y otra parte con sucesos nucleares.

El descubrimiento de la colaboración entre oncogenes ayuda a entender el mecanismo de la carcinogénesis en etapas múltiples. Basándonos en dicha colaboración, debemos pensar que cada paso en el proceso de tumorigénesis refleja una mutación que lleva a la activación de uno u otro oncogén celular.

Por otro lado, la existencia de genes que regulan de forma negativa el crecimiento celular, está apoyada por una extensa literatura en la que se descri-

ben las consecuencias de la fusión entre células normales y tumorales;³ con frecuencia la célula híbrida pierde el carácter tumoral, sugiriendo que a la célula neoplásica le falta un gen regulador del crecimiento y que es posible recuperar dicho control al fusionarla con una célula normal. Estos genes que regulan de manera negativa el crecimiento celular se llaman genes supresores de tumor o anti-oncogenes. Uno de los anti-oncogenes más estudiados es el gen retinoblastoma (*Rb*); la pérdida o inactivación de *Rb* predispone al desarrollo de retinoblastoma y osteosarcomas. La proteína retinoblastoma (*p105-Rb*) es uno de los blancos celulares de la proteína oncogénica viral E1A, codificada por adenovirus humanos tumorales.⁴ La asociación de E1A con *p105-Rb* no es casual, pues las mutaciones que inactivan la actividad transformante de E1A también inhiben la unión e inactivación de *p105-Rb*. Otros complejos similares a *pRb:E1A* se han descubierto recientemente (Figura 4). Estos se forman entre *p105-Rb* y el antígeno T grande de SV40 (LT SV40), o bien, entre *p105-Rb* y el producto del oncogén E7 de los PVH tipo 16 o tipo 18, considerados de alto riesgo en

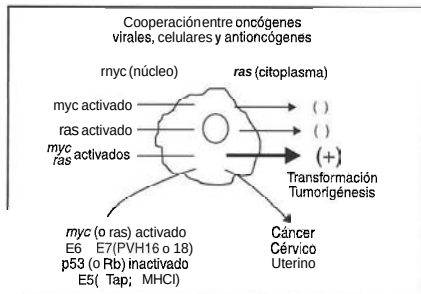


Figura 3 Cooperación de oncogenes. La transformación celular requiere la cooperación de al menos dos oncogenes activados, de diferente familia (uno nuclear representado por *myc* y uno citoplasmático representado por *ras*). Algunos virus tumorales (como PVH) tienen 2 oncogenes, E6 y E7 en el caso de PVH, que cooperan en la transformación de queratinocitos humanos. Otro gen que coopera con los anteriores es E5, al no haber importantes transformaciones del sistema inmune celular. La ausencia o inactivación de antioncogenes coopera en transformación maligna.

cáncer cervical⁵. En todos los casos las oncoproteínas virales inactivan a p105-Rb, lo cual favorece la disociación del factor transcripcional E2F del complejo p105-Rb: E2F y el crecimiento descontrolado de las células (Figura 4). Las interacciones de estas 3 proteínas oncogénicas virales (E1A, LT SV40, E7) con una proteína celular común (p105-Rb), sugiere que existe una proteína celular, posiblemente *myc*⁶, que también forma complejos con p105-Rb.

Otro anti-oncogén importante es p53. Estudios epidemiológicos han indicado que un 50-60% de los tumores malignos posee mutaciones en p53; es decir, este es el gen que se encuentra más frecuentemente mutado en cáncer humano (Figura 5).⁷ Las mutaciones en el gen p53 se reflejan en una proteína con vida media larga que se acumula en la célula y que inactiva a la proteína p53 codificada por el alelo silvestre al parecer formando complejos multiméricos inactivos con ella. La proteína oncogénica E6 de los PVH de alto riesgo forma un complejo con p53⁸ y destruye rápidamente a esta proteína anti-oncogénica;⁹ es posible que el efecto oncogénico de los PVH resulte, en parte, de este tipo de interacciones. En otras palabras, la inactivación de p105-Rb por E7 y de p53 por E6 constituyen etapas importantes en el desarrollo del cáncer genital.

