

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**EFFECTO DE LA HIDRALAZINA Y EL ÁCIDO VALPROICO EN
LA PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS DERIVADOS DE LA
PROTEÍNA E6 Y E7 DE HPV 16 Y 18 EN LÍNEAS CELULARES
DE CÁNCER CERVICOUTERINO**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGA

PRESENTA:
MARTÍNEZ GÓMEZ MARTHA PATRICIA

DIRECTORA: MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA

MÉXICO, D. F.

SEPTIEMBRE DE 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Inmunobiología, de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, bajo la dirección de la Dra. María de Lourdes Mora García, con el apoyo económico de beca del proyecto: DGAPA- PAPIIT No. IN210501 y apoyo económico de los proyectos: Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social Salud-2002-C01-6579/A-1, Fondo de Investigación en Salud FIS/IMSS/PROT. No. 122 y DGAPA-PAPIIT No. IX228404.

DEDICATORIA

A mis hijos: Johan Enrique y Miranda Elide, porque ustedes son la inspiración en mis deseos de superarme y por ustedes hare todo lo que esté en mis manos para lograrlo.

A mí esposo: Jorge Enrique, gracias por todo el cariño que me has dado durante el tiempo que hemos estado juntos, por convivir con mis defectos y por estar conmigo en este día tan importante.

A mis padres: Consuelo y Leopoldo, a ustedes que han estado conmigo en todo momento, gracias por darme un futuro y tolerar mis errores, aún en los momentos difíciles me han apoyado y brindado su amor incondicional. Este trabajo es una forma de agradecer lo que ustedes me dieron en un principio, gracias infinitamente por cuidar a sus nietos.

A mis Hermanas: Mónica y Adriana, gracias por estar siempre presentes y por su amistad, porque siempre he contado con ustedes para todo, sin su apoyo no hubiera podido llegar hasta donde estoy, gracias infinitamente por cuidar a sus sobrinos (traviesos).

A los que ya no están: Porque siempre tendrán un lugar en el corazón, donde mantengo vivo su recuerdo.

A mis amigos y compañeros de la facultad: Por estar a mi lado durante todo el trayecto de la carrera y con quienes compartí agradables momentos en esta mi segunda casa, la UNAM.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ma. de Lourdes Mora García : por la excelente dirección del presente trabajo, por toda su paciencia y entrega al compartir los conocimientos que enriquecieron enormemente mi formación, pero sobre todo por su amistad, por el apoyo y la confianza que me brindó durante mi estancia en el laboratorio.

Al Dr. Alberto Monroy García : por toda su dedicación al compartir sus conocimientos para enriquecer mi formación académica y por el apoyo y la confianza que me otorgó durante mi estancia en el laboratorio.

Al M. en C. Jorge Hernández Montes : por compartir su tiempo y sus conocimientos, los cuales enriquecieron mi formación académica durante mi estancia en el laboratorio y además por ser un gran amigo, por todos sus consejos y por la confianza que me brindó.

A los miembros del jurado:

Biol. Carlos Martínez Montoya.

Dra. Lucila Álvarez Barrera.

Dr. Edelmiro Santiago Osorio.

Por todas las sugerencias y observaciones recibidas, las cuales contribuyeron al enriquecimiento del presente trabajo.

Finalmente: A todos los compañeros de la facultad con los que compartí el trabajo en el laboratorio y al señor Ranulfo Pedraza G. (q. p. d.) por su apoyo técnico.

ÍNDICE

Dedicatoria	3
Agradecimientos	4
Índice	5
I. Abreviaturas	6
II. Resumen	7
III. Marco teórico	9
▪ La respuesta inmune	9
▪ El complejo principal de histocompatibilidad (MHC)	10
▪ Estructura molecular de las moléculas MHC clase I	13
▪ Procesamiento y presentación de antígenos	15
▪ El cáncer cérvico uterino	18
▪ Etiología del cáncer cérvico uterino	21
▪ Biología molecular y organización del genoma del VPH	25
▪ Acetilación y metilación del ADN	30
IV. Planteamiento del problema	37
V. Hipótesis	39
VI. Objetivos	40
VII. Material y método	41
▪ Muestras biológicas	41
▪ Cultivos celulares	41
▪ Obtención del RNA	43
▪ Retrotranscripción del RNA	43
▪ Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	44
▪ Citometría de flujo	45
▪ Estabilización de los péptidos con el alelo HLA A2	45
▪ Extracción de Linfocitos de Sangre Periférica por gradiente de densidad	46
▪ Citotoxicidad	47
▪ Análisis estadístico	48
VIII. Resultados	49
IX. Análisis de resultados	58
X. Conclusiones	62
XI. Apéndice	63
XII. Bibliografía	69

I. ABREVIATURAS

APC	Células presentadoras de antígenos
TCR	Receptor de células T
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
Ag	Antígeno
HLA	Antígeno leucocitario humano
OMS	Organización Mundial de la Salud
CaCu	Cáncer cérvico uterino
NIC	Neoplásia Intraepitelial Cervical
VPH	Virus del Papiloma Humano
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico Mensajero
LCR	Región Larga de Control
ORF	Fragmentos de Lectura Abierta
DNMT	ADN metiltransferasas
HAT	Enzimas acetilantes de histonas
HDAC	Enzimas desacetilantes de histonas
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RT	Retrotranscripción del ADN
SCC	Carcinoma escamoso
FIGO	Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia
rpm	revoluciones por minuto
PBS	Solución buffer de fosfatos
H	Hidralazina
AV	Ácido Valproico
INF γ	Interferón gamma

II. RESUMEN

Actualmente nuestro país enfrenta una gran problemática en salud pública, el cáncer cérvico uterino es una muestra de ello ya que en México y a nivel mundial ocupa el segundo lugar como causa de muerte, y la mayor parte de los casos se presentan en los países en vías de desarrollo.

La etiología de la enfermedad se asocia al virus del papiloma humano (VPH) el cual tiene una incidencia de contagio en las mujeres jóvenes cada vez mayor, que las lleva a desarrollar la enfermedad en algunos casos desde los 35 años. Durante el desarrollo de la enfermedad se presentan eventos a nivel molecular que impiden que se lleve a cabo una respuesta inmune efectiva por parte del organismo y como consecuencia se presenta un crecimiento celular desmedido.

A su vez se ha demostrado que el cáncer se manifiesta en un inicio con una serie de eventos epigenéticos en el ADN, como la metilación y la desacetilación de histonas que alteran su estructura y hacen que las células evadan su ciclo celular normal, ambos eventos son clave en la regulación de genes y su presencia se asocia al silenciamiento de genes involucrados en la codificación de proteínas que se encargan de proteger al organismo de los cambios adversos que se presentan a nivel molecular en el cáncer.

También la inhibición en la expresión de los genes que codifican para las proteínas involucradas en el procesamiento y presentación de antígenos como son TAP 1, TAP 2, LMP 2, LMP 7, LMP 10 y las moléculas del complejo de histocompatibilidad (HLA's), las cuales se encargan de que los antígenos sean llevados a la superficie celular y presentarlos para ser reconocidos por los linfocitos T para llevar a cabo la respuesta inmune, es un evento común en el que interfieren las proteínas del VPH, estas últimas tienen propiedades de crecimiento y transformantes al interactuar con las células del organismo.

Se han encontrado propiedades desmetilantes y e inhibidores de la desacetilación de histonas del ADN en algunas sustancias como la Hidralazina y el Ácido Valproico que han demostrado ser eficaces en la reactivación de genes supresores tumorales, así como

restaurar la expresión de moléculas involucradas en el procesamiento y presentación de antígenos, por lo que pueden revertir los efectos de las células transformadas.

En el presente trabajo se evaluó el efecto de la Hidralazina que es un desmetilante del ADN y el Ácido Valproico que tiene propiedades como inhibidor de la desacetilación de histonas, en las líneas celulares de cáncer cérvico uterino CaSki y MS751 para conocer la expresión de moléculas del procesamiento antigénico, así como de las oncoproteínas E6 y E7 a través de RT PCR.

También se utilizaron estos fármacos en las líneas celulares CaSki, MS751 y C33A para conocer por medio de citometría de flujo la expresión de la molécula HLA con el alelo A2 el cual tiene una particular importancia por estar presente en gran parte de la población mexicana.

Así mismo fue evaluada la capacidad de linfocitos T citotóxicos provenientes de pacientes con cáncer cérvico uterino para lisar células de cáncer, compatibles con los tipos de VPH 16 y 18 y el alelo de histocompatibilidad A2, en ensayos de citotoxicidad.

Los resultados obtenidos mostraron que no hubo un cambio en la expresión de las moléculas TAP's y LMP's, en las líneas celulares que fueron tratadas con Hidralazina y Ácido Valproico, ni en la expresión de las oncoproteínas E6 de VPH 18 y E7 de VPH 16 en las líneas celulares de cáncer CaSki y MS751 tratadas con los fármacos.

Sin embargo se observó un aumento en la expresión de la molécula HLA A2 en las líneas celulares CaSki, MS751 y C33A cuando estas fueron tratadas con Hidralazina y Ácido Valproico, sobre todo cuando el tratamiento incluyó la combinación de los fármacos.

Finalmente se observó una mejor capacidad citotóxica de los linfocitos provenientes de pacientes con cáncer cérvico uterino para lisar células derivadas del mismo tipo de cáncer.

III. MARCO TEÓRICO

▪ LA RESPUESTA INMUNE

En los seres humanos, el sistema inmune se encarga de mantener al organismo libre de los agentes infecciosos o sustancias extrañas a él y que son causantes de diversas enfermedades. Cuando estas sustancias entran en contacto con el sistema inmune dan lugar a la activación y proliferación de diversas células del organismo que proveen de una respuesta al organismo para destruir y eliminar a los agentes extraños (Janeway *et al.*, 2005).

Estos agentes extraños reciben el nombre de antígenos (Ag), y la protección contra ellos involucra diversos mecanismos: la barrera cutánea que incluye células presentes en los epitelios que otorgan una respuesta inmune local y reacciones inflamatorias, las mucosas que proveen una respuesta contra los antígenos que entran por vía oral; y la llevada a cabo por las células que incluye diversos factores y moléculas encontrados en la sangre realizando lo que se conoce como la respuesta innata y la respuesta adquirida (Abbas *et al.*, 2007).

La respuesta inmune adquirida o específica elimina a los antígenos por dos procesos: la respuesta de tipo humoral llevada a cabo por los linfocitos B, que producen anticuerpos los cuales se asocian a antígenos específicos eliminándolos; y la respuesta de tipo celular llevada a cabo por los linfocitos T, que reconocen al antígeno en forma de péptido que fue previamente procesado en el interior de las células (Roitt y Delves, 2003).

Así, sabemos que toda respuesta inmunitaria es una secuencia compleja y regulada de procesos que involucra a varios tipos celulares. Esta respuesta se desencadena cuando un antígeno ingresa al cuerpo y se encuentra con una clase de células especializadas llamadas

células presentadoras de antígenos ó APC (del inglés *Antigen Presenting Cell*) quienes capturan el antígeno en cantidades diminutas y lo exhiben de manera que pueda ser reconocido por linfocitos T cooperadores específicos. Estos linfocitos se activan y promueven la activación de otros tipos de linfocitos, como los linfocitos B y T citotóxicos quienes a su vez proliferan y realizan funciones específicas de inactivación o eliminación del antígeno (Regueiro *et al.*, 2004).

En cada etapa las células se comunican entre sí por contacto directo o mediante la secreción de citocinas reguladoras. Además interactúan con otros tipos celulares o componentes del complemento que originan la activación de fagocitos, la coagulación de la sangre y la cicatrización de las heridas (Roitt y Delves, 2003).

En cuanto a los linfocitos T, éstos expresan el receptor de células T (TCR) el cual reconoce epítopes antigénicos que han sido procesados y presentados, en moléculas que han sido codificadas por el MHC (del inglés *Major Histocompatibility Complex*) y una vez reconocidos por las células T, éstas pueden llevar a cabo una respuesta citotóxica en contra de los antígenos presentados (Abbas *et al.*, 2007).

▪ EL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC)

En los seres humanos el MHC es denominado HLA (del inglés *Human Leucocyte Antigen*) y constituye una región de alrededor de 4 Mb de DNA (aproximadamente el 0.1% del genoma) conocida como 6p21.3 y se localiza en el brazo corto del cromosoma 6. Alrededor de 220 genes han sido identificados y aproximadamente un 10% de ellos tienen funciones relacionadas con el sistema inmune. Diversos estudios indican que algunos genes que

codifican dentro de la región del MHC están relacionados con enfermedades y desordenes del sistema inmune (Lechler y Warrens, 2000).

Tradicionalmente los genes del MHC se dividen en tres regiones: clase I, clase II y clase III (**Figura 1**). La región clase II se localiza cerca del centrómero y tienen la función de codificar glicoproteínas que presentan péptidos antigénicos procesados en las APC como macrófagos, células dendríticas y células B a las células T_H , mientras que la región clase I se localiza cerca del telómero y presentan péptidos antigénicos procesados en el interior de casi todas las células nucleadas a las células T_C ; ubicada entre estas dos se encuentra la región clase III que codifica proteínas con funciones inmunitarias tales como algunos componentes del sistema del complemento y moléculas relacionadas con la inflamación (Janeway *et al.*, 2005).

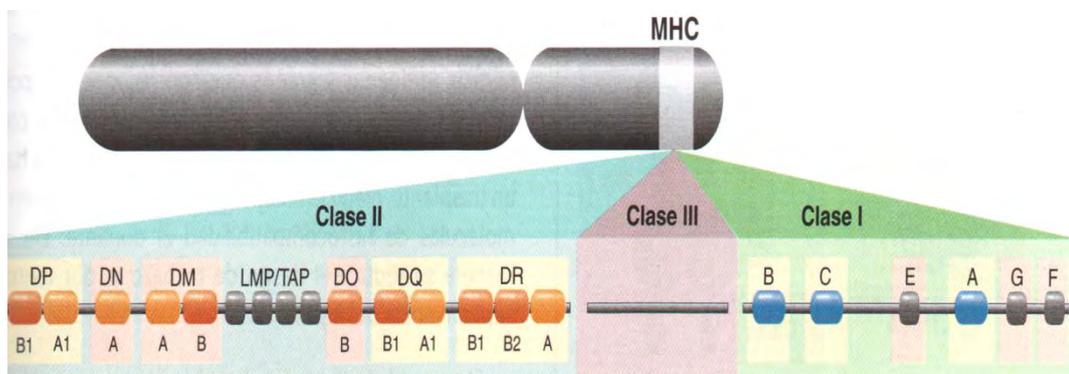


Fig. 1. Representación esquemática del mapa del complejo HLA, en el que se muestra la organización de los genes clase I, clase II y clase III dentro del brazo corto del cromosoma 6.

Empezando por la parte inferior izquierda del esquema se encuentra la región más cercana al centrómero donde codifican los genes clase II, seguido por la región clase III y por último la región clase I ubicada hacia el telómero (Tomado de Regueiro *et al.*, 2003).

Dentro de la región clase I se encuentran los genes que codifican para las moléculas denominadas clásicas HLA-A, HLA-B y HLA-C y los genes que codifican para las moléculas no clásicas HLA-E, HLA-F, HLA-G, HFE (antes HLA-H), HLA-J y HLA-X, así como los genes MIC descubiertos recientemente que incluye de MIC A a MIC E, algunos genes no clásicos son pseudogenes pues no codifican un producto proteínico (Abbas *et.al.*, 2007).

Los productos que tienen la función de presentar péptidos a los linfocitos T son HLA-A, HLA-B y HLA-C, los tres se expresan simultáneamente en la superficie o membrana de casi todas las células.

Una de las principales características de estas moléculas es su polimorfismo, dado que cada locus tiene muchos alelos, se estima que existen más de 195 alelos distintos para la molécula HLA-A, más de 395 alelos distintos para la molécula HLA-B y más de 93 alelos distintos para la molécula HLA-C (Janeway *et al.*, 2005).

Tomando en cuenta que se expresan de manera simultánea y codominante las moléculas codificadas por el cromosoma materno y paterno, el multialelismo determina que la mayoría de los individuos sean heterocigotos y exhiban en la superficie de sus células seis productos de clase I diferentes. La expresión de tantas moléculas MHC clase I permite que cada célula exhiba también un gran número de péptidos derivados de los antígenos procesados en su interior (Roitt y Delves, 2003).

Así mismo, el nivel de expresión de los genes clase I puede incrementarse por efecto de varias citocinas como el interferón α , β y γ , así como el Factor de Necrosis Tumoral (Margni, 1996).

▪ ESTRUCTURA DE LAS MOLECULAS MHC CLASE I

En cuanto a su estructura (**Figura 2**) las moléculas MHC clase I están constituidas por dos cadenas: una cadena pesada llamada α y una cadena ligera llamada β_2 -microglobulina las cuales se encuentran unidas no covalentemente.

