

Alelos HLA , papilomavirus y cáncer de cuello uterino

*Kumiko Eiguchi , Osvaldo Sprovieri,
Gustavo J. Leirós, César Pirez Torres*

KUMIKO EIGUCHI: Doctora en Medicina, egresada de la Universidad del Salvador, la autora es, además, Especialista en Alergia e Inmunología, título obtenido en la Universidad de Buenos Aires. Fue recertificada por la Academia de Medicina (CRAMA). Es Profesora Titular de Bioquímica e Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad del Salvador, así como también Profesora Titular de Inmunobiología de la Facultad de Ciencias Biomédicas de la Universidad Austral. Médica inmunóloga del Instituto Argentino de Alergia e Inmunología, la autora es Miembro del Comité Consultivo de la Revista "Archivos de Alergia e Inmunología Clínica", y ocupa la Presidencia de la Pan-American Medical Women's Alliance (PAMWA). La Doctora Eiguchi fue Vice-decana de la Facultad de Medicina de la Universidad del Salvador.

Introducción

El papilomavirus (HPV) es un virus ADN de doble cadena, del género *Papillomavirus*, perteneciente a la familia Papovaridae del que se conocen más de 100 tipos. Algunos de ellos, como el HPV 16, HPV 18, HPV 31, HPV 33, entre otros, han sido identificados en carcinomas invasivos.

Numerosos trabajos experimentales apoyan el papel preponderante que juega el papilomavirus en la etiología de diferentes tumores como carcinoma de cuello uterino o cervix, tumores orofaríngeos, cáncer de piel y melanoma, tumores urogenitales benignos y malignos y cáncer de próstata. Se ha podido comprobar la integración de diferentes tipos de HPV en los tumores mencionados, y su probable relación con genes supresores de tumores. Estos genes actuarían fisiológicamente como barrera contra la transformación maligna, por lo que su mutación o delección se traduciría en el desarrollo tumoral. Se ha comprobado la pérdida de la heterocigocidad en distintos cromosomas, donde supuestamente estarían presentes genes

supresores de tumores. La actividad supresora puede ser neutralizada por mutación del genoma, re-arreglo cromosomal o por la interacción con proteínas virales.

Por otra parte, se sabe que la frecuencia de infección con papilomavirus es mayor a la frecuencia de desarrollo de carcinomas, lo que sugiere la intervención de otros factores, inmunológicos o genéticos, además del viral. La respuesta inmunológica resulta de la interacción de lo genético, el procesamiento antigénico y el antígeno, que en este caso es el virus. Para ello, el virus es presentado a la célula T inmune en el contexto del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) de Clase II, cuyos genes están codificados en el cromosoma 6 y tendrían relación con la regulación de la respuesta. Además, se ha descripto asociación de estos genes con numerosas patologías.

Interesa el carcinoma de cervix, donde en USA se cuenta con más de 450.000 nuevos casos anuales y la epidemiología ha sido muy bien estudiada. Se considera la segunda causa de cáncer femenino en el mundo y, según la Organización Mundial de la salud, la incidencia mundial es de alrededor de 500.000 casos por año, de los cuales aproximadamente el 50% son mortales, y se estima que en los próximos 20 años habrá un aumento del 100% de cánceres de cuello uterino en mujeres jóvenes.

En trabajos realizados en pacientes caucásicos y en población hispana (New México), se comprobó una mayor incidencia de cáncer de cuello uterino en esta última (10,3/100.000 personas/año contra 18,9/100.000 personas/año), lo que coincide con otros trabajos efectuados en Estados Unidos en mujeres latinas. Se observó la asociación con HPV, pero si bien no se encontró al comienzo de los estudios asociación con antígenos del CMH, especialmente HLA DQ, sí se halló asociación de haplotipos HLA DR- HLA DQ con carcinoma de cervix y relación con papilomavirus, y se encontraron asociaciones HLA con cáncer de cuello y HPV, fundamentalmente el tipo 16. También, se ha reportado la presencia de asociación negativa, como el HLA DR14, que podría estar asociado a un factor de protección o resistencia al tumor. Estudios efectuados en Inglaterra, Suecia, Francia, Alemania, afroamericanas en Michigan, USA, Japón y Tanzania han encontrado distintos tipos de asociación HLA en pacientes con cáncer de cuello y en lesiones premalignas, con el predominio de la asociación DQ3 y DQ15. Los resultados son controvertidos y dependientes de la población estudiada (tabla 1).

Estudios recientes en los que se identificó variantes de HPV 16 muestran una probable asociación entre la variante HPV16 E2 y HLA DR 4(*0401) y DR 11 (*1101). En nuestra experiencia inicial con pacientes derivadas por el Dr. César Pires Torres y su grupo, habíamos encontrado que 13 pacientes con cáncer de cuello de las cuales 7 fueron HPV positivo (5 HPV 16, 1 HPV 18 y 1 no identificado) tuvieron asociación HLA DR4 (tabla 2). En un trabajo posterior con del Dr. Silvio Tatti, del Hospital de Clínicas, las Dra. Alejandra Picconi y Angélica Teysiée, del Instituto Malbrán, y el Dr. Eduardo

Raimondi del PRICAI y sus equipos, confirmamos la asociación con HLA DR4 y con HLA DQB1* 0302 (tabla 3), y hallamos incluso, la presencia de probables genes protectores como el HLA DR13 y el HLA DQB1*02.

