

Genes y moléculas de histocompatibilidad en tejidos normales y tumorales

Francisco Ruiz-Cabello Osuna

Alfonso Serrano

Hospital Virgen de las Nieves.

Servicio de Análisis Clínicos e Inmunología,

Universidad de Granada.

Avda. Fuerzas Armadas, S/N,

18012 Granada, España.

1. Resumen

El Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) está constituido por una serie de genes que codifican productos especializados en el procesamiento y presentación de antígenos endógenos y exógenos al sistema inmune. Los antígenos endógenos, que se presentan generalmente restringidos por moléculas de clase I, son reducidos a pequeños péptidos y son transportados a la membrana plasmática a través del retículo endoplasmático, junto con un alelo HLA clase I particular para interactuar con el complejo CD3-receptor de la célula T (CD8+). Los genes implicados en este proceso controlado genéticamente son: genes de clase-I, genes del proteosoma y genes transportadores. La característica más peculiar de estos genes es su alto grado de polimorfismo, que en humanos está principalmente concentrado en los genes de HLA de clase-I, mientras que en otras especies los genes del proteosoma y

transportadores son también polimórficos. El polimorfismo provee una enorme diversidad de péptidos antigénicos que pueden potencialmente ser presentados, confiriendo a una especie dada, la posibilidad de generar una respuesta inmune a un antígeno particular, aunque un miembro individual pueda no tener la combinación de alelos requerida. Sin embargo, las moléculas del MHC en ratones y humanos no fueron descubiertas a través de sus funciones fisiológicas, sino más bien por su capacidad de producir una fuerte reacción aloinmune, que daba como resultado la producción de aloanticuerpos y células T aloreactivas; estos efectores inmunes han sido las herramientas usadas para definir la organización molecular de los genes y antígenos MHC. Puesto que estas moléculas son capaces de presentar antígenos a células efectoras, entre ellos antígenos tumorales, cualquier pérdida total o alélica de estas moléculas, elimina la capacidad para presentar antígenos a través de las moléculas de clase I. En el caso de las células tumorales esto supone eludir parte de la respuesta inmune, si bien existen otros efectores que son independientes de esta restricción, algunos, incluso presentan una “restricción” negativa, como es el caso de las células NK, que podrían suponer un segundo frente de ataque antitumoral, cuando la expresión de clase I disminuye en las células tumorales. La reducción en la expresión de clase I se ha relacionado en muchos casos con la adquisición de ciertas características tumorales, como son la invasión del tejido adyacente y la capacidad metastatizante, y por lo tanto con una menor diferenciación tumoral y peor pronóstico. Actualmente esto ha permitido un enfoque terapéutico basado en la recuperación de la expresión de los antígenos de clase I, mediante la transfección de alelos específicos en tumores negativos, que permita la recuperación de parte de la respuesta inmune, con lo cual la determinación del fenotipo HLA tumoral podría ser un importante dato clínico en una potencial terapia génica.

2. Estructura y ensamblaje de la molécula HLA de clase I: procesamiento antigénico

Las moléculas de clase I son complejos formados por una cadena pesada, una cadena ligera o b2-microglobulina (b2m) y un péptido, que tienen como función principal presentar un antígeno peptídico a los linfocitos T citotóxicos (CD8+). Los linfocitos T se encuentran restringidos, no sólo en el reconocimiento del antígeno, por las moléculas del MHC, sino que además únicamente reconocen epitopos de origen peptídico, resultado de un procesamiento intracelular del antígeno. En el caso de las moléculas de Clase I, generalmente el antígeno es procesado en el citoplasma, transportado al retículo endoplasmático, donde se ensambla con la molécula específica de clase I y es

transportado, formando un complejo, a la membrana citoplasmática, vía aparato de Golgi. En toda esta vía participan los productos de una serie de genes que, al igual que los genes clásicos de clase I y II, se encuentran localizados en el CMH, estos son: genes de proteasas y genes transportadores TAP.

