

UNIVERSIDAD DE GRANADA

HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DE LAS NIVES

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**ESTUDIO DE LOS MECANISMOS
MOLECULARES CAUSANTES DE
ALTERACIONES EN LA EXPRESIÓN DE
MOLÉCULAS HLA DE CLASE I EN
TUMORES HUMANOS DE VEJIGA**

TESIS DOCTORAL

GRANADA 2005

José María Romero Noguera

Dra. D^a. María Teresa Cabrera Castillo, Profesora
Doctora de Inmunología en la Universidad de Granada.

Certifico que el presente trabajo de investigación titulado "ESTUDIO DE LOS MECANISMOS MOLECULARES CAUSANTES DE ALTERACIONES EN LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS HLA DE CLASE I EN TUMORES HUMANOS DE VEJIGA" ha sido realizado bajo mi dirección por D. José María Romero Noguera para optar al grado de Doctor.

Granada, 22 de Noviembre de 2005.

María Teresa Cabrera Castillo

Dr. D. Francisco Ruiz-Cabello Osuna, Jefe de Sección del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Virgen de las Nieves y Profesor Asociado a tiempo parcial de Inmunología en la Universidad de Granada.

Certifico que el presente trabajo de investigación titulado "ESTUDIO DE LOS MECANISMOS MOLECULARES CAUSANTES DE ALTERACIONES EN LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS HLA DE CLASE I EN TUMORES HUMANOS DE VEJIGA" ha sido realizado bajo mi dirección por D. José María Romero Noguera para optar al grado de Doctor.

Granada, 22 de Noviembre de 2005.

Francisco Ruiz-Cabello Osuna

Dra. D^a. Pilar Jiménez Gámiz, Facultativa Especialista de Área del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada.

Certifico que el presente trabajo de investigación titulado "ESTUDIO DE LOS MECANISMOS MOLECULARES CAUSANTES DE ALTERACIONES EN LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS HLA DE CLASE I EN TUMORES HUMANOS DE VEJIGA" ha sido realizado bajo mi dirección por D. José María Romero Noguera para optar al grado de Doctor.

Granada, 22 de Noviembre de 2005.

Pilar Jiménez Gámiz.

UNIVERSIDAD DE GRANADA

HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DE LAS NIVES

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**ESTUDIO DE LOS MECANISMOS
MOLECULARES CAUSANTES DE
ALTERACIONES EN LA EXPRESIÓN DE
MOLÉCULAS HLA DE CLASE I EN
TUMORES HUMANOS DE VEJIGA**

TESIS DOCTORAL

GRANADA 2005

Publicaciones relacionadas con la siguiente tesis:

-Coordinated downregulation of the antigen presentation machinery and HLA class I/beta2-microglobulin complex is responsible for HLA-ABC loss in bladder cancer.

Int J Cancer. 2005 Feb 10; 113(4):605-10.

Romero, J. M.; Jiménez, P.; Cabrera, T.; Cózar, J. M.; Pedrinaci, S.; Tallada, M.; Garrido, F.; Ruiz-Cabello, F.

-LOH at 6p21.3 region and HLA class I altered phenotypes in bladder carcinomas.

Immunogenetics (sometido a revisión).

Isabel Maleno, José María Romero, Teresa Cabrera, Laura Paco, Natalia Aptsiauri, José Manuel Cozar, Miguel Tallada, Miguel Ángel López-Nevot, Federico Garrido.

- Expression of HLA class I, cytokines and chemokines in primary tumors from patients with localized and metastatic renal cell carcinoma.

Cancer Immunol Immunother (sometido a revisión)

José María Romero, Natalia Aptsiauri, José Manuel Cozar, Julia Cantón, Teresa Cabrera, Miguel Tallada, Federico Garrido, Francisco Ruiz-Cabello

Primum vivere, deinde philosophare
(primero vivir, después filosofar).

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Federico Garrido, Jefe de Servicio de Análisis Clínicos del H.U. Virgen de las Nieves de Granada y Catedrático de Inmunología de la Universidad de Granada, por su asesoramiento, ideas y por conseguir con su esfuerzo los recursos materiales y humanos necesarios para realizar el presente trabajo de investigación.

A la Dra. Teresa Cabrera, Dr. Francisco Ruiz-Cabello y Dra. Pilar Jiménez, por su asesoramiento, ideas y su mucha paciencia en formarme como investigador y en la corrección del presente trabajo.

A todas las personas del laboratorio que han hecho del presente trabajo una tarea agradable.

A mi familia.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1. Características de los tumores de vejiga..... | 3 |
| 1.1. Prevalencia y distribución mundial..... | 3 |
| 1.2. Factores de riesgo..... | 3 |
| 1.2.1. Ambientales..... | 3 |
| 1.2.2. Genéticos..... | 6 |
| 1.3. Morfología de los carcinomas vesicales de células transicionales..... | 7 |
| 1.3.1. Microanatomía vesical normal..... | 7 |
| 1.3.2. Grado de diferenciación..... | 8 |
| 1.3.3. Extensión local..... | 9 |
| 2. Carcinogénesis..... | 10 |
| 2.1. Genes alterados en los carcinomas de vejiga..... | 11 |
| 2.2. Alteraciones en el cariotipo..... | 14 |
| 2.3. Pérdidas de heterocigosidad..... | 14 |
| 2.4. Vías de la carcinogénesis en vejiga..... | 15 |
| 3. El complejo mayor de histocompatibilidad..... | 17 |
| 3.1. Moléculas del MHC..... | 17 |
| 3.1.1. Moléculas MHC de clase I..... | 17 |
| 3.1.2. Moléculas MHC de clase II..... | 18 |
| 3.2. Genes de la región HLA..... | 19 |
| 3.2.1. Genes de la región HLA de clase I..... | 19 |
| 3.2.2. Genes de la región HLA de clase II..... | 20 |
| 3.2.3. Genes de la región HLA de clase III..... | 20 |

| | | |
|----------|---|----|
| 3.3. | Función biológica..... | 21 |
| 3.3.1. | Reconocimiento antigénico mediado por el linfocito T..... | 21 |
| 3.3.2. | Inhibición de la función efectora de las células NK..... | 22 |
| 3.3.3. | Diferenciación tímica..... | 23 |
| 3.4. | Maquinaria del procesamiento antigénico..... | 23 |
| 3.4.1. | Procesamiento de péptidos antigénicos endógenos..... | 23 |
| 3.4.2. | Procesamiento de péptidos antigénicos exógenos..... | 25 |
| 4. | Inmunología tumoral..... | 27 |
| 4.1. | Introducción histórica..... | 27 |
| 4.2. | Antígenos asociados a tumor..... | 28 |
| 4.2.1. | Antígenos normalmente expresados en línea germinal de testículo..... | 29 |
| 4.2.2. | Antígenos producidos por mutaciones en genes normales..... | 29 |
| 4.2.3. | Antígenos derivados de moléculas presentes en células normales sobreexpresadas en tumores y antígenos de diferenciación..... | 30 |
| 4.2.4. | Antígenos virales..... | 30 |
| 4.3. | Respuesta inmune frente a tumores..... | 30 |
| 4.3.1. | Mecanismos de escape tumoral frente al sistema inmune..... | 31 |
| 4.3.1.1. | Alteraciones en la expresión de moléculas HLA de clase I..... | 31 |
| 4.3.1.2. | Pérdida de antígenos tumorales..... | 36 |
| 4.3.1.3. | Pérdida de la señalización de muerte celular..... | 36 |
| 4.3.1.4. | Producción de citoquinas inmunosupresoras..... | 36 |
| 4.3.1.5. | Producción de ligandos peptídicos alterados..... | 37 |
| 4.3.1.6. | Apoptosis de linfocitos T activados..... | 38 |
| 4.4. | Inmunoterapia en el cáncer de vejiga..... | 38 |
| 4.4.1. | Uso del bacilo de Calmet y Guérin en el carcinoma vesical..... | 38 |

| | |
|---|----|
| OBJETIVOS | 57 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 61 |
| 1. Pacientes y material de estudio..... | 63 |
| 2. Metodología de estudio de alteraciones de moléculas HLA clase I en tejidos tumoraes microdisectados de vejiga..... | 67 |
| 2.1. Técnica de microdissección..... | 67 |
| 2.1.1. Técnica de microdissección para ADN..... | 68 |
| 2.1.2. Técnica de microdissección para ARN..... | 69 |
| 2.2. Extracción de ADN..... | 70 |
| 2.3. Extracción de ARN..... | 70 |
| 2.4. Retrotranscripción..... | 70 |
| 2.5. Estudio de pérdida de heterocigosidad en cromosomas 6 y 15..... | 71 |
| 2.6. Tipaje genómico..... | 75 |
| 2.7. Inestabilidad de microsatélites..... | 76 |
| 2.8. Análisis de mutaciones..... | 78 |
| 2.8.1. En la secuencia de β 2-microglobulina en tumores con pérdida total de expresión de moléculas HLA de clase I | 78 |
| 2.8.2. En la secuencia del locus HLA-B en tumores con pérdida de expresión de un alelo B..... | 79 |
| 2.9. Southern Blot..... | 80 |
| 2.10. Estudio de diferencias transcripcionales entre tumores de baja expresión de moléculas HLA clase I y tumores HLA clase I positivos y negativos..... | 84 |
| 2.11. Análisis estadístico..... | 89 |

| | |
|--|-----|
| RESULTADOS | 93 |
| 1. Estudio de mecanismos implicados en la pérdida de expresión de moléculas HLA de clase I en carcinomas humanos de vejiga..... | 95 |
| Estudio de pérdida de heterocigosidad en cromosomas 6 y 15 en combinación con expresión de HLA de clase I..... | 95 |
| Cromosoma 6..... | 97 |
| Cromosoma 15..... | 103 |
| Estudio de mutaciones en alteraciones alelo específicas..... | 107 |
| Estudio de mecanismos implicados en la pérdida de expresión generalizada de moléculas HLA clase I..... | 108 |
| Estudio de alteraciones en β 2-microglobulina..... | 108 |
| Estudio de inestabilidad de microsatélites..... | 108 |
| Secuenciación del ARNm del gen de la β 2m..... | 110 |
| Estudio del grado de metilación génica en HLA de clase I..... | 111 |
| Cuantificación de niveles de transcripción de los genes de moléculas del complejo HLA de clase I y de la maquinaria de procesamiento antigénico..... | 114 |
| Genes de referencia y control..... | 114 |
| Genes involucrados en el procesamiento y presentación antigénica mediada por moléculas HLA de clase I..... | 115 |
| Análisis de los resultados..... | 120 |
| Especificidad de los amplificadores..... | 120 |
| Análisis estadístico de los resultados..... | 121 |

| | |
|---|------------|
| 2. Implicaciones pronósticas de las alteraciones de expresión de HLA de clase I..... | 122 |
| DISCUSIÓN..... | 127 |
| 1. Introducción..... | 134 |
| 2. Inmunohistoquímica y pérdida de heterocigosidad..... | 135 |
| 3. Mecanismos de pérdida generalizada de expresión de HLA de clase I..... | 136 |
| 3.1. Inestabilidad de microsatélites, mutaciones en $\beta 2m$ y metilación génica... | 137 |
| 3.2. Descenso generalizado de la transcripción de los genes de HLA de clase I y de la maquinaria de procesamiento antigénico..... | 138 |
| 4. Implicaciones pronósticas y terapéuticas de las alteraciones de expresión de HLA de clase I..... | 142 |
| CONCLUSIONES..... | 151 |

INTRODUCCIÓN

1. CARACTERÍSTICAS DE LOS TUMORES DE VEJIGA

1.1. PREVALENCIA Y DISTRIBUCIÓN MUNDIAL

El cáncer de vejiga ocupa en el varón entre el 4º y 7º lugar en cuanto a frecuencia dentro de las enfermedades neoplásicas mientras que en la mujer se sitúa el 14º más frecuente (Ro et al., 1987). Las variaciones de las tasas de incidencia son de hasta ocho veces mayores al comparar distintas zonas del planeta, aunque puede comprobarse una incidencia tres veces superior en países industrializados. La localización de la mayoría de los tumores vesicales es superficial (70%) y únicamente el 15% de estos tumores tiene probabilidades de progresar, con riesgo de muerte. La tasa global es de 250 / 10⁶ habitantes, mostrando las variaciones que pueden observarse en la figura 1.

La variedad más frecuente es el carcinoma de células transicionales (CCT), que representa del 90-95% de los casos en Europa y EEUU, siendo el resto carcinomas de células escamosas en su mayoría. En contraste con estos datos, en Egipto, donde se dan las tasas más elevadas de incidencia, menos del 40% de los casos tienen morfología de CCT; este hecho se ha asociado a la alta incidencia de parasitismo por *Schistosoma haematobium* en la población egipcia (Hodder et al., 2000).

1.2. FACTORES DE RIESGO

1.2.1. FACTORES DE RIESGO AMBIENTALES

Tabaquismo. El riesgo de cáncer de vejiga se estima de 2 a 4 veces superior en fumadores y aumenta con el número de cigarrillos y el tiempo que dura el hábito de fumar (Cordon-Cardo et al., 1987; Tsai et al., 1995). El riesgo es mayor para los fumadores de tabaco negro, tabaco sin filtro y tabaco con alto contenido en nicotina (Harnden et al., 1995; Hainau and Dombernowsky, 1974; Rubben et al., 1988)

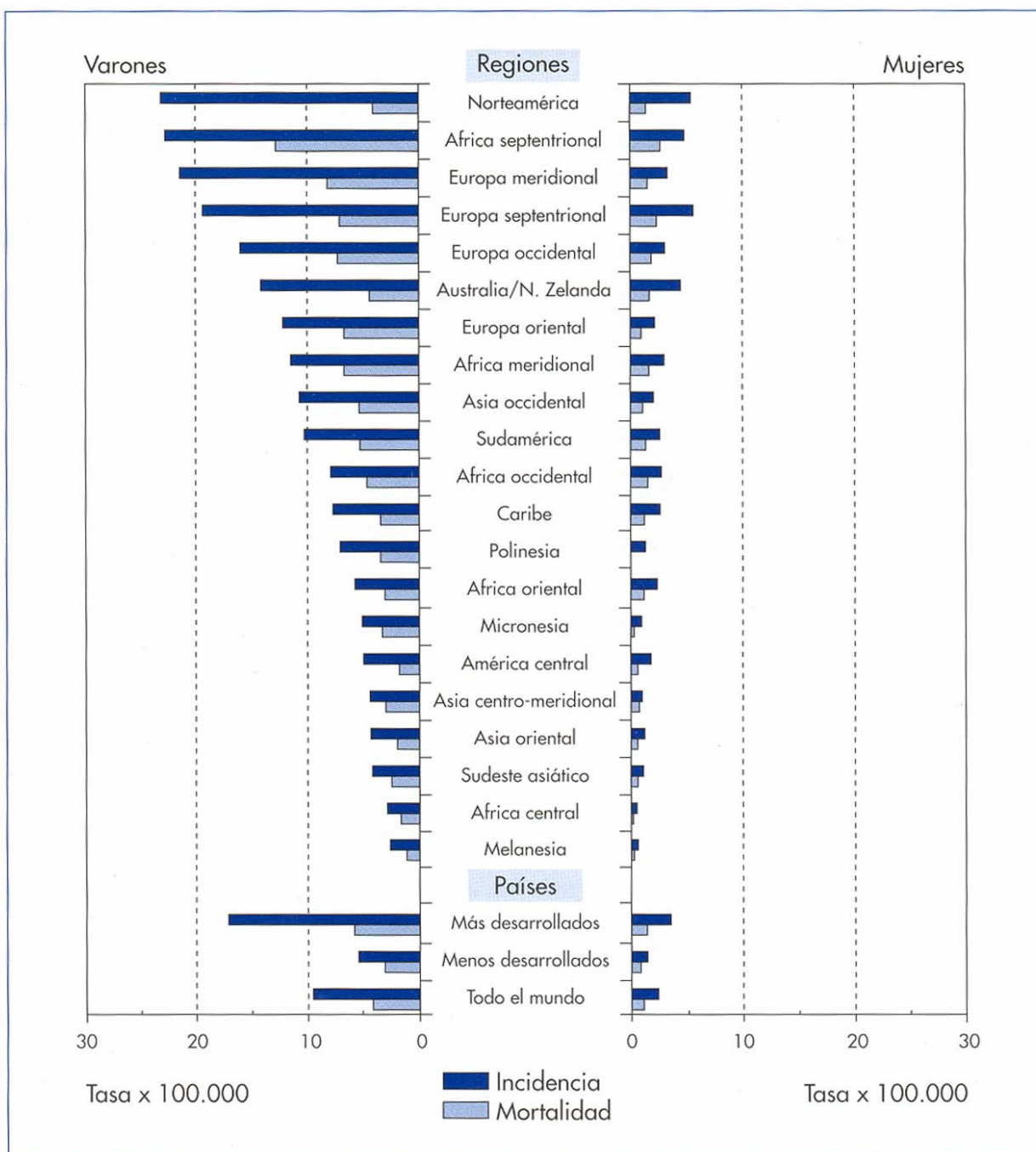


Figura 1. Tasas de incidencia y mortalidad normalizadas del cáncer vesical según área y sexo.

Ocupacional. La exposición a aminas aromáticas, y en especial a la 2-naftilamina y la bencidina es el determinante principal de las altas tasas de cáncer vesical observadas en trabajadores de varios tipos de industrias, tales como las de manufactura de tintes y colorantes y manufactura de caucho(Lee and Droller, 2000; Dalbagni et al., 1993; Jequier and Rousseau, 1987). La presencia de aminas aromáticas en tintes para el pelo ha sido señalada como la causa principal del aumento de incidencia de CCT en peluqueros, aunque no se ha encontrado un riesgo mayor en los usuarios de tintes capilares(Taylor et al., 1996).

Ingesta hídrica. Una ingesta hídrica elevada diluirá los agentes carcinógenos de la orina y elevará la frecuencia de la micción, por lo que se disminuye a la mitad el riesgo de padecer carcinoma vesical(Neal et al., 1990).

Café. Compuestos aromáticos derivados del metabolismo del café son eliminados por la orina, por lo que en principio se tuvo en cuenta como un posible factor de riesgo. Para la evaluación de este riesgo se han realizado varios estudios, el más importante con 2982 casos y 5782 controles y se ha descartado una asociación fuerte entre la ingesta de café y el tumor vesical, aunque no se ha descartado una asociación débil(Algaba et al., 1988).

Edulcorantes artificiales. Ni con la sacarina ni con otros edulcorantes artificiales se ha podido demostrar una asociación con el cáncer vesical(Bosman, 1999), esto hizo que la sacarina fuese pasada por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer de la categoría 2B (posible carcinógeno) a la categoría 3 (evidencia insuficiente).

Dieta. Los estudios realizados hasta la fecha no son concluyentes(Heney et al., 1983) e indican una asociación protectora con la ingesta de frutas y vegetales(Habuchi et al., 1993; Heney et al., 1983). Algunos trabajos indican una asociación directa con la ingesta de grasas(Reuter, 1999; Younes et al., 1990) y otros indican un efecto protector de la vitamina A frente al cáncer vesical(Millan-Rodriguez et al., 2000; Hasui et al., 1994).

Enfermedades de las vías urinarias. Se ha comprobado en estudios de casos y controles una mayor incidencia (con un riesgo relativo de 5) de carcinoma vesical en parasitados por *Schistosoma haematobium*(Riddle et al., 1975; Cheng et al., 1999). Las causas se atribuyen a los fenómenos de inflamación y retención urinaria crónica.

En infecciones urinarias crónicas de repetición de distinta etiología se ha calculado un riesgo relativo de aproximadamente el doble, atribuyéndosele a este estado crónico un papel carcinogénico en las etapas tardías(Jequier and Rousseau, 1987).

1.2.2. FACTORES GENÉTICOS DE RIESGO

La eliminación urinaria de distintas sustancias implica que puedan ser más o menos carcinógenas según las modificaciones metabólicas que hayan sufrido antes de su excreción, diferencias que pueden estar genéticamente determinadas; en este sentido se ha estudiado la enzima N-acetiltransferasa (NAT), involucrada en el metabolismo de aminas aromáticas. Existen dos genes, NAT-1 y NAT-2(Oyasu et al., 1995) y se ha comprobado que existe polimorfismo en NAT-2, polimorfismo que permite distinguir entre acetiladores lentos y acetiladores rápidos (aproximadamente el 50% de individuos de origen caucasiano son acetiladores lentos). Así, se ha comprobado una proporción mayor de la esperada de cáncer vesical en pacientes expuestos a aminas aromáticas(Herr et al., 1986) y otros estudios han encontrado además una proporción mayor de la poblacional de acetiladores lentos en pacientes con cáncer vesical con historia de tabaquismo(Bostwick et al., 1999; Zincke et al., 1985).

Otra enzima que se ha estudiado es la glutatión S-transferasa M1 (GSTM1), encargada de conjugar y así solubilizar diversos tóxicos para su eliminación. Varios estudios apuntan a un mayor riesgo relativo de cáncer vesical en individuos con un solo alelo funcional(Orsola et al., 1998b; Rosell Costa et al., 1998b; Soini et al., 1994)

1.3. MORFOLOGÍA DE LOS CARCINOMAS VESICALES DE CÉLULAS TRANSICIONALES

1.3.1. MICROANATOMÍA VESICAL NORMAL

1.3.1.1. Epitelio vesical

Es el estrato de mayor importancia oncológica pues es donde se originan los CTT; su estructura, partiendo desde la luz vesical hacia capas más profundas es la siguiente:

- Células de superficie o células en paraguas. Son células aplanadas de gran tamaño, su membrana apical es de gran grosor y puede llegar a ser pentalaminar; las uniones entre células son muy estrechas, mostrando un perfil específico de citoqueratinas(Bukholm et al., 1997); juegan un importante papel en mantener la impermeabilidad de la vejiga.

- Estrato intermedio. Se compone de varias capas de células de unas 50-60 μm de diámetro, de núcleos diploides o tetraploides.

- Estrato basal. Está formado de una sola capa de células cúbicas de 15-30 μm de diámetro. Estas son las células de reserva o células madre diferenciadas.

1.3.1.2. Estructuras más profundas

- Membrana basal del epitelio. Es la separación con el estroma, en esta zona es donde se localizan las moléculas de adhesión entre el epitelio y el estroma.

- Muscularis mucosae. Se compone de finos haces musculares discontinuos y vasos de distinto calibre. El hecho de que un tumor infiltrante del subepitelio llegue a esta capa es signo de una mayor agresividad(Rosell Costa et al., 1998a; Abdel-Fattah et al., 1998).

- Submucosa. Es el tejido conectivo entre la capa anterior y la túnica muscular.

- Túnica muscular o muscular propia. En ella se distingue una capa más externa y otra más interna.

- Capa de tejido adiposo perivesical (pericisto).

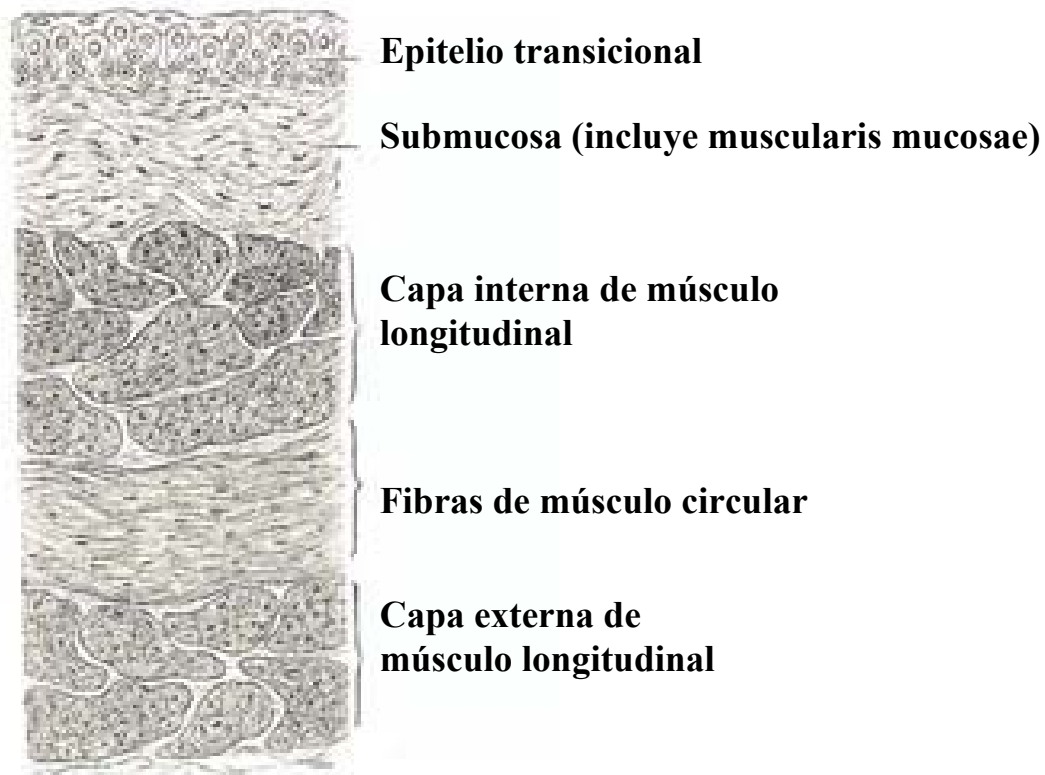


Figura 2. *Diferentes estructuras de la vejiga normal.*

1.3.2. GRADO DE DIFERENCIACIÓN

Conforme disminuye el grado de diferenciación los tumores son cada vez más agresivos y por tanto de peor pronóstico. De más diferenciados a menos diferenciados, los CCT pueden clasificarse según las recomendaciones de la OMS/ISUP de 1998 y OMS 1999 y subdividir los carcinomas de alto grado en Grado II y III(Orsola et al., 1998a; Vollmer et al., 1998).

- Papiloma. Según la clasificación de la OMS, el diagnóstico de papiloma está restringido a lesiones finamente papilares revestidas de urotelio prácticamente normal. Este tipo de lesión no suele ser múltiple (6%) ni recidivar (7,6%) y nunca progresa a infiltrante.

- Neoplasia papilar urotelial de bajo potencial maligno. Son papilas de mayor grosor que el papiloma. Presentan una atipia moderada y mitosis incrementadas.

- Carcinoma transicional Grado I (de bajo grado). Presentan un grado de atipia celular considerable, con pérdida de la polaridad en algunas zonas y núcleos algo mayores que en la neoplasia papilar de bajo potencial maligno.

- Carcinoma transicional de alto grado. Incluye los CCT de grado II y grado III. En el grado II hay una pérdida notoria de la ordenación de los núcleos, la polaridad está muy alterada pero sigue siendo reconocible. En el carcinoma transicional Grado III los núcleos son pleomórficos y la pérdida de la polaridad es casi total.

1.3.3. EXTENSIÓN LOCAL (Estadío).

1.3.3.1. Carcinomas superficiales de vejiga. Son aquellos que no llegan a invadir la muscular propia (ver figura 3); pueden ser erradicados con un tratamiento adecuado, en oposición a los infiltrantes. Se subdividen en:

Carcinoma "In situ" (CIS o TIS). Son lesiones planas del epitelio con una transformación maligna evidente. La cohesión intercelular suele estar alterada, produciendo una descamación de células malignas (detectables por citología) que puede llegar a presentar un epitelio monoestratificado.

Carcinomas Ta. Según la clasificación TNM de 1997, son carcinomas que no infiltran el estroma. Son de mejor pronóstico que los infiltrantes ya que hasta el momento no han desarrollado la capacidad de degradar la membrana basal ni han perdido la expresión de moléculas de adhesión intercelular (Sanchez-Carbayo et al., 2002).

Carcinomas T1. Infiltran el tejido subepitelial pero sin alcanzar la muscular propia. Numerosos grupos han observado diferencias en progresión en grado y estadio entre aquellos que infiltran la *muscularis mucosae* y aquellos que no

llegan a hacerlo (Rosell Costa et al., 1998a; Abdel-Fattah et al., 1998; Zhan et al., 1994), por lo que una subdivisión de estos tumores podría resultar útil.

1.3.3.2. Carcinomas infiltrantes de vejiga.

Se clasifican desde T2 a T4 según el grado de infiltración, como puede verse en la figura 3.

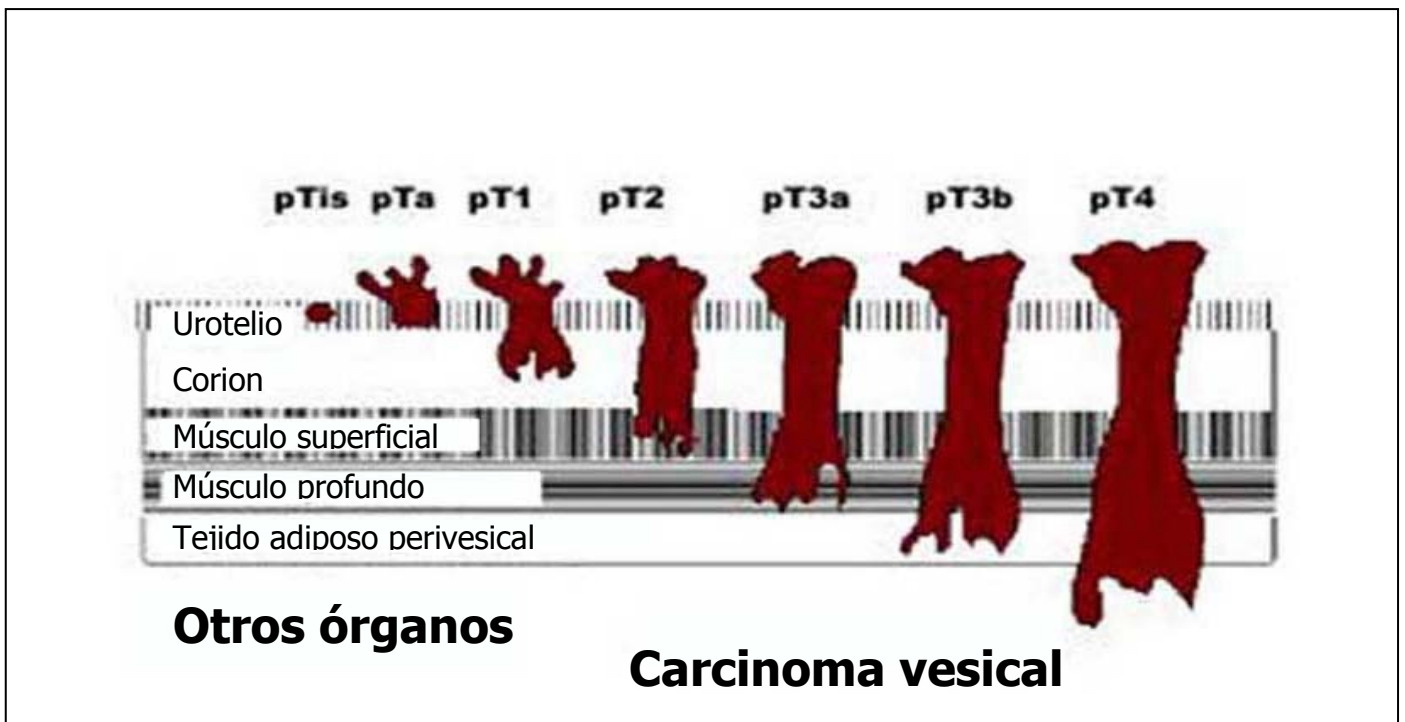


Figura 3. Grado de extensión local de los carcinomas vesicales primarios (p).

2. CARCINOGENÉISIS

El proceso de carcinogénesis en los tumores de vejiga se asocia, al igual que en otros tumores, a una alteración de genes reguladores del ciclo celular, tanto de aquellos que promueven la división celular (protooncogenes) como de los encargados de impedir la evolución del ciclo celular de una fase a otra o de promover la apoptosis (genes supresores tumorales). El carcinoma de vejiga tiene la peculiaridad de tener un comportamiento bastante impredecible, dos tumores de igual grado, estadio y apariencia (papilar, sólido) pueden comportarse de forma muy diferente; así, uno de ellos podría recidivar sin invadir la submucosa y el otro evolucionar a infiltrante. Esta discrepancia

de comportamientos ha hecho pensar en la existencia de distintas vías de la carcinogénesis con distintos patrones de alteración de protooncogenes y genes supresores, hecho corroborado por la existencia de alteraciones mutuamente excluyentes. Así, alteraciones en el gen FGFR3 (receptor tipo 3 del factor de crecimiento de fibroblastos) y alteraciones en TP53 no se encuentran juntas en un tumor concreto y además son predictoras de la evolución (Spruck et al., 1994) (los tumores con alteraciones en TP53 progresarían a infiltrantes y los tumores con alteraciones e FGFR3 no lo harían).

2.1. GENES ALTERADOS EN LOS CARCINOMAS DE VEJIGA

2.1.1. FGFR3.

Este gen codifica para el receptor tipo 3 del factor de crecimiento de fibroblastos, es el gen que se ha encontrado alterado en un mayor porcentaje de tumores de vejiga (30%) (Fradet and Lacombe, 2000), con una fuerte asociación a tumores de bajo grado. El papel de este gen se relaciona con una regulación negativa del ciclo celular en hueso, aunque su mecanismo de acción todavía no está claro (van Rhijn et al., 2002; Cappellen et al., 1999; Billerey et al., 2001).

2.1.2. TP53.

El gen TP53 o su producto, p53, se han encontrado alterados en tumores de vejiga y se asocian a progresión a infiltrantes (Vollmer et al., 1998; Sarkis et al., 1994) ya que se encuentran alteraciones hasta en el 50% de los tumores de alto grado y estadio avanzado. Mediante técnicas inmunohistoquímicas se detecta sobreexpresión nuclear de p53 debida a mutaciones en su zona efectora que la convierten en no funcional y la estabilizan, estas mutaciones también pueden detectarse mediante análisis del polimorfismo conformacional de cadena simple y estudios de secuenciación (Soini et al., 1994; Abdel-Fattah et al., 1998; Oyasu et al., 1995).

La proteína p53 actúa regulando la expresión de muchos genes, aumenta la producción de factores antiangiogénicos y proapoptóticos, y disminuye la de factores proangiogénicos y antiapoptóticos (Zhan et al., 1994; Dameron et al., 1994); también ejerce su control sobre los genes RAS, que a su vez controlan el ciclo celular (Bukholm et al., 1997; Fei et al., 2002; el-Deiry, 1998a).

2.1.3. HRAS

HRAS pertenece a la familia de genes RAS, involucrados en el control del ciclo celular. Su producto, p21, se une a los complejos ciclina-quinasa dependiente de ciclina e impide la evolución del ciclo celular (Bagui et al., 2003; el-Deiry, 1998a). Los estudios inmunohistoquímicos sobre carcinomas vesicales no son concordantes en cuanto a expresión de p21 y su valor pronóstico está en discusión; en los trabajos que sí se haya valor pronóstico, suele asociarse a mutaciones de p53 (Clasen et al., 1998; Garcia del Muro et al., 2004; Lacombe et al., 1996).

2.1.4. Gen RB

La proteína RB (pRB) ejerce su control sobre la evolución del ciclo celular reteniendo factores de transcripción necesarios para el paso de G1 a S. Para mantenerse unida a los factores de transcripción, Rb debe estar en un estado hipofosforilado, estado al que se oponen los complejos Ciclina-Cinasa dependiente de ciclina, con la consiguiente liberación de factores transcripcionales y la progresión del ciclo celular (el-Deiry, 1998b). Se han descrito alteraciones en este gen mediante técnicas inmunohistoquímicas, pérdida de heterocigosidad, análisis de conformación de cadena simple y secuenciación (Horowitz et al., 1990). (Ishikawa et al., 1991; Miyamoto et al., 1995) Las frecuencias de alteración dadas por distintos autores van de un 10 a un 50%. Recientemente también se han descrito hiperfosforilación de pRB (Chatterjee et al., 2004) que liberaría a factores necesarios para la progresión del ciclo celular, como E2F, de su unión a pRB.

2.1.5. EGFR

Se ha encontrado sobreexpresión del gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico en tumores vesicales, observándose una mayor frecuencia de positivos por inmunohistoquímica en tumores de mayor grado y estadio (Korkolopoulou et al., 1997; Ravery et al., 1995; Cheng et al., 2002), también se ha publicado la sobreexpresión de ARNm de este gen (Wood et al., 1992) y se ha comprobado *in vitro* cómo la estimulación de este receptor provoca una aceleración en el crecimiento tumoral (Gleave et al., 1993).

2.1.6. ERBB-2

El gen ERBB-2 (HER-2/neu) codifica una glucoproteína de la superficie celular de 185 kDa, la p185HER-2/neu, que guarda una gran semejanza con el EGFR. Se ha estudiado su alteración mediante inmunohistoquímica, amplificación génica mediante *Southern*, PCR semicuantitativa y más recientemente mediante hibridación *in situ*. La sobreexpresión del gen ha sido estudiada mediante *Northern* y mediante PCR a tiempo real. Los resultados encuentran sobreexpresión en una parte de estos tumores, amplificación génica en un bajo porcentaje (alrededor de 5%) y aumento de la transcripción del gen (Junttila et al., 2003; Miyamoto et al., 2000; Ohta et al., 2001; Ravery et al., 1997; Wood et al., 1991).

2.1.7. MDM2

El MDM2 es un protooncogen situado en el cromosoma 12. Su producto, la mdm2 es una proteína nuclear que se une a p53 e impide que realice su función; además, la p53 es más susceptible de ser degradada cuando se une a mdm2 (Momand et al., 1992; Oliner et al., 1992). El estudio de mdm2 se ha realizado fundamentalmente mediante inmunohistoquímica, aunque la amplificación génica se ha comprobado mediante *Southern* y FISH (Habuchi et al., 1994; Lu et al., 2002; Simon et al., 2002; Tuna et al., 2003). Se ha investigado el valor pronóstico de la sobreexpresión nuclear de mdm2 y se considera importante en casos con p53 funcional (Jahnson and Karlsson, 2000; Lu et al., 2002).

2.1.8. INK4A e INK4B

Estos genes se localizan en 9p21 y codifican las proteínas p16 y p15 respectivamente. Actúan como inhibidoras de las quinasas dependientes de ciclinas Cdk4 y Cdk6, por lo que se oponen a la progresión del ciclo celular al impedir que se fosforile pRB (Cordon-Cardo, 1995; Hannon and Beach, 1994; Graham, 1992). Para mayor complejidad, existe una pauta de lectura alternativa de INK4A cuyo producto, llamado p19^{ARF}, se ha visto que interactúa con mdm2 y bloquea la degradación de p53 inducida por mdm2 (Pomerantz et al., 1998; Quelle et al., 1995). Alteraciones en 9p21 se consideran un evento temprano en la etiología del carcinoma de vejiga, ya que han sido descritas en tejidos displásicos (Tsutsumi et al., 1998). Estudios de transferencia *Southern* han demostrado deleciones homocigotas tanto de INK4A como de INK4B,

también se ha descrito pérdida de heterocigosidad en 9p21 y se han detectado mutaciones puntuales por secuenciación directa(Orlow et al., 1995). Otro mecanismo descrito es el de hipermetilación del promotor de INK4A(Chang et al., 2003; Gonzalgo et al., 1998). Estudios de inmunohistoquímica han relacionado el fenotipo negativo para p16 con niveles altos de pRB, que no sería capaz de contener la progresión del ciclo celular al estar fosforilada. También se ha intentando conseguir la reexpresión de p16 en células tumorales de vejiga mediante adenovirus-p16 como una nueva estrategia terapéutica (Lee et al., 2001)

2.2. ALTERACIONES EN EL CARIOTIPO

Los carcinomas transicionales de vejiga exhiben cariotipos pseudodiploides con sólo unas pocas anomalías en etapas tempranas, evolucionando hacia cariotipos complejos pseudo-tetraploides. La monosomía parcial o completa 9 (-9) es un acontecimiento temprano(Van Tilborg et al., 1998), encontrado en la mitad de los casos. Las pérdidas (11p) o -11 se encuentran en 20-50% de casos, más a menudo en tumores de grado alto e invasivos. Deleciones en 13q se encuentran en el 25% de los casos y correlacionan con grado y estadio altos del mismo modo que lo hacen las alteraciones en RB, que se haya en esta localización(Benedict et al., 1999; Sanchez-Carbayo et al., 2003). Del(17p) es un acontecimiento tardío que puede encontrarse en el 40% de los casos, en esta región está TP53, cuyas alteraciones se relacionan con lesiones de alto grado y estadio, así como con peor pronóstico(Chaturvedi et al., 1997). Otras alteraciones como del(1p), i(5q), +7 y otros reagrupamientos, más a menudo deleciones que duplicaciones, son frecuentes(Mahdy et al., 1999; Koo et al., 1999) y apuntan hacia un proceso de varias etapas en las que se van afectando genes supresores.

2.3. PÉRDIDAS DE HETEROCIGOSIDAD (LOH).

Los estudios realizados en el análisis de LOH en cáncer de vejiga han demostrado la existencia de diversas alteraciones, aunque no han conducido por ahora a la identificación de genes supresores tumorales. La pérdida de heterocigosidad parece ser frecuente dentro de un cromosoma en concreto. Se han descrito alteraciones en

diversas localizaciones, no vamos a describirlas todas, sino solamente las más frecuentes; así, en cromosoma 9 se describe en cinco regiones, 9p21, 9q22, 9q31-32, 9q33 y 9q34; en el cromosoma 5 en cuatro regiones, 5q13.3-q22, 5q22-q31.1, 5q31.1-q32, y 5q34, y en el cromosoma 3 en las regiones 3p12-14, 3p21.3-22 y 3p24.2-25(Bohm et al., 2000; Erbersdobler et al., 1998; van Tilborg et al., 2002; Saran et al., 1996).

Una de las alteraciones más estudiada es la delección del cromosoma 9 o de regiones del mismo, pues se considera un evento temprano en el desarrollo tumoral y se relaciona con la alteración de inhibidores de las quinasas dependientes de ciclina como p15, p16 u otras proteínas relacionadas. Vamos a desarrollar con un poco más de extensión las alteraciones del cromosoma 9. Gracias a la posibilidad de estudiar tumores múltiples recurrentes del mismo paciente, se está llegando a la evidencia de que la pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 9 casi nunca es el primer paso del desarrollo tumoral. LOH se puede detectar hasta en el 67% de los marcadores probados. Las regiones de LOH son múltiples, varían en diversos tumores del mismo paciente y se amplían en tumores subsecuentes. Por otra parte, las regiones de LOH en el cromosoma 9 varían de un paciente a otro(Louhelainen et al., 2000; Williams et al., 2002).

En un intento de relacionar de forma general el tipo y extensión del daño genético con el grado y estadio de los tumores de vejiga, se cree que en la patogenia del cáncer de vejiga puede estar implicado un índice incrementado de recombinación mitótica, que puede llevar a pérdidas de heterocigosidad en distintas regiones del genoma. Esta alteración se adquiere de forma temprana en el proceso tumoral y por tanto, las alteraciones genómicas se irán acumulando durante la evolución del carcinoma(van Tilborg et al., 2002). La región HLA también sufre alteraciones, las veremos más adelante, cuando tratemos las alteraciones en HLA comentaremos la LOH en esta región del genoma.

2.4. VÍAS DE LA CARCINOGENÉISIS EN VEJIGA.

El análisis de tumores de alto grado y estadio avanzado y de tumores de grado bajo y estadio temprano ha sugerido a distintos autores la existencia de dos vías distintas de desarrollo canceroso en el epitelio de vejiga que van a producir tumores de distinto comportamiento(Baithun et al., 2001; Spruck et al., 1994).

2.4.1. Tumores superficiales

Son tumores que producen recurrencias pero normalmente no progresan a infiltrantes. En estos tumores suelen encontrarse alteraciones en el cromosoma 9, en relación con genes supresores del crecimiento celular, como ya hemos comentado(Tsutsumi et al., 1998).

2.4.2. Tumores infiltrantes

En estos tumores la alteración predominante es la de p53, que no suele encontrarse en los superficiales. Esta alteración también suele encontrarse en los CIS(Niehans et al., 1999).

3. EL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD

El descubrimiento de los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) data de principio de los años 50 y fueron descritos en el hombre por la reacción de leucoaglutinación que tenía lugar al enfrentar el suero de pacientes politransfundidos con leucocitos extraños. Las moléculas del MHC son glicoproteínas que aparecen en la membrana de mayoría de las células nucleadas de todos los vertebrados. Su expresión en superficie en combinación con el antígeno permite su reconocimiento por los linfocitos T.

3.1. MOLECULAS DEL MHC

En humanos estas moléculas van a recibir la denominación HLA (Human Leukocyte Antigen). Los ensayos celulares y serológicos han permitido describir la existencia de dos grandes grupos de moléculas. El primero de ellos, HLA de clase I, está representado en el hombre por las moléculas HLA-A, -B, y -C; el segundo, HLA de clase II, incluye las moléculas HLA-DP, -DQ y -DR.

3.1.1. Moléculas HLA de clase I

Los antígenos de histocompatibilidad de clase I comprenden las moléculas clásicas (clase Ia) HLA-A, -B, -C (Bjorkman and Parham, 1990) y las no clásicas (clase Ib) HLA-E, -F, -G (Shawar et al., 1994). Todas son glicoproteínas de la superficie celular de dos subunidades no covalentemente asociadas (Cresswell et al., 1973); se componen de una cadena transmembrana y polimórfica de 45 KD (cadena pesada o cadena α) y una proteína no polimórfica de 12 KD, la β_2 -microglobulina, no anclada a la membrana celular. El péptido antigénico se ensambla con esta estructura, formándose así el complejo HLA de clase I.

La cadena pesada contiene aproximadamente 340 aminoácidos organizados en tres regiones: extracelular, transmembrana e intracitoplasmática. La región extracelular se divide en tres dominios (α_1 , α_2 y α_3) de aproximadamente 90 aminoácidos cada

uno. El polimorfismo en la cadena pesada reside en los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$, cada uno de los cuales contiene una región de alto polimorfismo, estas dos regiones unidas forman la gruta de unión al péptido antigénico (Figura 4).