Tabla 1

HLA	ORIGIN	AUTHORS	REFERENCE
HLA DQ3	GERMANY	WHANK&THOMSEN	NATURE 1991, 352:723-5
DQB1 *0301 *0303	GERMANY	ODUNSI K. et al.	MOL.MED 1995, 1:161-71
IDEM	JAPAN	NAWA A. et al.	CANCER 1995, 75:518-21
DQB1 *0303 *0604	MICHIGAN (AFROAM)	GREGOIRE et al.	NT J. CANCER 1994,57:504-7
DQB1 *03	NORWEGIA	HELLANDA et al.	CANCER BIOMARKERS PREV. 1994, 3:479
DQB1 *03	FRANCE	HUGHES AL. et al.	NATURE 1988, 335:167-70
DRB1/DQB1 *1501/*0602 *0407-05*0302 (HPV 16)	HISPANIC- WOMEN NEW MEXICO (USA)	APPLE RJ. et al.	Ntgenet 1994, 6:157:62
DQB1 *0602	TANZANIA	WANK R. et al.	NATURE 1991, 356:
DRB1/DQB1	ENGLAND	CUZIK J. et al.	BR J CANCER
DRB1 *1602	BOLIVIA	CERVANTES J. et al.	HUM IMMUNOL. 2003,64:890

Tabla 2
HLA-DR, HLA-DQ in cervical cancer
patients of Buenos Aires (CC) n=13

	CC	CG	Statistics
HLA DR4	11 (84,6%)	3 (15%)	p <0.0002 RR: 5.64 95% CI: 1.52-9.7
HLA DQ3	13 (100%) 10 DQS 3 DQ7	4 (20%) DQS	p <0.0031 RR: 3.85 95% CI: 1.52-9.7
HPV+	12 (92%) 8 HPV16 3 HPV18	1 HPV 6' DR4 DQ3	

Statistics was carried by Fisher's Test using the approximate of Katz.

CG: Control Group n=20

I Kumiko Euguchi, Cristina Carlin, Mónica Álvarez, GL Leirós, María del Carmen Samaniego, T. Kahn, S. Grinstein. Medicina (Buenos Aires) 58 (Resumen N5/2):600, 1998. Con la colaboración de Dr. César Pires Torres y equipo.

Tabla 3
HLA-DR, HLA-DQ in cervical lesions

	HSIL/IN CA (n=31)	LSIL (n=24)	CG (n=26)	Statistics
HLA DR 4	18 (58.0%)	9 (37.5%)	3 (11.5%)	HSIL/INCA versus CG: p=0.0003 OR=10.615 95% CI: 2.620-43.007 LSIL versus CG: p<0.05 OR=4.6 95% CI: 1.068-19.807
HLA DQ0302	16 (51.6%)	5 (20.8%)	2 (7.7%)	HSIL/INCA versus CG: p=0.0005 OR=12.8 95% CI: 2.570-63.761

Statistics was carried by Fisher's Test using the approximate of Woolf.

Inca: invasive cancer.

HPV-Clinical Workshop and XXth International papillorvirus Conference, Octubre 4-9, 2002, Institute Parteur, Paris, Francia.

¿Qué es el HLA?

Los antígenos de histocompatibilidad, llamados por su descubridor antígenos leucocitarios humanos (HLA) se codifican en el brazo corto del cromosoma 6 humano en el llamado Complejo Mayor de Histocompatibilidad.

Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH)

El MHC humano ocupa un segmento de ADN de unas 4000 kilobases, aproximadamente unos 4 centimorgans, donde pueden producirse entrecruzamientos con una frecuencia del 4% por meiosis. Allí, se codifican los llamados Ag HLA de clase II, clase III y clase I, mencionados en orden desde el centrómero. Los de clase II son el DM, DP, DQ y DR; los de clase III, C4B, C4A, Factor B, C2, que codifican

proteínas del sistema de complemento, y los de clase I comprenden los genes polimórficos HLA B, HLA C y HLA A y los de menor polimorfismo X, F, G, H, J y E. Además de estos Ags, son codificadas otras sustancias con función biológica, como son las proteínas transportadoras en el procesamiento antigénico TAP1 y TAP2 y el complejo proteosoma en la región de Clase II; la citP450, la 21hidroxilasa en la región de clase III y citoquinas como el TNF (factor de necrosis tumoral), linfotóxina y linfotóxina beta entre las clases III y I. Actualmente, se han encontrado otros genes que tienen que ver con la regulación de la respuesta inmune.

Productos del CMH

La expresión génica originará los Ags de histocompatibilidad conocidos como HLA. Los de clase II se expresan en la membrana de las células profesionales presentadoras de Ag (APC profesional), mientras que los de clase I lo hacen en las membranas de todas las células nucleadas del organismo. (imágenes 2 y 16 de la presentación). Ambos poseen dos cadenas; en el caso de los de clase II, son dos cadenas polipeptídicas similares entre sí –alfa (32 a 34 kD) y beta (29 a 32 kD)– codificadas por diferentes genes de tipo polimórficos, mientras que los de clase I poseen una cadena alfa polimórfica (44 kD) y una cadena más pequeña conocida como *beta microglobulina* (12 kD) que no pertenece al MHC y es codificada en el cromosoma 15.

Las cadenas pesadas poseen dominios similares al de las inmunoglobulinas; las de clase II poseen dos dominios: el N terminal o región de unión al Ag de unos 90 aminoácidos (alfa-1, beta-1), y un segundo dominio de igual tamaño o región similar a las Igs (alfa-2, beta-2), una región transmembranosa de unos 25 aminoácidos y la región citoplasmática carboxilo terminal. La cadena alfa de clase I posee tres dominios: el N terminal alfa-1 y el alfa-2 que conforman la región de unión del Ag (unos 90 aminoácidos cada dominio) y el alfa-3, no polimórfico, que, junto a la microglobulina, forma la región similar a las inmunoglobulinas, luego las regiones transmembranosa y citoplasmática.