La cadena pesada de la molécula clásica de clase I es una proteína de 46 kD que está codificada por tres *loci* diferentes (HLA-A, B, y C) y que comprenden más de un ciento de alelos. Esta proteína presenta tres regiones: una zona citoplasmática corta, una zona transmembrana y otra zona extracelular constituida por tres dominios denominados $\alpha 3$, $\alpha 2$ y $\alpha 1$, encontrándose los residuos polimórficos sobre los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ que son los que determinan la especificidad antigénica de la molécula.

La b2-microglobulina es el único componente del MHC, cuyo gen no se localiza en el cromosoma 6, sino que está situado en el cromosoma 15. Es una proteína soluble que se asocia a la cadena pesada de forma temprana y que junto al péptido antigénico confiere estabilidad al complejo de clase I. Esta proteína se puede considerar como un miembro de la familia de las inmunoglobulinas, ya que presenta una estructura globular similar a los dominios presentes en las Igs y moléculas del MHC.

El péptido, además de ser el componente antigénico, está implicado en la estabilización del complejo de clase I. Aunque pueden existir complejos binarios cadena pesada/b2-microglobulina en la membrana plasmática, estos son mucho más inestables y tienen un recambio más elevado. El péptido antigénico tiene un tamaño que oscila entre 8 y 9 residuos aminoacídicos, y presenta dos motivos de anclaje en posición 2 y 8/9 que son constantes en la mayoría de los péptidos que se unen a un alelo específico de clase I.

El ensamblaje del complejo, en el cual el péptido tiene un papel fundamental, ocurre en el retículo endoplasmático (RE). En el procesamiento antigénico y en el posterior transporte de los péptidos resultantes intervienen dos tipos de proteínas, unas que forman parte del complejo del proteosoma y otras situadas en la membrana del RE y que son transportadores.

El proteosoma es un gran complejo proteolítico citoplasmático. Son estructuras relativamente abundantes en células eucariotas, están evolutivamente muy conservadas y parece que están involucradas en el turnover de la mayoría de las proteínas no lisosómicas. El proteosoma tiene una estructura cilíndrica multimérica, y dos de las subunidades que lo constituyen están codificadas por genes situados en la región II del MHC. Estas subunidades denominadas LMP-2 y LMP-7, son fundamentales en el procesamiento antigénico. Se ha sugerido que durante la evolución del sistema inmune, el proteosoma se habría tomado como soporte para aceptar estas dos nuevas subuni-

dades, de forma que se modificaría la acción del complejo para producir péptidos que se uniesen mejor a la molécula de clase I. Estas dos subunidades consiguen que el proteosoma corte mas eficientemente los péptidos detrás de residuos básicos e hidrofóbicos.

Los transportadores, denominados genéricamente TAP, consiguen que los péptidos generados por el proteosoma sean translocados al lumen del RE. Existen dos isoformas de estos transportadores de péptidos: TAP-1 y TAP-2, están codificados por genes diferentes y estrechamente ligados a los genes *Imp*. Los transportadores forman heterodímeros situados en la membrana del RE y cuyo dominio transmembrana forma un poro, a través del cual el péptido es translocado. Esta translocación es dependiente de ATP, dependiendo además del tamaño del péptido, entre 6 y 15 residuos, y del aminoácido carboxiterminal. Las moléculas TAP son polimórficas, aunque la magnitud de este polimorfismo varía dependiendo de la especie, en humanos TAP-1 Y TAP-2 son poco polimórficos.

Una vez que el péptido ha sido generado éste pasaría al transportador bien por una interacción directa entre ambas estructuras o por mediación de chaperonas que impedirían que el péptido fuese degradado en el citosol.

3. Distribución tisular y función de las moléculas de clase-I

a) Distribución histológica

Las moléculas de clase I se expresan en la mayoría de las células somáticas, aunque el nivel de expresión es tejido específico, encontrándose los mayores niveles en el tejido linfoide. Los niveles más bajos se encuentran en células endocrinas del tiroides, paratiroides e islotes de Langerhans, así como en miocardio, músculo, mucosa gástrica y hepatocitos. Los tejidos que son prácticamente negativos son el epitelio de la córnea, glándulas de Brunner, vellosidades trofoblásticas, neuronas, porción exocrina del páncreas y células acinares del paratiroides. Las moléculas clásicas (A,B,C), no se expresan en espermatozoides humanos, oocitos y cigoto. Tampoco se han detectado sobre citotrofoblasto o sincitiotrofoblasto de placenta humana, esto puede suponer una estrategia biológica que evite una respuesta inmune alogénica de la madre al feto. En contraste, los genes de clase I no clásicos son expresados en placenta, bien a nivel de superficie, HLA-G, o a nivel de RNAm, HLA-E,. Su función es todavía desconocida, aunque ambos pueden unir péptidos.