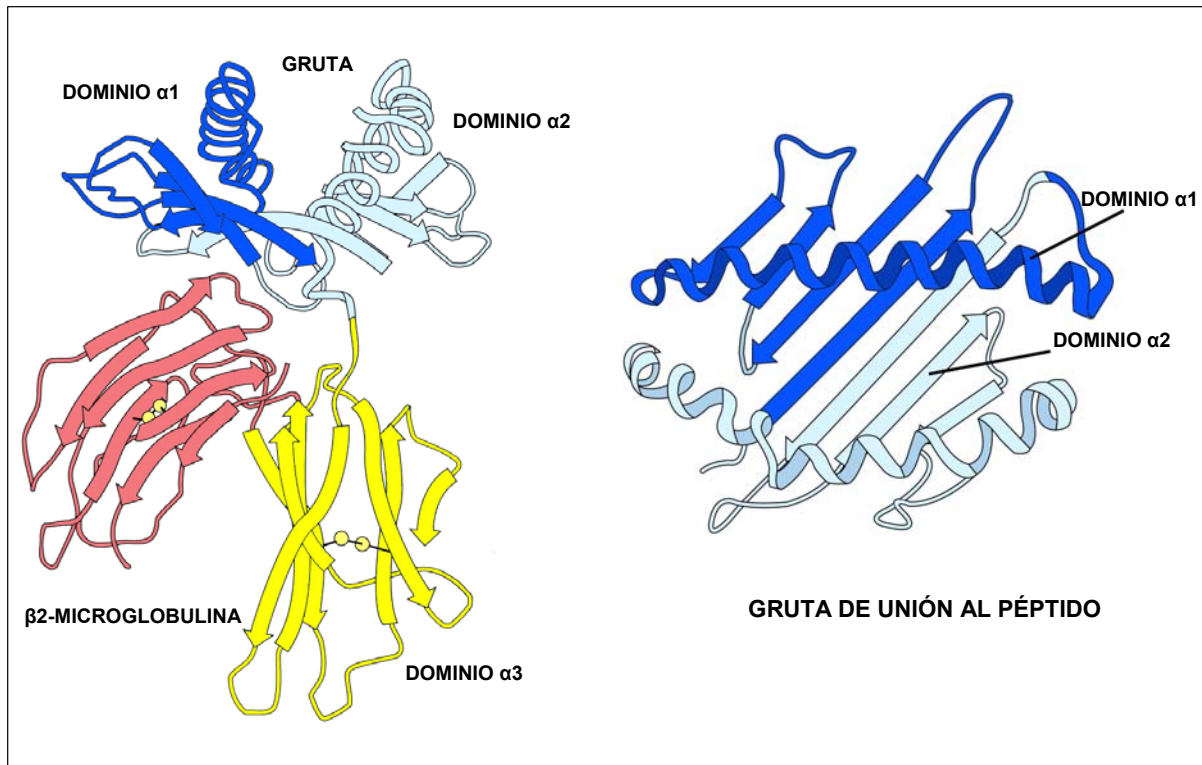


Figura 4. Estructura de la molécula HLA de clase I.

El péptido, formado por unos 8-10 aminoácidos, participa en el ensamblaje de la molécula de clase I y proporciona estabilidad al conjunto, de manera que las moléculas HLA vacías son inestables (Elliott et al., 1991). Así, la gruta formada por los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$, donde se anclará el péptido, será la zona reconocida por el receptor de las células T (TCR).

3.1.2. Moléculas HLA de clase II

Las moléculas de clase II son heterodímeros compuestos por dos subunidades glicoproteicas, una cadena α de 33-35 kD de peso molecular, y una cadena β de 25-30 kD, asociadas de forma no covalente (Kappes and Strominger, 1988). Cada una de ellas

consta de tres regiones: Una región extracelular, una porción transmembrana y un segmento intracitoplasmático.

La estructura tridimensional de la molécula de clase II fue descrita aplicando técnicas de difracción de rayos X (Brown et al., 1993). Una gruta de similares características a la de la clase I, pero algo más amplia, parece justificar el mayor tamaño de los péptidos presentados por las moléculas de clase II (10-24 aminoácidos) (Rudensky et al., 1991).

3.2. GENES DE LA REGIÓN HLA

Los genes HLA están localizados en el brazo corto del cromosoma 6, en la porción distal de la banda 6p21.3, en un espacio aproximado de 4 Mpb (Campbell and Trowsdale, 1993).

El sistema HLA es una región génica que se organiza en diferentes subregiones estrechamente ligadas entre sí, su herencia es mendeliana codominante. Es el sistema más polimórfico conocido en humanos debido a la enorme cantidad de alelos para cada uno de los genes conocidos; ensayos serológicos y celulares permitieron diferenciar unos 150 alelos distintos, y el tipaje genómico ha multiplicado esta cifra.

Esta región contiene múltiples genes y pseudogenes ordenados en tres grupos (Aguado and Campbell, 1999; Stewart et al., 2004); la región de clase I, la región de clase II y la región de clase III.

3.2.1. Genes de la región HLA de Clase I

Los genes codificantes de la cadena pesada de las moléculas HLA de clase I están situados en esta región, mientras que el gen de la β 2-microglobulina se ubica en el cromosoma 15 y por tanto independiente del complejo MHC (Goodfellow et al., 1975).

Dentro de la región de clase I están los genes llamados clásicos (HLA-A, -B, -C), otros tres no clásicos (HLA-E, -F, -G) (Geraghty, 1993) y al menos veintinueve elementos génicos entre los que figuran pseudogenes (HLA-H, J, K, L, X), genes incompletos o truncados y genes de significado incierto (Bodmer et al., 1994; Stewart et al., 2004)

3.2.2. Genes de la región HLA de Clase II

Las dos subunidades polipeptídicas de los antígenos de clase II, α y β , están codificadas por genes pertenecientes a esta región, la cual se subdivide en tres regiones funcionales, que ordenadas por su proximidad al centrómero, se denominan: HLA-DP, -DQ y -DR (Bell et al., 1986). También están aquí los genes que codifican para HLA-DM y HLA-DO, que regulan la unión del péptido antigénico a la gruta de la molécula HLA de clase II.

Otros elementos identificados dentro de la región de clase II son los genes TAP1 y TAP2 (Trowsdale et al., 1990) que codifican las proteínas transportadoras de los péptidos de las moléculas de clase I. Además, se encuentran aquí los genes LMP2 y LMP7, que codifican subunidades proteolíticas del proteosoma inducibles por $\text{INF}\gamma$ y que una vez incorporadas al proteosoma aumentan la variedad de péptidos producidos, formando el llamado inmunoproteosoma (Boes et al., 1994) (Glynne et al., 1991).

3.2.3. Genes de la región HLA de Clase III

La región de clase III no contiene genes que codifiquen para moléculas HLA, pero sí contiene genes que codifican proteínas con importantes funciones relacionadas con el sistema inmune, como las proteínas del complemento, Factor B, C2 y C4; el TNF y la linfoxina (Aguado and Campbell, 1999).

3.3. FUNCIÓN BIOLÓGICA

3.3.1. Reconocimiento Antigénico mediado por el linfocito T

De forma general, las moléculas del HLA de clase I participan en la presentación de antígenos derivados de proteínas citosólicas, tanto propias como posibles proteínas virales (Townsend et al., 1989); por el contrario, las moléculas de clase II actúan durante el procesamiento de antígenos exógenos, previamente captados por la célula a través de fenómenos de endocitosis (Chicz et al., 1992; Jardetzky et al., 1991).

Los linfocitos B y T, con sus receptores de alta especificidad, son los responsables de la detección de los antígenos extraños en la respuesta inmunitaria específica. Los linfocitos B, productores de anticuerpos, son capaces de reconocer determinantes antigénicos tridimensionales en proteínas nativas solubles o particuladas, mientras que los linfocitos T reconocen epítomos antigénicos en forma de fragmentos peptídicos unidos a moléculas del MHC en la superficie de la célula presentadora. Este reconocimiento del antígeno se lleva a cabo por el receptor antigénico del linfocito T (TCR), adquirido durante su fase de desarrollo intratímico. Este proceso requiere una serie compleja de eventos de diferenciación, que incluyen el reordenamiento y la expresión de los genes que codifican las cadenas del TCR.

El reconocimiento del antígeno por los linfocitos T depende de la interacción entre el TCR presente en la membrana de los linfocitos T y el péptido antigénico englobado en la molécula del MHC, que se encuentra en la membrana de la célula que va a ser reconocida por el linfocito T. El reconocimiento es dependiente tanto del péptido presentado como del alelo HLA que lo presenta; así, un péptido propio presentado en una molécula HLA extraña va a producir una respuesta similar a la de un péptido extraño presentado por una molécula HLA propia. El polimorfismo de los residuos localizados en la cavidad de unión al péptido va a asegurar la presentación de un amplio repertorio de péptidos distintos, pues cada alelo HLA va a tener más afinidad por un grupo de péptidos de características adecuadas para encajar en su gruta de unión al péptido (Chen et al., 1994). Así, el TCR es a la vez específico de péptido y de alelo del

MHC y esta interacción puede conducir a la activación del linfocito T, que será antígeno-específica y restringida por el MHC.

Las moléculas de clase II están especializadas en la presentación de antígenos captados del medio extracelular por las células presentadoras de antígeno. Los linfocitos T CD4⁺, llamados colaboradores, reconocen el antígeno presentado por la molécula HLA de clase II (Doyle and Strominger, 1987; Unanue and Allen, 1987). Estos linfocitos T CD4⁺ van a producir y mantener la respuesta específica de los linfocitos B, de los propios linfocitos T CD4⁺ y de los linfocitos T CD8 citotóxicos mediante la secreción de citoquinas específicas y la expresión de nuevos receptores. Los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos identifican el antígeno presentado conjuntamente con el MHC de clase I (Townsend et al., 1989), y su respuesta consistirá en ejercer una actividad citotóxica contra células diana (linfocitos T citotóxicos o CTL).

3.3.2. Inhibición de la función efectora de las células NK

Las células NK son células de estirpe linfocítica y aunque no poseen receptor específico de antígeno (Wang et al., 1996a) tienen importantes funciones en la respuesta inmune celular. Muestran actividad citotóxica “in vitro” contra una variedad de células diana normales o tumorales (Trinchieri, 1989) (Moretta and Moretta, 1997)

La función lítica de las células NK está regulada por un equilibrio que se establece entre señales activadoras e inhibitorias; está controlada por el reconocimiento específico de moléculas HLA de clase I a través de 2 familias de receptores inhibitorios específicos de HLA de clase I: KIR (Killer Inhibitory Receptors) y el receptor CD94/NKG2A. La interacción entre las moléculas HLA de clase I y estos receptores inhibe la citotoxicidad mediada por las células NK y la secreción de citoquinas, de modo que la pérdida patológica de las mismas confiere susceptibilidad a la actividad NK (Ljunggren and Karre, 1990). Un amplio espectro de moléculas de superficie pueden contribuir a desencadenar la actividad de estas células (Lanier, 2001).

Varias combinaciones de receptores pueden ser expresados en diferentes subpoblaciones de células NK. Este fenómeno permite a la célula NK detectar incluso

pérdidas de alelos HLA en la célula diana. Cada célula NK individual expresa, al menos, un receptor para uno u otro alelo HLA de clase I propio, previniendo así la autorreactividad(Lopez-Botet et al., 1996).

3.3.3. Diferenciación tímica.

Aunque no guarde una relación directa con este trabajo, el papel del MCH de clase I en la doble selección de los linfocitos T citotóxicos debe al menos ser mencionada, por su importancia biológica.

3.4. MAQUINARIA DEL PROCESAMIENTO ANTIGÉNICO (MPA)

La maquinaria del procesamiento antigénico comprende a las proteínas de actividad enzimática o transportadora involucradas tanto en la producción de los péptidos antigénicos como su transporte, correcto plegamiento y ensamblaje de los componentes del MHC. El fallo en estos mecanismos puede conllevar una pérdida de presentación de antígenos en la superficie celular, por lo que vamos a verlas con más detalle.

3.4.1. Procesamiento de péptidos antigénicos endógenos.

Los antígenos, que inicialmente se encuentran en el citosol, son degradados por enzimas proteolíticas en fragmentos de corta longitud, 8-11 residuos(Falk et al., 1991; Van Bleek and Nathenson, 1990). Varios estudios indican que la principal fuente de péptidos presentados por MHC-I son proteínas recién sintetizadas(Jones, 1997; Zaks et al., 1999) que son rápidamente degradadas. Estos sustratos han sido denominados productos defectivos ribosomales o DRiPs, y representan polipéptidos que no tienen la longitud correcta o están mal plegados y que generan una fuente rica de péptidos para la presentación antigénica por parte de moléculas del MHC de clase I, ya sea de productos

normales, virales o tumorales que pueden unirse a ubiquitina para ser degradados por el proteosoma (Figura 5).

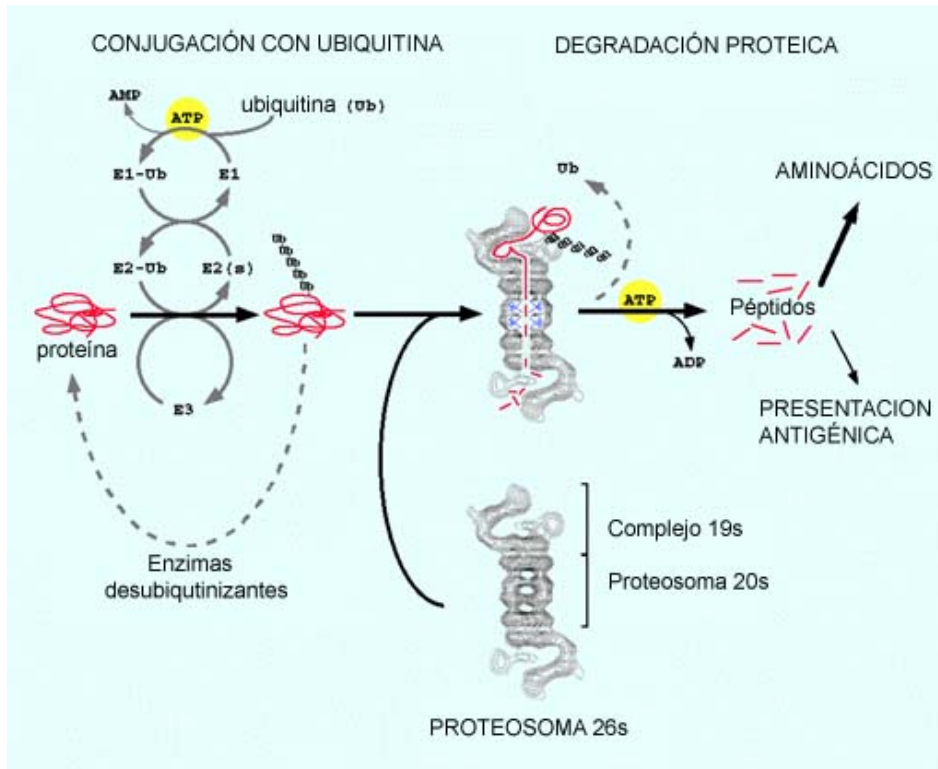


Figura 5. Producción de péptidos para ser presentados por moléculas HLA de clase I

El proteosoma está compuesto por un núcleo central proteolítico unido a unos complejos reguladores 19s (PA700) y PA28; el proteosoma genera la principal fuente de péptidos presentados por moléculas del MHC de clase I (Pamer and Cresswell, 1998). Esta función fue claramente demostrada con el empleo de inhibidores específicos que interaccionan con los centros catalíticos del proteosoma (Reits et al., 2000)

El proteosoma es un complejo constituido por 28 subunidades con estructura cilíndrica que se ordenan en cuatro anillos apilados, con un núcleo hueco recubierto por los centros activos de las subunidades catalíticas (Schubert et al., 2000). Tres subunidades constitutivas, y sus correspondientes subunidades inducibles por IFN γ , constituyen los centros catalíticos del proteosoma. Las subunidades inducibles LMP2 y

LMP7 están codificadas en la región del MHC cerca de los genes TAP. La sustitución de las subunidades constitutivas por las inducibles cambia la especificidad del proteosoma hacia su sustratos: generándose péptidos más adecuados para su transporte al retículo endoplásmico y presentación por moléculas MHC-I.

Seguidamente los péptidos son trasladados hacia el retículo endoplasmático por la acción de los transportadores TAP-1 y TAP-2(Monaco, 1992; Shepherd et al., 1993). Estas proteínas transportadoras presentan homología con una variedad de enzimas de transporte dependientes de ATP que se conocen como la familia ABC (ATP-Bind Casette)(Trowsdale et al., 1990).

En el lumen del retículo endoplásmico cada péptido interactúa con una cadena pesada de la molécula HLA de clase I y participa en su ensamblaje confiriendo estabilidad al heterodímero cadena pesada- β 2m(Elliott et al., 1991). En el ensamblaje de la cadena pesada con la β 2m y el péptido están implicadas una variedad de chaperonas tales como calnexina, calreticulina, ERp57 y tapasina(Lehner and Trowsdale, 1998). La tapasina controla el ensamblaje de las moléculas HLA con péptidos de alta afinidad que estabilizan el complejo(Grande and Van Kaer, 2001; Purcell et al., 2001). La molécula HLA de clase I es así conducida a través del aparato de Golgi hacia la superficie de la célula.

Estudios de secuenciación han puesto de manifiesto que los péptidos afines a cada uno de los alelos HLA de clase I muestran una estructura común en lo que respecta a la conservación de residuos que coinciden espacialmente con los bolsillos de la gruta donde se ancla el péptido(Falk et al., 1991)

3.4.2. Procesamiento de péptidos antigénicos exógenos.

El proceso de síntesis y ensamblaje de moléculas HLA de clase II empieza en el retículo endoplasmático con la producción de un complejo compuesto por tres dímeros de subunidades α , β y un trímero de cadenas invariables (Ii). En el retículo endoplásmico hay péptidos transportados a su interior y péptidos de proteínas que están siendo sintetizadas. Para evitar que las moléculas de clase II se unan a ellos, la cadena invariable sella la gruta de unión al péptido, la parte de Ii que bloquea la gruta de unión

al péptido es llamada CLIP. El ensamblaje del nonámero es mediado por calnexina, cuando el nonámero se ha formado, se libera la calnexina(Cresswell et al., 1994).

La cadena Ii dirige al complejo al aparato de Golgi, donde se glicosila (Cresswell et al., 1994); después llega al sistema endosomal a través de vesículas del aparato de Golgi(Peters et al., 1991). El sistema endosómico/lisosómico está constituido por compartimentos proteolíticos en los cuales se procesan los antígenos externos capturados en la superficie de la célula, que se transforman en péptidos mediante hidrólisis ácida(Watts, 2001) y se cargan sobre las moléculas del HLA de clase II. En el interior de las vesículas endosómicas, el pH ácido produce la degradación de la cadena invariable por la peptidasa catepsina S, y sólo el péptido CLIP queda unido en la gruta. Es ahora cuando se une el péptido antigénico a la molécula de clase II, por desplazamiento del péptido CLIP en la gruta de unión, este proceso asegura la unión a péptidos de alta afinidad. La unión está catalizada por el dímero HLA-DM, que facilita la salida del péptido CLIP y la entrada de otros péptidos hasta que finalmente entra uno lo suficientemente estable. Otra molécula, llamada HLA-DO, también controla este proceso pero de forma negativa, es decir, inhibiendo la función de HLA-DM; esta molécula no es inducible por INF- γ mientras que HLA-DM sí lo es. Por tanto, en estados de activación del sistema inmune, la presentación de péptidos a través de HLA de clase II se verá facilitada(van Ham et al., 2000; van Ham et al., 1997).

Finalmente el complejo se transporta a la superficie celular para cumplir su función(Brocke and Kunz, 2002).

4. INMUNOLOGÍA TUMORAL

4.1. INTRODUCCIÓN HISTÓRICA

Los primeros ensayos que apuntaban hacia una respuesta antitumoral del sistema inmune datan del año 1943: en estos ensayos, Ludwik Gross, indujo fibrosarcomas con metilcolantreno en un modelo experimental murino; al extirpar los tumores y reinyectar las células tumorales en el mismo ratón, el tumor era rechazado en la mayoría de las ocasiones.

Estas primeras experiencias apuntaban hacia la existencia de un antígeno tumoral responsable del rechazo; la acumulación de estudios posteriores se concretó en la hipótesis de la inmunovigilancia de Thomas (1959) y Burnet (1970), en la cual se presumía la generación de antígenos tumorales durante el proceso de transformación cancerígena, antígenos que serían los responsables del rechazo de los tumores. Los ensayos posteriores de Stutman (1974) y de Rygaard y Povlsen (1974) compararon la incidencia de tumores entre ratones nude (atímicos y por tanto carentes de linfocitos T que produzcan la respuesta antitumoral) y ratones inmunocompetentes; no hallaron diferencias entre los dos grupos, con lo que la hipótesis de la inmunovigilancia fue seriamente cuestionada. La no existencia de diferencias entre los grupos, hoy en día es explicada por la existencia en los ratones nude de una pequeña cantidad de linfocitos T y una sobreproducción de células NK, que llevarían a cabo la respuesta antitumoral (Pardoll, 2003).

Ya en la década de los 90, nuevos descubrimientos relanzaron la teoría de la inmunovigilancia, llevándola a ser aceptada por la comunidad científica.

El primero de ellos lo realizaron Dighe y colaboradores en relación a la producción de interferón gamma en ratones de la cepa BALB/c; al suministrarles un anticuerpo neutralizante del interferón gamma (IFN- γ) constataron que la función de esta citoquina era imprescindible para el rechazo de una línea de fibrosarcoma murino singénica; así mismo constataron que al modificar la línea tumoral para que no expresase el receptor del IFN- γ , la línea modificada era capaz de progresar en los ratones (Dighe et al., 1994).

Otros experimentos que avalan el concepto de la inmunovigilancia han sido realizados con ratones knockout deficitarios en algún gen relacionado con la respuesta inmune; así, los ratones C57BL/6, negativos para la síntesis de perforina, demostraron ser más sensibles a tumores inducidos con metilcolantreno que la cepa de la que derivan (van den Broek et al., 1996). También se han diseñado cepas de ratones knockout para RAG-1 (necesario para el reordenamiento del TCR y de las inmunoglobulinas, por lo que estos ratones carecen de linfocitos T y B), para el receptor del IFN- γ y para STAT-1 (implicada en la transducción de la señal del receptor IFN- γ); en estos ratones se constató una incidencia significativamente elevada, tanto de tumores inducidos como espontáneos, tumores que al ser inoculados en la cepa original murina inmunocompetente eran rechazados (Kaplan et al., 1998)

En humanos con inmunodeficiencias y en inmunosuprimidos se ha descrito una alta tasa de tumores (Trofe et al., 2004; Boshoff and Weiss, 2002), muchos de ellos son de origen viral y no puede excluirse que la etiología de estos tumores esté en la alta tasa de infecciones que sufren estos pacientes. Sin embargo, en el caso de pacientes trasplantados sometidos a inmunosupresión, sí se ha constatado una tasa mayor de tumores de origen no viral que en la población normal (Birkeland et al., 1995), tumores que podrían ser atribuidos a un sistema inmune deficitario, aunque también se han relacionado con estados de infección e inflamación crónica por infecciones bacterianas (Dranoff, 2004), por el alto grado de lesión y regeneración tisular que puede conducir a neoplasia (Sheil, 1999; Penn, 1996). Otros hechos que apoyan la idea del control inmunológico de los tumores son por un lado la aparición de respuestas antitumorales espontáneas en pacientes oncológicos y por el otro el que la presencia de linfocitos infiltrantes en un tumor puede ser un factor pronóstico positivo para la supervivencia del paciente (Dunn et al., 2004).

4.2. ANTÍGENOS ASOCIADOS A TUMOR

Las primeras investigaciones en este campo describieron antígenos tales como los gangliósidos GM2 y GD2 que eran reconocidos por anticuerpos (Houghton et al., 1980) y más tarde, con la introducción de las técnicas de transfección génica y dilución

límite se empezaron a estudiar antígenos reconocidos por células T (van der Bruggen et al., 1991).

La existencia de una respuesta inmune frente al tumor (Crowley et al., 1991) abre una vía terapéutica de enormes posibilidades terapéuticas, por lo que todo esfuerzo que ayude a conocer estos antígenos y cómo llegan a ser presentados al sistema inmune o cómo dejan de serlo, será un esfuerzo que merezca la pena. Vamos a ver seguidamente las categorías de antígenos tumorales.

4.2.1. Antígenos normalmente expresados en células de línea germinal de testículo.

Estos antígenos tumorales fueron identificados sobre una librería de cDNA derivada de la línea celular MZ2 (van der Bruggen et al., 1991).

Los miembros de esta familia son expresados en células de líneas germinales, principalmente en testículos, que no poseen expresión de moléculas HLA de clase I ni de clase II (Takahashi et al., 1995), lo que las preserva de despertar una respuesta del sistema inmune frente a estos antígenos; por tanto, son realmente un blanco muy interesante sobre el que trabajar para provocar una respuesta inmune. Dentro de estos antígenos se engloban los genes de la familia MAGE, BAGE, GAGE y RAGE, capaces de desarrollar una respuesta mediada por linfocitos T citotóxicos al ser presentados por un determinado alelo HLA de clase I (De Plaen et al., 1994; Van den Eynde et al., 1995) (Gaugler et al., 1996).

4.2.2. Antígenos producidos por mutaciones en genes normales

Se han descrito células cancerosas que dan origen a nuevas proteínas con o sin alteración en su función. Las proteínas o péptidos mutados, resultantes de la inestabilidad genética de la célula tumoral, podrían ser mucho más inmunogénicas y ser reconocidas por células T. Muchas de estas proteínas están involucradas en los procesos de regulación del ciclo celular y la vía de la apoptosis (Wolfel et al., 1995; Mandruzzato et al., 1997).

Recientemente ha sido descrito que el sistema inmune puede reconocer productos derivados de transcritos alternativos provenientes de nuevos marcos de lectura y pseudogenes (Moreau-Aubry et al., 2000).

4.2.3. Antígenos derivados de moléculas presentes en células normales sobreexpresadas en tumores y antígenos de diferenciación.

La sobreexpresión de antígenos propios por células tumorales puede provocar la aparición de una respuesta inmune frente a un antígeno que en principio era tolerado. Las explicaciones que se barajan para este fenómeno son dos, primero que un aumento del antígeno provocaría un aumento de los estímulos activadores y rompería la tolerancia; segundo, alteraciones en la glicosilación de la proteína podrían ser las responsables de esta respuesta (Finn et al., 1995; Rongcun et al., 1999; Ramirez-Montagut et al., 2003).

4.2.4. Antígenos virales

Existen virus asociados al desarrollo de tumores humanos como el del linfoma de Burkitt (virus de Epstein Barr), el del carcinoma hepatocelular (virus de la Hepatitis B) y el del carcinoma de cérvix (HPV). Las proteínas virales expresadas en estos tumores pueden actuar como diana inmunológica y ser utilizadas en inmunoterapia de para provocar una respuesta específica de células T (Alexander et al., 1996).

4.3. RESPUESTA INMUNE FRENTE A TUMORES

El concepto de que el sistema inmune reconoce y elimina tumores incipientes nace en 1909 con Paul Ehrlich y se continúa con los ya mencionados ensayos de Gross y subsiguientes investigadores. La presencia de linfocitos T citotóxicos con capacidad de reconocimiento de antígenos tumorales y lisis específica se ha puesto de manifiesto en distintos tipos de tumores (Coulie et al., 2001; Gueguen et al., 1998; Karanikas et al., 2001; Baurain et al., 2000). También se ha constatado la presencia de linfocitos B productores de anticuerpos que reconocen antígenos tumorales (Sahin et al., 1995) y de respuestas mediadas por células NK (Karre, 2002). Sin embargo, a pesar de esto, hay tumores que progresan porque son capaces de evadir o no provocar la respuesta del sistema inmune, por lo que se hace necesario conocer los mecanismos por los cuales se llega a esta situación para poder establecer una estrategia capaz de revertirla. (Old and Chen, 1998)

4.3.1. MECANISMOS DE ESCAPE TUMORAL FRENTE AL SISTEMA INMUNE.

Las alteraciones que se observan en los tumores varían tanto si comparamos tumores de distintos orígenes como tumores de igual origen, unos pueden comportarse como un tejido normal en crecimiento y no provocar respuesta inmune, otros pueden potencialmente producir dicha respuesta pero ser capaces de bloquearla y otros pueden ser resistentes a la respuesta inmune a pesar de producirla, llegando incluso a establecer una suerte de batalla con el sistema inmune. En todos estos casos, la variabilidad genética del tumor unida a la acción del sistema inmune produciría una especie de presión evolutiva que conferirá a las células tumorales resultantes las características que le permiten progresar; de otro modo, el tumor desaparecería sin dar manifestaciones clínicas. Vamos a ver de forma individualizada los principales mecanismos descritos.

4.3.1.1. Alteraciones en la expresión de moléculas HLA de clase I

Se han descrito pérdidas de expresión de moléculas HLA en diversos tipos de tumores (Festenstein, 1987; Garrido et al., 1993; Cabrera et al., 2003a); estas células tumorales con alteraciones en la expresión de moléculas HLA de clase I pueden tener ventajas en su desarrollo. Así, la pérdida del alelo HLA de clase I que presenta el antígeno tumoral va a preservar a la célula de la lisis por linfocitos T citotóxicos; igualmente, una baja expresión generalizada de moléculas HLA de clase I puede disminuir lo suficiente la presentación del antígeno tumoral como para no provocar respuesta citotóxica, pero esta expresión baja va a ser suficiente como para evitar la lisis mediada por células NK (Algarra et al., 1999).

La existencia de células tumorales con alteraciones de expresión de HLA de clase I tiene consecuencias adversas a la hora de aplicar terapias basadas en la estimulación de las células T, ya que la célula tumoral puede carecer del alelo HLA de clase I en el cual se carga el péptido antigénico frente al que se quiere provocar la respuesta inmune. Por lo tanto, la detección de una alteración específica de un determinado tumor en la expresión de moléculas HLA de clase I puede ser de gran utilidad en el momento de elegir un determinado protocolo inmunoterapéutico.

El uso de anticuerpos monoclonales en tumores permite realizar estudios inmunohistológicos que reconocen algunos alelos de HLA de clase I, estos anticuerpos, en uso conjunto con anticuerpos que reconocen todas las moléculas HLA de clase I, anticuerpos locus específicos y otros específicos frente a las dos grandes familias de alelos B (Bw4 y Bw6) ha permitido detectar diferentes tipos de alteraciones en la expresión de moléculas HLA de clase I (Cabrera et al., 1996; Cabrera et al., 1998; Cabrera et al., 2003b; Cabrera et al., 2000). La disponibilidad cada vez mayor de anticuerpos monoclonales alelo-específicos ha aumentado la detección de estas alteraciones (Garrido et al., 1997). El empleo de anticuerpos frente a distintas especificidades HLA de clase I, apoyado a veces en otras técnicas (como ocurre en la caracterización del fenotipo II), nos posibilita agrupar las alteraciones en la expresión de antígenos HLA de clase I en siete fenotipos (Figura 6).

4.3.1.1.1. Pérdida total de antígenos HLA de clase I. Fenotipo I.

La pérdida completa de expresión de antígenos HLA puede ser la consecuencia de alteraciones en distintas etapas de la síntesis de la molécula HLA, ya que mutaciones o defectos en la síntesis de los genes de la $\beta 2m$ y modificaciones epigenéticas de la cadena pesada (HC) de la región HLA que conlleven metilación del promotor y silenciación génica pueden conducir a este fenotipo (Browning et al., 1996; Serrano et al., 2001; Benitez et al., 1998). También alteraciones en la producción, ensamblaje o transporte del péptido antigénico pueden causar ausencia total de expresión de estas moléculas en la superficie celular (Sanda et al., 1995; Seliger et al., 2000).

En tumores con alteraciones en mecanismos reparadores del ADN se han descrito mutaciones en el gen de la $\beta 2m$, por tener secuencias de repetición susceptibles de sufrir alteraciones, alteraciones que pueden llevar a la pérdida de expresión de moléculas HLA de clase I, como se ha descrito en carcinomas de colon (Bicknell et al., 1996; Cabrera et al., 2003).

4.3.1.1.2. Pérdida de un haplotipo HLA. Fenotipo II.

La pérdida de un haplotipo se describió inicialmente en diversas líneas celulares derivadas de tumores de distintos tipos histológicos (Browning et al., 1996; Real et al., 1998; Torres et al., 1996). Existen evidencias de que esta alteración fenotípica la originan alteraciones en la región genómica del MHC, que pueden detectarse como pérdida de heterocigosidad (LOH). Los mecanismos que conducen a una LOH son diversos e incluyen: deleciones, conversión génica, recombinación, translocación, no-disyunción y pérdida cromosómica más duplicación (Cavenee et al., 1983). Su detección con técnicas inmunohistológicas es difícil al no disponer de anticuerpos monoclonales específicos que reconozcan cada uno de los alelos HLA, por lo que el empleo de técnicas de microdissección en tejido, empleo de microsatélites y tipaje genómico del ADN tumoral han permitido mejorar mucho la detección de LOH en la región cromosómica del complejo mayor de histocompatibilidad, detectándose tales alteraciones en tumores de laringe, carcinomas renales y otras procedencias histológicas (Maleno et al., 2004). En carcinomas de vejiga no se había definido la LOH mediante empleo de microsatélites y tipaje genómico, labor que ha sido realizada en el presente estudio. (Maleno et al., 2004; Ramal et al., 2000; Maleno et al., 2002)

4.3.1.1.3. Pérdida de un locus HLA de clase I. Fenotipo III.

Esta anomalía se detecta con anticuerpos locus específicos y parece deberse a un fallo transcripcional que suele afectar más frecuentemente al locus B (Mendez et al., 2001). Se han detectado alteraciones en las secuencias promotoras de locus HLA de clase I (Cereb and Yang, 1994) y en los niveles de mRNA de los alelos de un locus HLA en células tumorales. Estos niveles pueden elevarse con el uso de citoquinas.

4.3.1.1.4. Pérdida de un alelo HLA. Fenotipo IV.

La pérdida de un alelo HLA se debe a mutaciones puntuales o deleciones parciales de los genes HLA de clase I (Browning et al., 1993) que afectan a la

transcripción o traducción de la cadena pesada (Wang et al., 1998) o impiden la unión de la molécula HLA a los TAP (Wang et al., 1996b). Estos defectos no son recuperables mediante tratamiento con citoquinas. Como no existen anticuerpos frente a todos los alelos HLA de clase I, el porcentaje de tumores en que se detecta este fenotipo mediante inmunohistoquímica será siempre menor que el porcentaje real.

4.3.1.1.5. Fenotipo compuesto. Fenotipo V.

Es el resultado de la combinación de algunas de las alteraciones anteriores. Este fenotipo se ha descrito en líneas celulares de melanoma por una pérdida haplotípica unida a una baja regulación del locus B (Ikeda et al., 1997; Real et al., 1998) En carcinomas de cérvix, la alteración está originada por una pérdida haplotípica asociada a inserciones, deleciones o mutaciones puntuales en los genes HLA (Koopman et al., 1998). Se considera que esta alteración deriva de la combinación de diversos mecanismos que actúan de forma independiente durante la progresión tumoral (Ruiz-Cabello and Garrido, 1998).

4.3.1.1.6. Falta de respuesta al interferon (IFN). Fenotipo VI.

Se ha descrito en tumores con baja expresión de antígenos HLA que no responden al tratamiento con interferon por una baja regulación general de los elementos de respuesta secuencial a interferon (IRSE) (Abril et al., 1996) o de forma menos general, una baja respuesta para la inducción de TAP y LMP (Dovhey et al., 2000). Lógicamente, este fenotipo puede establecerse en líneas tumorales y no en tumores sólidos.

4.3.1.1.7. Baja expresión de moléculas HLA clásicas (Ia) con expresión aberrante de moléculas HLA no clásicas (Ib). Fenotipo VII.

En estas células se detecta una baja expresión de moléculas HLA clásicas y se aprecia expresión de moléculas HLA-E, lo que permitiría a estos tumores inhibir la actividad de las células NK al ser reconocidas por el receptor CD94/NKG2 (Marin et al., 2003).

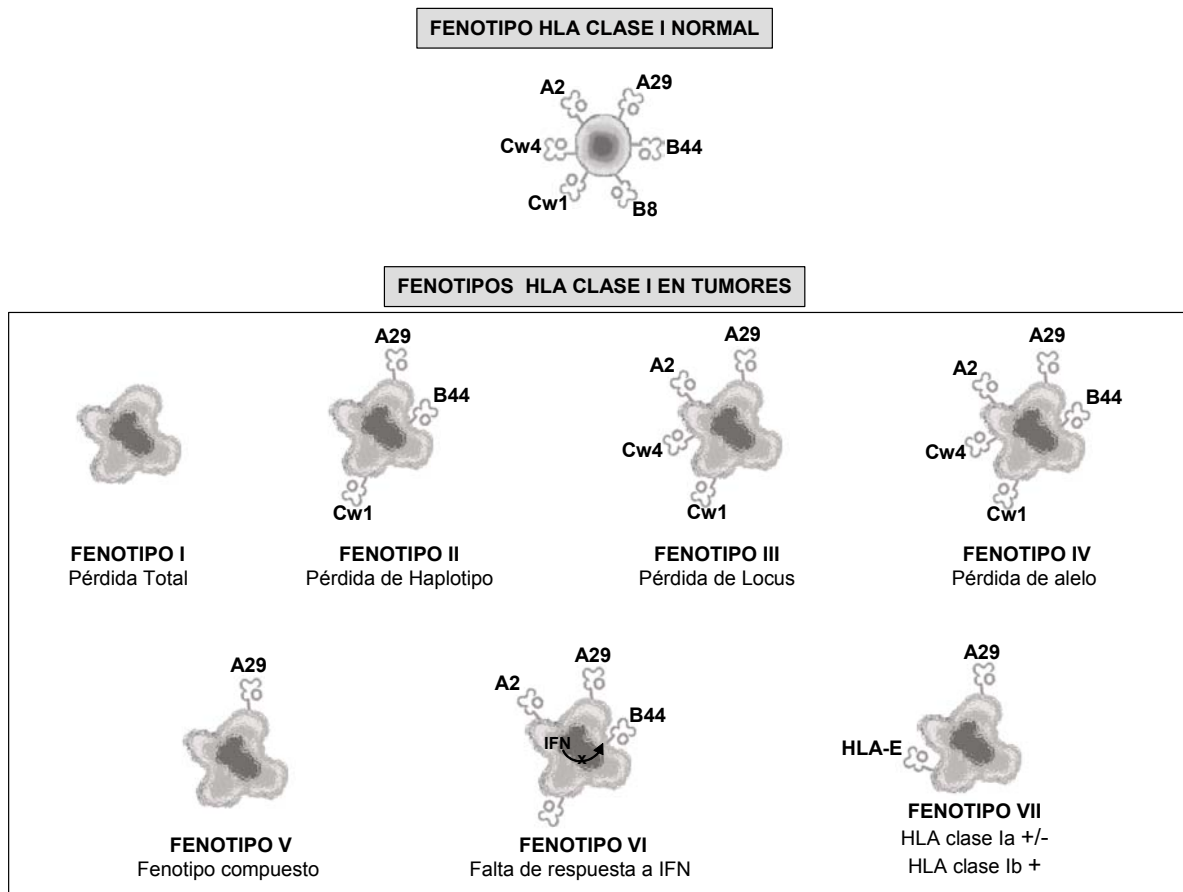


Figura 6. Alteraciones en la expresión de moléculas HLA.

4.3.1.2. Pérdida de antígenos tumorales

La pérdida de antígenos tumorales es una alternativa para eludir una respuesta por CTLs frente a un antígeno tumoral. Así, por ejemplo, se ha comprobado la pérdida del antígeno de melanoma MART, frente al que se producen CTLs específicos, en un 25% de los tumores de estadio IV frente a un 0% de pérdida de los melanomas en estadio I(Hofbauer et al., 1998). El hecho de que existan antígenos inmunodominantes, es decir, antígenos frente a los cuales se monta preferentemente la respuesta inmune, ha hecho pensar en la posibilidad de que se produzcan células tumorales carentes de los mismos o con una expresión lo suficientemente baja como para no ser inmunógeno; estas células progresarían mientras el sistema inmune se centra en destruir a las células tumorales que sí lo expresan(Khong and Restifo, 2002).

4.3.1.3. Pérdida de la señalización de muerte celular

Dos moléculas de superficie presentes en linfocitos y capaces de producir apoptosis en células tumorales son FasL y TRAIL, mediante la activación de la cascada de las caspasas(Davidson et al., 1998; Takeda et al., 2001). Se ha comprobado que existen mutaciones de pérdida de sentido para FasL en tumores hematológicos y melanoma(Gronbaek et al., 1998) y pérdidas cromosómicas y mutaciones para las moléculas encargadas de la transducción de la señal de TRAIL(Hersey and Zhang, 2001). También se ha descrito en tumores altos niveles de expresión de inhibidores de la caspasa 8 (cFLIP)(Irmmler et al., 1997), así como mutaciones en el gen de la caspasa 10(Shin et al., 2002).

Otra vía de escape es la inhibición de la apoptosis inducida por perforinas mediante la producción de PI-9 un inhibidor de la granzima B(Medema et al., 2001).

4.3.1.4. Producción de citoquinas inmunosupresoras

4.3.1.4.1. VEGF.

El factor de crecimiento del endotelio vascular es secretado por muchos tumores y se ha comprobado que además de tener actividad angiogénica es capaz de inhibir la diferenciación y maduración de las células dendríticas(Kuroi and Toi, 2001; Oyama et al., 1998)

4.3.1.4.2. Interleukina-10

Esta citoquina es frecuentemente encontrada en el suero de pacientes con cáncer, su efecto inmunosupresor es debido a la suma de distintos efectos. Se ha comprobado la capacidad de IL-10 para inhibir la diferenciación hasta células dendríticas, también su capacidad de inhibir la producción de IL-12 y las respuestas de linfocitos colaboradores Th-1(De Smedt et al., 1997; Sharma et al., 1999). También disminuye la presentación antigénica ya que disminuye la expresión de moléculas HLA de clase I y II y de componentes de la maquinaria del procesamiento antigénico (Sharma et al., 1999; Zeidler et al., 1997).

4.3.1.4.3. Prostaglandina E₂

Esta citoquina es un factor proinflamatorio que se sobreexpresa en tumores debido a la alta actividad ciclooxygenasa que poseen; el efecto principal que se ha encontrado es la inhibición de la producción de IL-12 por macrófagos, a la vez que favorece la producción de IL-10 por macrófagos y linfocitos(Khong and Restifo, 2002).

4.3.1.4.4. TGF-beta

Este factor se ha demostrado que es producido por diferentes tipos de tumores y se ha comprobado que inhibe la proliferación y actividad de los linfocitos *in vivo*(Weller et al., 1994).

4.3.1.5. Producción de ligandos peptídicos alterados.

Los ligandos peptídicos alterados son péptidos que tienen la misma especificidad tanto para cargarse en un alelo HLA como para interactuar con el mismo TCR que su análogo original, su origen está en mutaciones puntuales que afectan al péptido presentado. El resultado es un péptido que puede actuar como agonista parcial o antagonista, es decir, producir anergia en lugar de activación; el desarrollo de péptidos alterados capaces de comportarse como superagonistas (producir una mayor activación del linfocito T) está siendo investigado como arma terapéutica(Rivoltini et al., 2002).

4.3.1.6. Apoptosis de linfocitos T activados

En varios tipos de tumores humanos como melanoma, carcinoma de pulmón y carcinoma de colon se ha comprobado la expresión de la molécula funcional Fas-L, capaz de interactuar con el receptor Fas linfocitario y provocar la apoptosis de los linfocitos T antitumorales, aunque la expresión de este receptor es cuestionada por otros autores(Chappell et al., 1999; Hahne et al., 1996; Niehans et al., 1997).

4.4. INMUNOTERAPIA EN EL CÁNCER DE VEJIGA

Como apartado final de esta introducción vamos a tratar los avances en inmunoterapia tumoral en el carcinoma vesical, pues al fin y al cabo el motivo de esta investigación es aportar conocimientos que ayuden al control del desarrollo tumoral. El carcinoma de vejiga es un tumor en el que se emplea la inmunoterapia de forma habitual, mediante el uso del bacilo de Calmette y Guérin (BCG).

4.4.1. Uso del bacilo de Calmet y Guérin en el carcinoma vesical.

El BCG se emplea mediante instilaciones intravesicales tras resección transuretral de tumores superficiales de alto grado donde es más eficaz que otros tratamientos, de tipo citostático, para prevenir progresión y recidiva. Además, el tratamiento con BCG es de elección en el carcinoma in situ de vejiga. Sin embargo, la terapia con BCG no resulta efectiva en el tratamiento de tumores infiltrantes de la muscular(Meyer et al., 2002; Alexandroff et al., 1999). El tratamiento consiste en una instilación vesical semanal durante seis meses, protocolo propuesto por Morales y col. en 1976. el BCG va a producir una respuesta inflamatoria en la que se ven implicadas las células del endotelio vesical; el punto de unión del BCG es una proteína de la matriz extracelular, la fibronectina(Meyer et al., 2002).

La respuesta inmune comienza con un infiltrado de tipo granulocítico, que en el transcurso del tratamiento originará granulomas en la pared vesical. Seguidamente van a llegar macrófagos, linfocitos T y células NK. Todo este infiltrado va a producir un patrón de citoquinas (INF- γ , IL-2, IL-12, TNF- α) que lleva a una respuesta citotóxica en

individuos respondedores, donde aparecen las llamadas BAK (BCG activated NK cells). En no respondedores el patrón de citoquinas se va a orientar hacia una respuesta de tipo humoral, con la detección concomitante de anticuerpos frente a BCG en orina y falta de producción de INF- γ (Meyer et al., 2002; Bohle and Brandau, 2003). Este hecho ha motivado ensayos en los que se intenta polarizar la respuesta hacia Th1 mediante el uso de citoquinas, como el INF- α (Luo et al., 1999).

El efecto terapéutico se cree es mediado por los linfocitos T y BAK, en modelo murino se ha comprobado que tratamiento con anticuerpo anti-NK1.1 impide el efecto terapéutico(Bohle and Brandau, 2003). También, se ha demostrado la presencia de linfocitos T citotóxicos autólogos específicos frente a un antígeno tumoral humano(Gueguen et al., 1998).

