



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**EFEECTO DE LA HIDRALAZINA Y EL ÁCIDO
VALPROICO SOBRE LA PROLIFERACIÓN
Y EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS HLA-I EN LÍNEAS
CELULARES DERIVADAS DE CÁNCER
CERVICO-UTERINO.**

**T E S I S
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G O
P R E S E N T A
SAÚL JUÁREZ QUEZADA**

DIRECTOR: M. en C. JORGE HERNÁNDEZ MONTES

MÉXICO, D.F. JUNIO DE 2007





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 desarrolló en el laboratorio de Inmunobiología (L-326), Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, FES-Zaragoza, UNAM, Bajo la Dirección del M. en C. Jorge Hernández Montes con el apoyo económico del Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social Salud 2002-COI-6579/A-I y del FOFOI **Fondo para el fomento a la Investigación 2006/1A)I/004**

DEDICATORIA

A mi apreciable Familia, la cual sin su apoyo no hubiera sido posible la realización de mi formación, y que gracias a ella, ahora estoy consiguiendo uno de los objetivos contemplados a lo largo de mi vida.

A mi amada madre María Guadalupe Quezada Cortés

A mi amado padre José de Jesús Juárez Becerril

A mi amada hermana Guadalupe Juárez Quezada

Y a mi preciosa sobrina Sofía Montserrat López Juárez

Por darme la fuerza y esperanza para seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

Al M. en C. Jorge Hernández Montes por la excelente dirección de este trabajo, por todos los conocimientos transmitidos a lo largo de su realización, así como la confianza, el apoyo y sobre todo por su valiosa amistad.

A la Dra, María de Lourdes Mora García por su apoyo, comprensión y excelente ayuda, por los conocimientos transmitidos en la realización de este trabajo, pero sobre todo también por su apreciable amistad.

Al Dr. Alberto Monroy García por la excelente dirección de este trabajo, por todos los conocimientos transmitidos, por todo el apoyo confianza, pero sobre todo por su agradable amistad, así como por las facilidades brindadas durante mi permanencia en el laboratorio.

A los miembros del jurado:

M. en C. Raúl Zavala Chavero

Biól. Carlos Martínez Montoya

Dr. Alberto Monroy García

Dra. María de Lourdes Mora García

M. en C. Jorge Hernández Montes,

Por las observaciones y sugerencias recibidas para incrementar el enriquecimiento de este trabajo.

También como a todos los compañeros del laboratorio, amigos y conocidos, gracias por su amistad, y amabilidad.

Por su apoyo, colaboración y comprensión.

MUCHAS GRACIAS

ÍNDICE

Dedicatoria	II
Agradecimientos	III
Índice	IV
Abreviaturas	1
Resumen	2
Marco Teórico	4
<i>Cáncer Cervical</i>	4
<i>Causas asociadas al desarrollo de cáncer cervical.</i>	5
<i>Virus del Papiloma Humano (VPH)</i>	6
<i>Estructura del Virus del Papiloma Humano (VPH)</i>	9
<i>Funciones de las proteínas virales</i>	10
<i>Ciclo replicativo del VPH</i>	11
<i>Complejo principal de Histocompatibilidad</i>	13
<i>Estructura de las moléculas del MHC-I</i>	15
<i>Procesamiento y presentación del antígeno</i>	16
<i>Factores epigenéticos del cáncer</i>	20
<i>Agentes desmetilantes y agentes inhibidores de la desacetilació.</i>	24
Planteamiento del problema	28
Justificación	29
Hipótesis	31

Objetivos	32
Materiales y Métodos	33
Resultados	37
Discusión de Resultados	45
Conclusiones	49
Perspectivas	50
Literatura citada	51

ABREVIATURAS

B ₂ -m	Beta 2 microglobulina
μCi	Microcurie
μg	Microgramo
μL	Microlitro
μM	Micromolar
Å	Amstrong
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosin trifosfato
BAK	Proteína pro-apoptotica
cbp	Cuanto baste para
CpG	Islas citosina precedidas de guanina
cpm	Cuentas por minuto
E	Proteina de expresión temprana (Early)
FIGO	Federación Iternacional de Gineco Obstetricia
GST	Genes supresores del tumor
HAC	Acetiladas de histonas
HDAC	Desacetiladas de histonas
IFN γ	Interferon γ
kD	Kilo dalton
L	Proteínas de expresión tardía (Late)
LMP	Subunidad catalítica del proteasoma
M	Molar
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
mL	Mililitro
mM	Milimolar
nm	Nanometro
RE	Receptor de Estrogeno
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcriptasa reversa
PA28	Subunidad del proteasoma
pb	Pares de bases
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
RPMI	Medio de cultivo
pRB	Proteína retinoblastoma
seg	Segundo
TAP	Transportador asociado al procesamiento de antígenos
TNF	Factor de necrosis tumoral
U/mL	Unidades por mililitro
VPH	Virus del papiloma humano

RESUMEN

El cáncer cérvico uterino es la segunda causa de muerte de mujeres en el Mundo, y la primera en México. El principal factor que conduce a esta patología es la infección con el virus del papiloma humano (VPH), cuyas proteínas oncogénicas interactúan con las proteínas antitumorales de la célula hospedera, perdiéndose el control del ciclo celular, lo que induce una serie de cambios en el ADN, incluyendo alteraciones epigenéticas. Entre los factores epigenéticos alterados se encuentran la metilación del ADN y la desacetilación de las histonas.

