



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**CARRERA DE BIOLOGÍA**

**UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL  
ZARAGOZA**

**LABORATORIO DE INMUNOBIOLOGÍA, INVESTIGACIÓN EN  
DIFERENCIACIÓN CELULAR Y CÁNCER  
(L-3 PB)**

**Análisis de la expresión de moléculas HLA clase I y del  
procesamiento de antígenos en células tumorales con cáncer  
cervico-uterino tratadas con hidralazina y ácido valproico**

**Tesista: Rosario García Rocha.**

**Director de Tesis:**

**Dra. María de Lourdes Mora García**

**Marzo 2008**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## *No tuve tiempo...*

*Un hombre muy sabio decía: La gran línea divisoria entre el éxito y el fracaso se encierra en tres palabras: no tuve tiempo.*

*En medio del frenético ritmo de la vida moderna nos parece con frecuencia, que los días no tuvieran horas suficientes para realizar nuestras aspiraciones y entonces renunciamos a ellas.*

*El mundo sin embargo, está lleno de personas que a fuerza de voluntad han encontrado la manera de destinar una hora diaria por lo menos a cultivar por sí mismas su facultad creadora. Es más, he observado que los individuos con mayor número de ocupaciones, suelen ser los que se arreglan para disponer diariamente de una hora para disfrutar de su soledad.*

*Quien dedique aunque sólo sea una hora al día, a algún proyecto para él apasionante le estará dedicando 365 horas al año. O sea, el equivalente de más de 45 jornadas de trabajo, de ocho horas cada una.*

*Esto es como agregar un mes y medio de vida productiva a cada año de nuestra existencia. Reconozco que no es cosa fácil.*

*Se necesita voluntad, primero para darse esa hora y para luego utilizarla sabiamente. Lo más importante es que nuestras horas de soledad, sea productivas y así puede serlo aunque a veces únicamente nos proporcione un sentimiento de bienestar.*

**Anónimo**

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Inmunobiología de la UMIEZ de la FES-Zaragoza, UNAM y en el Laboratorio de Inmunobiología de la UIMEO del Hospital de Oncología del CMN SXXI, IMSS y fue realizado gracias al apoyo financiero proporcionado por la beca del proyecto DGAPA-PAPIT IN212506 y SALUD-2002-COI-6579. Además de contar con el apoyo económico de DGAPA-PAPIT IN212506, SALUD-2002-COI, CONACYT 47615-Q y FOFOI-IMSS 20067IA/I/004.

---

---

## Índice

Resumen.....	2
Introducción.....	4
Cáncer cérvico-uterino.....	4
Marco teórico.....	5
Virus de Papiloma Humano (HPV).....	5
Infección del virus.....	6
Respuesta inmune contra el cáncer.....	8
Complejo principal de histocompatibilidad (MHC).....	10
Procesamiento de antígenos.....	12
Epigenética y cáncer.....	15
Hidralazina Ácido Valproico.....	21
Interferón- $\gamma$ .....	23
Justificación.....	25
Hipótesis.....	27
Objetivo.....	28
Objetivos particulares.....	28
Métodos.....	29
Muestras biológicas.....	29
Tratamiento de las líneas celulares.....	29
Citometría de flujo.....	30
Tinción inmunocitoquímica.....	31
Resultados.....	33
Análisis de la expresión de moléculas HLA-I.....	33
Expresión de moléculas del procesamiento de antígenos.....	36
Discusión de resultados.....	48
Conclusiones.....	52
Perspectivas.....	53
Apéndice 1.....	54
Abreviaturas.....	56
Bibliografía.....	58

## **Resumen.**

El cáncer cervical uterino (CaCu) es un importante problema de salud pública a nivel nacional, representando la principal causa de muerte por tumores malignos en mujeres, con un 14.4% del total, dando lugar a más de 4000 muertes por año en México. Actualmente, es el primer cáncer reconocido por la Organización Mundial de la Salud que es 100% atribuible a la infección por el virus de papiloma humano (HPV).

Se ha reportado que más del 90% de los tumores de cáncer cérvico-uterino presentan pérdida o disminución de la expresión alélica de las moléculas clase I del complejo principal de histocompatibilidad (HLA-I), la cual se asocia con deficiencias en la expresión de moléculas que participan en el procesamiento de antígenos tales como LMP-2, LMP-7, LMP-10, TAP-I, TAP-2 y Tapasina.

En estudios recientes, se ha descrito que algunos mecanismos epigenéticos como son la hipermetilación y desacetilación de histonas, controlan la expresión de genes que codifican para proteínas que participan en el reconocimiento inmune de las células tumorales, incluyendo a las moléculas HLA-I y del procesamiento de antígenos. Asimismo, en un estudio reciente, realizado por nuestro grupo de investigación, se encontró que el uso del agente desmetilante hidralazina (H) junto con el inhibidor de desacetilasas de histonas, ácido valproico (AV), inducen una mayor expresión de moléculas MHC clase I y favorecen el reconocimiento inmune de células tumorales de cáncer cérvico-uterino (CaCu). Por lo que en el presente estudio se analizó si el incremento en la expresión de moléculas HLA-I en células tumorales de CaCu tratadas con ambos fármacos se relaciona con algún incremento en la expresión de moléculas del procesamiento antigénico.

En este estudio se utilizaron seis líneas celulares derivadas de cáncer cérvico uterino: C33A y Vibo (HPV-), Caski y Siha (HPV16+) y Hela e Inbl (HPV18+). Después del tratamiento con hidralazina (H) 10 $\mu$ M durante 5 días y ácido valproico (AV) 1mM durante 3 días, se

analizó la expresión total de moléculas HLA clase I en membrana mediante citometría de flujo y la expresión intracelular de las moléculas participantes en el procesamiento y presentación de antígenos LMP-2, LMP-7, TAP-1, TAP-2 y Tapasina mediante tinciones inmunocitoquímicas utilizando anticuerpos monoclonales específicos.

El tratamiento de las células tumorales con H y AV indujo un importante incremento (21-143%) en la expresión de moléculas HLA-I en las líneas celulares estudiadas, incluso mayor al obtenido cuando las células fueron tratadas con IFN- $\gamma$  (inductor positivo) (9-89.5%). La combinación de H+AV+ IFN- $\gamma$  indujo el mayor incremento en la expresión de moléculas HLA-I (133-173.5%). Por otro lado, el tratamiento con H+AV indujo un incremento importante en la expresión constitutiva de las moléculas del procesamiento antigénico LMP-2, LMP-7, TAP-1, TAP-2 y TPN comparable a la inducida con IFN- $\gamma$ . Las moléculas TAP-1 y LMP-7 del procesamiento antigénico fueron las que presentaron una mayor inducción en las células cultivadas en presencia de los tres fármacos.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio, el tratamiento de células tumorales con H, AV e IFN- $\gamma$  favorece el incremento en la expresión de las moléculas HLA-I y del procesamiento antigénico, lo cual puede repercutir de manera favorable para su reconocimiento inmunológico, por lo que resultaría conveniente estudiar la inclusión de estos fármacos en protocolos de inmunoterapia en pacientes con CaCu.

## **Introducción.**

### **Cáncer cervico-uterino.**

El cáncer cervical uterino (CaCu) es un importante problema de salud pública pues en el Mundo es la segunda causa de mortalidad debida a padecimientos oncológicos en mujeres, con unas 300, 000 muertes al año siendo la mayor tasa de incidencia entre la población femenina de los países en vías de desarrollo (Parkin *et al.*, 1999). En México, representa la principal causa de muerte por tumores malignos en mujeres, con un 14.4% del total, representando más de 4000 muertes por año (INEGI, 2002).

Actualmente, es el primer cáncer reconocido por la Organización Mundial de la Salud que es 100% atribuible a la infección por el virus de papiloma humano (HPV) (Bosch y Muñoz, 2002) y la infección por este virus representa la enfermedad por transmisión sexual más difundida (Bosch *et al.*, 2002, Walboomers *et al.*, 1997, Walboomers *et al.*, 1999), aunque la mayoría de estas infecciones es transitoria y no es clínicamente evidente debido a que el 70-90% de mujeres infectadas resuelven la infección en 12 a 30 meses (Evander *et al.*, 1995 y Ho GY, *et. al.*, 1998) y se estima que sólo un 5 a 8% de mujeres que la padecen desarrolla el CaCu (Torroella *et al.*, 1998).

Esta enfermedad tiene una historia natural de larga evolución que inicia con los cambios en el epitelio cervical, que gradualmente van acentuándose hasta que en un término de 1-10 años después de la infección persistente por el HPV se transforman en carcinoma invasor (Castellanos, 2003).

La edad promedio para el desarrollo del cáncer cervicouterino es aproximadamente 50 años; sin embargo, puede afectar a mujeres de hasta 20 años de edad o incluso menores. El cáncer cervicouterino está directamente relacionado con el número de compañeros sexuales a lo largo de la vida (Nubel, 2005).



## Marco teórico.

### Virus del papiloma humano (HPV).

El HPV pertenece a la familia *Papovaviridae*, de estructura icosaédrica de 72 capsómeros (60 hexámeros y 12 pentámeros) sin cápsula con un diámetro aproximadamente 55nm que contiene el genoma viral (Figura 1), compuesto de DNA circular de doble cadena de aproximadamente 8kb y 8, 000 pares de bases de longitud (Hebner y Laimins, 2006).

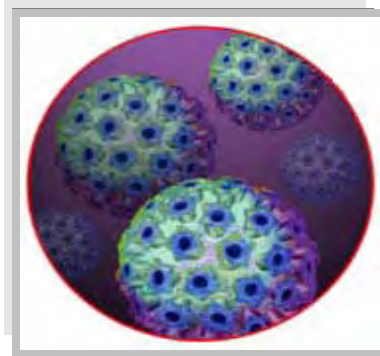


Figura 1. Virus de Papiloma Humano. Tomado de: ([http://www.roche.de/.../hvp\\_verlauf.htm](http://www.roche.de/.../hvp_verlauf.htm)).

El genoma del HPV se divide en tres regiones: la región larga de control (LCR) que no contiene marco de lectura alguno, la región que corresponde a las proteínas temprana (E1 a E7) y la región que corresponde a las proteínas tardías (L1 y L2) (Figura 2) (McMurray, *et al.*, 2001).

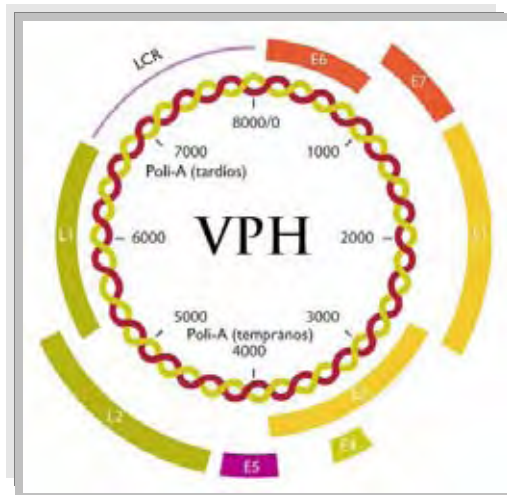


Figura 2. Genoma del HPV, tomado de: (López y Lizano, 2006).

Tabla 1. Funciones de los productos génicos del HPV.

		Funciones
Proteínas virales tempranas	E1	Replicación del ADN viral y mantenimiento episomal.
	E2	Transcripción viral, replicación y transformación.
	E4	Modifica el citoesqueleto para permitir la liberación del virus.
	E5	Proteína transformante: inhibición de la degradación del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR).
	E6	Proteína transformante: inactiva la proteína p53 e inhibe la apoptosis.
	E7	Proteína transformante: interfiere con las proteínas supresoras del retinoblastoma (Rb).
Proteínas virales tardías	L1 y L2	Principales proteínas de la cápside, L1 constituye el 90% y L2 el 10%.

Tomado de Zur, 2000, Huibregtse *et al.*, 1991, Munger *et al.*, 1992, DiMaio *et al.*, 1994, Chen *et al.*, 1995 y Syrjanen y Syrjänen, 1999.

## Infección del virus.

La infección con HPV es la enfermedad de transmisión sexual más común en el mundo; al menos el 60% de las mujeres con vida sexual activa menores de 35 años han tenido infección genital por HPV (Herman, 2003).

Es un virus epiteliotrópico que puede infectar la piel, el tracto ano genital, boca, laringe y esófago (Tewari, *et al.*, 2000), hasta ahora, por lo menos se han identificado 200 tipos (Zur, 1999) y los tipos de HPV's genitales son clasificados según su potencial para inducir malignidad: de alto riesgo: 16, 18, 31, 33, 36, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 73 y 82, probable alto riesgo: 26, 53 y 66 y de bajo riesgo: 6, 11,40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 y CP6108 (Muñoz *et al.*, 2003).

Aproximadamente el 99% de cánceres cervicales contienen DNA de HPV de alto riesgo, siendo el HPV tipo 16 es el más prevalente, encontrado en más del 50% de los casos seguido por los tipos: 18, 31, 33 y 45 (Walboomers *et al.*, 1999).

Como todas las neoplasias malignas, el carcinoma de cérvix es consecuencia de una serie de alteraciones en genes que regulan la proliferación celular y apoptosis, en donde el HPV es el factor más importante en su etiopatogenia debido a que el DNA del virus se encuentra integrado en las lesiones invasoras en más del 90% de los casos (Howley, 1991). Aunque esto no es suficiente ya que solo una pequeña proporción de las mujeres infectadas por el virus desarrollan cáncer (Hernán y Baylin, 2003) indicando que otros factores están implicados en la progresión de la infección (Berek y Hacker, 2000) como lo son la multiparidad (cuando la mujer a tenido 7 ó más embarazos a término), el cigarrillo, la inmunosupresión, (Muñoz *et al.*, 2002) y el uso prolongado de anticonceptivos orales (Moreno *et al.*, 2002).

Las partículas infecciosas entran a las células basales del cervix a través de una abertura en el epitelio estratificado. Tal abertura puede ocurrir en condiciones donde la piel tenga alguna lesión o microtrauma (Evander *et al.*, 1997) y allí se mantienen 50 a 100 copias de virus por célula; cuando se presenta la división celular una célula empieza a migrar hacia la superficie e inicia su proceso de diferenciación, lo cual es un problema para el virus que requiere de toda la maquinaria replicativa de la célula para la síntesis de su DNA; sin embargo, el virus requiere de algún nivel de diferenciación ya que el promotor que regula la síntesis de la cápside sólo se activa en células parcialmente diferenciadas. Por lo tanto el virus debe alterar la progresión de la fase G1 a la S para realizar su replicación en la capa granular y la síntesis de la cápside y amplificación de su DNA (Figura 3) (McMurray *et al.*, 2001).

La función de los productos de las proteínas E6 y E7, durante la infección productiva, es modificar los caminos de regulación del crecimiento celular para facilitar la replicación viral en la célula que aún no está diferenciada y mantener activo el proceso de división

celular. La proteína E6 de HPV se une a p53 y lo hace blanco de degradación por ubiquitinación, esta degradación tiene la misma función de una mutación inactivante (Warness *et al.*, 1990). Los productos del gen E7 se unen a la forma hipofosforilada de las proteínas de la familia pRb, esta unión interrumpe el complejo entre pRb y el factor de transcripción celular E2F, liberando así la transcripción de genes cuyos productos son requeridos para que la célula entre en fase de síntesis del ciclo celular. Los productos del gen E7 también se pueden asociar con otras proteínas del ciclo celular como la ciclina E, dando como resultado la estimulación de la síntesis de DNA y la proliferación celular (Thomas *et al.*, 1999) (Figura 3).

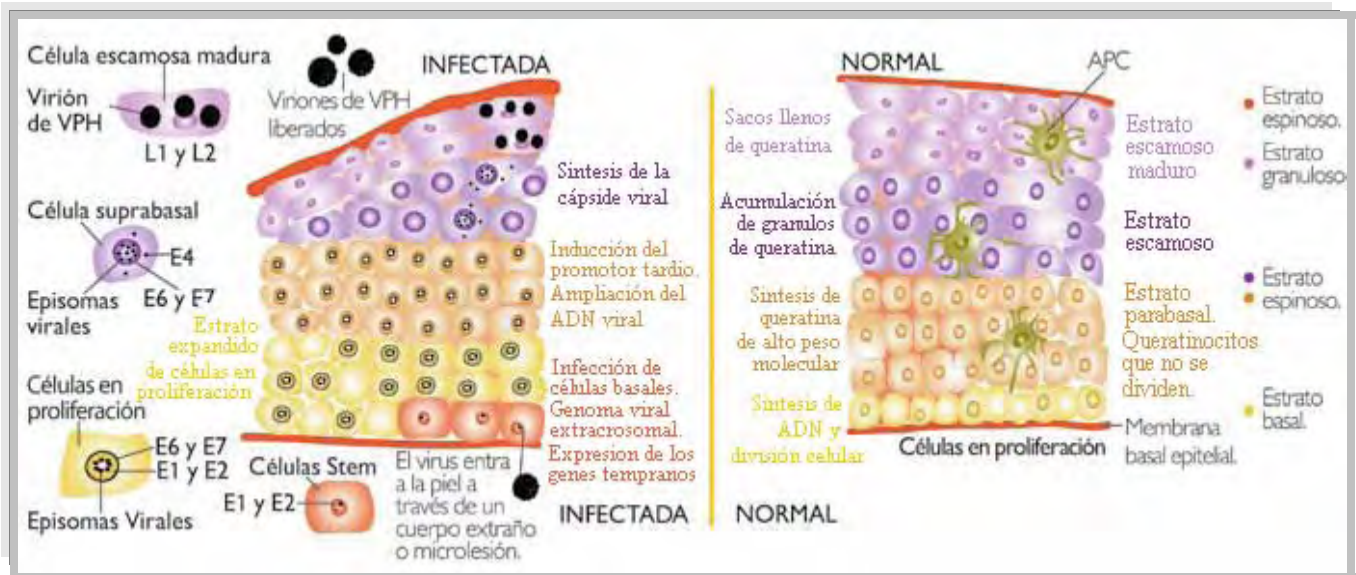


Figura 3. Arquitectura de la célula epitelial estratificada del cervix y expresión de las proteínas virales después de la infección. Tomado de: (Frazer, 2004).

## Respuesta inmune contra el cáncer.

La respuesta inmune está considerada como un mecanismo efector en la resistencia a los tumores y está relacionada desde la fase de iniciación hasta el crecimiento y progresión de éstos (Janeway *et al.*, 2001).

Importantes evidencias sugieren que el sistema inmune participa en la eliminación de las células malignas que aparecen en el huésped, probablemente, como resultado de mutaciones espontáneas, exposición a carcinógenos del medio ambiente y activación viral. Además, tiene una crucial implicación en la progresión de tumores ya establecidos, pues generalmente son más agresivos, en aquellos pacientes que sufren inmunodepresión (Brostoff *et al.*, 1993).

El HPV ha evolucionado conjuntamente con los humanos durante mucho tiempo y por tanto, su ciclo replicativo es muy complejo, de tal forma que puede infectar el tracto genital femenino durante varios años con un bajo perfil de expresión, lo que genera una muy pobre respuesta inmune innata (Wright y Richard, 1989). Cuando logra establecerse, una respuesta inmunológica adaptativa es más eficiente, y por eso, aunque la tasa de infección es muy alta, no todas las infecciones progresan hasta CaCu (Franco *et al.*, 1999).