Funcionalmente, estos Ags son esenciales para la presentación antigénica. Se unen en la región amino terminal con el Ag considerado extraño, previamente procesado. Cada molécula del MHC se une con un solo péptido a la vez, en la región del dominio 1 en un valle molecular que solo permite un péptido de unos 9 a 11 aminoácidos en los de clase I, y de unos 10 a 30 aminoácidos en los de clase II. (imagen 10 de la presentación). Esta zona de unión es la que presenta el mayor polimorfismo, y determina la especificidad y la afinidad de la unión del Ag y del reconocimiento de la célula T.

Así unidos, los de HLA de clase I son reconocidos por los linfocitos T CD8, mientras que los de clase II son reconocidos por los CD4. (fig 1).

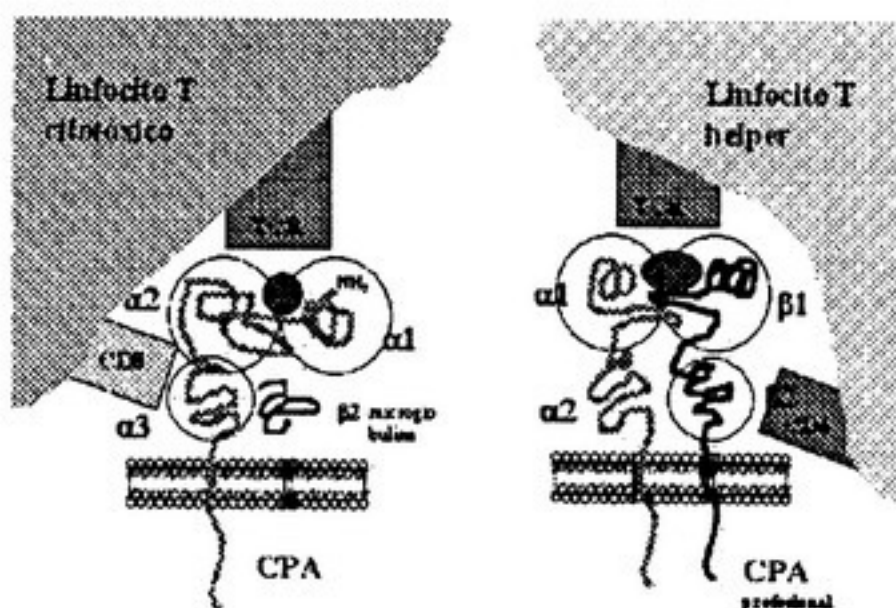


Figura 1. Presentación antigénica endógena por HLA clase I y exógena por HLA clase II

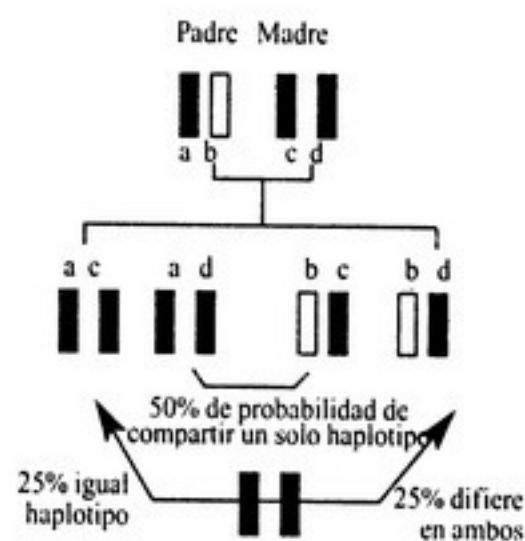


Figura 2. Herencia de los alelos HLA clase I

Genotipo Materno		Genotipo Paterno	
A1	A2	A12	A19
B35	B7	B13	B14
Cw1	Cw3	Cw5	Cw5
Genotipo del Hijo			
A1	A12		
B35	B13		
Cw1	Cw5		

Herencia

Un individuo heterocigota expresa 6 alelos polimórficos de clase I diferentes: 3 del padre y 3 de la madre y presenta 2 HLA A, 2 HLA B y 2 HLA C por célula (fig2). También, hereda 6 loci polimórficos de clase II, pero pueden expresarse más de 6 heterodímeros alfa, beta diferentes, pues pueden existir 2 o 3 genes funcionales de cadena beta en cada loci, aunque un solo gen para la cadena alfa, lo que permitiría una mayor combinación. Esto explica la existencia de 10 a 20, e incluso más, proteínas de clase II por célula, dependiendo de qué alelos se hayan heredado. Es necesario este concepto para interpretar los métodos de estudio.

De una manera simplificada, podemos decir que cada progenitor contribuye para el hijo con uno de los 2 cromosomas que contienen la región MHC; por lo tanto, cada hijo hereda dos loci HLA A, uno de cada progenitor, 2 HLA B, 2 HLA C, 2 HLA DR, 2 HLA DP, 2 HLA DQ. La contribución de cada progenitor es llamada haplotipo, y el fenotipo consiste en la expresión de los dos haplotipos heredados. Debido a que solo hay dos haplotipos paternos y dos maternos en una familia, los hijos biológicos pueden heredar 4 posibles combinaciones: esto sin contemplar los diferentes alelos de clase II, por lo que es fundamentalmente válido para la región I y nos sirve para predecir la probabilidad de histocompatibilidad.