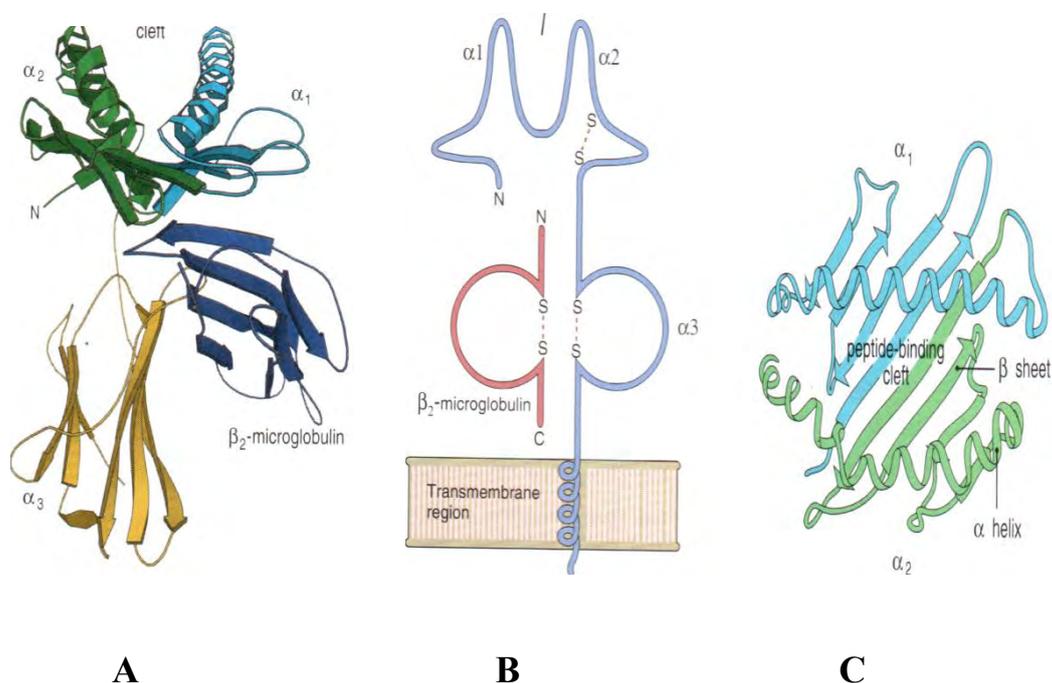


Fig. 2 Representación estructural de la molécula MHC clase I.

A) Diagrama de listón mostrando las cadenas polipeptídicas plegadas que conforman la molécula, con sus dominios α_1 , α_2 y α_3 unidos no covalentemente a β_2 microglobulina.

B) Esquema que muestra la región transmembranal correspondiente al dominio α_3 , β_2 -microglobulina no penetra la membrana, sin embargo α_3 y β_2 -m muestran similitudes en su secuencia de aminoácidos y un plegamiento estructural similar.

C) Vista superior de los dominios α_1 y α_2 mostrando la hendidura donde se une el péptido, formado por ocho tiras de hoja β plegada mostradas como flechas anchas formando el piso y dos α hélices mostradas como arrollamientos angostos que forman las paredes de la hendidura dentro de la cual se enlazan péptidos de 8 a 10 aminoácidos (**A** y **C** tomado de: Janeway *et al.*, 2005 y **B** tomado de: Abbas *et al.*, 2007).

Sólo la cadena pesada α codifica dentro del MHC; ésta, es una glucoproteína transmembranal de aproximadamente 45 kDa con tres dominios extracelulares formados por el plegamiento de la misma: $\alpha 1$, $\alpha 2$, y $\alpha 3$ (Lawlor *et al.*, 1990), el dominio $\alpha 1$ es el más próximo a la membrana y tiene la estructura que caracteriza a las inmunoglobulinas, los dominios $\alpha 2$ y $\alpha 3$ se pliegan de tal forma que mediante dos hojas β -plegadas y dos α -hélices forman un surco donde se alojará al péptido de una longitud de 8 a 10 aminoácidos en la molécula MHC clase I.

La cadena $\beta 2$ microglobulina es una proteína no transmembranal de estructura globular cuyo gen codifica en el cromosoma 15 humano y se une de manera no covalente a la cadena α (Marsh *et al.*, 2000).

Las moléculas MHC clase I responden en contra de los patógenos procesados de manera intracelular como los virus, pues presentan péptidos sintetizados de manera endógena hacia los linfocitos T CD8⁺ y ellos se encargan de controlar la infección lisando a las células afectadas y liberando citocinas antivirales, mientras que los péptidos sintetizados de manera exógena son presentados a linfocitos T CD4⁺ por medio de moléculas MHC clase II (Abbas *et al.*, 2007).

De esta manera las moléculas del MHC clase I y clase II juegan un papel importante en el control de las infecciones virales por medio de la respuesta inmune celular y humoral y así mismo los virus han desarrollado múltiples mecanismos para inhibir la expresión y acción de estas moléculas manipulando factores de transcripción celular (Cebulla *et al.*, 2000).

▪ PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS

Como ya se ha mencionado las APC 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 después de ser procesados en el interior de la célula y presentados por las moléculas MHC (Janeway *et al.*, 2005).

En el contexto MHC clase I (**Figura 3**), un gran número de moléculas participan en el ciclo 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 homólogas con una masa molecular de entre 20 y 35 kDa, los cuales se clasifican en subunidades tipo α y β , tiene una estructura cilíndrica altamente conservada con dos anillos externos de subunidades α y dos anillos internos de subunidades β (Yang, 2000).

Los péptidos procesados por la vía MHC clase I son degradados por el proteasoma y tanto la expresión del MHC clase I como la expresión de las subunidades del proteasoma, son reguladas por varias citocinas, en especial los interferones (Cebulla *et al.*, 2000).

Estas citocinas también están involucradas en la activación, proliferación y diferenciación de los linfocitos, lo cual involucra una serie de eventos complejos para obtener una correcta activación de señales que derivan en el reconocimiento del antígeno, de lo contrario el sistema inmune no es capaz de reconocer y atacar a las células tumorales.

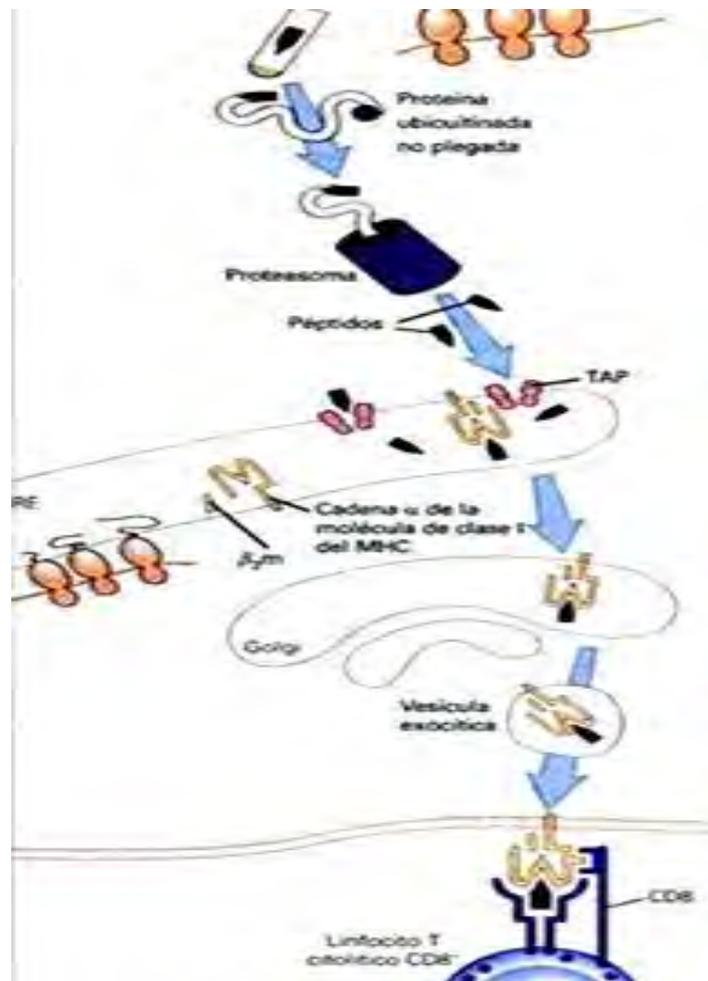


Fig. 3. Esquematación del procesamiento y presentación de antígenos (Tomado de Abbas *et al.*, 2007).

Tres de las subunidades β llamadas LMP2, LMP7 y MECL1, cuyos genes codifican en la región del MHC, pueden ser inducidas por interferón γ 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 (Yang, 2000).

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 (Regueiro *et al.*, 2004). Cada una está 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 con los residuos amino- y carboxilo-terminal adecuados (Momburg, 1994; Neefjes, 1993 y Heemels, 1993).

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 (Yang, 2000).

Existen además otras 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 Endert M. *et al.*, 1999; Lehner y Cresswell, 1996) en este proceso la cadena pesada α transmembranal, interactúa con las moléculas chaperonas y es doblada para unirse a la cadena ligera β 2-microglobulina (β 2m), después de ser cargada con el péptido forma el complejo de la molécula MHC- β 2m-péptido que posteriormente sale del retículo endoplásmico a través del aparato de Golgi para ser expuesto en la superficie y presentar el péptido asociado a la molécula MHC, hacia los linfocitos T CD8⁺ (Zinkernagel y Doherty, 1997; Ortmann *et al.*, 1994; Suh *et al.*, 1994).

▪ **EL CÁNCER CÉRVICO UTERINO (CaCu)**

El desarrollo del cáncer como enfermedad, involucra una serie de procesos que se originan con un daño en el ADN debido a que las células se han expuesto a un agente químico, físico o patógeno (en su mayoría viral), si el ADN no es reparado se producen mutaciones genéticas que conllevan a un anormal incremento en la proliferación celular y una disminución de la muerte celular, se activan los proto-oncogenes y se inactivan los genes supresores tumorales, posteriormente se promueve la expansión de las clonas celulares afectadas que derivan en un estado preneoplásico y por último un estado de progresión caracterizado por la transformación y el aumento de estas células para formar tumores los cuales comienzan a invadir las zonas adyacentes desarrollando metástasis (Jakóvisiak *et al.*, 2003).

La inactivación de los genes supresores tumorales se relaciona con el desarrollo del cáncer debido a que estos participan en la defensa del organismo contra los procesos carcinogénicos, ya que algunas de sus funciones son: inhibir la proliferación celular, inducir la diferenciación celular, inducir la muerte celular programada, reparar el ADN dañado e influir en la actividad del sistema inmune (Jakóvisiak *et al.*, 2003).

A nivel mundial, el cáncer es la principal causa de mortalidad, se le atribuyen 7.9 millones de defunciones ocurridas en 2007. La OMS, estima que alrededor de 84 millones de personas morirán a causa de esta enfermedad entre 2005 y 2015 (OMS, 2009).

Asimismo, la mortalidad más alta en las mujeres es debida al cáncer de mama, pulmón, estómago, colon-recto y **cérvico uterino**; mientras que en los hombres son el cáncer de pulmón, estómago, hígado, colon-recto, esófago y próstata (OMS, 2009).

La OMS señala que el consumo de tabaco es el principal factor de riesgo para desarrollar la enfermedad, así como el sobrepeso u obesidad, una dieta baja en frutas y hortalizas, el sedentarismo, el consumo de alcohol, **la presencia de enfermedades de transmisión sexual** tales como el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) y el **Virus del Papiloma Humano (VPH)**, la contaminación del aire urbano y la presencia de humo por combustibles sólidos (OMS, 2009).

De acuerdo con las estadísticas del INEGI, para el año 2007 en México, los tres principales tipos de cáncer que causaron defunciones en las mujeres fueron el de mama (13.8%), **cuello del útero o cérvico uterino (12.1%)** e hígado (7.6%); mientras que en los hombres fueron: el cáncer de próstata (15.7%), tráquea, bronquios y pulmón (14%) y estómago (9%).

En cuanto a la morbilidad hospitalaria entre las mujeres, de cada 100 egresos, 20 fueron por cáncer de mama, **19 por cáncer cérvico uterino** y 12 por leucemias. Otro dato importante es que de 1998 a 2007 se observa que las defunciones por tumores malignos, tienden a incrementarse siendo las mujeres las que presentan el porcentaje más alto en ese periodo, con un incremento del 14.7 al 15.4% (INEGI, 2009).

Por otro lado; los cambios histopatológicos que preceden al cáncer cérvico uterino se conocen como lesiones precursoras (**Figura 4**) son designadas como **NIC**, siglas de *Neoplasia Intraepitelial Cervical* según el sistema de clasificación Richard (Virmani *et al.*, 2001), y se dividen en:

- NIC 1, displasia leve.
- NIC 2, displasia moderada.
- NIC 3, displasia severa.

Posteriormente empieza el proceso conocido como carcinoma *in situ*, en esta etapa se da la invasión del estroma; seguido del microcarcinoma y el cáncer clínicamente manifiesto con metástasis (Buckley y Fox, 1992).

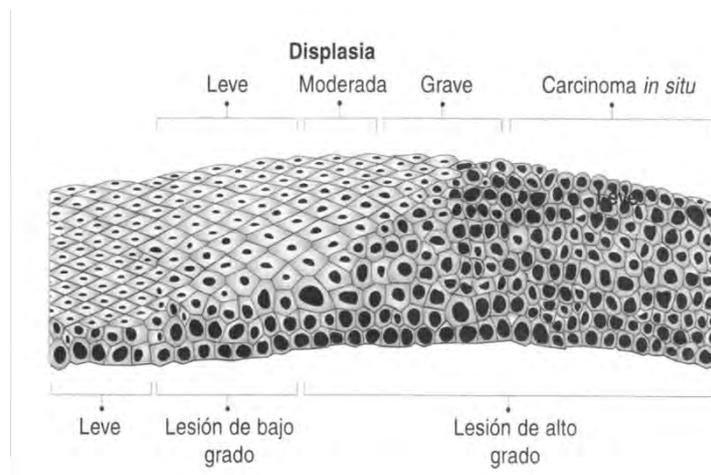


Fig. 4. Esquema que muestra la progresión de las lesiones intraepiteliales desde la displasia leve hasta el carcinoma *in situ*. (Tomado de Alonso *et al.*, 2000)

▪ ETIOLOGÍA DEL CÁNCER CÉRVICOUTERINO

La etiología del cáncer cérvico uterino ha sido ligada al **Virus del Papiloma Humano (VPH ó HPV del inglés *Human Papillomaviruses*)**, una de las enfermedades de transmisión sexual más comunes. (Muñoz *et al.*, 1994). Estudios epidemiológicos indican que existe una gran prevalencia de esta infección debido en parte, a la falta de un diagnóstico oportuno y tratamiento específico (Conzuelo, 2002).

Aunque casi siempre la presencia del VPH es necesaria para desarrollar cáncer, influyen en gran medida otros factores que están ligados a la su vez con la diferencia en la respuesta inmune de cada persona, entre los que encontramos:

- La edad, en mujeres jóvenes de 18 a 30 años es más frecuente la infección con VPH, mientras que el CaCu es más común después de los 35, lo que demuestra que la infección se da a temprana edad con una progresión lenta a cáncer (Adam *et al.*, 2000; Burk *et al.*, 1996).
- La multiparidad (Muñoz *et al.*, 2002; Hildesheim *et al.*, 2001).
- La promiscuidad, pues se asocia el número de parejas que han tenido el hombre y la mujer con la adquisición de VPH (Burk *et al.*, 1996).
- El inicio de la vida sexual activa a temprana edad (López y Lizano, 2006).
- El uso de anticonceptivos orales por largos periodos (Negrini *et al.*, 1990).
- La presencia de otras infecciones de transmisión sexual, como lo es *Chlamydia trachomatis* (Smith *et al.*, 2002; Castle *et al.*, 2001; Giuliano *et al.*, 2000).
- Coinfección con otros virus, como el del herpes simple tipo 2, citomegalovirus, herpes virus humano tipos 6 y 7, etc. (López y Lizano, 2006).

- La dieta (Smith *et al.*, 2002; Castle *et al.*, 2001; Giuliano *et al.*, 2000).
- Fumar (Deacon *et al.*, 2000; Castle *et al.*, 2001).
- La predisposición genética, lo cual afecta la susceptibilidad a la infección por VPH (Magnusson *et al.*, 2000).
- La carga viral y las variantes virales intratipo, es decir que ciertos tipos de virus de alto riesgo se relacionan directamente con la severidad de la enfermedad, así como la persistencia viral (López y Lizano, 2006).

Como ya se mencionó la zona de transformación cervical es un área de tejido delimitada, con una particular susceptibilidad al VPH (**Figura 5**). La carcinogénesis cervical se puede describir en tres fases: primero la infección por HPV en el cérvix normal que en ocasiones puede presentar regresiones y ser imperceptible, aquí la citología del cérvix infectado muestra anormalidades y persistencia hasta de más de un año; posteriormente hay una progresión de la infección hacia una etapa precancerosa donde también puede haber una regresión de las lesiones y finalmente la invasión como cáncer (Schiffman *et al.*, 2003).

En la región del cérvix confluyen el epitelio escamoso estratificado del ectocérvix y el epitelio cilíndrico alto mucosecretor del endocérvix, a esta región se le conoce como unión escamocilíndrica, y debido a que en esa zona se llevan a cabo un gran número de transformaciones histológicas durante ciertas etapas de la vida de la mujer, es fácilmente afectada por enfermedades y es ahí también donde se presentan con mayor frecuencia los carcinomas (Stevens y Lowe, 2006).