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Fattah, R., Challen, C., Griffiths, T.R., Robinson, M.C., Neal, D.E. and Lunec, J.: Alterations of TP53 in microdissected transitional cell carcinoma of the human urinary bladder: high frequency of TP53 accumulation in the absence of detected mutations is associated with poor prognosis. *Br J Cancer* 77 (1998) 2230-8.
- Abril, E., Mendez, R.E., Garcia, A., Serrano, A., Cabrera, T., Garrido, F. and Ruiz-Cabello, F.: Characterization of a gastric tumor cell line defective in MHC class I inducibility by both alpha- and gamma-interferon. *Tissue Antigens* 47 (1996) 391-8.
- Aguado, B. and Campbell, R.D.: Characterization of a human MHC class III region gene product with S-thioesterase activity. *Biochem J* 341 (Pt 3) (1999) 679-89.
- Alexander, M., Salgaller, M.L., Celis, E., Sette, A., Barnes, W.A., Rosenberg, S.A. and Steller, M.A.: Generation of tumor-specific cytolytic T lymphocytes from peripheral blood of cervical cancer patients by in vitro stimulation with a synthetic human papillomavirus type 16 E7 epitope. *Am J Obstet Gynecol* 175 (1996) 1586-93.
- Alexandroff, A.B., Jackson, A.M., O'Donnell, M.A. and James, K.: BCG immunotherapy of bladder cancer: 20 years on. *Lancet* 353 (1999) 1689-94.
- Algaba, F., Matias-Guiu, X., Badia, F. and Sole-Balcells, F.: Villous adenoma of the prostatic urethra. *Eur Urol* 14 (1988) 255-7.
- Algarra, I., Gaforio, J.J., Cabrera, T., Collado, A. and Garrido, F.: The biological consequences of altered MHC class I expression in tumours. *J Biol Regul Homeost Agents* 13 (1999) 90-6.
- Bagui, T.K., Mohapatra, S., Haura, E. and Pledger, W.J.: P27Kip1 and p21Cip1 are not required for the formation of active D cyclin-cdk4 complexes. *Mol Cell Biol* 23 (2003) 7285-90.
- Baithun, S.I., Naase, M., Blanes, A. and Diaz-Cano, S.J.: Molecular and kinetic features of transitional cell carcinomas of the bladder: biological and clinical implications. *Virchows Arch* 438 (2001) 289-97.
- Baurain, J.F., Colau, D., van Baren, N., Landry, C., Martelange, V., Vikkula, M., Boon, T. and Coulie, P.G.: High frequency of autologous anti-melanoma CTL directed against an antigen generated by a point mutation in a new helicase gene. *J Immunol* 164 (2000) 6057-66.
- Bell, J.I., Denney, D., Foster, L., Lee, B.S., Hardy, D. and McDevitt, H.O.: Molecular biology of the class II region of the human major histocompatibility complex. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1 (1986) 75-82.
- Benedict, W.F., Lerner, S.P., Zhou, J., Shen, X., Tokunaga, H. and Czerniak, B.: Level of retinoblastoma protein expression correlates with p16 (MTS-1/INK4A/CDKN2) status in bladder cancer. *Oncogene* 18 (1999) 1197-203.
- Benitez, R., Godelaine, D., Lopez-Nevot, M.A., Brasseur, F., Jimenez, P., Marchand, M., Oliva, M.R., van Baren, N., Cabrera, T., Andry, G., Landry, C., Ruiz-Cabello, F., Boon, T. and Garrido, F.: Mutations of the beta2-microglobulin gene result in a lack of HLA class I molecules on melanoma cells of two patients immunized with MAGE peptides. *Tissue Antigens* 52 (1998) 520-9.
- Bicknell, D.C., Kaklamanis, L., Hampson, R., Bodmer, W.F. and Karran, P.: Selection for beta 2-microglobulin mutation in mismatch repair-defective colorectal carcinomas. *Curr Biol* 6 (1996) 1695-7.

- Billerey, C., Chopin, D., Aubriot-Lorton, M.H., Ricol, D., Gil Diez de Medina, S., Van Rhijn, B., Bralet, M.P., Lefrere-Belda, M.A., Lahaye, J.B., Abbou, C.C., Bonaventure, J., Zafrani, E.S., van der Kwast, T., Thiery, J.P. and Radvanyi, F.: Frequent FGFR3 mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors. *Am J Pathol* 158 (2001) 1955-9.
- Birkeland, S.A., Storm, H.H., Lamm, L.U., Barlow, L., Blohme, I., Forsberg, B., Eklund, B., Fjeldborg, O., Friedberg, M., Frodin, L. and et, a.l.: Cancer risk after renal transplantation in the Nordic countries, 1964-1986. *Int J Cancer* 60 (1995) 183-9.
- Bjorkman, P.J. and Parham, P.: Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annu Rev Biochem* 59 (1990) 253-88.
- Bodmer, J.G., Marsh, S.G., Albert, E.D., Bodmer, W.F., Dupont, B., Erlich, H.A., Mach, B., Mayr, W.R., Parham, P., Sasazuki, T. and et, a.l.: Nomenclature for factors of the HLA system, 1994. *Eur J Immunogenet* 21 (1994) 485-517.
- Boes, B., Hengel, H., Ruppert, T., Multhaupt, G., Koszinowski, U.H. and Kloetzel, P.M.: Interferon gamma stimulation modulates the proteolytic activity and cleavage site preference of 20S mouse proteasomes. *J Exp Med* 179 (1994) 901-9.
- Bohle, A. and Brandau, S.: Immune mechanisms in bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for superficial bladder cancer. *J Urol* 170 (2003) 964-9.
- Bohm, M., Kleine-Besten, R. and Wieland, I.: Loss of heterozygosity analysis on chromosome 5p defines 5p13-12 as the critical region involved in tumor progression of bladder carcinomas. *Int J Cancer* 89 (2000) 194-7.
- Boshoff, C. and Weiss, R.: AIDS-related malignancies. *Nat Rev Cancer* 2 (2002) 373-82.
- Bosman, F.T.: The nuclear matrix in pathology. *Virchows Arch* 435 (1999) 391-9.
- Bostwick, D.G., Ramnani, D. and Cheng, L.: Diagnosis and grading of bladder cancer and associated lesions. *Urol Clin North Am* 26 (1999) 493-507.
- Brocke, C. and Kunz, H.: Synthesis of tumor-associated glycopeptide antigens. *Bioorg Med Chem* 10 (2002) 3085-112.
- Brown, J.H., Jardetzky, T.S., Gorga, J.C., Stern, L.J., Urban, R.G., Strominger, J.L. and Wiley, D.C.: Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364 (1993) 33-9.
- Browning, M., Petronzelli, F., Bicknell, D., Krausa, P., Rowan, A., Tonks, S., Murray, N., Bodmer, J. and Bodmer, W.: Mechanisms of loss of HLA class I expression on colorectal tumor cells. *Tissue Antigens* 47 (1996) 364-71.
- Browning, M.J., Krausa, P., Rowan, A., Hill, A.B., Bicknell, D.C., Bodmer, J.G. and Bodmer, W.F.: Loss of human leukocyte antigen expression on colorectal tumor cell lines: implications for anti-tumor immunity and immunotherapy. *J Immunother* 14 (1993) 163-8.
- Bukholm, I.K., Nesland, J.M., Karesen, R., Jacobsen, U. and Borresen, A.L.: Relationship between abnormal p53 protein and failure to express p21 protein in human breast carcinomas. *J Pathol* 181 (1997) 140-5.
- Cabrera, C.M., Jimenez, P., Cabrera, T., Esparza, C., Ruiz-Cabello, F. and Garrido, F.: Total loss of MHC class I in colorectal tumors can be explained by two molecular pathways: beta2-microglobulin inactivation in MSI-positive tumors and LMP7/TAP2 downregulation in MSI-negative tumors. *Tissue Antigens* 61 (2003) 211-9.
- Cabrera, T., Angustias Fernandez, M., Sierra, A., Garrido, A., Herruzo, A., Escobedo, A., Fabra, A. and Garrido, F.: High frequency of altered HLA class I phenotypes in invasive breast carcinomas.

Hum Immunol 50 (1996) 127-34.

- Cabrera, T., Collado, A., Fernandez, M.A., Ferron, A., Sancho, J., Ruiz-Cabello, F. and Garrido, F.: High frequency of altered HLA class I phenotypes in invasive colorectal carcinomas. *Tissue Antigens* 52 (1998) 114-23.
- Cabrera, T., Lopez-Nevot, M.A., Gaforio, J.J., Ruiz-Cabello, F. and Garrido, F.: Analysis of HLA expression in human tumor tissues. *Cancer Immunol Immunother* 52 (2003a) 1-9.
- Cabrera, T., Pedrajas, G., Cozar, J.M., Garrido, A., Vicente, J., Tallada, M. and Garrido, F.: HLA class I expression in bladder carcinomas. *Tissue Antigens* 62 (2003b) 324-7.
- Cabrera, T., Salinero, J., Fernandez, M.A., Garrido, A., Esquivias, J. and Garrido, F.: High frequency of altered HLA class I phenotypes in laryngeal carcinomas. *Hum Immunol* 61 (2000) 499-506.
- Campbell, R.D. and Trowsdale, J.: Map of the human MHC. *Immunol Today* 14 (1993) 349-52.
- Cappellen, D., De Oliveira, C., Ricol, D., de Medina, S., Bourdin, J., Sastre-Garau, X., Chopin, D., Thiery, J.P. and Radvanyi, F.: Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas. *Nat Genet* 23 (1999) 18-20.
- Cavenee, W.K., Dryja, T.P., Phillips, R.A., Benedict, W.F., Godbout, R., Gallie, B.L., Murphree, A.L., Strong, L.C. and White, R.L.: Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* 305 (1983) 779-84.
- Cereb, N. and Yang, S.Y.: The regulatory complex of HLA class I promoters exhibits locus-specific conservation with limited allelic variation. *J Immunol* 152 (1994) 3873-83.
- Chang, L.L., Yeh, W.T., Yang, S.Y., Wu, W.J. and Huang, C.H.: Genetic alterations of p16INK4a and p14ARF genes in human bladder cancer. *J Urol* 170 (2003) 595-600.
- Chappell, D.B., Zaks, T.Z., Rosenberg, S.A. and Restifo, N.P.: Human melanoma cells do not express Fas (Apo-1/CD95) ligand. *Cancer Res* 59 (1999) 59-62.
- Chatterjee, S.J., George, B., Goebell, P.J., Alavi-Tafreshi, M., Shi, S.R., Fung, Y.K., Jones, P.A., Cordon-Cardo, C., Datar, R.H. and Cote, R.J.: Hyperphosphorylation of pRb: a mechanism for RB tumour suppressor pathway inactivation in bladder cancer. *J Pathol* 203 (2004) 762-70.
- Chaturvedi, V., Li, L., Hodges, S., Johnston, D., Ro, J.Y., Logothetis, C., von Eschenbach, A.C., Batsakis, J.G. and Czerniak, B.: Superimposed histologic and genetic mapping of chromosome 17 alterations in human urinary bladder neoplasia. *Oncogene* 14 (1997) 2059-70.
- Chen, Q., Smith, M., Nguyen, T., Maher, D.W. and Hersey, P.: T cell recognition of melanoma antigens in association with HLA-A1 on allogeneic melanoma cells. *Cancer Immunol Immunother* 38 (1994) 385-93.
- Cheng, J., Huang, H., Zhang, Z.T., Shapiro, E., Pellicer, A., Sun, T.T. and Wu, X.R.: Overexpression of epidermal growth factor receptor in urothelium elicits urothelial hyperplasia and promotes bladder tumor growth. *Cancer Res* 62 (2002) 4157-63.
- Cheng, L., Chevillet, J.C., Neumann, R.M. and Bostwick, D.G.: Natural history of urothelial dysplasia of the bladder. *Am J Surg Pathol* 23 (1999) 443-7.
- Chicz, R.M., Urban, R.G., Lane, W.S., Gorga, J.C., Stern, L.J., Vignali, D.A. and Strominger, J.L.: Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size. *Nature* 358 (1992) 764-8.
- Clasen, S., Schulz, W.A., Gerharz, C.D., Grimm, M.O., Christoph, F. and Schmitz-Drager, B.J.: Frequent and heterogeneous expression of cyclin-dependent kinase inhibitor WAF1/p21 protein and mRNA in urothelial carcinoma. *Br J Cancer* 77 (1998) 515-21.

- Cordon-Cardo, C.: Mutations of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. *Am J Pathol* 147 (1995) 545-60.
- Cordon-Cardo, C., Finstad, C.L., Bander, N.H. and Melamed, M.R.: Immunoanatomic distribution of cytostructural and tissue-associated antigens in the human urinary tract. *Am J Pathol* 126 (1987) 269-84.
- Coulie, P.G., Karanikas, V., Colau, D., Lurquin, C., Landry, C., Marchand, M., Dorval, T., Brichard, V. and Boon, T.: A monoclonal cytolytic T-lymphocyte response observed in a melanoma patient vaccinated with a tumor-specific antigenic peptide encoded by gene MAGE-3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001) 10290-5.
- Cresswell, P., Androlewicz, M.J. and Ortman, B.: Assembly and transport of class I MHC-peptide complexes. *Ciba Found Symp* 187 (1994) 150-62; discussion 162-9.
- Cresswell, P., Turner, M.J. and Strominger, J.L.: Papain-solubilized HL-A antigens from cultured human lymphocytes contain two peptide fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70 (1973) 1603-7.
- Crowley, N.J., Darrow, T.L., Quinn-Allen, M.A. and Seigler, H.F.: MHC-restricted recognition of autologous melanoma by tumor-specific cytotoxic T cells. Evidence for restriction by a dominant HLA-A allele. *J Immunol* 146 (1991) 1692-9.
- Dalbagni, G., Presti, J., Reuter, V., Fair, W.R. and Cordon-Cardo, C.: Genetic alterations in bladder cancer. *Lancet* 342 (1993) 469-71.
- Dameron, K.M., Volpert, O.V., Tainsky, M.A. and Bouck, N.: Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 265 (1994) 1582-4.
- Davidson, W.F., Giese, T. and Fredrickson, T.N.: Spontaneous development of plasmacytoid tumors in mice with defective Fas-Fas ligand interactions. *J Exp Med* 187 (1998) 1825-38.
- De Plaen, E., Arden, K., Traversari, C., Gaforio, J.J., Szikora, J.P., De Smet, C., Brasseur, F., van der Bruggen, P., Lethe, B., Lurquin, C. and et, a.l.: Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics* 40 (1994) 360-9.
- De Smedt, T., Van Mechelen, M., De Becker, G., Urbain, J., Leo, O. and Moser, M.: Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *Eur J Immunol* 27 (1997) 1229-35.
- Dighe, A.S., Richards, E., Old, L.J. and Schreiber, R.D.: Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity* 1 (1994) 447-56.
- Dovhey, S.E., Ghosh, N.S. and Wright, K.L.: Loss of interferon-gamma inducibility of TAP1 and LMP2 in a renal cell carcinoma cell line. *Cancer Res* 60 (2000) 5789-96.
- Doyle, C. and Strominger, J.L.: Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. *Nature* 330 (1987) 256-9.
- Dranoff, G.: Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 4 (2004) 11-22.
- Dunn, G.P., Old, L.J. and Schreiber, R.D.: The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 22 (2004) 329-60.
- el-Deiry, W.S.: p21/p53, cellular growth control and genomic integrity. *Curr Top Microbiol Immunol* 227 (1998a) 121-37.
- el-Deiry, W.S.: Regulation of p53 downstream genes. *Semin Cancer Biol* 8 (1998b) 345-57.
- Elliott, T., Cerundolo, V., Elvin, J. and Townsend, A.: Peptide-induced conformational change of the class I heavy chain. *Nature* 351 (1991) 402-6.

- Erbersdobler, A., Friedrich, M.G., Schwaibold, H., Henke, R.P. and Huland, H.: Microsatellite alterations at chromosomes 9p, 13q, and 17p in nonmuscle-invasive transitional cell carcinomas of the urinary bladder. *Oncol Res* 10 (1998) 415-20.
- Falk, K., Rotzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G. and Rammensee, H.G.: Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 351 (1991) 290-6.
- Fei, P., Bernhard, E.J. and El-Deiry, W.S.: Tissue-specific induction of p53 targets in vivo. *Cancer Res* 62 (2002) 7316-27.
- Festenstein, H.: The biological consequences of altered MHC expression on tumours. *Br Med Bull* 43 (1987) 217-27.
- Finn, O.J., Jerome, K.R., Henderson, R.A., Pecher, G., Domenech, N., Magarian-Blander, J. and Barratt-Boyes, S.M.: MUC-1 epithelial tumor mucin-based immunity and cancer vaccines. *Immunol Rev* 145 (1995) 61-89.
- Fradet, Y. and Lacombe, L.: Can biological markers predict recurrence and progression of superficial bladder cancer? *Curr Opin Urol* 10 (2000) 441-5.
- Garcia del Muro, X., Condom, E., Vignes, F., Castellsague, X., Figueras, A., Munoz, J., Sola, J., Soler, T., Capella, G. and Germa, J.R.: p53 and p21 Expression levels predict organ preservation and survival in invasive bladder carcinoma treated with a combined-modality approach. *Cancer* 100 (2004) 1859-67.
- Garrido, F., Cabrera, T., Concha, A., Glew, S., Ruiz-Cabello, F. and Stern, P.L.: Natural history of HLA expression during tumour development. *Immunol Today* 14 (1993) 491-9.
- Garrido, F., Ruiz-Cabello, F., Cabrera, T., Perez-Villar, J.J., Lopez-Botet, M., Duggan-Keen, M. and Stern, P.L.: Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today* 18 (1997) 89-95.
- Gaugler, B., Brouwenstijn, N., Vantomme, V., Szikora, J.P., Van der Spek, C.W., Patard, J.J., Boon, T., Schrier, P. and Van den Eynde, B.J.: A new gene coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human renal carcinoma. *Immunogenetics* 44 (1996) 323-30.
- Geraghty, D.E.: Structure of the HLA class I region and expression of its resident genes. *Curr Opin Immunol* 5 (1993) 3-7.
- Gleave, M.E., Hsieh, J.T., Wu, H.C., Hong, S.J., Zhau, H.E., Guthrie, P.D. and Chung, L.W.: Epidermal growth factor receptor-mediated autocrine and paracrine stimulation of human transitional cell carcinoma. *Cancer Res* 53 (1993) 5300-7.
- Glynne, R., Powis, S.H., Beck, S., Kelly, A., Kerr, L.A. and Trowsdale, J.: A proteasome-related gene between the two ABC transporter loci in the class II region of the human MHC. *Nature* 353 (1991) 357-60.
- Gonzalzo, M.L., Hayashida, T., Bender, C.M., Pao, M.M., Tsai, Y.C., Gonzales, F.A., Nguyen, H.D., Nguyen, T.T. and Jones, P.A.: The role of DNA methylation in expression of the p19/p16 locus in human bladder cancer cell lines. *Cancer Res* 58 (1998) 1245-52.
- Goodfellow, P.N., Jones, E.A., Van Heyningen, V., Solomon, E., Bobrow, M., Miggiano, V. and Bodmer, W.F.: The beta2-microglobulin gene is on chromosome 15 and not in the HL-A region. *Nature* 254 (1975) 267-9.
- Graham, S.D. Jr: Immunology of the bladder. *Urol Clin North Am* 19 (1992) 541-8.
- Grande, A.G. 3rd and Van Kaer, L.: Tapasin: an ER chaperone that controls MHC class I assembly with peptide. *Trends Immunol* 22 (2001) 194-9.

- Gronbaek, K., Straten, P.T., Ralfkiaer, E., Ahrenkiel, V., Andersen, M.K., Hansen, N.E., Zeuthen, J., Hou-Jensen, K. and Guldborg, P.: Somatic Fas mutations in non-Hodgkin's lymphoma: association with extranodal disease and autoimmunity. *Blood* 92 (1998) 3018-24.
- Gueguen, M., Patard, J.J., Gaugler, B., Brasseur, F., Renaud, J.C., Van Cangh, P.J., Boon, T. and Van den Eynde, B.J.: An antigen recognized by autologous CTLs on a human bladder carcinoma. *J Immunol* 160 (1998) 6188-94.
- Habuchi, T., Kinoshita, H., Yamada, H., Kakehi, Y., Ogawa, O., Wu, W.J., Takahashi, R., Sugiyama, T. and Yoshida, O.: Oncogene amplification in urothelial cancers with p53 gene mutation or MDM2 amplification. *J Natl Cancer Inst* 86 (1994) 1331-5.
- Habuchi, T., Takahashi, R., Yamada, H., Kakehi, Y., Sugiyama, T. and Yoshida, O.: Metachronous multifocal development of urothelial cancers by intraluminal seeding. *Lancet* 342 (1993) 1087-8.
- Hahne, M., Rimoldi, D., Schroter, M., Romero, P., Schreier, M., French, L.E., Schneider, P., Bornand, T., Fontana, A., Lienard, D., Cerottini, J. and Tschopp, J.: Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 274 (1996) 1363-6.
- Hainau, B. and Dombernowsky, P.: Histology and cell proliferation in human bladder tumors. An autoradiographic study. *Cancer* 33 (1974) 115-26.
- Hannon, G.J. and Beach, D.: p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* 371 (1994) 257-61.
- Harnden, P., Allam, A., Joyce, A.D., Patel, A., Selby, P. and Southgate, J.: Cytokeratin 20 expression by non-invasive transitional cell carcinomas: potential for distinguishing recurrent from non-recurrent disease. *Histopathology* 27 (1995) 169-74.
- Hasui, Y., Osada, Y., Kitada, S. and Nishi, S.: Significance of invasion to the muscularis mucosae on the progression of superficial bladder cancer. *Urology* 43 (1994) 782-6.
- Heney, N.M., Ahmed, S., Flanagan, M.J., Frable, W., Corder, M.P., Hafermann, M.D. and Hawkins, I.R.: Superficial bladder cancer: progression and recurrence. *J Urol* 130 (1983) 1083-6.
- Herr, H.W., Pinsky, C.M., Whitmore, W.F. Jr, Sogani, P.C., Oettgen, H.F. and Melamed, M.R.: Long-term effect of intravesical bacillus Calmette-Guerin on flat carcinoma in situ of the bladder. *J Urol* 135 (1986) 265-7.
- Hersey, P. and Zhang, X.D.: How melanoma cells evade trail-induced apoptosis. *Nat Rev Cancer* 1 (2001) 142-50.
- Hodder, S.L., Mahmoud, A.A., Sorenson, K., Weinert, D.M., Stein, R.L., Ouma, J.H., Koech, D. and King, C.H.: Predisposition to urinary tract epithelial metaplasia in *Schistosoma haematobium* infection. *Am J Trop Med Hyg* 63 (2000) 133-8.
- Hofbauer, G.F., Kamarashev, J., Geertsen, R., Boni, R. and Dummer, R.: Melan A/MART-1 immunoreactivity in formalin-fixed paraffin-embedded primary and metastatic melanoma: frequency and distribution. *Melanoma Res* 8 (1998) 337-43.
- Horowitz, J.M., Park, S.H., Bogenmann, E., Cheng, J.C., Yandell, D.W., Kaye, F.J., Minna, J.D., Dryja, T.P. and Weinberg, R.A.: Frequent inactivation of the retinoblastoma anti-oncogene is restricted to a subset of human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (1990) 2775-9.
- Houghton, A.N., Taormina, M.C., Ikeda, H., Watanabe, T., Oettgen, H.F. and Old, L.J.: Serological survey of normal humans for natural antibody to cell surface antigens of melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77 (1980) 4260-4.
- Ikeda, H., Lethe, B., Lehmann, F., van Baren, N., Baurain, J.F., de Smet, C., Chambost, H., Vitale, M.,

- Moretta, A., Boon, T. and Coulie, P.G.: Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity* 6 (1997) 199-208.
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J.L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L.E. and Tschopp, J.: Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388 (1997) 190-5.
- Ishikawa, J., Xu, H.J., Hu, S.X., Yandell, D.W., Maeda, S., Kamidono, S., Benedict, W.F. and Takahashi, R.: Inactivation of the retinoblastoma gene in human bladder and renal cell carcinomas. *Cancer Res* 51 (1991) 5736-43.
- Jahnson, S. and Karlsson, M.G.: Tumor mapping of regional immunostaining for p21, p53, and mdm2 in locally advanced bladder carcinoma. *Cancer* 89 (2000) 619-29.
- Jardetzky, T.S., Lane, W.S., Robinson, R.A., Madden, D.R. and Wiley, D.C.: Identification of self peptides bound to purified HLA-B27. *Nature* 353 (1991) 326-9.
- Jequier, S. and Rousseau, O.: Sonographic measurements of the normal bladder wall in children. *AJR Am J Roentgenol* 149 (1987) 563-6.
- Jones, E.Y.: MHC class I and class II structures. *Curr Opin Immunol* 9 (1997) 75-9.
- Junttila, T.T., Laato, M., Vahlberg, T., Soderstrom, K.O., Visakorpi, T., Isola, J. and Elenius, K.: Identification of patients with transitional cell carcinoma of the bladder overexpressing ErbB2, ErbB3, or specific ErbB4 isoforms: real-time reverse transcription-PCR analysis in estimation of ErbB receptor status from cancer patients. *Clin Cancer Res* 9 (2003) 5346-57.
- Kaplan, D.H., Shankaran, V., Dighe, A.S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L.J. and Schreiber, R.D.: Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998) 7556-61.
- Kappes, D. and Strominger, J.L.: Human class II major histocompatibility complex genes and proteins. *Annu Rev Biochem* 57 (1988) 991-1028.
- Karanikas, V., Colau, D., Baurain, J.F., Chiari, R., Thonnard, J., Gutierrez-Roelens, I., Goffinet, C., Van Schaftingen, E.V., Weynants, P., Boon, T. and Coulie, P.G.: High frequency of cytolytic T lymphocytes directed against a tumor-specific mutated antigen detectable with HLA tetramers in the blood of a lung carcinoma patient with long survival. *Cancer Res* 61 (2001) 3718-24.
- Karre, K.: NK cells, MHC class I molecules and the missing self. *Scand J Immunol* 55 (2002) 221-8.
- Khong, H.T. and Restifo, N.P.: Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol* 3 (2002) 999-1005.
- Koo, S.H., Kwon, K.C., Ihm, C.H., Jeon, Y.M., Park, J.W. and Sul, C.K.: Detection of genetic alterations in bladder tumors by comparative genomic hybridization and cytogenetic analysis. *Cancer Genet Cytogenet* 110 (1999) 87-93.
- Koopman, L.A., Mulder, A., Corver, W.E., Anholts, J.D., Giphart, M.J., Claas, F.H. and Fleuren, G.J.: HLA class I phenotype and genotype alterations in cervical carcinomas and derivative cell lines. *Tissue Antigens* 51 (1998) 623-36.
- Korkolopoulou, P., Christodoulou, P., Kapralos, P., Exarchakos, M., Bisbiroula, A., Hadjiyannakis, M., Georgountzos, C. and Thomas-Tsagli, E.: The role of p53, MDM2 and c-erb B-2 oncoproteins, epidermal growth factor receptor and proliferation markers in the prognosis of urinary bladder cancer. *Pathol Res Pract* 193 (1997) 767-75.
- Kuroi, K. and Toi, M.: Circulating angiogenesis regulators in cancer patients. *Int J Biol Markers* 16 (2001) 5-26.

- Lacombe, L., Orlow, I., Silver, D., Gerald, W.L., Fair, W.R., Reuter, V.E. and Cordon-Cardo, C.: Analysis of p21WAF1/CIP1 in primary bladder tumors. *Oncol Res* 8 (1996) 409-14.
- Lanier, L.L.: On guard--activating NK cell receptors. *Nat Immunol* 2 (2001) 23-7.
- Lee, C.T., Seol, J.Y., Park, K.H., Yoo, C.G., Kim, Y.W., Ahn, C., Song, Y.W., Han, S.K., Han, J.S., Kim, S., Lee, J.S. and Shim, Y.S.: Differential effects of adenovirus-p16 on bladder cancer cell lines can be overcome by the addition of butyrate. *Clin Cancer Res* 7 (2001) 210-4.
- Lee, R. and Droller, M.J.: The natural history of bladder cancer. Implications for therapy. *Urol Clin North Am* 27 (2000) 1-13, vii.
- Lehner, P.J. and Trowsdale, J.: Antigen presentation: coming out gracefully. *Curr Biol* 8 (1998) R605-8.
- Ljunggren, H.G. and Karre, K.: In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 11 (1990) 237-44.
- Lopez-Botet, M., Moretta, L. and Strominger, J.: NK-cell receptors and recognition of MHC class I molecules. *Immunol Today* 17 (1996) 212-4.
- Louhelainen, J., Wijkstrom, H. and Hemminki, K.: Allelic losses demonstrate monoclonality of multifocal bladder tumors. *Int J Cancer* 87 (2000) 522-7.
- Lu, M.L., Wikman, F., Orntoft, T.F., Charytonowicz, E., Rabbani, F., Zhang, Z., Dalbagni, G., Pohar, K.S., Yu, G. and Cordon-Cardo, C.: Impact of alterations affecting the p53 pathway in bladder cancer on clinical outcome, assessed by conventional and array-based methods. *Clin Cancer Res* 8 (2002) 171-9.
- Luo, Y., Chen, X., Downs, T.M., DeWolf, W.C. and O'Donnell, M.A.: IFN-alpha 2B enhances Th1 cytokine responses in bladder cancer patients receiving Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin immunotherapy. *J Immunol* 162 (1999) 2399-405.
- Mahdy, E., Yoshihiro, S., Zech, L., Wester, K., Pan, Y., Busch, C., Dohner, H., Kallioniemi, O., Bergerheim, U. and Malmstrom, P.U.: Comparison of comparative genomic hybridization, fluorescence in situ hybridization and flow cytometry in urinary bladder cancer. *Anticancer Res* 19 (1999) 7-12.
- Maleno, I., Cabrera, C.M., Cabrera, T., Paco, L., Lopez-Nevot, M.A., Collado, A., Ferron, A. and Garrido, F.: Distribution of HLA class I altered phenotypes in colorectal carcinomas: high frequency of HLA haplotype loss associated with loss of heterozygosity in chromosome region 6p21. *Immunogenetics* 56 (2004) 244-53.
- Maleno, I., Lopez-Nevot, M.A., Cabrera, T., Salinero, J. and Garrido, F.: Multiple mechanisms generate HLA class I altered phenotypes in laryngeal carcinomas: high frequency of HLA haplotype loss associated with loss of heterozygosity in chromosome region 6p21. *Cancer Immunol Immunother* 51 (2002) 389-96.
- Maleno, I., Lopez Nevot, M.A., Seliger, B. and Garrido, F.: Low frequency of HLA haplotype loss associated with loss of heterozygosity in chromosome region 6p21 in clear renal cell carcinomas. *Int J Cancer* 109 (2004) 636-8.
- Mandrzzato, S., Brasseur, F., Andry, G., Boon, T. and van der Bruggen, P.: A CASP-8 mutation recognized by cytolytic T lymphocytes on a human head and neck carcinoma. *J Exp Med* 186 (1997) 785-93.
- Marin, R., Ruiz-Cabello, F., Pedrinaci, S., Mendez, R., Jimenez, P., Geraghty, D.E. and Garrido, F.: Analysis of HLA-E expression in human tumors. *Immunogenetics* 54 (2003) 767-75.
- Medema, J.P., de Jong, J., Peltenburg, L.T., Verdegaal, E.M., Gorter, A., Bres, S.A., Franken, K.L., Hahne, M., Albar, J.P., Melief, C.J. and Offringa, R.: Blockade of the granzyme B/perforin

- pathway through overexpression of the serine protease inhibitor PI-9/SPI-6 constitutes a mechanism for immune escape by tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001) 11515-20.
- Mendez, R., Serrano, A., Jager, E., Maleno, I., Ruiz-Cabello, F., Knuth, A. and Garrido, F.: Analysis of HLA class I expression in different metastases from two melanoma patients undergoing peptide immunotherapy. *Tissue Antigens* 57 (2001) 508-19.
- Meyer, J.P., Persad, R. and Gillatt, D.A.: Use of bacille Calmette-Guerin in superficial bladder cancer. *Postgrad Med J* 78 (2002) 449-54.
- Millan-Rodriguez, F., Chechile-Toniolo, G., Salvador-Bayarri, J., Palou, J. and Vicente-Rodriguez, J.: Multivariate analysis of the prognostic factors of primary superficial bladder cancer. *J Urol* 163 (2000) 73-8.
- Miyamoto, H., Kubota, Y., Noguchi, S., Takase, K., Matsuzaki, J., Moriyama, M., Takebayashi, S., Kitamura, H. and Hosaka, M.: C-ERBB-2 gene amplification as a prognostic marker in human bladder cancer. *Urology* 55 (2000) 679-83.
- Miyamoto, H., Shuin, T., Torigoe, S., Iwasaki, Y. and Kubota, Y.: Retinoblastoma gene mutations in primary human bladder cancer. *Br J Cancer* 71 (1995) 831-5.
- Momand, J., Zambetti, G.P., Olson, D.C., George, D. and Levine, A.J.: The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69 (1992) 1237-45.
- Monaco, J.J.: A molecular model of MHC class-I-restricted antigen processing. *Immunol Today* 13 (1992) 173-9.
- Moreau-Aubry, A., Le Guiner, S., Labarriere, N., Gesnel, M.C., Jotereau, F. and Breathnach, R.: A processed pseudogene codes for a new antigen recognized by a CD8(+) T cell clone on melanoma. *J Exp Med* 191 (2000) 1617-24.
- Moretta, A. and Moretta, L.: HLA class I specific inhibitory receptors. *Curr Opin Immunol* 9 (1997) 694-701.
- Neal, D.E., Sharples, L., Smith, K., Fennelly, J., Hall, R.R. and Harris, A.L.: The epidermal growth factor receptor and the prognosis of bladder cancer. *Cancer* 65 (1990) 1619-25.
- Niehans, G.A., Brunner, T., Frizelle, S.P., Liston, J.C., Salerno, C.T., Knapp, D.J., Green, D.R. and Kratzke, R.A.: Human lung carcinomas express Fas ligand. *Cancer Res* 57 (1997) 1007-12.
- Niehans, G.A., Kratzke, R.A., Froberg, M.K., Aeppli, D.M., Nguyen, P.L. and Geradts, J.: G1 checkpoint protein and p53 abnormalities occur in most invasive transitional cell carcinomas of the urinary bladder. *Br J Cancer* 80 (1999) 1175-84.
- Ohta, J.I., Miyoshi, Y., Uemura, H., Fujinami, K., Mikata, K., Hosaka, M., Tokita, Y. and Kubota, Y.: Fluorescence in situ hybridization evaluation of c-erbB-2 gene amplification and chromosomal anomalies in bladder cancer. *Clin Cancer Res* 7 (2001) 2463-7.
- Old, L.J. and Chen, Y.T.: New paths in human cancer serology. *J Exp Med* 187 (1998) 1163-7.
- Oliner, J.D., Kinzler, K.W., Meltzer, P.S., George, D.L. and Vogelstein, B.: Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 358 (1992) 80-3.
- Orlow, I., Lacombe, L., Hannon, G.J., Serrano, M., Pellicer, I., Dalbagni, G., Reuter, V.E., Zhang, Z.F., Beach, D. and Cordon-Cardo, C.: Deletion of the p16 and p15 genes in human bladder tumors. *J Natl Cancer Inst* 87 (1995) 1524-9.
- Orsola, A., Palou, J., Xavier, B., Algaba, F., Salvador, J. and Vicente, J.: Primary bladder carcinoma in situ: assessment of early BCG response as a prognostic factor. *Eur Urol* 33 (1998a) 457-63.

- Orsola, A., Palou, J., Xavier, B., Algaba, F., Salvador, J. and Vicente, J.: Primary bladder carcinoma in situ: assessment of early BCG response as a prognostic factor. *Eur Urol* 33 (1998b) 457-63.
- Oyama, T., Ran, S., Ishida, T., Nadaf, S., Kerr, L., Carbone, D.P. and Gabilovich, D.I.: Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell maturation through the inhibition of nuclear factor-kappa B activation in hemopoietic progenitor cells. *J Immunol* 160 (1998) 1224-32.
- Oyasu, R., Nan, L., Szumel, R.C., Kawamata, H. and Hirohashi, S.: p53 gene mutations in human urothelial carcinomas: analysis by immunohistochemistry and single-strand conformation polymorphism. *Mod Pathol* 8 (1995) 170-6.
- Pamer, E. and Cresswell, P.: Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol* 16 (1998) 323-58.
- Pardoll, D.: Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu Rev Immunol* 21 (2003) 807-39.
- Penn, I.: Malignant melanoma in organ allograft recipients. *Transplantation* 61 (1996) 274-8.
- Peters, P.J., Neefjes, J.J., Oorschot, V., Ploegh, H.L. and Geuze, H.J.: Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments. *Nature* 349 (1991) 669-76.
- Pomerantz, J., Schreiber-Agus, N., Liegeois, N.J., Silverman, A., Alland, L., Chin, L., Potes, J., Chen, K., Orlow, I., Lee, H.W., Cordon-Cardo, C. and DePinho, R.A.: The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* 92 (1998) 713-23.
- Purcell, A.W., Gorman, J.J., Garcia-Peydro, M., Paradela, A., Burrows, S.R., Talbo, G.H., Laham, N., Peh, C.A., Reynolds, E.C., Lopez De Castro, J.A. and McCluskey, J.: Quantitative and qualitative influences of tapasin on the class I peptide repertoire. *J Immunol* 166 (2001) 1016-27.
- Quelle, D.E., Zindy, F., Ashmun, R.A. and Sherr, C.J.: Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 83 (1995) 993-1000.
- Ramal, L.M., Maleno, I., Cabrera, T., Collado, A., Ferron, A., Lopez-Nevot, M.A. and Garrido, F.: Molecular strategies to define HLA haplotype loss in microdissected tumor cells. *Hum Immunol* 61 (2000) 1001-12.
- Ramirez-Montagut, T., Turk, M.J., Wolchok, J.D., Guevara-Patino, J.A. and Houghton, A.N.: Immunity to melanoma: unraveling the relation of tumor immunity and autoimmunity. *Oncogene* 22 (2003) 3180-7.
- Ravery, V., Colombel, M., Popov, Z., Bastuji, S., Patard, J.J., Bellot, J., Abbou, C.C., Fradet, Y. and Chopin, D.K.: Prognostic value of epidermal growth factor-receptor, T138 and T43 expression in bladder cancer. *Br J Cancer* 71 (1995) 196-200.
- Ravery, V., Grignon, D., Angulo, J., Pontes, E., Montie, J., Crissman, J. and Chopin, D.: Evaluation of epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, epidermal growth factor and c-erbB2 in the progression of invasive bladder cancer. *Urol Res* 25 (1997) 9-17.
- Real, L.M., Jimenez, P., Canton, J., Kirkin, A., Garcia, A., Abril, E., Zeuthen, J., Ruiz-Cabello, F. and Garrido, F.: In vivo and in vitro generation of a new altered HLA phenotype in melanoma-tumour-cell variants expressing a single HLA-class-I allele. *Int J Cancer* 75 (1998) 317-23.
- Reits, E.A., Vos, J.C., Gromme, M. and Neefjes, J.: The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins. *Nature* 404 (2000) 774-8.

- Reuter, V.E.: Bladder. Risk and prognostic factors--a pathologist's perspective. *Urol Clin North Am* 26 (1999) 481-92.
- Riddle, P.R., Chisholm, G.D., Trott, P.A. and Pugh, R.C.: Flat carcinoma in Situ of bladder. *Br J Urol* 47 (1975) 829-33.
- Rivoltini, L., Carrabba, M., Huber, V., Castelli, C., Novellino, L., Dalerba, P., Mortarini, R., Arancia, G., Anichini, A., Fais, S. and Parmiani, G.: Immunity to cancer: attack and escape in T lymphocyte-tumor cell interaction. *Immunol Rev* 188 (2002) 97-113.
- Ro, J.Y., Ayala, A.G. and el-Naggar, A.: Muscularis mucosa of urinary bladder. Importance for staging and treatment. *Am J Surg Pathol* 11 (1987) 668-73.
- Rongcun, Y., Salazar-Onfray, F., Charo, J., Malmberg, K.J., Evrin, K., Maes, H., Kono, K., Hising, C., Petersson, M., Larsson, O., Lan, L., Appella, E., Sette, A., Celis, E. and Kiessling, R.: Identification of new HER2/neu-derived peptide epitopes that can elicit specific CTL against autologous and allogeneic carcinomas and melanomas. *J Immunol* 163 (1999) 1037-44.
- Rosell Costa, D., Garcia-Foncillas Lopez, J., Diez-Caballero Vivas-Perez, J.I., Garcia-Tapia, J.A., Sanz Perez, G., Abad Alonso, F.D., Martin-Marquina Aspiunza, A., Rodriguez-Rubio Cortadellas, F.I., Robles Garcia, J.E., Zudaire Bergera, J.J. and Berian Polo, J.M.: [Gene sequence analysis of suppressor oncogene p53 in bladder carcinoma]. *Actas Urol Esp* 22 (1998a) 552-6.
- Rosell Costa, D., Garcia-Foncillas Lopez, J., Diez-Caballero Vivas-Perez, J.I., Garcia-Tapia, J.A., Sanz Perez, G., Abad Alonso, F.D., Martin-Marquina Aspiunza, A., Rodriguez-Rubio Cortadellas, F.I., Robles Garcia, J.E., Zudaire Bergera, J.J. and Berian Polo, J.M.: [Gene sequence analysis of suppressor oncogene p53 in bladder carcinoma]. *Actas Urol Esp* 22 (1998b) 552-6.
- Rubben, H., Lutzeyer, W., Fischer, N., Deutz, F., Lagrange, W. and Giani, G.: Natural history and treatment of low and high risk superficial bladder tumors. *J Urol* 139 (1988) 283-5.
- Rudensky, A.Y.u., Preston-Hurlburt, P., Hong, S.C., Barlow, A. and Janeway, C.A. Jr: Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* 353 (1991) 622-7.
- Ruiz-Cabello, F. and Garrido, F.: HLA and cancer: from research to clinical impact. *Immunol Today* 19 (1998) 539-42.
- Sahin, U., Tureci, O., Schmitt, H., Cochlovius, B., Johannes, T., Schmits, R., Stenner, F., Luo, G., Schobert, I. and Pfreundschuh, M.: Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995) 11810-3.
- Sanchez-Carbayo, M., Socci, N.D., Charytonowicz, E., Lu, M., Prystowsky, M., Childs, G. and Cordon-Cardo, C.: Molecular profiling of bladder cancer using cDNA microarrays: defining histogenesis and biological phenotypes. *Cancer Res* 62 (2002) 6973-80.
- Sanchez-Carbayo, M., Socci, N.D., Lozano, J.J., Li, W., Charytonowicz, E., Belbin, T.J., Prystowsky, M.B., Ortiz, A.R., Childs, G. and Cordon-Cardo, C.: Gene discovery in bladder cancer progression using cDNA microarrays. *Am J Pathol* 163 (2003) 505-16.
- Sanda, M.G., Restifo, N.P., Walsh, J.C., Kawakami, Y., Nelson, W.G., Pardoll, D.M. and Simons, J.W.: Molecular characterization of defective antigen processing in human prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 87 (1995) 280-5.
- Saran, K.K., Gould, D., Godec, C.J. and Verma, R.S.: Genetics of bladder cancer. *J Mol Med* 74 (1996) 441-5.
- Sarkis, A.S., Dalbagni, G., Cordon-Cardo, C., Melamed, J., Zhang, Z.F., Sheinfeld, J., Fair, W.R., Herr, H.W. and Reuter, V.E.: Association of P53 nuclear overexpression and tumor progression in carcinoma in situ of the bladder. *J Urol* 152 (1994) 388-92.