b) Función de las moléculas de clase I

La función principal de las moléculas de clase I es presentar un antígeno a una subpoblación de linfocitos T (CD8+), ésta presentación determina la

lisis unidireccional de la célula presentadora por parte del linfocito T, aunque también puede suponer una señal supresora dentro del marco de la respuesta inmune. Los linfocitos T (CD8+) se encuentran bajo el control de la subpoblación CD4+ (helper), que produce diversas citocinas, tras la activación restringida por las moléculas de clase II. Los linfocitos T, al contrario que los linfocitos B, son incapaces de reconocer el antígeno aislado, sino que necesitan que este sea procesado y presentado en el contexto del MHC por la célula presentadora, además se necesita la identidad del MHC por parte de ambas células, en un fenómeno conocido como restricción de las células T por el MHC. Existe otro tipo de restricción que afecta al tipo de antígeno reconocido por los linfocitos T, ya que únicamente reconocen antígenos de origen peptídico. Aunque siempre se ha conocido una asociación funcional entre HLA clase-I y linfocitos T (CD8), parece que también las células NK pueden estar condicionadas en su función por ciertas moléculas de clase I.

El receptor de los linfocitos T (TCR) está compuesto por un heterodímero transmembrana, que ha sido dividido en dos clases dependiendo de los tipos de cadenas polipeptídicas asociadas: Receptor alfa/beta y gamma/delta. Ambas clases de receptores están asociados al complejo CD3. La molécula CD8 que define a los linfocitos citotóxicos/supresores reconoce residuos no polimórficos de la cadena pesada de clase I. No está claro, sin embargo, si el TCR interactúa con residuos de la cadena pesada, en la hendidura de unión del péptido, o sólo con el péptido unido. La mayoría de las células normales expresan clase I, portando péptidos propios, muchos de origen desconocido y otros pertenecientes a proteínas ribosomales o proteínas relacionadas con el ciclo celular; sin embargo los linfocitos T pueden discriminar entre péptidos propios y no propios. Actualmente se acepta que los linfocitos T son "educados" en el timo y sometidos a una selección positiva, en contra de aquellos linfocitos con una reactividad nula frente a moléculas propias de clase I, que son delecionados, y negativa para aquellos linfocitos que muestran una elevada reactividad. El resultado es una población de efectores que presentan una afinidad intermedia por el complejo MHC-péptido propio.

El reconocimiento por parte de los linfocitos citotóxicos de péptidos antigénicos que se pueden generar en cualquier célula del organismo, es importante para el reconocimiento de patógenos intracelulares, que son destruidos impidiendo su diseminación, o de aquellas células que sufren transformación tumoral y que expresan antígenos propios mutados o bien antígenos propios no sintetizados desde etapas muy tempranas del desarrollo.

Las células NK son células citotóxicas que no tienen receptor TCR, y que son capaces de lisar células tumorales o infectadas por virus sin una estimulación previa, estas células son linfocitos granulares grandes (LGL).

Actualmente se desconoce si las células T y NK derivan de un mismo precursor o de diferentes. Aunque las células NK lisan sus dianas no restringidas por clase I, si que se afectan por los niveles de expresión, siendo más sensibles aquellas células que no expresan estas moléculas. Se piensa que pueden inducir una señal negativa a las células NK a través de unos receptores no relacionados con el TCR. Se ha propuesto que las células NK podrían constituir un segundo frente de ataque contra células tumorales o infectadas por patógenos intracelulares que pueden alterar la expresión de las moléculas de clase I.