Por otra parte, se postula que el estado transformado de una célula es monitoreado por medio de los linfocitos T, que reconocen antígenos asociados a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), señalando a una célula transformada para ser destruida. Sin embargo, en el proceso del cáncer ocurre un escape tumoral a la respuesta inmune, que puede incluir una baja o una pérdida de la expresión de las moléculas del MHC, lo cual probablemente esté siendo alterado por factores epigenéticos.

Recientemente se ha encontrado que el fármaco hidralazina (H) que se utiliza principalmente como anti-hipertensivo, actúa también inhibiendo la actividad metiltransferasa, y el ácido valproico (A.V) que se utiliza principalmente en el tratamiento de la epilepsia tiene la capacidad de inhibir la desacetilación de las histonas, por lo que tienen la capacidad de incrementar la expresión genética y por tanto, de regular la diferenciación y el ciclo celular.

En este trabajo fue probado el efecto que tienen H (10 μ M) y A.V (1 mM) en la proliferación y expresión de moléculas del MHC de tres líneas celulares derivadas de cáncer cervico uterino: MS751 (HPV-18+), CaSki (HPV-16+) y C33A (HPV-).

Al determinar el índice de proliferación, se encontró que el mayor grado de inhibición correspondió a la combinación de la hidralazina y el ácido valproico. Por otra parte, al determinar la expresión de moléculas MHC clase I en la membrana de estas líneas celulares, se encontró que la expresión total de estas moléculas aumentó con la combinación de ambos fármacos.

Asimismo, al determinar la expresión de los transcritos de los locus HLA-A, B y C del MHC-I, por medio de RT-PCT, se encontró que el ácido valproico tiene la capacidad de aumentar la expresión de los genes de estos locus en las líneas celulares C33A y MS751; mientras que en la línea celular CaSki observamos un aumento de la expresión genética en los locus HLA-A y HLA-B con la combinación de la hidralazina y el ácido valproico.

Por lo que se concluye que la hidralazina así como el ácido valproico tienen la capacidad de inhibir la proliferación de las líneas celulares utilizadas en este estudio, así como la capacidad de incrementar la expresión de genes del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I, con lo cual se podría mejorar la presentación de péptidos antigénicos, para ayudar a un mayor reconocimiento por los linfocitos T citotóxicos y llevar a cabo una mayor y más eficiente respuesta inmunológica antitumoral. En este contexto estos fármacos deben de ser probados en un tratamiento clínico en pacientes con esta enfermedad, para poder comprobar o contrastar los resultados obtenidos *in vitro* y evaluar su potencial adyuvante en la terapia antitumoral.

MARCO TEÓRICO

CÁNCER CERVICAL

El Cáncer cervical uterino es una de las principales causas de muerte en las mujeres en el Mundo (Galloway DA, 2003). Es el tumor maligno más común en el tracto genital femenino; su incidencia se ha incrementado en recientes años en un 13 % (Covens A, 2003), y existen aproximadamente 500,000 casos anuales, con cerca de una tercera parte fatales en todo el mundo. Sin embargo, gracias a la citología y a la histopatología se le puede detectar tempranamente y tratar oportunamente, reduciendo el impacto de esta enfermedad (International Agency for Research on Cancer, 1995).

El Cáncer cervicouterino es uno de los problemas más grandes de salud pública en América Latina, causando anualmente la muerte de alrededor de 30,000 mujeres. En México es el cáncer más común en las mujeres (Parkin DM, 1990). El impacto del cáncer cervicouterino es devastador ya que según el informe anual de la Federación Internacional de Gineco-Obstetricia (FIGO) se ha mantenido como la segunda neoplasia más importante entre la población mexicana y como la primera causa en la población femenina. La edad promedio al momento del diagnóstico es de 45 años, pero la enfermedad puede ocurrir inclusive en la segunda década de la vida y ocasionalmente durante el embarazo (Castellanos MR, 2003). En comparación, en los Estados Unidos de Norteamérica el pico de incidencia de carcinoma *in situ* en células escamosas de cérvix es de 25 a 29 años (Devesa S, 1989) y la edad media para cáncer cervical invasivo es de 49 años (Beral V, 1994).