En líneas celulares que no poseen PVH, se encuentra un nivel relativamente elevado de la proteína p53 y el anti-oncogén está mutado.¹⁰ Por el contrario, en líneas celulares que tienen PVH el nivel de la proteína p53 es bajo y el gen no está mutado. Algo similar ocurre con el gen y la proteína pRb; están normales en líneas positivas para PVH detectándose proteína pRb fosforilada e hipofosforilada de tamaño normal. Sin embargo, en líneas celulares negativas para PVH, se encuentran mutaciones en la proteína codificada por el anti-oncogén Rb que afectan su fosforilación, posición nuclear e interacción con proteínas oncogénicas virales. Lo anterior apoya la hipótesis que sugiere que las funciones normales de p53 y pRb son bloqueadas durante el desarrollo del cáncer cérvico-uterino, ya sea por mutaciones en dichos anti-oncogenes o por interacción de las proteínas anti-oncogénicas con las proteínas E6 y E7 de los PVH de alto riesgo, respectivamente. También apoya la hipótesis del desarrollo del cáncer humano en etapas múltiples, involucrando a oncogenes y anti-oncogenes.

No existe ninguna duda de que la activación de los oncogenes y la inactivación de los anti-oncogenes representa una parte importante para entender el mecanismo molecular del cáncer humano y para encontrar nuevas formas de diagnóstico, prevención y terapia de esta enfermedad.

Virus y cáncer humano

Algunos virus pueden contribuir al desarrollo de tumores humanos usando diferentes mecanismos que van desde la estimulación de la proliferación celular hasta inmunosupresión.

El virus de Epstein-Barr, de la hepatitis B, varios tipos de PVH y el virus de la leucemia humana de células T, se asocian congruentemente a cánceres específicos.¹¹ Sin embargo, la infección con estos virus no es suficiente para inducir neoplasia. Los largos períodos de latencia (varias décadas) entre la infección y el desarrollo de un carcinoma, así como el bajo número de individuos infectados que desarrollan cáncer, sugieren que se necesitan otros factores para que se origine un tumor maligno después de la infección viral.

En cáncer genital, las alteraciones de los oncogenes celulares y los anti-oncogenes, así como

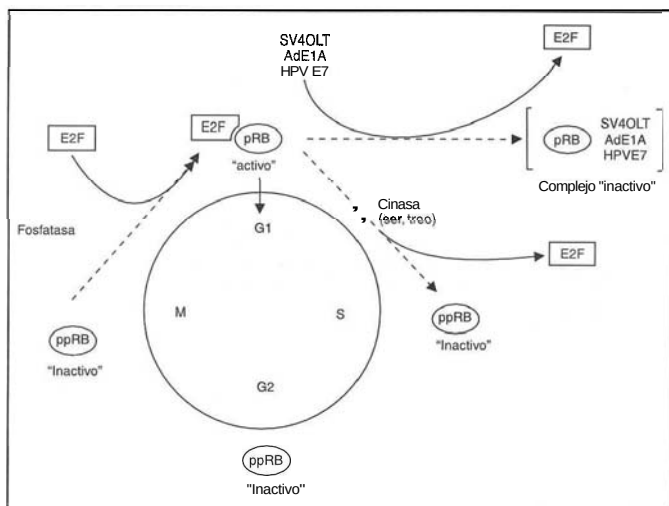


Figura 4. Inactivación de pRB por formación de complejos con los productos oncogénicos de virus tumorales. La proteína pRB se puede inactivar por fosforilación o por interacción con oncoproteínas virales tales como E7 de los PVH de alto riesgo. Al encontrarse pRB en su forma inactiva libera el factor de transcripción E2F y el ciclo celular puede avanzar de G1 a S, G2 y M, donde nuevamente se desfosforila por acción de una fosfatasa; ahora se puede unir a E2F y se bloquea el ciclo celular en fase G1. La formación de complejos entre pRB y las oncoproteínas virales puede llevar a un crecimiento celular descontrolado.

algunos tipos de PVH, son considerados como factores de riesgo.^{12,13} El genoma de PVH es de DNA de doble cadena, circular y formado por alrededor de 7 mil 900 pares de bases. Los diferentes tipos de PVH tienen su genoma organizado de una forma similar, con genes de expresión temprana (E) y otros de expresión tardía (L) (Figura 6) codificados por la misma cadena de DNA (es decir, transcritos en un solo sentido).