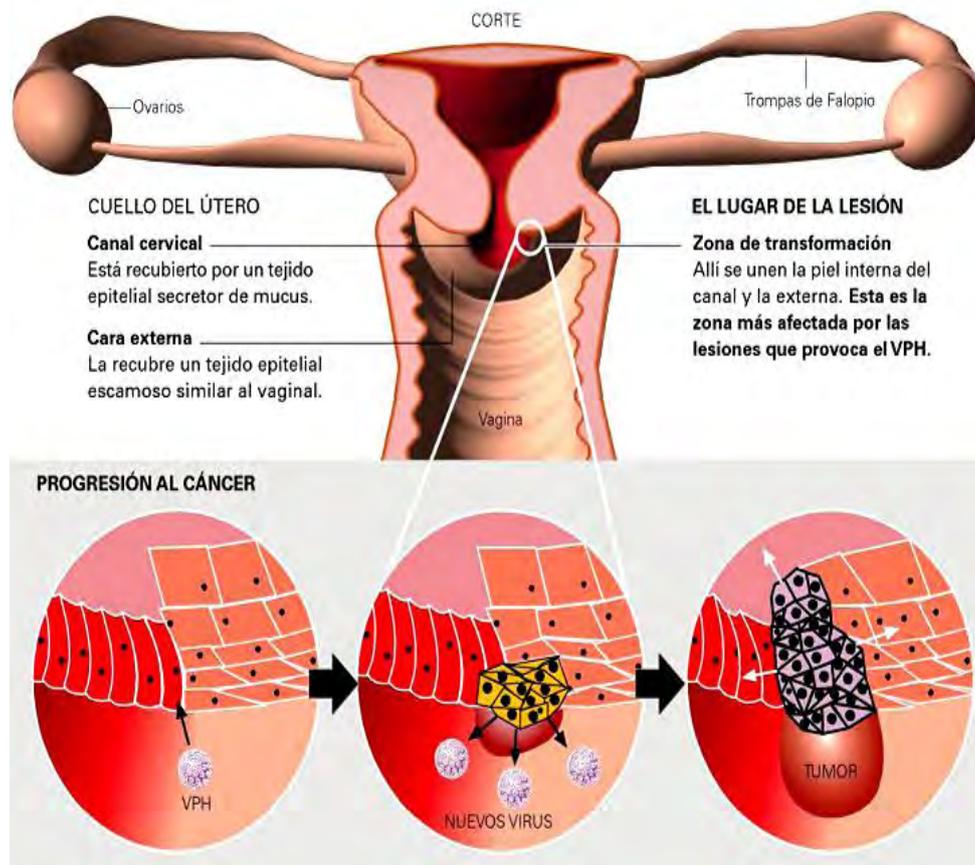


Figura 5: Área del aparato reproductor femenino que es afectada por el virus del papiloma humano (zona de transformación) en el cuello del útero, en ella se muestra la citología según el avance de la enfermedad (Disponible en: <http://biologiasegungolgix.blogspot.com>).

Las infecciones por Virus del Papiloma Humano son causadas por varios tipos genéticamente diferentes de VPH, los tipos de papiloma humano oncogénicos causan virtualmente todos los casos de cáncer cérvico uterino y las lesiones intraepiteliales precancerosas, pues aproximadamente un 99.7% de los cáncer de cérvix contienen secuencias de ADN de VPH (Muñoz *et al.*, 2003).

La replicación del virus se realiza principalmente en células con capacidad proliferativa y de diferenciación como son los epitelios y mucosas, ya que necesita utilizar parte de los componentes del tejido huésped para obtener su desarrollo completo y el estado físico del ADN presente en los núcleos de las células infectadas juega un papel importante pues de él depende la acción del virus en la célula (Alonso *et al.*, 2000).

La replicación del ADN se lleva a cabo en el interior del núcleo mientras que el ensamblaje de la cápside viral se lleva a cabo en el citoplasma. También se han observado dos maneras de infectar a las células: En la primera conocida como infección lítica, los virus penetran el núcleo pero no se integran al genoma celular y las copias producidas causan la muerte de la célula y quedan libres para infectar los epitelios cercanos; la segunda conocida como infección lisogénica se caracteriza por que el genoma celular se ve afectado directamente, en este caso los VPH, denominados de alto riesgo llegan al núcleo celular e integran dentro del genoma de la célula huésped a los segmentos E6 y E7 del virus, esperando a que la célula replique su propio ADN junto con el de los virus integrados, estos últimos se hacen transcripcionalmente activos asegurando su transformación (Conzuelo, 2002).

▪ **BIOLOGIA MOLECULAR Y ORGANIZACIÓN DEL GENOMA DEL VPH**

El Virus del Papiloma Humano (VPH) pertenece a la familia papillomaviridae, recientemente reconocidos como distintos de la familia de los polyomavirus por el consejo internacional para la taxonomía de los virus (De Villers *et al.*, 2004).

Su estructura es una doble hélice de ADN circular de aproximadamente 8 Kbp (8000 pares de bases) cubierta por una cápside proteica icosaédrica (**Figura 6**) con un diámetro aproximado de 50-55 nm (Hebner y Laimins, 2006). La cápside de los viriones está constituida por dos proteínas: L1 y L2, constituyendo un total de 72 capsómeros de los cuales 60 son hexámeros y 12 son pentámeros; L2 se encuentra presente en 1:30 veces la cantidad de L1 (Schwartz, 2000).



Figura 6: Imagen que muestra la estructura del virus del papiloma humano, específicamente la cápside icosaédrica constituida por las proteínas L1 y L2 (Disponible en: <http://weblogs.madridmasd.org>).

Los VPH son muy estables, en el medio ambiente, resisten la desecación y la congelación, son resistentes a la inactivación con éter y se inactivan con formalina, detergente, ácidos débiles y a 55° de temperatura, además al no tener envoltura puede permanecer infeccioso en un ambiente húmedo por meses (Conzuelo, 2002).

Se han identificado y secuenciado cerca de 85 tipos de Virus del Papiloma Humano (VPH) y más de 120 han sido parcialmente caracterizados (De Villiers *et al.*, 2004). Todos los tipos identificados parecen ser epiteliotrópicos es decir, infectan las células epiteliales de la piel, la región anogenital y la mucosa orofaríngea; estas zonas presentan células con una gran capacidad de proliferación y diferenciación.

La razón de su enorme diversidad aun es desconocida pero se ha observado que la replicación del ADN viral así como la formación de partículas virales en células epiteliales externas diferenciadas confiere a la infección una menor interferencia inmunológica, lo cual permite su adaptación para formar nuevas variantes de VPH en distintos tipos de epitelios (Zur Hausen, 1999).

Son aproximadamente unos 40 tipos los que afectan el tracto anogenital y están representados principalmente por los tipos 16, 18, 31, 33, 39, 45, 52, 58 y 59 quienes son denominados como de alto riesgo, siendo los tipos 16 y 18 los que se encuentran con más frecuencia, mientras que existen otros tipos como el VPH 6 y 11 son considerados de bajo riesgo (Walboomers *et al.*, 1999).

La organización del genoma viral es similar entre las diferentes variantes de VPH (**Figura 7**) y se distribuye en tres regiones:

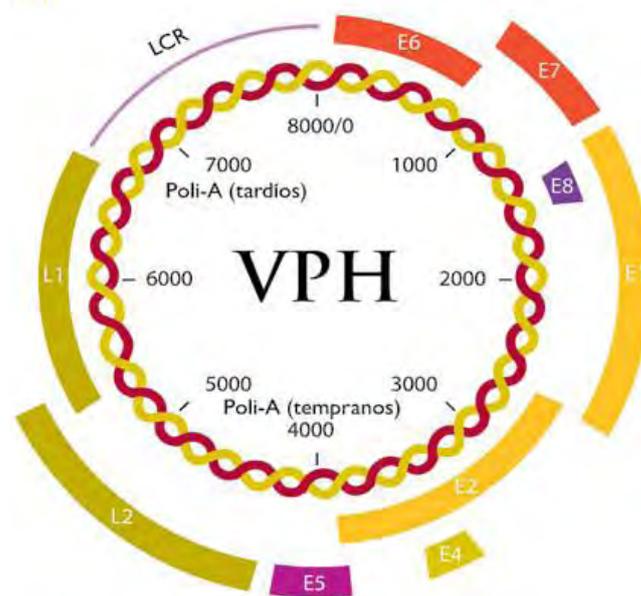


Fig. 7: Esquema de la organización del genoma del VPH, en el cual se muestra: la región larga de control, *LCR*; la región temprana, *E*; y la región tardía, *L* (Tomado de López y Lizano, 2006).

- 1) **La región de control (LCR):** formada por 400 pares de bases e incluye a los genes virales con sitios de unión para diferentes activadores y represores de la transcripción, estos genes se encargan de regular la producción de proteínas y partículas virales (Conzuelo, 2002). La constituyen unas 400-850 pb, su tamaño varía según el tipo viral, aunque no tiene marco de lectura, esta zona la conforman una serie de genes virales que se unen a diferentes activadores y represores de la transcripción; además de regular la producción de proteínas y partículas virales (Buollaga y Thierry, 1999).

- 2) **La región tardía o Late:** Se forma por dos segmentos ORF (*Open Reading Frames*) llamados L1 y L2, en éstos se encuentran genes que codifican para las proteínas estructurales que forman la cápside del virus (Conzuelo, 2002).

La proteína **L1** tiene un peso de 57 kDa y constituye cerca del 80% de la cápside viral, mientras que **L2** tiene un peso de 43 a 53 kDa y constituye el resto de la cápside (Doorbar *et al.*, 1997). L1 siempre se expresa después de L2 (Day *et al.*, 1998).

- 3) **La región temprana o Early** contiene genes virales que participan en la replicación viral, consta de varios segmentos en el genoma llamados también ORF, en esta región se distinguen seis segmentos: E1, E2, E3, E4, E5, E6 y E7; la expresión de los genes de estos segmentos se ha relacionado con eventos de la replicación viral y la transformación celular sus características principales se enlistan en la **Tabla 1**:

PROTEÍNA	CARACTERÍSTICAS
E1	Participa en la replicación del ADN viral, interacciona con la ADN polimerasa, con la histona H1 y otras proteínas que regulan la transcripción genética.
E2	Regula la transcripción y replicación del ADN viral, influye en el remodelaje de la cromatina interactuando con promotores de genes, induce el arresto del ciclo celular en G1.
E4	Facilita la amplificación del genoma viral y la expresión de proteínas tempranas asociadas a los cambios en las citoqueratinas que son característicos de los coilocitos.
E5	Codifica para proteínas de membrana, se expresa en infecciones productivas, interfiere con los receptores para los factores de crecimiento epidermal α y β por lo que está implicada en la transformación celular.
E6	Se une a la proteína p53, reteniéndola en el citoplasma o degradándola, inhibiendo su capacidad supresora tumoral, coopera con E7, interviene con proteínas de reparación del ADN, efecto antiapoptótico.
E7	Se une con la proteína Rb inactivándola con lo que se pierde su capacidad supresora tumoral y la estimulación del crecimiento celular como consecuencia de una pérdida de control del ciclo celular, incrementa la integración y mutagenicidad del ADN viral.
E8	Recientemente descubierta se piensa que reprime la replicación viral, así como la transcripción por lo cual es importante para el mantenimiento del estado latente del virus.

Tabla 1: Características de las proteínas de la región temprana del virus del papiloma humano.

Cabe destacar que las proteínas E6 y E7 son necesarias para mantener la inmortalización y el fenotipo maligno, dado que la transformación celular depende de la integración de E6 y E7 al genoma de la célula y de su activa expresión (Zur Hausen , 2000). La expresión de los genes virales varía en los diferentes estratos del epitelio, E6 y E7 se encuentran distribuidas en todo el epitelio mientras que E4, E5, L1 y L2 se incrementan en las capas suprabasales del epitelio (Conzuelo, 2002). Una vez que el virus ha infectado las células comienzan una serie de alteraciones celulares en los tejidos, modificando los estímulos de proliferación la cual se ve afectada por factores de crecimiento epidermal α y β , así como por la secreción de citocinas como las interleucinas 1, 4, 6 y 10. También se ve disminuida la expresión de la interleucina 2 e interferón γ . En esas condiciones los queratinocitos, que normalmente expresan antígenos clase I del MHC, modifican su expresión disminuyendo o perdiéndose por completo, con la consecuencia de inhibir la respuesta inmune celular. Los antígenos clase II normalmente no se expresan en los queratinocitos de cérvix, sin embargo cuando están transformados e infectados por VPH, se han detectado antígenos clase II (Galloway, 2003; Magner *et al.*, 2000).

Se ha observado que las lesiones por VPH son más frecuentes en pacientes que cursan con inmunodepresión, como los pacientes con SIDA, quienes han sido transplantados o pacientes embarazadas. En personas que no cursan con alguna inmunodepresión se ha observado la regresión espontánea de las lesiones, los estudios de tumores benignos muestran infiltrado de linfocitos T, tanto $CD4^+$ (cooperadores o helper) como $CD8^+$ (citotóxicos). En cambio en las lesiones malignas se observa un infiltrado con predominio de los linfocitos T $CD8^+$, aunque estos no son capaces de matar a las células infectadas por VPH, dado que su expresión está restringida por la expresión de antígenos del MHC, tanto MHC- I para los linfocitos $CD8^+$ como MHC- II para los linfocitos $CD4^+$, ya que los genes E6 y E7 virales interfieren con los genes del MHC y sus proteínas encargadas del transporte de antígenos que son procesados y presentados en las células APC, para ser reconocidos por los linfocitos (Conzuelo, 2002).

▪ ACETILACIÓN Y METILACIÓN EN EL ADN

Recientemente se ha relacionado el desarrollo del cáncer con daños en el ADN que producen mutaciones y transformaciones neoplásicas (Jakóbisiak *et al.*, 2003), además se sabe que eventos a nivel molecular pueden afectar la expresión de ciertos genes y con ello las funciones celulares, con lo que puede iniciar un proceso patológico. Así las células cancerígenas sufren una serie de eventos que le conceden propiedades patológicas y que a su vez hacen que ella y toda su descendencia se repliquen evadiendo todas las señales que la llevarían a autodestruirse, esto es ocasionado por fallas o alteraciones en la expresión de genes que impiden la producción de proteínas que regulen el proceso de manera correcta (Wajed *et al.*, 2001).

La metilación del ADN es un evento epigenético frecuente en el desarrollo del cáncer. Se le ha reconocido como un mecanismo clave en la regulación de la expresión de genes y su correspondiente papel en el desarrollo de muchos tipos de cáncer. La metilación del ADN se presenta de manera natural durante la embriogénesis y es asociado al desarrollo normal de los mamíferos (Lie *et al.*, 1992) cumple un papel esencial en la impronta genética y en la inactivación del cromosoma X extra (Lie *et al.*, 1993 y Beard *et al.*, 1995); pero como se ha demostrado este proceso toma un gran significado cuando la metilación ocurre en las regiones promotoras de genes, interfiriendo con los mecanismos de transcripción; así, entre otras alteraciones epigenéticas, la hipermetilación juega un papel importante en el desarrollo y progresión del tumor cancerígeno (Robertson, 2001).

Esta es una modificación química mediada por enzimas que alteran la estructura del ADN en la cual un grupo metilo (-CH₃) se une covalentemente al carbono 5 de la base citosina convirtiéndola en 5-metilcitosina. El proceso es regulado por un grupo de enzimas llamadas ADN metiltransferasas. El grupo metilo proviene del compuesto S-adenosil metionina

(SAM) que se convierte en S-adenil homocisteina (SAH) (**Figura 8**) la cual se convierte nuevamente a SAM en un proceso regulado por cobalamina y folato.

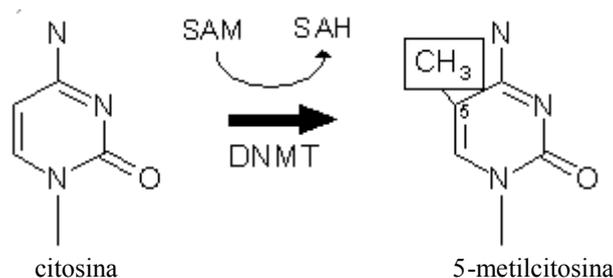


Figura 8: La metilación del ADN ocurre sobre el carbono 5 de la citosina. SAM, S-adenosil metionina; SAH, S-adenosil homocisteína; DNMT, ADN metiltransferasa (Tomado de Neissa y Guerrero, 2004).

El proceso solo ocurre en las bases citosina, cuando se encuentran unidas a una base guanina por enlaces fosfodiéster formando los pares dinucleótidos CpG (Wajed, 2001), esta metilación localizada dentro de las regiones promotoras de genes supresores del tumor inhibe su traducción (Zhu *et. al.*, 2001). Un gran número de genes relacionados al cáncer tienen una densa metilación en citosinas 5' unidas a una guanina en secuencias normalmente desmetiladas, localizadas dentro de regiones promotoras de genes (Momparler y Bovenzi, 2000).

En pacientes con cáncer cérvico uterino que presentan adenocarcinoma o cáncer de células escamosas, se ha encontrado metilación de los dinucleótidos CpG (islotos CpG) contenidos en las regiones promotoras de los genes supresores del tumor como *p16*, *VHL*, *E-caderina*, *APC* y *hMLH1* hasta en un 70%, por lo menos en alguno de estos genes (Myung *et al.*, 2001).

También se ha reportado metilación en otros genes como *RARβ*, *FHIT*, *GSTP1* y *MGMT* durante el progreso de la carcinogénesis cervical; el estado de metilación se presenta en diferentes porcentajes dependiendo del avance del tumor (Virmani *et al.*, 2001). Otros autores también reportan que el ADN de VPH-16 es un blanco eficiente para la metilación a lo largo de todo el genoma y que la frecuencia en la metilación decrece durante el progreso del cáncer (Bandal *et al.*, 2003).

Se han encontrado tres ADNmetiltransferasas funcionales: DNMT1, DNMT3a Y DNMT3b. DNMT1 es la más abundante y su blanco es el ADN semimetilado, se localiza en sitios de replicación lo cual se da al interactuar con el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) que es una proteína involucrada en la replicación del ADN (Zambrano *et al.*, 2005). A su vez es responsable de mantener los niveles de metilación durante la replicación y reparación del material genético (Chuang *et al.*, 1997). Las otras dos metiltransferasas (DNMT3a y DNMT3b) son responsables de la metilación *de novo* y su blanco es tanto el ADN semimetilado como el no metilado.