4. Alteraciones de expresión de clase I en tumores humanos

Con la primera descripción de anticuerpos monoclonales capaces de reconocer epitopos conformacionales de un antígeno HLA, y el trabajo en secciones de tejidos, en diversos laboratorios se comenzó a detectar ausencia de reactividad en algunas muestras tumorales. Pronto aparecieron evidencias de que una proporción de tumores derivados de epitelios HLA positivos no reaccionaban con monoclonales anti-cadena pesada o anti-b2m. Posteriormente se observó que eran muchos los mecanismos que podían estar implicados en la interrupción de la maquinaria requerida para la síntesis de una molécula HLA funcional. La consecuencia final de estas alteraciones es la ausencia total o parcial de algunos alelos HLA en las células tumorales.

La existencia de anticuerpos monoclonales anti-HLA capaces específicamente de detectar HLA-A y HLA-B ayudaron a definir pérdidas de locus HLA-A y B en células tumorales. Mas recientemente, diferentes anticuerpos anti-HLA que definen especificidades alélicas han estado disponibles para el estudio de secciones tisulares, lo que hace posible la detección de pérdidas alélicas.

Los datos de los primeros análisis utilizando anticuerpos alelo específicos muestran que alrededor del 60-70% de los tumores tienen alteraciones particulares de HLA, aunque aún no se dispone de un panel lo suficientemente amplio para cubrir todos los alelos, se puede predecir que el porcentaje de tumores que pueden presentar alteraciones podría estar cercano al 90-95%.

Estas alteraciones se han detectado en diferentes tipos de tumores, y parecen ocurrir cuando el tumor rompe la membrana basal y se hace invasivo. Posiblemente las variantes HLA negativas existieran en lesiones pre-malignas, pero no detectables hasta estados posteriores, debido a la limitada sensibilidad de la técnica usada.

5. Mecanismos implicados en la alteración de la expresión de clase I en células tumorales

Las células tumorales escapan al reconocimiento inmune a través de múltiples y heterogéneos mecanismos. En realidad cada paso en la síntesis de la molécula de clase I puede ser diana de una alteración que resulta en la ausencia de una molécula particular (Tabla II).

TABLA I.

Mecanismos generales de supresión de expresión de moléculas HLA en células tumorales

Mecanismo de supresión	Nivel de alteración
Cadena pesada	Reducción de la transcripción <ul style="list-style-type: none"> - Descenso de factores transcripcionales positivos - Aumento de factores inhibidores de la transcripción Pérdidas de genes HLA Interferencia en el proceso de ensamblaje cadena pesada/péptido <ul style="list-style-type: none"> - Retención de moléculas HLA por interacción con proteínas virales - Inhibición de la glicosilación - Aumento de la degradación de las moléculas HLA
β_2 -microglobulina	Mutaciones en el gen de la β_2 -m
TAP	Reducción de las proteínas transportadoras de péptidos al retículo endoplásmico

a) Pérdida de genes HLA

Debido a la alta frecuencia de pérdida total de antígenos HLA en tumores, parece poco probable que existan mutaciones o deleciones en las regiones codificantes de la cadena pesada de estos genes, ya que estos cambios necesariamente implicarían múltiples mutaciones, de hecho en casos donde la pérdida total de expresión es evidente no se ha encontrado ningún tipo de reordenamiento genético en los genes HLA-ABC. Sin embargo, se ha demostrado que mutaciones puntuales, reordenamiento genéticos y pérdida genómica de los genes que codifican la cadena pesada están involucrados en la pérdida de expresión de uno o más alelos. La pérdida de los genes de la cadena pesada ha sido observada después de una irradiación gamma en la línea linfoblastoide B, se ha sugerido también que las pérdidas genómicas pueden explicar la alta incidencia de pérdida de una única especificidad en el *locus* HLA-A en líneas de carcinomas de colon, además en líneas de melanoma ha sido aportada una pérdida de heterocigosidad. Recientemente se ha encontrado una pérdida haplotípica en tejido canceroso de páncreas y en su corres-

pondiente línea tumoral derivada. La ausencia alélica de A30 y B14 de la línea tumoral pancreática IMIM-PC-2 es debida a una pérdida genómica en el cromosoma 6, la característica de este tipo de lesión es la ausencia de respuesta a gamma interferón.