- Schubert, U., Anton, L.C., Gibbs, J., Norbury, C.C., Yewdell, J.W. and Bennink, J.R.: Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404 (2000) 770-4.
- Seliger, B., Wollscheid, U., Momburg, F., Blankenstein, T. and Huber, C.: Coordinate downregulation of multiple MHC class I antigen processing genes in chemical-induced murine tumor cell lines of distinct origin. *Tissue Antigens* 56 (2000) 327-36.
- Serrano, A., Tanzarella, S., Lionello, I., Mendez, R., Traversari, C., Ruiz-Cabello, F. and Garrido, F.: Repression of HLA class I antigens and restoration of antigen-specific CTL response in melanoma cells following 5-aza-2'-deoxycytidine treatment. *Int J Cancer* 94 (2001) 243-51.
- Sharma, S., Stolina, M., Lin, Y., Gardner, B., Miller, P.W., Kronenberg, M. and Dubinett, S.M.: T cell-derived IL-10 promotes lung cancer growth by suppressing both T cell and APC function. *J Immunol* 163 (1999) 5020-8.
- Shawar, S.M., Vyas, J.M., Rodgers, J.R. and Rich, R.R.: Antigen presentation by major histocompatibility complex class I-B molecules. *Annu Rev Immunol* 12 (1994) 839-80.
- Sheil, A.G.: Patterns of malignancies following renal transplantation. *Transplant Proc* 31 (1999) 1263-5.
- Shepherd, J.C., Schumacher, T.N., Ashton-Rickardt, P.G., Imaeda, S., Ploegh, H.L., Janeway, C.A. Jr and Tonegawa, S.: TAP1-dependent peptide translocation in vitro is ATP dependent and peptide selective. *Cell* 74 (1993) 577-84.
- Shin, M.S., Kim, H.S., Kang, C.S., Park, W.S., Kim, S.Y., Lee, S.N., Lee, J.H., Park, J.Y., Jang, J.J., Kim, C.W., Kim, S.H., Lee, J.Y., Yoo, N.J. and Lee, S.H.: Inactivating mutations of CASP10 gene in non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 99 (2002) 4094-9.
- Simon, R., Struckmann, K., Schraml, P., Wagner, U., Forster, T., Moch, H., Fijan, A., Bruderer, J., Wilber, K., Mihatsch, M.J., Gasser, T. and Sauter, G.: Amplification pattern of 12q13-q15 genes (MDM2, CDK4, GLI) in urinary bladder cancer. *Oncogene* 21 (2002) 2476-83.
- Soini, Y., Kamel, D., Paakko, P., Lehto, V.P., Oikarinen, A. and Vahakangas, K.V.: Aberrant accumulation of p53 associates with Ki67 and mitotic count in benign skin lesions. *Br J Dermatol* 131 (1994) 514-20.
- Spruck, C.H. 3rd, Ohneseit, P.F., Gonzalez-Zulueta, M., Esrig, D., Miyao, N., Tsai, Y.C., Lerner, S.P., Schmutte, C., Yang, A.S., Cote, R. and et, a.l.: Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res* 54 (1994) 784-8.
- Stewart, C.A., Horton, R., Allcock, R.J., Ashurst, J.L., Atrazhev, A.M., Coggill, P., Dunham, I., Forbes, S., Halls, K., Howson, J.M., Humphray, S.J., Hunt, S., Mungall, A.J., Osoegawa, K., Palmer, S., Roberts, A.N., Rogers, J., Sims, S., Wang, Y., Wilming, L.G., Elliott, J.F., de Jong, P.J., Sawcer, S., Todd, J.A., Trowsdale, J. and Beck, S.: Complete MHC haplotype sequencing for common disease gene mapping. *Genome Res* 14 (2004) 1176-87.
- Takahashi, K., Shichijo, S., Noguchi, M., Hirohata, M. and Itoh, K.: Identification of MAGE-1 and MAGE-4 proteins in spermatogonia and primary spermatocytes of testis. *Cancer Res* 55 (1995) 3478-82.
- Takeda, K., Smyth, M.J., Cretney, E., Hayakawa, Y., Yamaguchi, N., Yagita, H. and Okumura, K.: Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in NK cell-mediated and IFN-gamma-dependent suppression of subcutaneous tumor growth. *Cell Immunol* 214 (2001) 194-200.
- Taylor, D.C., Bhagavan, B.S., Larsen, M.P., Cox, J.A. and Epstein, J.I.: Papillary urothelial hyperplasia. A precursor to papillary neoplasms. *Am J Surg Pathol* 20 (1996) 1481-8.
- Torres, M.J., Ruiz-Cabello, F., Skoudy, A., Berrozpe, G., Jimenez, P., Serrano, A., Real, F.X. and Garrido, F.: Loss of an HLA haplotype in pancreas cancer tissue and its corresponding tumor

- derived cell line. *Tissue Antigens* 47 (1996) 372-81.
- Townsend, A., Bastin, J., Bodmer, H., Brownlee, G., Davey, J., Gotch, F., Gould, K., Jones, I., McMichael, A., Rothbard, J. and et, a.l.: Recognition of influenza virus proteins by cytotoxic T lymphocytes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 323 (1989) 527-33.
- Trinchieri, G.: Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 47 (1989) 187-376.
- Trofe, J., Beebe, T.M., Buell, J.F., Hanaway, M.J., First, M.R., Alloway, R.R., Gross, T.G. and Woodle, E.S.: Posttransplant malignancy. *Prog Transplant* 14 (2004) 193-200.
- Trowsdale, J., Hanson, I., Mockridge, I., Beck, S., Townsend, A. and Kelly, A.: Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the 'ABC' superfamily of transporters. *Nature* 348 (1990) 741-4.
- Tsai, Y.C., Simoneau, A.R., Spruck, C.H. 3rd, Nichols, P.W., Steven, K., Buckley, J.D. and Jones, P.A.: Mosaicism in human epithelium: macroscopic monoclonal patches cover the urothelium. *J Urol* 153 (1995) 1697-700.
- Tsutsumi, M., Tsai, Y.C., Gonzalzo, M.L., Nichols, P.W. and Jones, P.A.: Early acquisition of homozygous deletions of p16/p19 during squamous cell carcinogenesis and genetic mosaicism in bladder cancer. *Oncogene* 17 (1998) 3021-7.
- Tuna, B., Yorukoglu, K., Tuzel, E., Guray, M., Mungan, U. and Kirkali, Z.: Expression of p53 and mdm2 and their significance in recurrence of superficial bladder cancer. *Pathol Res Pract* 199 (2003) 323-8.
- Unanue, E.R. and Allen, P.M.: The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science* 236 (1987) 551-7.
- Van Bleek, G.M. and Nathenson, S.G.: Isolation of an endogenously processed immunodominant viral peptide from the class I H-2Kb molecule. *Nature* 348 (1990) 213-6.
- van den Broek, M.E., Kagi, D., Ossendorp, F., Toes, R., Vamvakas, S., Lutz, W.K., Melief, C.J., Zinkernagel, R.M. and Hengartner, H.: Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J Exp Med* 184 (1996) 1781-90.
- Van den Eynde, B., Peeters, O., De Backer, O., Gaugler, B., Lucas, S. and Boon, T.: A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *J Exp Med* 182 (1995) 689-98.
- van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A. and Boon, T.: A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254 (1991) 1643-7.
- van Ham, M., van Lith, M., Lillemeier, B., Tjin, E., Gruneberg, U., Rahman, D., Pastoors, L., van Meijgaarden, K., Roucard, C., Trowsdale, J., Ottenhoff, T., Pappin, D. and Neefjes, J.: Modulation of the major histocompatibility complex class II-associated peptide repertoire by human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DO. *J Exp Med* 191 (2000) 1127-36.
- van Ham, S.M., Tjin, E.P., Lillemeier, B.F., Gruneberg, U., van Meijgaarden, K.E., Pastoors, L., Verwoerd, D., Tulp, A., Canas, B., Rahman, D., Ottenhoff, T.H., Pappin, D.J., Trowsdale, J. and Neefjes, J.: HLA-DO is a negative modulator of HLA-DM-mediated MHC class II peptide loading. *Curr Biol* 7 (1997) 950-7.
- van Rhijn, B.W., van Tilborg, A.A., Lurkin, I., Bonaventure, J., de Vries, A., Thiery, J.P., van der Kwast, T.H., Zwarthoff, E.C. and Radvanyi, F.: Novel fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) mutations in bladder cancer previously identified in non-lethal skeletal disorders. *Eur J Hum Genet* 10 (2002) 819-24.

- van Tilborg, A.A., de Vries, A., de Bont, M., Groenfeld, L.E. and Zwarthoff, E.C.: The random development of LOH on chromosome 9q in superficial bladder cancers. *J Pathol* 198 (2002) 352-8.
- Van Tilborg, A.A., Hekman, A.C., Vissers, K.J., van der Kwast, T.H. and Zwarthoff, E.C.: Loss of heterozygosity on chromosome 9 and loss of chromosome 9 copy number are separate events in the pathogenesis of transitional cell carcinoma of the bladder. *Int J Cancer* 75 (1998) 9-14.
- Vollmer, R.T., Humphrey, P.A., Swanson, P.E., Wick, M.R. and Hudson, M.L.: Invasion of the bladder by transitional cell carcinoma: its relation to histologic grade and expression of p53, MIB-1, c-erb B-2, epidermal growth factor receptor, and bcl-2. *Cancer* 82 (1998) 715-23.
- Wang, B., Hollander, G.A., Nichogiannopoulou, A., Simpson, S.J., Orange, J.S., Gutierrez-Ramos, J.C., Burakoff, S.J., Biron, C.A. and Terhorst, C.: Natural killer cell development is blocked in the context of aberrant T lymphocyte ontogeny. *Int Immunol* 8 (1996a) 939-49.
- Wang, Z., Margulies, L., Hicklin, D.J. and Ferrone, S.: Molecular and functional phenotypes of melanoma cells with abnormalities in HLA class I antigen expression. *Tissue Antigens* 47 (1996b) 382-90.
- Wang, Z., Seliger, B., Mike, N., Momburg, F., Knuth, A. and Ferrone, S.: Molecular analysis of the HLA-A2 antigen loss by melanoma cells SK-MEL-29.1.22 and SK-MEL-29.1.29. *Cancer Res* 58 (1998) 2149-57.
- Watts, C.: Antigen processing in the endocytic compartment. *Curr Opin Immunol* 13 (2001) 26-31.
- Weller, M., Constam, D.B., Malipiero, U. and Fontana, A.: Transforming growth factor-beta 2 induces apoptosis of murine T cell clones without down-regulating bcl-2 mRNA expression. *Eur J Immunol* 24 (1994) 1293-300.
- Williams, S.V., Sibley, K.D., Davies, A.M., Nishiyama, H., Hornigold, N., Coulter, J., Kennedy, W.J., Skilleter, A., Habuchi, T. and Knowles, M.A.: Molecular genetic analysis of chromosome 9 candidate tumor-suppressor loci in bladder cancer cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* 34 (2002) 86-96.
- Wolfel, T., Hauer, M., Schneider, J., Serrano, M., Wolfel, C., Klehmann-Hieb, E., De Plaen, E., Hankeln, T., Meyer zum Buschenfelde, K.H. and Beach, D.: A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 269 (1995) 1281-4.
- Wood, D.P. Jr, Fair, W.R. and Chaganti, R.S.: Evaluation of epidermal growth factor receptor DNA amplification and mRNA expression in bladder cancer. *J Urol* 147 (1992) 274-7.
- Wood, D.P. Jr, Wartinger, D.D., Reuter, V., Cordon-Cardo, C., Fair, W.R. and Chaganti, R.S.: DNA, RNA and immunohistochemical characterization of the HER-2/neu oncogene in transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 146 (1991) 1398-401.
- Younes, M., Sussman, J. and True, L.D.: The usefulness of the level of the muscularis mucosae in the staging of invasive transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Cancer* 66 (1990) 543-8.
- Zaks, T.Z., Chappell, D.B., Rosenberg, S.A. and Restifo, N.P.: Fas-mediated suicide of tumor-reactive T cells following activation by specific tumor: selective rescue by caspase inhibition. *J Immunol* 162 (1999) 3273-9.
- Zeidler, R., Eissner, G., Meissner, P., Uebel, S., Tampe, R., Lazis, S. and Hammerschmidt, W.: Downregulation of TAP1 in B lymphocytes by cellular and Epstein-Barr virus-encoded interleukin-10. *Blood* 90 (1997) 2390-7.
- Zhan, Q., Fan, S., Bae, I., Guillouf, C., Liebermann, D.A., O'Connor, P.M. and Fornace, A.J. Jr: Induction of bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis. *Oncogene* 9 (1994) 3743-51.

Zincke, H., Utz, D.C. and Farrow, G.M.: Review of Mayo Clinic experience with carcinoma in situ.
Urology 26 (1985) 39-46.

OBJETIVOS

En el presente trabajo se pretende avanzar en el estudio de las alteraciones de moléculas de HLA de clase I en tumores de vejiga, tanto en la descripción de las alteraciones que sufren como en la comprensión de los mecanismos por los cuales en los tumores de vejiga se alteran la expresión de estas moléculas. La identificación de linfocitos T citotóxicos (CTLs) específicos en distintos tumores ha estimulado el desarrollo de protocolos inmunoterapéuticos con el propósito de generar y/o estimular respuestas citotóxicas antitumorales. En este sentido, las alteraciones de expresión de las moléculas de HLA de clase I podrían suponer un medio de escape de la respuesta inmunológica por parte del tumor frente al sistema inmune. Por tanto, conocer el patrón de expresión de antígenos HLA de clase I en un tumor podría resultar crucial para diseñar una inmunoterapia efectiva.

Objetivos generales

- 1) Estudio de frecuencia y tipos de alteraciones en la expresión de antígenos HLA de clase I en tumores de vejiga.
- 2) Estudio de los mecanismos genéticos implicados en las alteraciones de la expresión de antígenos de histocompatibilidad de clase I.

Objetivos específicos:

- 1) Estudio de pérdidas de heterocigosidad en 6p21, responsables de hemicigosidad en la región HLA, en tumores de vejiga.
- 2) Análisis de los genes responsables de la expresión de HLA de clase I en tumores de vejiga.
 - A) Estudio de expresión de genes de la maquinaria de procesamiento antigénico.
 - B) Estudio transcripcional de la cadena pesada de los genes de HLA de clase I y de $\beta 2m$.
 - C) Estudio mutacional en los genes de la $\beta 2m$ y HLA (aleloespecífico).
- 3) Implicaciones clínico-patológicas de las alteraciones HLA de clase I en tumores de vejiga.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. PACIENTES Y MATERIAL DE ESTUDIO

Las muestras se obtuvieron de un total de 96 pacientes del Área Sanitaria de referencia del Hospital Universitario “Virgen de las Nieves” de Granada, diagnosticados de carcinoma de vejiga por el servicio de Urología del mismo hospital. De todos los pacientes se obtuvo muestra tumoral mediante resección transuretral (RTU) y muestra de sangre periférica anticoagulada con EDTA. El grado y estadio tumoral se recogen en la tabla I.

Previamente al presente trabajo se realizó estudio inmunohistoquímico para la determinación de la expresión de antígenos HLA clase I en superficie (Cabrera et al., 2003). En este se rechazaron 24 casos bien por no hallarse tumor en la pieza remitida o por deterioro de los tejidos tumorales, deterioro que hacía inviable conocer la expresión en superficie de los antígenos HLA de clase I.

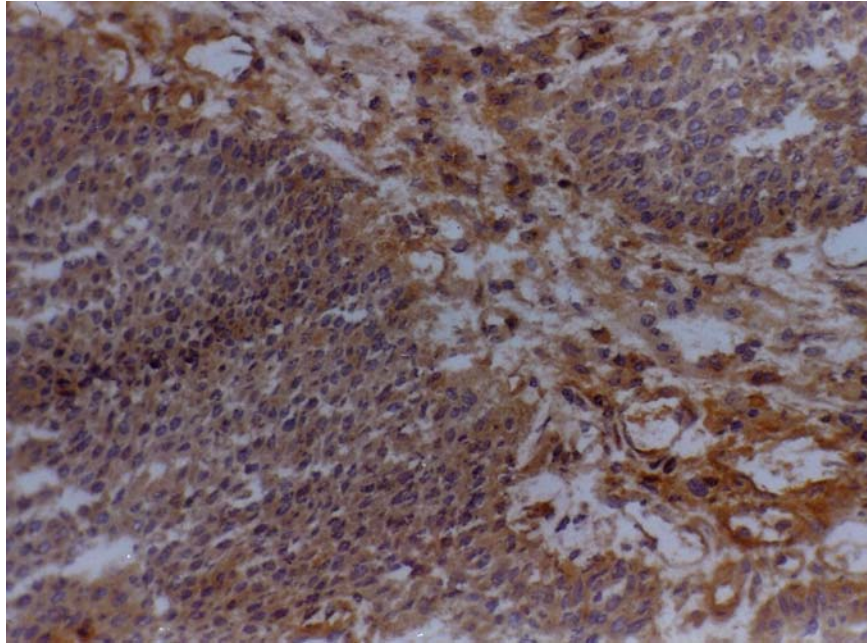
Los 70 tumores restantes mostraron distintos patrones de expresión de moléculas HLA de clase I en superficie, como se refleja en la tabla I y ejemplifica en la Figura 1. En la tabla I también se recogen las características anatomopatológicas y clínicas de los tumores.

| Código Tumor | T | N | M | G | Diametro mayor de 3cm | Infiltrado linfocitario | Resultado inmunohistología | Progresión | Recidiva |
|---------------------|----------|----------|----------|----------|------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|-------------------|-----------------|
| VE-003 | a | 0 | 0 | 2 | Sí | No | FENOTIPO II ó IV | NO | NO |
| VE-004 | 3 | X | X | 3 | Sí | Sí | FENOTIPO I | NO | NO |
| VE-005 | a | 0 | 0 | 2 | No | No | FENOTIPO II ó IV | NO | NO |
| VE-006 | 3 | 0 | 0 | 3 | Sí | Sí | FENOTIPO I | NO | NO |
| VE-008 | 2 | X | X | 2 | . | Sí | CLASE I POSITIVO | NO | NO |
| VE-009 | 2 | X | X | 2 | Sí | Sí | FENOTIPO I | NO | NO |
| VE-010 | a | 0 | 0 | 2 | No | No | FENOTIPO II ó IV | NO | SÍ |
| VE-011 | 1 | 0 | 0 | 2 | No | No | FENOTIPO III | NO | SÍ |
| VE-012 | 1 | 0 | 0 | 2 | No | No | FENOTIPO I | NO | SÍ |
| VE-013 | a | 0 | 0 | 2 | No | No | FENOTIPO I | NO | NO |
| VE-017 | 3 | 0 | 0 | 3 | Sí | Sí | CLASE I POSITIVO | NO | NO |
| VE-018 | 3 | 0 | 0 | 3 | Sí | Sí | FENOTIPO I | NO | NO |
| VE-021 | 2 | 0 | 0 | 1 | Sí | Sí | FENOTIPO IV | NO | NO |
| VE-022 | 2 | 0 | 0 | 2 | Sí | Sí | FENOTIPO I | NO | NO |
| VE-023 | 1 | 0 | 0 | 2 | No | No | FENOTIPO IV | NO | SÍ |
| VE-024 | 1 | 0 | 0 | 2 | Sí | No | FENOTIPO IV | SÍ | SÍ |
| VE-025 | 1 | 0 | 0 | 2 | Sí | No | FENOTIPO IV | NO | SÍ |
| VE-026 | 4 | X | X | 2 | . | Sí | CLASE I POSITIVO | SÍ | NO |
| VE-027 | 3 | 0 | 0 | 3 | . | Sí | CLASE I POSITIVO | SÍ | SÍ |
| VE-030 | a | 0 | 0 | 3 | Sí | No | CLASE I POSITIVO | SÍ | SÍ |
| VE-031 | 2 | X | X | 3 | . | Sí | FENOTIPO IV | SÍ | SÍ |
| VE-033 | a | 0 | 0 | 2 | No | No | FENOTIPO I | NO | SÍ |
| VE-034 | 3 | 1 | 0 | 2 | Sí | Sí | CLASE I POSITIVO | NO | NO |
| VE-035 | a | 0 | 0 | 2 | No | No | FENOTIPO IV | SÍ | SÍ |
| VE-036 | 1 | 0 | 0 | 2 | No | No | CLASE I POSITIVO | SÍ | SÍ |
| VE-037 | 1 | 0 | 0 | 2 | . | No | FENOTIPO I | NO | NO |
| VE-038 | 2 | 0 | 0 | 3 | Sí | Sí | FENOTIPO IV | NO | NO |
| VE-039 | a | 0 | 0 | 2 | Sí | No | FENOTIPO II ó IV | NO | SÍ |
| VE-041 | 3 | 1 | 1 | 3 | Sí | Sí | FENOTIPO I | NO | NO |
| VE-043 | 2 | 0 | 0 | 3 | Sí | Sí | FENOTIPO III | SÍ | SÍ |
| VE-044 | 1 | 0 | 0 | 2 | Sí | No | CLASE I POSITIVO | NO | SÍ |
| VE-046 | 3 | 1 | 0 | 2 | Sí | Sí | CLASE I POSITIVO | NO | NO |
| VE-047 | 2 | 3 | 0 | 3 | Sí | Sí | CLASE I POSITIVO | NO | NO |
| VE-050 | 2 | 0 | 0 | 3 | Sí | Sí | CLASE I POSITIVO | SÍ | NO |
| VE-051 | 3 | 0 | 1 | 3 | Sí | Sí | CLASE I POSITIVO | NO | NO |
| VE-052 | 1 | 0 | 0 | 2 | No | No | FENOTIPO I | NO | NO |
| VE-054 | 1 | 0 | 0 | 2 | Sí | No | CLASE I POSITIVO | NO | NO |
| VE-055 | a | 0 | 0 | 1 | Sí | No | FENOTIPO I | NO | SÍ |
| VE-056 | 1 | 0 | 0 | 2 | Sí | No | FENOTIPO I | NO | SÍ |
| VE-058 | a | 0 | 0 | 2 | Sí | No | FENOTIPO II ó IV | SÍ | SÍ |

| Código Tumor | T | N | M | G | Diametro mayor de 3cm | Infiltrado linfocitario | Resultado inmunohistología | Progresión Recidiva | |
|--------------|---|---|---|---|-----------------------|-------------------------|----------------------------|---------------------|----|
| VE-060 | 2 | 0 | 0 | 3 | Sí | Sí | FENOTIPO III | NO | NO |
| VE-061 | 1 | 0 | 0 | 3 | . | No | FENOTIPO III | NO | SÍ |
| VE-062 | a | 0 | 0 | 2 | Sí | No | FENOTIPO II ó IV | NO | NO |
| VE-063 | 2 | X | X | | Sí | Sí | FENOTIPO II ó IV | NO | NO |
| VE-067 | 3 | 3 | 0 | 3 | Sí | Sí | FENOTIPO III | SÍ | NO |
| VE-068 | 3 | 1 | X | 3 | Sí | Sí | FENOTIPO II ó IV | NO | NO |
| VE-069 | 2 | 1 | 0 | 2 | Sí | Sí | FENOTIPO I | NO | NO |
| VE-071 | a | 0 | 0 | 2 | . | No | CLASE I POSITIVO | NO | NO |
| VE-072 | X | X | X | X | . | No | CLASE I POSITIVO | NO | NO |
| VE-075 | a | 0 | 0 | 2 | Sí | No | FENOTIPO II ó IV | NO | SÍ |
| VE-076 | 2 | | | 2 | . | Sí | FENOTIPO II ó IV | SÍ | SÍ |
| VE-078 | 1 | 0 | 0 | 2 | No | No | FENOTIPO I | NO | NO |
| VE-079 | a | 0 | 0 | 2 | Sí | No | FENOTIPO II ó IV | SÍ | SÍ |
| VE-080 | a | 0 | 0 | 2 | Sí | No | FENOTIPO I | NO | NO |
| VE-081 | 2 | 0 | 0 | 2 | Sí | Sí | CLASE I POSITIVO | NO | NO |
| VE-082 | a | 0 | 0 | 2 | No | No | FENOTIPO II ó IV | NO | NO |
| VE-083 | 2 | 0 | 0 | 2 | . | Sí | FENOTIPO II ó IV | NO | NO |
| VE-084 | 2 | 0 | 0 | 3 | Sí | Sí | FENOTIPO III | NO | NO |
| VE-085 | 2 | 0 | 0 | 3 | Sí | Sí | FENOTIPO III | NO | NO |
| VE-086 | a | 0 | 0 | 2 | No | No | FENOTIPO II ó IV | SÍ | SÍ |
| VE-087 | 2 | 1 | 1 | 3 | Sí | Sí | CLASE I POSITIVO | NO | NO |
| VE-088 | 2 | X | X | 3 | Sí | Sí | FENOTIPO I | NO | NO |
| VE-089 | 2 | 0 | 0 | 2 | Sí | Sí | FENOTIPO III | SÍ | NO |
| VE-090 | X | X | X | X | . | No | FENOTIPO III | SÍ | SÍ |
| VE-091 | a | 0 | 0 | 2 | No | No | FENOTIPO II ó IV | NO | NO |
| VE-092 | a | 0 | 0 | 2 | No | No | FENOTIPO II ó IV | NO | SÍ |
| VE-093 | a | 1 | 0 | 2 | No | Sí | CLASE I POSITIVO | NO | NO |
| VE-094 | 3 | 0 | 0 | 3 | Sí | Sí | FENOTIPO II ó IV | SÍ | SÍ |
| VE-095 | a | 0 | 0 | 2 | No | No | FENOTIPO II ó IV | NO | SÍ |
| VE-096 | 2 | 0 | 0 | 2 | Sí | Sí | CLASE I POSITIVO | SÍ | SÍ |

Tabla 1. Características de los tumores recogidos. Fenotipo I: pérdida total de expresión de moléculas HLA-ABC. Fenotipo II: pérdida de un haplotipo. Fenotipo III: pérdida de un locus. Fenotipo IV: pérdida de un alelo. Fenotipo V: fenotipo compuesto.

A



B

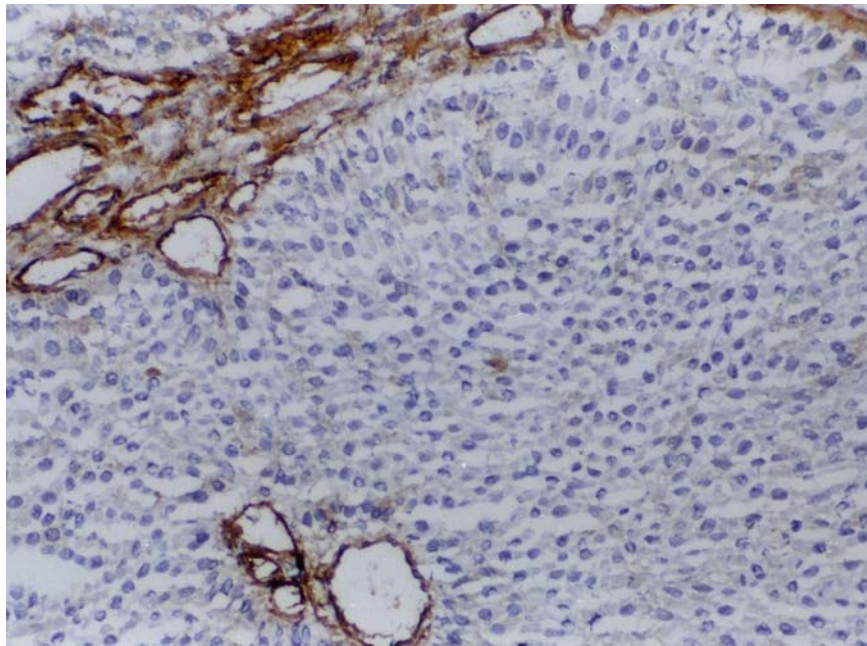


Figura 1. Técnica inmunohistoquímica de un tumor HLA clase I positivo (A) y un tumor negativo, donde podemos comprobar la positividad del estroma (B).

2. METODOLOGÍA DE ESTUDIO DE ALTERACIONES DE MOLÉCULAS HLA CLASE I EN TEJIDOS TUMORALES MICRODISECTADOS DE VEJIGA.

2.1. TÉCNICA DE MICRODISECCIÓN

La extracción de ADN y ARN de la pieza tumoral total no nos permite obtener ácidos nucleicos de origen exclusivo tumoral, pues el tejido normal y el infiltrado leucocitario incluidos en la pieza van a estar también presentes. Esta contaminación de material nos impedirá llegar a resultados fidedignos tanto en estudios de secuenciación como en estudios de pérdida de heterocigosidad y de grado de transcripción génica. Así, la presencia de ARN no tumoral puede enmascarar la baja transcripción de un gen en células tumorales y la presencia de ADN no tumoral puede enmascarar la pérdida de heterocigosidad en un microsatélite.

El empleo de la microdisección de nidos tumorales (Figura 2) va a reducir en gran medida la presencia de material de células no tumorales, por lo que esta técnica fue la elegida para el presente estudio.

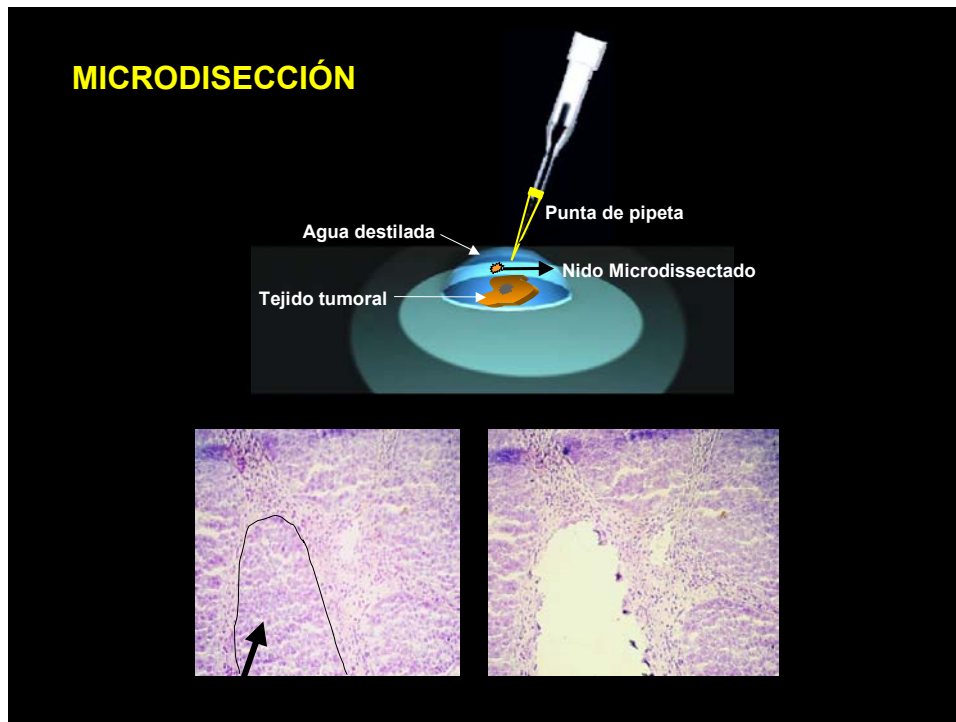


Figura 2. Microdissección manual y recogida de un nido tumoral.

2.1.1. TÉCNICA DE MICRODISECCIÓN PARA ADN.

- Cubrir los cortes criostáticos de tejido tumoral con solución de azul de toluidina al 0.05% durante aproximadamente 2 minutos. Esta tinción permite distinguir las estructuras del corte criostático y poder seleccionar las células tumorales para separarlas del resto.
- Tras la tinción lavar y cubrir el corte con 50-100 μ l de agua bidestilada. Realizar la microdissección en el aparato manual LEICA MS 5 de Heerbrugg. Utilizar agujas de tungsteno (0.5 mm de diámetro, Fine Science Tools)
- Las células tumorales se recuperan por aspirado mediante pipetas automáticas de punta desechable. Para evitar que el tejido tumoral quede adherido a la cara interna y borde de la punta de la pipeta, estas puntas se tratan previamente con una solución de silicona (Sigmacote, Sigma). El líquido aspirado se recoge en un tubo de microcentrífuga; esta operación se

realiza tantas veces como sea necesario hasta obtener una cantidad suficiente de partida para la extracción del DNA (unas 1000-2000 células aproximadamente).

- Tras realizar la microdissección, puede congelarse el material a -40°C o continuar el proceso de extracción de ADN
- Reducción del volumen de agua obtenido. Al aspirar cada porción de microdisectado se pueden tomar unos 5 μl de líquido, por lo que al repetir esta operación podemos llegar a tener un volumen tal que diluya los reactivos de la extracción de DNA. Para reducir este volumen se lleva el tubo a centrifuga de vacío, manteniéndose el tiempo necesario para que el volumen de la muestra no interfiera en la extracción. Como el DNA es resistente, puede aplicarse vacío intenso (DNA Speed Vac 120, Savant) y calor para conseguir un volumen final de unos 10 μl .

2.1.2. TÉCNICA DE MICRODISECCIÓN PARA ARN

Básicamente la metodología empleada es la misma, aunque con variaciones encaminadas a preservar el ARN de ser degradado. Las modificaciones empleadas fueron las siguientes.

- Empleo de agua DEPC en la solución de azul de toluidina y en el lavado de la tinción.
- Cubrir el corte con agua DEPC a la que se le han adicionado inhibidores de ARNasas (SUPERase In RNase Inhibitor, Ambión) a una concentración final de 1 U/ μl .
- El microdisectado se recoge del agua DEPC directamente en la solución de lisis del kit de extracción de ARN para evitar la degradación del ARN (contiene tiocianato de guanidina, el más potente inhibidor de ARNasas conocido). Se mantiene sobre hielo durante todo el tiempo que dura la microdissección. Una importante ventaja de recoger en la solución de lisis es que la punta no tiene que estar tratada para evitar la adherencia de los fragmentos microdisectados, ya que el tampón de lisis los disgrega por simple pipeteo; además, no es necesario coger un volumen mínimo de agua

para expulsar el microdisectado de la pipeta, con lo que la dilución del tampón de lisis es insignificante.

2.2. EXTRACCIÓN DE ADN.

2.2.1. EXTRACCIÓN DE SANGRE PERIFÉRICA

La extracción de ADN de sangre periférica se realizó con el kit "DNA isolation Kit" (Puregene), usando el protocolo para 5ml de sangre.

2.2.2. EXTRACCIÓN DE TEJIDOS MICRODISECTADOS

Los fragmentos microdisectados se recogieron en tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. El volumen final se redujo a unos 10 µl mediante centrifugado en vacío (DNA Speed Vac 120, Savant) y se extrajo mediante el kit QIAamp® DNA Mini kit (Quiagen) según los protocolos del proveedor, con la modificación de realizar la elución final por dos veces solamente con 50 µl de agua bidestilada, con objeto de conseguir una mayor concentración de ADN.

2.3. EXTRACCIÓN DE ARN.

La extracción del ARN se llevó a cabo con el kit Absolutely RNA Nanoprep Kit (Stratagene), siguiendo el protocolo para tejidos microdisectados y realizando el paso de digestión con ADNasas. Se usó la microcentrífuga Eppendorf Centrifuge 5415D.

2.4. RETROTRANSCRIPCIÓN

Se empleó el kit Reverse Transcription System (Promega). La muestra junto con el cloruro de magnesio y el tampón se calientan 3 minutos a 70° C e inmediatamente se pasa a hielo, para que el ARN quede desnaturalizado. Añadir el resto de reactivos, empleando "random primers" e incubar durante 1 hora a 42° C; finalmente se calienta 5

minutos a 95° C para inactivar la transcriptasa inversa, se alicuota y almacena a -40° C para su posterior uso.

2.5. ESTUDIO DE PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIDAD EN CROMOSOMAS 6 Y 15

REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN.

Se seleccionó un panel de 10 marcadores de microsatélites (STR) para definir pérdida de heterocigosidad (LOH) en HLA y β_2 -microglobulina en los 70 tumores vesicales.

Para estudiar el cromosoma 6 en 6p21.3, región HLA, se utilizaron 7 microsatélites, y uno para 6q. También se usaron dos microsatélites localizados en el cromosoma 15 próximos al gen de la β_2 -microglobulina. La localización y características de todos ellos se detallan en la tabla II

Cada uno de estos marcadores se escogió siguiendo dos criterios básicos, su localización, y el grado de heterocigosidad que presentan.

La amplificación de cada marcador se realizó mediante PCR, utilizando parejas de oligonucleótidos situados a los lados de la secuencia de repetición amplificada. Uno de los cebadores de la PCR tiene el marcador fluorescente 6-FAM (azul) o TET (verde) (PE Biosystems®) en 5' para posibilitar su detección durante la electroforesis.

Teniendo en cuenta los diferentes tamaños de los microsatélites y marcadores (6-FAM-azul o TET-verde) de cada microsatélite amplificado, se realizaron mezclas de cebadores que no diesen interferencias durante la amplificación. Cada cebador se ajustó a 5mM y de la mezcla se adicionó 1 μ l / muestra.

MIX.1: D6S105, D6S276,

MIX.2: D6S291, D6S265, D6S273,

MIX.3: D6S311 y D15S209,

MIX.4: D15S126 hemos obtenido resultados anómalos al mezclar éste marcador con otros. Y finalmente, MIX: 5: C: 1.2.C y C: 1.2.5.

| STR | Localización | Tamaño | Alelos | % Het | Marcaje | Secuencia |
|---------|--|---------|--------|-------|---------|---|
| D6S311 | 6q24 | 230-276 | 18 | 91 | FAM | CA:5'ATGTCCTCATTGGTGTGTG3' GT:5'GATTCAGAGCCCAGGAAGAT 3' |
| D6S291 | 6p21.3 región de Clase II | 198-210 | 7 | 70 | FAM | CA:5'CTCAGAGGATGCCATGTCTAAAATA3' GT:5'GGGGATGACGAATTATTCACCTAACT3' |
| D6S273 | 6p21.3 región de Clase III | 120-140 | 8 | 76 | TET | CA:5'GCAACTTTTCTGTCAATCCA3' GT:5'ACCAAACCTCAAATTTTCGG3' |
| C.1.2.C | Region A tel MICB(62kB) | 260-234 | 14 | 84 | FAM | AC5'GGATCCTAGGAACTCCCTCCTG3' GT5'GAGCAGAAGGGAGATGAAATG G3' |
| C.1.2.5 | Region A tel HLA-B(62Kb) | 178-220 | 20 | 89 | FAM | CA:5'CAGTAGTAAGCCAGAAGCTATTAC3' TG:5'AAGTCAAGCATATCTGCCATTTGG3' |
| D6S265 | Centr: HLA-A | 118-140 | 12 | 78 | FAM | CA:5'ACGTTTCGTACCCATTAACCT3' GT:5'ATCGAGGTAACAGCAGAAA3' |
| D6S105 | Tel. HLA-A | 116-138 | 12 | 82 | FAM | CA:5'GCCCTATAAAAATCCTAATTAAC GT:5'GAAGGAGAATTGTAATTCCG3' |
| D6S276 | Tel HLA-A | 198-230 | 14 | 83 | TET | CA:5'TCAATCAAATCATCCCCAGAAG3' GT:5'GGGTGCAACTTGTTCTCCT3' |
| D15S126 | 15q21(junto al gen de la β 2 m) | 188-218 | 11 | 82 | FAM | CA:5'GTGAGCCAAGATGGCACTAC3' GT:5'GCCAGCAATAATGGGAAGTT3' |
| D15S209 | 15pter-15qter Tel. al gen de la β 2m | 198-208 | 10 | 78 | FAM | CA:5'AAACATAGTGCTCTGGAGGC3' GT:5'GGGCTAACAACAGTGTCTGC3' |

Tabla II. Marcadores de cromosoma 6 y 15 empleados.

El DNA de tejido tumoral microdisectado y su correspondiente contrapartida no tumoral (ADN de leucocitos de sangre periférica, diluido a una concentración final de 15 ng/ μ l) se amplificó con estas mezclas, necesitando así 5 PCRs para estudiar 10 microsátélites.

Método

La PCR se hizo de acuerdo con el Gene Scan® Reference Guide (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), los reactivos empleados fueron los siguientes:

- 5µl del extraído de ADN (aproximadamente 50 ng)
- 1.00 µl de la mezcla de cebadores (5 µM cada uno)
- 0.12 µl de Taq Gold DNA polimerasa de concentración 5 U/µl (Boehringer Mannheim)
- 1.50 µl de 10x PCR buffer con Cl₂Mg (Boehringer Mannheim)
- 1.50 µl de mezcla de dNTPs (2,50 µM cada dNTP)
- agua bidestilada para un volumen final de 15 µl.

El programa del termociclador (PCT-100 cycler (MJ Research)) fue el siguiente:
(Tomado del Gene Scan Reference Guide)

- 95° C durante 12 minutos
- 10 ciclos : 94 ° C durante 30 s, 55 ° C durante 30 s, 72° C durante 30 s;
- 20 ciclos : 89° C durante 30 s, 55° C durante 30 s, 72° C durante 30 s
- Extensión final a 60° C durante 45 minutos.

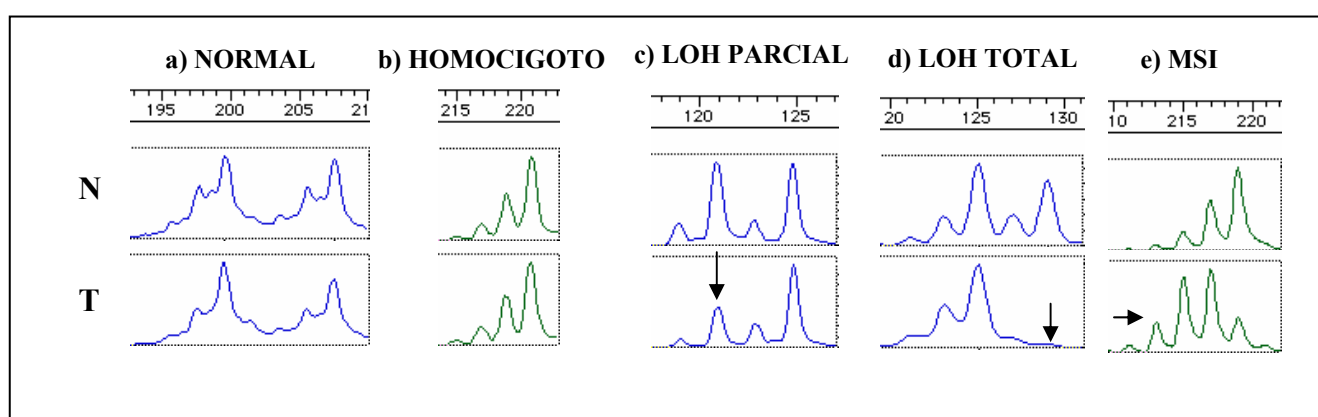


Figura 3. Patrones obtenidos en el estudio de microsatélites. T=DNA tumoral; N=DNA normal

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.

Preparación del gel

Se disuelven 18 g de urea (Sigma) en 26 ml de agua bidestilada, 5 ml de Poliacrilamida Long-Ranger® y 5 ml de TBE 10x. Añadimos 35 µl de TEMED (Tetrametilendiamino) y 250 µl de APS al 10%(Persulfato amónico) (BIO RAD).

Esta mezcla se inyecta procurando una difusión homogénea entre los cristales del secuenciador y se deja polimerizar durante 2 h.

Método

1 µl del producto de la PCR se diluye en 3 µl de la mezcla de 2.25 µl / muestra de Formamida (Amresco), 0.5 µl / muestra de GS500 TAMRA y 0.5 µl / muestra de Loading buffer (PE Biosystems). Se desnaturaliza calentando a 95° durante 3 min. y se carga 1.5 µl en el gel de poliacrilamida. La electroforesis se realiza durante 2 horas en el gel de polyacrilamida, con el secuenciador ABI PRISM 377 DNA con 36 calles a 2400 scan/h y 3000 Kv. El tamaño de los fragmentos es determinado automáticamente utilizando el software Gene Scan (PE Biosystems).

ANÁLISIS.

El software Genotyper® interpreta los resultados del Gene Scan respecto al tamaño, altura o área de los fragmentos generados en la PCR y asigna el valor a los alelos que se encuentran dentro de unos parámetros previamente establecidos para un microsatélite en particular, además de proporcionar diferentes representaciones gráficas.

Los alelos se definen por el tamaño de los fragmentos, que se estiman por la capilaridad de los productos de la PCR en la electroforesis. En la figura 3 se muestran ejemplos de los patrones obtenidos.

Se ha decidido asignar como LOH cuando existe una reducción del 25% del tamaño de un alelo en el ADN obtenido del tumor comparado con los del control normal de la misma muestra.

LOH (x) se calcula:
$$\frac{\text{Altura del 2º alelo tumoral} / \text{Altura del 1º alelo tumoral}}{\text{Altura del 2º alelo normal} / \text{Altura del 1º alelo normal}}$$

El 1º alelo es el fragmento de menor peso molecular, el 2º alelo el de mayor. Se considera para el cálculo de LOH que la altura y el área de los alelos dan resultados comparables, utilizamos la altura como representación de la intensidad de la fluorescencia de cada alelo, porque el área es de más difícil cálculo por la presencia de picos adicionales (stutters). **Si uno de los dos alelos está completamente desaparecido, la LOH se considera total, en cambio, si el alelo permanece de forma residual, consideramos la LOH como parcial.**

Cuando la LOH se produce en el alelo más corto, la reducción de la señal debe ser calculada como la inversa de x, le llamamos y =1/x

Se considera que existe una pérdida de haplotipo cuando existe LOH de 3 o más marcadores de los estudiados para cromosoma 6. Para la β-2microglobulina, se considera cuando aparece en cualquiera de los marcadores.

2.6. TIPAJE GENÓMICO

En aquellos casos en los que en el estudio con microsatélites encontramos LOH, se procedió a realizar tipaje de baja resolución para moléculas HLA de clase I (A;B;C) y clase II (DR y DQ) para determinar el haplotipo perdido. Estudiamos el ADN tumoral y normal utilizando la técnica PCR-based reverse line blot mediante el análisis de secuencias específicas de oligonucleótidos (SSO).

Para identificar en un individuo las distintas moléculas HLA, se estudian las zonas que determinan los distintos aloantígenos, y que generalmente van a codificar la región aminoterminal, o la zona de unión de la proteína al antígeno.

Utilizamos 7,5 µl de DNA, 22,5 µl de la mezcla de reacción de los distintos kits, para cada uno de los locus o regiones del HLA (Dynal RELI® SSO HLA-A, B, C, DR y DQ typing Kit) que van a ser amplificados por PCR.

El amplificado, se desnaturaliza para separar la doble cadena de DNA, y se añade a una bandeja donde se han colocado, inmersas en una solución astringente las tiras reactivas (Dynal RELI® SSO Typing Trays) que contienen fijados por una membrana de nylon las distintas secuencias específicas de oligonucleótidos, al añadir el producto de la PCR, van a capturar las secuencias complementarias.

Los cebadores están marcados con biotina. Se añade estreptavidina marcada con peroxidasa, que se fijará a la biotina. Finalmente se añade TMB (tetrametilbencidina) y peróxido de hidrógeno para colorear el complejo. En los distintos pasos seguidos en el proceso de detección seguimos el protocolo y los reactivos incluidos en el kit de detección (Dynal RELI® SSO Strip Detection Reagent Kit)

En la tira reactiva se observa un patrón de bandas que se interpreta con la ayuda de soporte informático (Dynal RELI® SSO Pattern Matching Program 5.1).

2.7. INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES (MIN)

REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN.

Se prepara una mezcla de reacción independiente para cada pareja de cebadores (ver tabla III), a un volumen final de 50 µl, conteniendo 300 ng de DNA, 30 pmol de cada oligonucleótido (síntesis comercial de PE Applied Biosystem), 5 µl de una mezcla de los cuatro dNTPs (Roche) 10mM, 5 µl de buffer con Mg (Roche) y una unidad de Taq Polimerasa (Taq DNA Polimerase, Roche).

TABLA III. CEBADORES USADOS EN EL ESTUDIO DE MIN.

| | Secuencia | T ^a | Marcaje |
|-------------|-------------------------------|----------------|---------|
| BAT 26 FW1 | TGA CTA CTT TTG ACT TCA GCC | 50°C | TET |
| BAT 26 BW | AAC CAT TCA ACA TTT TTA ACC C | 50°C | |
| TGFBRII FW4 | AAG CTC CCC TAC CAT GAC T | 50°C | FAM |
| TGFBRII BW | TGC ACT CAT CAG AGC TAC AG | 50°C | |

Las muestras se someten al siguiente protocolo de amplificación en un ciclador GeneAmp 9600 de Perkin-Elmer:

BAT 26 y TGFβRII

| | | | | | | |
|------|-----------|------|------|-------|-----------|--|
| | 35 CICLOS | | | | | |
| 95°C | 94°C | 50°C | 72°C | 72°C | 4°C | |
| 5min | 1min | 1min | 1min | 10min | Mantenido | |

ELECTROFORESIS CAPILAR

La incorporación de cebadores y estándares marcados fluorescentemente permite la detección con láser de los productos de la PCR. Las moléculas absorberán la energía luminosa emitida por un láser y la reemitirán a distintas longitudes de onda específicas de cada fluorocromo. Las diferentes longitudes de onda son interpretadas por el software del ordenador y se muestran como distintos colores a tiempo real. De este modo es posible analizar hasta veinte microsátélites en una misma línea. Los tamaños de los alelos son asignados por el programa informático en referencia a un estándar interno marcado en un color único y distinto del resto. Debe sólo asegurarse que los diferentes fragmentos no se solapen en tamaño y color de marcaje.