La región que precede a los genes tempranos se llama región larga de control (RLC o LCR) y contiene secuencias promotoras y aumentadoras de la transcripción, así como secuencias que controlan el inicio de la replicación. La región temprana codifica para proteínas oncogénicas (E6 y E7) y para proteínas que se necesitan en la replicación del genoma viral (E1, E2); la proteína E2 también puede actuar como represor de la transcripción de los oncogenes virales (E6, E7).

Entre las evidencias que indican que algunos PVH están involucrados de manera causal en cáncer cérvico-uterino, tenemos: 1) el DNA viral se encuentra en 80-90% de dichos tumores; 2) el DNA de PVH se integra al genoma celular, inactivándose el gen E2 y favoreciendo la expresión de los oncogenes virales E6 y E7 (Figura 6); 3) en tumores y líneas celulares derivadas de carcinomas cervicales, se encuentra mRNA y proteína de los oncogenes E6, E7; 4) se ha demostrado que E6 y E7 (provenientes de los PVH 16 o 18) son capaces de immortalizar cultivos primarios de queratinocitos humanos y de transformarlos en cooperación con el oncogén ras activado (Figura 3). 5) Como vimos con anterioridad E6 y E7 son capaces de inactivar a las proteínas supresoras de tumor p53 y p105Rb, respectivamente. Además, al cultivar durante tiempos largos las células immortalizadas por E6 y E7,

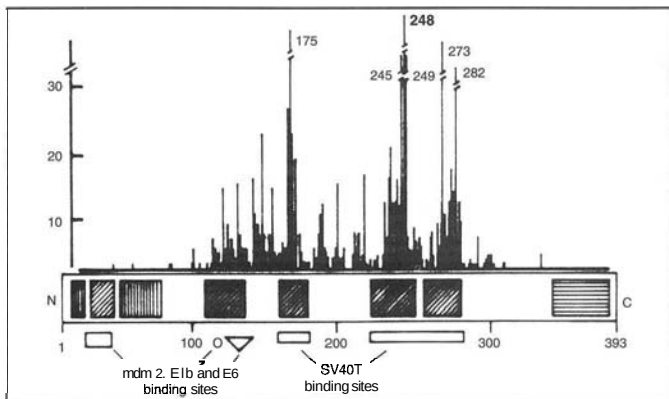
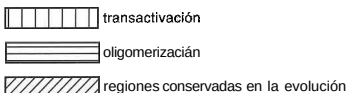


FIGURA 5. Frecuencia de mutaciones en la proteína p53. Se indica el extremo amino terminal y el extremo carboxilo terminal de la proteína p53 (aminoácido 393). Las barras verticales indican las mutaciones (sustitución de bases) más frecuentes al analizar 1,361 tumores; éstas se encuentran en los aminoácidos 175 (n=77), 245 (n=55), 248 (n=112), 249 (n=55), 273 (n=89) y 282 (n=42).

Se señalan los distintos dominios funcionales:



Se indican también el sitio en que la proteína p53 se une a proteínas celulares (mdm2) y virales (E1b de adenovirus, antígeno T grande de SV40 y la oncoproteína E6 de los papilomavirus humanos de alto riesgo).

estas originan clones malignos, lo que sugiere que genes celulares se modifican en dichos cultivos.¹⁴

Con base a su asociación con cáncer cérvico-uterino, los PVH genitales se pueden clasificar en grupos de bajo riesgo (tipo 6, 11), riesgo intermedio (31, 33, 35) o alto riesgo (tipo 16, 18).

En cuanto a la integración del genoma viral al DNA celular, cuando la lesión progresa de precancerosa a cancerosa, vale la pena destacar: (1) la integración en el genoma celular es al azar, aunque en algunos casos nuestro grupo ha encontrado que ocurre dentro o muy cerca del gen c-myc, lo cual sugiere que tanto PVH como oncogenes celulares activados (c-myc) participan en cáncer cérvico-uterino.^{15,16} (2) El DNA viral se rompe en la

región E1-E2 (Figura 6), con lo cual se inhibe la síntesis de la proteína E2 (ver anteriormente); hemos observado que la proteína E2 actúa como inhibidor de la transcripción de los oncogenes virales de los PVH genitales de alto riesgo, pero activa aquella de los papilomavirus cutáneos.¹⁷ Es decir, la integración del genoma viral con la consecuente inhibición de la expresión del transregulador negativo E2, favorece la expresión de los oncogenes de PVH y por consiguiente el desarrollo de un carcinoma genital. En conclusión, los papilomavirus de alto riesgo claramente ejercen algunos de sus efectos proliferativos y oncogénicos mediante la cooperación entre sus oncogenes (E6, E7) y la de oncogenes celulares (myc, ras), así como median-