Pero cuando la infección es persistente y el sistema inmune está deprimido, puede darse lugar a la integración del genoma del HPV a la célula hospedera y eventualmente, al desarrollo de una neoplasia que puede derivarse hacia tumores avanzados y finalmente, hasta metástasis (Zur, 2000).

Potencialmente todas las proteínas del HPV pueden ser blancos antigénicos para generar una respuesta inmune, no obstante, de acuerdo con el ciclo biológico del virus, algunas de sus proteínas pueden quedar más accesibles al reconocimiento inmune. En las etapas tempranas de infección viral o en las etapas iniciales del desarrollo del cáncer cervical, cuando existe una amplia formación de viriones, las proteínas de la cápside (primordialmente L1) son los principales antígenos blanco accesibles para la respuesta inmune humoral y celular contra la infección por HPV (Zur, 2002), mientras que las oncoproteínas E6 y E7, que se expresan abundantemente en estadios tardíos, constituyen los principales blancos de la respuesta inmune en el cáncer cervical en etapas avanzadas (Frazer, 2004).

Además de que el HPV no estimula una respuesta inflamatoria usa estrategias deliberadas para evitar ser detectado (Frazer, 2004). En los cánceres cérvico-uterinos asociados con este virus frecuentemente se encuentra una pérdida o disminución de la expresión alélica de las moléculas clase I del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), que están íntimamente involucradas en el reconocimiento y presentación de antígenos de superficie. Esto podría explicar por qué algunos cánceres escapan a la vigilancia inmunológica mediada por células (Serman, 2002).

De hecho el estudio de la inmunidad celular dirigida hacia proteínas del HPV ha sido enfocado principalmente hacia estas proteínas de transcripción temprana, las cuales al ser sintetizadas endógenamente quedan disponibles en el citosol para ser degradadas a péptidos y posteriormente presentados por moléculas MHC clase I en la membrana celular (Feltkamp *et al.*, 1993).

### **Complejo principal de histocompatibilidad (MHC).**

El factor más importante en el progreso de un carcinoma vaginal es la respuesta inmune celular. En esta respuesta el Complejo principal de Histocompatibilidad (MHC en vertebrados específicamente, o HLA en humanos) tiene la gran capacidad de presentar gran variedad de antígenos tumorales y virales, que son reconocidos por los linfocitos T, los cuales actúan de una manera muy precisa para eliminar el tumor (Garrido *et al.*, 1993).

El complejo principal de histocompatibilidad está ubicado en el brazo corto del cromosoma 6 en el humano, e incluye por lo menos 200 genes (Figura 4). El complejo se encuentra dividido en tres regiones: Clase II (con los genes HLA-DR, -DP y -DQ), clases III (que incluye los genes que codifican las proteínas del complemento y factor de necrosis tumoral), y clase I (con los genes HLA-A, B, -C, -E, -H, -G y -F) (Fig. 4) (Moss y Khanna, 1999).

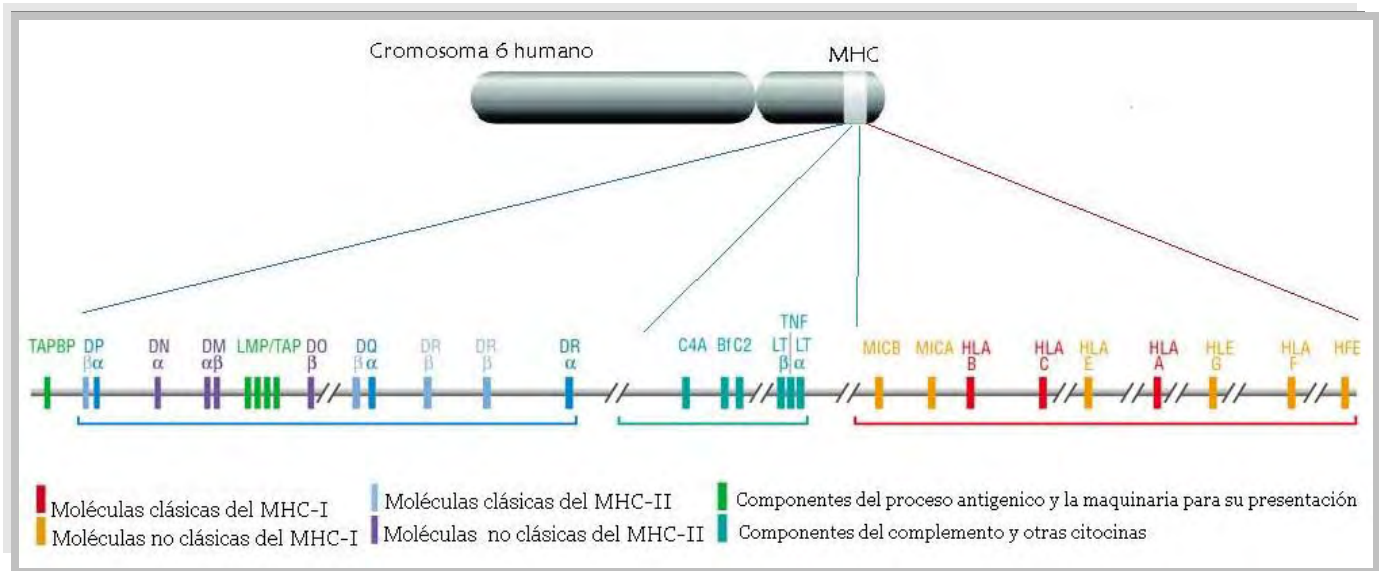


Figura 4. Mapa geonómico; incluye los genes que codifican las moléculas del MHC clásicas y no clásicas. En MHC-III el concepto de clásico y no clásico no se aplica. Tomado de: ([http://courses.cm.utexas.edu/jrobertusch339koverheads-1ch7\\_MHC-proteins](http://courses.cm.utexas.edu/jrobertusch339koverheads-1ch7_MHC-proteins)).

## MHC-I

Las moléculas del MHC-I se expresan de manera constitutiva en prácticamente todas las células nucleadas, este patrón de expresión está ligado a las funciones de las células T. Debido a que los virus pueden infectar cualquier célula nucleada, todas las células de este tipo deben presentar los ligandos que reconocen las células T. Así, proporcionan un sistema de presentación de antígenos virales (Apple y Erlich, 1996).

En las moléculas de clase I, cada familia génica codifica para dos cadenas pépticas heterodiméricas denominadas cadena pesada (cadena alfa) y liviana (Beta 2 microglobulina, codificada fuera del complejo), la cadena pesada (44 a 47 kDa) se orienta de manera que alrededor de las tres cuartas partes del polipéptido se extienden en el medio extracelular, un pequeño segmento atraviesa la membrana y el extremo carboxiterminal se localiza en el citoplasma. Los segmentos alfa 1 y alfa 2 del extremo amino terminal interactúan y forman el sitio de unión al péptido, su tamaño es suficientemente grande para unir péptidos de 8 y 11 residuos de aminoácidos en una conformación flexible y extendida, los extremos

de esta hendidura están cerrados de manera que péptidos de mayor tamaño no puedan encajar (Figura 5) (Andersson *et al.*, 1994).

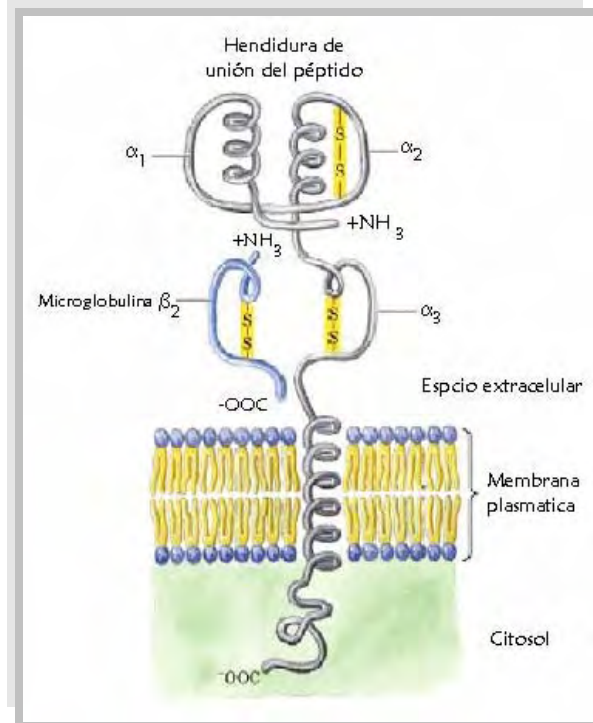


Figura 5. Esquema de la molécula MCH-I tomado de: ([http://pcourses.cm.utexas.edu/jrobertusch339koverheads-1ch7\\_MHC-proteins](http://pcourses.cm.utexas.edu/jrobertusch339koverheads-1ch7_MHC-proteins)).

## Procesamiento de antígenos.

En el contexto MHC clase I, un gran número de moléculas participan en el proceso conocido como procesamiento y presentación de antígenos: primero el proteasoma que es una unidad multicatalítica localizada en el citosol de la célula, genera péptidos a través de la degradación de proteínas intracelulares. El proteasoma está compuesto por una familia de 14 subunidades diferentes pero homólogas con una masa molecular de entre 20 y 35 kDa, los cuales se clasifican en subunidades tipo  $\alpha$  y  $\beta$ , tiene una estructura cilíndrica altamente conservada con dos anillos externos de subunidades  $\alpha$  y dos anillos internos de subunidades  $\beta$ . Tres de las subunidades  $\beta$  llamadas LMP2, LMP7 y MECL1, cuyos genes codifican en la región del MHC clase II, pueden ser inducidas por interferón  $\gamma$  para formar el inmunoproteasoma desplazando a las subunidades originales X, Y y Z, estos cambios



inducidos por el interferón son responsables de los cambios funcionales en la actividad catalítica y el procesamiento de antígenos (Heemels y Ploegh, 1993).

Una vez generados los péptidos son llevados desde el citosol hacia el retículo endoplásmico por medio de la proteína transportadora asociada al procesamiento de antígenos llamada TAP que es un complejo heterodimérico transportador dependiente de ATP compuesto por las unidades TAP1 y TAP2, cuyos genes se codifican en el MHC y son fuertemente inducidas por el interferón; cada una esta constituida por una cadena polipeptídica con seis dominios transmembranales y un dominio carboxilo-terminal de unión a ATP, la proteína TAP tiene una alta especificidad y selecciona péptidos del tamaño correcto y con los residuos amino y carboxilo-terminal adecuados. Se ha demostrado la preferencia del TAP hacia péptidos de 8 a 13 aminoácidos en presencia de ATP y dado que esta es la longitud de los péptidos que se unen a moléculas clase I, se puede correlacionar la longitud con la especificidad de los TAP (Momburg *et al.*, 1994 y Neefjes y Momburg, 1993).

Existen moléculas chaperonas residentes en el retículo endoplásmico como: calnexina, calreticulina, BiP (proteína de unión), ER60 y tapasina, las cuales estabilizan a las moléculas MHC clase I para su ensamblaje (Koopman *et al.*, 1997; Van *et al.*, 1999; Lehner y Cresswell, 1996) en este proceso la cadena pesada  $\alpha$  transmembranal, interactúa con las moléculas chaperonas y es doblada para unirse a la cadena ligera  $\beta$ 2-microglobulina ( $\beta$ 2m), después de ser cargada con el péptido forma el complejo de la molécula MHC- $\beta$ 2m-péptido que posteriormente es transportado desde el retículo endoplasmático hacia el aparato de Golgi, donde es englobada en una vesícula secretora y posteriormente es transportada a la membrana citoplasmática para fusionarse con ella y ser expuesta en la superficie y así presentar el péptido asociado a la molécula MHC, hacia los linfocitos T CD8<sup>+</sup> (Figura 6) (Zinkernagel y Doherty 1997).

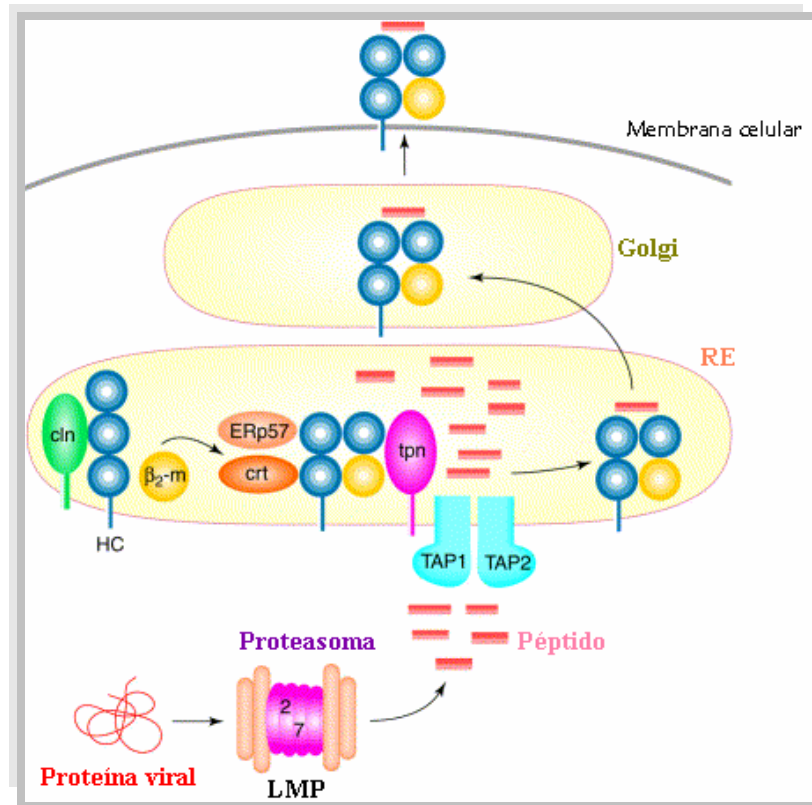


Figura 6. Procesamiento y presentación de antígeno. Tomado de:  
<http://www.bio.davidson.edu/Courses/immunology/Students/spring2006/Maluskitapasinimages0>

Las células presentadoras de antígenos tienen como objetivo capturar y procesar antígenos dentro de ella y presentarlos en la superficie celular en forma de péptidos a los linfocitos T quienes reconocen y eliminan el antígeno presentado. Estos antígenos pueden derivar de patógenos que se replican dentro de las células como virus o bacterias intracelulares o de patógenos y sus productos que son internalizados a las células por endocitosis. Los péptidos se liberan en la superficie celular para ser presentados por glicoproteínas especializadas llamadas moléculas MHC, estas glicoproteínas codifican en una enorme región donde se agrupan genes que han sido identificados por su potente efecto en la respuesta inmune (Janeway *et al.*, 2005).

El carcinoma de cervix es derivado de epitelios HLA-I+ (Cromme *et al.*, 1993), y la expresión deficiente de moléculas clase I del MHC en la membrana, es un mecanismo

característico en las células malignas para evadir la respuesta inmunológica mediada por los linfocitos T citotóxicos (Janeway *et al.*, 2005).

Existen varios mecanismos que pueden alterar la expresión del MHC-I, como son la inhibición de transporte o glicosilación de HLA-I; mutación en los genes TAP; mutación o arreglos en el gen  $\beta$ -2-microglobulina; cambios en la metilación de la estructura de los genes clase I; alteraciones en la unión de los factores transcripcionales y la regulación negativa de moléculas HLA-I por oncogénesis o por el HPV (Cromme *et al.*, 1993).

La expresión de moléculas HLA-I en células de cáncer cervical se observa disminuida en el 60% de los tumores con metástasis, existiendo también una menor infiltración de linfocitos en el tejido, lo que sugiere que la pérdida de la expresión de moléculas HLA-I puede representar un mecanismo de escape de la respuesta mediada por linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos y producir un aumento en el potencial metastático de las células tumorales (Hilders *et al.*, 1995).

Además la mayoría de los tumores de cáncer cérvico-uterino presentan deficiencias en la expresión de componentes de la maquinaria del procesamiento antigénico (LMP-2, LMP-7, LMP-10, TAP-I, TAP-2) (Ritz *et al.*, 2001 y Fowler *et al.*, 2004), afectando la presentación de antígenos tumorales en la membrana celular y por tanto en el reconocimiento inmune por linfocitos T citotóxicos (Brady *et al.*, 2000 y Hilders *et al.*, 1995).

### **Epigenética y cáncer.**

La epigenética es un fenómeno bien establecido que juega un papel importante en los procesos biológicos como el desarrollo embrionario, la biología del cáncer, la respuesta del sistema inmune entre otros (Jablonka y Lamb, 2002).

En estudios recientes han descrito que los mecanismos epigenéticos de control transcripcional, juegan un papel de gran importancia en la desactivación de genes

responsables de la regulación del crecimiento y diferenciación celular, así como de genes que participan en el reconocimiento inmune de las células tumorales, incluyendo a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad y moléculas del procesamiento de antígenos (Maio *et al.*, 2003). Los mecanismos epigenéticos más estudiados son la metilación del DNA y la desacetilación de histonas (Spencer y Davie, 1999).

### Metilación del DNA.

La metilación del DNA es un proceso importante en la regulación epigenética. Consiste en la incorporación de un grupo metilo en la citosina del dinucleótido CpG (Figura 7). Participa en la regulación de etapas tempranas del desarrollo, así como en la inmovilización de transposones, manteniendo una mayor estabilidad (Bird, 2002).

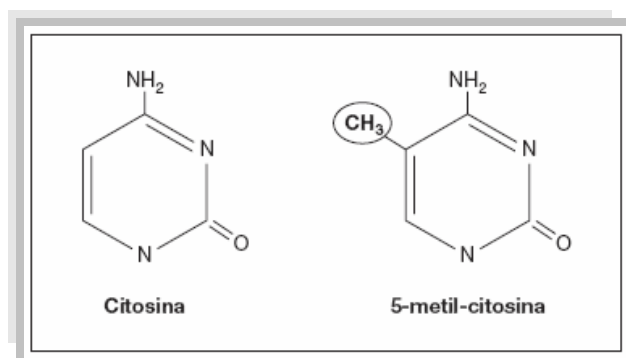


Figura 7. La metilación del DNA ocurre por la adición enzimática de un grupo metilo en el carbono 5 del nucleótido citosina. Tomado de: (Gómez JR, *et al.*, 2005).

La mayoría de las 5-metilcitosinas (5 mC) en el DNA humano están presentes en los dinucleótidos 5'-CpG-3' (citosina-fosfato-guanina, CpG), los cuales no se encuentran uniformemente distribuidos en el genoma ya que han sido eliminados progresivamente de éste a lo largo de la evolución (Ng *et al.*, 1999). En el 98% del genoma, los dinucleótidos CpG aparecen una vez cada 100 dinucleótidos y se encuentran fuertemente metilados con objeto de estructurar la cromatina (Bestor y Tycko, 1996).

La metilación puede regular la expresión génica por dos mecanismos:

- Por interferencia directa en la unión de los factores de transcripción con secuencias blanco, evitando su activación.
- La unión de proteínas que reconocen al DNA metilado, conocidas como "Methyl-CpG-binding proteins", que unen co-represores y éstos además reclutan desacetilasas de histonas, generando una cromatina altamente compactada (Bird y Wolffe, 1999).