Preparar la mezcla de análisis:

- N° de muestras × 24µl de formamida desionizada (Amresco).
- N° de muestras × 1µl de estandar GeneScan-500[ROX] (Applied Biosystems)
- En un tubo del secuenciador añadir 25µl de la mezcla de análisis y 1.5µl del producto de PCR.
- Tapar los tubos y proceder a su desnaturalización calentándolos durante tres minutos a 95°C e introducirlos posteriormente en hielo durante al menos tres minutos.
- Analizar las muestras en el secuenciador ABI PRISM 310, utilizando la resina POP-4.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los datos obtenidos por el instrumento ABI PRISM se analizarán mediante el programa informático Gene Scan que asignará un tamaño y cuantificará los fragmentos detectados creando una serie de archivos que serán reanalizados mediante el programa Genotyper.

Los patrones de inestabilidad dependen del tipo de microsatélite:

- BAT 26: aparición de alelos con un tamaño menor al tamaño de los alelos del tejido normal.
- TGF β RII: pérdida de una o varias bases.

2.8. ANÁLISIS DE MUTACIONES

2.8.1. EN LA SECUENCIA DE β 2-MICROGLOBULINA EN TUMORES CON PÉRDIDA TOTAL DE EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS HLA DE CLASE I.

La región que codifica para β 2-microglobulina se amplificó con 4 μ l de ADNc a volumen final de 50 μ l 30 pmol de cada oligonucleótido (síntesis comercial de PE Applied Biosystem), 5 μ l de una mezcla de los cuatro dNTPs (Roche) 10mM, 5 μ l de buffer con Mg (Roche) y una unidad de Taq Polimerasa (Taq DNA Polimerase, Roche).

Los cebadores empleados fueron

β 2-m-S: 5'-GGGCATTCCTGAAGCTGACA-3'

β 2-m-AS: 5'-AGAGCTACCTGTGGAGCAAC-3'.

Estos cebadores se sitúan en zona que no codifica y amplifican un tamaño de 614 p.b. El programa de temperaturas empleado fue el siguiente.

| | 40 CICLOS | | | | | |
|-------|-----------|-------|-------|-------|-----------|--|
| 95° C | 94° C | 60° C | 72° C | 72° C | 4° C | |
| 5 min | 60 s | 30 s | 90 s | 10min | Mantenido | |

El producto obtenido se purificó por paso en columnas (centri-sep columns, Princeton Separations, Inc.), siguiendo los protocolos del proveedor.

La reacción de secuenciación se realizó con el kit ABI Prism® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems), siguiendo los protocolos recomendados por el proveedor; el análisis se realizó en secuenciador ABI-PRISM 377 DNA Sequencer (PE Applied-Biosystems, Foster City, CA). Cada muestra analizada se secuenció con el cebador β 2-m-S (sentido) y β 2-m-AS (antisentido), para comprobar la concordancia de la secuencia amplificada con uno y otro cebador.

2.8.2. EN LA SECUENCIA DEL LOCUS HLA-B EN TUMORES CON PÉRDIDA DE EXPRESIÓN DE UN ALELO B.

En este estudio se secuenció el ADNc con cebadores locus específicos. Dado que el tamaño es demasiado grande para ser amplificado en un solo fragmento, se amplificaron tres fragmentos que abarcaban la totalidad de la secuencia. Los reactivos de PCR fueron los mismos del apartado anterior. El programa de temperaturas, y cebadores empleados fueron los siguientes.

| 40 CICLOS | | | | | |
|-----------|-------|----------------|-------|-------|-----------|
| 95° C | 94° C | Tª hibridación | 72° C | 72° C | 4° C |
| 5 min | 60 s | 30 s | 120 s | 10min | Mantenido |

| Fragmento | Cebadores | Tª hibridación |
|-----------------|--|----------------|
| F-1 (420 pb) | 5'-CGGACTCAGAGTCTCCTCAGACGCCGAG-3'-OH | 58 °C |
| | 5'-GCCGCGGTGTCCGCCGCGGTCCAGGAGCG-3'-OH | |
| F-2 (480 pb) | 5'-GACAGCGACGCCGCGAGTCC-3'-OH | 64° C |
| | 5'-AGCAGCGACCACAGCTCCGA-3'-OH | |
| F-3 (720 pb) | 5'-CTGTGGTGGTGCCTTCTTGGAGA-3'-OH | 68° C |
| | 5'-CTGGGGAGGAAACACAGGTCAGCATGGGAAC-3'-OH | |

La reacción de secuenciación se llevó a cabo utilizando los cebadores descritos por Curran y cols (Curran et al., 1996), utilizando los reactivos y condiciones señalados en el apartado anterior.

| CEBADORES USADOS EN SECUENCIACIÓN LOCUS B | |
|--|---|
| Fragmento | Cebador |
| F-1 | 5'-CGGACTCAGAGTCTCCTCAGACGCCGAG-3'-OH |
| | 5'-GCCGCGGTGTCCGCCGCGGTCCAGGAGCG-3'-OH |
| | 5'-CTACTACAACCAGAGCGAG-3'-OH |
| | 5'-GCTCTGGTTGTAGTAGCCGC-3'-OH |
| F-2 | 5'-CATCTCAGGGTGAGGGGCT-3' |
| | 5'-GCCGCGGTGTCCGCCGCGGTCCAGGAGCG-3'-OH |
| | 5'-GCTCTGGTTGTAGTAGCCGC-3'-OH |
| | 5'-CTGTGGTGGTGCCTTCTTGGAGA-3'-OH |
| F-3 | 5'-CTGTGGTGGTGCCTTCTTGGAGA-3'-OH |
| | 5'-CTGGGAGGAAACACAGGTCAGCATGGGAAC-3'-OH |

2.9.SOUTHERN BLOT

La metodología del Southern Blot fue empleada con el objetivo de evaluar la metilación génica ADN del tumor. El fundamento de la misma fue el empleo de enzimas con diferente sensibilidad a la metilación, para observar los distintos puntos de corte presentes en estos genes para ello se empleó como sondas fragmentos de los genes de cadena pesada HLA-A y HLA-B.

MARCAJE FLUORESCENTE DE LAS SONDAS.

Las sondas empleadas fueron: un fragmento de PvuII-XbaI de 1.2Kb de longitud derivado de la región 3' del gen HLA-A3 y un fragmento PvuII-PvuII de 0.55kb derivado de la región 3' del HLA-B7

La reacción de marcaje se realizó en un volumen de 50 µl.

Método

- Desnaturalización de la sonda. A 50 ng de sonda se le añade agua destilada hasta un volumen de 30 μ l y se calienta a 95 °C durante 5 minutos.
- Se le añade 5 μ l del tampón de reacción, 5 μ l de dNTPs marcados con fluoresceína, 5 μ l de cebadores y 1 μ l de la enzima Klenow. La reacción se mantuvo a 37°C durante 1 hora.
- La sonda fue cuantificada mediante la elaboración de un filtro de referencia con diluciones de los dNTPs marcados con fluoresceína (las diluciones son realizadas con T.E a partir de una dilución 1/5 de los cebadores, las mismas son de 1/10 hasta 1/500). Las diluciones son colocadas en un filtro de nitrocelulosa, dejándolo secar en la oscuridad. Entonces, 5 μ l de las sonda son colocados en otro filtro con la dilución 1/5 de los cebadores.
- Este se deja secar en la oscuridad. El filtro con la sonda es lavado durante 15 minutos con 2xSCC a 60 °C en un horno de hibridación.
- La sonda se compara con el filtro de referencia y la intensidad de la misma debe estar entre las diluciones 1/10 y 1/250.
- La sonda se congela a -20 hasta su uso.

DIGESTIÓN DEL ADN

- La digestión se llevó a cabo en un volumen de 100 μ l. Las muestras de ADN de tumores de vejiga y su contrapartida de sangre periférica (20 μ g) fueron digeridas con la enzima HindIII. La reacción contenía además del ADN, 12 unidades de enzima/ μ g de ADN y 10 μ l de tampón de digestión L x 10 (CL2Mg 100 mM). El ADN fue digerido durante 12 horas a 37°C.
- El ADN fue precipitado con etanol y acetato de sódico 3mM. Se realizó un lavado con Etanol al 70%. El ADN se dejó secar y fue resuspendido en 20 μ l de agua destilada. Para su disolución, se incubó durante una hora a 56°C.
- El ADN ya disuelto fue nuevamente incubado con HpaII durante 12 horas a 37°C.

TRANSFERENCIA DE LOS FRAGMENTOS DE ADN A FILTRO DE NYLON.

- Previo a la transferencia las muestras de ADN digeridas fueron separadas en sus diferentes fragmentos en gel de agarosa al 0.8%. Antes de la transferencia el gel se lavó durante 30 minutos en agitación con solución desnaturalizante (NaOH y NaCl 0.6 M). Se le da un lavado con agua destilada y se vuelve a lavar con solución neutralizante (Tris HCl y NaCl 0.6M).
- La transferencia se realizó por capilaridad sobre una membrana de nylon de dimensiones idénticas al gel. El gel se puso sobre un papel de filtro 3MM humedecido en solución de transferencia 20xSCC (NaCl 3M, Citrato Sódico 0.3M pH 7.0) y sobre un soporte que comunicaba dos recipientes que contenían dicha solución.
- Sobre el gel se puso la membrana de nitrocelulosa (Hybond) humedecida en solución 2xSCC y justo encima tres trozos de papel 3MM de igual tamaño e igualmente humedecidos. Sobre el conjunto se colocó un bloque de papel de filtro (aprox. 10 cm), siempre con las mismas dimensiones del gel, y sobre este un peso uniforme de 500 grs aproximadamente.
- La transferencia se dejó durante aproximadamente 20 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo el DNA del filtro es fijado al mismo mediante luz UV (1 minuto) Una vez hecho esto el filtro esta listo para la hibridación.

HIBRIDACIÓN DEL FILTRO CON LA Sonda MARCADA.

- El filtro se incubaba durante una hora a 60°C en un horno de hibridación con 180 ml de solución A (100mM Tris HCl, 300 mM NaCl pH 9.5) a la cual se le añaden 20 ml del líquido de bloqueo.

- La solución de bloqueo se descarta y el filtro es incubado una hora con 50 ml de la solución A y se le añaden 0,250 g de albúmina bovina y 10 µl de anticuerpo anti-fluoresceína conjugado con fosfatasa alcalina (5000x).

LAVADOS Y REVELADOS.

- La sonda se retira del filtro y este es lavado (con solución 0.5 x SSC, 0,1% SDS) en condiciones astringentes (65°C durante 15 minutos). El lavado se vuelve a repetir con la solución segunda.
- Al volumen restante de la solución A se le agregan 2,4 ml de Tween 20. Con esta solución se realizan tres lavados de 10 minutos cada uno a temperatura ambiente.
- El filtro se pone en contacto con la solución CDP, durante 5 minutos, con agitación rápida y en oscuridad.
- El filtro se seca con papel 3MM y se coloca en una bolsa plastica y se fija al chasis, revelándose la interacción de la sonda mediante autoradiografía (Gene Image CDP-Star).

2.10. ESTUDIO DE DIFERENCIAS TRANSCRIPCIONALES ENTRE TUMORES HLA CLASE I POSITIVOS Y NEGATIVOS

Se determinaron los niveles transcripcionales de β 2-microglobulina, cadena pesada de HLA clase I, LMP-2, LMP-7, TAP-1, TAP-2, tapasina, β -actina y G6PDH (glucosa 6-fosfato deshidrogenasa) de muestras de tumores con expresión normal o sin expresión de moléculas HLA de clase I y se realizó estudio comparativo entre los dos grupos.

SELECCIÓN DE MUESTRAS

Se seleccionaron 11 casos que mostraban pérdida total de expresión de moléculas HLA clase I en superficie del total de 18 casos iniciales y 10 casos que mostraban una expresión normal en su superficie. Como criterio de exclusión se consideró que el tumor mostrase un patrón heterogéneo de expresión de HLA clase I o un alto grado de infiltrado. De estos casos se obtuvo ADN complementario (ADNc) mediante microdissección.

PCR CUANTITATIVA

Fundamento

La técnica de PCR a tiempo real permite detectar diferencias entre muestras en el número de copias iniciales de la secuencia amplificada, basándose en el ciclo en el cual se empieza a detectar la presencia del amplificado (ver figura 3). Mediante esta metodología podemos comparar la cantidad de ARN mensajero de un determinado gen y establecer estudios comparativos entre el grado de transcripción de ese gen entre distintas células. Se emplearon dos métodos de detección, mediante sondas y mediante el marcador de ADN de doble cadena SYBR Green I.

- Detección por sondas. Se emplean como sondas dos oligonucleótidos bloqueados en 3' para evitar que sirvan de cebadores de la PCR, estos van a ser

complementarios a dos secuencias contiguas del amplificado. La sonda que se une más hacia 5' de la secuencia amplificada va marcada con fluoresceína en 3', mientras que la otra sonda va marcada en 5' con un emisor fluorescente que sólo emitirá cuando sea excitado por la fluoresceína de la primera sonda; para que la fluoresceína excite al marcador fluorescente, las dos moléculas han de estar muy próximas y esto solamente ocurrirá cuando las dos sondas se unan a la secuencia específica.

- Detección por SYBR Green I. En este caso el sistema de detección del amplificado es más inespecífico, pues se trata de un fluorocromo que emite fluorescencia cuando se intercala al ADN de doble cadena, por lo que un amplificado distinto al deseado dará también señal de amplificación. Para solucionar este problema, tras la amplificación se realiza un programa de temperatura que consiste en renaturalizar el amplificado y después calentar de forma progresiva a la vez que medimos emisión fluorescente en cada muestra. El amplificado específico tiene una temperatura característica de fusión dependiente de su contenido en C+G y de su longitud; a esta temperatura las dos hebras de ADN se separan y la emisión fluorescente disminuye con gran rapidez. La caída de la fluorescencia en cada muestra a la temperatura correspondiente al amplificado que estemos estudiando nos confirmará la especificidad de la amplificación.

Método

La cuantificación de G6PDH y β 2-microglobulina se realizó con sondas comerciales ("G6PDH Housekeeping gene set kit" y " β 2-microglobulin Housekeeping gene set kit, Roche) que tienen una mezcla de sondas y cebadores de la PCR, y kit de PCR adecuado (LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes, Roche). La β -actina se cuantificó mediante SYBR green I (LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I, Roche) con kit comercial (beta-Actin Housekeeping Gene, Search LC). En los tres casos se siguieron los protocolos del proveedor.

En la cuantificación de la cadena pesada se empleó kit para sondas (LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes, Roche) y las sondas siguientes (2 μ M):

CCATCCCgCTgCCAggTCA-Fluoresceína

LCRed640-TgTgATCTCCgCAgggTAgAAgC

El resto de moléculas se amplificaron con kit comercial LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I, Roche. Los cebadores, tamaño del amplificado y temperaturas de hibridación se listan en la tabla 4. El volumen final en todos los casos fue de 20 μ l, con una concentración 4mM de Cl_2Mg , 0,5 μ M de cada cebador (ver tabla 4) y 2 μ l de muestra de ADN complementario. El resto de reactivos se utilizaron siguiendo el protocolo del proveedor.

| Gen | Secuencias de los cebadores | Tamaño Amplificado | Temperatura de hibridación |
|-------------|--|--------------------|----------------------------|
| Cad.Pesada | 5'-GAGAACGGGAAGGAGACGC-3' | 309 pb | 60 °C |
| HLA clase I | 5'-CATCTCAGGGTGAGGGGCT-3' | | |
| TAP-1 | 5'-CGCCTCACTGACTGGATTCTAC-3' 5'-TCCGTCTCCTGGCGCAGGAC-3' | 194 pb | 64 °C |
| TAP-2 | 5'-GTCGTGTCATTGACATCCTG-3' 5'-TCAGCTCCCCTGTCTTAGTC-3' | 228 pb | 58 °C |
| LMP-2 | 5'-TTGTGATGGGTTCTGATTCCCG-3' 5'-CAGAGCAATAGCGTCTGTGG-3' | 449 pb | 60 °C |
| LMP-7 | 5'-TCGCCTTCAAGTTCCAGCATGG-3' 5'-CCAACCATCTTCCTTCATGTGG-3' | 541 pb | 62 °C |
| Tapasina | 5'-CAAAGTGTCCTGATGCCAGC-3' 5'-GGTGAATTCGACAGGCATAGCG-3' | 281 pb | 64 °C |

Tabla 4. Cebadores y temperaturas empleados.

Las condiciones del programa de amplificación fueron las siguientes:

- Inicialmente 10 minutos a 95° C (activación de la enzima ADN polimerasa)
- Seguidamente 45 ciclos de: 95°C, 6 s; temperatura de hibridación, 8 s; 72°C, 1s por cada 25 pares de bases de tamaño del amplicón. La lectura de fluorescencia se realizó una vez cada ciclo, al final de la temperatura de hibridación en el caso de la cadena pesada de HLA (detección por sondas) y al final de la temperatura de elongación

para el resto de moléculas. En el caso de LMP-2 y 7 se incluyó una etapa de 3 s a 83°C, al final de la cual se realizó la lectura de fluorescencia

- En las reacciones que se usó SYBR Green I: 95° C 3 s; 45° C 10 s; incremento gradual de temperatura a 0,1° C/s desde 45° C hasta 95° C, con lectura continua de la emisión de fluorescencia, este paso nos sirve para poder realizar el análisis de las curvas de fusión.

- Enfriado (mantener a 35° C durante 30 s).

En cada tanda de reacciones se incluyeron 3 estándares de concentración conocida para el cálculo de la recta de regresión, recta que nos relacionará el ciclo de detección del amplificado con la concentración de la molécula en la muestra.

Para tener una mayor seguridad de la especificidad del amplificado, se realizó en todas las amplificaciones el posterior chequeo en gel de agarosa al 2% en tampón TAE y una concentración de bromuro de etidio de 0,5 µg/ml.

Análisis de resultados

- Corrección de variaciones en el cDNA obtenido de los distintos casos. El gen de la GPDH no está implicado en el procesamiento y presentación de péptidos antigénicos; se ha comprobado que su expresión es constante y puede ser empleado como factor corrector (Barthe et al., 2001; Kletzien et al., 1994) de diferencias debidas a la cantidad de ARN obtenido en cada muestra. Por tanto, una vez obtenido el ADNc, se alicuotó y se determinó el número de copias por microlitro de G6PDH, esta cifra se empleó para corregir los resultados obtenidos en el resto de moléculas mediante el cálculo de la razón :

(copias por µl de la molécula estudiada) / (copias por µl de G6PDH)

CURVAS DE CALIBRACIÓN

La elaboración de las curvas de calibración se llevó a cabo mediante amplificación de ADNc de la línea tumoral Jurkatt, esta línea tiene una expresión normal de moléculas HLA de clase I en su superficie. Se amplificaron cada una de las ocho moléculas incluidas en el estudio siguiendo los programas de amplificación antes mencionados.

PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL

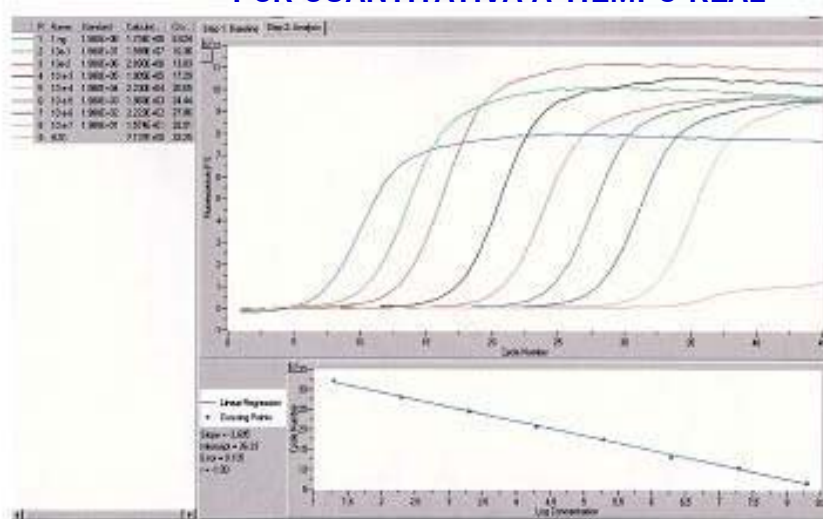


Figura 4. Diluciones seriadas al décimo del plásmido.

Partiendo de ADNc de la línea Jurkatt se amplificaron las moléculas del presente estudio y se purificaron en columnas (Wizad®PCR Preps DNA purification System, Promega) siguiendo el protocolo de centrifugado. Tras esto se insertó en el vector PCR 4-TOPO (TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen, Groningen, The Netherlands) y se clonó en *E. coli* siguiendo los protocolos del kit de clonación.

Las bacterias que tenían el plásmido con el inserto se seleccionaron en medio sólido L.B. al cual se adicionaron 50 U.I. de ampicilina por ml y se crecieron en agitación a 37° C durante toda la noche en 15 ml de medio L.B. líquido con 50 U.I. / ml de ampicilina. De 3 a 5 ml del cultivo se emplearon en la extracción del plásmido mediante el kit Wizad® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) según el protocolo de centrifugado del proveedor.

La concentración de plásmido se determinó por lectura en fotómetro (GeneQuant pro RNA/DNA calculator) del ADN del purificado del plásmido y se hizo

una dilución a 1 ng / μ l. Asumiendo que todo el ADN del purificado corresponde al plásmido, calculamos el número de copias de plásmido por μ l mediante la siguiente fórmula, que permite obtener la concentración en número de copias conociendo la concentración de ADN y el peso molecular del plásmido (vector + inserto).

$$\text{Número copias}/\mu\text{l} = \frac{9,1 \cdot 10^8 (\text{plásmidos}/\mu\text{l}) * \text{Kb}}{\text{Longitud del plásmido en Kilobases}}$$

Una vez conocido el número de copias por μ l se realizaron diluciones seriadas al décimo hasta obtener una concentración final de 20 a 2 copias/ μ l. Las diluciones que abarcaban el rango de expresión de la molécula estudiada en nuestros tejidos (comprobado en pruebas previas) se emplearon como calibradores de concentración, incluyéndolas como muestras en la misma tanda de amplificación de nuestras muestras.

2.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En el análisis estadístico usamos el programa estadístico SPSS 12.0. para windows para aplicar los parámetros estadísticos a los datos obtenidos.

Para comprobar si existían diferencias estadísticamente significativas en el nivel de trascrición de estos genes entre los dos grupos de tumores del apartado anterior se empleó el test no para métrico de Mann-Whitney, también usado para comparar posibles diferencias en grado y estadio entre los dos grupos estudiados.

En el estudio de correlaciones entre variables clínico-histológicas y alteraciones en la expresión de moléculas HLA de clase I se empleó la prueba de Chi cuadrado de Pearson. En este análisis se abarcaron los 70 tumores de vejiga y se clasificaron en tres grupos; en el primer grupo se incluyeron los tumores en los que no encontramos alteraciones en HLA de clase I, en el segundo grupo se incluyeron todos aquellos tumores con una alteración parcial de la expresión de HLA de clase I y en el tercer grupo se incluyeron los tumores con una pérdida generalizada de expresión de moléculas HLA de clase I.

BIBLIOGRAFÍA

- Barthe, C., Mahon, F.X., Gharbi, M.J., Faberes, C., Bilhou-Nabera, C., Hochhaus, A., Reiffers, J. and Marit, G.: Expression of interferon-alpha (IFN-alpha) receptor 2c at diagnosis is associated with cytogenetic response in IFN-alpha-treated chronic myeloid leukemia. *Blood* 97 (2001) 3568-73.
- Cabrera, T., Pedrajas, G., Cozar, J.M., Garrido, A., Vicente, J., Tallada, M. and Garrido, F.: HLA class I expression in bladder carcinomas. *Tissue Antigens* 62 (2003) 324-7.
Notes:
- Curran, M.D., Williams, F., Earle, J.A., Rima, B.K., van Dam, M.G., Bunce, M. and Middleton, D.: Long-range PCR amplification as an alternative strategy for characterizing novel HLA-B alleles. *Eur J Immunogenet* 23 (1996) 297-309.
- Kletzien, R.F., Harris, P.K. and Foellmi, L.A.: Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a "housekeeping" enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress. *FASEB J* 8 (1994) 174-81.

RESULTADOS

1. ESTUDIO DE MECANISMOS IMPLICADOS EN LA PÉRDIDA DE EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS HLA DE CLASE I EN CARCINOMAS HUMANOS DE VEJIGA

En todos estos estudios se empleó ADN o ADNc obtenidos mediante microdissección de nidos tumorales para eliminar, en la medida de lo posible, células no tumorales que puedan falsear los resultados obtenidos. El proceso se explica con mayor detalle en la sección de material y métodos.

1.1. PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIDAD (LOH) EN LOS CROMOSOMAS 6 Y 15 EN COMBINACIÓN CON EXPRESIÓN DE HLA DE CLASE I.

La detección de LOH en 6p21.3, región HLA, nos permite mejorar la clasificación inmunohistoquímica de las alteraciones de HLA de clase I en los tumores, ya que la falta de anticuerpos para todos los alelos HLA clase I impide detectar pérdidas de expresión de muchos antígenos. Al estudiar LOH de la región HLA se clasificaron como fenotipo II tumores que por inmunohistoquímica perdían un alelo A y uno B, también otros tumores que o no presentaban alteraciones o perdían un alelo y mostraban LOH. Como fenotipo V se incluyeron tumores que por inmunohistoquímica presentaban pérdida de un locus y que tenían LOH. En la figura 1 vemos el ejemplo del patrón obtenido en un caso que presentaba LOH. Para la determinación del haplotipo HLA perdido se realizó tipaje genómico.

La utilidad de determinar LOH en la zona del cromosoma 15 donde está el gen de la $\beta 2m$ consiste en que este mecanismo puede contribuir a la pérdida de expresión de $\beta 2m$.

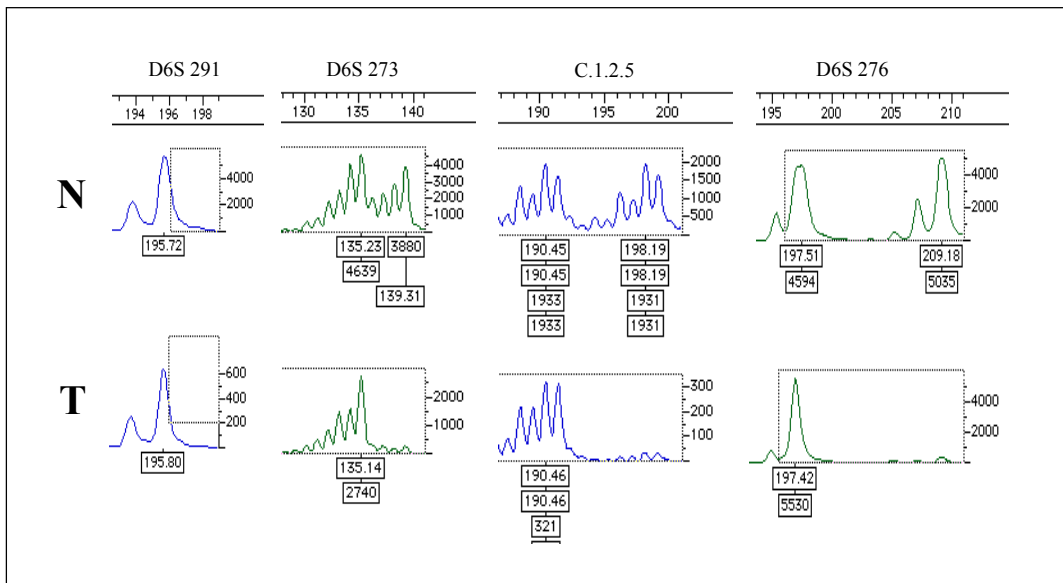


Figura 1. Patrones obtenidos en el estudio de microsatélites del caso VE 85. En la línea superior tenemos el patrón obtenido en ADN de sangre periférica autóloga y en la fila inferior el patrón obtenido en ADN tumoral. El marcador D6S 291 resultó ser homocigoto y por tanto no informativo, los marcadores D6S 273, C.1.2.5 y D6S 276 muestran un patrón de LOH. N =DNA no tumoral autólogo. T= DNA tumoral.

1.1.1. CROMOSOMA 6

De los 70 casos, uno de ellos fue desechado para estudio de LOH en la región HLA del cromosoma 6 por estar extremadamente infiltrado por linfocitos; del resto, encontramos LOH en 25 casos (36%). En los casos con LOH parcial (n=12) no pudo determinarse el haplotipo perdido por tipaje genómico, pues se determinan los dos haplotipos ya que parte del ADN no tiene la alteración. En los otros 13 casos sí se determinó el haplotipo perdido. En el caso VE 43 (tabla 6) sólo pudo determinarse la pérdida de un alelo A, lo cual fue congruente con el análisis de microsatélites, que mostraba pérdida de los marcadores D6S265 y D6S276, en la zona del locus A. De los casos que mostraban LOH en HLA, 11 la mostraron también en 6q, con lo cual es probable que se haya perdido el cromosoma completo.

La clasificación de tumores tras realizar el estudio de LOH y tipaje genómico fue de 16 tumores sin alteraciones, 17 con pérdida total de HLA, de los cuales 6 mostraban LOH en HLA, 14 casos con fenotipo II, 5 con fenotipo III, 8 con fenotipo IV y 10 con fenotipo V, de los que 6 presentaban LOH en HLA.

El resumen de combinar la técnica de inmunohistoquímica con el estudio de LOH en 6p21.3 da la distribución de alteraciones que se refleja de forma gráfica en la figura 2, también se muestra la frecuencia de LOH en cada fenotipo.

El estudio pormenorizado de cada caso se muestra en las tablas 1 a 6, donde vemos el tipaje HLA del paciente, el estudio inmunohistoquímico del tumor y el haplotipo perdido y retenido en los casos en que se pudo determinar mediante tipaje genómico. Cada tabla contiene los casos que se han clasificado dentro de un fenotipo tras realizar el estudio. Los criterios para considerar LOH en 6p21 se exponen en el apartado de material y métodos.

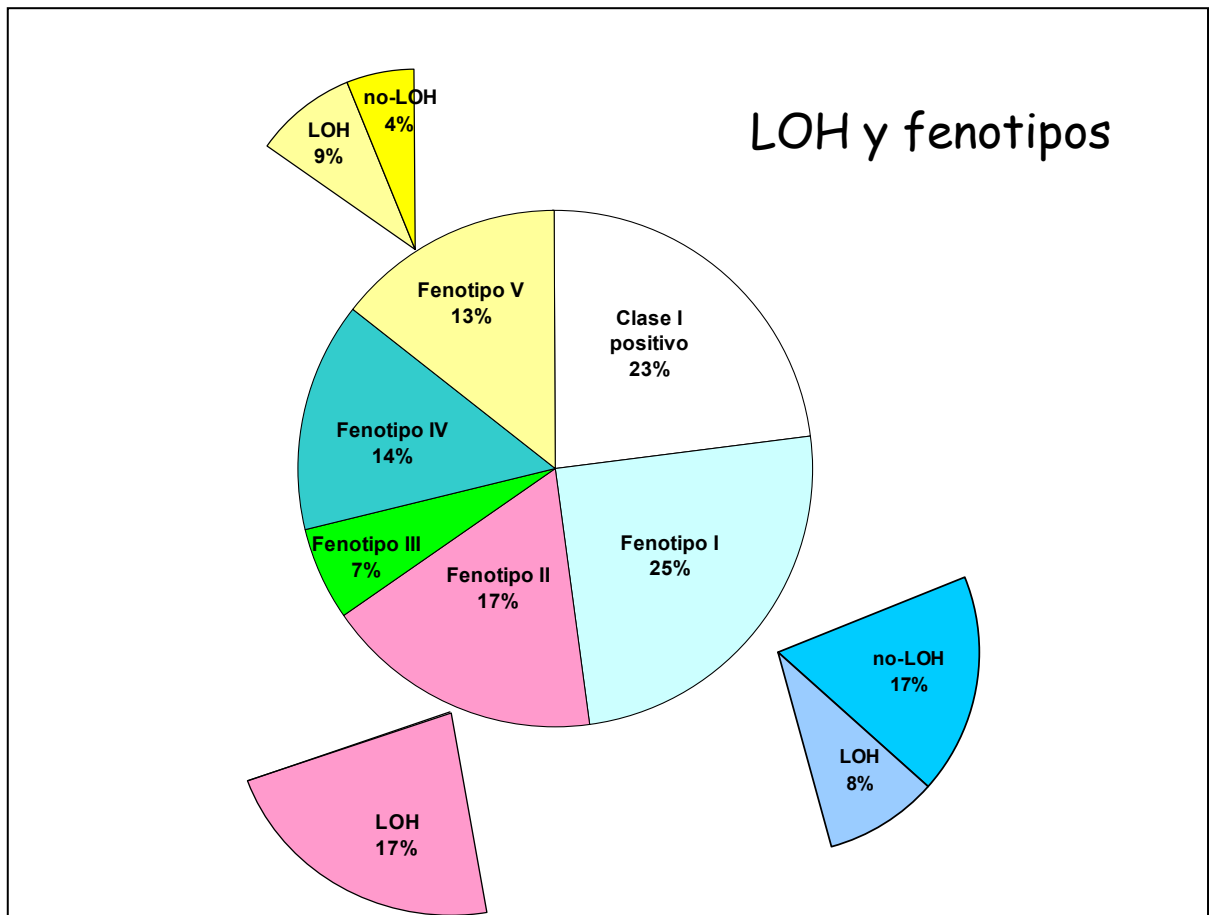


Figura 2. Fenotipos HLA y porcentajes de LOH en 6p21 en cada fenotipo.

En la tabla 1 se recogen los tumores sin alteraciones demostradas para HLA de clase I, los casos VE-50 y VE-96 se consideraron como no alterados a pesar de cumplir los criterios de LOH para la región de HLA, ya que la LOH que mostraban era parcial y además no era congruente con la expresión en superficie, puesto que por inmunohistoquímica se revelaba la expresión de los dos alelos HLA-B. Como podemos observar, ningún caso presenta LOH ya que aquellos que la tenían han sido clasificados como fenotipo II.

En la tabla 2 se agrupan los casos que mostraron fenotipo I, de los cuales 6 mostraban LOH y 11 no. Dentro de los casos con LOH, en los casos VE-6 y VE-52 pudo determinarse el haplotipo perdido.

TABLA 1. TUMORES HLA CLASE I POSITIVOS TRAS ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO Y DE MICROSATÉLITES.
(N=16)

| Tumor | TIPAJE HLA DEL TUMOR | | | | | | NO LOH-HLA | | | | | | | | |
|-------|----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|------------|-----|-----|------|------|-----|-----|-----|--|
| | INMUNOHISTOQUÍMICA | | | | | | 311 | 291 | 273 | C12C | C125 | 265 | 105 | 276 | |
| VE-5 | A29 | A31 | B44 | B35 | - | Bw6 | N | N | N | N | N | H | H | L | |
| VE-8 | A1 | A3 | B62 | B57 | Bw4 | Bw6 | L | N | H | N | N | L* | N | N | |
| VE-26 | A2 | - | B51 | B35 | Bw4 | Bw6 | N | N | N | N | N | N | N | N | |
| VE-27 | A24 | A25 | B44 | - | Bw4 | - | N | N | N | N | N | N | N | N | |
| VE-34 | A32 | A68 | B14 | B40 | - | Bw6 | L | N | L* | H | N | - | H | H | |
| VE-44 | A3 | A31 | B35 | B40 | - | Bw6 | L* | H | H | L* | H | N | N | N | |
| VE-46 | A2 | A26 | B50 | - | - | Bw6 | L | N | H | N | N | L* | L* | H | |
| VE-47 | A2 | A30 | B7 | B55 | - | Bw6 | L | N | N | N | - | L* | H | N | |
| VE-50 | A2 | A26 | B52 | B50 | Bw4 | Bw6 | N | L | L* | N | L | N | N | L* | |
| VE-51 | A24 | A33 | B65 | B41 | - | Bw6 | H | N | H | L* | N | N | L* | N | |
| VE-54 | A11 | A29 | B27 | - | Bw4 | - | N | N | H | N | N | N | N | L* | |
| VE-71 | A1 | A3 | B27 | B35 | Bw4 | Bw6 | N | H | N | N | N | N | H | N | |
| VE-72 | A2 | A3 | B13 | B35 | Bw4 | Bw6 | N | N | N | N | N | N | H | H | |
| VE-87 | A26 | A29 | B44 | B55 | Bw4 | Bw6 | N | N | H | N | N | N | N | L* | |
| VE-93 | A2 | A29 | B44 | - | Bw4 | - | L* | N | H | H | H | N | N | N | |
| VE-96 | A2 | A11 | B51 | B35 | Bw4 | Bw6 | H | N | H | L* | L* | N | L* | L* | |

Los alelos enmarcados son los que se han podido estudiar con anticuerpos monoclonales; con fondo blanco son los que no se han perdido y los de fondo gris los perdidos. Los alelos con fondo blanco y sin recuadro son aquellos que no se han podido determinar mediante inmunohistoquímica. Los marcadores de microsatélite determinados se incluyen a la derecha de cada tabla, la L significa pérdida del marcador, si es con asterisco, parcial. La H significa homocigoto, la N no alteración y MIN inestabilidad del microsatélite.

TABLA 2. FENOTIPO I TRAS ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO Y DE MICROSATÉLITES.
(N=17)

| Tumor | TIPAJE HLA DEL TUMOR | | | | | | LOH-HLA | | | | | | | | | | |
|-------|----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|------------|-----|-----|------|------|-----|-----|-----|------------------------|------------------------|--|
| | INMUNOHISTOQUÍMICA | | | | | | 311 | 291 | 273 | C12C | C125 | 265 | 105 | 276 | HAPLOTIPO PERDIDO | HAPLOTIPO RETENIDO | |
| VE-6 | A2 | A3 | B7 | B65 | - | Bw6 | N | L | H | H | L | L | L | L | A*03,B*14,Cw*08,DR*01● | A*02,B*07,Cw*07,DR*01● | |
| VE-9 | A2 | A25 | B41 | B44 | Bw4 | Bw6 | L | L | L* | N | L | L* | N | N | | | |
| VE-22 | A2 | A29 | B18 | B44 | Bw4 | Bw6 | L | L | H | L | L | N | N | L | | | |
| VE-52 | A29 | A31 | B44 | B51 | Bw4 | - | N | N | L | H | H | L | N | L* | A*31,B*51,Cw*16●,DR*01 | A*29,B*44,Cw*16●DR*03 | |
| VE-69 | A2 | A3 | B18 | B50 | - | Bw6 | H | L* | N | L* | MIN | N | N | L* | | | |
| VE-78 | A28 | A24 | B14 | B27 | Bw4 | Bw6 | L | L* | N | L* | N | N | N | L* | | | |
| | | | | | | | NO LOH-HLA | | | | | | | | | | |
| VE-4 | A1 | A11 | B8 | B27 | Bw4 | Bw6 | L | N | N | N | N | L* | H | H | | | |
| VE-12 | A2 | A24 | B13 | B17 | Bw4 | - | L | N | N | H | N | N | N | N | | | |
| VE-13 | A1 | A2 | B41 | B51 | Bw4 | Bw6 | N | H | N | N | N | N | N | H | | | |
| VE-18 | A2 | A3 | B49 | B35 | Bw4 | Bw6 | L | L* | L* | N | N | N | N | N | | | |
| VE-33 | A11 | A30 | B14 | B51 | Bw4 | Bw6 | N | N | L* | N | N | N | N | L* | | | |
| VE-37 | A2 | - | B49 | B57 | Bw4 | - | N | H | N | N | N | L* | H | N | | | |
| VE-41 | A3 | A11 | B14 | B35 | - | Bw6 | N | L* | N | H | L* | N | N | H | | | |
| VE-55 | A1 | A26 | B62 | - | - | Bw6 | L | N | L* | N | N | H | H | L* | | | |
| VE-56 | A29 | - | B17 | B35 | Bw4 | Bw6 | L | H | N | N | N | N | H | N | | | |
| VE-80 | A2 | A3 | B8 | - | - | Bw6 | N | N | H | H | H | L* | N | N | | | |
| VE-88 | A1 | A30 | B18 | B40 | - | Bw6 | L* | N | N | N | N | H | N | | | | |

En la columna de inmunohistoquímica todos los casos están sombreados, ya que la pérdida total de antígenos HLA de clase I se ha determinado con un anticuerpo común para todos los antígenos HLA-ABC.

La tabla 3 contiene los casos que han mostrado fenotipo II. En ella se incluyen casos que por inmunohistoquímica eran sugerentes de LOH por perder un alelo A y uno B, estos casos son VE 23, VE 79 y VE 83; mediante el estudio de LOH y tipaje genómico fueron plenamente corroborados. También se incluyen casos como por ejemplo VE 31 y VE 39, que por inmunohistoquímica mostraban pérdida de un alelo y que tras comprobar LOH fueron incluidos en este fenotipo. Los casos VE 17, VE 24, VE 36 y VE 81 que no mostraban pérdidas por inmunohistoquímica presentaron un patrón de LOH, patrón que era compatible con los datos de inmunohistoquímica puesto que son casos que no habían podido ser estudiados de forma completa por falta de anticuerpos específicos.

TABLA 3. FENOTIPO II TRAS ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO Y DE MICROSATÉLITES.
(N=12)

| Tumor | TIPAJE HLA DEL TUMOR | | | | | | LOH-HLA | | | | | | | | | |
|--------------|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|---------|-----|-----|------|------|-----|-----|-----|---------------------------|-----------------------|
| | <i>INMUNOHISTOQUÍMICA</i> | | | | | | 311 | 291 | 273 | C12C | C125 | 265 | 105 | 276 | HAPLOTIPO PERDIDO | HAPLOTIPO RETENIDO |
| VE-23 | A2 | A3 | B7 | B27 | Bw4 | Bw6 | N | N | H | L | L | L | L | L | A*03,B*27,Cw*07,DR*12 | A*02,B*07,Cw*15,DR*10 |
| VE-79 | A2 | A29 | B8 | B50 | - | Bw6 | H | | L | L | L | L | L | L | A*0201,B*08,Cw*07,DR*03 | A*29,B*50,Cw*06,DR*07 |
| VE-83 | A2 | A1 | B17 | B60 | Bw4 | Bw6 | H | L | L | H | L | L | L* | | | |
| VE-3 | A3 | A26 | B7 | B62 | - | Bw6 | H | N | H | L* | L* | L | L | L* | | |
| VE-30 | A3 | A26 | B51 | B50 | Bw4 | Bw6 | N | L* | L* | L* | L* | H | L | H | | |
| VE-31 | A2 | A24 | B18 | B62 | - | Bw6 | L | H | - | L | L | L | L | L | A*02,B*15,DR*13 | A*24,B*18,Cw12•,DR*11 |
| VE-39 | A3 | A30 | B18 | B35 | - | Bw6 | L* | L | L | L | L | L | L | L | A*0301,B*35,Cw*0401,DR*11 | A*30,B*18,Cw05,DR*03 |
| VE-92 | A3 | A1 | B8 | B35 | - | Bw6 | H | | H | H | L | L | L | L | | |
| VE-17 | A2 | A11 | B8 | B60 | - | Bw6 | L* | L* | L | H | L* | L* | L* | L | | |
| VE-24 | A3 | A26 | B53 | B51 | Bw4 | - | N | L | L | L | H | L | L | L | A*26,B*53,Cw*04 | A*03,B*51Cw*14,DR*04• |
| VE-36 | A29 | A30 | B39 | B17 | - | Bw6 | N | L | H | L | L | L | L | L | A*29,B*57,Cw06,DR*07 | A*30,B*39,Cw*07,DR*15 |
| VE-81 | A24 | A29 | B15 | B40 | - | Bw6 | L* | H | H | L* | L* | L* | L | H | | |

La tabla 4 muestra los casos clasificados como fenotipo III; los casos VE 62 y VE 86 eran homocigotos para Bw4, el hecho de no tener expresión de esta especificidad nos indicó que no expresaban ningún alelo B. En esta tabla ningún caso tiene LOH ya que un caso que presente LOH y por inmunohistoquímica tenga pérdida de un locus se ha clasificado como fenotipo V e incluido en la tabla 6.

TABLA 4. FENOTIPO III TRAS ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO Y DE MICROSATÉLITES.
(N=5)

| Tumor | TIPAJE HLA DEL TUMOR | | | | | | NO LOH-HLA | | | | | | | |
|-------|----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|------------|-----|-----|------|------|-----|-----|-----|
| | INMUNOHISTOQUÍMICA | | | | | | 311 | 291 | 273 | C12C | C125 | 265 | 105 | 276 |
| VE-62 | A2 | A26 | B51 | B27 | Bw4 | - | N | N | N | N | N | N | N | H |
| VE-68 | A2 | A26 | B14 | B18 | - | Bw6 | H | H | H | N | - | - | N | L |
| VE-86 | A1 | A28 | B17 | B49 | Bw4 | - | N | N | H | H | N | N | N | N |
| VE-90 | A2 | - | B8 | B41 | - | Bw6 | N | N | N | N | N | N | N | N |
| VE-91 | A2 | A29 | B44 | B18 | Bw4 | Bw6 | L | N | H | N | N | L | N | H |

En la tabla 5 tenemos los casos con fenotipo IV, tampoco en esta tabla hay casos con LOH, ya que los casos con LOH han sido clasificados como fenotipo II e incluidos en la tabla 3. Los casos VE 21 y VE 63 aunque cumplían el criterio de LOH no se clasificaron como tal pues aunque mostraban reducción en 3 marcadores, o tenían reducción parcial o eran periféricos a la región HLA. Además, en el caso VE 63 la inmunohistoquímica no era congruente con pérdida de haplotipo.

La tabla 6 nos muestra los casos con fenotipo V. Casos como VE 43, VE 67 y VE 11 presentan todos los alelos negativos por dar negatividad los anticuerpos específicos de locus A y B, sin embargo, muestran reactividad positiva con el anticuerpo W6/32, que reconoce al complejo HLA-ABC, por lo que estos casos no pueden ser clasificados como fenotipo I.

TABLA 5. Fenotipo IV TRAS ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO Y DE MICROSATÉLITES.