te la interacción de las oncoproteínas virales con proteínas celulares anti-oncogénicas (p53, pRb). Debido a esto, en nuestro laboratorio estudiamos tanto la participación de los anti-oncogenes Rb y p53 como la de myc y ras en cáncer cérvico-uterino. El diagnóstico de las alteraciones genéticas (oncogenes y anti-oncogenes) y de PVH en lesiones genitales, es de gran importancia clínica y permitirá el diseño de nuevos métodos de prevención y terapia del cáncer cérvico-uterino

Estrategias para el desarrollo de una vacuna

Respecto a la posibilidad de desarrollar una vacuna contra cáncer cervical, es necesario recordar que el sistema inmune es capaz de reconocer y reaccionar contra las células cancerosas. Cuando una célula normal se transforma en cancerosa, ella con frecuencia expone en su superficie marcadores alterados que son reconocidos por el sistema inmune como extraños al organismo. Un regulador importante del crecimiento tumoral lo constituye la respuesta inmune celular. El reconocimiento de un antígeno por células T ocurre en el contexto de los productos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC).¹⁸ El MHC es un conjunto de genes importantes en el reconocimiento inmune; el MHC humano se conoce como HLA (Human Leucocyte Antigen). La región HLA se encuentra en el cromosoma 6 y se divide en 4 regiones principales: A, B, C y D. La región génica HLA-A, -B y -C codifica: moléculas MHC clase I, en tanto que HLA-D codifica moléculas MHC clase II; dentro de la región HLA-D se han identificado los genes DP, DR y DQ. Los linfocitos T citotóxicos (CTL) y los T ayudadores (TH) reconocen péptidos antigénicos procesados (8-12 aminoácidos), presentados por moléculas MHC clase I o II, respectivamente.¹⁹⁻²² Por otro lado, debemos considerar que los cánceres que se presentan con mayor frecuencia en individuos inmunodeficientes son aquellos que se asocian con virus tumorales, sugiriendo que una respuesta inmune normal es de particular importancia para combatir tumores inducidos por virus. Se ha obtenido evidencia indirecta que indica que una persona infectada por PVH genera inmunidad natural contra lesiones genitales malignas; en particular esta evidencia se ha obte-

nido en pacientes con respuesta inmune celular reducida, resultante de inmunosupresión^{23,24} En pacientes que reciben trasplantes renales, que deben inmunosuprimirse para evitar el rechazo del trasplante, el riesgo de displasia cervical aumenta 5 veces y el de displasia vulvar 30 veces.

Por desgracia, la inmunidad celular contra el PVH16 o el PVH18 en el cérvix es relativamente pobre; esto puede deberse a una estimulación débil de la respuesta inmune o a inaccesibilidad de las células premalignas en el cérvix (o ambas). Respecto a esto se ha reportado que los queratinocitos pueden presentar antígenos virales de tal forma que se induzca tolerancia.²⁵ Además, se ha visto que las células presentadoras de antígeno de los epitelios (células de Langerhans) están frecuentemente alejadas de las lesiones inducidas por PVH16; esto podría explicar, en parte, la débil respuesta inmune observada en pacientes con cáncer cérvico-uterino.

Como mencionamos antes, las proteínas virales pueden ser reconocidas por linfocitos T citotóxicos cuando son presentadas en la superficie celular en forma de pequeños péptidos unidos a moléculas MHC clase I (Figura 7). Estos péptidos virales se translocan al lumen del retículo endoplásmico por transportadores peptídicos codificados por los genes TAP-1 y TAP-2. En algunos estudios se ha descrito la frecuente inhibición de la expresión de MHC-I en células neoplásicas cervicales, con esto se favorece un modelo en el que MHC-I sin péptido (por ausencia de TAP) es muy inestable y no se expresa en la superficie celular, permitiendo a la célula neoplásica infectada por PVH escapar al reconocimiento por el linfocito T citotóxico. Al parecer la proteína E5 de los PVH de alto riesgo puede llevar a una pérdida post-transcripcional de MHC-I al interferir con la función de las proteínas TAP.