Por contrario, pequeñas regiones del DNA que van desde 200 pb hasta varias kilobases, denominadas “islas CpG”, contienen la frecuencia esperada de dinucleótidos CpG (1 por cada 10 dinucleótidos) (Gardiner *et al.*, 1987 y Bird *et al.*, 1986). Estas áreas están protegidas de la metilación y se encuentran localizadas en las regiones promotoras proximales de cerca del 50-60% de todos los genes, siendo esta ausencia de metilación un requisito básico para la transcripción activa y normal funcionamiento de los mismos (Antequera y Bird, 1996).

La metilación de las regiones promotoras de los genes es, en la actualidad, el evento epigenético (alteración de la expresión de un gen sin que exista cambio en la secuencia normal de los nucleótidos que lo componen) mejor caracterizado de las células tumorales; se encuentra virtualmente en todos los tipos de neoplasias humanas y se asocia con el inapropiado silencio transcripcional y pérdida de función de estos genes (Herman y Baylin, 2003 y Das y Singal, 2004).

La metilación de genes relacionados con el cáncer aparece en la mayoría de las vías moleculares que caracterizan la actividad tumoral. Genes implicados en la regulación del ciclo celular, reparación del DNA, resistencia a drogas, diferenciación, apoptosis, angiogénesis, metástasis e invasión se encuentran patológicamente silenciados por metilación (Figura 8) (Belinsky, 1998 y Robertson y Wolffe 2000).



Figura 8. Papel central de la metilación del DNA en la conducta normal y tumoral de las células. Tomado de: (Gómez *et al.*, 2005).

En resumen, el silenciamiento por metilación del DNA de regiones de control de muchos genes supresores de tumor, cuya función es evitar el proceso de tumorigénesis en el humano; sugiere que tiene un papel importante en cualquier proceso maligno que lleva al desarrollo de cáncer. Y sobre este punto, además, surge la importancia de considerar a los inhibidores de la metilación, como posibles drogas con efectos terapéuticos, para mejorar incluso el efecto de las modalidades existentes como la quimio y la radioterapia (Jones y Laird, 1999).

### Acetilación de histonas.

Las histonas son proteínas básicas, ricas en arginina y lisina que juegan un papel estructural en la conformación de la cromatina. La cromatina es la estructura en la que el DNA se organiza y empaqueta en el núcleo de la célula eucarionte. La unidad primaria es el nucleosoma que está formado por un octámero de histonas con dos de cada una de las proteínas histónicas: H2A, H2B, H3 y H4. Un fragmento de 146 pares de bases (pb) de

DNA se arregla alrededor de cada octámero (Wolffe y Hayes, 1999). Las interacciones internucleosomales se ven favorecidas por la quinta histona, la histona H1 y otras proteínas no histónicas como las proteínas de alta movilidad electroforética (HMGs). Así, se organiza el nivel superior de la cromatina generado por la reunión de varios nucleosomas, y formando una hebra de 30 nm de diámetro. Cada hebra se reúne entre sí varias veces para generar otra de mayor grosor y formar parte de una cromátida de un cromosoma que representa el mayor nivel de estructuración de la cromatina (Figura 9) (Davie y Chadee, 1998).

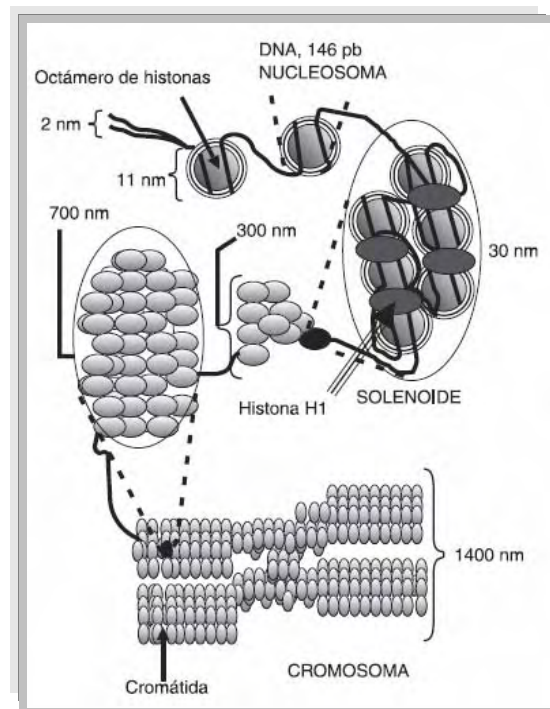


Figura 9. Niveles de organización de la cromatina en una célula eucarionte. El DNA se organiza con el octámero de histonas para formar el nucleosoma. Se indican las dimensiones en diámetro de diferentes niveles de organización de la cromatina. Tomado de: (Arenas y Recillas 2002).

Por otro lado, el remodelamiento de la cromatina que regula la expresión génica, está determinado principalmente por la interacción de dos grupos de enzimas, las desacetilasas (HDAC) y las acetiltransferasas de histonas (HAT) (Spencer y Davie, 1999).

Se sabe que la acetilación está relacionada con la regulación de la transcripción genética. Esta relación se corroboró al observar que los complejos activadores de la transcripción

poseen funciones de acetiltransferasas de histonas (Kuo *et al.*, 1998) y facilita la unión de los factores de transcripción a las secuencias de DNA en las zonas promotoras de los genes, fomentando una estructura abierta de la cromatina (Lefebvre *et al.*, 1998). Incluso, la acetilación incrementa la solubilidad de la cromatina en medios más acuosos (Perry y Chalkley, 1982).

Por otro lado, los complejos co-represores poseen actividad de desacetilasas de histonas y confieren represión transcripcional (Wong *et al.*, 1998). De esta manera, el proceso de acetilación de histonas es dinámico y los residuos de lisinas modificados hacia el extremo amino-terminal, son hiperacetilados con vidas medias de pocos minutos en zonas de cromatina transcripcionalmente activa (Zhang *et al.*, 1988).

La alteración de la estructura de la cromatina por un desbalance de la acetilación de histonas puede dar origen a enfermedades neoplásicas como las leucemias (Redner *et al.*, 1999).

Las alteraciones epigenéticas en las moléculas que participan en el reconocimiento inmunológico son comúnmente observadas en diversos tumores humanos (Seliger *et al.*, 2000; Van *et al.*, 2004). Por ejemplo, la inactivación de la transcripción de genes que codifican para antígenos de histocompatibilidad HLA-I, debido a la hipermetilación del DNA, ha sido demostrada en carcinoma de esófago (Van *et al.*, 2004, Nie *et al.*, 2001). De igual manera, la desacetilación de histonas en genes que promueven la transcripción de las moléculas de histocompatibilidad HLA, como son los genes CIITA, tiene un efecto primordial en la disminución de la expresión de moléculas HLA clase I y II en las células tumorales. Actualmente se ha demostrado que el uso de drogas anti-epigenéticas en células malignas puede revertir dichas alteraciones. Por ejemplo el tratamiento de células de melanoma con el agente desmetilante 5-aza-2'-desoxicitidina, ha mostrado tener un efecto significativo al aumentar la expresión constitutiva de antígenos HLA clase I (alelos HLA A1 y A2); así como de moléculas co-estimuladoras B7.1 y moléculas de adhesión intracelular ICAM-1 y LFA-3, las cuales son importantes en el reconocimiento



inmunológico de las células malignas (Coral *et al.*, 1999). Asimismo, el uso de tricostatina A, un agente inhibidor de desacetilasas, induce la expresión de promotores CIITA para las moléculas HLA clase I y II en varias líneas celulares tumorales deficientes en HLA clase I y II (Morimoto *et al.*, 2004; Satoh *et al.*, 2004; Kanaseki *et al.*, 2003; Magner *et al.*, 2003).

Se ha establecido que algunos virus pueden encontrar diferentes maneras para regular la expresión de sus genes a través de la modulación de la metilación de DNA, así un virus puede imponer silencio con la activación de sus genes de una manera que favorece el establecimiento de una infección persistente y la evasión de la respuesta inmune (Tao *et al.*, 1993).

La reactivación de genes supresores de tumor que han sido silenciados por un factor epigenético, como el gen promotor de la metilación es un blanco molecular muy atractivo para la terapia del cáncer. Los inhibidores de la metilación de DNA han demostrado la habilidad de inhibir la hipermetilación, la restauración de genes supresores de tumor y ejerce los efectos antitumor (Dueñas *et al.*, 2005).

### **Hidralazina y ácido valproico.**

La hidralazina (H), uno de los primeros agentes antihipertensivos orales usados que reduce la resistencia periférica directamente por la relajación del músculo de la capa celular en los vasos arteriales, ha sido utilizado para el manejo de trastornos hipertensivos y fallas cardíacas, no obstante, su uso actual esta limitado sólo a trastornos hipertensivos durante el embarazo (Arce *et al.*, 2006).

A pesar de numerosos estudios con el fármaco, su mecanismo de acción ha permanecido desconocido, pero se ha sugerido que la hidralazina puede modular los efectos de ciertos compuestos como las purinas, liberados por el nervio simpático, y mediante la inhibición de  $Ca^{+}$  intracelular en células de los vasos sanguíneas. La mayoría de sus efectos son confinados al sistema cardiovascular. La disminución de la presión sanguínea después de la

administración de hidralazina, se asocia con un decremento selectivo en la resistencia cardiovascular en la circulación coronaria, cerebral y renal, y un efecto más pequeño en piel y músculo. El efecto hipotensivo de hidralazina en plasma ocurre entre los 30-120 minutos después de la ingestión. Aunque su vida media en plasma es aproximadamente 1 hora, la duración del efecto hipotensivo puede durar hasta 12 horas; no hay una clara explicación para esta discrepancia (Arce *et al.*, 2006).

Existen 2 tipos de efectos secundarios que ocurren después del uso de la hidralazina. El primer tipo es una extensión del efecto farmacológico de la hidralazina, incluye dolor de cabeza, náusea, enrojecimiento, hipotensión, palpitación, taquicardia, aturdimiento y angina de pecho; la hidralazina puede producir retención de sal con congestivo desarrollo de falla cardíaca. El segundo tipo de efecto secundario es causado por reacciones inmunológicas, de las cuales la inducción del fármaco al síndrome semejante al lupus es el más común (Arce *et al.*, 2006).

La H es también un inhibidor de la metilación de DNA (Segura *et al.*, 2003; Angeles *et al.*, 2005 y Arce *et al.*, 2006) y su capacidad desmetilante y reactivante de genes supresores de tumor ha sido demostrada en un estudio de fase clínica I en pacientes con cáncer cervical (Zambrano *et al.*, 2005).

Por su parte el ácido valproico (AV), una cadena de ácido graso ramificada de 8 carbonos, conocida como una droga antiepiléptica como lo ha demostrado durante 35 años de uso. Su vida media en suero es de 9-18 horas y es administrado oralmente (Chávez *et al.*, 2005).

Los efectos secundarios observados en pacientes durante el tratamiento con ácido valproico son: la somnolencia, vértigo y temblor así como molestia gastrointestinal. Los efectos más adversos son la teratogénesis cuando el fármaco es suministrado durante el embarazo (Dueñas *et al.*, 2007).

En estudios clínicos, se ha reportado que la hidralazina ha sido tolerada por los pacientes y además no presenta efectos tóxicos y se logra satisfactoriamente la reexpresión de genes importantes para la homeostasis celular (Zambrano *et al.*, 2005). Mientras que a las personas que se les ha suministrado ácido valproico en un estudio clínico fase I presentan fatiga, pero sin que esta interfiera en las actividades diarias de los pacientes (Chávez *et al.*, 2005).

Se ha reportado recientemente que causa la hiperacetilación de los extremos N-terminales de las histonas H3 y H4 e inhibe la actividad de las desacetilasas de histonas muy probablemente por la unión al centro catalítico de las enzimas, bloqueando el acceso del substrato (Phiel *et al.*, 2001 y Kramer *et al.*, 2003).

La habilidad de AV para inhibir la actividad desacetilasa en tumores sólidos ha sido recientemente demostrada en pacientes con CaCu y cuando es usado en combinación con H, estos agentes regulan positivamente la expresión de genes supresores de tumor en las células tumorales tratadas (Chávez *et al.*, 2005).

### **Interferón- $\gamma$ .**

Los interferones (IFN) son un grupo extraordinario de proteínas cuya actividad antiviral condujo a su descubrimiento hace casi 50 años. En estudios subsecuentes demostraron que los IFN's poseen otros efectos, que incluyen la capacidad para inducir diferenciación celular y participar en funciones inmunoregulatoras (Goldsby *et al.*, 2006).

Los interferones han sido clasificados en dos categorías:

- El IFN tipo I, es inducido como el resultado de una infección viral, y agrupa a la familia del IFN- $\alpha$  y al IFN- $\beta$ .

➤ EL IFN tipo II, es inducido inmunológicamente y a través del estímulo inflamatorio. Es sintetizado exclusivamente por linfocitos T y por células asesinas naturales y conocido como IFN- $\gamma$  (Weissmann y Weberbh, 1986).

El interferón  $\gamma$  se descubrió por su capacidad para inducir a las células a bloquear o a inhibir la replicación de una amplia variedad de virus. La actividad antiviral es una propiedad que comparte con el IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ . Sin embargo, a diferencia de estos otros interferones, el IFN- $\gamma$  tiene una función central en muchos procesos inmunorreguladores como son aumentar la expresión de moléculas del MHC clase I de muchos tipos celulares y clase II en células que presentan antígenos, como macrófagos y células dendríticas (Goldsby *et al.*, 2006).

## **Justificación.**

En México, la infección por virus del papiloma humano y la incidencia de cáncer cérvico-uterino se incrementa día a día, debido a que la infección por HPV es asintomática y se mantiene latente por períodos largos de tiempo (Muñoz y Bosch, 1997; Muñoz *et al.*, 2003). El CaCu representa en nuestro país la principal causa de muerte por tumores malignos en mujeres, con un 14.4% del total, representando más de 4000 muertes por año (Registro Histopatológico SS, México, 1999; INEGI, 2002).

La alta asociación etiológica de CaCu con la infección por el HPV (>99.7%) ha llamado a proponer que proteínas derivadas de HPV de alto riesgo como son los tipos 16 y 18, sean utilizados en la composición de vacunas contra esta enfermedad (Walboomers *et al.*, 1999).

Aún cuando se realizan importantes estudios para evaluar la eficacia de propuestas de vacunación, como lo son las partículas tipo virales (VLPs), que mimetizan la estructura viral sin efectos nocivos, y están siendo utilizadas en la inmunidad profiláctica (Koutzky *et al.*, 2002, Billich, 2003); o el uso de las proteínas E6 y E7 de HPV como antígenos en los componentes de las vacunas terapéuticas (Frazer, 2004 y Zur, 2002), quedan muchos aspectos por resolver respecto de la naturaleza de la respuesta inmune efectiva inducida en contra del HPV. Uno de esos aspectos, entre otros, es mejorar el reconocimiento y rechazo de las células tumorales blanco. Se conoce que la mayoría de los tumores de cáncer cérvico-uterino presentan defectos en las moléculas que conducen a un eficiente procesamiento y presentación de antígenos, lo cual favorece la evasión del reconocimiento inmune. Asimismo varios de estos defectos han sido atribuidos a mecanismos epigenéticos como son la metilación de genes o la desacetilación de histonas que conducen a la transcripción deficiente de moléculas participantes en este proceso.

Recientemente se ha demostrado la capacidad del ácido valpróico (agente inhibidor de desacetilasas) para inhibir la actividad desacetilasa en pacientes con CaCu, y cuando es

usado en combinación con hidralazina (agente desmetilante), estos agentes regulan positivamente la expresión de genes supresores de tumor en las células tumorales tratadas (Chávez *et al.*, 2005); e incrementan el reconocimiento inmune de células tumorales de cáncer cérvico-uterino mediante linfocitos T citotóxicos (Mora *et al.*, 2006).

Con base en estos trabajos, en el presente estudio se propone analizar la expresión de moléculas que participan en la vía del procesamiento y presentación de antígenos por moléculas HLA-I en las células tumorales de cáncer cérvico-uterino tratadas *in vitro* con ácido valproico e hidralazina.

Los resultados de este trabajo serán importantes para evaluar el uso de estos medicamentos en el tratamiento inmunoterapéutico del cáncer cérvico-uterino.

## **Hipótesis.**

La deficiencia en la expresión de moléculas participantes en el procesamiento y presentación de antígenos es un proceso conocido en células tumorales de cáncer cérvico-uterino. Además, se sabe que mecanismos epigenéticos como la hipermetilación de genes e hiperacetilación de histonas en tumores, afectan la expresión de genes que codifican para moléculas importantes en el reconocimiento inmune de las células tumorales. En estudios previos se ha mostrado que el agente desmetilante, hidralazina, en combinación con el inhibidor de desacetilasas, ácido valproico, regulan positivamente la expresión de genes supresores de tumor e incrementan el reconocimiento inmune en células de CaCu tratadas, sugiriendo un incremento en la expresión de moléculas participantes en el procesamiento de antígenos. En consecuencia, se espera que en células tumorales de cáncer cérvico-uterino, tratadas *in vitro* con los fármacos hidralazina y ácido valproico, se aumente la expresión de moléculas TAP-1, TAP-2, LMP-2, LMP-7 y Tapasina además de HLA-I.

## **Objetivo general.**

Analizar la expresión de moléculas relacionadas con la presentación (HLA-I) y del procesamiento de antígenos (TAP-1, TAP-2, LMP-2, LMP-7 y Tapasina, en células de cáncer cérvico uterino tratadas *in vitro* con el agente desmetilante, hidralazina (H), en combinación con el inhibidor de desacetilasas, ácido valproico (AV).

## **Objetivos particulares.**

- Evaluar la expresión de moléculas HLA-I en líneas celulares derivadas de cáncer cervical tratadas *in vitro* con hidralazina y ácido valproico y en combinación con IFN- $\gamma$ .
  
- Evaluar la expresión de las moléculas del procesamiento (TAP-1, TAP-2, LMP-2, LMP-7 y tapasina) en líneas celulares derivadas de cáncer cérvico uterino tratadas con hidralazina y ácido valproico y en combinación con IFN- $\gamma$ .



## **Métodos.**

### **Muestras biológicas.**

Se trabajó con seis líneas celulares derivadas de cáncer cérvico uterino:

- Vivo y C33A (HPV-).
- Caski y Siha (HPV16+).
- Hela e Inbl (HPV18+).

Las células fueron cultivadas en condiciones de esterilidad con medio de cultivo consistente en RPMI-1640 de GibcoBRL (Life Technologies) suplementado con suero fetal de bovino GibcoBRL (Life Technologies) al 10% y mantenidas bajo condiciones reguladas en una incubadora (Forma Scientific) a 37°C con 5 % de CO<sub>2</sub>.

### **Tratamiento de las líneas celulares.**

Las líneas celulares fueron cultivadas *in vitro* durante 5 días bajo los siguientes tratamientos:

- Sin tratamiento, únicamente con medio de cultivo.
- Con Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) 100ng/ml durante 48 hrs.
- Con hidralazina (H) 10 $\mu$ M durante 120hrs y con ácido valproico (AV) 1mM en las últimas 48 hrs de cultivo.
- Con la combinación de H+AV+IFN- $\gamma$ , H durante 120hrs, AV e IFN- $\gamma$  en las últimas 48 hrs de cultivo.