b) Ausencia de factores transcripcionales

La expresión constitutiva e inducible de los genes de clase I está regulada por secuencias reguladoras en cis. A estas secuencias se unen factores proteicos asociados a la expresión de clase I y relacionados con la alteración de HLA, de hecho, la unión alterada de los factores regulatorios NFkB/KBF1 a la secuencia potenciadora de clase I fue descrita en líneas celulares que perdían la expresión de antígenos de clase I. Los factores transcripcionales *locus* específicos han sido también implicados en aquellas líneas tumorales con una expresión defectiva de *locus*, de esta forma se ha descrito una regulación diferencial de HLA-A versus HLA-B. El potenciador de HLA-A contiene dos motivos de unión para k-B, mientras que el potenciador de HLA-B tiene sólo uno.

c) Activación de oncogenes

La activación oncogénica propia de las células tumorales, puede afectar también a la expresión de clase I, ya que algunos productos oncogénicos pueden mediar uniones alteradas de factores de transcripción. La expresión de clase I es deprimida por N-myc y c-myc en líneas de neuroblastoma y melanoma. Existe una clara diferencia entre el mecanismo que involucra a c-myc y N-myc: la expresión de c-myc está relacionada con la inhibición *locus* específica, principalmente de alelos HLA-B, mientras que N-myc modula negativamente todas las moléculas de clase I. Además, mientras que los efectos sobre la expresión de clase I de N-myc están regulados a través del potenciador A, el efecto mediado por c-myc parece involucrar diferentes elementos localizados en el corazón del promotor. La relación inversa entre mRNA de clase I y mRNA de c-myc observada en líneas de melanoma, no está presente en otros melanomas, neuroblastomas o en líneas de carcinoma de pulmón. Otros oncogenes han sido también implicados en la inhibición de la expresión de clase I: c-jun, K-ras, N-ras y H-ras. La inactivación de genes supresores de tumor, se cree que puede ser importante en el desarrollo de una transformación maligna. Hasta el momento, cambios en la expresión del MHC no han sido relacionados con la pérdida de función de genes supresores de tumor.

d) mutaciones en b2-microglobulina

Han sido mostrados diferentes mecanismos moleculares que inducen una baja expresión de clase I a través de un defecto en b2m. La importancia de esta cadena en el control de la expresión de los antígenos de clase I se observó en células Daudi y en una línea de linfoma de Burkitt. La línea Daudi no expresa clase I debido a la presencia de una mutación en el codón de iniciación, la síntesis de un mensajero anormal induce una baja eficiencia en su unión a los ribosomas.

La línea de melanoma FO-1, tampoco expresa antígenos de clase I, y no los adquiere con el tratamiento con gamma interferón, este defecto está causado por la pérdida de transcripción del gen de la b2m, debido a una deleción que implica al primer exón y un segmento del primer intrón. La pérdida de la expresión de clase I por la línea de melanoma SK-MEL-33 es causada por una guanosina delecionada en el gen de la b2m, que implica un cambio de lectura y la introducción de un codón stop. La expresión de clase I se puede reconstituir por transfección o ensayo de fusión celular. Esta alteración molecular representa una mutación somática adquirida durante la progresión del tumor. Se ha encontrado que las mutaciones en el gen de la b2m se correlacionan con su expresión, la pérdida de la expresión de b2m fue vista en líneas homocigotas para una mutación, o heterocigotas para dos mutaciones, mientras que la expresión reducida se ha correlacionado con una mutación en un alelo.

Existe una zona hipermutable dentro del primer exón del gen de la b2m que contribuye a la alteración molecular detectada en algunas líneas tumorales. Esta hipótesis ha sido confirmada secuenciando las mutaciones en líneas de tumor colorrectal, que mostraron que una repetición de 8pb CT en la secuencia del péptido líder era especialmente variable. Son necesarias pruebas de estas mutaciones en el contexto de la inestabilidad genómica, las cuales pueden jugar un último papel causal en la tumorigénesis, en este contexto es interesante que las líneas celulares Lovo, HCT-15 y DLD-1, que contienen mutaciones en el gen de la b2m, expresen el fenotipo mutador. Estos descubrimientos sugieren una interrelación entre el efecto de selección de las mutaciones de la b2m que inician la pérdida de la expresión de clase I y el fenotipo mutador.

e) Anormalidades en los genes transportadores de péptidos

El transporte de las moléculas de clase I a la superficie depende de su ensamblaje con los péptidos derivados de una fuente intracelular, los péptidos juegan un papel crucial en el establecimiento de la estructura de clase I

en el RE. Las alteraciones en el procesamiento peptídico son objetivos potenciales durante la tumorigénesis y confieren ventajas en la respuesta evasiva del tumor. La identificación de células mutantes en el procesamiento antigénico ayudó a determinar la maquinaria necesaria para el procesamiento endógeno de las proteínas sintetizadas.