(N=10)

| Tumor | TIPAJE HLA DEL TUMOR | | | | | | NO LOH-HLA | | | | | | | |
|-------|----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|------------|-----|-----|------|------|-----|-----|-----|
| | INMUNOHISTOQUÍMICA | | | | | | 311 | 291 | 273 | C12C | C125 | 265 | 105 | 276 |
| VE-10 | A2 | - | B44 | B49 | Bw4 | - | N | N | N | H | N | N | N | N |
| VE-21 | A3 | A29 | B7 | B14 | - | Bw6 | N | L* | N | H | N | N | L* | L |
| VE-25 | A2 | A24 | B44 | B51 | Bw4 | - | H | - | H | L* | L* | N | N | H |
| VE-35 | A24 | A30 | B27 | B35 | Bw4 | Bw6 | N | - | N | N | N | L* | N | - |
| VE-38 | A1 | A24 | B13 | B18 | Bw4 | Bw6 | H | N | H | N | H | N | L* | L |
| VE-63 | A28 | A24 | B38 | B35 | Bw4 | Bw6 | N | N | H | L | H | N | L | L |
| VE-75 | A2 | A32 | B51 | B61 | Bw4 | Bw6 | N | H | H | N | L* | H | N | H |
| VE-76 | A28 | A3 | B51 | B7 | Bw4 | Bw6 | N | - | H | N | N | N | N | N |
| VE-82 | A1 | A2 | B7 | B8 | - | Bw6 | | N | H | N | N | N | | |
| VE-95 | A3 | - | B7 | B38 | Bw4 | Bw6 | N | N | N | H | N | H | N | N |

TABLA 6. FENOTIPO V TRAS ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO Y DE MICROSATÉLITES.

(N=9)

| Tumor | TIPAJE HLA DEL TUMOR | | | | | | LOH-HLA | | | | | | | | HAPLOTIPO PERDIDO | HAPLOTIPO RETENIDO |
|-------|----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|------------|-----|-----|------|------|-----|-----|-----|----------------------------|----------------------------|
| | INMUNOHISTOQUÍMICA | | | | | | 311 | 291 | 273 | C12C | C125 | 265 | 105 | 276 | | |
| VE-43 | A2 | A24 | B18 | - | - | Bw6 | L | L* | H | N | N | L | H | L | A*02 | A*24 |
| VE-60 | A1 | A29 | B14 | B44 | Bw4 | Bw6 | | | | L | L | | L | L | A*29,B*44,Cw16,DR*07,DQ*05 | A*01,B*14,Cw08,DR*15,DQ*02 |
| VE-67 | A3 | - | B7 | B51 | Bw4 | Bw6 | L | L* | H | L* | L* | H | N | L* | | |
| VE-84 | A25 | A29 | B7 | B44 | Bw4 | Bw6 | L | L | L | L | L | L | L | L | A*29,B*44,Cw16,DR*07 | A*25,B*07,Cw07,DR*15 |
| VE-85 | A1 | A3 | B7 | B44 | Bw4 | Bw6 | L | H | L | L | L | L | H | L | A*03,B*07,Cw*07,DR*01 | A*01,B*44,Cw*05,DR*13 |
| VE-89 | A2 | A11 | B18 | B44 | Bw4 | Bw6 | H | L | | H | L | L | L* | N | A*02,B*18,Cw*12,DR*15 | A*11,B*44,Cw*05,DR*12 |
| | | | | | | | NO LOH-HLA | | | | | | | | | |
| VE-11 | A11 | A29 | B44 | B62 | Bw4 | Bw6 | N | L* | N | N | N | N | N | L* | | |
| VE-58 | A3 | A11 | B7 | B15 | - | Bw6 | H | N | - | N | N | N | N | H | | |
| VE-61 | A2 | - | B44 | B52 | Bw4 | - | L | L* | N | N | N | H | L* | H | | |

1.1.2. CROMOSOMA 15

El estudio de LOH en $\beta 2m$ arrojó 36 casos con LOH sobre 64 informativos, con una frecuencia del 55%. El resumen de LOH en $\beta 2m$ según fenotipo HLA de clase I se muestra en la tabla 7. En la tabla 8 se recogen los datos pormenorizadamente, las abreviaturas empleadas para cada microsatélite son las mismas que en las tablas 1-6. Se consideró LOH en $\beta 2m$ cuando al menos un marcador mostró LOH, como ya se explicó en material y métodos.

TABLA 7. FRECUENCIA ABSOLUTA DE LOH EN $\beta 2m$ SEGÚN FENOTIPOS

| | No LOH $\beta 2m$ | LOH $\beta 2m$ | No informativos | Total |
|-----------------------------|-------------------|----------------|-----------------|-------|
| HLA clase I positivo | 7 | 6 | 2 | 15 |
| Fenotipo I | 6 | 10 | 1 | 17 |
| Fenotipo II | 1 | 11 | 0 | 12 |
| Fenotipo III | 4 | 0 | 0 | 4 |
| Fenotipo IV | 7 | 3 | 1 | 11 |
| Fenotipo V | 3 | 6 | 1 | 10 |
| Total | 28 | 36 | 5 | 69 |

Como podemos comprobar, los tumores con mayor frecuencia de pérdida de heterocigosidad en $\beta 2m$ son los que han perdido un haplotipo HLA, seguidos de los tumores con pérdida total de expresión de HLA y los tumores con alteraciones mixtas. Los tumores sin alteraciones en la expresión de HLA y aquellos con expresión deficiente de un locus HLA de clase I o de un alelo son los que presentan menores frecuencias de pérdida de heterocigosidad en $\beta 2m$.

TABLA 8. LOH EN $\beta 2m$ Y MICROSATÉLITES.

| Tumor | EXPRESIÓN HLA | LOH en HLA | LOH en $\beta 2m$ | <i>Microsatélites $\beta 2m$ usados</i> | |
|--------|------------------|------------|-------------------|--|---------|
| | | | | D15S126 | D15S209 |
| VE-003 | FENOTIPO II | SÍ | SÍ | L | L |
| VE-004 | FENOTIPO I | NO | SÍ | L | H |
| VE-005 | CLASE I POSITIVO | NO | NO | H | N |
| VE-006 | FENOTIPO I | SÍ | SI | H | L |
| VE-008 | CLASE I POSITIVO | NO | SI | L | H |
| VE-009 | FENOTIPO I | SÍ | SI | L | H |
| VE-010 | FENOTIPO IV | NO | SI | L | N |
| VE-011 | FENOTIPO V | NO | NO INFORM | H | H |
| VE-012 | FENOTIPO I | NO | NO | N | H |
| VE-013 | FENOTIPO I | NO | NO INFORM | H | H |
| VE-017 | FENOTIPO II | SÍ | SÍ | L | N |
| VE-018 | FENOTIPO I | NO | SÍ | L | N |
| VE-021 | FENOTIPO IV | SI | NO | N | N |
| VE-022 | FENOTIPO I | SÍ | SÍ | L | N |
| VE-023 | FENOTIPO II | SÍ | NO | N | N |
| VE-024 | FENOTIPO II | SÍ | SÍ | L | L |
| VE-025 | FENOTIPO IV | NO | NO INFORM | H | H |
| VE-026 | CLASE I POSITIVO | NO | NO | N | N |
| VE-027 | CLASE I POSITIVO | NO | NO | H | N |
| VE-030 | FENOTIPO II | NO | SÍ | L | L |
| VE-031 | FENOTIPO II | SÍ | SÍ | L | L |
| VE-033 | FENOTIPO I | NO | NO | H | N |
| VE-034 | CLASE I POSITIVO | NO | SÍ | L | H |
| VE-035 | FENOTIPO IV | NO | SÍ | H | L |
| VE-036 | FENOTIPO II | SÍ | SÍ | L | L |
| VE-037 | FENOTIPO I | NO | SÍ | N | L |
| VE-038 | FENOTIPO IV | NO | NO | N | N |
| VE-039 | FENOTIPO II | SÍ | SÍ | L | L |
| VE-041 | FENOTIPO I | NO | SÍ | H | L |
| VE-043 | FENOTIPO V | SÍ | SÍ | H | L |
| VE-044 | CLASE I POSITIVO | NO | NO INFORM | H | H |
| VE-046 | CLASE I POSITIVO | NO | NO | N | N |
| VE-047 | CLASE I POSITIVO | NO | NO | H | N |
| VE-050 | CLASE I POSITIVO | NO | SÍ | L | L |
| VE-051 | CLASE I POSITIVO | NO | NO INFORM | H | H |
| VE-052 | FENOTIPO I | SÍ | SÍ | N | L |
| VE-054 | CLASE I POSITIVO | NO | NO | N | N |

| Tumor | EXPRESIÓN HLA | LOH en HLA | LOH en $\beta 2m$ | <i>Microsatélites $\beta 2m$ usados</i> | |
|--------|------------------|------------|-------------------|--|---------|
| | | | | D15S126 | D15S209 |
| VE-055 | FENOTIPO I | NO | NO | N | N |
| VE-056 | FENOTIPO I | NO | NO | N | H |
| VE-058 | FENOTIPO V | NO | NO | N | N |
| VE-060 | FENOTIPO V | SÍ | SÍ | L | Nd |
| VE-061 | FENOTIPO V | NO | NO | N | N |
| VE-062 | FENOTIPO III | NO | NO | N | N |
| VE-063 | FENOTIPO IV | SÍ | NO | N | N |
| VE-067 | FENOTIPO V | SÍ | SÍ | L | L |
| VE-068 | FENOTIPO III | NO | SÍ | L | L |
| VE-069 | FENOTIPO I | SÍ | NO | N | N |
| VE-071 | CLASE I POSITIVO | NO | NO | N | N |
| VE-072 | CLASE I POSITIVO | NO | NO | N | N |
| VE-075 | FENOTIPO IV | NO | NO | H | N |
| VE-076 | FENOTIPO IV | NO | SÍ | L | L |
| VE-078 | FENOTIPO I | SÍ | SÍ | L | L |
| VE-079 | FENOTIPO II | SÍ | SÍ | N | L |
| VE-080 | FENOTIPO I | NO | SÍ | L | L |
| VE-081 | FENOTIPO II | SÍ | SÍ | L | L |
| VE-082 | FENOTIPO IV | NO | NO | Nd | N |
| VE-083 | FENOTIPO II | SÍ | SÍ | L | H |
| VE-084 | FENOTIPO V | SÍ | NO | N | H |
| VE-085 | FENOTIPO V | SÍ | SÍ | H | L |
| VE-086 | FENOTIPO III | NO | NO | N | H |
| VE-087 | CLASE I POSITIVO | NO | NO | H | N |
| VE-088 | FENOTIPO I | NO | NO | H | N |
| VE-089 | FENOTIPO V | SÍ | SÍ | L | L |
| VE-090 | FENOTIPO III | NO | NO | N | N |
| VE-091 | FENOTIPO III | NO | NO | N | N |
| VE-092 | FENOTIPO II | SÍ | SÍ | L | N |
| VE-093 | CLASE I POSITIVO | NO | SÍ | N | L |
| VE-094 | FENOTIPO II | Nd | Nd | Nd | Nd |
| VE-095 | FENOTIPO IV | NO | NO | N | N |
| VE-096 | CLASE I POSITIVO | NO | SÍ | L | L |

Nd: *no determinado*

El estudio de LOH en $\beta 2m$ arrojó la frecuencia general mostrada en la figura 3 y la frecuencia relativa en cada fenotipo mostrada en la figura 4.

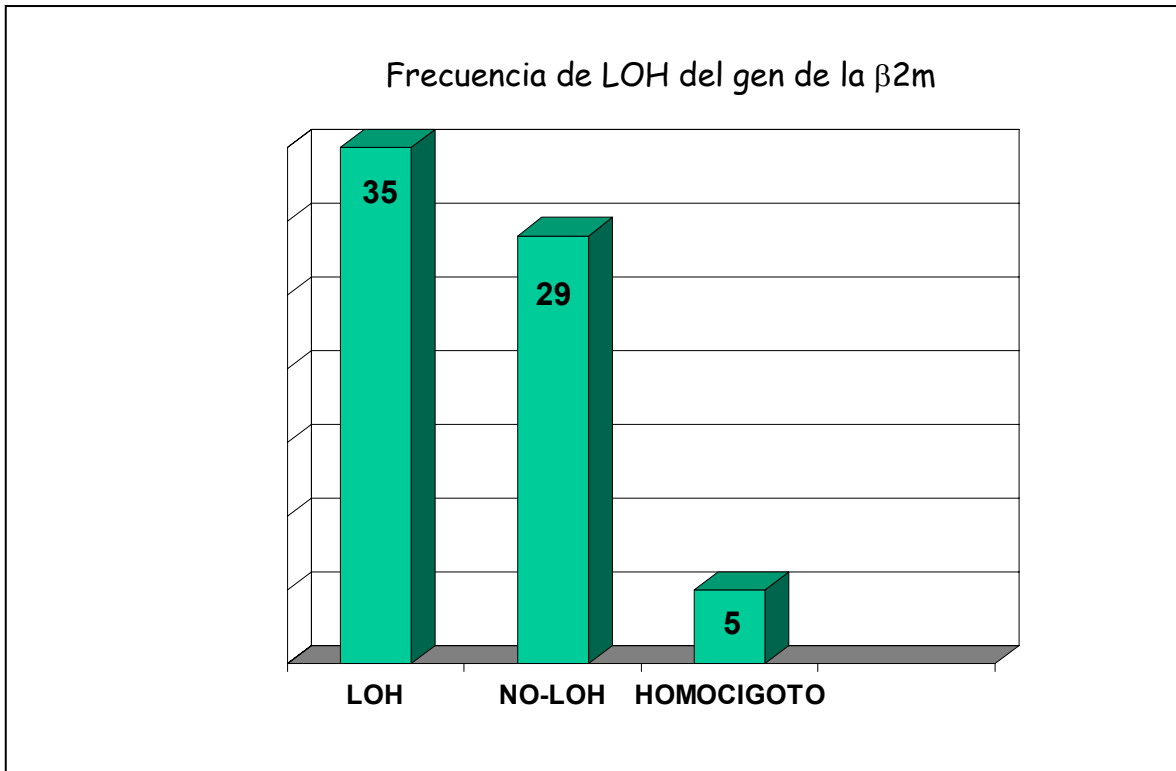


Figura 3. Frecuencia de LOH en $\beta 2m$. En los casos homocigotos no pudo determinarse.

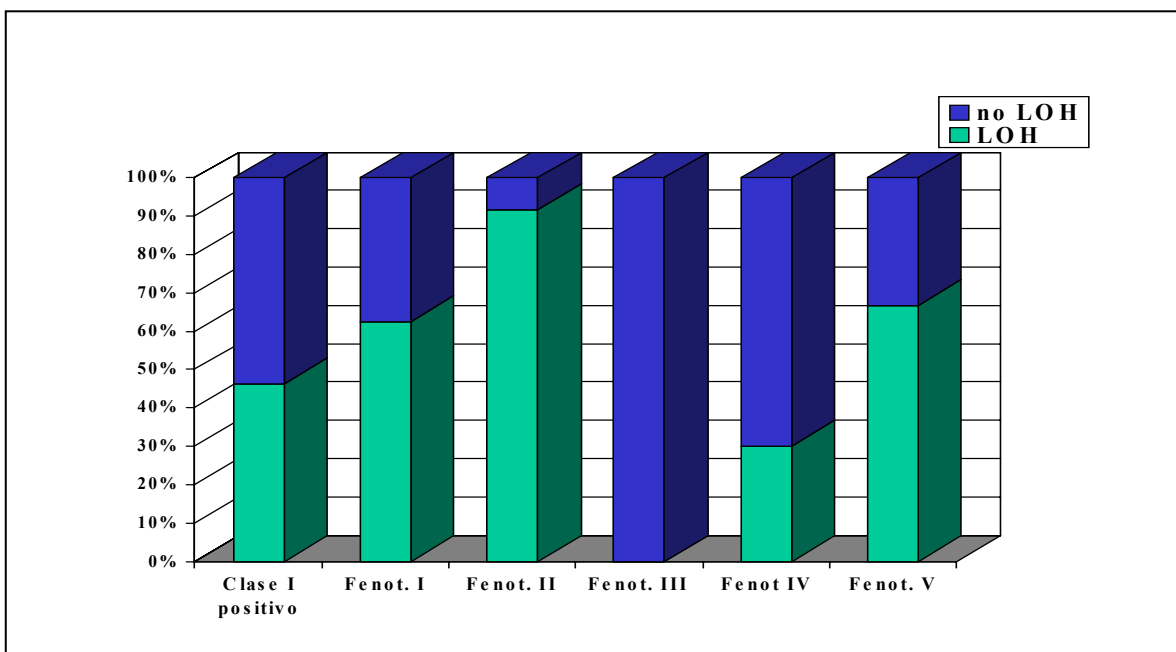


Figura 4. Distribución relativa de frecuencias de LOH en $\beta 2m$ según fenotipos HLA de clase I.

1.2. ESTUDIO DE MUTACIONES EN ALTERACIONES ALELO ESPECÍFICAS

De los casos con alteraciones alelo específicas en la expresión de HLA de clase I, solamente en 2 de ellos pudo realizarse este estudio, los otros tuvieron que ser descartados por ser tumores infiltrados y/o por presentar un patrón heterogéneo de expresión del alelo perdido que no nos permitía obtener únicamente células tumorales negativas.

Se obtuvo ADNc por microdissección de los casos y se secuenciaron los 5 exones del locus en el que se había perdido el alelo, como describimos en material y métodos. El caso VE-10 mostraba una pérdida del alelo B44 y el caso VE-82 una pérdida del alelo B8. En los dos casos comprobamos que existía transcripción del alelo perdido aunque no encontramos alteraciones en ninguno de sus exones, como se recoge en la tabla 9.

TABLA 9. Análisis de mutaciones en ADNc

| Tumor | Alelo - | RNA | Exón 1 | Exón 2 | Exón 3 | Exón 4 | Exón 5 |
|--------------|----------------|------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| VE10 | B44 | + | SA | SA | SA | SA | SA |
| VE82 | B8 | + | SA | SA | SA | SA | SA |

S.A : Sin alteración.

1.3. ESTUDIO DE MECANISMOS IMPLICADOS EN LA PÉRDIDA GENERALIZADA DE EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS HLA CLASE I.

Estos estudios se realizaron en 11 casos negativos para la expresión de HLA de clase I (VE-4, VE-6, VE-18, VE-22, VE-33, VE-37, VE-41, VE-52, VE-56, VE-77, VE-80), los criterios de selección están descritos en material y métodos. El caso VE-77 es una recidiva de VE 69. Para el estudio del grado de transcripción génica se seleccionaron también 10 tumores sin alteraciones demostradas para HLA de clase I, siguiendo criterios similares, con objeto de comparar los niveles transcripcionales de los dos grupos.

1.3.1. ESTUDIO DE ALTERACIONES EN β 2M

La alteración de β 2m es una de las causas de pérdida de expresión de HLA de clase I, como ya comentamos en la introducción. Estas alteraciones suelen deberse a defectos en el gen de la β 2m. Por tanto, comprobamos si existía transcripción del gen, realizamos el estudio de mutaciones del ARNm de β 2m y estudiamos si existía inestabilidad de microsátelites (MIN), puesto que mutaciones en β 2m se asocian a la presencia de MIN.

1.3.1.1. ESTUDIO DE INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES.

Se estudiaron por PCR y electroforesis capilar (ver material y métodos) las secuencias de repetición de mononucleótidos TGFBR2 y BAT26 en los tumores negativos estudiados y en los leucocitos autólogos de cada caso, el patrón obtenido en tumor y leucocitos de cada uno de los 11 casos de tumores sin expresión de HLA de clase I fue normal. Estas alteraciones se han encontrado en tumores de colon con defectos en los mecanismos reparadores del ADN, produciendo el fenotipo MIN, como veremos más a fondo en la discusión. Los tumores con MIN presentan con alta frecuencia mutaciones en las zonas de repetición (CT)₅, A₅ y C₅ del gen de la β 2m. En la figuras 5 y 6 se muestran tumores de vejiga, cuyo patrón es normal, y ejemplos de

patrones alterados para BAT26 y TGFBR2 en tumores de colon. En la tabla 10 (pag 20) se resumen los resultados obtenidos.

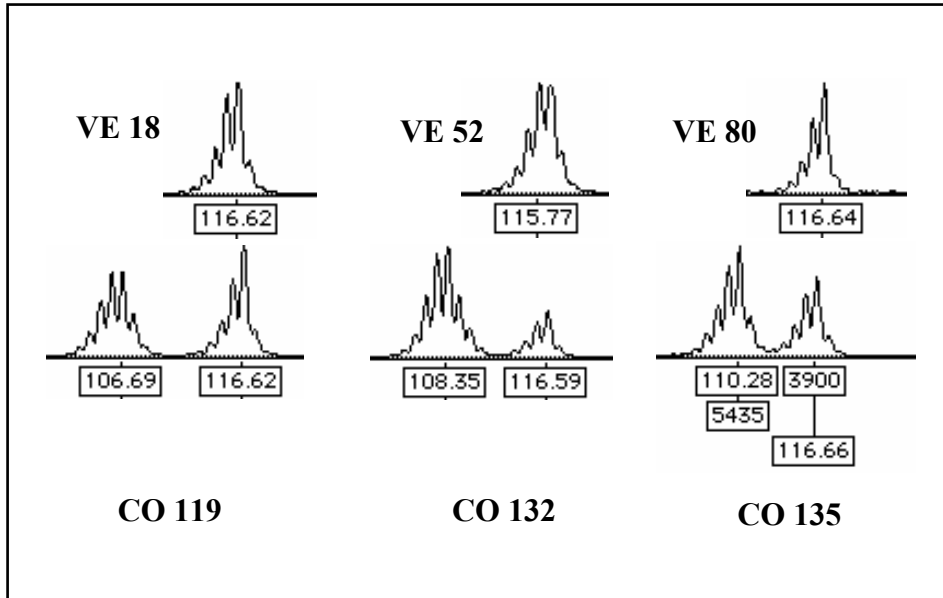


Figura 5. Estudio de Bat26. En la línea superior vemos tres casos de vejiga que muestran el patrón normal, en los casos de colon con MIN vemos la aparición de un nuevo pico a distinto peso molecular.

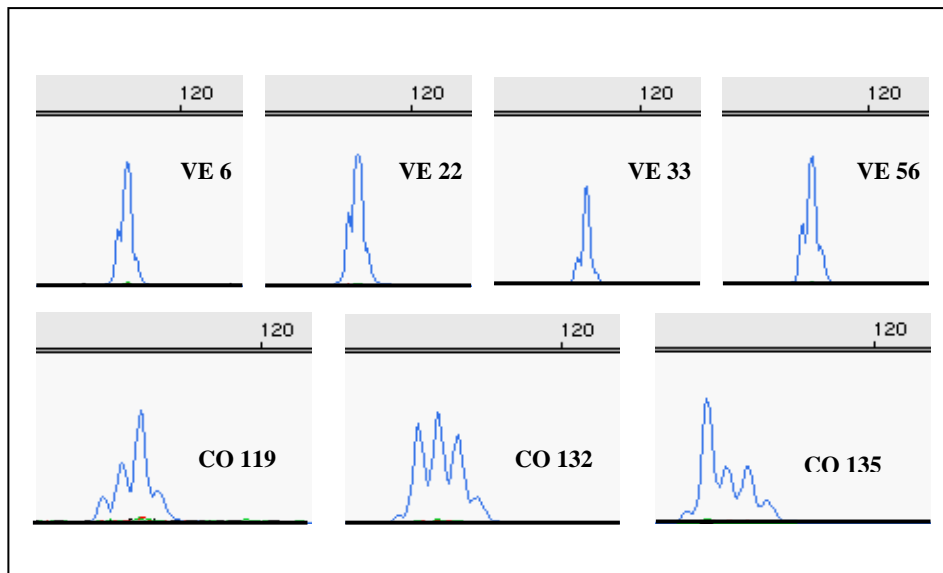


Figura 6. Estudio de TGFBR2. En la línea superior vemos 4 casos de vejiga que muestran un patrón normal. En los casos de colon con MIN vemos la aparición de nuevos picos en el marcador.

1.3.1.2. SECUENCIACIÓN DEL ARNm DEL GEN DE LA $\beta 2m$

El análisis de amplificación por PCR del ADNc de la $\beta 2m$ reveló que en todos los casos existía transcripción de la misma, por lo que descartamos la ausencia de mensajero de este gen como la causa de falta de expresión de moléculas HLA de clase I. A pesar de que estos tumores no presentaban fenotipo MIN, la ausencia de inestabilidad de microsatélites no excluye mutaciones en $\beta 2m$, mutaciones que suelen aparecer en las secuencias de repetición que se esquematizan en la figura 7. El análisis de secuenciación de la secuencia completa del ARNm del gen de la $\beta 2m$ de los 11 casos puso de manifiesto la ausencia de mutaciones en estos tumores. En la figura 8 vemos la secuenciación de las zonas propensas a mutar de un tumor de vejiga y dos ejemplos de mutaciones encontrados en tumores de colon. Los resultados completos se muestran en la tabla 10 (pag 20).

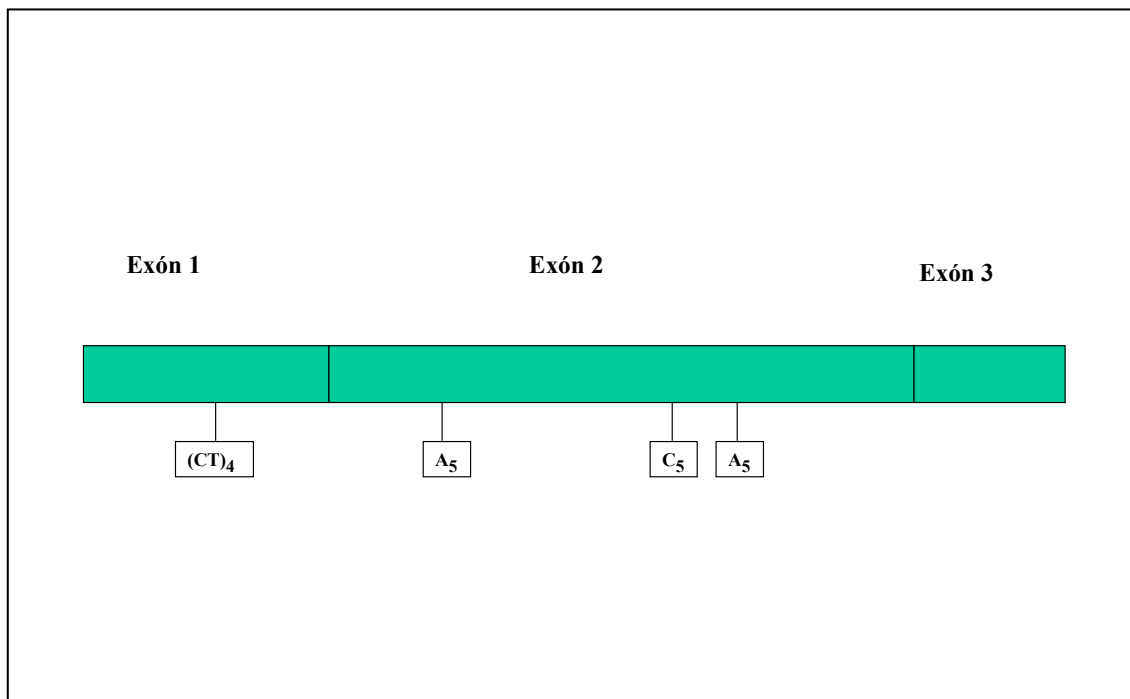


Figura 7. Esquema del ARNm del gen de la $\beta 2m$ con las cuatro zonas de repetición.

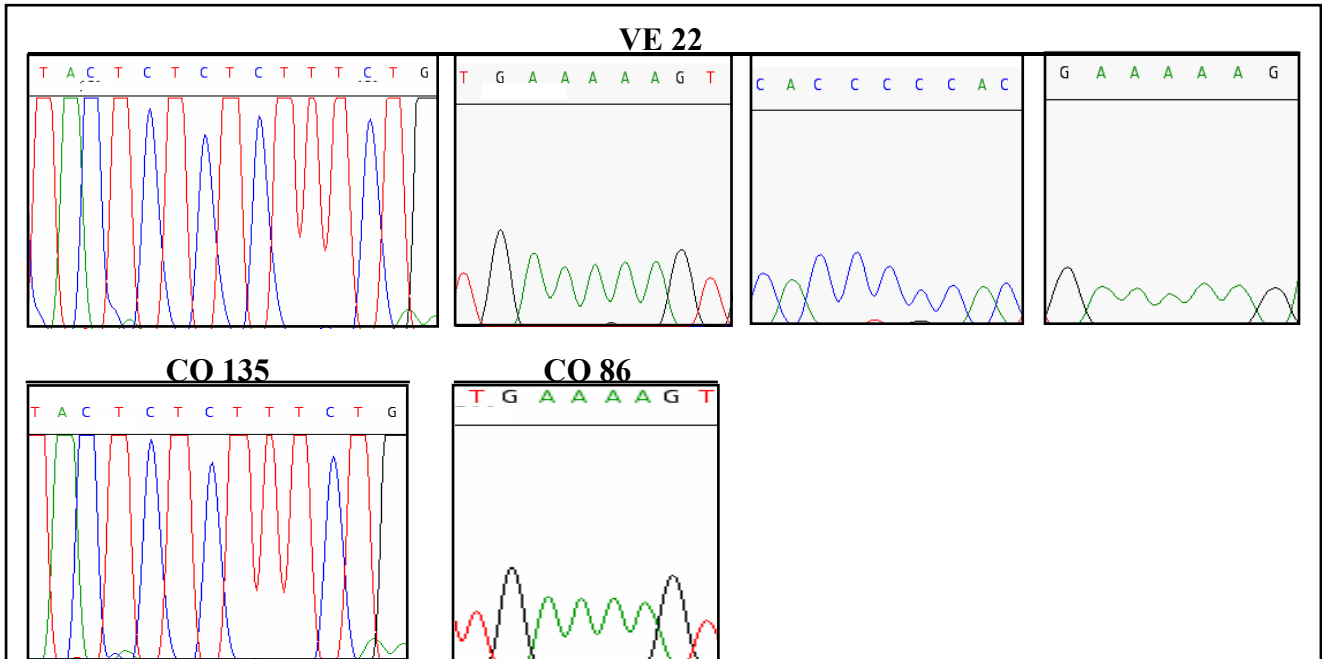


Figura 8. Secuenciación del ARNm de $\beta 2m$. En la parte superior tenemos uno de los casos de vejiga, que no muestra alteraciones en las zonas propensas a mutar al igual que el resto de casos de vejiga. En la parte inferior tenemos dos ejemplos de mutaciones en estas zonas en dos carcinomas de colon, el primero ha perdido un CT y el segundo una A.

1.3.2. ESTUDIO DEL GRADO DE METILACIÓN GÉNICA EN HLA DE CLASE I.

Como ya dijimos en la introducción, se han descrito pérdidas totales de expresión de HLA de clase I por hipermetilación de la región de la cadena pesada de HLA de clase I, por lo que estudiamos si este mecanismo estaba involucrado en nuestros tumores de vejiga.

El ADN tumoral y el obtenido de linfocitos autólogos de los 11 casos se sometió a digestión con endonucleasas de restricción sensibles a metilación y se compararon las bandas obtenidas en Southern Blot al revelar con sondas específicas para el locus A y el B. Como podemos ver en la figura 9, obtuvimos un patrón de bandas similar en las parejas de tumor y leucocitos de cada paciente (a diferencia del ejemplo de la figura 10), esto nos indica que no existe un aumento de la metilación del promotor de HLA de clase I y que la hipermetilación del gen la cadena pesada de HLA no es el mecanismo involucrado en la pérdida de expresión de moléculas HLA de clase I en los carcinomas de vejiga de nuestro estudio. Los resultados de todos los casos se recogen en la tabla 10.

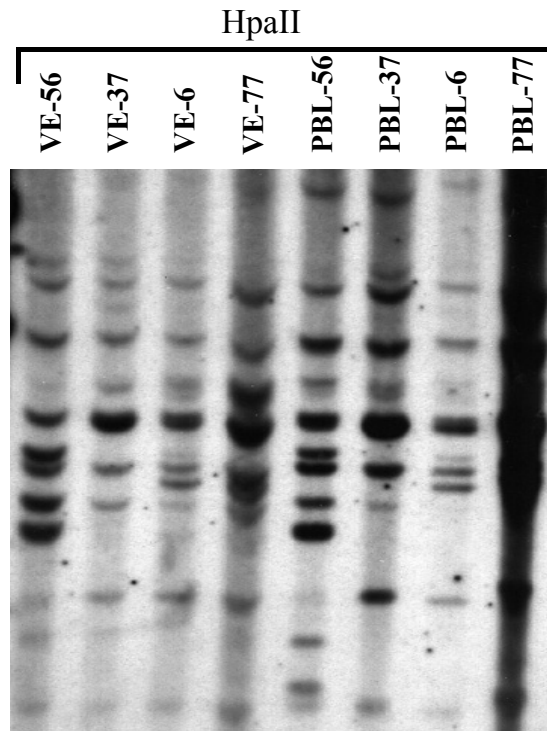


Figura 9. Digestión con endonucleasas de restricción sensibles a metilación y revelado de la región de HLA con sonda específica de locus A en tumores de vejiga. Podemos comprobar que no se observan diferencias entre los tumores (4 primeras calles) y los linfocitos autólogos (PBL).

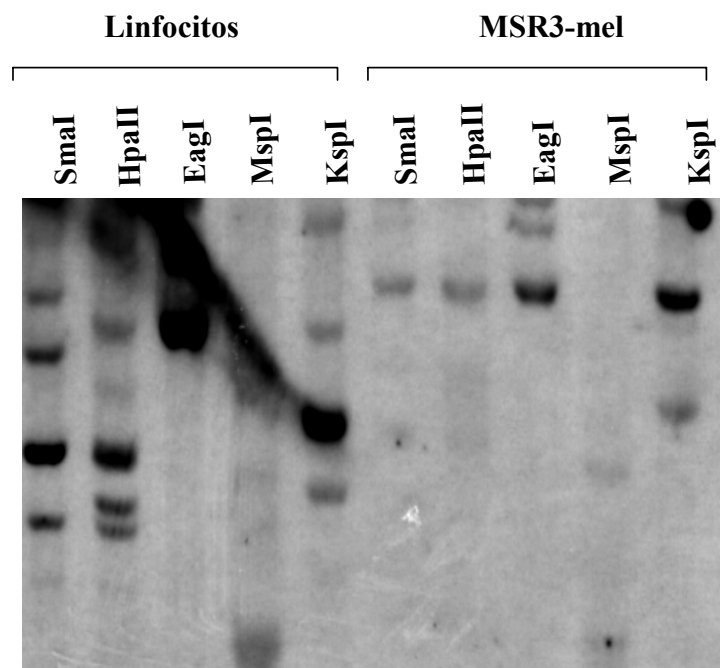


Figura 10. Ejemplo de hipermetilación de la región HLA-A en una línea de melanoma. Como podemos comprobar, en la línea tumoral el número de bandas es menor ya que la hipermetilación impide la actuación de la endonucleasa de restricción sensible a metilación.

**TABLA 10. ESTUDIO DE INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES,
MUTACIONES EN β 2M E HIPERMETILACIÓN**

| Caso | Inestabilidad microsatélite | Mutaciones en β2m | Hipermetilación de HLA |
|--------------|--|---|-----------------------------------|
| VE 4 | NEG | NEG | NEG |
| VE 6 | NEG | NEG | NEG |
| VE 18 | NEG | NEG | NEG |
| VE 22 | NEG | NEG | NEG |
| VE 33 | NEG | NEG | NEG |
| VE 37 | NEG | NEG | NEG |
| V3 41 | NEG | NEG | NEG |
| VE 52 | NEG | NEG | NEG |
| VE 56 | NEG | NEG | NEG |
| VE 77 | NEG | NEG | NEG |
| VE 80 | NEG | NEG | NEG |

NEG: negativo.

1.3.3. CUANTIFICACIÓN DE NIVELES DE TRANSCRIPCIÓN DE LOS GENES DE MOLÉCULAS DEL COMPLEJO HLA DE CLASE I Y DE LA MAQUINARIA DE PROCESAMIENTO ANTIGÉNICO

Puesto que en los estudios hasta ahora descritos no habíamos encontrado un mecanismo que justificase la pérdida de expresión de HLA de clase I en nuestros casos, decidimos comprobar si la pérdida de expresión en superficie se debía a defectos de transcripción de genes involucrados. Para este estudio se realizó microdissección de nidos tumorales, obtención de ADNc y PCR a tiempo real.

1.3.3.1. Genes de referencia y control

La cuantificación del nivel de transcripción del gen de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa tiene como finalidad corregir diferencias entre muestras debidas a variaciones en la cantidad de ARN obtenida en los distintos tumores, al usar el número de copias de este gen de referencia como factor de corrección. Los resultados iniciales al cuantificar el grado de ARNm de un gen se obtienen en copias por microlitro, al dividir por el número de copias del gen de referencia, obtenemos el resultado como número de copias de ARNm del gen estudiado por copia de ARNm del gen de referencia. El gen de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, como ya se mencionó en material y métodos, es un gen de expresión constante y proporcional a la cantidad de ARN que había en la muestra. No está involucrado en la maquinaria del procesamiento antigénico y su pérdida haría inviable a la célula. Como gen de control se usó la beta actina, este gen tampoco está involucrado en el procesamiento antigénico.

Los niveles de expresión obtenidos en los dos grupos de tumores no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de G6PDH ($p = 0,29$), lo que nos indica que la calidad y cantidad del ARN obtenido en los dos grupos es similar. Así mismo, tampoco se hallaron diferencias en la expresión de beta actina, esto nos sirve como control, ya que un gen no involucrado en la maquinaria del procesamiento antigénico no debería dar distintos niveles de expresión en los dos grupos estudiados y de hecho, no encontramos diferencias ($p = 0,78$).

1.3.3.2. Genes involucrados en el procesamiento y presentación antigénica mediada por moléculas HLA de clase I.

El número de copias de ARNm de genes involucrados en el procesamiento y presentación antigénica (beta2-microglobulina, cadena pesada HLA, tapasina , TAP-1, TAP-2, LMP-2 y LMP-7) se corrigieron para hacerlas relativas a la expresión de G6PDH, como hemos comentado. Los resultados obtenidos se reflejan en las figuras 11 a 17. El eje de abscisas refleja el número de copias de ARNm de la molécula estudiada por cada copia de ARNm del gen de la G6PHD. En la tabla 9 se recogen todos los valores que obtuvimos.

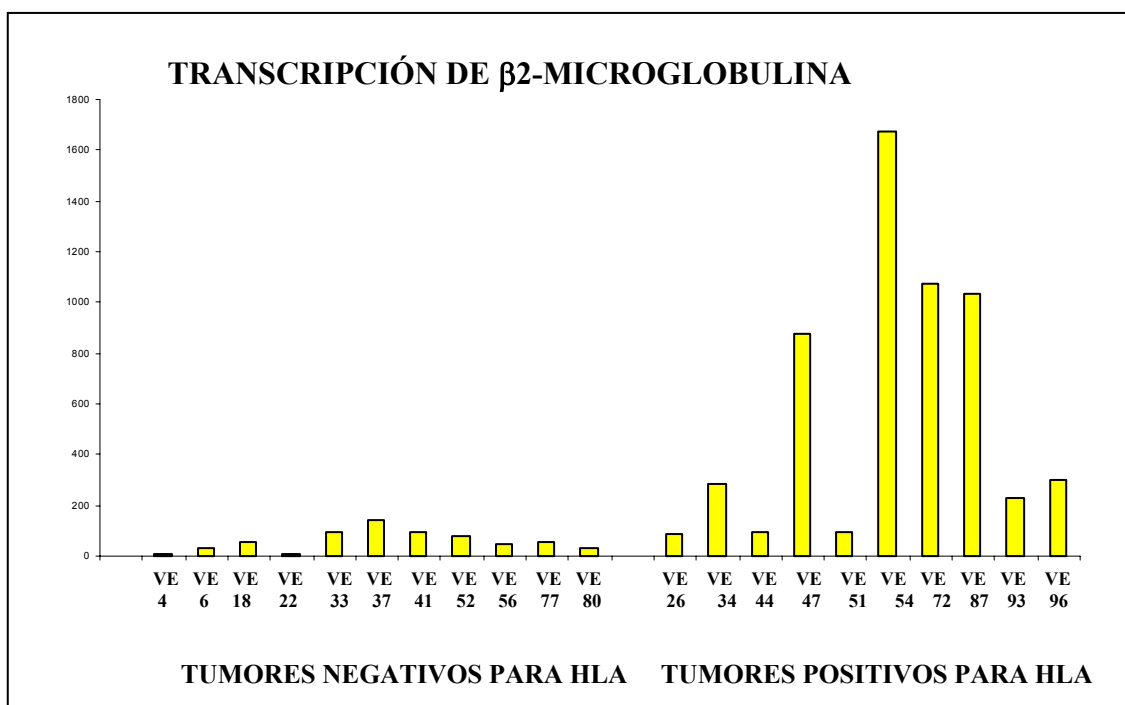


Figura 11. Niveles transcripcionales de beta2-microglobulina

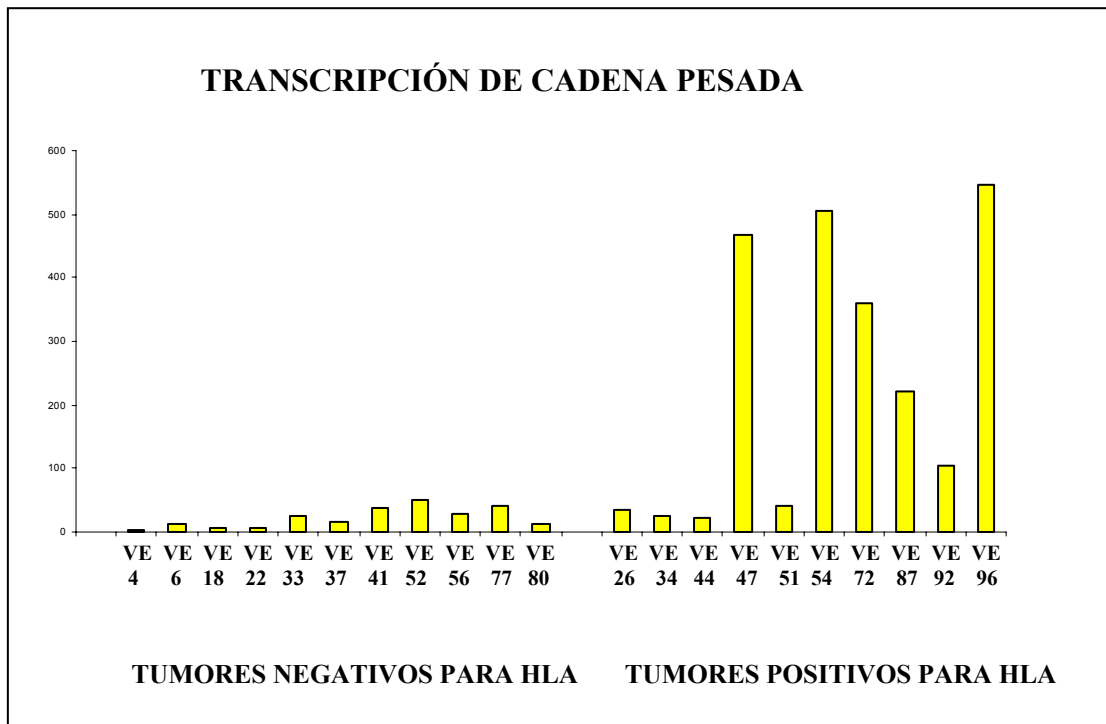


Figura 12. Niveles transcripcionales de cadena pesada de HLA de clase I

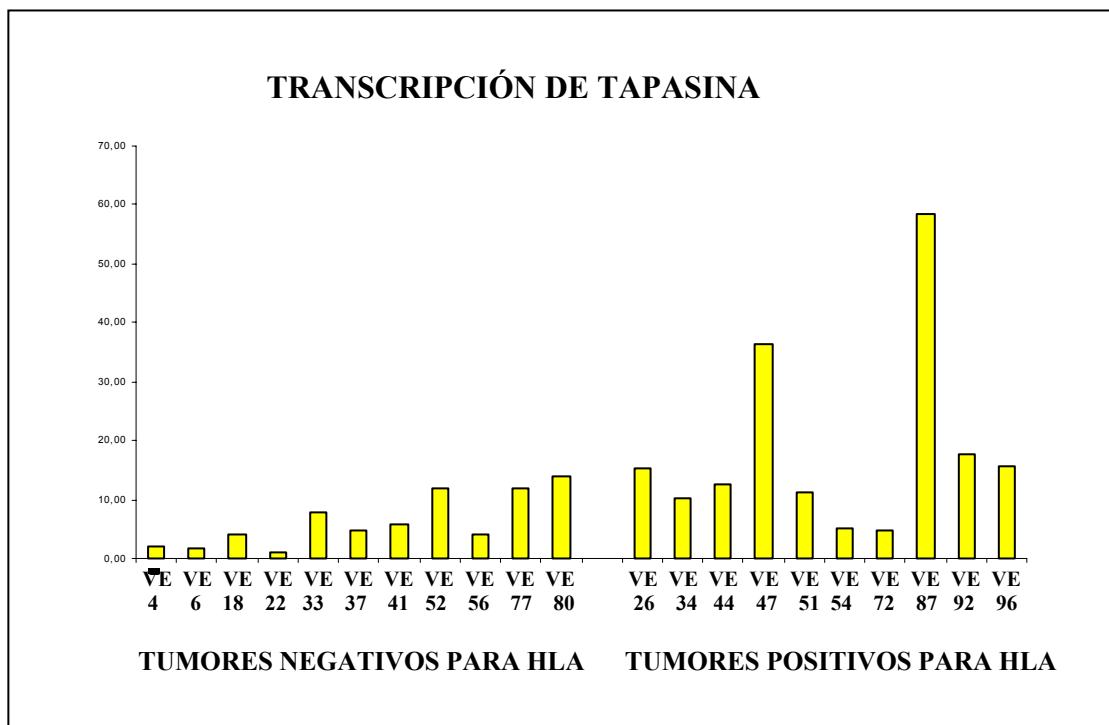


Figura 13. Niveles transcripcionales de tapasina.