En principio, cualquier proteína viral codificada ya sea por genes de expresión temprana (como E6, E7) o tardía (como L1, L2), podría ser empleada como antígeno para el diseño de vacunas profilácticas, pero las proteínas tempranas se han considerado con más frecuencia en el desarrollo de vacunas terapéuticas. Se conocen varios ejemplos en animales que indican que las proteínas virales son capaces de invocar una respuesta inmune que puede prevenir la aparición de un tumor, o bien, inducir la regresión de tumores. Por

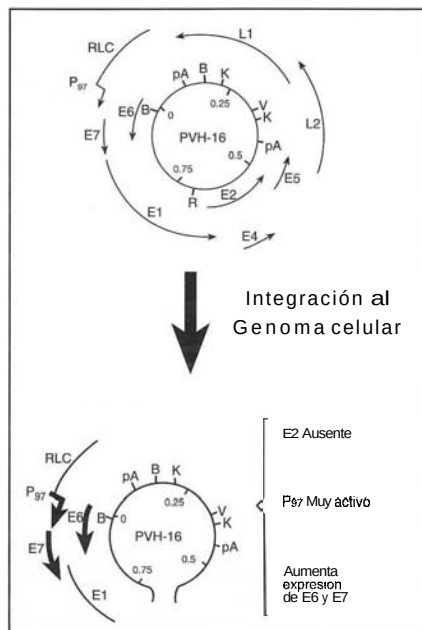


Figura 6. Mapa genético del paplomavirus humano tipo 16 (PVH16). El genoma del paplomavirus humano tipo 16 es de doble cadena, contiene toda la información genética en una cadena, y está dividido en genes tempranos (E), tardíos (L) y una región larga de control (RLC). pA, señal de poliadenilación. B, Bam HI; R, Eco RI; K, Kpn I; V, Eco RV son sitios de restricción de PVH16. P97 es el promotor temprano. Se indica la interrupción del genoma viral al integrarse al genoma celular, con el consiguiente bloqueo en la síntesis de la proteína E2 (transregulador negativo de la transcripción de los oncogenes E6 y E7 de los PVH genitales). En ausencia de E2, el promotor p97 es muy activo y se incrementa la expresión de los oncogenes virales E6 y E7.

ejemplo, inoculación con el virus de la vaccinia (ampliamente usado para combatir la viruela) recombinante, expresando proteínas no estructurales del virus polio, previene el desarrollo de tumores inducidos por este virus y causa el rechazo de estos tumores en animales que ya los presentaban.²⁶

La administración de virus vaccinia recombinante que expresa proteínas de PVH16 (tales como E6, E7) también puede provocar una respuesta inmune en ratas, contra células tumorales

transplantadas (células co-transformadas por PVH16 y ras).²⁷ Respecto a esto se encontró que ratones inyectados con virus vaccinia modificado para producir la proteína E7 de PVH16 rechazan células que expresan E7, transplantadas a la piel de dichos roedores; este rechazo ocurre a una velocidad muy alta, indicando que los animales fueron sensibilizados a la oncoproteína viral E7. En experimentos similares se demostró que tanto la proteína E7 como E6 pueden funcionar como antígenos cuando se presentan en fibroblastos no tumorigénicos;²⁸ este tratamiento produjo una reducción del crecimiento de células tumorales expresando E7.²⁸ Por otro lado, ganado vacuno inyectado con la proteína E7 del papilomavirus bovino es capaz de combatir tumores inducidos por este virus;²⁹ el tratamiento con la proteína E7 estimuló fuertemente la respuesta inmune celular.

La mejor forma de evitar el complejo procesamiento intracelular de una proteína antigénica es usando péptidos de tamaño y secuencia adecuados que se unan a moléculas HLA en la superficie celular. Como se sabe, ciertos epítopos reconocidos por linfocitos T citotóxicos pueden ser buenos candidatos para inducir una respuesta inmune contra un tumor. Mediante el uso de la línea celular RMA-S, que posee un defecto en el procesamiento de péptidos, se estudió la inducción de CTL con péptidos de PVH *in vitro*;³⁰ se identificaron epítopos de las proteínas L1, E6 y E7 de PVH16; sólo reconocidos por CTL; además, algunos CTL que reconocieron estos péptidos fueron capaces de destruir células transfectadas con PVH16.