Función en la respuesta inmune

La respuesta inmune se caracteriza por el reconocimiento de lo propio y no propio (reconocimiento en el contexto HLA), por ser específica, especializada, poseer gran diversidad, conservar una memoria inmunológica y ser regulada. Para ello, intervienen diferentes niveles moleculares: el reconocimiento antigénico entre el receptor T y el Ag; en el contexto del HLA (fig 1), las moléculas accesorias y las de coestimulación (como algunas moléculas de adhesión), transducción de señales intracelulares y la liberación y acción de las citoquinas.

Para su estudio, la respuesta inmune adaptativa puede dividirse en distintas fases: a) reconocimiento del Ag; b) activación de los linfocitos; c) fase efectora; d) recuperación de la homeostasis y conservación de la memoria.

Reconocimiento del Ag

Cada uno de nosotros posee el repertorio de linfocitos capaz de reconocer a distintos Ag conocidos y por conocer; por lo tanto, la entrada del Ag provocará la selección del clon o clones de linfocitos capaces de unirse a él. Este reconocimiento es dinámico, y existe una adaptación molecular del Ag y del receptor del linfocito. Para que este reconocimiento tenga lugar debe ser presentado por las CPA que procesan el Ag previamente. Si el Ag es extracelular se produce el procesamiento y presentación exógena; si, en cambio, es intracelular, como ocurre con Ag virales, de parásitos intracelulares u oncoproteínas, el procesamiento y presentación es endógena.

Presentación antigénica: La mayoría de los antígenos necesitan ser procesados y presentados a los linfocitos T a través moléculas HLA. Los linfocitos T poseen el complejo del receptor T (TCR) (fig 1) que reconoce al Ag solo en contexto del CMH, a través de los HLA. Las moléculas CD3 están en todos los linfocitos T, lo que nos permite caracterizar a dicha población y/o cuantificarla. Cabe señalar que tanto las moléculas HLA, como el receptor T y las Igs son emparentadas evolutivamente y conforman la superfamilia de las Igs, junto a otras moléculas de estructuras relacionadas.

Existen antígenos que pueden ser presentados directamente al linfocito B (generalmente polisacáridos) sin colaboración de linfocitos T que, al no estimular el "switch" de Igs, generan como respuesta la producción de IgM específica. Son los llamados **antígenos T-independientes**.

Recientemente, se ha estudiado la presentación de antígenos lipídicos y glucolipídicos a través de **CD1**, (a,b,c,d y e) una molécula similar al HLA clase I, que no pertenece al Complejo Mayor de Histocompatibilidad y que se encuentra pre-

sente en timocitos, células dendríticas, linfocitos citotóxicos, subpoblación linfocitaria B y en el caso del CD1d en leucocitos y células epiteliales.

Los **Ags proteicos** (simples o conjugados) y otros Ags en su gran mayoría necesitan de la colaboración T-B, y son presentados a los linfocitos T a través de moléculas del CMH, lo que permite la producción de citoquinas necesarias para que se produzca el "switch" de las Igs y se sintetizen los distintos isotipos de Igs. Son los **antígenos T dependientes** que pueden ser exógenos o endógenos; por lo tanto, la presentación antigénica puede ser exógena o endógena. Ambos tienen restricción HLA o del CMH.

Procesamiento y Presentación exógena o con restricción HLA Clase II

Cuando un antígeno es fagocitado por la CPA, por ejemplo, el macrófago, se produce su procesamiento. El antígeno es degradado en pequeños péptidos por proteólisis en el endosoma o lisosoma, que tienen un Ph ácido, esencial para el procesamiento por acción de enzimas lisosomales, como catepsina y leupeptina.

Mientras tanto, se produce un aumento de la síntesis de moléculas de HLA clase II, que son transportadas por una proteína Ii o cadena invariante a través del retículo endoplásmico y el Golgi hasta la vesícula exocítica. Allí Ii es cortada y da un péptido pequeño llamado CLIP (péptido de la cadena invariante asociado a clase II). El CLIP queda unido a la hendidura de la zona variable del HLA clase II.

Cuando se fusionan la vesícula exocítica con el endosoma donde se encuentran los pequeños péptidos del antígeno, un HLA DM libera el CLIP y permite que en su lugar se una uno de esos péptidos. De esta manera, el HLA de clase II lleva unido el péptido antigénico y se expresa en la membrana de la célula, que será presentado a un linfocito CD4⁺.

Los linfocitos T CD4⁺ pueden unirse a los HLA de clase II; por lo tanto, los linfocitos CD4⁺, capaces de reconocer el antígeno en el contexto del HLA, serán los que se unan a la CPA para originar la respuesta inmune.

Procesamiento y Presentación endógena o con restricción HLA Clase I

En la presentación endógena, los antígenos procesados se encuentran en el citoplasma celular. Esto es útil para aquellos casos de infecciones intracelulares o transformaciones tumorigénicas.

Aquí también, los antígenos sufrirán una proteólisis vía ubiquitina por un complejo multienzimático llamado proteosoma, dos de cuyas subunidades (LMP2 y LMP7) mencionamos como codificadas entre los antígenos de Clase II, y es estimulado por el interferón (IFN) gamma. Por acción de este sistema, se generan péptidos más pequeños (5-11 aminoácidos) que se unirán al HLA de clase I.

Los HLA de clase I son sintetizados en las células nucleadas y transportados por las proteínas TAP1 y TAP2 hacia el encuentro con los péptidos que puedan

unirse, previa liberación de TAP. De esta forma, se expresan en la membrana celular para ser presentado a los linfocitos CD8⁺.