CAUSAS ASOCIADAS AL DESARROLLO DE CÁNCER CERVICAL.

El principal factor de riesgo para el cáncer cervical es la exposición a ciertas variedades del virus de papiloma humano (VPH), aunque otros factores de riesgo son:

- No practicarse la prueba de detección de cáncer cervical periódicamente (Papanicolaou)
- El comenzar las relaciones sexuales a una temprana edad.
- Tener múltiples parejas sexuales o tener contacto sexual con alguien que ha tenido múltiples parejas sexuales
- El tener embarazos múltiples.
- Contraer el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), que debilita el sistema inmunológico de la mujer haciéndola más vulnerable a la infección por el VPH.
- El tener una historia familiar de cáncer cervical.
- El tener una edad con riesgo (en las mujeres de entre 30-60 años) y a mayor medida que aumente la edad.
- El tabaquismo aumenta el riesgo.
- El estado socioeconómico (las tasas de mortalidad e incidencia son más elevadas entre mujeres pobres ya que no tienen acceso a los servicios de diagnóstico y tratamiento. (Muñoz N, 1997).

VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH).

Los virus de papiloma VPs pertenecen a la familia de los Papovavirus (Papovaviridae), la cual incluye papilomavirus, y virus vacuolados de primates y humanos, tales como 40 virus de simio (VS), virus JC y BK (Cole CN 1996). Los virus de papiloma son llamados de acuerdo a su hospedero específico tal como humanos (VPH), bovino (VPB), etc., y son numerados por su genotipo viral. Las células blanco de la infección de los virus de papiloma son mucosas cutáneas o queratinocitos basales, donde el ADN viral se establece como un plásmido nuclear, múltiplo. La producción de viriones progenie es restringida a capas diferenciadas terminadas del epitelio (Laimins LA, 1998).

Su infección se ha vinculado a diferentes alteraciones moleculares que inducen la carcinogénesis cervical como: alteraciones en el receptor del factor del crecimiento epidérmico (EGFR), la sobreexpresión del HER-2-neu, la mutación del H-ras y K-ras y la amplificación/sobreexpresión del c-myc. El VPH es capaz de transformar las células que infectan mediante la acción directa de los productos de dos de sus genes tempranos E6 y E7 (Aguirre R, 2001).

El **99.7 %** de los tejidos de cáncer cervical contienen ADN de VPH. (Walbomers JMM., 1999). Se estima que entre 20 y 30 millones de mujeres americanas albergan ADN de VPH, aunque solamente un pequeño grupo desarrolla cáncer cervical (Bosch FX, 1995).

A la fecha se han identificado 92 tipos de VPH, los cuales inducen principio de papilomas epidérmicos y mucosos; el desarrollo del cáncer está altamente asociado con la infección genital por tipos específicos tales como VPH tipo 16 (VPH-16), VPH-18, VPH-31, VPH-33, VPH-35, VPH-39, VPH-45, VPH-52, VPH-58, y VPH-59. (Muñoz N, 2000). Más del 50 % de tejidos cervicales contienen ADN del VPH-16 (Bosch FX, 1995)

Un estudio llevado a cabo en México reportó ADN del VPH en 87 % de las muestras de mujeres con cáncer invasor; la mayoría de los genomas encontrados fueron de los VPH-16, y VPH-18 seguido por el -39, -59 y -58. (Torroella M, 1998)

Varios estudios han demostrado una menor prevalencia de ADN del VPH en mujeres con cérvix normal que en mujeres con cáncer cervical. En México se encontró VPH en 14.5 % de mujeres con citología cervical normal (Lazcano-Ponce EC, 2001). Aunque la infección con VPH es la más frecuente enfermedad de transmisión sexual, está usualmente autolimitada y es revertida espontáneamente, con solamente un pequeño grupo de mujeres desarrollando cáncer cervical. La evolución de infección a lesión intraepitelial escamosa y cáncer es dependiente de varios factores, muchos de los cuales son desconocidos (Shah KV, 1996).

El virus del papiloma humano ha evolucionado junto con los humanos durante los últimos 200,000 años, y por ello se asocian con nuestra especie múltiples tipos de VPH e incluso de variantes de estos tipos. Las variantes se encuentran en regiones geográficas específicas y en asociaciones étnicas (Myers G 1996).

Las variantes de papiloma virus mucoso-genital, en particular las variantes del VPH-16, muestran una fuerte evidencia de agrupamientos geográficos, la cual ha sido tomada como una evidencia de una evolución o coevolución de las variantes con los humanos (Yamada T, 1997)

La distribución de las variantes de VPH-16 son encontradas en agrupaciones geográficas dentro de los 5 continentes.