En un estudio reciente se determinó que pequeños péptidos conteniendo epítopos de las proteínas oncogénicas E6 y E7 pueden servir para el desarrollo de una vacuna peptídica anti-tumoral;³¹ en este trabajo se emplearon 240 péptidos de 9 aminoácidos de largo, con un traslape de 8 aminoácidos, cubriendo la secuencia completa de E6 y E7 del PVH16; se determinó la capacidad de unión de estos péptidos a la molécula HLA clase 1 más común en la población europea (HLA-A2.1). La unión de los péptidos virales se midió con la línea celular humana T2, defectuosa en procesamiento intracelular de péptidos; esta línea expresa un elevado número de moléculas vacías de HLA-A2.1, las cuales son inestables a 37°C, a menos que se establecen agregando péptidos exógenos. El grado

virus vaccinia expresando proteínas tempranas de algún tipo específico de PVH.

Con los avances recientes en el estudio de los oncogenes, de los anti-oncogenes, de los virus tumorales y del sistema inmune, se abren nuevas posibilidades respecto a diagnóstico temprano y vacunas en cáncer cérvico-uterino.

Cuadro I. Afinidad relativa de péptidos, obtenidos de la oncoproteína E6 de PVH-16, por moléculas HLA-A2.1

Posición del primer aminoácido	Secuencia	Afinidad relativa (µM)
18	KLPQLCTEL	12
21	QLCTELQTT	25
22	LCTELQTT	250
25	ELQTTIHDI	200
26	LQTTIHDI	25
29	TIHDIIEC	50
30	IHDILECV	50
37	CVYCKQQL	250
79	KISEYRHYC	125
102	PLCDLLIRC	150

A a lanina R arg n na; N aspara g na; D a cido aspárico C c ste na Q glutam na E a cido glutárico G g cina H histona I isoleuc na L euc na K is na M met on na F fen alan na P pro na S ser na T. treonina; W: triptófano Y: tirosina; V valina.

Cuadro II. Afinidad relativa de péptidos, obtenidos de la oncoproteína E7 de PVH-16, por moléculas HLA-A2.1

Posición del primer aminoácido	Secuencia	Afinidad relativa (µM)
7	TLHEYMLDL	100
11	YMLDLQPET	15
12	MLDLQPETT	15
66	RLCVQSTHV	75
78	TLEDLLMGT	62
82	LLMGTLGIV	50
85	GTLGIVCPI	2
86	TLGIVCPIC	12

Referencias

- Rassoulzadegan M, Cowie A, Carr A, Glaichenhaus N, Kamen R, Cuzin F. The roles of individual polyomavirus early proteins in oncogenic transformation. *Nature* 1982; 300: 713.
- Land H, Parada L, Weinberg R. Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 1983; 304: 596.
- Klinger H. Suppression of tumorigenicity. *Cytogenet Cell* 1982; 32:68.
- Whyte P, Buchkovich K, Horowitz J, et al. Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A protein binds to the retinoblastoma gene product. *Nature* 1988; 334: 124.
- Dyson N, Howley P, Munger K, Harlow E. The human papillomavirus 16 E7 oncoprotein is able to bind to retinoblastoma gene product. *Science* 1989; 243: 934.
- Rustgi A, Dyson N, Bernards R. Amino-terminal domains of c-myc and N-myc proteins mediate binding to the retinoblastoma gene product. *Nature* 1991; 352: 541.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogstein B, Harris C. p53 mutations in human Cancers. *Science* 1991; 253: 49.
- Werness B, Levine A, Howley P. Association of human papillomavirus type 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990; 248: 76.
- Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990; 63: 1129.
- Scheffner M, Munger K, Byrne J, Howley P. The state of p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 5523.
- Gariglio P, Rangel LM. *Virus y Cancer. Salud Publica Mex* 1992;34:308.
- Gariglio P. Genes, Virus y Neoplasias: Genética Molecular del Cáncer. *Información Científica y Tecnológica* 1993; 15: 24.
- García A, Gariglio P. Aspectos moleculares de los papilomavirus humanos y su relación con el cáncer cérvico-uterino. *Rev Inv Clin* 1993; 45: 85.
- Zur Hausen H. Viruses in human Cancers. *Science* 1991; 254: 1167.
- Gariglio P, Ocádiz R, Saucedo R. Human papillomavirus DNA sequences and c-myc oncogene alterations in uterine cervix carcinoma. *Cancer Cells, Papillomaviruses. CHL* 1987; 5: 343.
- Ocadiz R, Saucedo R, Cruz M, Greaf A, Gariglio P. High correlation between molecular alterations of the c-myc oncogene and uterine-cervix carcinoma. *Cancer Res* 1987; 47: 4173.
- Guido M, Zamorano R, Garrido E, Gariglio P, García A. Early promoters of genital and cutaneous human papillomaviruses are differentially regulated by the bovine papillomavirus type 1 E2 gene product. *J General Virol* 1992; 73: 1395.
- Zinkernagel RM, Doherty PC. MHC-Restricted cytotoxic T cells: Studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness. *Advances in immunology* 1979; 27: 51.
- Townsend A, Ohlen C, Bastin J, Ljunggren H, Foster L, Karre K. Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides. *Nature* 1989; 340: 443.
- Germain RN, Margulies DH. The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annual Review of Immunology* 1993;11: 403.
- Stern U, Wiley DC. Antigenic peptide binding by class I and class II histocompatibility proteins. *Structure* 1994; 2: 245.