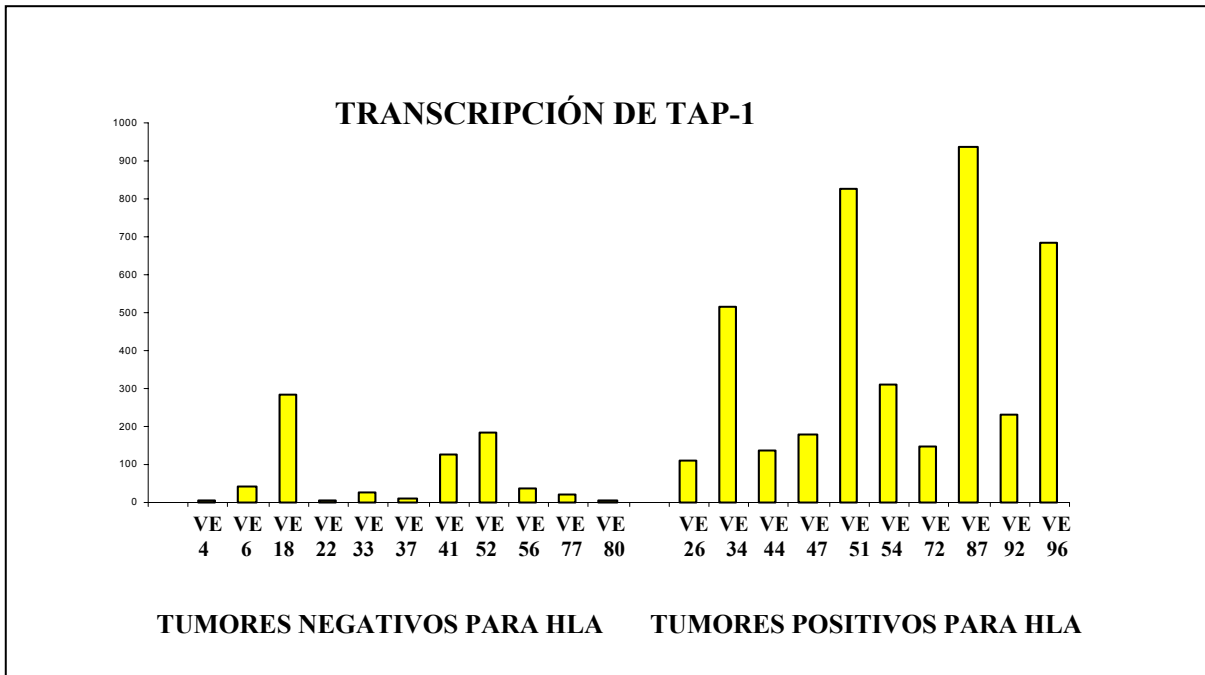


Figura 14. Niveles transcripcionales de TAP-1

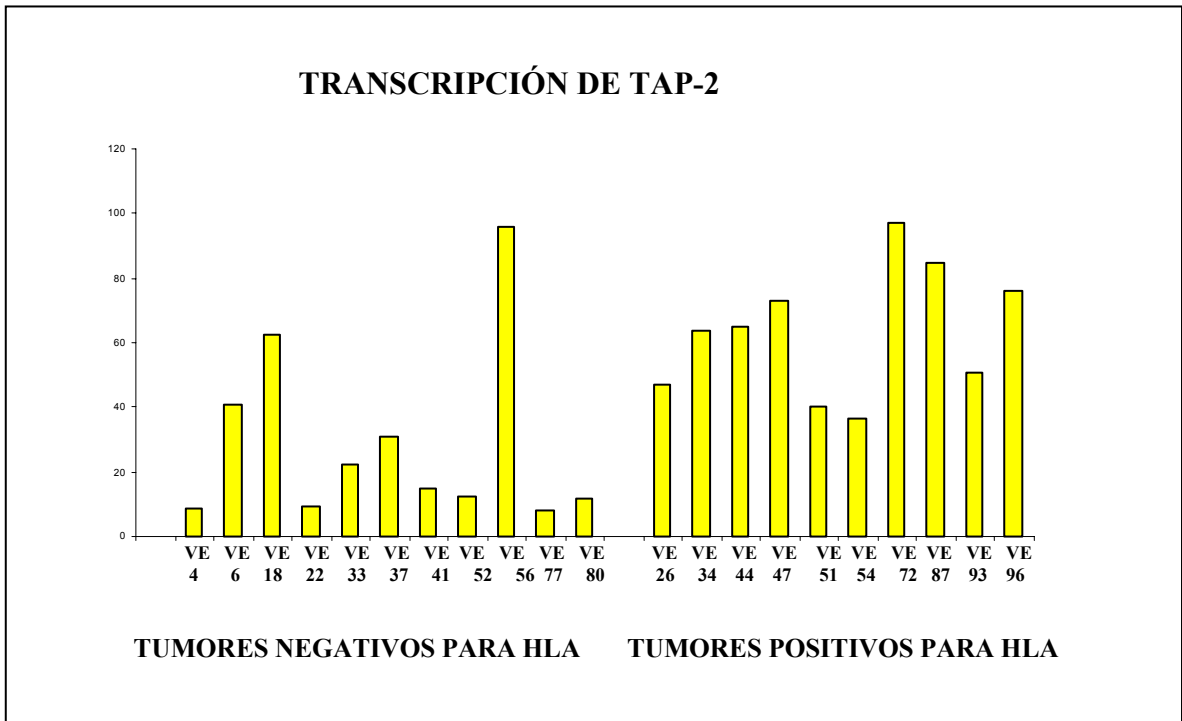


Figura 15. Niveles transcripcionales de TAP-2

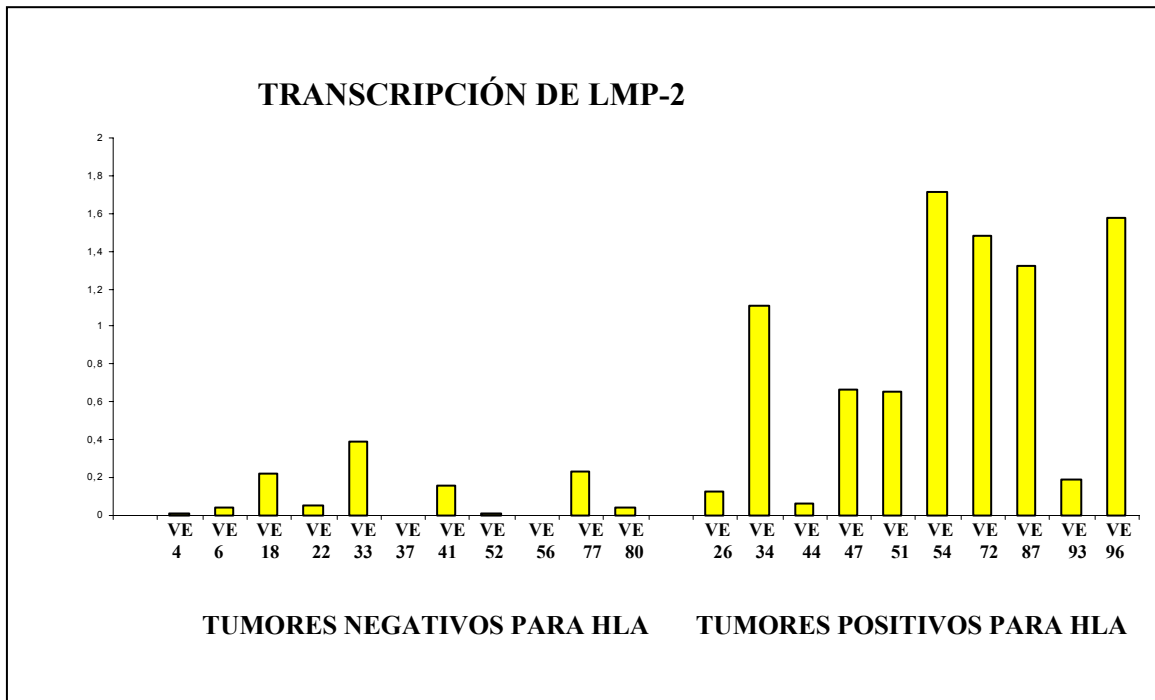


Figura 16. Niveles transcripcionales de LMP-2

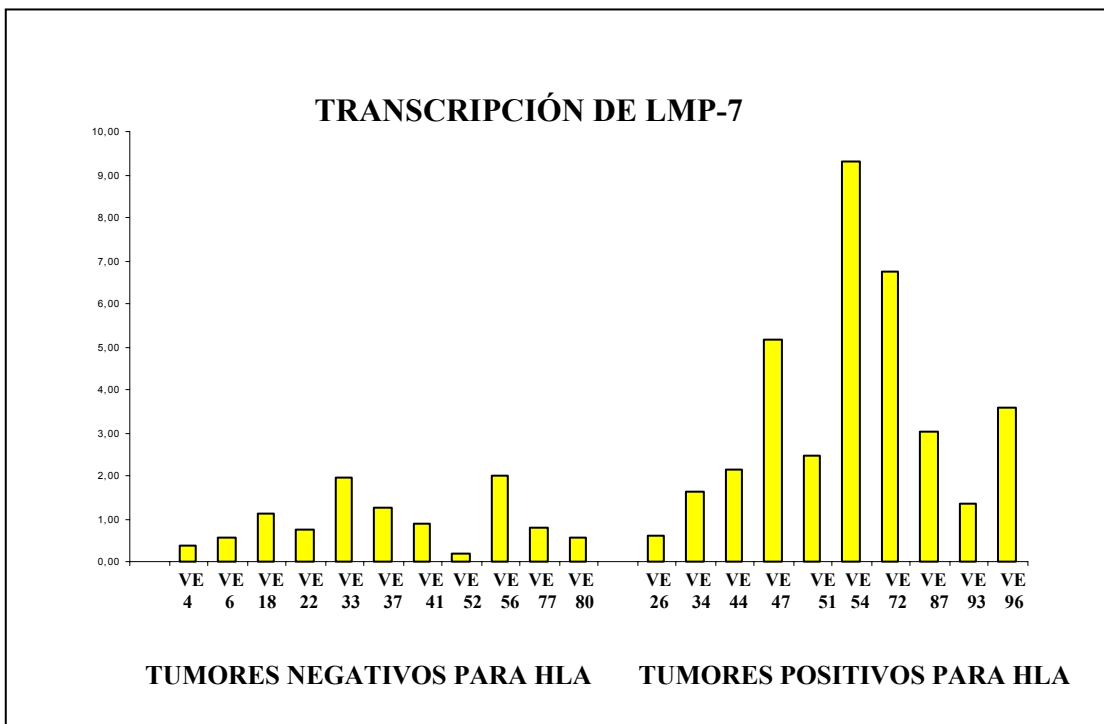


Figura 17. Niveles transcripcionales de LMP-7

TABLA 11. RESUMEN DE LOS NIVELES TRANSCRIPCIONALES DE COMPONENTES DE LA MAQUINARIA DEL PROCESAMIENTO ANTIGÉNICO.

| TUMOR | β2m / GPDH | Cad pes / GPDH | tapasina / GPDH | TAP 1 / GPDH | TAP-2 / GPDH | LMP-2 / GPDH | LMP-7 / GPDH |
|--------------------------------------|------------|----------------|-----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Tumores HLA clase I negativos | | | | | | | |
| VE-04 | 9 | 4,6 | 2,08 | 7,2 | 8,4 | 0,01 | 0,37 |
| VE-06 | 33 | 13,7 | 1,69 | 44,5 | 41,1 | 0,04 | 0,54 |
| VE-18 | 56 | 6,6 | 4,11 | 282,3 | 62,3 | 0,22 | 1,14 |
| VE-22 | 7 | 7,3 | 1,03 | 5,8 | 9,2 | 0,06 | 0,72 |
| VE-33 | 98 | 26,7 | 7,71 | 27,7 | 22,4 | 0,39 | 1,95 |
| VE-37 | 145 | 17,3 | 4,92 | 10,6 | 30,8 | 0,00 | 1,25 |
| VE-41 | 92 | 37,5 | 5,76 | 128,9 | 15,1 | 0,16 | 0,89 |
| VE-52 | 82 | 51,6 | 11,76 | 183,1 | 12,3 | 0,01 | 0,21 |
| VE-56 | 44 | 29,6 | 4,07 | 35,0 | 95,9 | 0,00 | 2,02 |
| VE-77 | 58 | 42,4 | 11,89 | 21,1 | 7,8 | 0,24 | 0,81 |
| VE-80 | 29 | 12,4 | 14,05 | 7,8 | 11,5 | 0,04 | 0,54 |
| Tumores HLA clase I positivos | | | | | | | |
| VE-26 | 84 | 34,3 | 15,44 | 110,6 | 47,0 | 0,13 | 0,60 |
| VE-34 | 285 | 26,3 | 10,33 | 514,8 | 63,6 | 1,12 | 1,63 |
| VE-44 | 94 | 21,0 | 12,47 | 137,8 | 65,2 | 0,07 | 2,15 |
| VE-47 | 879 | 467,9 | 36,25 | 176,3 | 73,3 | 0,67 | 5,17 |
| VE-51 | 93 | 40,5 | 11,12 | 825,9 | 40,3 | 0,66 | 2,45 |
| VE-54 | 1671 | 505,7 | 5,06 | 311,7 | 36,8 | 1,72 | 9,30 |
| VE-72 | 1073 | 361,2 | 4,82 | 146,6 | 97,1 | 1,48 | 6,73 |
| VE-87 | 1036 | 219,8 | 58,55 | 935,5 | 85,0 | 1,32 | 3,02 |
| VE-93 | 230 | 105,4 | 17,62 | 231,9 | 50,6 | 0,19 | 1,37 |
| VE-96 | 301 | 545,7 | 15,63 | 685,5 | 76,3 | 1,58 | 3,58 |

1.3.3.3. Análisis de los resultados

1.3.3.3.1. Especificidad de los amplificadores.

La especificidad de los resultados se comprobó de distinta manera según el método de detección empleado. En el caso de empleo de sondas específicas para la detección del amplificado, como es el caso de la GPDH, β 2m y cadena pesada de HLA, sólo se detecta señal de amplificación cuando está el transcrito específico, de todas formas, las muestras fueron analizadas en gel de agarosa. Para comprobar la especificidad del amplificado cuando se emplea SYBR green I hemos de realizar el análisis de las curvas de fusión (ver fundamento en material y métodos). También realizamos el análisis en gel de agarosa, como se muestra en la figura 18.

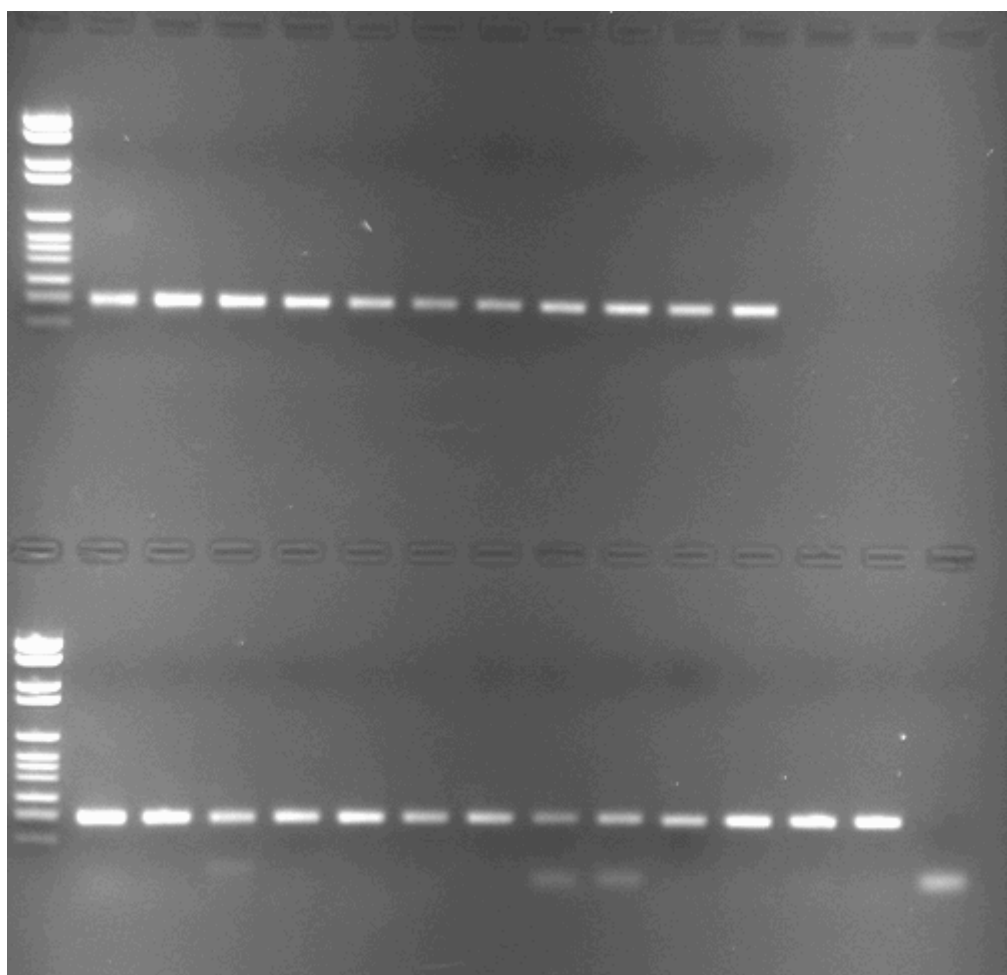


Figura 18. Análisis en gel de la amplificación de TAP-2. En la primera fila están los casos negativos para HLA de clase I en el mismo orden que las gráficas y en la segunda los casos positivos, tres calibradores (20, 200 y 2000 copias/ μ l) y el control negativo.

1.3.3.3.2. Análisis estadístico de los resultados.

En el análisis estadístico de los resultados se empleó el test de Mann-Witney, este test no paramétrico nos indica si existen diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos comparados en los niveles transcripcionales de los distintos genes estudiados. Los resultados obtenidos nos indicaron que sí existían diferencias entre el grado de transcripción de los genes involucrados en el procesamiento y presentación antigénica mediada por moléculas HLA de clase I, siendo el nivel transcripcional mayor en los tumores que se detectó expresión de HLA de clase I en superficie mediante inmunohistoquímica. No se encontraron diferencias en el gen de referencia (G6PDH) ni en el de control (beta-actina). Los resultados del test de Mann-Witney se reflejan en la tabla 10.

También comprobamos diferencias en grado y estadio entre los dos grupos, para comprobar si existía asociación entre estos dos parámetros y la baja regulación de moléculas de HLA de clase I, el análisis demostró que no existían diferencias en grado de diferenciación ($p = 0,53$) ni en estadio ($p = 0,69$) entre los dos grupos de tumores.

Tabla 12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DIFERENCIAS TRANSCRIPCIONALES.

| Gen estudiado | Valor de p |
|---------------------------|-------------------|
| Cadena pesada HLA clase I | 0.003 |
| Beta2-microglobulina | 0.002 |
| Tapasina | 0.009 |
| TAP-1 | 0.002 |
| TAP-2 | 0.005 |
| LMP-2 | 0.001 |
| LMP-7 | 0.001 |
| Beta-actina | 0.78 |
| G6PDH | 0.29 |

Valores de $p < 0,05$ indican diferencias de expresión estadísticamente significativas entre el grupo de tumores positivos y el grupo de tumores negativos para HLA de clase I, para un intervalo de confianza del 95%

2. IMPLICACIONES PRONÓSTICAS DE LAS ALTERACIONES DE EXPRESIÓN DE HLA DE CLASE I

Las moléculas HLA de clase I juegan un papel crucial en el reconocimiento de antígenos tumorales y en la regulación de la respuesta citolítica de las células NK, por lo que nuestro siguiente paso fue comprobar en qué modo estas alteraciones se relacionan con las características del tumor y la evolución de los pacientes. Como se especifica en material y métodos, los tumores se distribuyeron en tres grupos. La intención al realizar estos tres grupos es establecer una división que nos permita distinguir entre tumores con un distinto comportamiento inmunológico.

En el primer grupo se incluyeron los tumores en los que no encontramos alteraciones en HLA de clase I, estos tumores serían susceptibles de expresar antígenos tumorales y ser atacados por linfocitos T citotóxicos. El segundo grupo contiene los tumores con alteraciones parciales en HLA de clase I, estos tumores pueden retener o perder las moléculas HLA de clase I adecuadas para inhibir la lisis mediada por células NK y haber perdido las moléculas HLA de clase I que puedan presentar un péptido antigénico inmunógeno a los CTLs. El tercer grupo engloba a los tumores con una baja expresión generalizada de moléculas HLA de clase I, este grupo evadiría las respuestas específicas mediadas por CTLs pero sería susceptible de control inmunológico a través de células NK.

Los parámetros clínico-patológicos estudiados fueron progresión, recidiva, metástasis, infiltración local de ganglios linfáticos, tamaño tumoral, grado tumoral, estadio tumoral y grado de infiltración linfocitaria del tumor. Las características de cada tumor se muestran en la tabla 13 (ver Tabla 1 de material y métodos para descripción detallada de los parámetros que no se reflejan), como podemos observar, hemos conservado el caso VE-94 a pesar de que no se pudo determinar si tenía LOH por ser muy infiltrado, el motivo es que el tumor muestra alteraciones parciales de expresión de HLA por inmunohistoquímica y el grupo en el que se encasilla no va a variar por tener o no tener LOH.

Tabla 13 : ALTERACIONES DE EXPRESIÓN DE HLA DE CLASE I, CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS Y CLÍNICAS EN 70 TUMORES DE VEJIGA.

| <i>Tumor</i> | <i>T</i> | <i>N</i> | <i>M</i> | <i>Grado</i> | <i>EXPRESIÓN HLA</i> | <i>PROGRESIÓN</i> | <i>RECIDIVA</i> |
|--------------|----------|----------|----------|--------------|----------------------|-------------------|-----------------|
| VE-003 | a | 0 | 0 | 2 | FENOTIPO II | NO | NO |
| VE-004 | 3 | X | X | 3 | FENOTIPO I | NO | NO |
| VE-005 | a | 0 | 0 | 2 | CLASE I POSITIVO | NO | NO |
| VE-006 | 3 | 0 | 0 | 3 | FENOTIPO I | NO | NO |
| VE-008 | 2 | X | X | 2 | CLASE I POSITIVO | NO | NO |
| VE-009 | 2 | X | X | 2 | FENOTIPO I | NO | NO |
| VE-010 | a | 0 | 0 | 2 | FENOTIPO IV | NO | SÍ |
| VE-011 | 1 | 0 | 0 | 2 | FENOTIPO V | NO | SÍ |
| VE-012 | 1 | 0 | 0 | 2 | FENOTIPO I | NO | SÍ |
| VE-013 | a | 0 | 0 | 2 | FENOTIPO I | NO | NO |
| VE-017 | 3 | 0 | 0 | 3 | FENOTIPO II | NO | NO |
| VE-018 | 3 | 0 | 0 | 3 | FENOTIPO I | NO | NO |
| VE-021 | 2 | 0 | 0 | 1 | FENOTIPO II | NO | NO |
| VE-022 | 2 | 0 | 0 | 2 | FENOTIPO I | NO | NO |
| VE-023 | 1 | 0 | 0 | 2 | FENOTIPO II | NO | SÍ |
| VE-024 | 1 | 0 | 0 | 2 | FENOTIPO II | SÍ | SÍ |
| VE-025 | 1 | 0 | 0 | 2 | FENOTIPO IV | NO | SÍ |
| VE-026 | 4 | X | X | 2 | CLASE I POSITIVO | SÍ | NO |
| VE-027 | 3 | 0 | 0 | 3 | CLASE I POSITIVO | SÍ | SÍ |
| VE-030 | a | 0 | 0 | 3 | CLASE I POSITIVO | SÍ | SÍ |
| VE-031 | 2 | X | X | 3 | FENOTIPO II | SÍ | SÍ |
| VE-033 | a | 0 | 0 | 2 | FENOTIPO I | NO | SÍ |
| VE-034 | 3 | 1 | 0 | 2 | CLASE I POSITIVO | NO | NO |
| VE-035 | a | 0 | 0 | 2 | FENOTIPO IV | SÍ | SÍ |
| VE-036 | 1 | 0 | 0 | 2 | FENOTIPO II | SÍ | SÍ |
| VE-037 | 1 | 0 | 0 | 2 | FENOTIPO I | NO | NO |
| VE-038 | 2 | 0 | 0 | 3 | FENOTIPO IV | NO | NO |
| VE-039 | a | 0 | 0 | 2 | FENOTIPO II | NO | SÍ |
| VE-041 | 3 | 1 | 1 | 3 | FENOTIPO I | NO | NO |
| VE-043 | 2 | 0 | 0 | 3 | FENOTIPO V | SÍ | SÍ |
| VE-044 | 1 | 0 | 0 | 2 | CLASE I POSITIVO | NO | SÍ |
| VE-046 | 3 | 1 | 0 | 2 | CLASE I POSITIVO | NO | NO |
| VE-047 | 2 | 3 | 0 | 3 | CLASE I POSITIVO | NO | NO |
| VE-050 | 2 | 0 | 0 | 3 | CLASE I POSITIVO | SÍ | NO |
| VE-051 | 3 | 0 | 1 | 3 | CLASE I POSITIVO | NO | NO |
| VE-052 | 1 | 0 | 0 | 2 | FENOTIPO I | NO | NO |
| VE-054 | 1 | 0 | 0 | 2 | CLASE I POSITIVO | NO | NO |
| VE-055 | a | 0 | 0 | 1 | FENOTIPO I | NO | SÍ |
| VE-056 | 1 | 0 | 0 | 2 | FENOTIPO I | NO | SÍ |
| VE-058 | a | 0 | 0 | 2 | FENOTIPO V | SÍ | SÍ |
| VE-060 | 2 | 0 | 0 | 3 | FENOTIPO V | NO | NO |

| <i>Tumor</i> | <i>T</i> | <i>N</i> | <i>M</i> | <i>Grado</i> | <i>EXPRESIÓN HLA</i> | <i>PROGRESIÓN</i> | <i>RECIDIVA</i> |
|--------------|----------|----------|----------|--------------|----------------------|-------------------|-----------------|
| VE-061 | 1 | 0 | 0 | 3 | FENOTIPO V | NO | SÍ |
| VE-062 | a | 0 | 0 | 2 | FENOTIPO III | NO | NO |
| VE-063 | 2 | X | X | | FENOTIPO II | NO | NO |
| VE-067 | 3 | 3 | 0 | 3 | FENOTIPO V | SÍ | NO |
| VE-068 | 3 | 1 | X | 3 | FENOTIPO III | NO | NO |
| VE-069 | 2 | 1 | 0 | 2 | FENOTIPO I | NO | NO |
| VE-071 | a | 0 | 0 | 2 | CLASE I POSITIVO | NO | NO |
| VE-072 | X | X | X | X | CLASE I POSITIVO | NO | NO |
| VE-075 | a | 0 | 0 | 2 | FENOTIPO IV | NO | SÍ |
| VE-076 | 2 | | | 2 | FENOTIPO IV | SÍ | SÍ |
| VE-078 | 1 | 0 | 0 | 2 | FENOTIPO I | NO | NO |
| VE-079 | a | 0 | 0 | 2 | FENOTIPO II | SÍ | SÍ |
| VE-080 | a | 0 | 0 | 2 | FENOTIPO I | NO | NO |
| VE-081 | 2 | 0 | 0 | 2 | FENOTIPO II | NO | NO |
| VE-082 | a | 0 | 0 | 2 | FENOTIPO IV | NO | NO |
| VE-083 | 2 | 0 | 0 | 2 | FENOTIPO II | NO | NO |
| VE-084 | 2 | 0 | 0 | 3 | FENOTIPO V | NO | NO |
| VE-085 | 2 | 0 | 0 | 3 | FENOTIPO V | NO | NO |
| VE-086 | a | 0 | 0 | 2 | FENOTIPO III | SÍ | SÍ |
| VE-087 | 2 | 1 | 1 | 3 | CLASE I POSITIVO | NO | NO |
| VE-088 | 2 | X | X | 3 | FENOTIPO I | NO | NO |
| VE-089 | 2 | 0 | 0 | 2 | FENOTIPO V | SÍ | NO |
| VE-090 | X | X | X | X | FENOTIPO III | SÍ | SÍ |
| VE-091 | a | 0 | 0 | 2 | FENOTIPO III | NO | NO |
| VE-092 | a | 0 | 0 | 2 | FENOTIPO II | NO | SÍ |
| VE-093 | a | 1 | 0 | 2 | CLASE I POSITIVO | NO | NO |
| VE-094 | 3 | 0 | 0 | 3 | FENOTIPO II ó IV | SÍ | SÍ |
| VE-095 | a | 0 | 0 | 2 | FENOTIPO IV | NO | SÍ |
| VE-096 | 2 | 0 | 0 | 2 | CLASE I POSITIVO | SÍ | SÍ |

Fenotipo I: pérdida total de expresión de moléculas HLA-ABC. Fenotipo II: pérdida de un haplotipo. Fenotipo III: pérdida de un locus. Fenotipo IV: pérdida de un alelo. Fenotipo V: fenotipo compuesto.

El análisis estadístico de los datos mostró significación estadística para la recidiva tumoral ($p = 0,010$). Debido a que el número de casos de algunos de los grupos en los que se subdividen los casos al hacer el análisis estadístico es bajo, no pudimos determinar significación estadística con progresión, metástasis a distancia y metástasis ganglionar pues el análisis sólo resultó plenamente fiable para el estudio de la recidiva; un futuro aumento del tamaño muestral permitirá un adecuado estudio de estas relaciones.

En la figura 19 vemos la representación gráfica de los tumores que recidivan según su expresión de HLA de clase I, como podemos ver una mayor tendencia a la recidiva de los tumores con alteraciones parciales en la expresión de HLA de clase I (recidivan 21 de 37). Los tumores con pérdida total y sin alteraciones muestran una frecuencia menor de recidiva (4 de 17 y 3 de 16 respectivamente).

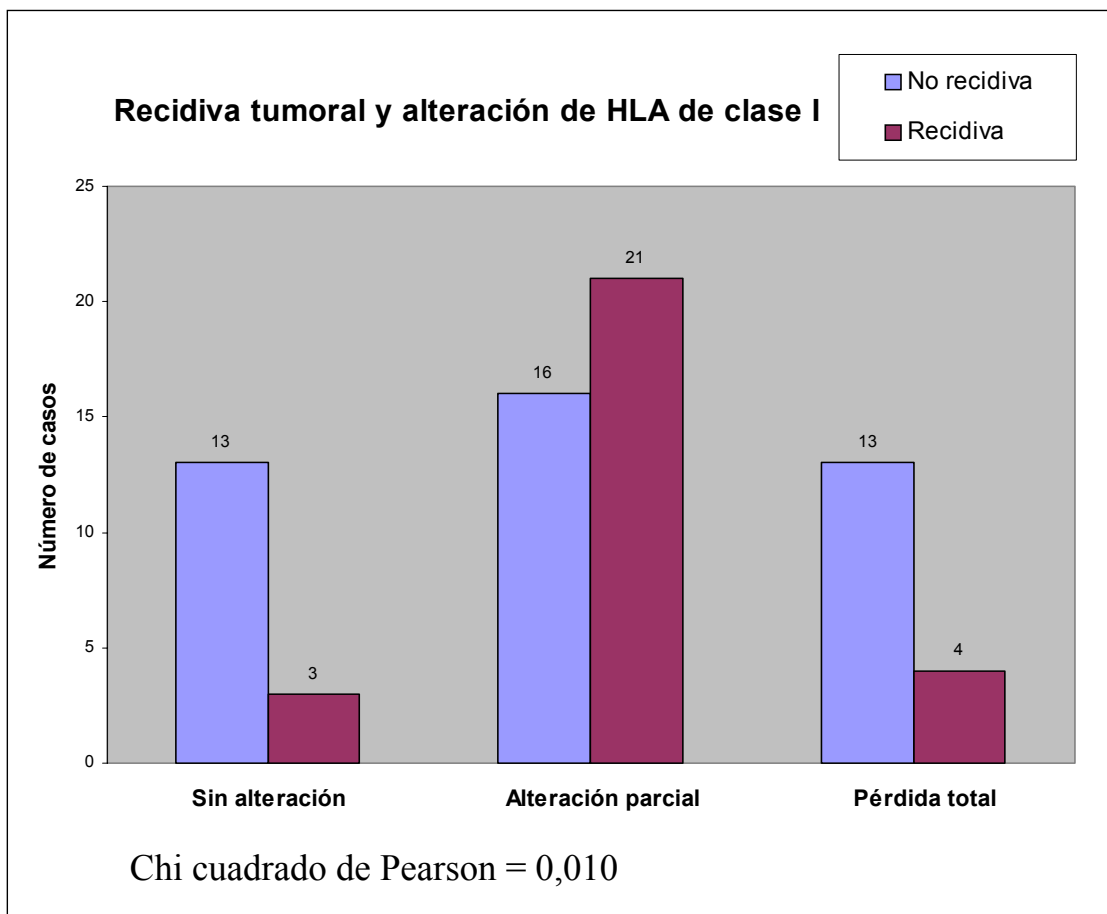


Figura 19. Relación entre recidiva y alteración HLA de clase I.

DISCUSIÓN

1. Introducción

La finalidad del presente estudio es la de caracterizar las alteraciones de HLA de clase I en 70 tumores de vejiga. El papel de estas moléculas es crucial en la interacción del tumor con linfocitos T capaces de producir lisis específica de células tumorales, por reconocimiento de un péptido tumoral cargado en un alelo HLA específico (Coulie et al., 2001; Gueguen et al., 1998; Karanikas et al., 2001; Baurain et al., 2000). Las moléculas de HLA de clase I también interaccionan con células NK, que pueden reconocer pérdidas de expresión de estas moléculas (Karre, 2002).

Las células tumorales con alteraciones en la expresión de moléculas HLA de clase I pueden tener ventajas en su desarrollo. Así, la pérdida del alelo HLA de clase I que presenta un antígeno tumoral evitará la lisis específica por linfocitos T citotóxicos. También una baja expresión de moléculas HLA de clase I puede proporcionar ventajas a un tumor pues puede disminuir lo suficiente la presentación del antígeno tumoral como para no provocar respuesta citotóxica, pero además, esta expresión baja puede ser suficiente como para evitar la lisis mediada por células NK (Algarra et al., 1999).

Nuestro objetivo ha sido definir los mecanismos subyacentes en las alteraciones HLA de clase I en tumores de vejiga y así facilitar el camino para conseguir su reparación con fines inmunoterapéuticos. Un mismo patrón de expresión fenotípica de HLA de clase I podemos hallarlo en distintos tumores, pero no necesariamente el mecanismo molecular subyacente tiene por qué ser el mismo; por tanto, las medidas correctoras para restablecer la expresión de estas moléculas serán distintas en función del mecanismo por el que se han producido. Así por ejemplo, se ha descrito que tumores con ausencia generalizada de expresión de HLA de clase I son causados tanto por mutaciones en los genes de la $\beta 2m$ como por ausencia de transcripción de la cadena pesada de HLA, causada por hipermetilación de la región HLA (Benitez et al., 1998; Browning et al., 1996; Serrano et al., 2001). También alteraciones en la producción, ensamblaje o transporte del péptido antigénico pueden causar ausencia total de expresión de estas moléculas en la superficie celular (Sanda et al., 1995; Seliger et al., 2000), como más adelante comentaremos con mayor profundidad.

2. Inmunohistoquímica y pérdida de heterocigosidad.

En el presente trabajo se han analizado una serie de tumores en los que ya se había realizado el estudio inmunohistoquímico de las pérdidas de HLA de clase I (Cabrera et al., 2003). Los anticuerpos monoclonales usados en cada tumor se seleccionan en función del tipaje HLA de clase I del paciente, realizado en linfocitos autólogos y del panel de anticuerpos monoclonales disponible (Cabrera et al., 1996). El panel de anticuerpos empleado detecta los tumores con pérdida generalizada expresión de moléculas HLA de clase I de forma adecuada.

La detección de pérdida de expresión de locus A y B es también adecuada (Spear et al., 1985; Lozano et al., 1989; Burrone et al., 1985). Para el locus B se emplearon también otros dos anticuerpos que proporcionan valiosa información, uno frente a la especificidad común Bw4 y otro frente a Bw6.

Para la investigación de alteraciones del locus C no se han desarrollado anticuerpos específicos que funcionen adecuadamente en inmunohistoquímica, por lo que sólo podemos aseverar la pérdida del locus C en los tumores que presentan pérdida generalizada de moléculas HLA de clase I (fenotipo I). La pérdida del locus C puede ser importante en el control inmunológico del tumor, ya que buena parte de los receptores inhibidores NK tienen sus ligandos HLA de clase I en moléculas de este locus (Moretta and Moretta, 1997; Farag et al., 2002).

En el estudio de pérdidas alélicas se emplearon anticuerpos capaces de reconocer los alelos A2, A3, A23, A24, A28, A30 y A31 y los alelos B7, B8, B13, B44 y B45; para algunos alelos se dispone de 2 anticuerpos, por lo que aumenta la fiabilidad de la detección de su pérdida. Los alelos B pudieron ser estudiados de forma más precisa al combinar el estudio los resultados obtenidos con los anticuerpos que reconocen HLA-Bw4 y HLA-Bw6.

Con el objeto de conocer más acerca de las alteraciones en HLA decidimos realizar el estudio de pérdida de heterocigosidad (LOH) en cromosomas 6 (HLA) y 15 ($\beta 2m$). La relevancia de la detección de LOH en la región de HLA reside en que la pérdida de un

haplotipo elimina tres alelos de clase I que podían estar presentando un péptido inmunógeno, facilitando así el escape tumoral(García-Lora et al., 2003; Campoli et al., 2002; Restifo et al., 2002). La carencia de anticuerpos monoclonales específicos para todos los alelos HLA de clase I ocasiona que en muchos casos el fenotipo II no pueda definirse correctamente por inmunohistoquímica, determinándose otro fenotipo de forma errónea. Así por ejemplo, un caso que haya perdido un haplotipo HLA puede haber sido clasificado de distintas formas según el tipaje HLA del paciente. Si no tuviésemos anticuerpos frente a ningún alelo perdido, el tumor habría sido clasificado sin alteraciones. En el caso de determinar la pérdida de un alelo, sería clasificado como fenotipo IV y en el caso de poder determinar los dos alelos perdidos, habría sido clasificado como un posible fenotipo II porque tampoco podríamos excluir la posibilidad de la pérdida de un alelo en cada cromosoma. Por tanto, el estudio de LOH viene a mejorar la clasificación de los casos estudiados.

La relevancia de determinar LOH el gen de la $\beta 2m$ reside en que se ha descrito que este gen se inactiva mediante LOH de un alelo y otra mutación en el segundo alelo, por tanto, un tumor con LOH en un alelo posteriormente puede sufrir otra alteración y conducir a un fenotipo I(Benitez et al., 1998). Además, la presencia de un solo alelo funcional creemos que podría causar una menor expresión de HLA de clase I en superficie, ya que la cantidad de $\beta 2m$ disponible se reduce a la mitad, pudiendo incluso limitar la expresión de moléculas HLA no clásicas.

En nuestro trabajo encontramos un porcentaje de LOH en 6p21 del 36%, estudios de LOH en otras regiones cromosómicas en carcinomas de vejiga han arrojado distintos porcentajes de pérdida de heterocigosidad, siendo las frecuencias máximas obtenidas del 40 al 67%. Las frecuencias mayores de LOH se obtienen en el cromosoma 9, donde se estudia la presencia de genes reguladores del ciclo celular. La pérdida de heterocigosidad en cromosoma 9 se describe en cinco regiones, 9p21, 9q22, 9q31-32, 9q33 y 9q34; en el cromosoma 5 en cuatro regiones, 5q13.3-q22, 5q22-q31.1, 5q31.1-q32, y 5q34, y en el cromosoma 3 en las regiones 3p12-14, 3p21.3-22 y 3p24.2-25(Bohm et al., 2000; Erbersdobler et al., 1998; van Tilborg et al., 2002; Saran et al., 1996). Otros estudios de pérdida de heterocigosidad en 6p21 en tumores de diferente estirpe histológica y que utilizan un panel similar de microsatélites obtienen frecuencias de LOH similares o superiores, así en tumores colorectales la frecuencia encontrada fue del 40%(Maleno et al., 2004), en

carcinomas de laringe del 52%(Maleno et al., 2002), del 49% en tumores de cabeza y cuello(Feenstra et al., 2000) y del 50% en cáncer cervical(Koopman et al., 2000). Sin embargo, en tumores renales de células claras el porcentaje de LOH encontrado es menor, del 7%(Maleno et al., 2004). Las diferencias obtenidas en distintos tejidos ponen de manifiesto que la frecuencia de LOH en 6p21 depende del tipo de tumor.

En 15q, donde se localiza el gen de la $\beta 2m$, obtuvimos una frecuencia de LOH del 55%. Este porcentaje es mayor que el encontrado en tumores de laringe, donde se ha obtenido una frecuencia del 41% (Maleno et al., 2002) y mayor que en tumores de cabeza y cuello, donde se ha detectado una frecuencia del 40% en tumores con baja expresión de $\beta 2m$ y del 29% en casos con baja expresión de HLA de clase I(Feenstra et al., 2000). En nuestro estudio, los tumores con mayor frecuencia de LOH en $\beta 2m$ son los que han perdido un haplotipo HLA (11 de 12), seguidos de los tumores con pérdida total de expresión de HLA (10 de 16) y los tumores con alteraciones mixtas (6 de 9). Los tumores sin alteraciones en la expresión de HLA (6 de 13) y aquellos con expresión deficiente de un locus HLA de clase I (0 de 4) o de un alelo (3 de 10) son los que presentan menores frecuencias de pérdida de heterocigosidad en $\beta 2m$.

Los microsatélites empleados en el estudio de LOH en la región de HLA fueron 8, de los cuales 4 se sitúan dentro de la zona de genes de clase I, uno en la zona de genes de clase III y uno a cada lado de la región HLA(Maleno et al., 2004). El último microsatélite se sitúa en 6q24 y nos sirve para detectar pérdidas del cromosoma completo; con este panel, la región de HLA de clase I, de unas 4Mb de longitud, queda a nuestro juicio suficientemente estudiada.

En el caso de la $\beta 2m$ se emplearon dos microsatélites, uno de los marcadores es centromérico y está muy próximo al gen, el otro microsatélite es telomérico y está algo más alejado. El tamaño del gen es de unas 6,7Kb (NCBI database); con dos microsatélites en principio sería suficiente, ya que para estudiar LOH en HLA empleamos 8 para una región mucho mayor, de 4Mb. Sin embargo, otros autores (Koene et al., 2004)han planteado dudas acerca de que el estudio de microsatélites en $\beta 2m$ sea representativo de pérdida de uno de los dos genes, dudas que a continuación vamos a analizar.

Estos autores han cuestionado el estudio de LOH en el gen de la $\beta 2m$ porque al realizar hibridación in situ con sondas para el centrómero del cromosoma 15 encontraron un alto índice de aneuploidía. Por esta aneuploidía se ha planteado que algunas LOH parciales por análisis de microsatélites pueden ser debidas a duplicaciones en el tumor de uno de los cromosomas, duplicaciones que provocarían un aumento de intensidad de la detección del alelo situado en ese cromosoma, produciéndose así un desequilibrio entre los dos alelos al comparar con DNA de linfocitos autólogos(Koene et al., 2004).

Incluso en LOH absolutas, según este razonamiento, podrían existir dos o más copias funcionales del gen de la $\beta 2m$, ya que el hecho de que se detecten 3 cromosomas 15 (por ejemplo) no descarta que se haya producido pérdida de uno de los dos originales y que el cromosoma restante por fenómenos de duplicación y no-disyunción haya originado los 3 cromosomas que se detectan; este fenómeno, no sería relevante si el gen es funcional, ya que tendríamos 3 copias de un gen sin polimorfismo. En la región de HLA no ocurre lo mismo, ya que se perdería uno de los haplotipos.

Sin embargo, como crítica a estos autores, hay que decir que la sonda que se emplea en este estudio es una sonda centromérica que puede no reflejar las alteraciones que se hayan producido en 15q21, que es donde está el gen de la $\beta 2m$; además, en estudios de hibridación genómica comparativa (HGC) no se ha encontrado ganancia génica en 15q en tumores vesicales(Hurst et al., 2004; Prat et al., 2001).

La misma duda podría plantearse en el cromosoma 6 para las LOH parciales aunque no para las totales, ya que por mucho que se duplique el cromosoma 6 remanente, la célula habrá perdido la mitad de sus alelos HLA. De hecho, estudios de HGC y estudios de cariotipo muestran alteraciones en 6p, con ganancia génica de esta zona; el estudio detallado por HGC ha acotado la zona de ganancia génica a 6p22.3, donde se han propuesto algunos genes como protoncogenes activadores del ciclo celular, ya que en los tumores con mayor grado de proliferación se ha demostrado una mayor amplificación génica de esta zona (Hurst et al., 2004; Prat et al., 2001; Tomovska et al., 2001; Bruch et al., 2000). Incluso asumiendo que la LOH parcial en algunos casos se deba a duplicaciones de un haplotipo HLA y no a deleciones del otro, este hecho puede seguir teniendo implicaciones biológicas, ya que la sobreexpresión de unos alelos en superficie puede enmascarar la presencia del antígeno

tumoral en un alelo con baja expresión y provocar en el sistema inmune una respuesta de anergia (Pardoll, 1999; Makki et al., 2002; Schreiber et al., 2002).

En nuestro estudio, tras realizar el estudio de LOH y de tipaje genómico, teniendo como base los resultados de expresión por inmunohistoquímica, clasificamos los tumores nuevamente. Con el uso de anticuerpos monoclonales se habían detectado un 72% de tumores con alteraciones en HLA de clase I (Cabrera et al., 2003). Al usar la técnica de microsatélites, el porcentaje aumentó al 77% porque se detectó LOH en tumores clasificados como no alterados por inmunohistología. Los tumores con fenotipo III pasaron de ser un 12% a un 7%, ya que al tener LOH, algunos pasaron al fenotipo V. Algunos tumores que por inmunohistoquímica se consideraron fenotipo IV fueron clasificados como fenotipo II, obteniéndose finalmente un 17% de tumores con fenotipo II y un 14% con fenotipo IV. En el fenotipo II también se incluyeron algunos casos en los que por inmunohistoquímica no se habían detectado alteraciones. Así por ejemplo, los casos VE-31 y VE-39, en los que sólo se había detectado la pérdida de un alelo, fueron clasificados como fenotipo II por tener LOH en 6p21 y casos como VE-35, VE-63 y VE-95 se mantuvieron como pérdidas alélicas ya que eran heterocigotos para 6p21. Otros casos como VE-17, VE-24 y VE-81 pasaron de ser considerados no alterados a estar incluidos en el fenotipo II, esto no contradice los datos inmunohistoquímicos, ya que faltaban anticuerpos HLA clase I alelo específicos para estudiar a fondo estos casos.