En el desarrollo del cáncer se ha observado hipometilación global e hipermetilación regional (Hermann y Baylin 2000). Las secuencias hipermetiladas son los islotes CpG, así como otras secuencias ricas en CpG y GpC localizadas cerca de las regiones promotoras de genes involucradas en la transcripción genética (Zambrano *et al.*, 2005).

La metilación inhibe la expresión de genes, ya sea interfiriendo con los factores de transcripción o por unirse a proteínas que reconocen al ADN metilado y se unen a las islas CpG formando complejos con proteínas desacetilantes de histonas (HDAC) y causando alteraciones en la estructura de la cromatina que la hace más condensada e inaccesible para cualquier factor de transcripción (Rountree *et al.*, 2000; Nan *et al.*, 1998).

Algunos ejemplos de sustancias desmetilantes del ADN son la *Hidralazina* que es un antihipertensivo, *Procainamida* utilizado como antiarítmico y *5-aza-CdR* (Segura *et al.*, 2003).

Otro cambio epigenético reconocido actualmente son las modificaciones en las histonas, proteínas que junto con el ADN conforman la cromatina, la cual es un complejo proteico que contiene 5 proteínas histonas llamadas: H1, H2A, H2B, H3 y H4, las cuatro últimas conforman el nucleosoma y cada una se presenta de manera repetida formando un octámero, sobre el cual se enrollan 145 pares de bases dando una vuelta y tres cuartos, la Histona 1 se asocia a cada nucleosoma e interactúa con otras Histonas 1 para obtener una mayor condensación, estas interacciones son electrostáticas y se llevan a cabo entre las moléculas electronegativas de los fosfatos del ADN y las cargas positivas de los aminoácidos que conforman las histonas; así, el ADN se condensa formando los cromosomas (Singer y Berg, 1993).

Las histonas pueden ser modificadas por acetilación, metilación, fosforilación, y las histonas H2A y H2B se modifican también por ubiquitinación (Singer, M. *et al.* 1999).

Los nucleosomas tienen gran importancia en la expresión de los genes; dado que en los residuos o colas amino-terminales de las histonas (ricas en el aminoácido lisina), se llevan a cabo las modificaciones (**Figura 9**) y como consecuencia se dan fenómenos de activación o represión transcripcional, o una menor condensación de la cromatina (Jenuwein y Allis, 2001; Lizuka y Smith, 2003).

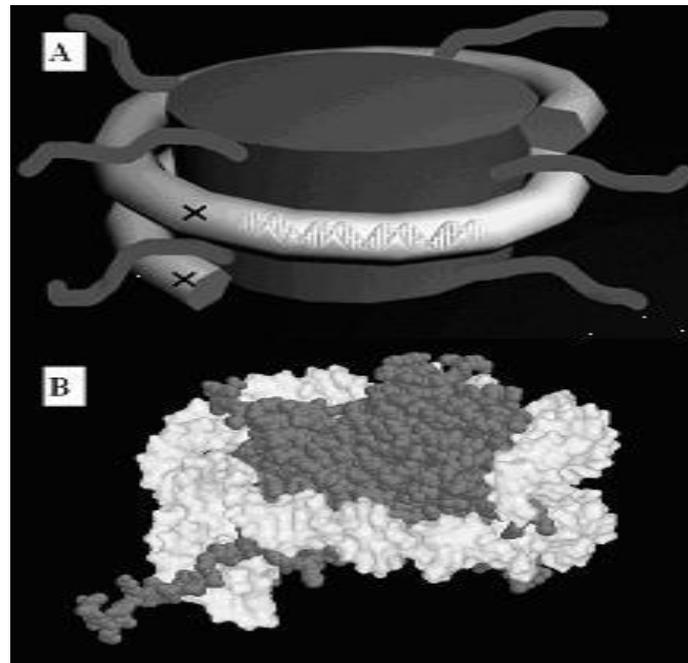


Figura 9: (A) Representación esquemática del nucleosoma, donde la doble hélice del ADN da vuelta sobre el octámero de histonas, las X marcan lugares donde podría haber reconocimiento de proteínas de unión al ADN. (B) Estructura de acuerdo al patrón de difracción de rayos X donde se aprecia la cola amino terminal de una histona H3, las cuales son susceptibles a acetilación o metilación. (Tomado de Neissa y Guerrero, 2004).

Las Histonas 3 y 4 son modificadas por enzimas acetiltransferasas (HAT) y enzimas desacetilantes de histonas (HDAC) (**Figura 10**). La acetilación de los residuos aminoterminales neutraliza las cargas positivas del residuo y se reduce la afinidad por el ADN cargado negativamente, de esta manera se llevan a cabo cambios en la conformación de los nucleosomas y el ADN se hace más accesible a los factores de transcripción en lo que se conoce como regiones activas; por el contrario las histonas hipoacetiladas (o desacetiladas) se asocian a las regiones apagadas del genoma (Grunstein, 1997; Struhl, 1998) ya que la cromatina se compacta y se suprime la transcripción.

tratamiento, que es cuando las histonas empiezan a hiperacetilarse. Además todos ellos muestran un incremento en el ARNm y así como arresto del ciclo celular ya sea en G₂/M o G₁/S y bloquean el acceso de los residuos lisina-acetilo hacia los sacos catalíticos de las HDACs (Jaboin *et al.*, 2002). Otra acción importante es que sensibilizan a las células cancerígenas a la quimioterapia (Kim *et al.*, 2003).

El Ácido Valproico es una droga utilizada tradicionalmente en terapias contra la epilepsia y se le han atribuido actividades anticancerígenas, algunas acciones importantes son: incrementa la unión del DNA activando el factor de transcripción AP-1 y la expresión de genes regulada por la ruta ERK-AP-1 y bloquea a las HDACs causando hiperacetilación (Blaheta y Cinatl, 2002).

Sin embargo el efecto que más se ha estudiado hasta este momento es el sinergismo entre los agentes desmetilantes del ADN y los inhibidores de la desacetilación de histonas, lo cual les confiere la ventaja de causar efectos de inhibición y apoptosis en dosis más bajas que si fueran usados por separado. Algunos autores reportan que usando 5-aza-deoxitidina en combinación con Depsipeptido se produce una gran reactivación de los genes mpsin y gelsolin comparado con el efecto por separado de ambas drogas, en células de cáncer de mama (Primeau *et al.*, 2003).

También se ha reportado que inhibidores de HDACs como Depsipeptido y Tricostatina A inducen a la apoptosis en presencia de 5-aza-2'-deoxitidina, en células de cáncer de hígado (Zhu W. G. *et al.* 2001). En cuanto al Ácido Valproico inhibe los correpeores asociados a HDACs empleado en concentraciones terapéuticas y actúa como un potente inductor de diferenciación en un gran número de células transformadas (Göttlicher *et al.*, 2001).

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Varias líneas de evidencia han sugerido que eventos epigenéticos asociados con el desarrollo y progresión de tumores tales como la metilación de dinucleótidos CpG y la hiperacetilación de histonas pueden impedir el potencial inmunogénico de células cancerosas (Maio *et al.*, 2003).

De hecho se ha demostrado que la hipermetilación del ADN y/o desacetilación de histonas contribuyen a la pérdida de la expresión de diferentes componentes del complejo de reconocimiento tumoral (por ejemplo: moléculas HLA clase I, moléculas del procesamiento antigénico, moléculas accesorias, etc.) (Cameron *et al.*, 2003; Gottlicher, 2001; Villar y Esteller, 2004).

Sin embargo, algunos agentes farmacológicos que inducen hipometilación de ADN o inhiben la desacetilación de histonas pueden modificar estos eventos epigenéticos, restaurando la defectuosa expresión de componentes selectos del complejo de reconocimiento tumoral, y como consecuencia modulando positivamente la inmunogenicidad de las células cancerosas (Seliger *et al.*, 1997, Segura *et al.*, 2003; Magner *et al.*, 2000).

Recientemente nuestro grupo de investigación ha encontrado que la Hidralazina, un agente desmetilante, es capaz de inducir inhibición de la proliferación celular además de revertir la resistencia a drogas y reactivar los genes supresores de tumor en muestras tumorales de cáncer cervical; además de que el Valproato de Magnesio (que es una sal derivada del Ácido Valproico), un inhibidor de desacetilasas de histonas, tiene efecto antiproliferativo en varios tipos tumorales (Chávez *et al.*, 2005; Zambrano *et al.*, 2005).

En los seres humanos se pueden generar CTL's específicos para un péptido derivados de linfocitos de sangre periférica de pacientes con HPV estimulados con un péptido sintetizado que contenga una secuencia epítope de las oncoproteínas de HPV (Schoell *et al.* 1999).

Los péptidos que son presentados como antígenos por la ruta del MHC clase I, en la superficie celular son reconocidos por las células T, activándolos y haciéndolos específicos para ese péptido. Así, linfocitos específicos para cierto péptido pueden permanecer como células de memoria formadas por la exposición previa de células presentadoras que expresen moléculas MHC con el péptido de interés, iniciando una respuesta específica contra un cierto antígeno, además bajo condiciones de cultivo se puede producir una respuesta citotóxica contra células blanco infectadas con HPV.

Por lo tanto es de interés conocer en este estudio si la Hidralazina y el Ácido Valproico favorecen la expresión de moléculas relacionadas con el procesamiento y presentación de antígenos (HLAs, TAPs, LMPs) así como la presentación de epítopes antigénicos derivados de las proteínas oncogénicas E6 y E7 del HPV, para ser utilizados en protocolos de inmunoterapia de cáncer cérvico uterino.

V. HIPÓTESIS

Se sabe que la generación y activación de linfocitos T citotóxicos específicos que reconozcan antígenos derivados de las proteínas oncogénicas de E6 y E7 de HPV está influenciada por la deficiente expresión de antígenos, y de moléculas involucradas en el procesamiento de antígenos por la vía MHC clase I. También se ha visto que agentes desmetilantes como la Hidralazina y el Ácido Valproico que es un inhibidor de la desacetilación de histonas, son capaces de reestablecer la expresión de moléculas MHC clase I en células tumorales. En consecuencia al utilizar la Hidralazina y el Ácido Valproico en líneas celulares de cáncer cérvico uterino se incrementara la expresión y presentación de moléculas involucradas en el procesamiento antigénico.

VI. OBJETIVOS

Objetivo general:

- ❖ Analizar el efecto de la Hidralazina y el Ácido Valproico en el procesamiento y presentación de los antígenos E6 y E7 de HPV 16 y 18 en líneas celulares de cáncer cérvico uterino (CaCu).

Objetivos particulares:

- ❖ Determinar la expresión de moléculas HLA –A2 en la superficie celular de líneas celulares de CaCu tratadas con Hidralazina y Ácido Valproico.
- ❖ Analizar la expresión de E6 y E7 de HPV tipo 16 y 18 en líneas celulares de CaCu tratadas con Hidralazina y Ácido Valproico.
- ❖ Analizar la expresión de TAP 1, TAP 2, LMP 2, LMP7 y LMP10 en líneas celulares de CaCu tratadas con Hidralazina y Ácido Valproico.
- ❖ Determinar la capacidad citotóxica de linfocitos de pacientes con CaCu hacia líneas celulares de CaCu tratadas con Hidralazina y Ácido Valproico.

VII. MATERIAL Y MÉTODO

▪ MUESTRAS BIOLÓGICAS:

Todas las muestras biológicas fueron suministradas en el Instituto Nacional de Cancerología (INCAN) por el Dr. Alfonso Dueñas González, con previa autorización de las pacientes para participar en el estudio. Primero fueron suministradas las biopsias de cérvix de pacientes con diagnóstico de cáncer cérvico uterino para realizar extracción de ADN genómico (APÉNDICE A) y la tipificación de VPH (APÉNDICE B) y quienes resultaran positivas para VPH 16 y VPH 18 donaron muestras de sangre para tipificar su haplotipo y conocer si eran positivas para el alelo de histocompatibilidad HLA A2 (APÉNDICE C); de acuerdo con el resultado, se realizaron los ensayos de citotoxicidad con los linfocitos de sangre periférica obtenidos de las muestras positivas para VPH 16 y 18 y el alelo de histocompatibilidad HLA A2.

▪ CULTIVOS CELULARES:

Se trabajó con las siguientes líneas celulares de cáncer cérvico uterino (**Tabla 2**) positivas para el alelo HLA-A2:

<i>LÍNEA CELULAR</i>	<i>TIPO DE VPH</i>
CaSki	VPH tipo 16
MS751	VPH tipo 18
C33A	Negativa para VPH

Tabla 2: Líneas celulares usadas para los ensayos.

Todas las líneas celulares fueron mantenidas en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco BRL USA) con suero fetal de bovino (Gibco BRL USA) al 10% dentro de una incubadora a 37 °C y 5% de CO₂. Se cultivaron tratándolas con los fármacos de interés en cajas Petri de poliestireno de 60 X 15 mm (Corning, USA), la duración del tratamiento para cada una de las líneas celulares fue de cinco días previos a su utilización ya sea para los ensayos de citotoxicidad, citometría de flujo o para RT-PCR. De esa manera, en cada uno de los ensayos las líneas celulares CaSki, MS751 y C33A fueron cultivadas bajo las siguientes condiciones:

- La primera se utilizó como control negativo es decir, sin tratamiento los cinco días.
- En la segunda caja, se agregó Hidralazina (Sigma Chem. Co. USA) directamente al medio de cultivo a una concentración preestablecida de 10 µM durante 5 días.
- En una tercera caja con células se agregaron 200U/ml de Interferón γ (R&D Systems), al día 3 de tratamiento, durante 2 días.
- En la cuarta caja con células se agregó el Ácido Valproico (Sigma Chem. Co. USA) a una concentración de 1 mM, también en el día 3 del ensayo durante 2 días.
- En la quinta caja con células se agregaron de manera conjunta la Hidralazina y el Ácido Valproico en las concentraciones previamente mencionadas y días de tratamiento establecidos.
- En la sexta caja con células se agregaron de manera conjunta Hidralazina, Ácido Valproico e Interferón γ en las concentraciones previamente mencionadas y días de tratamiento establecidos.

Los tiempos y las dosis de fármacos utilizados en los cultivos celulares fueron los mismos que reportaron Segura *et al.*, 2003 para el caso de Hidralazina; Chávez *et al.*, 2005 para el Ácido Valproico y Mora *et al.* 2006 para el caso de IFN- γ .

▪ **OBTENCIÓN DEL RNA:**

Una vez terminado el tratamiento con Hidralazina y Ácido Valproico en las líneas celulares CaSki y MS751, se realizó la extracción de RNA total con la técnica de TRIZOL (Life Technologies, Invitrogen USA) de acuerdo con el protocolo suministrado con él reactivo; las células de todas las cajas de cultivo fueron lisadas, para lo cual se agregó directamente 1 mL. del reactivo TRIZOL en las cajas previamente lavadas con PBS, incubando por 5 minutos a temperatura ambiente en tubos para microcentrífuga (Costar, USA). Las células no adherentes se colectaron por centrifugación obteniendo el botón celular y se lisaron agregando 1 mL. de TRIZOL directamente en los tubos para microcentrífuga.

Posteriormente se agregó 0.2 mL. de cloroformo en el tubo, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 12,000 rpm por 15 minutos en una termocentrífuga a una temperatura de 2 a 8 °C. Se colectó la fase acuosa donde se encuentra disuelto el RNA en otro tubo y se desechó la fase orgánica de fenol-cloroformo. Después el RNA se precipitó con 0.5 mL. de isopropanol en cada tubo, mezclando ligeramente. Se incubó de 15 a 30 °C por 10 minutos y se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos a una temperatura de 2 a 8 °C. Se eliminó el sobrenadante en cada tubo y se lavó con 1 mL. de etanol al 75%, se agitó y se centrifugó a 7,500 rpm por 5 minutos a una temperatura de 2 a 8 °C. Por último se dejó secar el RNA contenido en cada tubo a temperatura ambiente en la campana de extracción durante 5 a 10 minutos y se disolvió en agua ultra pura libre de RNAsas y DNAsas (DEPC, Gibco USA) utilizando de 20 a 30 µL. La cantidad de RNA obtenido se cuantificó mediante su lectura de absorbancia en un espectrofotómetro digital (Eppendorf AG, Hamburg) a una longitud de onda de 260 nm.

▪ **RETROTRANSCRIPCIÓN DE RNA:**

La retrotranscripción de RNA para pasarlo a DNA complementario se realizó en tubos para PCR (Eppendorf), con los siguientes reactivos: RNA 10 µg, MgCl₂ 5mM, Buffer RT 10X, dNTPs 4mM, Inhibidor de RNAsas 25 U, Oligo-dT 1:25, Dithiotreitol (DTT) 25 mM,

enzima retrotranscriptasa 200 U, H₂O DEPC la necesaria para completar un total de 100 µL. La reacción se llevo a cabo, en un termociclador (Mastercycler Eppendorf, Hamburg) a 42 °C por una hora y a 95 °C por 5 minutos.

▪ **REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR):**

Posteriormente la reacción en cadena de la polimerasa para cada uno de los ensayos se efectuó en tubos para PCR (Eppendorf), mezclando las siguientes cantidades de reactivos en un volumen total de 25 µL: cDNA 5 µL; MgCl₂ 1.5 mM; Buffer de reacción 10 X; dNTPs 0.8 mM; enzima polimerasa de ADN 1 U; oligonucleótidos para β-actina 0.1 mM; oligonucleótidos específicos para E6, E7, TAP1, TAP2, LMP2, LMP7, y LMP10 0.2 mM; H₂O DEPC 12.925 µL, para efectuar la reacción en cadena de la polimerasa los tubos se colocaron en el termociclador (Mastercycler Eppendorf, Hamburg) con las condiciones de temperatura y tiempo de acuerdo a cada molécula que se analizó (APÉNDICE D).