Los tiempos y las dosis de fármacos utilizados en los cultivos celulares fueron los mismos que utilizaron Segura *et al.*, en el 2003 para el caso de la hidralazina; Chávez *et al.*, en 2005 para el ácido valproico y de Mora *et al.*, 2006, para el caso de IFN- $\gamma$ .

El análisis de la expresión de moléculas participantes en el procesamiento y presentación de antígenos, se llevó a cabo por medio de tinciones inmunocitoquímicas, de acuerdo con el protocolo anexo en el kit DAKO LSAB + Kit, Peroxidase (DAKO LABS<sup>®</sup>+ Kit, HRP, USA.).

Además, se realizó una citometría de flujo para el análisis de la expresión de moléculas HLA-I en la membrana de las células.

### **Citometría de flujo.**

Después de los tratamientos con los diferentes fármacos:

1. Se colocaron  $1 \times 10^6$  células/por pozo en una placa de 96 pozos de fondo U.
2. Se lavaron las células con solución salina de fosfatos y suero fetal de bobino al 3% (PBS-SFB) y se centrifugaron a 3500 rpm a una temperatura de 4°C por 5 minutos desechando el sobrenadante.
3. Se incubaron las células por 30 minutos a 4°C con 100 $\mu$ l de un anticuerpo específico (W6/32) que reconoce la porción constante de las moléculas HLA clase-I a una concentración de 10 $\mu$ g/ml en solución de PBS-SFB.
4. Se centrifugaron las células y se les dio dos lavados con PBS-SFB como se describe en el paso 2.
5. Nuevamente se las células fueron incubadas pero esta vez con 100 $\mu$ l de un anticuerpo secundario marcado con isotiocianato de fluoresceína (Fitc-Goat antimouse IgG Zymed Laboratorios Invitrogen immunodetection) (dilución 1:100) por 30 minutos a 4°C.
6. Se centrifugan las células y se lavan como en el paso 2.

7. Por último las células se colocaron en tubos de plástico con 200µl de solución PBS-SFB y con 200µl de paraformaldehído al 4% para fijar las células y realizar su análisis en un citómetro de flujo (FACScalibur Becton Dickinson).

### **Tinción inmunocitoquímica de las líneas celulares.**

Después de los tratamientos, las células fueron colocadas en portaobjetos con 8 pozos ( $2.5 \times 10^4$  células por pozo) (LAB-TEK, NUNK), para su adherencia. Una vez adheridas, las células se lavaron con PBS dos veces, y posteriormente se fijaron con acetona fría por 2 minutos y se volvieron a lavar con PBS. Para la tinción inmunocitoquímica se realizó lo siguiente:

1. Se retiró el exceso de PBS y se agregó a las células unas gotas de amortiguador de bloqueo y permeado (Apéndice 1), cuidando de que cubriera perfectamente toda la superficie y se dejó reposar por 30min. Se enjuagó con solución de lavado (Apéndice 1).
2. Se retiró el exceso de solución de lavado y se agregó una gota de peróxido de hidrógeno al 3% y se dejó incubar durante 5 minutos. Se enjuagó con la solución de lavado y se colocó en una cámara húmeda.
3. Se eliminó el exceso de la solución de lavado y se secó cuidadosamente alrededor de la muestra. Se agregaron independientemente los anticuerpos primarios (anticuerpos contra HLA-I (hibridoma W6/32), LMP-2, LMP-7 y Tapasina (Sta. Cruz USA), TAP-1 y TAP-2 (anticuerpos policlonales de conejo donados por el Dr. Miguel Cruz del H. Especialidades CMN SXXI) y se incubaron durante 30 minutos cubriendo con un cuadrado de parafilm para evitar que los anticuerpos se secan. Se enjuagaron como en el paso 2 y se retiró el empaque que dividía cada pozo.
4. Inmediatamente se eliminó el exceso de solución de lavado y secó cuidadosamente, las muestras fueron tratadas con un anticuerpo secundario (LINK: que contiene inmunoglobulinas que reconocen anticuerpos de conejo, ratón y cabra en solución

de PBS con proteínas y ácida de sodio a 15mM), cubriendo con parafilm y se incubó durante 30 minutos. Se enjuagó como en el paso 2.

5. Se eliminó el exceso de solución de lavado y secó cuidadosamente, se agregó una gota o gotas de la enzima estreptavidina marcada con peroxidasa (estreptavidina-peroxidasa) se cubrió con parafilm y se dejó incubar durante 30 minutos. Se enjuagó como en el paso 2.
6. Se eliminó el exceso de solución de lavado y se secó cuidadosamente alrededor de la muestra. Se agregó una solución de sustrato-cromógeno (apéndice 1) cubriendo con parafilm y se dejó incubar por 5 minutos. Se enjuago delicadamente con agua destilada.
7. Se cubrió la muestra con Hematoxilina para contra teñir los núcleos, se incubó por 20 min. Se enjuagó delicadamente con agua destilada.
8. Se sumergió 10 veces en agua de amonia (apéndice 1).
9. Se colocó la muestra en agua destilada o desionizada por 2 minutos.
10. Las preparaciones se observaron en el microscopio a un aumento de 10X, 40X y 100X determinando mediante una coloración marrón la presencia de las moléculas HLA-I y del procesamiento de antígenos.

### **Control positivo y negativo.**

La línea linfoblástica T2 negativa para HLA-I, LMP2, LMP7, TAP1 TAP2 y Tapasina (Hosken *et al.*, 1990, Johnsen *et al.*, 1998), fue usada como control negativo de la expresión de estas moléculas; mientras que células de tejido normal de cervix de un donador sano fue utilizado como control positivo en ambas pruebas.

## **Resultados.**

### **Análisis de expresión de moléculas HLA-I.**

Se tiene reportado que la expresión de las moléculas HLA-I se encuentra generalmente disminuida en células tumorales de cáncer cérvico-uterino, debido entre otros factores a la metilación del DNA y a la desacetilación de histonas (Brady *et al.*, 2000), lo que representa un factor importante en la presentación de antígeno y por tanto en la evasión de la respuesta inmune. Con la finalidad de analizar si el tratamiento con el agente desmetilante hidralazina y el inhibidor de desacetilasas ácido valproico induce un incremento en la expresión de moléculas HLA-I en células tumorales de cáncer cérvico-uterino, seis líneas celulares fueron sometidas al tratamiento con estas drogas.

El análisis de la expresión de moléculas HLA-I se realizó mediante citometría de flujo. Para cada línea celular cultivada en condiciones normales (únicamente medio de cultivo), el valor de Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) obtenido después de la tinción con el anticuerpo monoclonal W6/32 fue asignado como el 100% y las tinciones celulares obtenidas en cada tratamiento como valores relativos a este.

En todas las líneas celulares se obtuvo un incremento en la expresión de moléculas HLA-I cuando fueron tratadas ya sea con IFN- $\gamma$  (inductor positivo de la expresión de moléculas HLA-I) o con los fármacos H+AV y con la combinación de H+AV+IFN- $\gamma$  (Fig. 9, A-H).

En la línea celular T2, utilizada como control negativo se observó un aumento marginal de la expresión de moléculas HLA-I, utilizando al IFN- $\gamma$ , H+AV y al H+AV+IFN- $\gamma$  siendo este del 2.8%, del 1.3% y del 10.1% respectivamente (Fig. 9, A). Por su parte, en el control positivo (células derivadas de cervix normal) se observó un incremento de expresión de las moléculas HLA-I de 20.5% con H+AV y de 52.1% con la combinación de H+AV+IFN $\gamma$  (Fig. 9, B).

En las células que fueron tratadas con IFN- $\gamma$  el menor aumento de la expresión de moléculas HLA-I fue del 9% en las células C33A (Fig. 10, C) y el mayor fue de 89.5% en la línea Inbl (Fig. 10, H).

La combinación de los fármacos H+AV en las células derivadas de cáncer cérvico-uterino también indujo un aumento diferencial en la expresión de moléculas HLA-I, desde el 22% en las células Vibo (Fig. 10, D) hasta 143% en la línea celular Inbl (Fig. 10, H). Cabe destacar que este tratamiento indujo un mayor incremento de HLA-I en las líneas celulares: C33, Siha e Inbl en comparación al obtenido cuando fueron tratadas con IFN- $\gamma$  (Fig. 10, C, F y H). En las líneas celulares Vibo, Caski y Hela el incremento de la expresión de HLA-I fue comparable cuando se aplicaron ambos tratamientos (Fig. 10, D, E y G).

En todas las líneas celulares el mayor incremento de la expresión de moléculas HLA-I fue obtenido cuando se utilizó la combinación H+AV+IFN- $\gamma$  (Fig. 9 y 10), desde el 48.3% en Hela hasta el 173% en las células Inbl (Fig.10, G y H). Es interesante mencionar que en tres líneas celulares (C33A, Vibo e Inbl) este incremento fue mayor al 100% en relación a las células sin tratamiento (Fig. C, D y H).

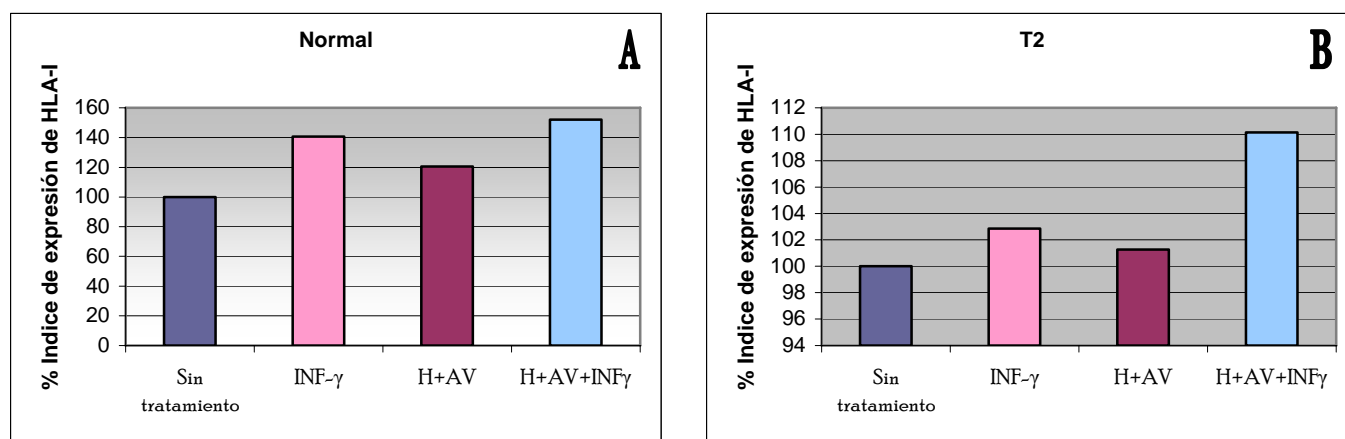


Figura 9. Expresión relativa de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (HLA-I) en la membrana de la línea celular T2 (control negativo) y las células derivadas de cervix normal (control positivo) tratadas con hidralazina (H) y ácido valproico (AV) e Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ).

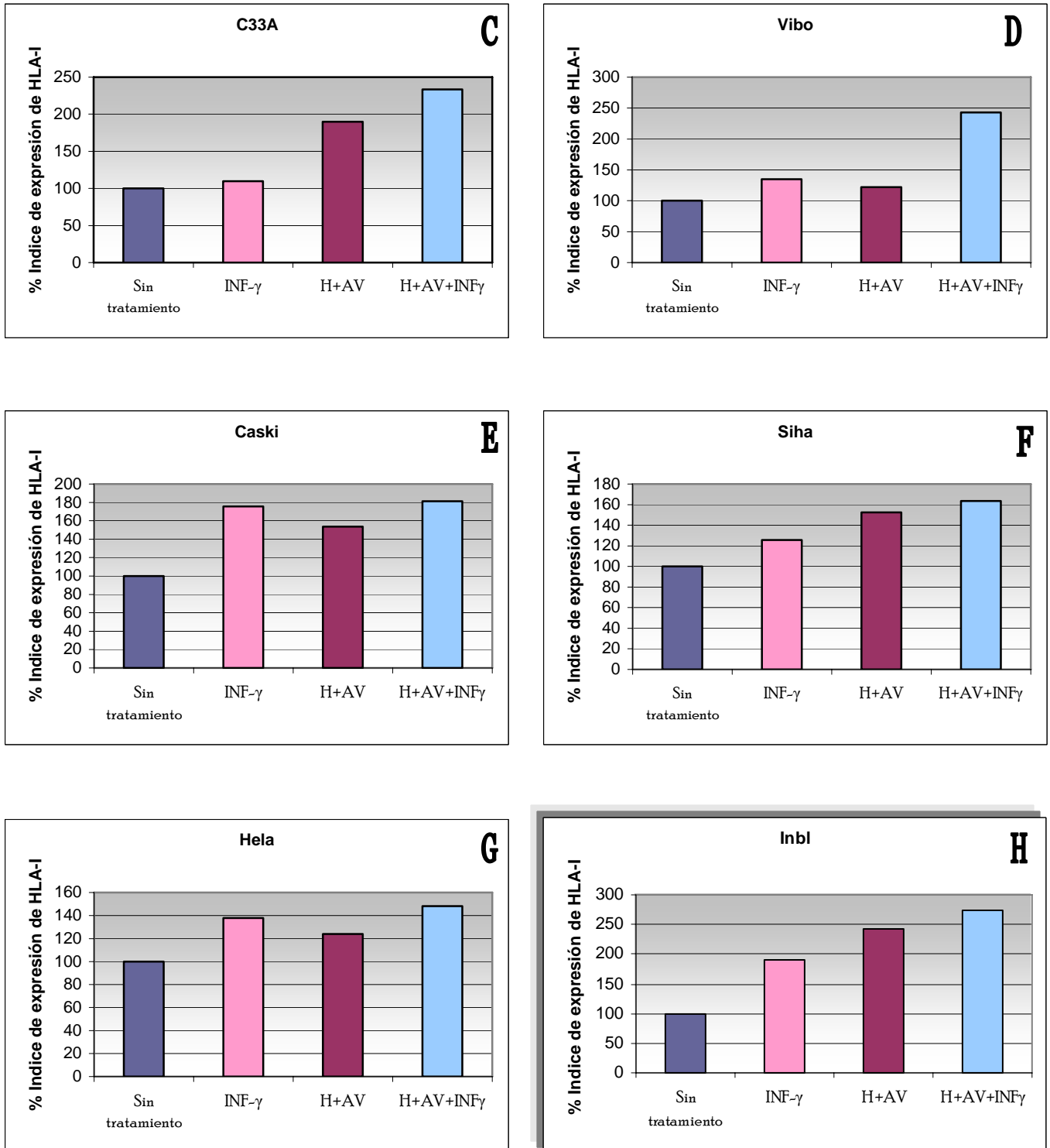


Figura 10. Expresión relativa de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (HLA-I) en la membrana de las líneas celulares de cáncer cérvico-uterino tratadas con hidralazina (H) y ácido valproico (AV) e Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ).

## Expresión de moléculas del procesamiento antigénico.

La baja expresión de moléculas HLA-I en células tumorales de cáncer cérvico-uterino ha sido asociada con la deficiencia de la expresión de moléculas del procesamiento antigénico (Seliger, 2002). Por lo que en este estudio se evaluó la expresión de moléculas presentadoras de antígenos (HLA-I) y del procesamiento antigénico (LMP-2, LMP-7, TAP-1, TAP-2 y TPN) en las seis líneas celulares tratadas con IFN- $\gamma$ , H+AV y H+AV+IFN- $\gamma$  mediante tinciones inmunocitoquímicas (Fig.11-18).

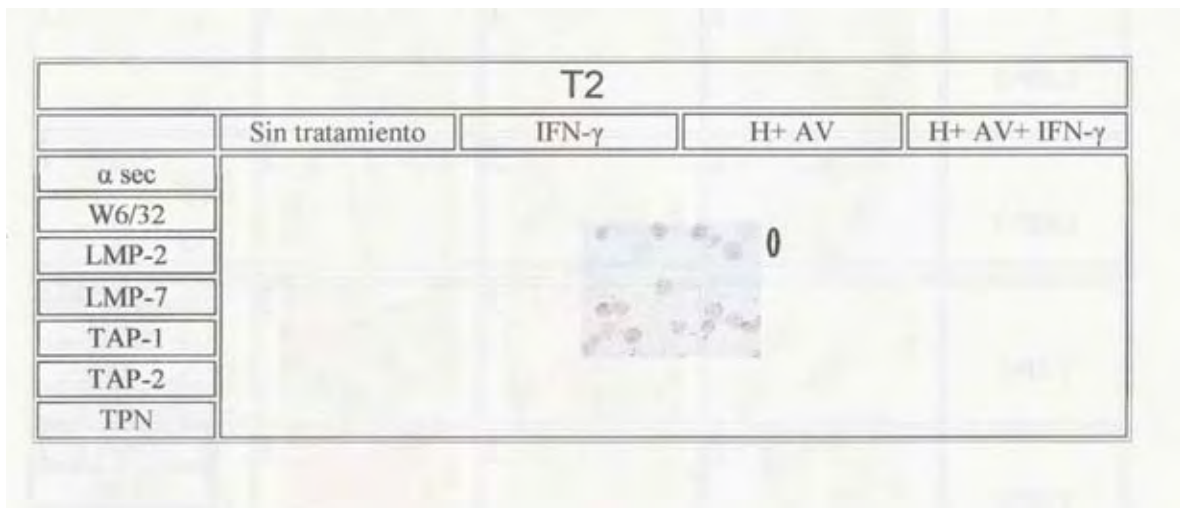


Figura 11. Expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (HLA-I) y de las moléculas participantes en el procesamiento de antígenos (LMP-2, LMP-7, TAP-1, TAP-2 y TPN) de la línea celular T2 (control negativo) tratadas con hidralazina (H), ácido valproico (AV) e Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) (40X).