Los linfocitos T CD8⁺ pueden unirse a los HLA de clase I; por lo tanto, los linfocitos CD8⁺ capaces de reconocer el antígeno en el contexto del HLA, serán los que se unan a la célula para originar la lisis de esta, generalmente por apoptosis o muerte celular programada (acción citotóxica sobre la célula diana, que presenta el Ag en el contexto de Clase I).

En ambos tipos de presentaciones, seguirá un proceso de reconocimiento entre la célula que presenta el antígeno unido al HLA y el receptor del linfocito T junto a un grupo de moléculas accesorias y de coestimulación presente en la membrana de ambas células para dar lugar a la transducción de señales y activación del linfocito T.

Activación de los linfocitos T

Una vez reconocido el Ag, los linfocitos requieren una **doble señal de estimulación**. La primera señal está dada por el **reconocimiento de los TCR del Ag**, que asegura la especificidad de la respuesta. Desencadenan vías de señalización intracelular e inducen la síntesis de factores de transcripción que activan distintos genes de los linfocitos. La segunda señal, o **señal de coestimulación**, es activada por microorganismos o por factores de la inmunidad innata, y asegurarían que la respuesta ocurra ante la presencia de patógenos y no contra Ag. propios. La vía de señal de coestimulación mejor conocida es la que se produce con la unión de CD28 presente en los linfocitos T y las glicoproteínas B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) expresadas en las CPA activadas. Cuando B7-2 se une a CTLA-4 resulta una vía de estimulación importante en la autotolerancia (regulación negativa de la respuesta inmune).

Los linfocitos T vírgenes se activan en los órganos linfáticos secundarios y tejidos linfáticos periféricos y producen la **expansión** clonal de esos linfocitos, que se **diferenciarán** en linfocitos T **efectores** y linfocitos T de **memoria**. Las mejores CPA para los linfocitos T vírgenes (Th0) son las **células dendríticas** ricas en moléculas coestimuladoras que transportan los Ags a los ganglios linfáticos donde se realizará la presentación y activación linfocitaria. Los macrófagos y linfocitos B pueden hacerlo, pero no son tan eficientes, en cambio sí son buenas CPA de linfocitos efectores y de memoria, tanto en tejido linfático como en otros tejidos. Todo este proceso es favorecido por la unión de las dos células a través de moléculas de adhesión como las integrinas. La zona de contacto entre ambas células se la conoce como **sinapsis inmunológica**. Los cambios que ocurren en la sinapsis se manifiestan por la llegada de las moléculas del TCR, el co-receptor CD4 o CD8, receptores coestimuladores como el CD28, moléculas de adhesión, citoquinas, enzimas. La correcta interacción de las moléculas disparan las vías de señalización intrace-

lular con fenómenos de membrana (activación de tirosinas y fosforilación de proteínas del TCR), activación de enzimas citoplasmáticas (ERK, JNK, PKC, calcineurina) que activan factores de transcripción como NF- κ B, AP-1, NFAT, los que darán lugar a un aumento de la transcripción de genes, como, por ejemplo, los de citoquinas con su consiguiente síntesis y liberación. La acción de citoquinas dirigen la fase efectora.

Estos conceptos son necesarios para comprender el efecto de las nuevas vacunas para HPV, con las cuales se busca generar una respuesta inmune capaz de destruir al virus o a las células infectadas.

Fase efectora

Es la fase de respuesta donde se secretan citoquinas y se produce la proliferación y diferenciación de los linfocitos T. La primera citoquina secretada por los Th0 es la IL2 que actúa como factor de crecimiento linfocitario, con efecto autócrino, ya que la IL2 actúa sobre los propios receptores de IL2 expresados por los linfocitos. La IL15, secretada por las CPA y otras células, tiene un efecto similar a la IL2 (y estimula también linfocitos CD8⁺ y linfocitos de memoria CD8⁺). Luego, los linfocitos se diferencian en distintas subpoblaciones efectoras como las Thelper 1 (Th1) y Thelper 2 (Th2), reconocidas por las citoquinas que producen. Existe una Thelper 3 (Th3) que tendría un papel regulador y se encuentra en estudio en procesos de hipersensibilidad.

Las **citoquinas** son polipéptidos o proteínas liberadas por las células del sistema inmune y sus accesorias que se unen a un receptor celular específico para originar una función o transformación.

Cuando los linfocitos CD4⁺ se diferencian en Th1 y Th2 liberan citoquinas que se encuentran en equilibrio por mecanismos regulatorios; así, por ejemplo, INFgamma producido por las Th1 inhiben a Th2, mientras que IL4 producida por Th2 inhibe a Th1.

Los Th1 liberan IL2, IFN gamma y TNF beta. La IL2 va a estimular a todo el sistema, incluida la cooperación de B, pero, esencialmente, junto con el IFN gamma estimula la respuesta de tipo celular: estimula a los macrófagos, linfocitos T CD8⁺ citotóxicos, células NK.

Los Th2 liberan IL4, IL5, IL6, IL13, IL10. Estas favorecen la diferenciación y activación de linfocitos B con producción de Igs.

Las citoquinas liberadas por Th1 van a favorecer la expansión y diferenciación de los linfocitos TCD8⁺ en linfocitos T citotóxicos (LTC), capaces de destruir la célula blanco al reconocer el Ag en el contexto del CMH (HLA I), con activación de los genes de transcripción de citoquinas, proteínas de los gránulos de los LTC y de moléculas que se expresan en la membrana como CD40L y FAS, necesarias para la colaboración B y la señales de apoptosis, respectivamente.