22. Engelhard VH. Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules. *Annual Review of Immunology* 1994; 12: 181.
23. Crawford L. Prospects for Cervical Cancer Vaccines. *Cancer Surveys. The Molecular Pathology of Cáncer. Imperial Cancer Research Fund* 1993; 16: 215.
24. Frazer IH, Tindie RW. Cell-mediated immunity to papillomaviruses. *Papillomavirus Reports* 1992; 3: 53.
25. Bal V, McIndoe A, Denton G, et al. Antigen presentation by keratinocytes induce tolerance in human T cells. *Eur J Immunol* 1990;20: 1893.
26. Lathe R, Kieny M, Gerlinger P, et al. Tumor prevention and rejection with recombinant vaccinia. *Nature* 1987; 287: 72.
27. Meneguzzi G, Kieny MP, Cerni Ch, Cuzin F, Lathe R. Antitumoral vaccination using vaccinia recombinants expressing papillomavirus early proteins. *Papillomaviruses* 1990; 124: 339.
28. Chen L, Thomas EK, Hu S-L, Hellström KE. Human papillomavirus type 16 nucleoprotein E7 is a tumor rejection antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1991; 88: 110.
29. Campo MS. Vaccination against papillomaviruses. *Cancer Cells* 1991;3: 421.
30. Stauss HJ, Davies H, Sadovnikova E, Chain B, Horowitz N, Sinclair C. Induction of cytotoxic T lymphocytes with peptides in vitro: identification of candidate T-cell epitopes in human papillomavirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1992; 89: 871.
31. Kast WM, Brandt RMP, Drijfhout JW, Melief CJM. Human leukocyte Antigen-A2. 1. Restricted candidate cytotoxic T lymphocyte epitopes of human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins identified by using the processing-defective human cell line T2. *Journal of Immunotherapy* 1993; 14: 115.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT N9108-0408), UNDO y a Fundación Aaron Sáenz México. Agradecemos a Srta. Verónica Ramírez por su apoyo secretarial en la realización de este artículo.

Comentario al trabajo de ingreso "Cáncer cérvico-uterino. Influencia de los genes celulares y de los virales. Implicaciones en el desarrollo de vacunas"

Fabio Salamanca-Gómez*

Agradezco a la Mesa Directiva esta honrosa designación para dar la más cordial bienvenida al doctor Patricio Gariglio con motivo de su ingreso a nuestra Academia.

El doctor Gariglio es un distinguido investigador que procede de las australes latitudes de nuestro continente, originario de Chile, en donde realizó la licenciatura y la maestría en Bioquímica en la Universidad de Chile, con un doctorado en Genética Molecular obtenido en la Universidad de California, con estudios postdoctorales en Bélgica, Boston (Harvard) y en el laboratorio del doctor Chambon en Estrasburgo, y quien desde hace varios lustros se ha incorporado a la investigación biomédica en nuestro país, dirigiendo un laboratorio de Genética y Biología Molecular en el CINVESTAV.