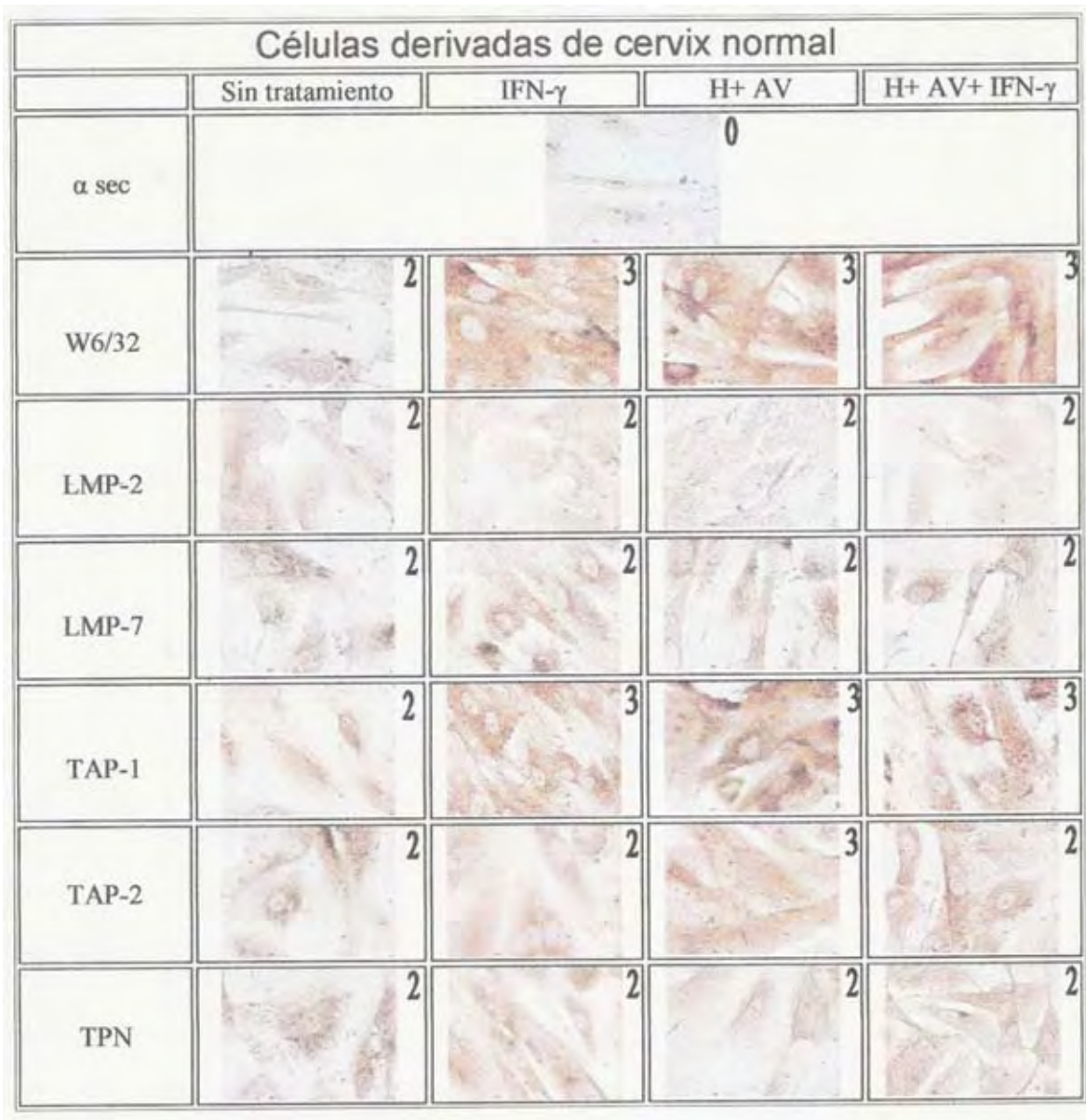


Figura 12. Expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (HLA-I) y de las moléculas participantes en el procesamiento de antígenos (LMP-2, LMP-7, TAP-1, TAP-2 y TPN) de células derivadas de cervix normal (control positivo) tratadas con hidralazina (H), ácido valproico (AV) e Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) (40X).

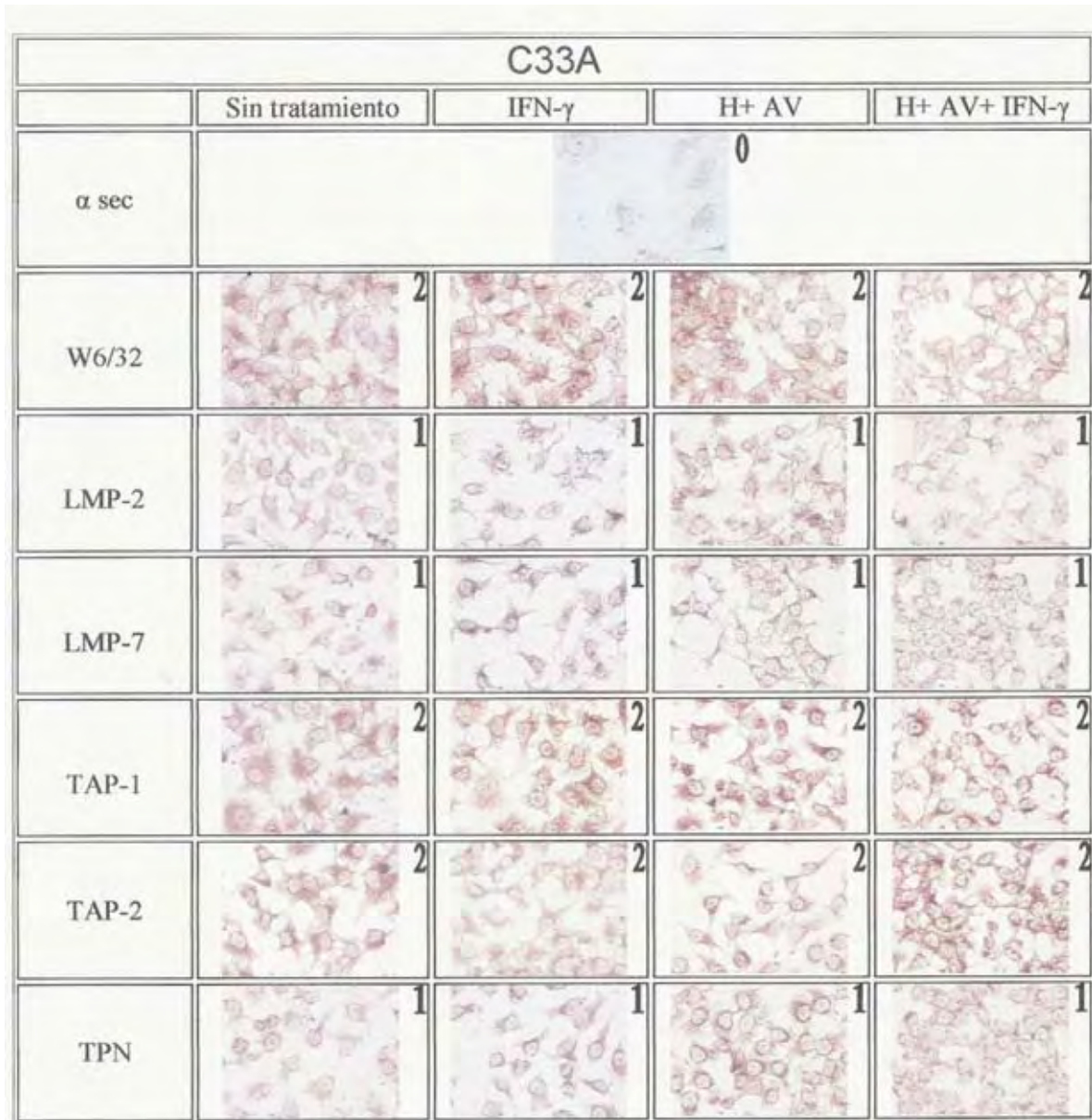


Figura 13. Expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (HLA-I) y de las moléculas participantes en el procesamiento de antígenos (LMP-2, LMP-7, TAP-1, TAP-2 y TPN) de la línea celular C33A tratada con hidralazina (H), ácido valproico (AV) e Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) (40X).

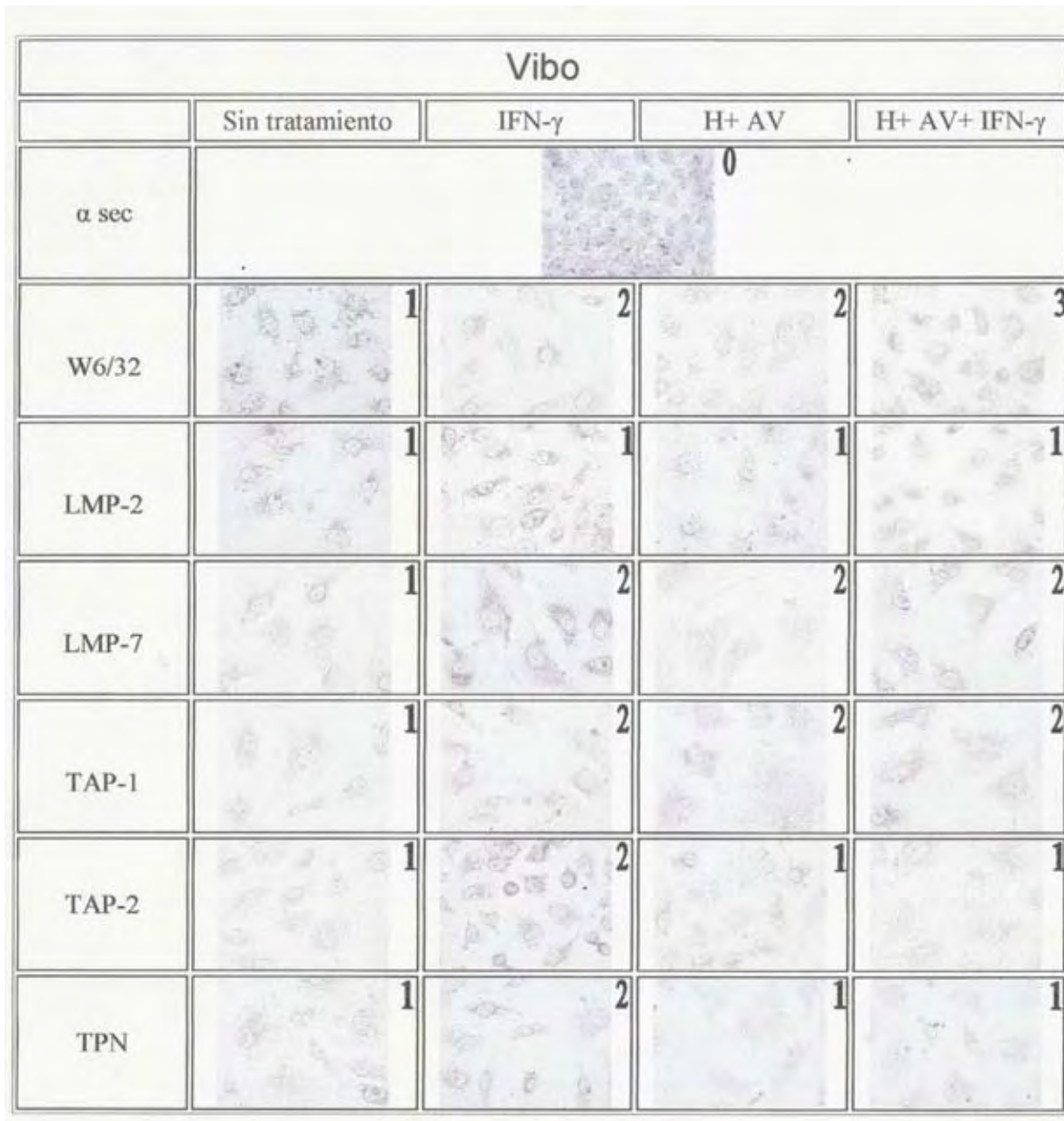


Figura 14. Expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (HLA-I) y de las moléculas participantes en el procesamiento de antígenos (LMP-2, LMP-7, TAP-1, TAP-2 y TPN) de la línea celular Vibo tratada con hidralazina (H), ácido valproico (AV) e Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) (40X).

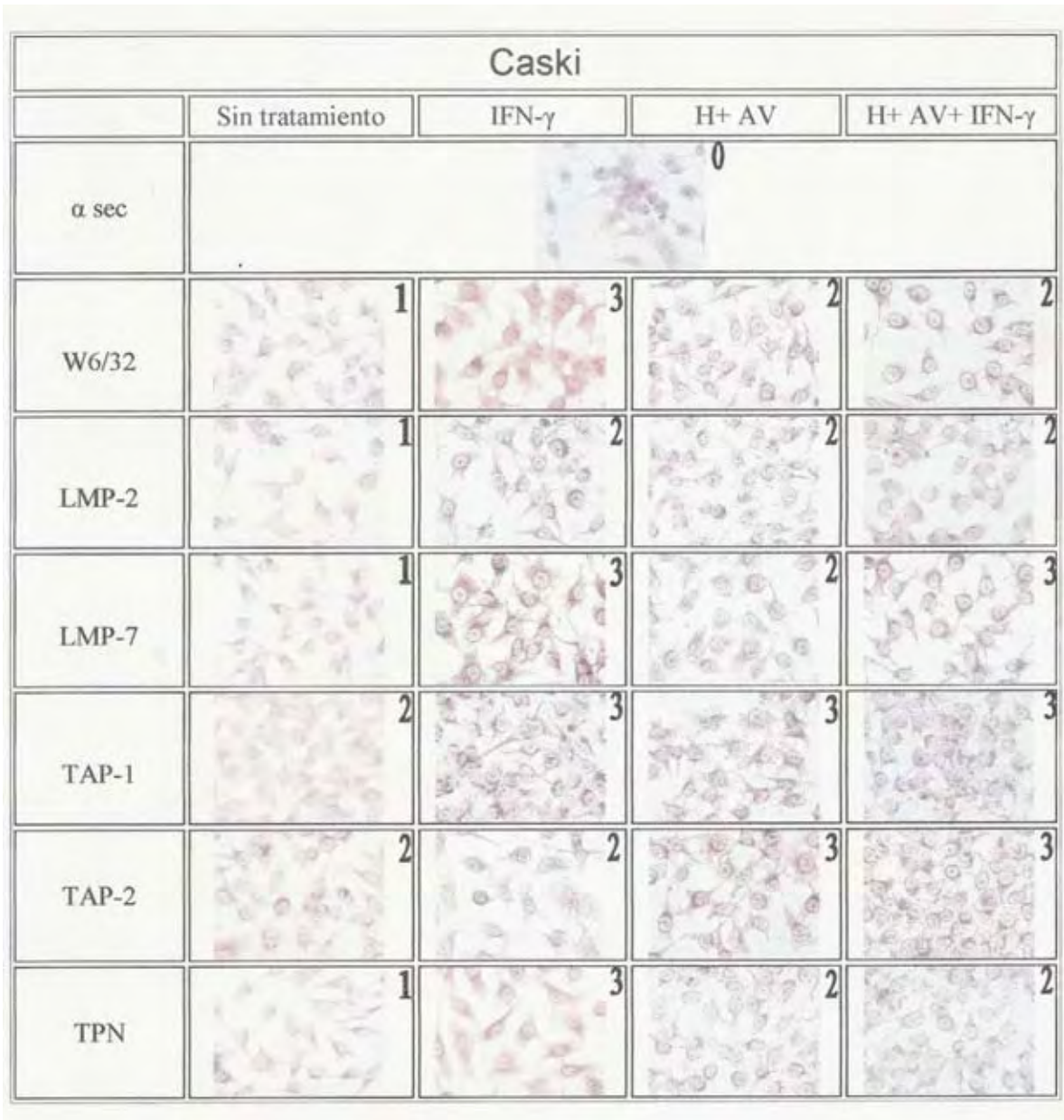


Figura 15. Expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (HLA-I) y de las moléculas participantes en el procesamiento de antígenos (LMP-2, LMP-7, TAP-1, TAP-2 y TPN) de la línea celular Caski tratada con hidralazina (H), ácido valproico (AV) e Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) (40X).

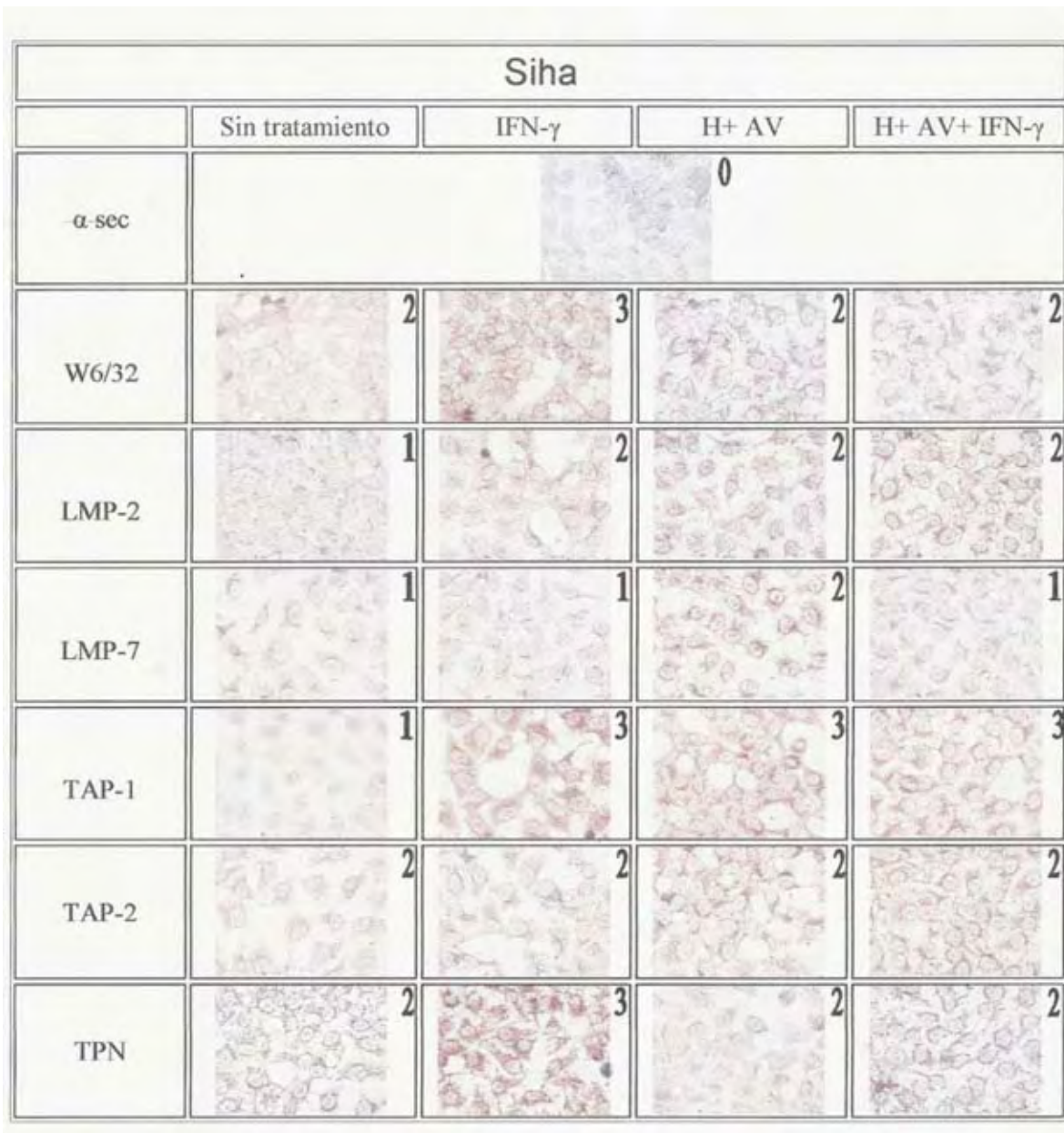


Figura 16. Expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (HLA-I) y de las moléculas participantes en el procesamiento de antígenos (LMP-2, LMP-7, TAP-1, TAP-2 y TPN) de la línea celular Siha tratada con hidralazina (H), ácido valproico (AV) e Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) (40X).