Recuperación de la homeostasis y conservación de la memoria

Una vez que las células efectoras eliminaron el Ag, la mayoría de los linfocitos muere por apoptosis ante la falta de las señales de activación.

Parte de los linfocitos generados sobreviven, incluso sin la presencia del Ag, y son responsables de la rápida respuesta ante la segunda entrada del Ag. Constituyen los linfocitos de memoria, que poseen integrinas y la molécula CD44 responsables de la migración hacia el foco inflamatorio. Últimamente, se han podido marcar dos subgrupos de linfocitos T de memoria. Los que poseen alta concentración del receptor para la quimioquina CCR7, que migrarían a los ganglios linfáticos y proliferan ante los estímulos antigénicos, y los de baja concentración sintetizan los efectoras y migran hacia los focos inflamatorios periféricos. Esta respuesta, con conservación de la memoria, es lo que se busca en una vacunación eficaz.

Asociación con enfermedad

Se entiende por desequilibrio de ligamiento cuando dos hechos independientes (no relacionados) aparecen asociados con una frecuencia mayor a la esperada (desequilibrio de ligamiento positivo) o con una frecuencia menor (disociación o desequilibrio de ligamiento negativo). Los genes de la región MHC están íntimamente ligados, y ciertas combinaciones de antígenos tienden a estar sobre el mismo haplotipo de individuos al azar, en un grupo étnico determinado, con mayor frecuencia de lo esperado, si se multiplicara las frecuencias del gen de los antígenos individuales como hechos independientes. Por ejemplo, la frecuencia del gen para HLA A1 en una población caucasoide fue de 0.16 y la frecuencia del gen HLA B8 fue de 0.10.

Si se asocian al azar, la frecuencia de aparición de ambos sería: $0.16 \times 0.10 = 0.016$; sin embargo, la frecuencia observada del haplotipo A1.B8 es de 0.088, es decir, que aparece en una frecuencia mayor a lo esperado. Es necesario conocer la existencia de estos desequilibrios de ligamiento cuando se estudia el grado de asociación de un gen HLA con una determinada enfermedad para no incurrir en el error de definir una asociación.

Para un mejor estudio de asociación con enfermedad, se puede utilizar el método de Ryder y Svejgaard para hallar el llamado Riesgo Relativo (RR), que es el riesgo de desarrollar la enfermedad cuando un Ag está presente en comparación con el que habría si el Ag no estuviera:

$$RR = \frac{N \text{ enfermos Ag positivos} \times N \text{ sanos Ag negativos}}{N \text{ enfermos Ag negativos} \times N \text{ sanos Ag positivos}}$$

Si el RR es superior a 1 indica que hay asociación HLA con la enfermedad. Para valorar el grado de significancia se halla un factor de correlación r , utilizando el χ^2 , siendo $r = \sqrt{\chi^2/N}$

Se considera que un $r > 0,3$ indica asociación. Cuando el tamaño de la muestra no es suficiente para utilizar el test de chi cuadrado se recomienda utilizar el Test de Fisher, que fue el utilizado por nosotros, y tomar el OR en lugar del RR.

La primera asociación fuerte descripta fue el HLA B27 con la espondilitis anquilosante, que se da en todas las poblaciones estudiadas en alrededor del 90% de los pacientes. Se ha comunicado el hallazgo de más de 500 patologías con asociación HLA con distintos RR. El conocimiento de estas asociaciones son importantes como valor pronóstico y como estudio de susceptibilidad a padecer enfermedad o de estar "protegidos" genéticamente a padecerla.

Asociación HLA con cáncer y HPV

¿Los HLA son simples marcadores, o está en relación a su composición de aminoácidos que permitan o no unir con distinta afinidad el péptido antigénico y presentarlo a los linfocitos?

Diferentes ensayos se efectuaron estudiando distintos péptidos obtenidos de proteínas E6 o E7 de los HPV-16 y HPV-18 para evaluar su eficacia como inmunógeno; se encontró, por ejemplo, que E711-20 y E786-93 se unían a los alelos

HLA A* *0201, A*0202, A*0203, A*0204, A*0209 (Ressing Maïke et al); por lo tanto, los pacientes con esos alelos en su haplotipo se verían beneficiados si fueran vacunados con esos péptidos. En la actualidad, se sigue investigando sobre el papel de los HLA clase I, dado que tienen que ver con la respuesta antiviral y antitumoral.

Sin embargo, ante una vacunación con diferentes péptidos, estos darían una respuesta eficaz al ser presentados a los linfocitos CD4+ a través de HLA de clase II, por lo que interesa conocer cómo sería el comportamiento de aquellos HLA marcadores de susceptibilidad o resistencia. Ensayos con E6-41-62 y E7 mostraron que eran capaces de generar proliferación linfocitaria y producción de interferón gamma, lo que implica una buena respuesta inmune. Cuando a estos péptidos in vitro se los enfrentaba a linfocitos HLA-DR15 respondían adecuadamente, mientras que ensayos con linfocitos HLA DR4 no daban respuesta (Van Der Burg Sjoerd H et al), lo que podría interpretarse como que los portadores de HLADR4 no son hábiles para presentar antigénicamente a proteínas virales y, por lo tanto, no ser capaces de responder inmunológicamente al HPV, lo que podría explicar el aumento de la susceptibilidad HLA-DR4 de nuestros resultados, confirmados recientemente en una publicación de Beskow AH y colaboradores en población sueca.