El trabajo realizado por el doctor Gariglio ha tenido amplia repercusión nacional e internacional, se ha hecho acreedor a numerosas distinciones en el país y en el exterior, le ha merecido ser miembro fundador de dos programas de biomedicina molecular y de la Asociación Mexicana de biología molecular en medicina del Sistema Nacional de Investigadores Nivel III y de varias sociedades científicas internacionales. Ha dirigido 28 tesis de licenciatura, 23 de maestría y 11 de doctorado. Sus aportaciones originales incluyen la descripción del micromosoma de SV40 activo en transcripción, del método de "run-on" para estudiar la transcripción, de la RNA polimerasa II o en genes activos en transcripción y de un inhibidor de la reverse transcriptasa del virus HIV-1.

El trabajo del doctor Gariglio se ha orientado principalmente a desentrañar las muy complejas interrelaciones genético-moleculares y ambientales de la transformación maligna. El cáncer es hoy en día la segunda causa de muerte en nuestro país, y el cáncer cérvico-uterino ocupa el segundo lugar en la tasa de mortalidad (5.27), precedido sólo por el cáncer de pulmón (6.23) por cien mil habitantes.

El interesante trabajo que acabamos de escuchar "Cáncer cérvico-uterino. Influencia de genes celulares y virales. Implicaciones en el desarrollo de vacunas", está estructurado en dos partes. En la primera parte se trata sobre la complejidad del fenómeno de la transformación neoplásica que incluye la alteración de cuando menos mediadores de oncogenes y de genes supresores o anti-oncogenes y al menos dos o tres en el proceso de metástasis. Los proto-oncogenes cumplen funciones importantes en etapas tempranas de la diferenciación y el desarrollo, pero que de anormalmente reprimidos después de cumplir esta función. Sin embargo, pueden alterarse o mutarse transformándose como resultado de la acción de agentes o factores ambientales en los que destacan por su importancia los Papiloma Virus humanos.

Otros genes que regulan negativamente el crecimiento celular son los genes supresores o antioncogenes. La proteína Rb, de retinoblastoma, no puede cumplir su función reguladora cuando la proteína E1A de adenovirus tumorales se une a ella. Algo similar ocurre con el antígeno T del SV40

*Académico titular Jefe Unidad de Investigación Médica en Genética Humana Centro Médico Nacional "Siglo XXI" IMSS
Correspondencia y Solicitudes Sobretiros: Hospital de Pediatría, Av. Cuauhtémoc No. 330 Centro Médico Nacional Siglo XXI, Doctores, 06725 México, D.F.

o entre Rb y el producto del oncogén E7 de los papiloma virus humanos tipo 16 o tipo 18 que implican alto riesgo de cáncer cérvico-uterino; lo mismo sucede entre la proteína oncogénica E6 de estos virus y el producto del gen supresor p53 que se encuentran mutado en cerca del 50 por ciento de las neoplasias en el humano.

Es en este campo en donde el doctor Gariglio y su grupo han contribuido en forma notable a esclarecer estas sutiles y trascendentes relaciones al demostrar que la integración del genoma viral del papiloma ocurre dentro o en las inmediaciones de la localización del oncogén c-myc en cáncer cérvico-uterino, la amplificación y los rearrreglos de este oncogén en cáncer cervical, y que la inhibición de la expresión del transregulador negativo E2 favorece la expresión de los oncogenes del papiloma virus y por consiguiente el desarrollo del carcinoma cérvico-uterino.

La segunda parte del trabajo trata de manera teórica sobre las estrategias para el desarrollo de una vacuna contra esta neoplasia. Debe conside-

rarse que la respuesta inmune celular modula en gran parte el crecimiento tumoral al reaccionar contra los marcadores alterados de las células tumorales, y que en pacientes inmunodeficientes se encuentran con elevada frecuencia cánceres que se asocian con virus oncogénicos, lo cual implica que la respuesta inmune normal es fundamental para limitar los tumores inducidos por virus. Es alentadora la perspectiva de contar en breve plazo con una vacuna obtenida mediante manipulación genética y formulamos votos porque el doctor Gariglio y su grupo contribuyan a este importante desarrollo en nuestro medio.

Me es muy grato, doctor Gariglio, expresarle nuestra más cálida bienvenida a esta Academia, en donde todos los colegas que apreciamos sus sobresalientes contribuciones en el campo de la Genética Molecular y sus estimables cualidades personales, estamos ciertos de que su presencia contribuirá a enriquecer las actividades científicas y académicas de nuestra corporación. Muchas gracias.