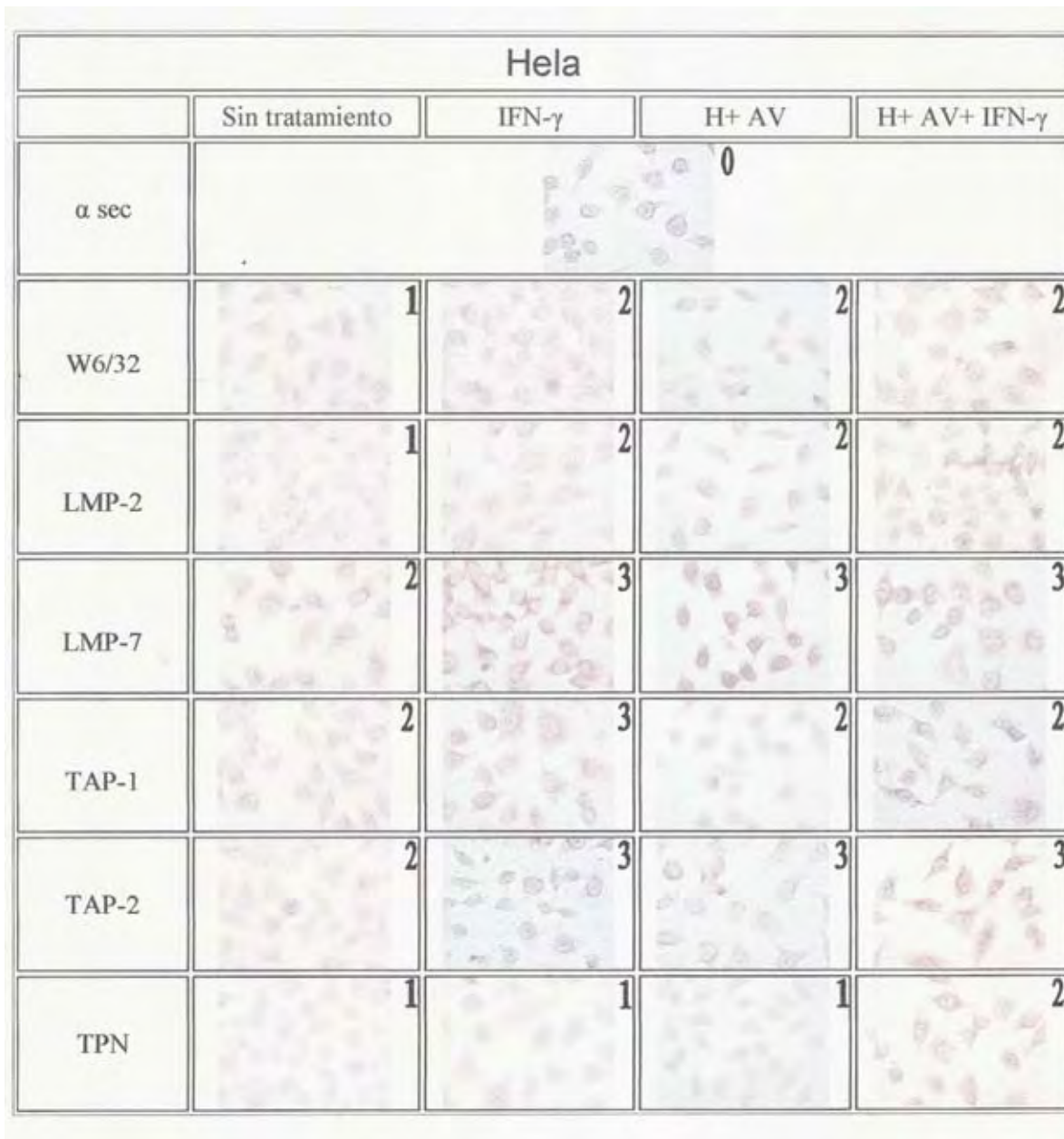


Figura 17. Expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (HLA-I) y de las moléculas participantes en el procesamiento de antígenos (LMP-2, LMP-7, TAP-1, TAP-2 y TPN) de la línea celular Hela tratada con hidralazina (H), ácido valproico (AV) e Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) (40X).

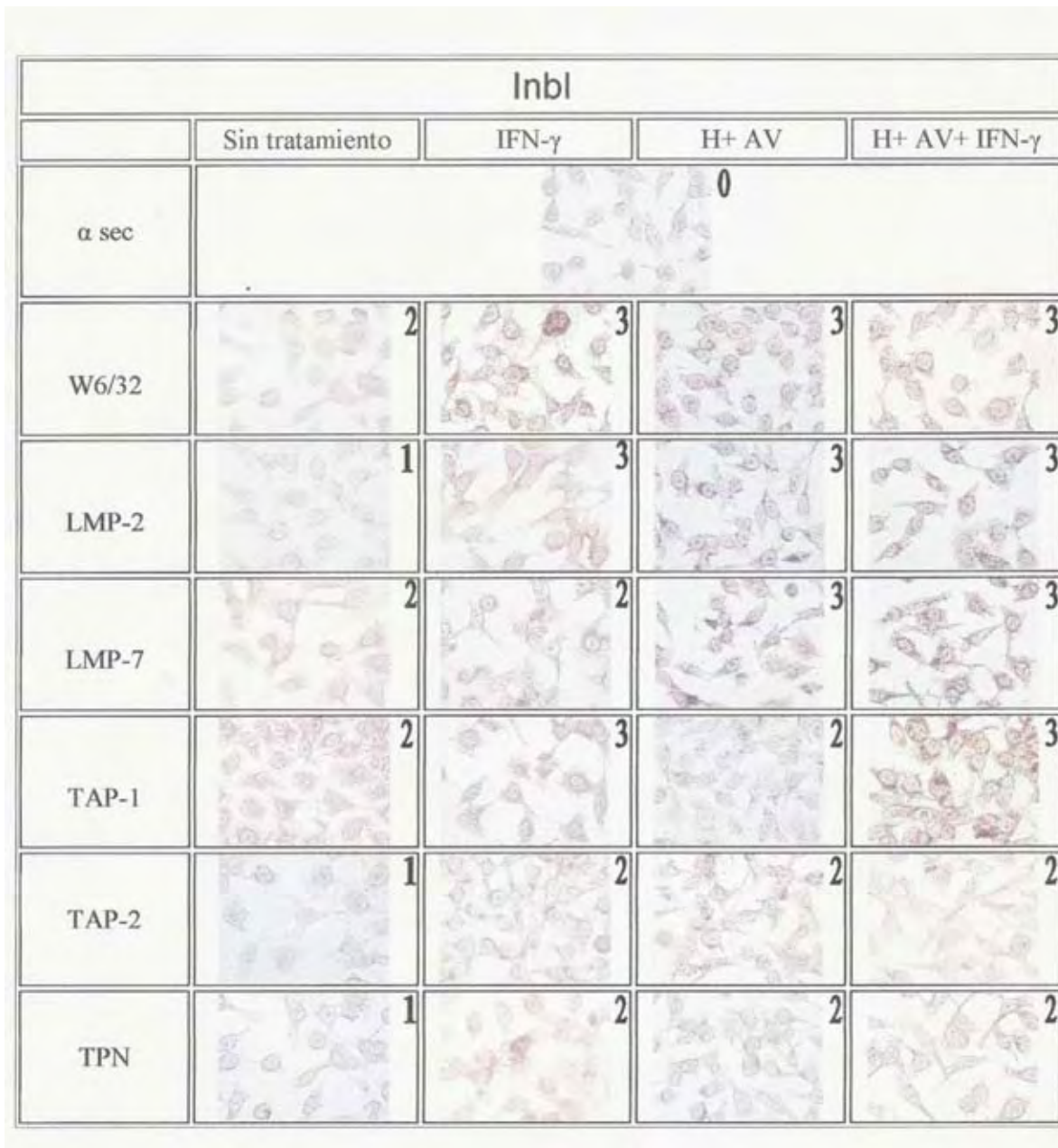


Figura 18. Expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (HLA-I) y de las moléculas participantes en el procesamiento de antígenos (LMP-2, LMP-7, TAP-1, TAP-2 y TPN) de la línea celular Inbl tratada con hidralazina (H), ácido valproico (AV) e Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) (40X).

El análisis de las tinciones se llevó a cabo de acuerdo con la coloración obtenida y se asignaron los siguientes valores:

Tabla 2: valores otorgados a las inmunohistoquímicas de acuerdo con la coloración obtenida

0	No hay tinción
1	Intensidad baja
2	Intensidad media
3	Intensidad alta

Las células T2, deficientes en la expresión de TAP-1, TAP-2, LMP-2 y LMP-7 (Hosken *et al.*, 1990, Johnsen *et al.*, 1998), utilizadas como control negativo en este trabajo, no mostraron tinción alguna para la expresión de las moléculas analizadas.

En contraste, en las células derivadas de tejido cervical normal, que fueron utilizadas como control positivo, sólo se obtuvo un aumento considerable en la expresión de moléculas HLA-I y TAP-1 con cualquiera de los diferentes tratamientos (Fig. 19, A), por lo que se puede decir que la H, el AV o el IFN- $\gamma$  también inducen la expresión de moléculas HLA-I y del procesamiento antigénico en células derivadas de cervix normal. Además únicamente se observó incremento de TAP-2 en presencia de H+AV.

Al analizar la expresión de moléculas HLA-I por este método se encontró que todas las líneas celulares mostraron un incremento en la expresión de estas moléculas cuando fueron tratadas con H+AV o con la combinación de H+AV+IFN- $\gamma$ ; no obstante las líneas celulares C33A, Siha e Inbl presentaron una marcada tinción intracelular cuando no tuvieron tratamiento (Fig. 20, B).



Esto contrasta con los valores obtenidos en la citometría de flujo, en donde el tratamiento de H+AV o de H+AV+IFN- $\gamma$  indujo un importante aumento de la expresión de HLA-I en membrana celular, sugiriendo que estas líneas celulares retienen de manera intracelular una gran cantidad de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad.

Al evaluar la expresión de la molécula LMP-2, subunidad catalítica del proteasoma participante en el procesamiento de antígenos, se puede ver un aumento homogéneo en la coloración resultante de las células Caski, Siha y Hela tratadas con IFN- $\gamma$ , H+AV y H+AV+IFN- $\gamma$  (Fig. 20, D, E y F). En las células Inbl este aumento fue muy notable ya que los tres tratamientos indujeron un fuerte incremento en su expresión (Fig. 20, G).

La molécula LMP-7 fue incrementada en todas las líneas celulares tratadas H+AV con excepción de la línea celular C33A, no obstante y el tratamiento con los tres fármacos sólo aumentó fuertemente la expresión de LMP-7 en las células Hela, Caski e Inbl (Fig. 20, D, F y G).

La molécula TAP-1 fue la que mayor inducción mostró en las líneas celulares bajo los diferentes tratamientos (Fig.20). En el caso particular de las líneas C33A, Hela e Inbl (Fig. 20, C, G y H) éstas presentaron fuerte tinción intracelular en las células sin tratamiento: Hela y Caski incrementaron la expresión de TAP-1 en presencia de IFN- $\gamma$ , mientras que C33A no mostró un evidente incremento. Por su parte en las líneas Caski y Siha el incremento fue notable, de baja a alta intensidad (Fig. 20, D y E).

La molécula TAP-2 aumento moderadamente su expresión en la mayoría de las líneas celulares. C33A, Siha y Hela mostraron una tinción intracelular con intensidad media, y sólo en Hela se pudo observar un mayor incremento bajo los diferentes tratamientos (Fig. 20, B, E y F). Las células Vibo, Caski e Inbl, presentaron un ligero incremento en la expresión de TAP-2 con alguno de los tratamientos; en el caso de las células Caski sólo existió un aumento en la expresión de TAP-2 con H+AV y con H+AV+IFN- $\gamma$  (Fig. 20, C) mientras que Inbl aumentó con los tres tratamientos utilizados (Fig. 20, D y E).

La molécula TPN mostró un fuerte incremento en las líneas celulares Caski y Siha tratadas con IFN- $\gamma$ , mientras que en Caski, Siha, Hela e Inbl se observó ligero aumento cuando éstas fueron tratadas con los tres fármacos (Fig. 20, D-G). C33A mantuvo una baja expresión de TPN, aún después de los diferentes tratamientos (Fig. 20, B).

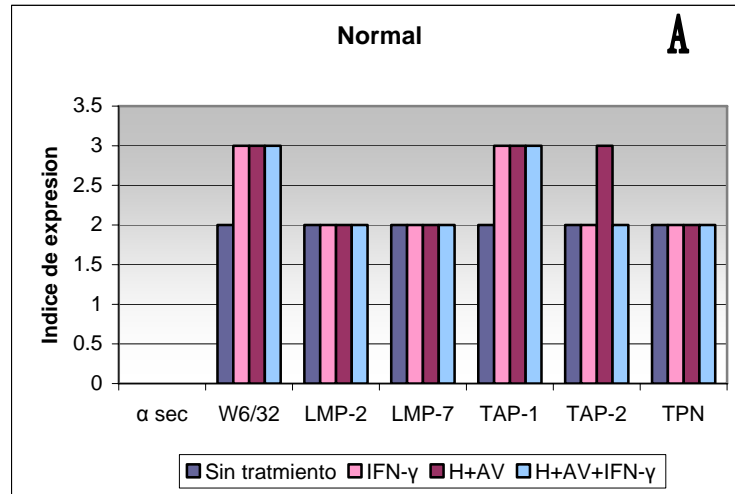


Figura 19. Expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (HLA-I) y de las moléculas participantes en el procesamiento de antígenos (LMP-2, LMP-7, TAP-1, TAP-2 y TPN) de células derivadas de cervix normal (control positivo) tratadas con hidralazina (H), ácido valproico (AV) e Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ).

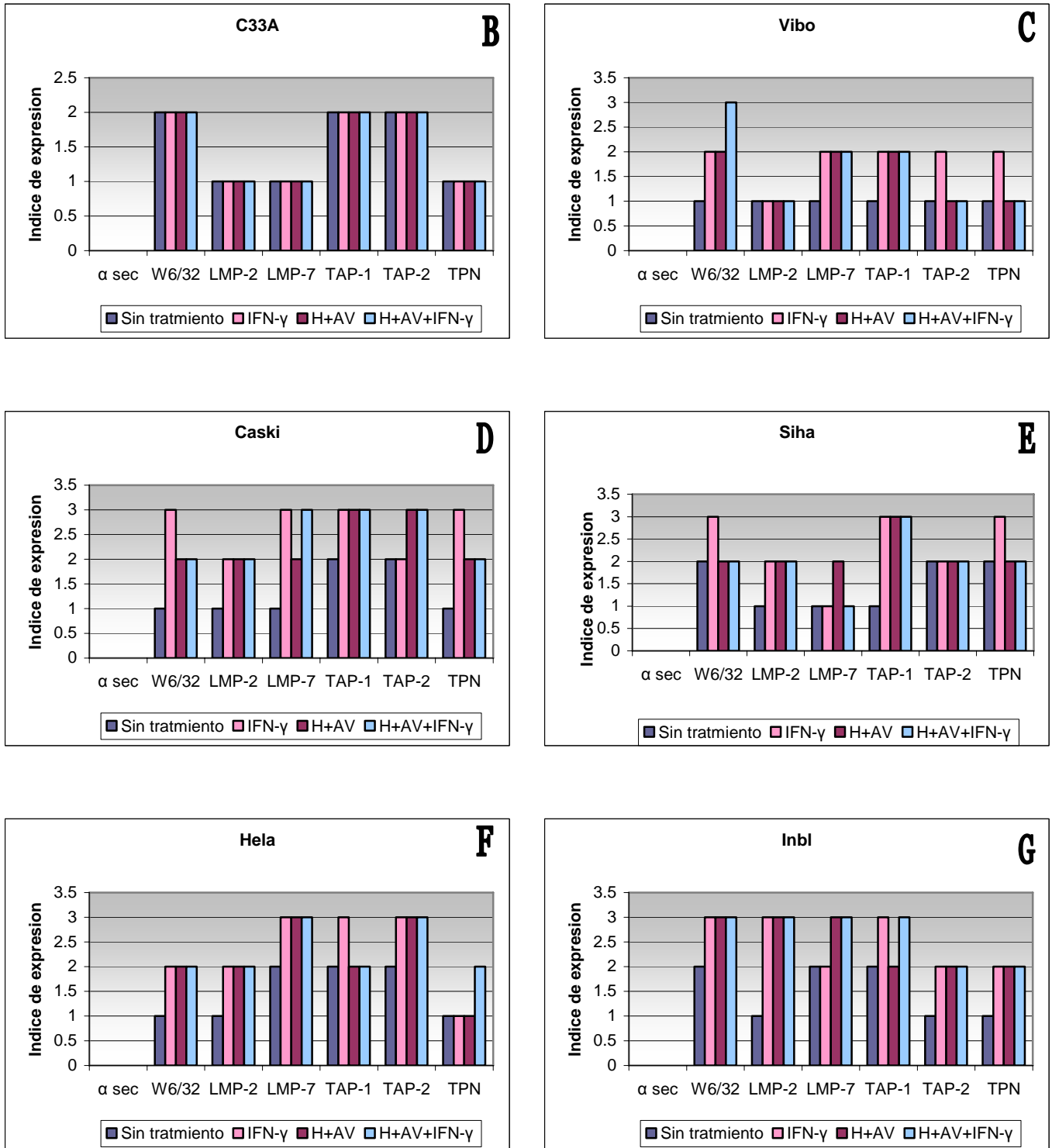


Figura 20. Expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (HLA-I) y de las moléculas participantes en el procesamiento de antígenos (LMP-2, LMP-7, TAP-1, TAP-2 y TPN) de las líneas celulares de cáncer cérvico-uterino tratadas con hidralazina (H), ácido valproico (AV) e Interferón gamma (IFN-γ).

## **Discusión de resultados.**

La respuesta inmune puede jugar un papel determinante en la eliminación de células transformadas, como lo son las células de cáncer cérvico-uterino. Para ello, linfocitos deben reconocer en la superficie de tales células a péptidos derivados de proteínas intracelulares, asociados a moléculas de histocompatibilidad clase I, que evidencien su estado transformado; así, el reconocimiento de péptidos derivados de proteínas virales o mutadas conduce a la eliminación de la célula presentadora (Hernández, 2002).

Por otro lado, las células neoplásicas pueden perder la capacidad para presentar eficientemente antígenos tumorales al sistema inmune hospedero como resultado de diferentes mecanismos entre los que destacan defectos que afectan la biosíntesis de moléculas HLA clase I. Las transformaciones malignas están asociadas entre otros factores, con cambios en la expresión y/o función de antígenos HLA-I, que inducen a la pérdida total de la expresión de estas moléculas, a una baja expresión, o a la pérdida selectiva de distintos alelos específicos (Seliger, 2002).

Recientemente, se han mostrado efectos antitumorales en modelos *in vivo* e *in vitro* mediante la modulación en la expresión de genes silenciados por cambios en la metilación del DNA y la modificación transcripcional a través del uso de desmetilantes del DNA e inhibidores de la acetilación de histonas. (Zhu *et al.*, 2003).