Variantes del virus del papiloma humano	Clasificación
Variante Europea	E
Variante Asiática	As
Variante Africana	Af
Variante Asiático-Americana	AA
Variante Norte Americana	NA

TABLA 1. (Tomado de Yamada T, Manos M, Peto M, Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspectives, J. Virol, 71: 2463-2472).

Aunque la distribución geográfica de los diferentes tipos de variantes puede estar influenciada por varios factores incluyendo: coevolución, migración y mezcla de razas, las asociaciones geográficas no son absolutas (Myers G 1996).

Casi un cuarto de todos los carcinomas cervicales en México son atribuidos a la variante Asiático Americana (AA subclase AA-a y AA-c) del papiloma virus humano tipo 16 (HPV-16) (Berumen J, 2001).

El Virus del papiloma humano es un virus simple de ADN que infecta el epitelio escamoso y mucoso (Lowy DR, 2001, Koutsky LA, 1999). Dado que el VPH no codifica las proteínas especiales para su propia replicación ha desarrollado estrategias para asegurar que las células suprabasales continúen su ciclo para proveer un medioambiente permisible para su replicación viral. En el caso de VPHs genitales de bajo riesgo, como el VPH-6 o VPH-11, el incremento en la proliferación celular resulta en principios de verrugas. En contraste, los VPHs de alto riesgo, como el VPH-16 o VPH-18, más extensamente desregulan los puntos que normalmente monitorean la fidelidad de la replicación y la segregación de cromosomas, escenificando el estado de cambios que pueden conducir al cáncer (Galloway DA, 2003).

Las infecciones genitales por virus de papiloma humano (VPH) son las más comunes enfermedades de transmisión sexual mundialmente, y han sido encontradas como el centro etiológico de factores de riesgo para el cáncer cervical (Walboomers JM, 1999).

ESTRUCTURA DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH)

El virus de papiloma humano (VPH) es un virus de doble hélice de ADN no envuelto, isométrico, de una medida aproximada de entre 50 y 60 nm de diámetro. (Es el agente causante de la primera de las enfermedades de transmisión sexual más comunes). En el genoma del VPH, el ADN, de aproximadamente 8000 pares de bases es mantenido en una forma circular cerrada envuelta, y un total de ocho marcos de lectura abiertos, que codifican dos grupos principales de proteínas, llamadas temprana (E) y tardías (L). Los genes E codifican para las proteínas tempranas E1, E2, E4, E5, E6 y E7, las cuales tienen varias funciones en la replicación viral, transcripción, replicación, facilitación del escape viral, y algunas de ellas son clasificadas como oncoproteínas. (Dell G., 2001)

Los genes L codifican para las proteínas L1 y L2, las cuales constituyen la cápside viral en relación 30:1 (Schwartz S., 2000). Cada cápside consiste de un arreglo ordenado de 72 capsómeros de L1. Las proteínas L2 son co-ensambladas con las proteínas L1, pero la localización exacta es desconocida. (Hagensee M.,1993)

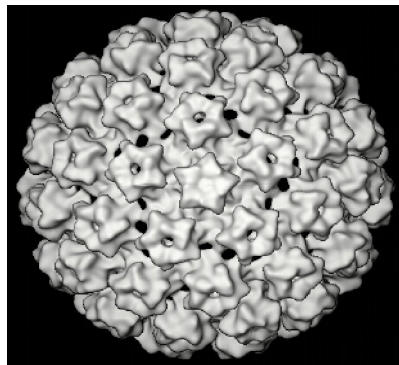


Figura 1. Estructura icosaédrica de la cápside del VPH. (Tomado de Doug Lowy (NCI USA) (Castellsagué X, (2005), El papel del hombre en la transmisión del VPH y en la carcinogénesis cervical: implicaciones para la prevención, Institut Catalá d'Oncologia, Barcelona Spain).

FUNCIONES DE LAS PROTEÍNAS VIRALES.

PROTEÍNA	FUNCIÓN
E1	Codifica a una helicasa para la replicación episomal del virus.
E2	Regula la expresión temprana de los genes y facilita la replicación del virus.
E4	Altera el citoesqueleto para facilitar la liberación del virus.
E5	Altera el ph endosomal y el reciclamiento de los receptores de EGF a la superficie celular.
E6	Inactiva la función de p53 e inhibe la apoptosis.
E7	Se une al p105RB y reactiva la síntesis del ADN del huésped.
L1	Constituye el 80 % de la cápside viral.
L2	Constituye el 20 % de la cápside viral.