La secuencia de los oligonucleótidos (primers) utilizados se muestra en la **Tabla 3** (Singal D *et al.* 1998; Seliger B *et al.* 1997; Johansen A *et al.* 1998 y Groettrup M *et al.* 1995):

PRIMER	SENTIDO 5'3'	ANTISENTIDO5'3'	TAMAÑO (PB)	ALINEAMIENTO (°C)
β-actina	gggtcagaaggattcctatg	ggtctcaaacatgatctggg	238	60
E7 VPH 16	cagctcagaggaggaggatg	gccattaacaggtctcca	166	60
E6 VPH 18	atgctgcatgccataaatgt	tgcccagctatgttgtaa	214	60
TAP 1	gacaagagccacaggtatttg	tgatgagaagcactgagcgg	345	58
TAP 2	tacctgctcataaggagggtgc	attgggatatgcaaaggagacg	312	58
LMP 2	gggatagaactggaggaacc	agatgacacccccgcttgag	321	60
LMP 7	gaacacttatgcctacggggtc	tttctacttaccaccaaccatc	174	60
LMP 10	attctgggcccgcgatacgcg	gccagggccgcgtcctgacc	238	60

Tabla 3: Secuencia de los oligonucleótidos utilizados y condiciones para RT- PCR

El producto final del PCR fue corrido en gel de agarosa al 3% en una cámara de electroforesis Horizon 58 (GibcoBRL Life Technologies) y visualizados con bromuro de etidio al 10% en un transiluminador con luz ultravioleta (UVP Transilluminator NM-26),

para observar las bandas amplificadas correspondientes a las moléculas de interés, por último, la imagen se documentó por fotografía bajo luz ultravioleta.

▪ **CITOMETRÍA DE FLUJO:**

Para la detección de moléculas HLA-A2 por citometría de flujo, se cosecharon las células tratadas con Hidralazina y Ácido Valproico y se colocaron en placas de 96 pozos ajustándolas a 5×10^5 células por pozo, en 100 μL de solución salina de fosfatos y suero fetal de bovino al 2% (PBS-SFB). Se centrifugaron y se eliminó el sobrenadante, los botones celulares fueron resuspendidos en 100 μL (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) de anticuerpo HLA-A2 (PA2.1, American Type Culture Collection, USA), se incubaron a 4 °C por 30 minutos y posteriormente se lavaron dos veces con PBS- SFB (Solución buffer de fosfatos- suero fetal de bovino). Posteriormente las células fueron incubadas con 100 μL de anticuerpo secundario marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC-Goat antimouse IgG; Gibco BRL USA) diluido 1:100 en PBS-SFB, por 15 minutos a 4 °C. Posteriormente se realizaron dos lavados y se resuspendieron en 400 μL de PBS-SFB para ser analizado en un citómetro de flujo (FACS calibre Becton Dickinson). También fue realizado un marcaje inespecífico solo con anticuerpo secundario como referencia.

▪ **ESTABILIZACIÓN DE LOS PÉPTIDOS DERIVADOS DE E6 Y E7 CON EL ALELO HLA-A2:**

Para probar la afinidad de los tres péptidos derivados de VPH a diferentes concentraciones (de 12.5-100 μg) estos fueron sintetizados por Invitrogen USA, disueltos en solución buffer de fosfato y mantenidos a -70 °C antes de ser utilizados. Posteriormente se incubaron toda la noche a 37°C en presencia de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de β_2 -microglobulina, y posteriormente se incubaron con la línea celular linfoblástica T2 que tiene el alelo HLA-A*0201 (HLA A2) y expresa moléculas HLA vacías en su superficie para conocer su afinidad. También se

utilizó el péptido GILGFVFTL derivado proteína M de la influenza como control positivo de unión al alelo HLA A2. (Tabla 4):

PÉPTIDO	SECUENCIA
PROTEÍNA E7 VPH 16	TLGIVCPIC
PROTEÍNA E7 VPH 16	YMLDLQPETT
PROTEÍNA E6 VPH 18	KLPDLCTEL

Tabla 4: secuencia de los péptidos derivados de las proteínas E6 de VPH 18 y E7 de VPH 16 que específicamente se unen al alelo HLA-A2.

▪ **EXTRACCIÓN DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA POR GRADIENTE DE DENSIDAD**

La muestra de sangre de la paciente suministrada en un tubo *vacutainer*, se homogenizó. Posteriormente se pasó a un tubo de plástico de 50 mL (Corning USA), se centrifugó a 3000 rpm durante 6 minutos, se retiró el plasma (la capa superior) dejando una capa de ½ cm. aproximadamente ya que esta todavía contiene células blancas, la cual se resuspendió en PBS (solución salina de fosfatos). Después la muestra se pasó a un tubo con *Ficoll* (Histopaque 1.077 Sigma Aldrich) lo cual se realizó de manera lenta evitando que se mezclen para quedar en relación Muestra:Ficoll, 3:1. Se centrifugó por 25 minutos a 1500 rpm. Después de la centrifugación se observó la formación de un patrón de bandas en el tubo, que de forma descendente corresponden a: desechos, disco color blanquecino con los linfocitos, FICOLL y eritrocitos. La banda blanquecina que contiene los linfocitos se extrajo del tubo con pipeta de 2 mL. Esta se colocó en un tubo de plástico de 15 mL

(Corning USA) y se resuspendió con 5 mL de PBS. Posteriormente se centrifugó por 4 minutos a 2000 rpm decantando el PBS. Se realizaron otros dos lavados con PBS y finalmente las células se resuspendieron en medio de cultivo Iscove's (Gibco BRL USA) y suero humano al 10%.

▪ **CITOTOXICIDAD:**

Las células efectoras, es decir los linfocitos obtenidos de pacientes con VPH 16 y 18 y con el alelo de histocompatibilidad HLA A2, se incubaron con los péptidos estabilizados previamente, derivados de las oncoproteínas E6 y E7 de VPH. Se sembraron en botellas FALCON T25 (Corning USA). La muestra de linfocitos se dividió en tres partes para cada uno de los péptidos:

- En una botella se colocó el péptido KLPDLCTEL y una parte de los linfocitos.
- En una segunda botella se colocó el péptido YMLDLQPETI con otra parte de los linfocitos.
- En la tercera botella se colocó el péptido TLGIVCPIC con la otra parte de los linfocitos.

Se ajustó el volumen total de linfocitos, medio de cultivo ISCOVES'S (Gibco BRL USA) suplementado con 10% de suero humano desactivado, 100 UI/ ml de penicilina, 4 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio y 20 μ M de 2-mercaptoetanol (Gibco BRL USA) y el péptido en concentración 25 μ M; a 4 mL totales en la botella.

Para inducir la proliferación de los linfocitos T, los cultivos fueron suplementados con citocinas, al tercer día se agregaron 20 U/mL de Interleucina 2 (IL-2) a una concentración de 10 UI/mL e Interleucina 15 (IL-15) en concentración 15 ng/mL; cada 3 días se hizo recambio parcial de medio, adicionando medio fresco suplementado con las citocinas y 10 μ M de los respectivos péptidos antigénicos. Para ser activados y conseguir la especificidad hacia los péptidos, los linfocitos fueron estimulados *in vitro* en presencia de

células presentadoras de antígenos para lo cual se utilizó la línea celular linfoblástica T2, la cual fue cargada con el péptido de interés y tratada con mitomicina para quedar como

célula presentadora del péptido sin proliferar (APÉNDICE E).

Los cultivos de linfocitos se mantuvieron en cultivo por 3 semanas, y se hizo coincidir los cinco días de tratamiento con Hidralazina y Ácido Valproico en las líneas de cáncer cérvico uterino, con el día en que se cosecharon los linfocitos para realizar el ensayo de citotoxicidad (día 21). Las células blanco con tratamientos (CaSki, MS751 y T2) fueron cosechadas, lavadas en medio de cultivo y marcadas con 50 μCi de ^{51}Cr en forma de cromato de sodio en solución acuosa ($\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$), por una hora e incubadas con las células efectoras (linfocitos) en 100 μL de medio ISCOVE'S ajustando la cantidad para quedar en proporción Efectoras:Blanco 20:1, por triplicado en placas de 96 pozos fondo U (Costar USA).

Para medir la liberación espontánea de ^{51}Cr se cultivaron células blanco sin células efectoras y para medir la liberación de ^{51}Cr total las células blanco (sin células efectoras) fueron lisadas con 100 μL de SDS al 5 %. Se incubaron por 4 horas a 37 °C y 5% de CO_2 el supernadante fue transferido a viales (Mini Poly-Q vial Beckman) para medir la liberación de ^{51}Cr en un contador de centelleo (Beckman LS 6500). La citotoxicidad fue calculada de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de citotoxicidad} = \frac{(\text{Liberación experimental} - \text{Liberación espontánea})}{(\text{Liberación total} - \text{Liberación espontánea})} \times 100$$

▪ ANÁLISIS ESTADÍSTICO

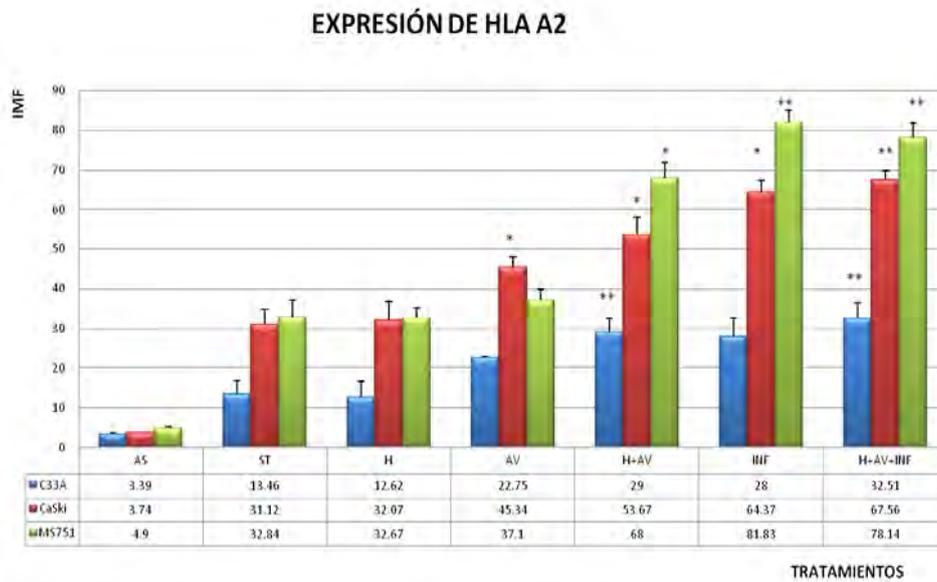
En los ensayos de citometría de flujo cada uno de los tratamientos con las líneas celulares se realizó por triplicado, tomando el promedio y obteniendo la desviación estándar del resultado. Para los ensayos de citotoxicidad cada tratamiento de linfocitos con su respectivo péptido fue realizado por triplicado, tomando como resultado el promedio y su desviación estándar. Las comparaciones entre las células tratadas y sin tratamiento fueron evaluadas por la prueba estadística t y un valor de $P < 0.05$ fue considerado significativo.

VIII. RESULTADOS

EFECTO DE HIDRALAZINA Y ÁCIDO VALPROICO EN LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD HLA-A2 EN CÉLULAS DE CÁNCER CÉRVICO UTERINO.

Para determinar si los agentes epigenéticos (Hidralazina y Ácido Valproico) favorecen la expresión de moléculas HLA-I, específicamente el alelo HLA-A2 en la membrana de las líneas celulares CaSki (HPV 16+), MS751 (HPV 18+) y C33A (HPV-), las cuales se caracterizan por expresar en común el alelo de histocompatibilidad HLA-A2 (el más frecuentemente encontrado a nivel mundial), las líneas celulares fueron cultivadas en presencia ya sea de Hidralazina (H) 10 μ M, durante 5 días o con Ácido Valproico (AV) 1mM, durante 3 días, o de ambas drogas; y mediante citometría de flujo, se evaluó la expresión del alelo HLA-A2 utilizando el anticuerpo monoclonal PA2.1 que reconoce a la molécula HLA-A2 de manera conformacional. Los resultados muestran que en las células C33A en presencia de Hidralazina, la expresión del alelo HLA-2 no tuvo cambio con respecto al cultivo sin tratamiento, mientras que las células tratadas con AV, H + AV, INF γ e H+AV+INF- γ si hubo un incremento, más notable en la combinación de H+AV y de H+AV+INF γ . En las células CaSki y MS751, se observó un patrón similar en el incremento de expresión de HLA-A2 con la combinación de las drogas, y de igual manera para Hidralazina sola, no hubo un aumento. Las diferencias significativas entre las líneas celulares tratadas en comparación con las células sin tratamiento (ST) se muestran con

* P=95% y ** P=99% (Figura 1).



*P=95%,
**P=99%

Figura 1. Efecto de Hidralazina y Ácido Valproico sobre la expresión de moléculas HLA-A2 en líneas celulares de cáncer cérvico uterino. AS, expresión de fondo dada por el anticuerpo secundario marcado por GAM-FITC; ST, Sin Tratamiento; H, Hidralazina; AV, Ácido Valproico; INF, interferón γ .

EXPRESIÓN DE ARN MENSAJERO DE TAP1, TAP2, LMP2, LMP7 Y LMP10 EN LÍNEAS DE CÁNCER CÉRVICO UTERINO TRATADAS CON HIDRALAZINA Y ÁCIDO VALPROICO.

Una vez que se determinó que la combinación de la Hidralazina, Ácido Valproico e Interferón γ favorecen la expresión de moléculas de Histocompatibilidad HLA-A2, se quiso conocer si el incremento en la expresión de moléculas HLA-A2 es debido a un aumento de la expresión de moléculas participantes en el procesamiento de antígenos: LMP-2, LMP7 y LMP-10 del complejo proteasómico (generadoras de péptidos antigénicos)

y de los transportadores de péptidos antigénicos TAP1 y TAP2, los cuales participan en el abastecimiento de péptidos para unirse a las moléculas HLA clase I. Para ello se realizó mediante RT-PCR el análisis de la expresión de estos componentes en las líneas celulares CaSki y MS751 tratadas con Hidralazina y Acido Valproico. (**Figura 2**). Se observó que el tratamiento de Hidralazina y Ácido Valproico no induce un incremento perceptible en la expresión de moléculas participantes en el procesamiento de antígenos y de los transportadores de péptidos antigénicos.

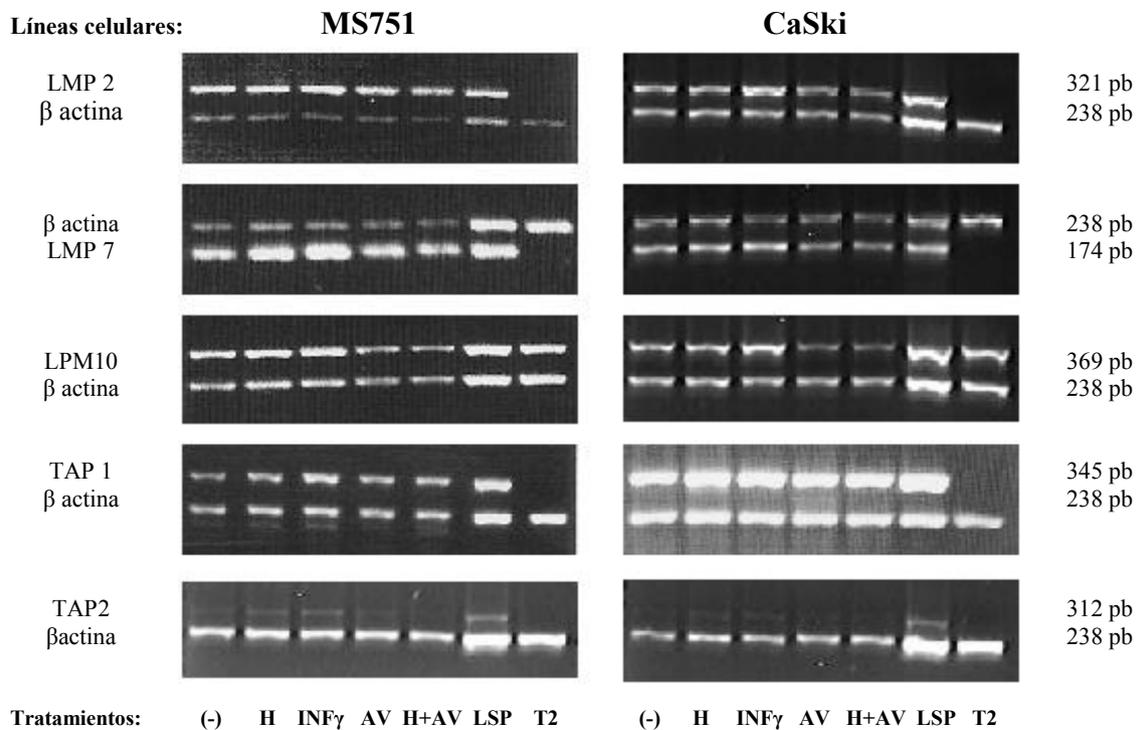


Figura 2. Efecto de Hidralazina y Ácido Valproico en la expresión de moléculas del procesamiento antigénico LMP 2, LMP 7, LPM 10, TAP 1 y TAP 2 en las líneas celulares MS751 (VPH 18) y CaSki (VPH 16); LSP linfocitos de sangre periférica usados como control positivo; T2 línea celular de linfoblastoma utilizado como control negativo.

EFFECTO DE HIDRALAZINA Y ÁCIDO VALPROICO EN LA EXPRESIÓN DEL GEN E6 DE VPH 18 Y E7 DE VPH 16 EN LAS LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER CÉRVICO UTERINO MS751 Y CaSki.