Sin embargo, se podría plantear por qué otras pacientes HLA-DR4 no tienen

cáncer de cuello o HPV de alto riesgo. Para esta respuesta, sería necesario comprobar el grado de asociación con los distintos alelos de HLA-DRB1*04. Por otra parte, en nuestro estudio, habíamos encontrado un efecto protector para HLA-DR13 que también fue encontrado por el grupo sueco. Es importante el estudio poblacional y su comparación, ya que si bien los suecos coinciden con nuestros resultados, Dao DD y col. recientemente encontraron en población venezolana HLA-DQB1*0201-0202 y *0402, pudieron confirmar estadísticamente a este último y no al primero. Nosotros encontramos al HLA- DQB1*02 como candidato protector.

Conclusión

- Existen haplotipos HLA protectivos y predisponentes para el cáncer cervical.
- Es necesario efectuar estudios de población en cada región para identificarlos, no solo como marcadores de población de riesgo, sino también como evaluación de población a vacunar en forma preventiva o terapéutica.
- Resulta importante estudiar si estos haplotipos pueden ser marcadores evolutivos de la enfermedad y cómo es la asociación con HPV y cáncer.
- Su conocimiento contribuirá a la producción de vacunas de mayor eficacia e identificar a las pacientes de riesgo.

Referencias

- APPLE RJ; Erlich H.A; Klitz W.; Manos M.M.; Becker T.M; Wheeler C.M. HLA DR-DQ associations with cervical carcinoma show papillomavirus-type specificity. *Nature Genetics* 1994; 6:157-163.
- BESKOW AH, Engelmark MT, Magnusson JJ, Gyllensten UB. Interaction of host and viral risk factors for development of cervical carcinoma in situ. *Int J Cancer*. 2005;117(4):690-2
- BESKOW AH, Moberg M, Gyllensten UB. HLA class II allele control of HPV load in carcinoma in situ of the cervix uteri. *Int J Cancer*. 2005 May 19;117(3):510-514 .
- BOSCH, F.X; Manos, M, Muñoz, N et al. Prevalence of Human Papillomavirus in Cervical Cancer: a Worlwide Perspective. *J.Natl. Cancer Inst* 1995; 87: 796-802.
- CERVANTES J, Lema C, Valentina Hurtado L, Andrade R et al. HLA-DRB1*1602 allele is positively associated with HPV cervical infection in Bolivian Andean women. *Hum Immunol*. 2003;64(9):890-5.
- CUZICK J, Terry G, Ho L, Monaghan J, Lopes A, Clarkson P, Duncan I. Association between high-risk HPV types, HLA DRB1* and DQB1* alleles and cervical cancer in British women. *Br J Cancer*. 2000;82(7):1348-52.

- DAO DD, Sierra-Torres CH, Robazetti SC, de Gómez MN, König R, Lema C, Lester LJ, Au WW, Tying SK. HLA-DQB1 and cervical cancer in Venezuelan women. *Gynecol Oncol*. 2005;96(2):349-54.
- DUGGAN-KEEN M; Keating PJ; Stevens FRA; Sinnott P; Snijders PJF; Wal-boomers JMM et al. Immunogenetic factors in HPV-associated cervical cancer: influence on disease progression *Eur J Immunogenet* 1996, 23:275-284.
- EIGUCHI de Palmero K. El Complejo HLA. Su relación con la Enfermedad. *Rev. Arg. de Tuberculosis, Enfermedades Pulmonares y Salud Pública* 1983 44(4): 73-85.
- EIGUCHI K, Guerra L, Kahn T Alteraciones genéticas en 10q en melanoma y carcinoma de próstata humano. *Medicina (Buenos Aires)* 1995, 55: 540.
- EIGUCHI K, Llorente de Carlin C. Histocompatibilidad. *Archivos Argentinos de Alergia e Inmunología Clínica*. 29 (2):7-18, 1998.
- EIGUCHI K, Leirós G, Galliano S, Sember ME, Rubi R, Schwarz E, Kahn T. Detención of human papillomavirus DNA in prostate carcinomas. 17th International Cancer Congress, (Monduzzi Ed, Bologna) Italy, pp: 1081-1086, 1998.
- EIGUCHI K, Carlin C, Alvarez M, Leirós GL, Sanmaniego MC, Kahn T, Grinstein S. Asociación HLA-DR; HLA DQ en pacientes con cáncer de cuello uterino *Medicina (Buenos Aires)* 58 (N5/2): 600, 1998.
- EIGUCHI K. Introducción a la Inmunología. Maestría en Aterosclerosis. Educación a distancia. Vol I, Módulo N° 3 Capítulo 4 pp:1-21. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario Edit. Aterosclerosis, Buenos Aires 2004.
- FUJIYOSHI T, Sonoda S. HLA-DRB1*1602 allele is positively associated with HPV cervical infection in Bolivian Andean women. *Hum Immunol*. 2003; 64 (9):890-895.
- GREGOIRE L; Lawrence WD; Kukuruga D. Eisenbrey AB; Lancaster WD. Association between HLA DQB1 alleles and risk for cervical cancer in African-American women *Int J Cancer* 1994, 57:504-507.
- GRIMMEL, M; De Villiers, E.M.; Neumann C.; Pawlita M; zur Hausen H. Characterization of a new human papillomavirus (HPV 41) from disseminated warts and detection of its DNA in some skin carcinomas. *In J Cancer* 1988, 41: 5-9 in situ. *Int J Cancer*. 2005;117(4):690-692 .
- KAHN T, Friesl H; Copeland N.G; Gilbert D.J; Jenkis N.A.; Gissmann L; Kramer J; zur Hausen H. Molecular Cloning, Analysis, and Chromosomal Localization of a Mouse Genomic Sequence Related to the Human Papillomavirus Type 18 E5 Region. *Molecular Carcinogenesis* 1992, 6:88-99.
- KAHN T.; Turazza E.; Ojeda R.; Bercovich A; Stremlau A.; Lichter P.; Poustka A; Grinstein S.; zur Hausen H. Integration of Human Papillomavirus Type 6a DNA in a tonsillar Carcinoma: chromosomal Localization and Nucleotide Se-