Estudios previos de alteraciones de expresión de HLA de clase I en tumores de vejiga encuentran porcentajes de alteraciones diferentes a los nuestros. Estos estudios utilizan un panel de anticuerpos más reducido, lo que origina que el porcentaje de alteraciones encontradas sea menor (Eryigit and Kirkali, 1990; Levin et al., 1991; Witjes et al., 1995). En otro trabajo, donde se emplea un mayor panel de anticuerpos, el porcentaje de alteraciones es más parecido al encontrado por nosotros (Oliver et al., 1989). En ninguno de estos trabajos se combina la técnica de inmunohistoquímica con la detección de LOH, por lo cual la clasificación es menos precisa y además no proporcionan información acerca del mecanismo que ha originado la pérdida de expresión de estas moléculas.

La aplicación conjunta de las técnicas de microsatélites y tipaje genómico nos permitió determinar los alelos con pérdida de expresión y el mecanismo molecular subyacente en estos casos con pérdida de haplotipo, donde la causa es estructural. Causas estructurales de pérdida de expresión de HLA de clase I implicarían estrategias terapéuticas distintas para conseguir la reexpresión de los alelos HLA que las empleadas si las alteraciones son debidas a mecanismos de regulación génica. Al tratarse de mecanismos reguladores, puede conseguirse la reexpresión de moléculas de HLA de clase I con tratamiento inmunoestimulador(Alexandroff et al., 1999), mientras que delecciones del ADN precisan de reconstrucción génica para conseguir la reexpresión(Nouri et al., 1994).

3. Mecanismos de pérdida generalizada de expresión de HLA de clase I.

Dentro de los tumores de vejiga, por inmunohistoquímica se definió un grupo que no presentaba reactividad para los anticuerpos que reconocen todas las moléculas de HLA de clase I (anticuerpos monomórficos). El estudio de tumores con este tipo de alteración de otras procedencias histológicas ha puesto de manifiesto que la causa no es siempre la misma y que incluso dentro de un tipo de tumor pueden existir distintas alteraciones genéticas que conduzcan a este fenotipo (Bicknell et al., 1996; Serrano et al., 2001; Cabrera et al., 2003).

3.1. Inestabilidad de microsatélites, mutaciones en $\beta 2m$ y metilación génica.

Una de las causas por las que se puede perder la expresión de HLA de clase I es por la falta de expresión de $\beta 2m$ asociada a mutaciones en el gen. Las mutaciones suelen aparecer en secuencias de repetición en los exones 1 y 2 (Bicknell et al., 1996; Yamamoto et al., 1999). Las mutaciones en secuencias repetitivas se han relacionado con alteraciones en enzimas que intervienen en la reparación del ADN, la falta de estas enzimas conduce a mutaciones características en las zonas de repetición del ADN, produciendo el llamado fenotipo mutador (Ionov et al., 1993).

Por tanto, el primer paso fue comprobar, mediante marcadores de microsatélites, si existía inestabilidad de microsatélites (MIN) en los tumores clasificados como fenotipo I. En nuestros casos no encontramos inestabilidad de microsatélites para TGF β RII ni para BAT26, dos marcadores que suelen encontrarse alterados cuando existen fallos en los mecanismos reparadores de bases mal apareadas en el ADN, ya que contienen secuencias de repetición de mononucleótidos propensas a sufrir apareamientos erróneos (Aaltonen et al., 1993).

Algunos autores han encontrado inestabilidad de microsatélites en tumores de vejiga (Linn et al., 1997; Christensen et al., 1998; Uchida et al., 1996), en alguno de estos estudios se engloba la LOH dentro de la inestabilidad de microsatélites, pero la LOH no es un fenómeno asociado a defectos de las enzimas encargadas de corregir errores de nucleótidos desapareados.

En general hay falta de uniformidad en los criterios y marcadores empleados para definir la inestabilidad de microsatélites; los resultados de nuestro estudio concuerdan con lo obtenido por otros autores que han utilizado el mismo tipo de marcadores (Bonnal et al., 2000).

Los trabajos citados sobre inestabilidad de microsatélites en tumores de vejiga muestran la existencia de distintos patrones de inestabilidad. Así, algunos tumores presentan un patrón de múltiples alelos mientras que otros sólo presentan una variación del peso molecular de uno de los alelos. Nuestra opinión es que no indica el mismo grado de inestabilidad la aparición de un patrón de múltiples bandas en el tumor cuando en ADN normal encontramos 2 (o picos si analizamos el amplificado por electroforesis capilar) que la aparición de un patrón de alguna banda adicional o un patrón de igual número de bandas en el ADN normal y tumoral pero a un peso molecular distinto en el ADN tumoral (Linn et al., 1997; Christensen et al., 1998; Uchida et al., 1996). En este contexto, el patrón de múltiples alelos sugiere la existencia de diferentes clones en el tumor mientras que la aparición de una única banda pero con diferente peso molecular indicaría la naturaleza monoclonal del tumor. Este último patrón es el que se ha detectado predominantemente en los tumores de vejiga. Esto nos indica que todas las células tumorales son monoclonales para la alteración y sugiere la existencia de una fase de inestabilidad en el ADN y una posterior estabilización que explicaría el que se mantenga la clonalidad del tumor para el marcador o marcadores alterados, a diferencia de lo que ocurre cuando se encuentra un patrón de bandas adicionales, ya que las células tumorales, al seguir siendo inestables, sufren nuevas alteraciones del marcador y se pierde la monoclonalidad.

Los resultados concuerdan con los obtenidos en el análisis de LOH con marcadores de microsatélite en 6p. En este estudio la aparición de MIN fue excepcional, únicamente el marcador C.1.2.5 en el caso VE 69, mostró un patrón de inestabilidad de microsatélites.

La falta de inestabilidad de microsatélites no excluye la posibilidad de mutaciones en el gen de la $\beta 2m$, por lo que pasamos a la siguiente fase del estudio, ya que aunque la mayoría de los tumores con mutaciones en $\beta 2m$ tienen el fenotipo MIN, se han encontrado también mutaciones puntuales que no se encuentran en la zona de microsatélites de la $\beta 2m$, y que por tanto no se asocian al fenotipo MIN (Benitez et al., 1998).

El siguiente paso fue comprobar la existencia del ARN mensajero del gen de la $\beta 2m$, lo que nos indicaría la existencia de transcripción del gen. Tras encontrar transcrito, sintetizar ADNc y realizar la secuenciación, comprobamos que la secuencia no estaba alterada en ninguno de los carcinomas de vejiga que presentan fenotipo I. Nuestros resultados coinciden con lo encontrado en tumores de laringe, mama y ovario (Fernandez et al., 2000; Feenstra et al., 1999; Bicknell et al., 1996). Basándonos en que no encontramos alteraciones en la secuenciación de nuestros casos, descartamos esta alteración en $\beta 2m$ como causa de la pérdida de expresión generalizada de moléculas HLA de clase I.

Un mecanismo implicado en la regulación de la transcripción génica es el de cambios epigenéticos en el ADN. Los fenómenos epigenéticos constituyen alteraciones que no involucran cambios en la estructura primaria del ADN (Laird, 1997). Un tipo de estos cambios es la metilación génica, que está asociada a la modulación de la expresión génica. El ADN hipermetilado es por lo general inactivo para la transcripción (Baylin, 1997) ya que se altera la estructura secundaria mediante un cambio conformacional del surco mayor del ADN, cambio que interfiere con la maquinaria transcripcional (Yan et al., 2001). También la hipometilación génica se ha relacionado con inhibición de la transcripción, como veremos más adelante.

Existen numerosos datos experimentales que implican a la metilación del ADN, específicamente en las regiones 5-CpG, en el control de la expresión génica y en el silenciamiento de genes (Zingg and Jones, 1997; Baylin et al., 1998; Holliday, 2005). En este contexto, los genes HLA de clase I se consideran regulados por metilación (Guillaudeux et al., 1995; Pontarotti et al., 1988).

Se han descrito patrones de metilación aberrante del ADN tumoral en varios genes incluyendo el gen supresor del retinoblastoma y la molécula $p16^{INK4a}$ que ocasiona la baja regulación de dichas moléculas en tumores (Jones, 1999). Estos patrones de metilación aberrante de las islas CpG descritos en un gran número de tumores son de naturaleza tumor específica y no al azar (Costello et al., 2000). La hipermetilación se ha señalado como responsable de la pérdida de expresión de moléculas HLA de clase I en carcinomas escamosos de esófago, en donde un 45% de los tumores analizados exhibían la

hipermetilación de los promotores de las moléculas HLA de clase I (Nie et al., 2001), esto también ha sido observado por nuestro grupo en células de melanoma (Serrano et al., 2001). La baja regulación de moléculas HLA de clase I también ha sido observada en estados de hipometilación génica presentes en células provenientes de sincitiotrofoblasto y en neuroblastoma; en los últimos, la pérdida del locus MEMO-1, un modificador de la metilación génica en la región del MHC, produce hipometilación en las regiones 5' y 3' de los genes HLA de clase I reduciendo su nivel de expresión (Cheng et al., 1996), aunque no está claro si tal mecanismo puede actuar también en las células normales de las que proviene. Estos resultados han sugerido la necesidad de un nivel de metilación basal para activar la transcripción de los genes HLA de clase I (Onno et al., 1997).

En el estudio de metilación de la región de HLA de clase I de los tumores de vejiga con fenotipo I no encontramos hipermetilación en ADN tumoral. Sin embargo, en otras zonas del ADN la hipermetilación sí parece jugar un papel importante en los tumores de vejiga, ya que se ha comprobado que este mecanismo participa en la silenciación de distintos genes supresores tumorales, como p16(INKA) y p14(ARF) (Marsit et al., 2005; Dulaimi et al., 2004).

Un ejemplo de nuestros resultados en los tumores de fenotipo I podemos verlo en las figuras 9 y 10 del apartado de resultados, donde se observa que los tumores muestran un patrón de metilación similar en el tumor que en linfocitos autólogos, a diferencia de las alteraciones observadas en una línea control de melanoma.

3.2. Descenso generalizado de la transcripción los genes de HLA de clase I y de la maquinaria de procesamiento antigénico.

En los estudios de inmunohistoquímica es difícil diferenciar entre una reacción negativa o débilmente positiva, que a veces puede deberse a artefactos de la reacción. El hecho de no encontrar mecanismos estructurales que explicasen la carencia de expresión de moléculas HLA de clase I, nos llevó a plantear la posibilidad de la implicación de un mecanismo regulador de la transcripción de genes relacionados con la expresión de HLA de

clase I como causa de este fenotipo en vejiga. De hecho, este tipo de mecanismo ya se había descrito en líneas tumorales humanas y de ratón (Johnsen et al., 1998; Seliger et al., 2000), donde se ha comprobado que otras moléculas no relacionadas o relacionadas pero no específicas de la expresión de moléculas HLA de clase I (PA, calnexin, calreticulina, ER60 y PDI) permanecen inalteradas o muy levemente afectadas.

Se ha propuesto el factor de transcripción PML, que forma los cuerpos de PML (promielocytic leukemia, observados inicialmente en leucemia promielocítica, de ahí su nombre), como activador de la transcripción de los genes HLA de clase I y de los genes de la maquinaria de procesamiento antigénico (APM) (Zheng et al., 1998). En líneas tumorales humanas de próstata y pulmón se ha corroborado la relación entre PML y expresión de HLA de clase I (Zhang et al., 2003; Chang et al., 2002). Sin embargo, otros autores no han encontrado esta relación (Bruno et al., 2003).

Otro factor a tener en cuenta es el transactivador CIITA, que regula la transcripción de HLA de clase I y $\beta 2m$ pero no afecta de forma significativa a las moléculas TAP y LMP (Gobin et al., 1998), por lo que no debe ser el factor regulador de los casos de vejiga analizados ya que en nuestros casos sí hemos encontrado una clara disminución en TAP y LMP.

En nuestro estudio comparamos los niveles transcripcionales de HLA-ABC, $\beta 2m$ y genes de la APM entre tumores con fenotipo I y tumores en los que no habíamos detectado alteraciones de expresión de HLA de clase I. El estudio se llevó a cabo mediante microdissección de nidos tumorales y PCR cuantitativa, técnica que ha demostrado su utilidad en la cuantificación de la cantidad inicial de una molécula de ADNc en una muestra (Heid et al., 1996; Higuchi et al., 1993; Lay and Wittwer, 1997). La PCR cuantitativa o PCR "a tiempo real" nos permitió medir de forma precisa la cantidad de mensajero de cada una de las moléculas estudiadas, con lo cual pudimos comparar los perfiles de expresión génica para estas moléculas entre los dos grupos de tumores.

Nuestros resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos, al comparar los niveles transcripcionales de cadena pesada de HLA de clase I, $\beta 2m$, LMP-2, LMP-7, TAP-1, TAP-2 y tapasina, pero no en los niveles del gen de referencia (G6PDH) ni del gen de control (β -actina). Esto nos permitió descartar diferencias en la

calidad del ARN obtenido entre los dos grupos. De existir estas diferencias, podrían haber causado un sesgo en los resultados porque no se puede descartar que la degradación del ARN afecte de forma distinta al mensajero del gen de referencia que al de los genes estudiados y por tanto, se podrían obtener diferencias transcripcionales artefactuadas al corregir con el gen de referencia.

Aunque encontramos diferencias en las moléculas mencionadas, no todas fueron igualmente significativas, así, las moléculas LMP-7, LMP-2, TAP-1 y $\beta 2m$ fueron las que mostraron mayores diferencias, mientras que la menos afectada fue la tapasina. Estos resultados apuntan hacia la presencia de un factor regulador común antes que a modificaciones epigenéticas locales, ya que el gen de la $\beta 2m$ se haya en un cromosoma diferente.

En la observación minuciosa de las gráficas de los resultados transcripcionales comprobaremos que tumores del grupo sin alteraciones en HLA de clase I tienen en alguno de los ARNm estudiados niveles tan bajos o incluso menores que los de algún caso negativo. Puesto que estos tumores de hecho mantienen la expresión de HLA de clase I, la baja transcripción necesaria para producir un fenotipo I dependerá de la combinación adecuada de niveles transcripcionales suficientemente bajos de los distintos genes implicados.

En nuestro trabajo no hemos podido hacer ensayos proteómicos debido a que la cantidad de material obtenido por microdissección es insuficiente para este tipo de ensayos. Otros autores sí lo han realizado, comparando las moléculas HLA-ABC, $\beta 2m$, TAP, LMP, tapasina, calreticulina y ERp57, involucradas en el procesamiento y presentación antigénica, mediante Western blot y Northern blot en líneas de melanoma y cultivo de melanocitos autólogos (Giorda et al., 2003), estos autores encontraron que la expresión de estas moléculas, salvo la de ERp57, era coordinada tanto en expresión como en transcripción, aunque las correlaciones estadísticas eran más significativas en expresión. La coordinación que encontraron era mayor para unas moléculas que otras, por lo que establecieron una jerarquía de coordinación entre estas moléculas, jerarquía a la que llamaron "coordinomo" de HLA de clase I.

4. Implicaciones pronósticas y terapéuticas de las alteraciones de expresión de HLA de clase I

Existen estudios anteriores de expresión de HLA de clase I en relación con factores pronósticos. Estos estudios utilizaban anticuerpos monoclonales frente a determinantes monomórficos de moléculas HLA de clase I y $\beta 2m$. Los resultados obtenidos eran contradictorios. Uno de estos estudios encuentra asociación entre la baja positividad frente al anticuerpo y una menor supervivencia del paciente (Levin et al., 1991). En nuestro estudio no pudimos relacionar las alteraciones de HLA de clase I con la supervivencia del paciente ya que, desafortunadamente, no contamos con datos para establecer la supervivencia específica de los pacientes. Otro estudio, sin embargo, no encuentra relaciones entre la expresión de HLA de clase I en tumores primarios de vejiga y parámetros clínico-patológicos (Cordon-Cardo et al., 1991). En estos trabajos no se emplearon anticuerpos específicos de locus ni de alelo ni tampoco se realizó estudio de LOH, por lo que muchas alteraciones quedan sin ser estudiadas.

Para el estudio de relaciones entre las alteraciones de HLA de clase I y el pronóstico, los tumores se dividieron en tres grupos; el criterio para formar estos tres grupos fue el de su distinto nivel de expresión de moléculas HLA de clase I, que conllevará una distinta interacción frente a los mecanismos efectores del sistema inmune. Un primer grupo incluye los tumores en los que no se han identificado alteraciones en la expresión de HLA de clase I, este grupo tiene una expresión alta de estas moléculas y sería susceptible de presentar péptidos tumorales que sean reconocidos por linfocitos T citotóxicos específicos. De hecho, así se ha demostrado en pacientes con tumores de mama, pulmón, vejiga y melanoma (Kass et al., 2003; Karanikas et al., 2001; Gueguen et al., 1998; Coulie et al., 2001; Dunn et al., 2004). El segundo grupo incluye los tumores en los que hemos encontrado alteraciones parciales de expresión de HLA de clase I; estos tumores podrían sufrir lisis mediada por linfocitos T citotóxicos que reconozcan los alelos HLA remanentes y por células NK con receptores inhibidores frente a los alelos HLA perdidos (Moretta and Moretta, 2004). El tercer grupo incluye los tumores con baja expresión generalizada de moléculas de HLA de clase I (Romero et al., 2005). Estos tumores van a eludir la lisis mediada por linfocitos T citotóxicos pero

serían susceptibles de ser lisados por células NK si la expresión de HLA de clase I es lo suficientemente baja (Karre, 2002; Bottino et al., 2004).

Al realizar esta clasificación encontramos que los tumores con alteraciones parciales en la expresión de HLA de clase I son los que muestran una mayor tendencia a recidivar, como hemos visto en el apartado de resultados. En nuestros casos, las alteraciones de HLA de clase I no se correlacionan ni con el grado de diferenciación ni con el estadio del tumor, indicando una falta de relación de las pérdidas de expresión de HLA de clase I con el proceso de pérdida de diferenciación que se produce en la célula tumoral.

Si aceptamos el control inmunológico del tumor, el fenotipo con alteraciones parciales presentaría una ventaja al favorecer el escape simultáneo frente a células T y NK. Este fenotipo permitiría la supervivencia del tumor dado que una alteración parcial de la expresión de HLA de clase I permitirá escapar de la lisis de linfocitos T citotóxicos específicos, mediante la pérdida de los alelos que presentasen el péptido tumoral. Además, mantendría la capacidad de inhibir la lisis mediada por NK gracias a los alelos HLA de clase I que aún conserva.

El hecho de que terapias inmunoestimuladoras con el bacilo de Calmette-Guérin (BCG), IL-2 e INF- γ sean efectivas en el tratamiento del cáncer de vejiga (Luo et al., 1999; Nouri and Symes, 1998) indica el papel del sistema inmune en el control de estos tumores, por lo que el conocimiento de los mecanismos implicados en las alteraciones de HLA de clase I puede proporcionar valiosa información para conseguir inmunoterapias tumorales más efectivas que conduzcan a un mejor control del cáncer. Tumores con pérdida generalizada de moléculas de HLA de clase I podrían controlarse potenciando la actuación de células NK en el tumor, mediante factores que controlen la actividad y que regulen el tráfico intratumoral de células NK. En cambio, tumores que conserven expresión de HLA de clase I serían susceptibles de ser tratados potenciando respuestas citotóxicas mediadas por linfocitos T CD8.

En los tumores con baja expresión generalizada de las moléculas HLA de clase I, el mecanismo que hemos encontrado es regulador, la terapia con BCG podría aumentar la

expresión de estas moléculas al favorecer la producción de citoquinas inmunoestimuladoras, particularmente INF- γ . Al favorecer el infiltrado leucocitario, la BCG pondría en contacto a las células tumorales con una adecuada presentación antigénica y a las células efectoras y colaboradoras de la respuesta inmune celular. También la BCG potencia la acción de la inmunidad natural y el infiltrado de células NK y NKT, productoras de INF- γ (Bohle and Brandau, 2003; Meyer et al., 2002). Esto podría ser importante para posteriormente sensibilizar al tumor frente a respuestas adaptativas de linfocitos T citotóxicos. El tratamiento con BCG sería más efectivo en tumores con baja expresión de HLA por mecanismo regulador que en otros que tuviesen defectos estructurales que impidan una adecuada presentación antigénica.

La evidencia de que los tumores son heterogéneos en sus mecanismos de desarrollo, producción de metaloproteasas, pérdida de moléculas de adhesión, producción de moléculas inmunosupresoras y adaptación frente a las respuestas del sistema inmune (Bond et al., 2005; Tamura et al., 1999; Malmberg, 2004; Rivoltini et al., 2002; Schreiber et al., 2002) nos lleva a abogar por un tratamiento individualizado de cada paciente, con estudios previos del tejido del tumor que nos permitan saber si las alteraciones que se detectan son o no son irreversibles de cara a establecer estrategias terapéuticas efectivas. Así, de este estudio se puede concluir que un paciente con ausencia o descenso generalizado de expresión de moléculas HLA de clase I sería candidato al uso de inmunoterapia con citoquinas que estimulen toda la maquinaria de procesamiento antigénico.

Nuestra esperanza es avanzar hacia una terapia optimizada, terapia que nos conduzca al objetivo deseado: un mejor control de la proliferación y finalmente la erradicación tumoral.

BIBLIOGRAFÍA

- Aaltonen, L.A., Peltomaki, P., Leach, F.S., Sistonen, P., Pylkkanen, L., Mecklin, J.P., Jarvinen, H., Powell, S.M., Jen, J., Hamilton, S.R. and et, a.l.: Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 260 (1993) 812-6.
- Alexandroff, A.B., Jackson, A.M., O'Donnell, M.A. and James, K.: BCG immunotherapy of bladder cancer: 20 years on. *Lancet* 353 (1999) 1689-94.
- Algarra, I., Gaforio, J.J., Cabrera, T., Collado, A. and Garrido, F.: The biological consequences of altered MHC class I expression in tumours. *J Biol Regul Homeost Agents* 13 (1999) 90-6.
- Baurain, J.F., Colau, D., van Baren, N., Landry, C., Martelange, V., Vikkula, M., Boon, T. and Coulie, P.G.: High frequency of autologous anti-melanoma CTL directed against an antigen generated by a point mutation in a new helicase gene. *J Immunol* 164 (2000) 6057-66.
- Baylin, S.B.: Tying it all together: epigenetics, genetics, cell cycle, and cancer. *Science* 277 (1997) 1948-9.
- Baylin, S.B., Herman, J.G., Graff, J.R., Vertino, P.M. and Issa, J.P.: Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res* 72 (1998) 141-96.
- Benitez, R., Godelaine, D., Lopez-Nevot, M.A., Brasseur, F., Jimenez, P., Marchand, M., Oliva, M.R., van Baren, N., Cabrera, T., Andry, G., Landry, C., Ruiz-Cabello, F., Boon, T. and Garrido, F.: Mutations of the beta2-microglobulin gene result in a lack of HLA class I molecules on melanoma cells of two patients immunized with MAGE peptides. *Tissue Antigens* 52 (1998) 520-9.
- Bicknell, D.C., Kaklamanis, L., Hampson, R., Bodmer, W.F. and Karran, P.: Selection for beta 2-microglobulin mutation in mismatch repair-defective colorectal carcinomas. *Curr Biol* 6 (1996) 1695-7.
- Bohle, A. and Brandau, S.: Immune mechanisms in bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for superficial bladder cancer. *J Urol* 170 (2003) 964-9.
- Bohm, M., Kleine-Besten, R. and Wieland, I.: Loss of heterozygosity analysis on chromosome 5p defines 5p13-12 as the critical region involved in tumor progression of bladder carcinomas. *Int J Cancer* 89 (2000) 194-7.
- Bond, J.S., Matters, G.L., Banerjee, S. and Dusheck, R.E.: Meprin metalloprotease expression and regulation in kidney, intestine, urinary tract infections and cancer. *FEBS Lett* 579 (2005) 3317-22.
- Bonnal, C., Ravery, V., Toublanc, M., Bertrand, G., Boccon-Gibod, L., Henin, D. and Grandchamp, B.: Absence of microsatellite instability in transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology* 55 (2000) 287-91.
- Bottino, C., Moretta, L., Pende, D., Vitale, M. and Moretta, A.: Learning how to discriminate between friends and enemies, a lesson from Natural Killer cells. *Mol Immunol* 41 (2004) 569-75.
- Browning, M., Petronzelli, F., Bicknell, D., Krausa, P., Rowan, A., Tonks, S., Murray, N., Bodmer, J. and Bodmer, W.: Mechanisms of loss of HLA class I expression on colorectal tumor cells. *Tissue Antigens* 47 (1996) 364-71.
- Bruch, J., Schulz, W.A., Haussler, J., Melzner, I., Bruderlein, S., Moller, P., Kemmerling, R., Vogel, W. and Hameister, H.: Delineation of the 6p22 amplification unit in urinary bladder carcinoma cell lines. *Cancer Res* 60 (2000) 4526-30.
- Bruno, S., Ghiotto, F., Fais, F., Fagioli, M., Luzi, L., Pelicci, P.G., Grossi, C.E. and Ciccone, E.: The PML gene

- is not involved in the regulation of MHC class I expression in human cell lines. *Blood* 101 (2003) 3514-9.
- Burrone, O.R., Kefford, R.F., Gilmore, D. and Milstein, C.: Stimulation of HLA-A,B,C by IFN-alpha. The derivation of Molt 4 variants and the differential expression of HLA-A,B,C subsets. *EMBO J* 4 (1985) 2855-60.
- Cabrera, C.M., Jimenez, P., Cabrera, T., Esparza, C., Ruiz-Cabello, F. and Garrido, F.: Total loss of MHC class I in colorectal tumors can be explained by two molecular pathways: beta2-microglobulin inactivation in MSI-positive tumors and LMP7/TAP2 downregulation in MSI-negative tumors. *Tissue Antigens* 61 (2003) 211-9.
- Cabrera, T., Angustias Fernandez, M., Sierra, A., Garrido, A., Herruzo, A., Escobedo, A., Fabra, A. and Garrido, F.: High frequency of altered HLA class I phenotypes in invasive breast carcinomas. *Hum Immunol* 50 (1996) 127-34.
- Cabrera, T., Pedrajas, G., Cozar, J.M., Garrido, A., Vicente, J., Tallada, M. and Garrido, F.: HLA class I expression in bladder carcinomas. *Tissue Antigens* 62 (2003) 324-7.
- Campoli, M., Chang, C.C. and Ferrone, S.: HLA class I antigen loss, tumor immune escape and immune selection. *Vaccine* 20 Suppl 4 (2002) A40-5.
- Chang, S.K., Park, B., Shin, J., Ahn, J.H., Kim, I.H. and Ahn, K.: Proto-oncogene PML enhances antigen presentation by MHC class I molecules in human lung cancer cells. *Mol Cells* 14 (2002) 130-5.
- Cheng, N.C., Beitsma, M., Chan, A., Op den Camp, I., Westerveld, A., Pronk, J. and Versteeg, R.: Lack of class I HLA expression in neuroblastoma is associated with high N-myc expression and hypomethylation due to loss of the MEMO-1 locus. *Oncogene* 13 (1996) 1737-44.
- Christensen, M., Jensen, M.A., Wolf, H. and Orntoft, T.F.: Pronounced microsatellite instability in transitional cell carcinomas from young patients with bladder cancer. *Int J Cancer* 79 (1998) 396-401.
- Cordon-Cardo, C., Fuks, Z., Drobnjak, M., Moreno, C., Eisenbach, L. and Feldman, M.: Expression of HLA-A,B,C antigens on primary and metastatic tumor cell populations of human carcinomas. *Cancer Res* 51 (1991) 6372-80.
- Costello, J.F., Fruhwald, M.C., Smiraglia, D.J., Rush, L.J., Robertson, G.P., Gao, X., Wright, F.A., Feramisco, J.D., Peltomaki, P., Lang, J.C., Schuller, D.E., Yu, L., Bloomfield, C.D., Caligiuri, M.A., Yates, A., Nishikawa, R., Su Huang, H., Petrelli, N.J., Zhang, X., O'Dorisio, M.S., Held, W.A., Cavenee, W.K. and Plass, C.: Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet* 24 (2000) 132-8.
- Coulie, P.G., Karanikas, V., Colau, D., Lurquin, C., Landry, C., Marchand, M., Dorval, T., Bricard, V. and Boon, T.: A monoclonal cytolytic T-lymphocyte response observed in a melanoma patient vaccinated with a tumor-specific antigenic peptide encoded by gene MAGE-3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001) 10290-5.
- Dulaimi, E., Uzzo, R.G., Greenberg, R.E., Al-Saleem, T. and Cairns, P.: Detection of bladder cancer in urine by a tumor suppressor gene hypermethylation panel. *Clin Cancer Res* 10 (2004) 1887-93.
- Dunn, G.P., Old, L.J. and Schreiber, R.D.: The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 22 (2004) 329-60.
- Erbersdobler, A., Friedrich, M.G., Schwaibold, H., Henke, R.P. and Hulan, H.: Microsatellite alterations at chromosomes 9p, 13q, and 17p in nonmuscle-invasive transitional cell carcinomas of the urinary bladder. *Oncol Res* 10 (1998) 415-20.

- Eryigit, M. and Kirkali, Z.: HLA antigens and transitional cell carcinoma of the bladder. *Urol Int* 45 (1990) 75-7.
- Farag, S.S., Fehniger, T.A., Ruggeri, L., Velardi, A. and Caligiuri, M.A.: Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood* 100 (2002) 1935-47.
- Feenstra, M., Rozemuller, E., Duran, K., Stuy, I., van den Tweel, J., Slootweg, P., de Weger, R. and Tilanus, M.: Mutation in the beta 2m gene is not a frequent event in head and neck squamous cell carcinomas. *Hum Immunol* 60 (1999) 697-706.
- Feenstra, M., Verdaasdonk, M., van der Zwan, A.W., de Weger, R., Slootweg, P. and Tilanus, M.: Microsatellite analysis of microdissected tumor cells and 6p high density microsatellite analysis in head and neck squamous cell carcinomas with down-regulated human leukocyte antigen class I expression. *Lab Invest* 80 (2000) 405-14.
- Fernandez, M.A., Ruiz-Cabello, F., Oliva, M.R., Cabrera, T., Jimenez, P., Lopez Nevot, M.A. and Garrido, F.: Beta2-microglobulin gene mutation is not a common mechanism of HLA class I total loss in human tumors. *Int J Clin Lab Res* 30 (2000) 87-92.
- Garcia-Lora, A., Algarra, I. and Garrido, F.: MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *J Cell Physiol* 195 (2003) 346-55.
- Giorda, E., Sibilio, L., Martayan, A., Moretti, S., Venturo, I., Mottolise, M., Ferrara, G.B., Cappellacci, S., Eibenschutz, L., Catricala, C., Grammatico, P. and Giacomini, P.: The antigen processing machinery of class I human leukocyte antigens: linked patterns of gene expression in neoplastic cells. *Cancer Res* 63 (2003) 4119-27.
- Gobin, S.J., Peijnenburg, A., van Eggermond, M., van Zutphen, M., van den Berg, R. and van den Elsen, P.J.: The RFX complex is crucial for the constitutive and CIITA-mediated transactivation of MHC class I and beta2-microglobulin genes. *Immunity* 9 (1998) 531-41.
- Gueguen, M., Patard, J.J., Gaugler, B., Brasseur, F., Renaud, J.C., Van Cangh, P.J., Boon, T. and Van den Eynde, B.J.: An antigen recognized by autologous CTLs on a human bladder carcinoma. *J Immunol* 160 (1998) 6188-94.
- Guillaudeux, T., Rodriguez, A.M., Girr, M., Mallet, V., Ellis, S.A., Sargent, I.L., Fauchet, R., Alsat, E. and Le Bouteiller, P.: Methylation status and transcriptional expression of the MHC class I loci in human trophoblast cells from term placenta. *J Immunol* 154 (1995) 3283-99.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. and Williams, P.M.: Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6 (1996) 986-94.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. and Watson, R.: Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 11 (1993) 1026-30.
- Holliday, R.: DNA methylation and epigenotypes. *Biochemistry (Mose)* 70 (2005) 500-4.
- Hurst, C.D., Fiegler, H., Carr, P., Williams, S., Carter, N.P. and Knowles, M.A.: High-resolution analysis of genomic copy number alterations in bladder cancer by microarray-based comparative genomic hybridization. *Oncogene* 23 (2004) 2250-63
- Ionov, Y., Peinado, M.A., Malkhosyan, S., Shibata, D. and Perucho, M.: Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 363 (1993) 558-61.
- Johnsen, A., France, J., Sy, M.S. and Harding, C.V.: Down-regulation of the transporter for antigen presentation, proteasome subunits, and class I major histocompatibility complex in tumor cell lines. *Cancer Res* 58

- (1998) 3660-7.
- Jones, P.A.: DNA methylation in development of bladder cancer. *Adv Exp Med Biol* 462 (1999) 419-23.
- Karanikas, V., Colau, D., Baurain, J.F., Chiari, R., Thonnard, J., Gutierrez-Roelens, I., Goffinet, C., Van Schaftingen, E.V., Weynants, P., Boon, T. and Coulie, P.G.: High frequency of cytolytic T lymphocytes directed against a tumor-specific mutated antigen detectable with HLA tetramers in the blood of a lung carcinoma patient with long survival. *Cancer Res* 61 (2001) 3718-24.
- Karre, K.: NK cells, MHC class I molecules and the missing self. *Scand J Immunol* 55 (2002) 221-8.
- Kass, R., Bellone, S., Palmieri, M., Cane, S., Bignotti, E., Henry-Tillman, R., Hutchins, L., Cannon, M.J., Klimberg, S. and Santin, A.D.: Restoration of tumor-specific HLA class I restricted cytotoxicity in tumor infiltrating lymphocytes of advanced breast cancer patients by in vitro stimulation with tumor antigen-pulsed autologous dendritic cells. *Breast Cancer Res Treat* 80 (2003) 275-85.
- Koene, G.J., Arts-Hilkes, Y.H., van der Ven, K.J., Rozemuller, E.H., Slootweg, P.J., de Weger, R.A. and Tilanus, M.G.: High level of chromosome 15 aneuploidy in head and neck squamous cell carcinoma lesions identified by FISH analysis: limited value of beta2-microglobulin LOH analysis. *Tissue Antigens* 64 (2004) 452-61.
- Koopman, L.A., Corver, W.E., van der Slik, A.R., Giphart, M.J. and Fleuren, G.J.: Multiple genetic alterations cause frequent and heterogeneous human histocompatibility leukocyte antigen class I loss in cervical cancer. *J Exp Med* 191 (2000) 961-76.
- Laird, P.W.: Oncogenic mechanisms mediated by DNA methylation. *Mol Med Today* 3 (1997) 223-9.
- Lay, M.J. and Wittwer, C.T.: Real-time fluorescence genotyping of factor V Leiden during rapid-cycle PCR. *Clin Chem* 43 (1997) 2262-7.
- Levin, I., Klein, T., Goldstein, J., Kuperman, O., Kanetti, J. and Klein, B.: Expression of class I histocompatibility antigens in transitional cell carcinoma of the urinary bladder in relation to survival. *Cancer* 68 (1991) 2591-4.
- Linn, J.F., Lango, M., Halachmi, S., Schoenberg, M.P. and Sidransky, D.: Microsatellite analysis and telomerase activity in archived tissue and urine samples of bladder cancer patients. *Int J Cancer* 74 (1997) 625-9.
- Lozano, F., Santos-Aguado, J., Borche, L., Places, L., Domenech, N., Gaya, A., Vilella, R. and Vives, J.: Identification of the amino acid residues defining an intralocus determinant in the alpha 1 domain of HLA-A molecules. *Immunogenetics* 30 (1989) 50-3.
- Luo, Y., Chen, X., Downs, T.M., DeWolf, W.C. and O'Donnell, M.A.: IFN-alpha 2B enhances Th1 cytokine responses in bladder cancer patients receiving *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin immunotherapy. *J Immunol* 162 (1999) 2399-405.
- Makki, A., Weidt, G., Blachere, N.E., Lefrancois, L. and Srivastava, P.K.: Immunization against a dominant tumor antigen abrogates immunogenicity of the tumor. *Cancer Immunol* 2 (2002) 4
- Maleno, I., Cabrera, C.M., Cabrera, T., Paco, L., Lopez-Nevot, M.A., Collado, A., Ferron, A. and Garrido, F.: Distribution of HLA class I altered phenotypes in colorectal carcinomas: high frequency of HLA haplotype loss associated with loss of heterozygosity in chromosome region 6p21. *Immunogenetics* 56 (2004) 244-53.
- Maleno, I., Lopez-Nevot, M.A., Cabrera, T., Salinero, J. and Garrido, F.: Multiple mechanisms generate HLA class I altered phenotypes in laryngeal carcinomas: high frequency of HLA haplotype loss associated with loss of heterozygosity in chromosome region 6p21. *Cancer Immunol Immunother* 51 (2002) 389-96.

- Maleno, I., Lopez Nevot, M.A., Seliger, B. and Garrido, F.: Low frequency of HLA haplotype loss associated with loss of heterozygosity in chromosome region 6p21 in clear renal cell carcinomas. *Int J Cancer* 109 (2004) 636-8.
- Malmberg, K.J.: Effective immunotherapy against cancer: a question of overcoming immune suppression and immune escape? *Cancer Immunol Immunother* 53 (2004) 879-92.
- Marsit, C.J., Karagas, M.R., Danaee, H., Liu, M., Andrew, A., Schned, A., Nelson, H.H. and Kelsey, K.T.: Carcinogen exposure and gene promoter hypermethylation in bladder cancer. *Carcinogenesis* (2005)
- Meyer, J.P., Persad, R. and Gillatt, D.A.: Use of bacille Calmette-Guerin in superficial bladder cancer. *Postgrad Med J* 78 (2002) 449-54.
- Moretta, A. and Moretta, L.: HLA class I specific inhibitory receptors. *Curr Opin Immunol* 9 (1997) 694-701.
- Moretta, L. and Moretta, A.: Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. *EMBO J* 23 (2004) 255-9.
- Nie, Y., Yang, G., Song, Y., Zhao, X., So, C., Liao, J., Wang, L.D. and Yang, C.S.: DNA hypermethylation is a mechanism for loss of expression of the HLA class I genes in human esophageal squamous cell carcinomas. *Carcinogenesis* 22 (2001) 1615-23.
- Nouri, A.M., Hussain, R.F. and Oliver, R.T.: The frequency of major histocompatibility complex antigen abnormalities in urological tumours and their correction by gene transfection or cytokine stimulation. *Cancer Gene Ther* 1 (1994) 119-23.
- Nouri, A.M. and Symes, M.O.: Relevance of the immune system in human urological malignancies: prospective for future clinical treatments. *Urology* 51 (1998) 41-9.
- Oliver, R.T., Nouri, A.M., Crosby, D., Iles, R.L., Navarette, C., Martin, J., Bodmer, W. and Festenstein, H.: Biological significance of beta hCG, HLA and other membrane antigen expression on bladder tumours and their relationship to tumour infiltrating lymphocytes (TIL). *J Immunogenet* 16 (1989) 381-90.
- Onno, M., Amiot, L., Bertho, N., Drenou, B. and Fauchet, R.: CpG methylation patterns in the 5' part of the nonclassical HLA-G gene in peripheral blood CD34+ cells and CD2+ lymphocytes. *Tissue Antigens* 49 (1997) 356-64.
- Pardoll, D.M.: Inducing autoimmune disease to treat cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999) 5340-2.
- Pontarotti, P., Chimini, G., Nguyen, C., Boretto, J. and Jordan, B.R.: CpG islands and HTF islands in the HLA class I region: investigation of the methylation status of class I genes leads to precise physical mapping of the HLA-B and -C genes. *Nucleic Acids Res* 16 (1988) 6767-78.
- Prat, E., Bernues, M., Caballin, M.R., Egozcue, J., Gelabert, A. and Miro, R.: Detection of chromosomal imbalances in papillary bladder tumors by comparative genomic hybridization. *Urology* 57 (2001) 986-92
- Restifo, N.P., Antony, P.A., Finkelstein, S.E., Leitner, W.W., Surman, D.P., Theoret, M.R. and Touloukian, C.E.: Assumptions of the tumor 'escape' hypothesis. *Semin Cancer Biol* 12 (2002) 81-6.
- Rivoltini, L., Carrabba, M., Huber, V., Castelli, C., Novellino, L., Dalerba, P., Mortarini, R., Arancia, G., Anichini, A., Fais, S. and Parmiani, G.: Immunity to cancer: attack and escape in T lymphocyte-tumor cell interaction. *Immunol Rev* 188 (2002) 97-113.
- Romero, J.M., Jimenez, P., Cabrera, T., Cozar, J.M., Pedrinaci, S., Tallada, M., Garrido, F. and Ruiz-Cabello, F.: Coordinated downregulation of the antigen presentation machinery and HLA class I/beta2-

- microglobulin complex is responsible for HLA-ABC loss in bladder cancer. *Int J Cancer* 113 (2005) 605-10.
- Sanda, M.G., Restifo, N.P., Walsh, J.C., Kawakami, Y., Nelson, W.G., Pardoll, D.M. and Simons, J.W.: Molecular characterization of defective antigen processing in human prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 87 (1995) 280-5.
- Saran, K.K., Gould, D., Godec, C.J. and Verma, R.S.: Genetics of bladder cancer. *J Mol Med* 74 (1996) 441-5.
- Schreiber, H., Wu, T.H., Nachman, J. and Kast, W.M.: Immunodominance and tumor escape. *Semin Cancer Biol* 12 (2002) 25-31.
- Seliger, B., Wollscheid, U., Momburg, F., Blankenstein, T. and Huber, C.: Coordinate downregulation of multiple MHC class I antigen processing genes in chemical-induced murine tumor cell lines of distinct origin. *Tissue Antigens* 56 (2000) 327-36.
- Serrano, A., Tanzarella, S., Lionello, I., Mendez, R., Traversari, C., Ruiz-Cabello, F. and Garrido, F.: Rexpression of HLA class I antigens and restoration of antigen-specific CTL response in melanoma cells following 5-aza-2'-deoxycytidine treatment. *Int J Cancer* 94 (2001) 243-51.
- Spear, B.T., Kornbluth, J., Strominger, J.L. and Wilson, D.B.: Evidence for a shared HLA-A intralocus determinant defined by monoclonal antibody 131. *J Exp Med* 162 (1985) 1802-10.
- Tamura, M., Gu, J., Tran, H. and Yamada, K.M.: PTEN gene and integrin signaling in cancer. *J Natl Cancer Inst* 91 (1999) 1820-8.
- Tomovska, S., Richter, J., Suess, K., Wagner, U., Rozenblum, E., Gasser, T.C., Moch, H., Mihatsch, M.J., Sauter, G. and Schraml, P.: Molecular cytogenetic alterations associated with rapid tumor cell proliferation in advanced urinary bladder cancer. *Int J Oncol* 18 (2001) 1239-44
- Uchida, T., Wang, C., Wada, C., Iwamura, M., Egawa, S. and Koshiba, K.: Microsatellite instability in transitional cell carcinoma of the urinary tract and its relationship to clinicopathological variables and smoking. *Int J Cancer* 69 (1996) 142-5.
- van Tilborg, A.A., de Vries, A., de Bont, M., Groenfeld, L.E. and Zwarthoff, E.C.: The random development of LOH on chromosome 9q in superficial bladder cancers. *J Pathol* 198 (2002) 352-8.
- Witjes, J.A., Umbas, R., Debruyne, F.M. and Schalken, J.A.: Expression of markers for transitional cell carcinoma in normal bladder mucosa of patients with bladder cancer. *J Urol* 154 (1995) 2185-9.
- Yamamoto, H., Perez-Piteira, J., Yoshida, T., Terada, M., Itoh, F., Imai, K. and Perucho, M.: Gastric cancers of the microsatellite mutator phenotype display characteristic genetic and clinical features. *Gastroenterology* 116 (1999) 1348-57.
- Yan, L., Yang, X. and Davidson, N.E.: Role of DNA methylation and histone acetylation in steroid receptor expression in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 6 (2001) 183-92.
- Zhang, H., Melamed, J., Wei, P., Cox, K., Frankel, W., Bahnson, R.R., Robinson, N., Pyka, R., Liu, Y. and Zheng, P.: Concordant down-regulation of proto-oncogene PML and major histocompatibility antigen HLA class I expression in high-grade prostate cancer. *Cancer Immun* 3 (2003) 2
- Zheng, P., Guo, Y., Niu, Q., Levy, D.E., Dyck, J.A., Lu, S., Sheiman, L.A. and Liu, Y.: Proto-oncogene PML controls genes devoted to MHC class I antigen presentation. *Nature* 396 (1998) 373-6.
- Zingg, J.M. and Jones, P.A.: Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis. *Carcinogenesis* 18 (1997) 869-82.

CONCLUSIONES

1. La pérdida de heterocigosidad en la región HLA (6p21), puesta de manifiesto mediante marcadores polimórficos, es la lesión molecular más frecuentemente observada en tumores de vejiga que afecta a la expresión de antígenos HLA.

2. Las pérdidas de heterocigosidad obedecen en más de la mitad de los casos a deleciones que no afectan al cromosoma completo, dado que retienen la heterocigosidad en 6q.

3. La pérdida total de antígenos HLA de clase I en los casos estudiados es consecuencia de una baja transcripción tanto de los genes de la cadena pesada de HLA de clase I como de $\beta 2m$. La baja transcripción también se observa en genes que codifican para proteínas implicadas en el procesamiento y presentación antigénica (TAP, LMP, tapasina) y que con frecuencia resulta reversible tras tratamiento inmunomodulador. Estos hallazgos sugieren la alteración de un factor o factores que coordinan la expresión de todos estos genes.

4. La pérdida total de expresión de moléculas HLA de clase I no se ha producido en ningún caso por mutaciones estructurales en el gen de la $\beta 2m$ (mutaciones y deleciones) o a mecanismos epigenéticos (hipermetilación del ADN). Estos resultados concuerdan con la ausencia de tumores de vejiga con el fenotipo mutador (inestabilidad de microsatélites) y apoyan el hecho de que la lesión molecular más frecuentemente observada sea la LOH, ya que esta alteración genética involucra a enzimas reparadoras distintas a las alteradas en el fenotipo mutador.

5. En nuestros casos, los tumores con alteraciones parciales en la expresión de HLA de clase I (fenotipos II, III, IV y V) muestran una incidencia mayor de recidiva que aquellos que no presentan alteraciones en HLA de clase I o que tienen una pérdida total de expresión de antígenos HLA de clase I.