Se analizó mediante RT-PCR la expresión de los genes de E6 y E7, para determinar si la Hidralazina y el Ácido Valproico modulan la expresión de estos genes en las líneas celulares de CaSki y MS751. Los resultados muestran que ni el transcripto de E7 de HPV-16 en células CaSki ni el transcripto de E6 de HPV-18 en células MS751, fueron modificados por el tratamiento con estos fármacos, ya sea solos o en combinación (Figura 3).

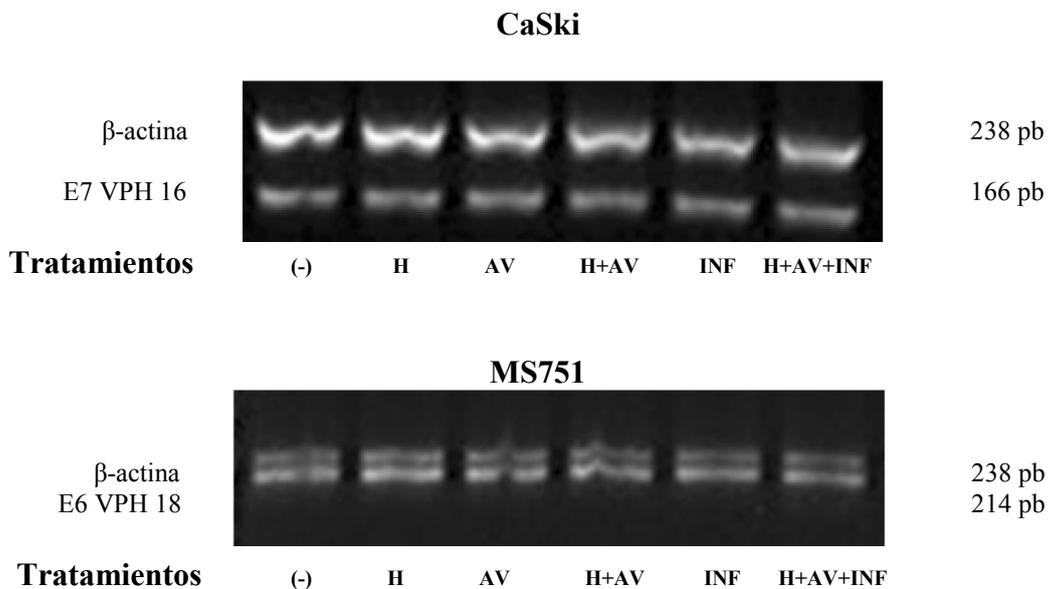


Figura 3. Expresión de E7 de HPV 16 en la línea celular CaSki y de E6 de HPV 18 en la línea celular MS751 ambas con tratamientos. (-) línea celular sin tratamiento; H, Hidralazina; AV, Ácido Valproico; INF, Interferón γ .

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD CITOTÓXICA DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON CÁNCER CÉRVICO UTERINO CONTRA CÉLULAS MS751 Y CaSki TRATADAS CON HIDRALAZINA Y ÁCIDO VALPROICO.

Para saber si los tratamientos con Hidralazina y Ácido Valproico potencializaron el efecto citotóxico de los linfocitos se evaluó el efecto de éstos fármacos en la presentación de 3 péptidos antigénicos específicos para el alelo HLA-A2 ampliamente conocidos por su capacidad inmunogénica: TLGIVCPIC y YMLDLQPETT de la proteína E7 de HPV-16 y el péptido KLPDLCTEL de la proteína E6 de HPV-18 (Bartolomew *et al.* 1994; Imanishi *et al.* 1992; Kast *et al.* 1993; Rensing, 1993 y Rensing *et al.* 1996). Previamente se realizó un ensayo con los péptidos para conocer su afinidad para unirse a la molécula HLA-A2, para lo cual se utilizó la línea celular T2, la cual carece de moléculas del procesamiento antigénico y por ello presenta moléculas HLA-A2 vacías en la superficie celular. De acuerdo con la **Figura 4**, usando 50 – 100 µg de estos tres péptidos, se observó una eficiente estabilización del alelo HLA-A2 sobre las células T2 similar a la obtenida con el péptido control GILGFVFTL derivado de la proteína M de influenza A y con una alta afinidad de unión al alelo HLA-A2.

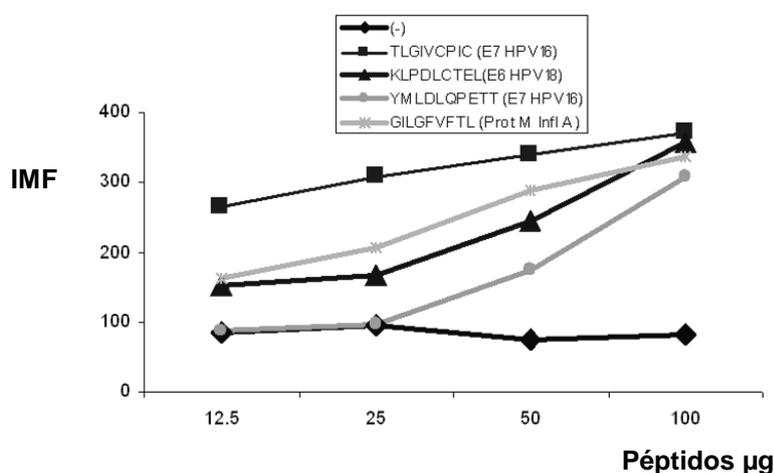


Figura 4. Titulación de las concentraciones de los péptidos antigénicos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 y 18, para unirse a la molécula HLA-A2 en la línea celular linfoblástica T2. IMF, Índice Medio de Fluorescencia.

Por consiguiente, la concentración utilizada en los experimentos fue de 50 µg/mL en los cultivos de linfocitos de las pacientes, ya que se observa una estabilización en el índice medio de fluorescencia con esa cantidad.

Posteriormente, para conocer el efecto citotóxico de los linfocitos T CD8⁺ de pacientes con cáncer cérvico uterino contra las líneas celulares CaSki y MS751 tratadas con Hidralazina y Ácido Valproico, linfocitos T de pacientes con VPH 16 (Pacientes 1 y 2) o VPH 18 (Pacientes 3 y 4) (**Tabla 3**) fueron estimulados con los péptidos antigénicos: TLGIVCPIC y YMLDLQPETT de la proteína E7 de VPH 16 y el péptido KLPDLCTEL de la proteína E6 de VPH18.

Así mismo el péptido GILGVFTL derivado de la proteína M de la matriz de influenza que es altamente afín al alelo HLA-A2, fue utilizado como péptido irrelevante. Todo ello para demostrar la especificidad de los péptidos derivados de las oncoproteínas en la citotoxicidad contra las células blanco, en presencia de IL-2 e IL-15. Después de tres semanas, los linfocitos fueron retados contra las líneas celulares CaSki (HPV 16) o MS751 (HPV 18) previamente tratadas con los fármacos.

PACIENTE y TIPO DE VPH	DIAGNOSTICO DE ACUERDO A FIGO	ALELOS HLA
1) VPH16	SCC IIIB	A2, B53,Cw4,A68,B48,Cw3
2) VPH16	SCC IBI	A2,B39,Cw3,B60,Cw3
3) VPH 18	SCC IIA	A2, B38(16), Cw3, A2, B60(40), Cw3
4) VPH 18	SCC IIIB	A2, B35, Cw4, A3, B41,Cw7

Tabla 3: Pacientes y características tumorales con las cuales se trabajó. VPH, Virus del Papiloma Humano; SCC, carcinoma escamoso; FIGO, Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia.

Los linfocitos de la paciente 1 (HPV-16) después de ser estimulados con los péptidos TLGIVCPIC y YMLDLQPETT de la proteína E7 de VPH 16 ejercieron un mayor efecto citotóxico sobre la línea celular CaSki tratada con Ácido Valproico (AV), la mezcla de Hidralazina y AV, Interferón gamma (IFN- γ) e H/AV/IFN- γ (**Figura 5**). Este efecto también fue observado en la paciente 2 positiva para HPV-16 cuyos linfocitos estimulados con ambos péptidos ejercieron un efecto citotóxico muy importante sobre la línea CaSki tratada con los fármacos, principalmente cuando éstos fueron utilizados de manera simultánea (**Figura 6**).

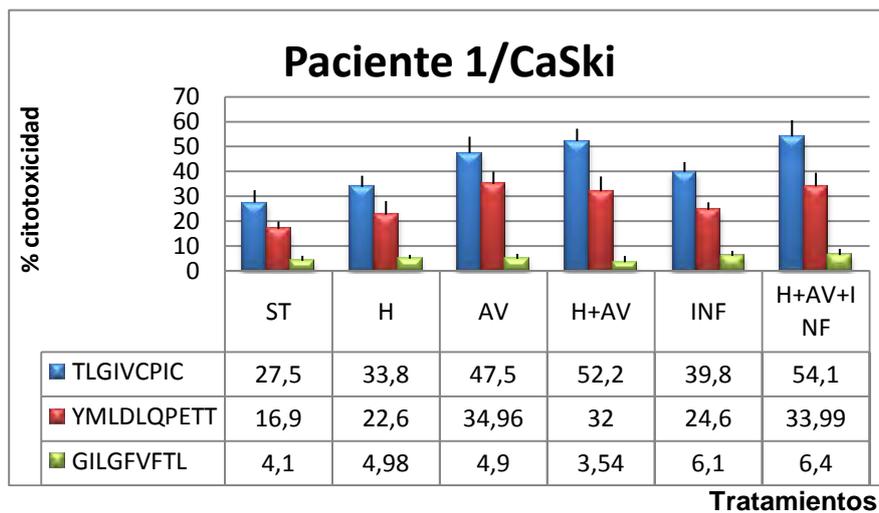


Figura 5: Citotoxicidad de linfocitos de paciente con cáncer cérvico uterino positiva para VPH 16 y con el alelo HLA A2, sobre la línea celular CaSki tratada con Hidralazina y Acido Valproico.

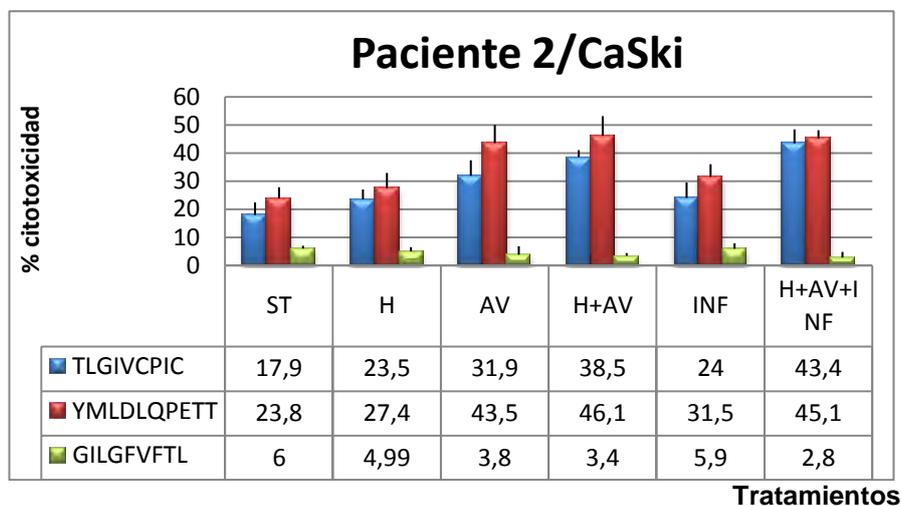


Figura 6: Citotoxicidad de linfocitos de paciente con cáncer cérvicouterino positiva para VPH16 y con el alelo HLA A2, sobre la línea celular CaSki tratada con Hidralazina y Acido Valproico.

Finalmente, los linfocitos T de 2 pacientes positiva para VPH 18, después de ser estimulados con el péptido KLPDLCTEL de la proteína E6 de VPH 18, fueron capaces de lisar con mayor efecto citotóxico a la línea celular MS751. La paciente 3 y la paciente 4 mostraron la citotoxicidad más alta cuando las células fueron tratadas con AV, H/AV e H/AV/IFN- γ . (**Figura 7**) y (**Figura 8**). En ambos casos el efecto de la Hidralazina sola no tuvo una diferencia notable respecto a las células sin tratamiento. En todos los experimentos los linfocitos T estimulados con el péptido control GILGFVFTL mostraron muy poca actividad citotóxica cuando fueron retados contra las células CaSki y MS751 (**Figuras 5, 6, 7 y 8**).

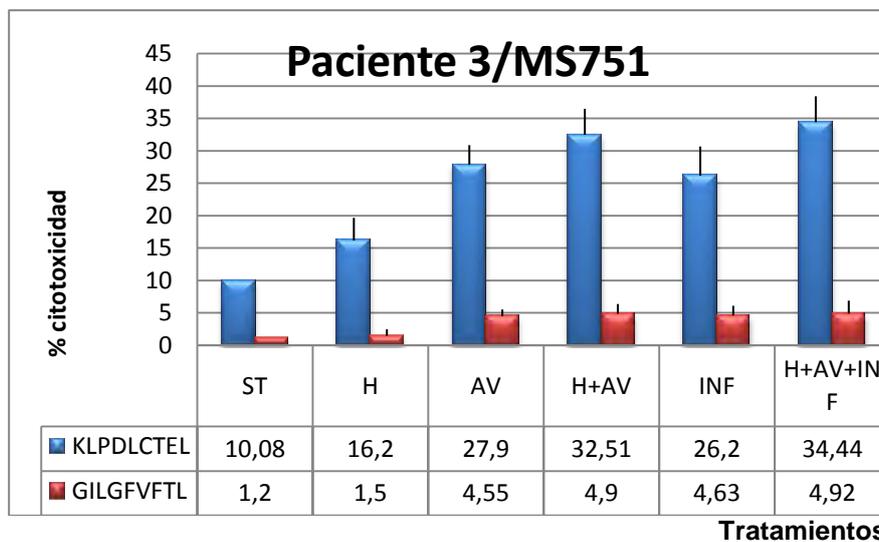


Figura 7: Citotoxicidad de linfocitos de paciente positiva para VPH 18 y con el alelo HLA A2, sobre la línea celular MS751 tratada con Hidralazina y Acido Valproico.

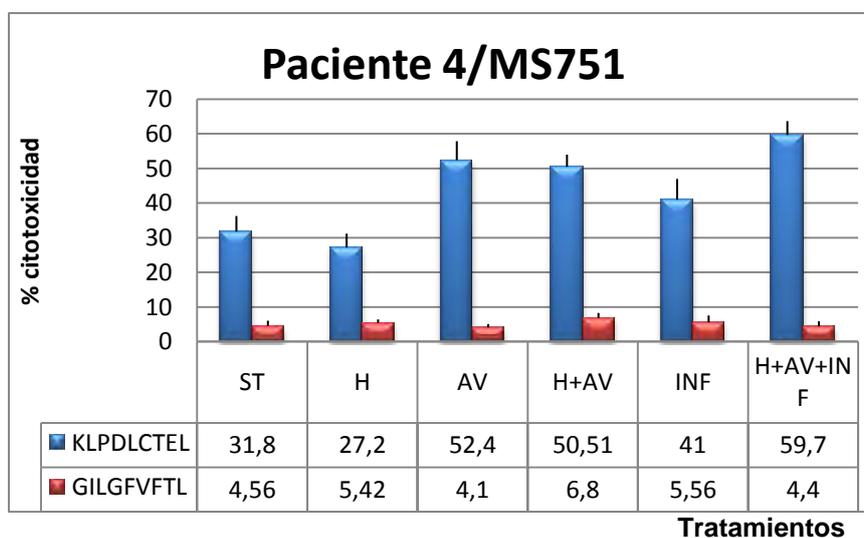


Figura 8: Citotoxicidad de linfocitos de paciente positiva para VPH 18 y con el alelo HLA A2, sobre la línea celular MS751 tratada con Hidralazina y Ácido Valproico.

IX. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Durante el desarrollo del cáncer, las células sufren una serie de cambios epigenéticos que hacen que pierda sus funciones normales y que no responda a los mecanismos naturales del organismo que controlan su crecimiento y reproducción. Son conocidos los efectos derivados de la pérdida de la expresión de genes supresores del tumor, así como de las proteínas involucradas en la señalización, ya sea para reprimir o inducir a estos genes (Bayin S B y Herman J G. 2000)

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 las 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 éstas moléculas, a una baja expresión, o a la pérdida selectiva de distintos alelos específicos. Por consiguiente, las células tumorales son deficientemente reconocidas por los linfocitos T, contribuyendo a que el tumor escape de la vigilancia inmune (Seliger B. *et al.* 2002).

En las últimas dos décadas la investigación se ha enfocado en tratar de explicar esta evasión tumoral por diferentes anormalidades genéticas, pero actualmente existe evidencia que señala que los eventos epigenéticos tiene un papel crucial para la evasión inmune tumoral (Maio M. *et al.* 2003, Garmenis A E. 2007).

Se ha demostrado que agentes epigenéticos tiene efectos antitumorales tanto in vivo como in vitro al modular la expresión de genes silenciados por cambios en la metilación del ADN

y la modificación transcripcional a través del uso de desmetilantes del DNA e inhibidores de la acetilación de histonas (Zhu W G *et al.* 2003).

En este sentido, se ha reportado que los agentes epigenéticos como la Hidralazina un compuesto hipertensivo, tiene un efecto desmetilante del ADN y reactiva la transcripción de genes supresores del tumor (Segura P. *et al.* 2006). Por otra parte, el Ácido Valproico es un efectivo inhibidor de desacetilasas de histonas a concentraciones bien toleradas entre dosis terapéuticas utilizadas para uso original en la epilepsia (Arce C. 2006).