- quence of the Genomic Target Region. *Cancer Research* 1994, 54:1305-1312.
- KOSTYU D.D. HLA: Fertile Territory for Developmental Genes?. *Critical Reviews in Immunology* 1994; 14 (1):29-59.
 - KOUTSKY L.A.; Holmes K.K.; Critchlow C.W; Stevens C.E. Paavonen J.; Beckmann A.M et al A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med* 1992, 327: 1272-1278.
 - LEIRÓS G; Galliano S; Sember M; Kahn T; Schwarz E; Eiguchi K Detection of human papillomavirus DNA and p53 codon 72 polymorphism in prostate carcinomas *BMC Urol.* 2005 Nov 24;5(1):15
 - LORINCZ AT; Temple GF; Kurman R.J.; Jenson A.B; Lancaster W.D. Oncogenic association of specific human papillomavirus types with cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1987, 79: 671-677.
 - MALONEY K; Wiener JS; Walther PJ. Oncogenic human papillomaviruses are rarely associated with squamous cell carcinoma of the bladder; evaluation by differential polymerase chain reaction. *J Urol* 1994, 154: 360-364.
 - NAWA A; Nishiyama Y; Kobayashi T; Wakahara Y; Okamoto T; Kikkawa F et al Association of Human Leucocyte Antigen-B1*03 with Cervical Cancer in Japanese Women Aged 35 Years and Younger. *Cancer.* 1995;75(2):518-21.
 - ODUNSI K.; Terry G.; Ho L; Bell J.; Cuzick J.; Ganesan T.S. Associations between HLA DQB1*03 and cervical intraepithelial neoplasia. *Mol Med* 1995, 1: 161-171.
 - PFISTER H.; Fuchs, P.G. Papillomaviruses: Particles. Genoma Organisation and Proteins. In Syrjanen K; Grossmann L; Koss L.G (Eds) *Papilloma-viruses and Human disease*. Springer Verlag , Heidelberg, 1987, pp 1-16.
 - PICCONI M.A; Eiguchi K; Tatti S; Vighi S; Alonio L.V; Raimondi E; Teyssié A.R. HLA class II alleles and cervical HPV associated lesions in patients from Argentina. HPV-Clinical Workshop and XXth International Papillomvirus Conference. Octubre 4-9, 2002. Institute Pasteur, Paris, Francia. Resumen p123
 - SANDA MG; Restifo NP; Walsh JC; Kawakami Y; Nelson WG; Pardoll DM; Simons JW. Molecular characterization of defective antigen processing in human prostate cancer *J-Natl Cancer Inst.* 1995; 87: 280-285.
 - SANJEEVI CB; Hjelmstrom Hallmaans G; Wiklund F.; Lenner P.; Angstrom T; Dillner J. Different HLA-DR-DQ haplotypes are associated with cervical intraepithelial neoplasia among human papillomavirus type 16 seropositive and seronegative Swedish women. *Int J Cancer* 1996, 68:409-414.
 - SASTRE-GARAU X; Loste M-N; Vincent-Salomon A; Favre M; Mouret E, de la Rochefordiere A et al. Decreased frequency of HLA-DRB1*13 alleles in French women with HPV-positive carcinoma of the cervix. *Int J Cancer* 1996, 69:159-164.

- TERRY G.; Ho L. and Cuzick J. Analysis of E2 amino acid variants of human papillomavirus types 16 and 18 and their associations with lesion grade and HLA DR/DQ type. *Int J Cancer*, 1997; 73: 651-657.
- TURAZZA E; Lapeña A; Sprovieri O.; Pires Torres, C; Gurucharri C; Maciel A.; Lema B. Grinstein S. Kahn T. Low risk human papillomavirus types 6 and 11 associated with carcinomas of the genital and upper aero-digestive tract. *Acta Obst.et Gynecologica Scandinavica* 1997;76: 271-276.
- WANK R; Meulen JT; Luande J; Eberhardt H.C. Pawlita M. Cervical intraepithelial neoplasia, cervical carcinoma, and risk for patients with HLA-DQB1*0602,*301,*0303 alleles. *Nature* 1993, 341:1215.
- Wiener,JS; Walther PJ. A high association of oncogenic human papillomavirus with carcinomas of the female urethra: Polymerase chain reaction-based analysis of multiple histologic types. *J Urol* 1993, 150:49.
- WNAK R; Schendel DJ; Thomssen C. HLA antigens and cervical carcinoma. *Nature* 1992, 356:22-23.
- ZEGARRA L, Quiroga G, Asturizaga D, Dulon A, Prada R, Panoso W, Yashiki S, Zoodsma M, Nolte IM, Schipper M, Oosterom E, van der Steege G, de Vries EG, te. Analysis of the entire HLA region in susceptibility for cervical cancer: a comprehensive study. *J Med Genet*. 200;42(8):e49.
- ZUR HAUSSEN H. Papillomavirus as carcinomaviruses. In Klein G (ed), *Advances in Viral Oncology*, Vol. 8, Raven Press Ltd, New York, 1989, pp1-26.