Tomado de Stanley MA, (2003), Progress in prophylactic and therapeutic vaccines for human papillomavirus infection, Expert Rev, Vaccines Vol, 2(3); 381-389

Ciclo replicativo del VPH

El ciclo replicativo del virus del papiloma difiere de todas las otras familias de virus: la infección requiere la disponibilidad de células epiteliales mucosas o epidermales que sean capaces para proliferar (células de la capa basal) (zur Hausen H., 1996). En estas células, la expresión genética viral es fuertemente regulada, aunque la expresión limita genes virales “tempranos” específicos (tales como E5, E6 y E7) resultando en incremento de la proliferación de las células infectadas y su expansión lateral. Seguida de la entrada a las capas suprabasales, la expresión genética viral “tardía” es iniciada: el genoma viral circular es después replicado y forma proteínas estructurales. En las capas superiores de la mucosa o epidermis, partículas virales son completamente ensambladas y liberadas. (Fig. 2)

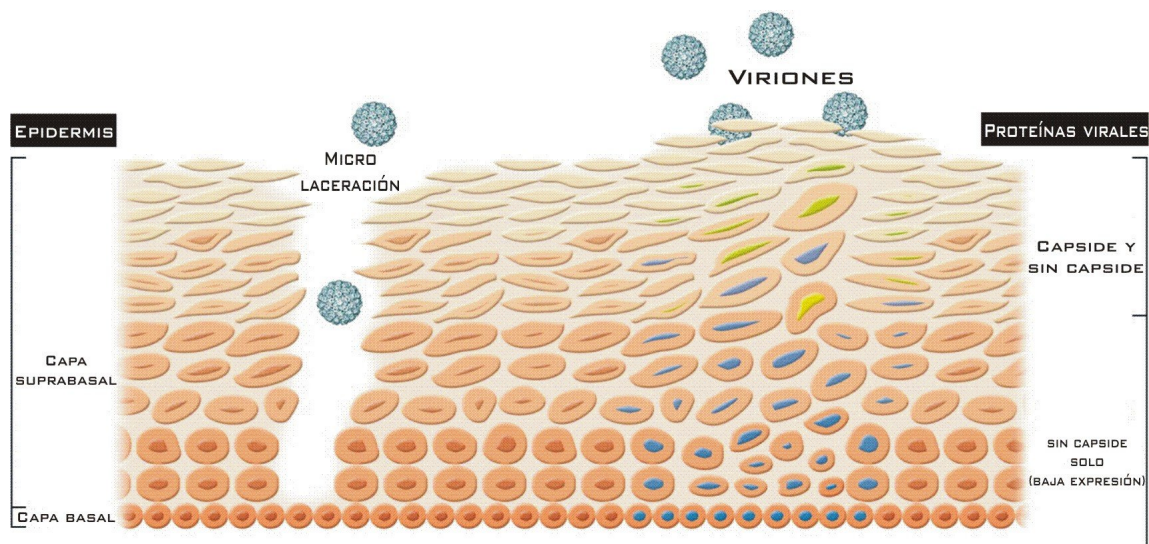


Figura 2. Ciclo replicativo del virus del papiloma humano. (Lowy DR, Schiller JT, (2006), Prophylactic human papillomavirus vaccines, J. Clin. Invest. 116:1167-1173).

Tres genes poseen actividad estimuladora de la proliferación: E5, E6 y E7. La proteína E5 parece ser importante en el curso temprano de la infección. El crecimiento de las células es estimulado a través de la formación de un complejo con el receptor de factor de crecimiento epidermal (EGFR), el disco derivado del receptor de factor de crecimiento- β y el receptor de factor de estimulación de crecimiento-1. (Hwang ES, 1995) Recientemente, también ha sido mostrado que E5 previene la apoptosis seguido de daño de ADN. (Hwang ES, 1995) Sin embargo, como las lesiones por infección de VPH progresan a cáncer cervical, el ADN viral episomal frecuentemente llega a ser integrado dentro del ADN de la célula hospedera, y una parte sustancial del genoma, generalmente incluyendo la secuencia codificada

E5, es suprimida. (Schwarz E, 1985) Así, que E5 no es obligatoria en los eventos tardíos de la carcinogénesis mediada por el VPH.

Un papel más significativo para la transformación maligna puede ser asignado a los genes E6 y E7 y sus respectivas proteínas. Estas son consistentemente expresadas en el tejido maligno, y su inhibición bloquea el fenotipo maligno de células de cáncer cervical. Son capaces de inmortalizar independientemente varios tipos de células humanas en cultivo de tejido, pero la eficiencia es incrementada cuando son expresadas juntas. (Münger K., 1989, McDougall JK, 1994)

Varias funciones han sido descritas para E6 y E7. Observaciones iniciales revelan que E6 interactúa con p53 (Werness BA, 1990) y E7 interactúa con RB (Dyson N., 1989) para bloquear la actividad de estos supresores del tumor. La interacción de la proteína E6 con la p53 y la proteína pro-apoptótica BAK, lleva a su degradación (Jackson S., 2000), lo cual resulta en resistencia a la apoptosis y un incremento en la inestabilidad cromosomal. Además, la activación de telomerasas y la inhibición de la degradación de proteínas de la familia de las kinasas SRC por la oncoproteína E6 parecen llevar a cabo importantes funciones en la estimulación de la proliferación (Veldman T, 2001).