Por consiguiente, en este trabajo evaluamos si la Hidralazina y el Ácido Valproico son capaces de modular positivamente la expresión de moléculas HLA clase I (específicamente el alelo A2) y del procesamiento y presentación de antígenos en líneas celulares de cáncer cérvico uterino y si además estos fármacos pueden mejorar la presentación de péptidos antigénicos derivados de las proteínas E6 y E7 de HPV 16 y 18.

Los resultados demuestran que la combinación de Hidralazina más Ácido Valproico favorece la regulación positiva del alelo HLA-A2 en las líneas celulares CaSki y MS751, principalmente cuando se le agregó IFN- γ (potente inductor de la expresión de moléculas HLA-I). Estos resultados están de acuerdo con anteriores estudios donde se obtuvo igualmente un incremento de la expresión de moléculas HLA clase I total al tratar a las células CaSki y MS751 con la combinación de estos fármacos (Juárez QS. 2007).

Estas observaciones son apoyadas por otro trabajo en donde células SW480 muestran una regulación positiva del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase I solamente con el tratamiento combinado pero no con Hidralazina o Ácido Valproico solos (Chávez BA, *et al.* 2006). El hecho que la Hidralazina sola no haya tenido efecto sobre la expresión de moléculas HLA-A2 nos sugiere que el remodelado de la cromatina por la

acetilación de histonas predomina sobre la metilación en relación a la expresión de genes involucrados en el cáncer (Mora GML, *et al.* 2006). La expresión deficiente de moléculas HLA clase I en células de cáncer se ha tratado de explicar con base en alteraciones en la maquinaria del procesamiento de antígenos (Johansen A *et al.* 1998). En las líneas celulares CaSki y MS751, al ser tratadas con Hidralazina y Ácido Valproico, no induce un incremento perceptible en la expresión de moléculas participantes en el procesamiento de antígenos y de los transportadores de péptidos antigénicos; lo cual nos sugiere que el mejoramiento en la expresión de HLA-A2 por efecto de estos fármacos, es debido a una regulación positiva en el gen del alelo A2 y no a una re-expresión *de novo* en las moléculas involucradas en el procesamiento antigénico.

Por otra parte, la continua expresión de las oncoproteínas E6 y E7 para mantener el estado de transformación celular, las hace blancos potenciales en la producción de epítopes antigénicos que sean reconocidos por las células efectoras para mejorar la respuesta inmune del organismo contra las células del cáncer (Valdespino V *et al.* 2004). Además, como se mencionó anteriormente, la mayoría de las células de cáncer cervical muestran una expresión deficiente de moléculas HLA clase I sobre su superficie, que pueden afectar la presentación de péptidos antigénicos derivados de VPH a linfocitos T (Ritz U. *et al.* 2001) Por consiguiente, se determinó analizar si la Hidralazina y el Ácido Valproico son capaces de mejorar la presentación de péptidos antigénicos de E6 y E7 de VPH 16 y 18 a linfocitos T citotóxicos derivados de pacientes con cáncer cervical.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, el tratamiento de células tumorales con Hidralazina y Ácido Valproico e IFN- γ hizo que estas fueran altamente reconocidas y lisadas por linfocitos T de pacientes con cáncer cérvico uterino de manera alelo-específico. Lo anterior sugiere que los genes que codifican para las moléculas HLA clase I son blancos importantes de las modificaciones epigenéticas, los cuales pueden ser revertidos mediante el tratamiento combinado de Hidralazina y Ácido Valproico, remarcando su uso potencial en la inmunoterapia de este tipo de cáncer.

Además pudimos observar que estos fármacos tienen un efecto favorable sobre las células de cáncer independientemente del tipo de VPH para el cual sean positivas, ya que se obtuvieron resultados similares con los tratamientos en líneas celulares con VPH 16 y 18 los cuales son encontrados en la mayoría de los casos de cáncer.

Los resultados de este estudio sugieren que el uso de drogas epigenéticas para el tratamiento del cáncer, tales como la Hidralazina y el Ácido Valproico pueden mejorar la respuesta inmune en pruebas clínicas basadas en péptidos de E6 y E7, debido a su efecto regulador positivo sobre las moléculas de HLA clase I.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el tratamiento de la células tumorales con Hidralazina y Ácido Valproico favorece el incremento en la expresión de las moléculas HLA-A2, lo cual repercute de manera favorable para su reconocimiento inmune. Lo anterior apoya el uso potencial de estos fármacos en protocolos de inmunoterapia en pacientes con cáncer cérvico uterino.

X. CONCLUSIONES

El tratamiento con Ácido Valproico solo, la combinación de la Hidralazina y Ácido Valproico y la combinación de Hidralazina, Ácido Valproico e Interferón γ , mejoran la expresión de las moléculas HLA A2 en la superficie celular de líneas celulares de cáncer cérvico uterino.

El tratamiento con Ácido Valproico solo, la combinación de Hidralazina y Ácido Valproico y la combinación de Hidralazina, Ácido Valproico e Interferón γ , en las líneas celulares de CaCu mejora el reconocimiento por parte de los linfocitos T antígeno específicos estimulados con los péptidos derivados de las oncoproteínas de VPH haciéndolas más susceptibles para ser lisadas.

No se observó un mejoramiento en la expresión de las moléculas del procesamiento antigénico: TAP's y LMP's; así como en la expresión de los genes de E6 y E7 de VPH 18 y 16 en las líneas celulares de CaCu, al ser tratadas con Hidralazina, Ácido Valproico e Interferón γ .

El incremento de la expresión de las moléculas HLA A2 y el mejoramiento en el reconocimiento inmune por parte de los linfocitos T en las líneas celulares de CaCu, fue independiente del tipo viral presente.

XI APÉNDICE

A. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE LAS BIOPSIAS DE PACIENTES CON CaCu:

El tejido se enjuagó con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) hasta eliminar residuos de sangre, se procedió a cortarlo en pequeñas partes y el tejido se pasó a tubos Eppendorff de 2ml, a los cuales se les agregó 400 μ L de buffer de lisis; posteriormente se adicionó 5 μ L de proteinasa K (16mg/ ml), los tubos se incubaron toda la noche de 37°C a 56°C hasta que se disolviera el tejido. Al término de la incubación se homogenizó completamente.

Se adicionó 40 μ L de Tris 1M pH 9.4 y se homogenizó; después se agregó 400 μ L de fenol saturado en agua y se agitó vigorosamente con la mano. Los tubos con la muestra se centrifugaron 10 minutos a 8000 rpm. La fase superior (acuosa) se transfirió a un tubo nuevo.

La muestra recuperada se mezcló con un volumen igual de cloroformo-alcohol isoamílico (25:1); se agitó vigorosamente con la mano y se centrifugó 10 minutos a 8000 rpm. Se recuperó la fase superior y se transfirió a un nuevo tubo. A la muestra recuperada se le agregó medio volumen de acetato de amonio 7.5 M y se homogenizó. Posteriormente se le agregó 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío y se mezcló por inversión. En este paso debe ser evidente la precipitación de DNA en forma de finos hilillos. Se procedió a centrifugar 10 min. a 5000 rpm a 4°C. Finalmente se descartó el sobrenadante.

El botón formado se lavó con etanol al 75% frío; se centrifugó por 10 min. a 5000 rpm a 4°C descartando el sobrenadante.

Finalmente se procedió a realizar una rápida centrifugación para concentrar los residuos de etanol con la finalidad de retirar la mayor cantidad posible de este reactivo. Se dejó secar el botón de DNA durante 10 min.; con el tubo destapado. Transcurrido el tiempo se disolvió con agua ultra pura libre de DNAsas y RNAsas en cantidad dependiente al botón obtenido

(aprox. De 50µL a 200 µL). Se incubó por lo menos 30 min. a 56°C, para descartar productos insolubles; se centrifugó por 10 min. a 14000 rpm a 4°C y finalmente se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo. Se cuantificó por espectrofotometría (Eppendorf AG 22331 Hamburg).

B. TIPIFICACIÓN DE VPH EN LAS BIOPSIAS DE PACIENTES CON CaCu:

Para determinar el tipo de VPH infectante en los ADN's de las pacientes, se utilizaron los oligonucleótidos consenso descritos por Manos (Manos, *et al.* 1989), ya que los oligonucleótidos MY09 y MY11 cuya secuencia es: 5'-3'cgccmarrggawactgac y 5'3'gcmcagggwcataayaatgg respectivamente; reconocen una región conservada en la región de apertura de lectura de L1 de todos los VPH's, y permiten amplificar un segmento de 450pb. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 40µl, conteniendo: 2.0 µg ADN genómico de cada una de las muestras de paciente, amortiguador de PCR 10X, 30mM de MgCl₂, 2mM de dNTPs, 10 µM de cada oligonucleótido y 1U de Taq DNA polimerasa (Gibco BRL, USA). El control positivo para VPH-16 fue ADN obtenido de la línea celular CaSki en el caso de la tipificación para VPH 16 y ADN de HeLa para VPH-18. Las condiciones de amplificación en el termociclador (Mastercycler Eppendorf, Hamburg) fueron las siguientes: desnaturalización a 95 °C por 30 seg., la alineación de los oligonucleótidos se hizo a 45° C por 60 seg. y la extensión a 72 °C por 90 seg., para un total de 30 ciclos. El último ciclo fue a 72° por 10 min. 8 µl del producto de amplificación se corrieron en gel de agarosa con bromuro de etidio al 3% y fue observado a través de una cámara con luz ultravioleta. Los productos positivos de amplificación de L1 (que muestren una banda de 450 pb) fueron digeridos con la enzima de restricción Rsa I (Gibco BRL, USA) durante 1 hora a 37° C. Finalmente, las muestras digeridas fueron separadas en un gel de agarosa con bromuro de etidio al 3%.

C. TIPIFICACIÓN DEL HAPLOTIPO HLA CLASE I:

Se tomó 1 mL de sangre a tipificar y se colocó en un tubo de poliestireno de 15 mL. (Corning USA), se agregaron 50 µL de perlas magnéticas (immunopets), incubando por 3 minutos y agitando por inversión. Posteriormente se agregó 1 mL. de solución desarrolladora y se mezcló, El tubo se colocó en la ranura del magneto (sin tapar el tubo) por 3 minutos. Posteriormente se retira el líquido que contiene los eritrocitos y suero, del lado contrario del magneto en el cual quedaron adheridos los linfocitos, con la pipeta de transferencia. Se realizaron dos veces con PBS y se colocó una vez más en el magneto por un minuto, después se realizaron dos lavados más con PBS y se retiró el líquido. Las células adheridas se resuspendieron en 0.3 mL de RPMI 1640 (Gibco BRL USA). Con la micropipeta Hamilton multicanal, se colocaron dos disparos de las células resuspendidas en RPMI 1640 en cada pozo de una placa Terasaki (previamente descongelada al inicio del ensayo). La placa Terasaki se incubó 1 hora a temperatura ambiente y en la oscuridad. Posteriormente se preparó la micropipeta Hamilton, enjuagándola con agua destilada. Se agregó *Fluoroquen* a un reservorio de plástico (caja Petri) con una pipeta de transferencia llenando con ello la micropipeta Hamilton, se coloca un disparo en cada pozo de la placa Terasaki, y se incuba por 5 minutos para incorporar el *Fluoroquen* a las células. Después de la incubación se leyó la muestra en el microscopio de fluorescencia con el filtro azul. Se observaron células verdes a las cuales se les asigna el número 1 y células rojas a las cuales se les asigna el número 8 en proporción a su intensidad, se van leyendo los pozos de la placa Terasaki asignando un número del 1 al 8 según la cantidad de células verdes-rojas que haya en cada pozo. Anotar los números con los datos de la paciente en la hoja de tipificación diseñada para ello (Special Monoclonal Typing Tray, Class I (96) Lot # 2, WORKSHEET).

D. CONDICIONES DE LA REACCIÓN RT-PCR PARA CADA UNA DE LAS MOLÉCULAS ANALIZADAS:

TAP 1:

	T (°C)	tiempo (minutos)
1.	94°	02:30
2.	94°	01:00
3.	60°	01:00
4.	72°	01:30
5.	2 repeticiones	34 min
6.	72°	10:00
7.	25°	ENTER (listo)

TAP 2:

	T (°C)	tiempo (minutos)
1.	94°	02:30
2.	94°	01:00
3.	60°	01:00
4.	72°	01:30
5.	2 repeticiones	24 min
6.	72°	05:00 22°
7.	22°	ENTER (listo)

LMP 2:

	T (°C)	tiempo (minutos)
1.	94°	02:00
2.	94°	00:30
3.	60°	00:30
4.	72°	01:30
5.	2 repeticiones 24 min	
6.	72°	05:00
7.	22°	ENTER (listo)

LMP 7:

	T (°C)	tiempo (minutos)
1.	94°	02:00
2.	94°	00:30
3.	60°	00:30
4.	72°	01:30
5.	2 repeticiones 24 min	
6.	72°	05:00
7.	22°	ENTER (listo)

LMP 10:

	T (°C)	tiempo (minutos)
1.	94°	05:00
2.	94°	01:00
3.	60°	01:00
4.	72°	01:30
5.	2 repeticiones 26 min	
6.	72°	05:00
7.	22°	ENTER (listo)

RT (Retrotranscripción de RNA):

T° (°C) tiempo (minutos)

1. 42° 01:00:00
2. 95° 05:00
3. 25° ENTER (listo)

E. PREPARACIÓN DE LAS CÉLULAS T2 PARA REESTIMULAR A LOS LINFOCITOS:

Se cosecharon las células T2 de las cajas de cultivo de 60 mm (Corning USA). Se obtuvo el botón celular de T2 y se resuspendió en 2 mL de RPMI 1640 (Gibco BRL USA). Se agregó *Mitomicina* (que es un inhibidor de la mitosis celular) a una concentración de 25 µg/mL y se incubó por ½ hora con la *Mitomicina*. Posteriormente se realizaron 3 lavados con 5 a 6 mL. de PBS. El botón celular se dividió en 3 partes (1 para cada péptido) y cada uno se resuspendió en medio de cultivo ISCOVE'S (Gibco BRL USA) con el péptido de interés. Se incubó toda la noche y al día siguiente se lavó dos veces con ISCOVE'S y se le agregó suero humano inactivado al 10%, e IL-15 a una concentración de 2 ng/mL. De esta manera las células TS quedaron cargadas con los péptidos y se adicionaron a las botellas FALCON T25 (Corning USA) que contenían los linfocitos.

XII. BIBLIOGRAFIA

1. Abbas A K, Lichtman A H y Pilli S. 2007. **Celular and molecular immunology**. 6a. ed. Ed. Saunders Company. E. U. A. 577 pp.
2. Adam E, Berkova Z y Daxnerova Z. 2000. **Papillomavirus detection: demographic and behavioral characteristics influencing the identification of cervical disease**. Am J Obstet Gynecol. 182:257-264.
3. Alonso R P, Lazcano P E C y Hernández A M. 2000. **Cáncer cérvico uterino. Diagnostico Prevención y Control**. Ed. Médica Panamericana. México. 254 pp.
4. Arce C, Candelaria M, Segura P B, Pérez C E, Taja Ch L y Dueñas G A. 2006. **Hidralazine target: from blood vessels to the epigenoma**. J Transl M. 4:10-19.
5. Bandal V, Chuang L S H, Hwee-Hong T E, Badal S, Villa L L, Wheeler C M, Li B F L y Ulrich B H. 2003. **CpG Methylation of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancer cell lines and in clinical specimens: genomic hypomethylation correlates with carcinogenic progression**. J Virol. 77:6227-6234.
6. Bartolomew J S, Stacey S N, Coles B, Burt D J, Arrand J R y Stern P L. 1994. **Identification of a naturally processed HLA-A*0201-restricted viral peptide from cells expressing human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein**. Eur J Immunol. 24:3175-3179.
7. Beard C, Li E y Jaenisch R. 1995. **Lost of methylation activates Xits in somatic but not in embryonic cells**. Gen Dev. 9:2325-2334.
8. Blaheta R A y Cinatl J. 2002. **Anti-tumor mechanisms of valproate: a novel role for an old drug**. Medic Res Rev. 22:492-511.
9. Buckley C H y Fox H. 1992. **Pathology of clinical invasive carcinoma of the cervix**. En: **Coppleson M. et. al.** Gynec Oncol. Ed. Churchill Livingstone. Escocia. 349 pp.