Se ha sugerido que la hipermetilación del DNA puede ser el principal mecanismo para la inactivación transcripcional de genes de HLA clase I en células cancerígenas escamosas en esófago humano (Nie, 2001). Asimismo, la desacetilación de histonas en tumores, particularmente en cáncer cérvico-uterino es muy frecuente y su hiperacetilación ha sido observada bajo el tratamiento con Valproato de magnesio (Chávez *et al.*, 2006). Por otro lado, recientemente nuestro grupo de investigación ha encontrado que el tratamiento de células tumorales de cáncer cérvico-uterino con hidralazina y ácido valproico, incrementan

su reconocimiento inmune mediante linfocitos T citotóxicos (Mora *et al.*, 2006), sugiriendo que las células tumorales tienen una desregulación de genes asociados con el mecanismo de procesamiento y la presentación de antígenos, los cuales son inducidos con estos fármacos.

En modelos de inducción de antígenos de cáncer de testículo (CAT), se ha reportado que éstos pueden ser regulados positivamente bajo el tratamiento con drogas inhibitoras de la metilación, como los es 5-aza-CdR, dando la posibilidad de poder inducir o potenciar una respuesta inmune contra estos antígenos, (Karpf, 2004). Se ha visto que las células tumorales resistentes a morir por apoptosis mediada por interferón, revierten esa resistencia al ser tratadas previamente con 5-aza-CdR y después con interferón  $\alpha$  y  $\beta$ , (Reu, 2006), entre las moléculas reguladas por la 5-aza-CdR, también se encuentran las moléculas de HLA-I, (Coral, 1999).

Otra molécula regulada negativamente en cáncer es la proteína FAS, se ha observado que la pérdida de esta determina el escape inmune y la respuesta a la terapia convencional en cáncer, y que esta regulación negativa de FAS puede ser revertida por el tratamiento con inhibidores de desacetilasas, logrando una mejor respuesta al tratamiento convencional y una disminución tumoral por las células efectoras asesinas naturales (Maecker, 2002).

En este sentido, en el presente estudio se evaluó el efecto de los fármacos hidralazina y ácido valproico, que son desmetilante del DNA e inhibidor de la desacetilación de histonas respectivamente, en la expresión de moléculas presentadoras de antígenos y del procesamiento antigénico en seis líneas celulares derivadas de cáncer cérvico-uterino de las cuales dos son HPV- (C33 y Vibo), dos HPV16+ (Caski y Siha) y dos HPV18+ (Hela e Inbl).

De acuerdo a lo esperado, se encontró un aumento en la expresión de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (HLA-I) y de las moléculas participantes en el procesamiento de antígenos (LMP-2, LMP-7, TAP-1, TAP-2 y TPN), en las líneas celulares cultivadas con los diferentes tratamientos (IFN- $\gamma$ , H+AV y H+AV+IFN- $\gamma$ ). Es

importante destacar que la aplicación de H y AV en los cultivos celulares indujo un incremento de la expresión de moléculas HLA clase I en la membrana de las líneas celulares estudiadas, de manera comparable, e incluso por arriba de la producida por IFN- $\gamma$  (inductor positivo). El incremento neto observado respecto a la expresión constitutiva de moléculas HLA-I inducido por IFN- $\gamma$  fue de 9-89.5% y el de H+AV de 21-143.1%; mientras que el producido por la suma de los tres fármacos fue de 48-173.5%, lo que nos permite sugerir que además de una baja inducción de la expresión de estas moléculas a nivel de promotores, estos genes pudieran estar hipermetilados o bien desacetilados, repercutiendo en su expresión como ha sido recientemente observado en cáncer de esófago y varias líneas celulares derivadas de diferentes tumores (Segura *et al.*, 2003).

La expresión deficiente de moléculas HLA-I en células de cáncer se ha tratado de explicar con base en alteraciones en la maquinaria del procesamiento de antígenos (Johnsen *et al.*, 1998). En los primeros estudios que reportan la pérdida de la expresión de alelos en el cáncer de cervix mediante inmunocitoquímica, se encontró también una disminución de la expresión de la molécula transportadora de péptidos TAP-1, lo cual sugirió que en algunos tumores existe la incapacidad para estabilizar moléculas HLA-I para que se expresen en superficie (Cromme *et al.*, 1994). Pero más recientemente se encontró que la proteína TAP-1 se expresa en líneas celulares derivadas de cáncer cérvico-uterino, por lo cual se descarta la participación de esta molécula como la principal causante en la baja expresión o pérdida de alelos HLA-I en estas células tumorales (Brady *et al.*, 2000). De manera semejante en otro estudio realizado por Hernández (2002) se encontró RNA mensajero para TAP-1 en ocho líneas celulares de cáncer cérvico-uterino analizadas. En el presente estudio, mediante tinciones inmunocitoquímicas se encontró un importante incremento en la expresión intracelular de moléculas participantes en el procesamiento de antígenos, particularmente TAP-1 y LMP-7 en las células tumorales tratadas con H y AV o su combinación con IFN- $\gamma$ . Aunque este fenómeno también fue observado parcialmente en células normales de cervix, se ha observado que los genes y/o promotores de las moléculas HLA-I, y del procesamiento antigénico en células tumorales se encuentran hipermetilados, asimismo se ha detectado una gran desacetilación en las histonas que envuelven a estos genes. Esto recientemente ha

sido demostrado en un modelo *in vivo* de ratón, en el cual se encontró que la expresión de los genes del procesamiento de antígenos en células tumorales TC-1, esta modulado por los mecanismos epigenéticos como la hipermetilación del DNA o desacetilación de histonas y que la aplicación de 5-aza-2'-deoxycytidine y 5-azacytidine (desmetilantes de DNA) así como Tricostatin y butirato de sodio (inhibidores de desacetilasas de histonas) tienen un efecto reversible, mejorando la expresión de moléculas del procesamiento de antígenos y en consecuencia la respuesta inmune antitumor (Manning *et al.*, 2007).

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio, el tratamiento de células tumorales con H, AV e IFN- $\gamma$  favorece el incremento en la expresión de las moléculas HLA-I y del procesamiento antigénico, lo cual puede repercutir de manera favorable para su reconocimiento inmunológico, como recientemente fue descrito por Mora *et al.*, (2006), en donde células de cáncer cérvico-uterino Caski y MS751 tratadas con H+AV+IFN- $\gamma$ , fueron altamente reconocidas y lisadas por linfocitos T de pacientes con cáncer cervical de manera alelo específicas. En consecuencia el tratamiento de células tumorales con la mezcla de los tres fármacos podría ser una alternativa interesante para aplicarla en protocolos de investigación clínica en pacientes con cáncer cervical.

## **Conclusiones.**

En todas las líneas celulares de cáncer cérvico-uterino estudiadas se encontró un incremento en la expresión constitutiva de moléculas presentadoras de antígenos (HLA-I) y del procesamiento antigénico (LMP-2, LMP-7, TAP-1, TAP-2 y TPN) con el tratamiento de H+AV y su combinación con IFN- $\gamma$ .

Las moléculas TAP-1 y LMP-7 del procesamiento antigénico fueron las que presentaron una mayor inducción en las células tumorales cultivadas con los tres fármacos.

El incremento de la expresión de moléculas HLA clase I y del procesamiento de antígenos en las líneas celulares de cáncer cérvico-uterino no dependió del tipo viral infectante ni de la ausencia de virus en las células tumorales, fue independiente del tipo viral.



## **Perspectivas.**

De acuerdo a nuestros resultados, las moléculas TAP-1 y LMP-7 fueron las que se indujeron en mayor proporción con la combinación de H, AV e IFN- $\gamma$  en las líneas celulares, esto nos conduce a proponer un análisis de los niveles de metilación y de desacetilación de histonas en las células tumorales, lo cual puede ser de gran relevancia para el estudio de inducción de la expresión de las moléculas HLA-I en estos tumores, con la finalidad de mejorar la respuesta inmune antitumoral.

El uso de los fármacos hidralazina junto ácido valproico e IFN- $\gamma$  en dosis adecuadas podrían ser una alternativa interesante para incluirla en protocolos de investigación clínica en pacientes con cáncer cervical.

## **Apéndice 1.**

### **Solución amortiguadora de fosfatos (PBS).**

- 8 gramos de cloruro de sodio
- 0.2 gramos de potasio
- 0.2 gramos de fosfato de potasio monobásico.

Se afora en un litro de agua Milli-Q y se ajusta a un pH de 7.2 con fosfato de sodio dibásico.

### **Solución de lavado.**

- 1 litro de PBS.
- 6.057 gramos de Tris-base.

Se ajusta el pH a 7.2-7.6 con ácido clorhídrico.

### **Amortiguador de bloqueo y permeación.**

- 0.4 mililitros de suero fetal de bovino.
- 0.2 mililitros de albúmina serica de bovino.
- 0.02 mililitros de Triton 100X
- 0.01 mililitro de Tween 20

Se diluye en 20 mililitros de PBS.

### **Solución crógena-sustrato.**

Dependiendo del número de muestras a ser teñidas, se agrega 1 mililitro de buffer sustrato del el kit DAKO LSAB + Kit, Peroxidase (DAKO LABS<sup>®</sup>+ Kit, HRP, USA.) en un tubo pequeño. Por cada mililitro de buffer se agrega una gota del cromógeno DAB el kit DAKO LSAB + Kit, Peroxidase (DAKO LABS<sup>®</sup>+ Kit, HRP, USA.), se mezcla y se agrega inmediatamente a las muestras.

### **Agua de amonia.**

➤ 2.5 mililitros de hidróxido de amonio.

Se afora en un litro de agua destilada.

## Abreviaturas.

$\mu\text{M}$	Micromolar.
ATP	Trifosfato de adenosana.
AV	Ácido valproico.
Ca	Calcio.
CaCu	Cáncer cérvico uterino.
CAT	Antígenos de cáncer de testículo.
cdks	Cinasas dependientes de ciclinas.
CpG	Citosina-fosfato-guanina.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
EGFR	Factor de crecimiento epidermal.
H	Hidralazina.
HAT	Acetiltransferasas de histonas.
HDCA	Desacetilasas.
HKF	Keratinocitos humanos.
HLA	Antígenos leucocitarios humanos.
HMGs	Proteínas de alta movilidad electroforética.
HPV	Virus de papiloma humano.
hrs	Horas.
IFN- $\gamma$	Interferón gamma.
IMF	Intensidad media de fluorescencia.
kDa	Kilodalton.
Kb	Kilobases.
LCR	Región larga de control.
LMP	Subunidad catalítica del proteasoma.
mc	Metilcitosinas.
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad.
ml	Mililitros.

mM	Milimolar.
ng	Nanogramos.
pb	Pares de bases.
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos.
PDGFR	Crecimiento derivado de plaquetas.
pH	Potencial de hidrogeno.
Rb	Retinoblastoma.
rpm	Revoluciones por minuto.
SFB	Suero fetal de bovino.
TAP	Transportador asociado al procesamiento de antígenos.
TPN	Tapasina.
VLP's	Partículas tipo virales.

## Bibliografía.

- Andersson G, Andersson L, Larhammar D, Rask L, Sigurdardóttir S. (1994) Simplifying genetic locus assignment of HLA-DRB genes. *Immunology Today*;15:58-62.
- Angeles E, Vázquez-Valadez VH, Vázquez-Valadez O, Velázquez-Sánchez AM, Ramírez A, Martínez L, Díaz BS, Romero RA, Cabrera G, López CR, Dueñas GA. (2005). Computational studies of 1-Hydrazinophtalazine (Hydralazine) as antineoplastic agent. Docking studies on methyltransferase. *Lett Drug Design Discov*; 4: 282-286.
- Antequera F y Bird A.(1996). Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Dec 15; 90:11995-11999.
- Apple RJ, Erlich HA. (1996). HLA class II genes: structure and diversity, in HLA and MHC: genes, molecules and function. Edited by M.Browning and A. McMichael. BIOS Scientific Publishers Limited: 97-112.
- Arce C, Candelaria M, Segura PB, Pérez CE, Taja CL, Dueñas GA. (2006). Hydralazine Target: From blood vessels to the epigenoma. *J Transl Med*; 4:10.
- Arenas HF, Recillas TF. (2002). Modificaciones epigenéticas de la cromatina en la generación de cáncer. *Gac Méd Méx*; 138: 547-556
- Belinsky SA. (1998). Role of the cytosine DNA-methyltransferase and p16INKa genes in the development of mouse lung tumors. *Exp Lung Res*; 24: 463-79.
- Berek JS, Hacker NF. (2000) *Practical Gynecology Oncology*. 3th edition.Lippincott Williams & Wilkins: 180-203.
- Bestor TH y Tycko B. (1996). Creation of genomic methylation patterns. *Nat Genet*; 12: 363-367.
- Billich A. (2003). HPV vaccine MedImmune/GlaxoSmithKline. *Curr Opin Invest Drugs*; 4: 210-213.
- Bird AP y Wolffe AP. (1999). Methylation-induced repression-bets, braces and chromatin. *Cell*; 24: 451-454.
- Bird AP. (1986). CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*; 321: 209-213.

- Bird AP. (1993). Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 90: 11995-11999.
- Bird AP. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*; 16: 6-21.
- Bosch FX y Muñoz N. (2002). The viral etiology of cervical cancer. *Virus Res*; 89: 183–189.
- Bosch FX, Lorinc ZA, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV (2002). The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*; 55: 244-265.
- Boyer SN, Wazer DE, Band V. (1996). E7 protein of human papillomavirus 16 induces degradation of the retinoblastoma protein through the ubiquitinproteosome pathway. *Cancer Res*; 56: 4620–4624.
- Brady CS, Bartholomew JS, Burt DJ, Duggan-Keen MF, Glenville S, Telford N, Little AM, Davidson JA, Jimenez P, Ruiz-Cabello F, Garrido F, Stern PL (2000). Multiple mechanisms underlie HLA dysregulation in cervical cancer. *Tissue Antigens*; 55: 401-411.
- Brostoff J, Scadding GK, Male DK, Roitt IM.(1993). Cancer. En: *Immunologie Clinique*. France. De Boeck Université Bruxelles: 281-291.
- Castellanos MMR. (2003). Cáncer cervicouterino y el HPV. Opciones de Detección” *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*; 2: 63-66.
- Chávez BA, Segura PB, Pérez CE, Taja CL, Cetina L, Candelaria M, Cantú D, Pérez-Plasencia C, Cabrera G, Trejo BC, Angeles E, González FA, García LP, Zambrano P, Dueñas GA. (2005). Histone acetylation and histone deacetylase activity of magnesium valproate in tumor and peripheral blood of patients with cervical cancer. A phase I study. *Molec Cáncer*; 4: 22.
- Chávez-BA, Perez-PC, Perez-CE, Carrasco-LC, Rangel-LE, Segura-PB, Taja-CL, Trejo-BC, Gonzalez-FA, Candelaria M, Cabrera G, Duenas-GA. (2006). Antineoplastic effects of the DNA methylation inhibitor hydralazine and the histone deacetylase inhibitor valproic acid in cancer cell lines. *Cancer Cell Int*; 6: 2.
- Chen JJ, Reid CE, Band V, Androphy EJ. (1995). Interction of Papillomavirus E6 oncoproteins with a putative calcium-binding protein. *Science*; 269: 529-531.

- 
- Coral S, Sigalotti L, Gasparollo A, Cattarossi I, Visintin A, Cattelan A, Altomonte M, Maio M (1999). Prolonged upregulation of the expression of HLA class I antigens and costimulatory molecules on melanoma cells treated with 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AZA-CdR). *J Immunother*; 22: 16-24.
  - Coral S, Sigalotti L, Gasparollo A, Cattarossi I, Visintin A, Cattelan A, Altomonte M, Maio M. (1999). Prolonged upregulation of the expresión of HLA class I antigens and costimulatoty molecules on melanoma cells with 5-aza-2´deoxycytidine (5-aza-CdR). *J Immunother. Jan*; 22:16-24.
  - Cortés YH. (2003) Papilomavirus in cervical carcinoma. *Ginecol Obstet Col*. 2:1-6
  - Cromme FV, Meijer CJLM, Snijers PJF et. al. (1993). Analisis of HLA-DR expression on keratinocytes in cervical neoplasia. *Br J Cancer*; 67: 1372-1380.
  - Cromme FV, van Bommel PFJ, Walboomers JMM, Gallee MPW, Stem PL, Keenemans P, Helmerhortst TJM, Stukart MJ, Meijer CJLM. (1994). Differences in MHC and TAP-1 expresion in cervical cancer lymph node metastases as compared with the primary tumours. *Br J Cancer*; 69: 1176-1181.
  - Das PM, Singal R. DNA methylation and cancer. *J Clin Oncol*. 2004; 22: 4632-4642.
  - Davie JR, Chadee DN. (1998). Regulation and regulatory parameters of histone modifications. *J Cell Biochem*; 30: 203-213.
  - Day PM, Roden RBS, Lowy DR (1998). The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication E2, to PML oncogenic domains. *J. Virol*; 72: 142–150.
  - Deborah E, Jackson J, Doorbar J. (2002). Identification of a G2 Arrest Domain in the E1<sup>^</sup>E4 Protein of Human Papillomavirus Type 16. *Journal of virology*; 76: 9806–9818.
  - DiMaio D, Petti L, Hwang ES. (1994). The E5 transforming propteins of the Papillomaviruses. *Sem Virol*; 5: 369-379.
  - Dueñas GA, Candelaria M, Pérez PC, Pérez CE, de la Cruz HE, Herrera LA. (2007). Valproic acid as epigenetic cáncer drug: Preclinical, clinical and transcriptional effects on solid tumors. *Cancer Treat Rev*, doi: 10.1016/j.ctrv.2007.11.03



- Dueñas GA, Lizano M, Candelaria M, Cetina L, Arce C, Cervera E. (2005). Epigenetics of cervical cancer. An overview and therapeutic perspectives. *Molecular Cancer*; 4: 38-52.
- Evander M, Edlund K, Gustafsson A, Jonsson M, Karlsson R, Rylander E, Wadell G. (1995) Human papillomavirus infection is transient in young women: a population-based cohort study. *J infect Dis*; 171:1026–1030.
- Evander M, Frazer IH, Payne E. (1997). Identification of the alpha-6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J. Virol*; 71: 2449-2456.
- Feltkamp MC, Smits HL, Vierboom MP, Minnaar RP, de Johgh BM, Brijfhout JW, Ter Schegget J, Melief CJ, Kast WM (1993). Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope containing peptide protects against a tumor induced by human Papillomavirus type 16-transformed cells. *Eur J Immunol*; 23: 2242-2249.
- Fowler, NL. Frazer, IH. (2004). Mutations in TAP genes are common in cervical carcinomas. *Gynecol.Oncol*; 92: 914-921.
- Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM, Rousseau MC, Desy M, Rohan TE (1999). Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J infect Dis* 180:1415-23.
- Frazer IH. (2004). Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev Immunol*; 4: 46–54.
- Gardiner-Garden M, Frommer M. (1987). CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol*; 196: 261-82.
- Garrido F, Cabrera T, Concha A, Glew S, Cabello RF, Stern LP. (1993). Natural history of HLA expression during tumor development. *Immunol Today*; 14: 491-499.
- Goldsby AR, Kindt JT, Osborne AB, Kuby J. (2006). *Inmunología*. Quinta Edición. McGraw-Hill Interamericana. Impreso en México: 665p.
- Gómez RJ, Velasco JA, Aguirre X, Barrios M, Castillejo JA, Prosper F., Heiniger A., Torres A. (2005). Metilación del DNA en oncohematología. *Haematologica*; 90: 27-36.
- Hebner CM, Laimins LA. (2006). Human papillomavirus: Basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev. Med.Virol*; 16:83–97.