Se han identificado en células de carcinoma de células pequeñas de pulmón, deficiencias en el procesamiento antigénico, ellos encontraron bajos niveles de mensajero de componentes del proteosoma y transporte de péptidos. La pérdida de la expresión de TAP-1 se ha encontrado también en un alto porcentaje de carcinoma cervical humano.

f) Modulación de la expresión de clase I por infecciones virales

Diversos mecanismos pueden contribuir a una bajada de expresión de clase I por infecciones virales. Los virus DNA frecuentemente afectan al ensamblaje y transporte de las moléculas de clase I hacia la superficie, este transporte depende del ensamblaje en el RE con péptidos generados en el citosol. Existen evidencias convincentes de que muchos virus afectan a este proceso, la proteína del Adenovirus tipo 2 E3/19K inhibe el transporte a la superficie debido a que se une a los péptidos clase I, que permanecen así en el RE. En células infectadas por el virus Ad12, los niveles de mensajero de los transportadores se encuentran reducidos, y en aquellas células infectadas por el virus del herpes simple 1 y 2, la molécula de clase I no llega a ser glicosilada y transportada al aparato de Golgi.

Finalmente, el virus de Epstein-Barr (EBV) supone un excelente ejemplo de estrategias virales múltiples que favorecen la larga supervivencia de las células infectadas en hospedadores inmunocompetentes. En líneas de linfoma de Burkitt se ha documentado una bajada de expresión alelo-selectiva de moléculas de clase I, el defecto aleloselectivo puede ser parcialmente dependiente de defectos en el procesamiento antigénico.

En otros casos, el control viral de la expresión de clase I afecta los niveles de mensajero de la cadena pesada. El virus del sarcoma de Rous induce la inhibición de expresión de mensajero en fibroblastos humanos. La bajada de expresión de clase I en tumores transformados por el virus Ad12 ocurre tanto en niveles transcripcionales como postranscripcionales, el producto del gen E1A reprime la acumulación de mensajero de clase I. El oncogén E1A también media una trans-represión de la transcripción de clase I, reprimiendo su potenciador.

6. Repercusiones de la pérdida de expresión de antígenos HLA en la inmunoterapia del cáncer

El cáncer es el resultado de un proceso multifásico que involucra mutaciones, que cuando resultan ventajosas, determinan la selección y expansión de una determinada población celular. Los tumores pueden presentar antígenos capaces de despertar una respuesta celular mediada por células citotóxicas. En este sentido, la inmunología tumoral está evolucionando hacia el conocimiento y la manipulación de las respuestas mediadas por linfocitos T. Aunque, la respuesta inmunológica antitumoral es frecuentemente débil e irrelevante para controlar el crecimiento tumoral *in vivo*, sin embargo, se está demostrando actualmente que ésta se puede manipular y hacer eficiente para controlar el crecimiento de los tumores. La mayoría de las estrategias van dirigidas hacia el aumento de la inmunogenicidad de las células tumorales, sin que ello implique, el tener que conocer la naturaleza molecular de los antígenos tumorales, que es por otra parte muy variada: proteínas alteradas “irrelevantes”, proteínas oncogénicas, proteínas de naturaleza viral, etc.

Al margen de que se ha demostrado que algunas células tumorales pueden secretar sustancias que resultan inmunosupresoras para el sistema inmune, una variedad de mecanismos hacen también a las células tumorales debilmente inmunogénicas y explica el que células con un potencial amplio espectro de epitopos-T que pueden ser presentados en el contexto de las moléculas del MHC escapen al reconocimiento de las células T específicas. Así por ejemplo, dado que la mayoría de los tumores son derivados de tejido parenquimatoso o mesenquimal y que células tumorales procedentes de estos tejidos no expresan moléculas coestimuladoras para las células T (B7), se cree que aunque las células presentaran antígenos específicos de tumor, la estimulación de los linfocitos T sería insuficiente. Experiencias de introducción del gen B7 en tumores experimentales murinos han demostrado que las células pasan a ser inmunogénicas.