10. Buollaga I y Thierry F. 1999. **Control of human papillomavirus type 18 transcription: role in carcinogenesis.** *Rec Res Dev Virol.* 1:369-383.
11. Burk R D, Ho G Y y Beardsley L. 1996. **Sexual behavior and parterns characteristics are the predominant risk factors for genital human papillomavirus infection in young women.** *J Infec Dis.* 174:679-689.
12. Burk R D, Kelly P y Feldman J. 1996. **Declining presence of cervicovaginal human papillomavirus infection with age is independent of other risk factors.** *Sex Transm Dis.* 23:333-341.
13. Burkhardt A, Willingham M, Gay C, Jean K T y Schlegel R. 1989. **The E5 oncoprotein of bovine papillomaviruses oriented asymmetrically in Golgi and plasma membranes.** *Virology.* 170: 334-339.
14. Cameron E E, Bachman K E, Myohanen S, Herman J G y Baylin S B. 1999. **Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer.** *Nat Genet.* 21:103-107.
15. Castle P E, Hillier S L y Rabe L K. 2001. **An association of cervical inflammation with high-grade cervical neoplasia in women infected with oncogenic human papillomavirus (HPV).** *Can Epidemiol Biomark Prev.* 10:1021-1027.
16. Cebulla C M, Miller D M y Sedmak D D. 2000. **Viral inhibition of major histocompatibility complex class I and class II: Targeting transcription factors.** *Mod. Asp. Immunobiol.* 3:84-87.
17. Chávez B A, Pérez P C, Pérez C E, Carrasco L C, Rangel L E, Segura P B, Taja Ch L, Trejo B C, González F A, Candelaria M, Cabrera G y Dueñas G A. 2006. **Antineoplastic effects of the DNA methylation inhibitor hidralazine and the histone deacetylase inhibitor valproate in cancer cell lines.** *Cancer Cell Int.* 6:2-14.
18. Chávez B A, Segura P B, Pérez C E, Taja Ch L, Cetina L. Candelaria M. Cantú D. Pérez P C, Cabrera G. Trejo B C, Ángeles E, González F A, García L P, Zambrano P y Dueñas G A. 2005. **Histone acetylation and histone deacetylase activity of**

- magnesium valproate in tumor and peripheral blood of patients with cervical cancer. A phase I study.** *Mol Cancer.* 4:22-35.
19. Chuang L S, Ian H I, Koh T W, Ng H H, Xu G y Li B F. 1997. **Human DNA (cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for P21WAF1.** *Science.* 277:1996-2000.
20. Conzuelo Q A E. 2002. **Nuevas alternativas en el tratamiento de papilomavirus.** Ed. Prado. México. 142 pp.
21. Day P M, Lowy D R y Schiller J T. 2003. **Papillomavirus infect cells via a clathrin-dependent pathway.** *Virology.* 307:1-10.
22. Deacon J M, Evans C D y Yule R. 2000. **Sexual Behavior and smoking as determinants of cervical HPV infection and of CIN 3 among those infected: a case control study nested within the Manchester cohort.** *Br J Cancer.* 83:1565-1572.
23. De Villers E M, Fauquet C y Broker T R. 2004. **Clasificación of papillomaviruses.** *Virology.* 324:17-27.
24. Doorbard J A, Parton K, Hartley L y Banks T. 1990. **Detection of novel splicing patterns in a HPV-16 containing Keratinocyte cell line.** *Virology.* 178:254-262.
25. Galloway D. A. 2003. **Papillomavirus vaccines in clinical trials.** *Lanc Infec Dis.* 3:469-475.
26. Germenis A E y Karanikas V. 2007. **Immunoepigenetics: the unseen side of cancer immunoediting.** *Immunol Cell Biol.* 85:55-59.
27. Giuliano A R. 2000. **The role of nutrients in the prevention of cervical dysplasia and cancer.** *Nutrition.* 16:570-573.
28. Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Krämer O H, Schimpf A, Giavara S, Sleeman J P, Lo Coco F, Nervi C, Pelicci P G y Hienzel T. 2001. **Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells.** *EMBO J.* 20:6969-6978.

-
29. Groettrup M, Standera A, Stohwasseer R y Kloetzel P M. 1997. **The subunits MECL-1 and LMP 2 are mutually required for incorporation into the 20S proteasome.** Proc Natl Acad Sci. USA. 94:8970-8975.
30. Grunstein M. 1997. **Histone acetylation in cromatin structure and transcription.** Nature. 389:349-352.
31. Hebner C M y Laimins L A. 2006. **Human papillomavirus: Basic mechanism of pathogenesis and oncogenicity.** Rev Med Virol. 16:83-97.
32. Heemels M T, Schmacher T N, Wonigeit K y Ploegh H L. 1993. **Peptide translocation by variants of the transporter associated with antigen processing.** Science. 262: 2059-2063.
33. Herman J G y Baylin S B. 2000. **Promoter region hypermethylated and silencing genes in human cancer.** Pag. 35-54. in: Jones P A y Vogt P K. (ed). **DNA methylation and cancer.** Ed. Springer. Germany.
34. Hildesheim A, Herrero R y Castle P E. 2001. **HPV-cofactors related to the development of cervical cancer: results from a population based studying Costa Rica.** Br J Cancer. 84:1219-1226.
35. Imanishi T, Akaza T, Kinura A, Tokunaga K y Gojobori T. 1991. **Allele and haplotype frequencies for HLA and complement loci in various ethnic groups.** En: Tsuji K, Aizawa M y Sasazuki T, editores. **HLA Proc. Eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference.** Japan. Ed. Oxford University Press. 1992:2065-2072.
36. INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. Disponible en:
<http://www.inegi.org.mx/inegi/contenido/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2009/cancer0.doc> [Consultado el: 3 de agosto de 2009].
37. Jaboin J, Wild J, Hamidi H, Khanna C, Kim C J, Robey R, Bates S E y Thiele C J. 2002. **MS-27-275 an inhibitor of histone deacetylase has marked in vitro and in vivo.** Cancer Res. 62:6108-6115.

-
38. Jakóvisiak M, Witold L y Jakub G. 2003. **Natural mechanisms protecting against cancer.** Immunol Lett. 90:103-122.
39. Janeway Ch A, Travers P, Walport M y Shlomchik M J. 2005. **Immunobiology. The immune system in health and disease.** 5a. ed. Ed. Churchill Livingstone–Garland Publishing. 732 pp.
40. Jenuwein T y Allis C D. 2001. **Translating the histone code.** Science. 293:1074-1080.
41. Johnsen A, France J, Man-Sun S y Harding V C. 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.
42. Juárez Q S. 2007. **Efecto de la Hidralazina y Ácido Valproico sobre la proliferación y expresión de moléculas HLA-I en líneas celulares derivadas de cáncer cérvico-uterino.** Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México. 65 pp.
43. Kast W M, Remco M, Brandt R M, Sidney J, Drijfhout J W y Melief C J. 1993. **Human leukocyte antigen-A2.1 restricted candidate cytotoxic T lymphocyte epitopes of human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins identified by using the processing-defective human cell line T2.** J Immunother. 14:115-120.
44. Kim M S, Blake M, Baek J H, Kohlhagen G, Pommier Y y Carrier F. 2003. **Inhibition of histone deacetylase increases cytotoxicity to anticancer drugs targeting DNA.** Cancer Res. 63: 7291-7300.
45. Koopman J O, Hammerling G J y Momburg F. 1997. **Generation intracellular transport and loading of peptides associated with MHC class I molecules.** Curr Opin Immunol. 9:80-88.
46. Lawor D A, Zemmour J, Ennis P D y Parhamet P. 1990. **Evolution of class-I MHC genes and proteins: from natural selection to thymic selection.** Ann Rev Immunol. 8:23-63.
47. Lechner R y Warrens A. 2000. **HLA in health and disease.** 2a. ed. Ed: Academy Press. Gran Bretaña. 472 pp.

-
48. Lehner P J y Cresswell P. 1996. **Processing and delivery of peptides presented by MHC class I molecules.** *Curr Opin Immunol.* 8:59-67.
49. Lie E, Beard C y Jaenisch R. 1993. **Role for DNA methylation in genomic imprinting.** *Nature.* 366:362-365.
50. Lie E, Bestor T H y Jaenisch R. 1992. **Targued mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality.** *Cell.* 69: 915-926.
51. Lizuka M y Smith M M. 2003. **Functional consequences of histone modification.** *Curr Opin Genet Dev.* 13:154-160.
52. López S A y Lizano S M. 2006. **Cáncer cérvico uterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina.** *Rev. Cancerol.* 1:31-55.
53. Magner W J, Kasim A L, Keiser N, Santaniello F, Stewart C, Romano M A, Catalano G, Grande C y Tomasi T B. 2000. **Activation of MHC Class I, II and CD40 gene expression by histone deacetylase inhibitors.** *J Immunol.* 165:7017-7024.
54. Magnuson P K E, Lichtenstein P y Gillenstein U B. 2000. **Heritability of cervical tumors.** *Int J Cancer.* 88:698-701.
55. Maio M, Coral S, Fratta E, Altomonte M y Sigalotti L. 2003. **Epigenetic targets for immune intervention in human malignancies.** *Oncogene.* 22: 6484-6488.
56. Margni R A. 1996. **Inmunología e Inmunoquímica.** 5^a ed. Ed Médica Panamericana. Argentina. 701 pp.
57. Marsh S G E, Parham P y Barber L D. 2000. **The HLA Facts Book.** Academy Press. Gran Bretaña. 398 pp.
58. Momburg F, Roelse J, Hammerling G J y Neefjes J J. 1994. **Peptide size selection by the histocompatibility complex-encoded peptide transporter.** *J Exp Med.* 179:1613-1623.
59. Momparler R L y Bovenzi V. 2000. **DNA methylation and cancer.** *J Cell Physiol.* 183:145-154.
60. Mora G M L, Dueñas G A, Hernández M J, De la Cruz H E, Pérez C E, Weiss S B, Santiago O E, Ortíz N V F, Rosales V H, Cantú D, Lizano S M, Rojo A M P y

- Monroy G A. 2006. **Up-regulation of class-1 antigen expression and antigen-specific CTL response in cervical cancer cells by the demethylating agent Hidralazine and the histone deacetylase inhibitor Valproic Acid.** J Transl Med. 4:55-69.
61. Muñoz N, Bosch F X y De Sanjosé S. 2003. **Epidemiologic classification of human papillomavirus associated with cervical cancer.** N Engl J Med. 6:518-527.
62. Muñoz N, Bosch F X, De Sanjosé S, Shah K V. 1994. **The role of HPV in the etiology of cervical cancer.** Mutant Res. 305: 293-301.
63. Munoz N, Franceschi S, Rosetti C. 2002. **Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study.** Lancet. 359: 1085-1092.
64. Myung D S, Kim H-S, Rha S-H y Sidransky D. 2001. **Promoter hypermethylation of multiple genes in carcinoma of the uterine cervix.** Clin Cancer Res. 7:1982-1986.
65. Nan X, Ng H H, Johnson C A, Laherty C D, Turner B M, Eisenman R N y Bird A. 1998. **Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex.** Nature. 393:386-389.
66. Neefjes J J, Momburg F, Hämmerling G J. 1993. **Selective and ATP dependent translocation of peptides by MHC-encoded transporter.** Science. 261:769-771.
67. Negrini B P, Schiffman M H y Kurgan R J. 1990. **Oral contraceptive use, human papillomavirus infection, and risk of early cytological abnormalities of the cervix.** Cancer Res. 15:4670-4675.
68. Neissa J I y Guerrero C. 2004. **Del código genético al código epigenético: Nuevas estrategias terapéuticas.** Rev Fac Med Univ Nac Colomb. 52:287-303.
69. OMS. Organización Mundial de la Salud. 2009. Cáncer. Nota descriptiva N° 297, Julio de 2008. Disponible en:
<http://www.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>. [Consultado el: 3 de agosto de 2009].

-
70. Ortomann B, Androlewicz M J y Cresswell P. 1994. **MHC class I/ β 2-microglobulin complex associate with TAP transporters before peptide binding.** Nature. 368: 864-867.
71. Primeau M, Jacynthe G y Richard L M. 2002. **Synergistic antineoplastic action of DNA methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxytidine and histone deacetylase inhibitor depsipeptide on human breast carcinoma cells.** Int J Cancer. 103:177-184.
72. Regueiro G J R, López L C, González R S y Martínez N E. 2003. **Inmunología. Biología y patología del sistema inmune.** 3^a. ed. Ed. Médica Panamericana. España. 256 pp.
73. Rensing M E, Sette A, Brandt R M, Ruppert J, Wentworth P A, Hartman M, Oseroff C, Grey H M, Melief C J y Kast W M. 1995. **Human CTL epitopes encoded by human papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through in vivo and in vitro immunogenicity studies of HLA-A*0201 binding peptides.** J Immunol. 154:5934-5943.
74. Rensing M E, Van Driel W, Celis E, Sette A, Brandt M P, Hartman M, Anholts J D, Schreuder G M, Harmsel W B, Fleuren G J, Trembos B J, Kast W M y Melief C V M. 1996. **Occasional memory cytotoxic T-cell responses of patients with human papillomavirus type 16 positive cervical lesions against a human leukocyte antigen-A*0201-restricted E7-encoded epitope.** Cancer Res. 56:582-588.
75. Ritz U, Momburg F, Pilch h, Huber C, Maurer M J y Seliger B. 2001. **Deficient expression of components of the MHC class I antigen processing machinery in human cervical carcinoma.** Int J Oncol. 19: 1211-1220.
76. Robertson K. D. 2001. **DNA methylation, methyltransferases and cancer.** Oncogene. 20: 3139-3155.
77. Roitt I M y Delves P J. 2003. **Inmunología. Fundamentos.** 10a. ed. Ed. Panamericana. Argentina. 559 pp.

-
78. Rountree M R, Bachman K E y Baylin S B. 2000. **DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication fosi.** Nat Genet. 25:269-277.
79. Schiffman M y Castle P E. 2003. **Human papillomavirus. Epidemiology and public health.** Arch Pathol Lab Med. 127: 930-934.
80. Schoell, W M J, Mirhashemi R, Liu B, Janicek M F, Podack E R, Penalver M A y Averette H E. 1999. **Generation of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes by stimulation with HPV type 16 E7 peptide-pulsed dendritic cells: an approach to immunotherapy of cervical cancer.** Gynec Oncol. 74:448-455.
81. Schwartz S. 2000. **Regulation of human papillomavirus late gene expression.** Ups J Med Sci. 105: 171-192.
82. Segura P B, Pérez C E, Taja Ch L, Chávez B A, Revilla V A, Benítez B L y Dueñas G A. 2006. **Global DNA hypermethylation-associated cancer chemotherapy resistanse and its reversion with the demethylating agent hydralazine.** J Transl Med. 4:32-45.
83. Segura P B, Trejo B C, Pérez C E, Taja Ch L, Mariscal I, Chávez B A, Acuña C, Salazar A M, Lizano M y Dueñas G A. 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.
84. Seliger B, Cabrera T, Garrido F y Ferrone S. 2002. **HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells.** Seminars in cancer biology. 12:3-13.
85. Seliger B, Dunn T, Schwenzer A, Casper J, Huber C y Schmoll H J. 1997. **Analysis of the MHC class I antigen presentation machinery in human embryonal carcinomas: evidence for deficiencies in TAP, LMP y MHC class I expression and their up regulation by interferon- γ .** Scand J Immunol. 46:625-632.
86. Shu, W K. 1994. **Interaction of MHC class I molecules with the transporter associated with antigen processing.** Science. 264: 1322-1326.

-
87. Singal D, Ye M y Bienzle D. 1998. **Transfection of TAP 1 gene restores HLA class I expression in human small-cell lung carcinoma.** Int J Cáncer. 75:112-116.
88. Singer M y Berg P. 1999. **Genes y Genomas.** Ed Omega. España. 974 pp.
89. Smith J S y Muñoz N. 2002. **Evidence of *Chlamydia trachomatis* as an human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer in Brazil and Philippines.** J Infect Dis. 185:324-331.
90. Stevens A y Lowe J. 2006. **Histología humana.** 3a. ed. Ed Elsevier. España. 464 pp.
91. Struhl K. 1998. **Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms.** Genes Dev. 12:599-606.
92. Takai N, Desmond J C, Kumagai T, Gui D, Said J W, Whittaker S, Miyakawa I y Koeffler H P. 2004. **Histone deacetylase inhibitors have a profound antigrowth activity in endometrial cancer cells.** Clinical Cancer Research. 10: 1141-1149.
93. Valdespino V, Gorodezky C, Ortiz V, Kauffman A M, Basaure E R, Vázquez A y Berumen J. 2005. **HPV 16-specific cytotoxic T lymphocyte responses are detected in all HPV16-positive cervical cancer patients.** Gynec Oncol. 96:92-102.
94. Van Endert, M. 1999. **Genes regulating MHC class I processing of antigen.** Curr Opin Immunol. 11:82-88.
95. Villar G A y Esteller M. 2004. **Histone deacetylase inhibitors: Understanding a new wave of anticancer agents.** Int J Cancer. 112:171-178.
96. Virmani A K, Muller C, Rathi A, Zochbauer M S, Mathis M y Gazdar A F. 2001. **Aberrant methylation during cervical carcinogenesis.** Clin Cancer Res. 7:584-589.
97. Wajed, S A, Peter W L y Tom R D. 2001. **DNA methylation: an alternative pathway to cancer.** Ann Surg. 234:10-20.
98. Walboomers J M M, Jacobs M V y Manos M M. 1999. **Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide.** Pathol J. 189: 12-19.

99. Yang Y. 2000. **Major histocompatibility complex class I antigen processing and presentation.** *Mod Asp Immunobiol.* 1:70-72.
100. Zambrano P, Segura P B, Pérez C E, Cetina L, Revilla V A, Taja Ch L, Chávez B A, Ángeles E, Cabrera G, Sandoval K, Trejo B C, Chanona V J y Dueñas G A. 2005. **A phase I study of hydralazine to demethylate and reactivate the expression of tumor suppressor genes.** *BMC Cancer.* 5:1-12.
101. Zhu W-G. 2001. **DNA methyltransferase inhibition enhances apoptosis induced by histone deacetylase inhibitors.** *Cancer Res.* 61:1327-1333.
102. Zhu W-G, Srinivasan K, Dai Z, Duan W, Druhan L J, Ding H, Yee L, Villalona C M A, Plass C y Otterson G A. 2003. **Methylation of adjacent CpG sites affects Sp1/Sp3 binding activity in the p21 (Cip 1) promoter.** *Mol Cel Biol.* 23:4056-4065.
103. Zinkernagel R M y Doherty P C. 1979. **MHC-restricted cytotoxic T cell: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T cell restriction, specificity, function and responsiveness.** *Adv Immunol.* 27: 51-177.
104. Zur Hausen H. 2000. **Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis.** *J Nat Cancer Inst.* 92:690-698.
105. Zur Hausen H. 1999. **Papillomaviruses in human cancers.** *Proc Asoc Am Physicians.* 111: 1-7.