E7, interactúa y degrada a RB, lo cual libera al factor de transcripción E2F de la inhibición por RB e incrementa la regulación de INK4A. (Dyson N, 1989; Kiyono T, 1998). (El resultado de la alta actividad de E2F puede conducir a la apoptosis en células expresando E7). Además, E7 estimula los genes de fase S ciclina A y ciclina E, (Zerfass K., 1995) y parece bloquear la función de los inhibidores de la ciclina dependiente kinasa WAF1 (también conocida como C1P1 y p21) y KIP1 (también conocido como p27). (Jones D.L., 1997, Zerfass-Thome K, 1996). Por inducción de amplificación del centriolo, también induce aneuploidia de lo cual contribuye a la tumorigénesis. (Duensing S, 2001)

E6 y E7 pueden inmortalizar células humanas independientemente, sin embargo, con reducida eficiencia (Band V., 1990, Halbert, C. L., 1991); su función en conjunto, resulta en un marcado incremento en la actividad de transformación. Esto parece ser debido a un interesante y complementario efecto sinérgico.

Como se mencionó previamente, E6 parece ser deteriorado o debilitado por INK4A, mientras E7 desvía esta inhibición a través de la directa activación de ciclinas A y E. A su vez, E6 transforma e impide la apoptosis inducida por E7 mediante la degradación de las proteínas inductoras de apoptosis p53 y BAK. (Zerfass K, 1995; Thomas M., 1998)

Al presente, es difícil asignar un papel para otras proteínas tempranas de VPH (tales como E1, E2 y E4) en el proceso de la transformación maligna. Sin embargo, las 2 proteínas estructurales L1 y L2 no son expresadas en células malignas y precancerosas, pero son importantes para el desarrollo de vacunas (zur Hausen H, 2002).

COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC)

En el Complejo principal de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) se codifican moléculas que se definen por su capacidad de provocar el rechazo de injertos entre miembros de una especie. Las moléculas del MHC en el humano reciben el nombre de antígenos leucocitarios humanos (HLA, por sus siglas en inglés) (Roit IM, 2003).

El HLA se encuentra situado en el brazo corto del cromosoma 6 y contiene más de 200 genes, de los cuales un poco más de 40 codifican para antígenos de leucocitos que participan, en diversas maneras, en la respuesta inmunitaria. Los genes encontrados en esta región se agrupan en cuatro familias predominantes (HLA-I, HLA-II, HLA-III y HLA-IV). Los genes para antígenos de clase I son: A, B y C; la de los genes para antígenos de clase II son DP, DQ y DR; la de los genes para antígenos de clase III entre otros: C2, C4, Bf, TNF α , TNF β , y por último los genes para antígenos de clase IV son LMP1, LMP2, TAP1 y TAP2.

ESTRUCTURA DE LAS MOLÉCULAS DEL MHC-I

Las moléculas MHC-I consisten de una cadena pesada transmembranal glicosilada de 45 kD unida no covalentemente con una proteína soluble de 12 kD (β_2 -m), y un péptido corto usualmente de entre 8 y 10 aminoácidos.

La cadena pesada contiene 3 dominios (α_1 , α_2 y α_3) de los cuales el dominio α_1 y α_2 , consisten de 2 hélices- α descansando sobre las hojas β de 8 hebras, formando el surco unión del péptido (Jardetzky T, 1996) (Figura. 4).

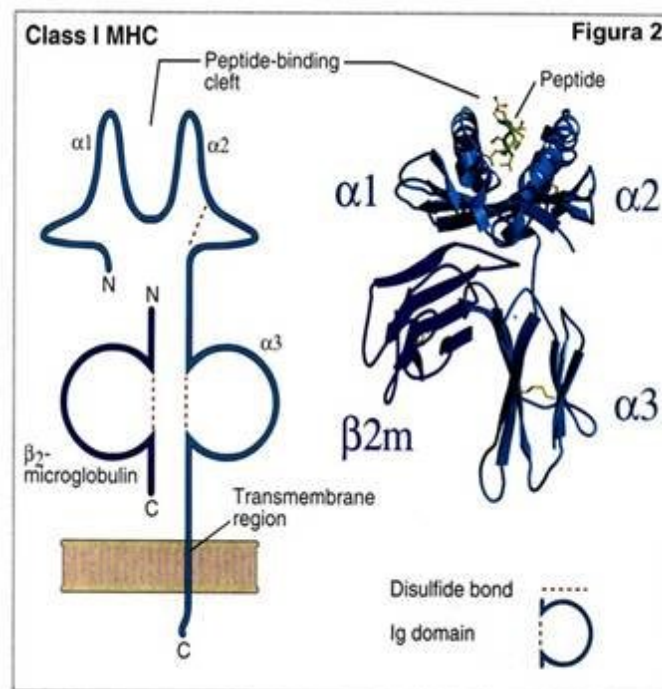


Figura 4. Estructura de la molécula MHC clase I.