- Heemels T-M, Ploegh H. (1993). Antigen presentation: Untapped peptides *Current Biology*; 3: 380-383.
- Hegde RS, (2002). The papillomavirus E2 proteins: Structure, function, and biology. *Annu. Rev. Biomol. Struct*; 31: 343–360.
- Hengstermann A, Linares LK, Ciechanover A, (2001) Complete switch from Mdm2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells. *Proc. Natl Acad Sci USA*; 98: 1218–1223.
- Herman JG, Baylin SB. (2003). Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*; 349: 2042-2054.
- Hernández MJ. (2002). Estudio de la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I y del procesamiento de antígenos en líneas celulares derivadas de cáncer cervical infectadas y no infectadas con HPV. Tesis de Maestría FES-Zaragoza, UNAM.
- Hilders CG, Munoz IM, Nooyen Y, Fleuren GJ. (1995). Altered HLA expression by metastatic cervical carcinoma cells as a factor in impaired immune surveillance. *Gynecol Oncol*; 57: 366-375.
- Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. (1998). Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *New Engl J Med*, 338:423–8.
- Hosken, AN, and Bevan, MJ. (1990). Defective presentation of endogenous antigen by a cell line expressing class I molecules. *Science* 248:367-370.
- Howley PM (1991). Role of the human papillomavirus in human cancer. *Cancer Res*; 51: 5019-5026.
- [http://pcourses.cm.utexas.edu/jrobertusch339koverheads-1ch7\\_MHC-proteins](http://pcourses.cm.utexas.edu/jrobertusch339koverheads-1ch7_MHC-proteins). Consultado el 06 de noviembre de 2007.
- [http://courses.cm.utexas.edu/jrobertusch339koverheads-1ch7\\_MHC-proteins](http://courses.cm.utexas.edu/jrobertusch339koverheads-1ch7_MHC-proteins). Consultado el 19 de noviembre de 2007.
- [http://www.bio.davidson.edu/Courses/immunology/Studentsspring2006/Maluskitapasini images0](http://www.bio.davidson.edu/Courses/immunology/Studentsspring2006/Maluskitapasini%20images0)). Consultado el 17 de noviembre de 2007.
- [http://www.roche.de/.../hvp\\_verlauf.htm](http://www.roche.de/.../hvp_verlauf.htm). Consultado el 12 de noviembre de 2007.

- Huibregtse JM, Scheffber M, Howley PM. (1991). A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of Human Papillomavirus type 16 or 18. *EMBO J*; 10: 4129-4135.
- Hwang ES, Nottoli T, DiMaio D. (1995) The HPV 16 E5 protein; expression, detection, and stable complex formation with transmembrane proteins in COS cells. *Virology*; 211: 227–233.
- INEGI (2002). Estadísticas vitales, base de datos. Consultado en: [www.inegi.gob.mx](http://www.inegi.gob.mx)
- Jablonka E, Lamb MJ. (2002). The changing concept of epigenetics. *Ann N Y Acad Sci*; 981: 82-96.
- Janeway CA. Jr., Travers P., Simon H., Walport M. (1999). *Immunobiology: the immune system in health and disease*. Ed. Current Biology Limited. Impreso en New York: 76p.
- Janeway CH, Travers P, Walport M, Capra JD. (2001). Manipulation of the immune response. Signaling through lymphocyte receptor. En: *Immunobiology. The immune system in health and disease*. 5 ed. EE.UU. Garland Publishin: 550-560.
- Janeway CH, Travers P, Walport M, Shlomchik, MJ. (2005). *Immunobiology. The immune system in health and disease*. 6th Edition. Ed: Current Biology Ltd. New York, U.S.A.: 823p.
- Johnsen A, France J, Harding, CV. (1998) Down-regulation of the transporter for antigen presentation, proteasome subunits, and class I major histocompatibility complex in tumor cell lines. *Cancer Res*. 58: 3660-3667.
- Jones PA, Laird PW. (1999). Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet*; 21: 163-167.
- Kanaseki T, Ikeda H, Takamura Y, Toyota M., Hirohashi Y, Tokino T, Himi T, Sato N. (2003). Histone deacetylation, but not hypermethylation, modifies class II transactivator and MHC class II gene expression in squamous cell carcinomas. *J. Immunol*; 170: 4980–4985.
- Karpf AR, Lasek AW, Ririe TO, Hanks AN, Grossman D, Jones DA. (2004). Limited gene activation in tumor and normal epithelial cells treated with the DNA methyltransferase inhibitor. 5-aza-2'-deoxycytidine. *Mol Pharmacol. Jan*; 65 :18-27.

- Kiyono T, Foster SA, Koop JL, et. al. (1998). Telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature*; 396: 84-88.
- Koopman LA, Corver WE, Mulder A, Anholts JDH, Claas FHJ, Giphart MJ, Fleuren GJ. (1997). Analysis of allele-specific HLA expression in cervical cancer cell lines and fresh tumor cell suspensions by multiparameter flow cytometry and SSP-PCR. *Immunology Letters*. Evasion of the immune system (Posner presentations): 437.
- Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, Brown DR, Barr E, Alvarez FB, Chiacchierini LM, Jansen KU (2002). A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N Engl J Med*; 347: 1645-1651.
- Kramer OH, Zhu P, Ostendorff HP, Golebiewski M, Tiefenbach J, Peters MA, Brill B, Groner B, Bach I, Heinzl T, Gottlicher M (2003). The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2. *EMBO J*; 22: 3411-3420.
- Kuo MH, Zhou J, Jambeck P, Churchill MEA, Allis CD. (1998). Histone acetyltransferase activity of yeast Gcn5p is required for the activation to target genes in vivo. *Genes Dev*; 12: 627-639.
- Lefebvre D, Mouchon A, Lefebvre B, Formstecher P. (1998). Binding of retinoic acid receptor heterodimers to DNA-role for histones NH2 termini. *J Biol Chem*; 273: 12288-12295.
- Lefebvre O, Steger G, Yaniv M. (1997) Synergistic transcriptional activation by the papillomavirus E2 protein occurs after DNA binding and correlates with a change in chromatin structure. *J. Mol. Biol*; 266: 465–478.
- Lehner PJ y Cresswell P. (1996). Processing and delivery of peptides presented by MHC class I molecules *Current Opinion in Immunology*; 8: 59-67.
- López SA y Lizano SM. (2006). Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. *Cancerología*; 1: 31-55.
- Maecker, H., Yun, Z., Maecker HT., Giaccia A. (2002). Epigenetic changes in tumor FASD levels determine immune escape and response to therapy. *Cancer Cell*; 2: 139-148.

- Magner WJ, Kazim AL, Stewart C, Romano MA, Catalano G, Grande C, Keiser N, Santaniello F y Tomasi TB. (2000). Activation of MHC class I, II, and CD40 gene expression by histone deacetylase inhibitors. *J. Immunol*; 165: 7017–7024.
- Maio M, Coral S, Fratta E, Altomonte M, Sigalotti L. (2003). Epigenetic targets for immune intervention in human malignancies. *Oncogene*; 22: 6484–6488.
- Manning J, Indrova M, Lubyova B, Pribylova H, Bieblova J, Hejnar J, Simova J, Jandlova T, Bubenik J, Reinis Milan. (2007). Induction of MHC class I molecule cell surface expression and epigenetic activation of antigen-processing machinery components in a murine model for human papilloma virus 16-associated. Blackwell Publishing Ltd, *Immunology*; 123: 218-227.
- Mantovani F y Banks L, (2001). The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene*; 20:7874–7887.
- McBride A y Myers G (1997) The E2 proteins. Human papillomavirus. Los Alamos National Laboratory; III-54-III-72.
- McMurray HR, Nguyen D, Westbrook TF, Mcance DJ. (2001). Biology of human papillomaviruses. *Viruses and Cancer*; 82: 15-33.
- Momburg F, Neefjes JJ, Hämmerling GJ. (1994). Peptide selection by MHC-encoded TAP transporters *Current Opinion in Immunology*; 6: 32-37.
- Mora GML, Dueñas GA, Hernández MJ, De la Cruz HE, Pérez CE, Weiss SB, Santiago OE, Ortiz NF, Rosales VH, Cantú D, Lizano SM, Rojo AMP, Monroy GA. (2006). Up-regulation of HLA class-I antigen expression and antigen-specific CTL response in cervical cancer cells by the demethylating agent hydralazine and the histone deacetylase inhibitor valproic acid. *Journal of Translational Medicine*; 4: 1-14.
- Moreno V, Bosch FX, Muñoz N, *et al.* (2002) Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet*; 359: 1085-1092.
- Morimoto Y, Toyota M, Satoh A, Murai M, Mita H, Suzuki H, Takamura Y, Ikeda H, Ishida T, Sato N, Tokino T, Imai K (2004). Inactivation of class II transactivator by DNA methylation and histone deacetylation associated with absence of HLA-DR induction by interferon-gamma in haematopoietic tumour cells. *Br J Cancer*; 90: 844-852.

- Moss DJ, Khanna R. (1999). Major histocompatibility complex: from genes to function. *Immunol Today* Apr; 20 (4): 165-167.
- Munger K, Basile JR, Duensing S. (2001). Actividades biológicas y blancos moleculares de la oncoproteína E7 del virus del papiloma humano. *Encogen*; 20: 7888–7898.
- Munger K, Scheffner M, Huibregste JM, Howley PM. (1992). Interactions of HPV E6 and E7 oncoproteins with tumor suppressor gene product. *Cancer Surv*; 12: 197-217.
- Muñoz N y Bosch FX. (1997). Cervical cancer and human papillomavirus: epidemiological evidence and perspectives for prevention. *Salud pública de México*; 39: 274-282.
- Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. *N Engl J Med*; 348: 518-527.
- Muñoz N, Bosh FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué, X, Shah, KV, Snijders PJ Meijer Ch. (2003). Epidemiology classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *The New England J of Med*; 348: 518-527.
- Muñoz N, Franceschi S, Bosetti C et. al..(2002) Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet*; 359: 1093-101.
- Neefjes JJ, Momburg F. (1993). Cell biology of antigen presentation. *Current Opinion in Immunology*; 5: 27-34.
- Ng HH, Bird A. (1999). DNA methylation and chromatin modification. *Curr Opin Genet Dev*; 9: 158-163.
- Nie Y, Yang G, Song Y, Zhao X, So C, Liao J, Wang LD, Yang CS: (2001). DNA hypermethylation is a mechanism for loss of expression of the HLA class I genes in human esophageal squamous cell carcinomas. *Carcinogenesis*; 22: 1615-1623.
- Nubel R J R. (2005). Evaluación de las capacidades antigénicas de péptidos homólogos derivados de la variante europea y de la variante asiatico-americana de la

---

proteína E6 del HPV en el contexto de HLA Clase 1. Tesis de Licenciatura. FES-Zaragoza. UNAM.

- Parkin DM, Pisani P, Ferlay J (1999) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*; 49: 33-64
- Perry M, Chalkley R. (1982). Histone acetylation increases the solubility of chromatin and occurs sequentially over most of the chromatin. *J Biol Chem*; 257: 7336-7347.
- Petti L, Nilson LA Dimaio D. (1991). Activation of the platelet-derived growth factor receptor by the bovine papillomavirus E5 transforming protein. *EMBO J*;10: 845-855.
- Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS (2001). Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J Biol Chem*; 276: 36734-36741.
- Redner RL, Wang J, Johnson ML. (1999). Chromatin remodeling and leukemia: new therapeutic paradigms. *Blood*; 94: 417-428.
- Registro Histopatológico de Neoplasias en México. México: Secretaría de Salud, México, D. F. 1999. Secretaría de Salud, México.
- Reu FJ, Bae SI, Cherkassky L, Leaman DW, Lindner D, Beaulieu N, MacLeod AR, Borden EC. (2006). Overcoming resistance to interferon-induced apoptosis of renal carcinoma and melanoma cells by DNA demethylation. *J Clin Oncol*. Aug 10; 24: 3771-3779.
- Ritz, U., Momburg, F., Pilch, H., Huber, C., Maeurer, MJ., Seliger, B. (2001) Deficient expression of components of the MHC class I antigen processing machinery in human cervical carcinoma. *Int.J of Oncology*; 19: 1211-1220.
- Robertson KD, Wolffe AP. (2000). DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet*; 1: 11-9.
- Roitt I. M. y Delves P. J. (2003). *Inmunología fundamentos* Editorial Médica Panamericana S. A. Impreso en Argentina: 558p.
- Román GJ, Jiménez VA, Agirre X, Barrios M, Castillejo JA, Prosper F, Heiniger A, Torres A. (2005). Metilación del ADN en oncohematología. *Hematologica/edición española*; 90: 27-36.

- Santini V, Kantarjian HM, Issa JP. (2001) Changes in DNA methylation in neoplasia: pathophysiology and therapeutic implications. *Ann Intern Med*; 134: 573-586.
- Satoh A, Toyota M, Ikeda H, Morimoto Y, Akino K, Mita H, Suzuki H, Sasaki Y, Kanaseki T, Takamura Y, Soejima H, Urano T, Yanagihara K, Endo T, Hinoda Y, Fujita M, Hosokawa M, Sato N, Tokino T, Imai K (2004). Epigenetic inactivation of class II transactivator (CIITA) is associated with the absence of interferon-gamma-induced HLA-DR expression in colorectal and gastric cancer cells. *Oncogene*; 23: 8876-8886.
- Segura PB, Trejo BC, Pérez CE, Taja CL, Mariscal I, Chávez A, Acuña C, Salazar AM, Lizano M, Dueñas GA. (2003). Reactivation of tumor suppressor genes by the cardiovascular drugs hydralazine and procainamide and their potential use in cancer therapy. *Clin Cancer Res*; 9: 1596-1603.
- Seliger B, Cabrera T, Garrido F, Ferrone S. (2002). HLA clas I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells. *Semin, Cancer Biol*;12: 3-13
- Seliger B, Maeurer MJ, Ferrone S (2000). Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunol Today*; 21: 455-464.
- Serman F. (2002). Cáncer cervicouterino: epidemiología, historia natural y rol del virus del papiloma humano. *Perspectivas en prevención y tratamiento. Revchil Obstet Ginecol*; 67: 318-323.
- Spencer VA, Davie JR (1999). Control of histone modifications. *J Cell Biochem; Suppl 141*: 32-33
- Straight SW, Herman B, McCance DJ. (1995). The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes. *J Virol*; 69: 3185-3192.
- Stubenrauch F, Laimins LA. (1999). Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin Cancer Biol*; 9: 379–386.
- Stubenrauch F, Zobel T. (2001). The E8 domain confers a novel long distance transcripcional repression activity on the E8E2C protein of high risk human papillomavirus type 31. *J Virol*; 75: 4139–49.
- Syrjänen SM, Syrjänen JK. (1999). New concepts on the role of Human Papillomavirus in cell cycle regulation. *Ann Med*; 31: 175-187.



Syrjanen SM, Syrjanen KJ. (1999). New concepts on the role of human papillomavirus in cell cycle regulation. *Ann Med*; 31:175-187.

- Tao Q, Robertson KD. (2003). Stealth technology: how Epstein-Barr virus utilizes DNA methylation to cloak itself from immune detection. *Clin Immunol*; 109: 53-63.

- Tewari KS, Taylor JA, Liao SY, DiSaia PJ, Burger RA, Monk BJ, et al. (2000). Development and assessment of a general theory of cervical carcinogenesis utilizing a severe combined immunodeficiency murine-human xenograft model. *Gynecol Oncol*; 77: 137-148.

- Thomas M, Pim D, Banks L. (1999). The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene*; 18: 7690-7700.

- Torroella Kouri M., Morsberger S, Carrillo A., Mohar A., Meneses A, Ibarra M, Ghaffari AM, Solorza G, and Shah, KV (1998). HPV prevalence among Mexican women with neoplastic and normal cervixes. *Gynecologic Oncol*; 70: 115-120.

- Valle G y Banks L. (1995). The human papillomavirus HPV-6 and HPV-16 E5 proteins co-operate with HPV-16 E7 in the transformation of primary rodent cells. *J. General Virology*; 76: 1239-1245.

- Van den Elsen PJ, Holling TM, Kuipers HF, van der Stoep N (2004). Transcriptional regulation of antigen presentation. *Curr Opin Immunol*;16: 67-75.

- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*; 189: 12-19.

- Walboomers JM, Snijders FJP, Steenbergen MRD, Meijer MC. (1997). Role of human papillomaviruses in cancer of the respiratory and upper digestive tract *Clinics in Dermatology*; 15: 415-425.

- Warness B., Levin AJ, Howley PM. 1990. Association of human papillomavirus-types 16 and 18 E6 protein with p53. *Science*; 248: 76-79.

- Weissmann C y Weberb H. (1986). The interferon genes. *Prog Nucleic Acid Res*; 33: 251-300.

- Wolffe AP y Hayes JJ. (1999). Chromatin disruption and modification. *Nucleic Acids Res*; 27: 711-720.

- Wong J, Patterton D, Imhof A, Shi Y-B, Wolffe AP. (1998). Distinct requirements for chromatin assembly in transcriptional repression by thyroid hormone receptor and histone deacetylase. *EMBO J*; 17: 520-534.
- Wright TC, Richart RM (1989). Role of human Papillomavirus in the pathogenesis of genital tract warts and cancer. *Gynecologic Onc*; 37: 151-164.
- Zambrano P, SPB, Pérez CE, Cetina L, Revilla VA, Taja CL, Chávez BA, Angeles E, Cabrera G, Sandoval K, Trejo BC, Chanona VJ, Dueñas GA (2005). A phase I study of hydralazine to demethylate and reactivate the expression of tumor suppressor genes. *BMC Cancer*; 5: 44.
- Zhang DE, Nielson DA. (1988). Histone acetylation in chicken erythrocytes. Rates of acetylation and evidence that histones in both active and potentially active chromatin are rapidly modified. *Biochem J*; 250: 233-240.
- Zhang, LF, Zhou J, Chen S, Cai LL, Bao QY, Zheng FY, Lu JQ, Padmanabha J, Hengdst K, Malcolm K, Frazer IH (2000). HPV6b virus like particles are potent immunogens without adjuvant in man. *Vaccine*; 18: 1051-1058.
- Zhu WG, Srinivasan K, Dai Z, Duan W, Druhan LJ, Ding H, Yee L, Villalona-Calero MA, Plass C, Otterson GA. (2003). Methylation of adjacent CpG sites affects Sp1/Sp3 binding and activity in the p21 (Cip1) promoter. *Mol Cell Biol*; 23: 4056-4065.
- Zinkernagel RM, Doherty (1997). The discovery of MHC restriction *Immunology Today*; 18: 14-17.
- Zur HH (1999). Papillomaviruses in human cancers. *Proc Assoc Am Physicians*; 111: 581-587.
- Zur HH (2000). Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Nat Can Inst*; 92:690-6.
- Zur HH (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Immunol*; 2: 342-350.