Sin embargo el mayor impedimento para el desarrollo de estrategias de inmunoterapia lo constituye la aparición de células con pérdida de expresión de moléculas del MHC, como una etapa más del proceso continuo de mutación y selección del que se hablaba al principio. Es hoy generalmente aceptado que estas alteraciones que ocurren con cierta frecuencia en los tumores humanos, pueden conducir al escape de la respuesta inmunológica de linfocitos T restringidos, por la interrupción del proceso de presentación antigénica. En algunos tumores estas alteraciones conducen a una ausencia total de expresión de moléculas HLA. Sin embargo, la prueba más consistente de la participación de un proceso de inmunoselección, es la comprobación de la existencia de pérdidas que afectan a uno o más alelos. Hay que tener en

cuenta, que de nada sirve que las células tumorales expresen otras moléculas HLA de clase I si el antígeno de rechazo es presentado en el contexto de la que se ha perdido. Si la expresión de MHC de clase I puede ser restituida en la célula tumoral por citoquinas tales como IFN-gamma y/o TNF-alfa la inducción de respuestas mediadas por CTL puede ser recuperada. Sin embargo, a veces esto no sucede así y la alteración resulta irreversible. Nuestro grupo ha puesto de relieve en tejido tumoral pancreático y en líneas tumorales autólogas un mecanismo nuevo, que involucra la delección de grandes segmentos génicos de la región HLA que se traducen en pérdida haplotípica. Esta pérdida de heterocigosidad ha sido observada también en líneas tumorales de melanoma y de cáncer de colon aunque en estos estudios no se disponía del tejido autólogo tumoral. Otras alteraciones moleculares que conducen a irreversibilidad en la expresión de antígenos HLA es producida por mutaciones en el gen de la b2-microglobulina. Los primeros estudios revelan que tumores con fenotipo "mutator" contienen frecuentemente mutaciones en este gen, lo cual parece indicar, la importancia selectiva de estas mutaciones durante la progresión tumoral. En este sentido, el que la única función conocida para la b2-microglobulina sea participar en la respuesta inmune como un componente de las moléculas HLA apoyaría que la selección de mutaciones de este gen tenga como misión el escape a la inmunovigilancia T.

En este sentido, el sistema inmune puede jugar un papel importante seleccionando clones celulares del tumor que han perdido una molécula crucial de HLA requerida en un individuo particular para presentar el péptido correspondiente que actúe como antígeno tumoral. Esto da como resultado una diana tumoral HLA-defectiva.

Se ha demostrado que la reducción de expresión de clase I se correlaciona significativamente con tumores pobremente diferenciados en laringe, mama, pulmón y carcinoma de células basales. La relación entre la pérdida de expresión y el menor grado de diferenciación tumoral apoya la asunción de que la pérdida de antígenos de clase I pueden empeorar el pronóstico. Estos carcinomas de laringe y de mama que pierden la expresión de clase I son más agresivos y tienen un peor pronóstico, de igual forma los melanomas que muestran pérdidas de clase I son más invasivos y tienen mayor capacidad metastásica. Además los tumores de células pequeñas de pulmón negativos, progresan y metastatizan antes. En cáncer cervical y carcinomas tempranos, se ha visto un peor pronóstico si presentan una alteración en la expresión de clase I. No obstante debe quedar claro que la asociación entre pérdida de clase I e invasividad tumoral y diferenciación está todavía cuestionada, ya que se han obtenido resultados contradictorios en tumores originados en diferentes tejidos.

Finalmente se ha mostrado recientemente que un gen HLA-B27 puede ser transfectado directamente dentro de un melanoma negativo para dicho antígeno sin efectos tóxicos para el paciente. Complejos DNA-liposoma han sido inyectados localmente dentro de lesiones tumorales, siendo detectada la proteína recombinante HLA-B27 en la biopsia tumoral. Este gen transfectado también generó un incremento en la frecuencia de precursores CTLs anti HLA-B27. En un paciente, se obtuvo una total remisión del melanoma. Estos trabajos pioneros apuntan la posibilidad de diseñar protocolos para pacientes cuyos tumores tienen una total o parcial pérdida de moléculas de clase I.