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. Tomado de Abbas Abbul K. (2005).

PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN DEL ANTÍGENO

Las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC) presentan péptidos derivados de antígenos endógenos. Los péptidos se originan principalmente de proteínas nucleares o citosólicas y son generados por un complejo proteínico multicatalítico: el proteasoma (Grommé M, 2002).

Los antígenos citosólicos o nucleares primero son degradados a pequeños péptidos antes de ser transportados a través de transportadores proteínicos asociados al antígeno (TAP) al retículo endoplásmico, y unidos a las moléculas del MHC clase I. La mayor parte de proteínas en las células eucarióticas son blanco para la degradación por unión con ubiquitina. En el proceso de unión con ubiquitina, la molécula requiere ATP y varias enzimas, y múltiples cantidades de ubiquitina son covalentemente atraídas al grupo ϵ -amino de residuos de lisina en el sustrato proteínico (Jentsch S, 1992).

Esta cadena poliubiquitinada marca a la proteína para su rápida degradación por el proteasoma. Las proteínas contienen cajas de “destrucción” o secuencias PEST, los cuales consisten de patrones particulares de aminoácidos conservados, que también son degradados por el proteasoma. Son reconocidos por ligasas de ubiquitina, que transfieren ubiquitina a proteínas blanco. Muchas ubiquitinas son subsecuentemente adicionadas para formar una cola poliubiquitinada que es reconocida por la tapa 19S del proteasoma, que también ejecuta la reacción del desdoblamiento que precede a la degradación por el proteasoma. Estas cadenas de poliubiquitina marcan a la proteína para su rápida degradación por el proteasoma (Kloetzel PM, 2001). El proteasoma es el sistema principal proteolítico en el núcleo y citosol de todas las células eucariotas.

El proteasoma 20S es un complejo multicatalítico de 700 kD compuesto de dos anillos exteriores heptaméricos de subunidades α y dos anillos internos heptaméricos de subunidades β los cuales juntos forman un cilindro hueco. Las subunidades β son codificadas como precursores inactivos, que son activados por hendiduras autocatalíticas de la unión al péptido procediendo al residuo catalítico (Seemuller E, 1996).

Este procesamiento autocatalítico resulta en actividad proteolítica de subunidades β con una treonina N-terminal como sitio activo nucleófilo (Seemuller E, 1995). La distancia corta entre los sitios activos de dos subunidades β es de 28 Å, corresponde aproximadamente a una cadena de péptido extendido de ocho aminoácidos (Lowe J, 1995). Los proteasomas humanos probablemente contienen únicamente tres distintas subunidades β activadas (X, Y y Z) mientras la otra cuarta subunidad β parece carecer de los sitios activos (Seemuller E, 1995). Las tres subunidades activas β son estimuladas positivamente con interferón γ (IFN γ), y reemplazadas por otra serie de subunidades activas β : LMP2, LMP7 Y LMP10 (Belich MP, 1994).

El proteasoma 20S está involucrado en la degradación proteínas y polipéptidos desdoblados (Wenzel T, 1995) y puede funcionar independientemente o en asociación con dos subunidades reguladoras. El proteasoma 26S consiste del centro del proteasoma 20S con ambas terminaciones de las subunidades reguladoras 19S (PA700) y está involucrado en la degradación dependiente de ATP de proteínas unidas a ubiquitina. Alternativamente, el proteasoma 20S puede asociarse con un complejo regulador 11S (PA28 ó REG), el cual está compuesto de dos subunidades inducibles por IFN γ PA28 α y PA28 β , formando el complejo proteasoma-PA28 (Dubiel W, 1992). Han sido reportadas uniones simultáneas de las subunidades 19S y 11S al proteasoma 20S (Hendil KB, 1998). Es posible que con la estimulación positiva del interferón γ , un complejo 19S-20S-PA28 es formado, en el cual la parte de ubiquitinas 19S y PA28 activan la degradación por la partícula 20S.

Los tres complejos proteasómicos han sido implicados en la generación de péptidos para la presentación del antígeno por el MHC clase I. La unión de ubiquitina y la degradación por el proteasoma 26S juega una función en la generación de péptidos epítomos para algunos antígenos del MHC clase I (Townsend A, 1988).

La presencia de PA28 en el complejo proteasómico 20S incrementa marcadamente la hidrólisis del péptido (Dubiel W, 1992) y conduce a un incremento en la producción de productos de doble unión (Groettrup M, 1996).