7. Referencias

1. Bernards R, Dessain SK, Weinberg RA (1986) N-myc amplification causes down-modulation of MHC class I antigen expression in neuroblastoma. *Cell* 47, 667
2. Bicknell DC, Rowan A, Bodmer WF (1994) Beta 2-microglobulin gene mutations: a study of established colorectal cell lines and fresh tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 4751
3. Bjorkman, P. J., and Parham P. (1990) Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annu. Rev. Biochem* 59, 253.
4. Campbell RD and Trowsdale J (1993) Map of the human MHC. *Immunol. Today* 14, 349
5. Cromme FV, Airey J, Heemels MT, Ploegh HL, Ketaing PJ, Stern PL, Meijer CJLM, Walboomers JMM (1994) Loss of transporter protein encoded by the TAP-1 gene, is highly correlated with loss of HLA expression in cervical carcinomas. *J. Exp. Med.* 179, 335
6. D'Urso CM, Wang Z, Cao Y, Tataka R, Zeff RA, Ferrone S (1991) Lack of HLA class I antigen expression by cultured melanoma cells FO-1 due to a defect in B2m gene expression. *J. Clin. Invest* 87, 284
7. Garrido F and Ruiz Cabello F (1991) MHC expression on human tumors-its relevance for local tumor growth and metastasis. *Semin. Cancer. Biol.* 2, 3
8. Garrido F, Cabrera T, Concha A, Glew S, Ruiz-Cabello F, Stern P (1993) Natural history of HLA expression during tumor development. *Immunology. Today* 14, 491
9. Germain RN and Margulies DH (1993) The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 403

10. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M (1993) Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 363, 558
11. Lopez Nevot MA, Esteban F, Ferron A, Gutierrez J, Oliva MR, Romero C, Huelin C, Ruiz Cabello F, Garrido F (1989) HLA class I gene expression on human primary tumours and autologous metastases: demonstration of selective losses of HLA antigens on colorectal, gastric and laryngeal carcinomas. *Br. J. Cancer* 59, 221
12. Peinado MA, Malkhosyan S, Velazquez A, Perucho M (1992) Isolation and characterization of allelic losses and gains in colorectal tumors by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 10065
13. Plautz GE, Yang ZY, Wu BY, Gao X, Huang L, Nabel GJ (1993) Immunotherapy of malignancy by in vivo gene transfer into tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 4645
14. Redondo M, Concha A, Oldiviela R, Cueto A, Gonzalez A, Garrido F, Ruiz Cabello F (1991a) Expression of HLA class I and II antigens in bronchogenic carcinomas: its relationship to cellular DNA content and clinical-pathological parameters. *Cancer. Res.* 51, 4948
15. Restifo NP, Esquivel F, Kawakami Y, Yewdell JW, Mule JJ, Rosenberg SA, Bennink JR (1993) Identification of human cancers deficient in antigen processing. *J. Exp. Med.* 177, 265
16. Rotem-Yehudar R WS, Sela S. (1994) Downregulation of peptide transported genes in cell lines transformed with the highly oncogenic adenovirus 12. *J Exp Med* 180:477-488.
17. Ruiz Cabello F, Klein E, Garrido F (1991) MHC antigens on human tumors. *Immunol. Lett.* 29, 181
18. Smith GL (1994) Virus strategies for evasion of the host response to infection. *Trends. Microbiol.* 2, 81
19. Townsend A and Bodmer H (1989) Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 7, 601
20. Von Boehmer H (1994) Positive selection of lymphocytes. *Cell* 76, 219
21. Wang Z, Cao Y, Albino AP, Zeff RA, Houghton A, Ferrone S (1993) Lack of HLA class I antigen expression by melanoma cells SK-MEL-33 caused by a reading frameshift in beta 2-microglobulin messenger RNA. *J.Clin.Invest.* 91, 684
22. Zinkernagel RM and Doherty PC (1974) Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 248, 701