Estos productos de doble unión son generados a través de consecutivas coordinaciones o uniones simultáneas de sustratos proteínicos por dos sitios activos en el proteasoma. Este incremento de actividad de doble unión del proteasoma PA28 incrementa la cantidad de péptidos de longitud óptima para el transportador TAP, lo cual también puede ser capaz de unir a las moléculas del MHC clase I. El proteasoma puede unir péptidos a los lados C-terminales fundamentales (actividad semejante a tripsina), hidrofóbicos (actividad semejante quimiotripsina), acidificados, cadenas ramificadas y pequeños aminoácidos neutrales (Orlowski M, 1993).

Los péptidos generados son transportados dentro del lumen del retículo endoplásmico (RE) a través del transportador asociado con el procesamiento de antígeno (TAP). En el retículo endoplásmico, son protegidos por moléculas chaperonas asistentes para generar un complejo heterotrimérico estable conformado por la cadena pesada del MHC clase I, la proteína β 2-microglobulina y el péptido. Finalmente, este complejo MHC clase I/péptido se transporta desde el RE por la ruta de exocitosis, a la superficie celular (Grommé M, 2002).

La presentación de péptidos por las moléculas MHC-I juega un papel central en la respuesta inmune celular para las células infectadas virales (Benitez R, 1998). Fig. 5.

Los virus emplean mecanismos sofisticados para evadir su detección por el sistema inmune huésped (Johnsen AK, 1999).

En el cáncer cervical frecuentemente se encuentra disminuida la expresión de moléculas HLA clase I, lo cual provee un mecanismo para la evasión inmune. La baja expresión del HLA-I en la superficie celular está frecuentemente asociada con efectos negativos inmunológicos (Serrano A, 2001).

La pérdida selectiva de los alelos individuales HLA-A o HLA-B, así como la completa pérdida de la expresión de los antígenos HLA-I se ha venido mostrando en varios tumores (Serrano A, 2001).

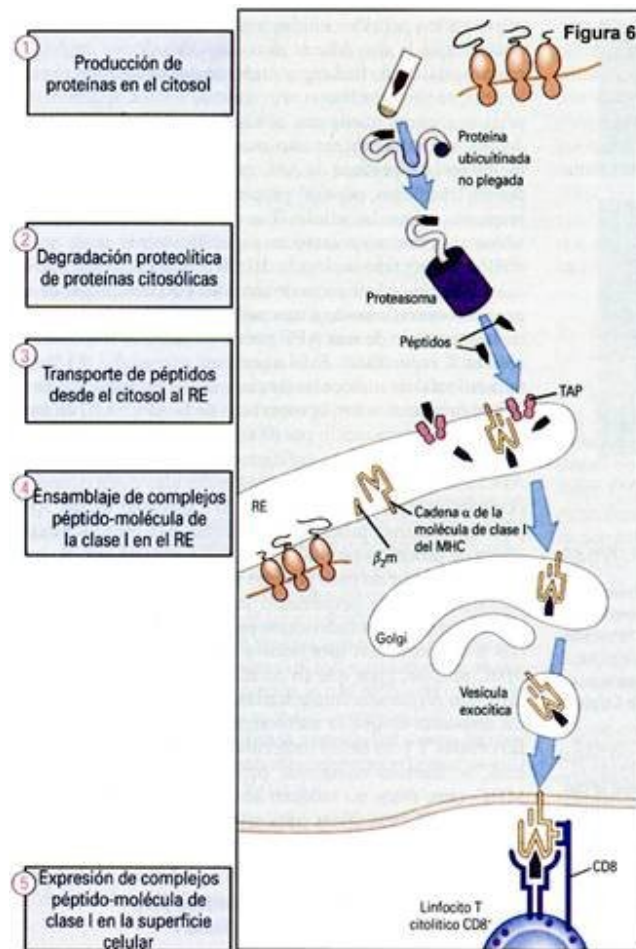


Figura 5. Procesamiento y presentación de antígenos. Tomado de Abbass Abul K. (2005).

Uno de los mecanismos que limita la expresión en la superficie celular de HLA involucra la cadena β -2-microglobulina, efecto de las mutaciones en los genes β -2-microglobulina que pueden modificar la expresión de las moléculas, porque β -2-microglobulina es requerida para ensamblar al complejo HLA y es transportada a la superficie celular. (Benitez, Godelaine, et al, 1998)

Por otro lado la expresión deficiente de los genes TAP y LMPs pueden ser responsables de la pérdida total de la expresión de HLA-I. (Johnsen, Templeton, et al 1999).

FACTORES EPIGENÉTICOS DEL CÁNCER

Epigenética

La epigenética puede ser definida como el estudio de la función del genoma que es contenida en el exterior del ADN y por medio del cual son causadas alteraciones estables en la expresión genética. La epigenética es un fenómeno bien establecido que juega un papel principal en una diversidad de procesos biológicos tales como desarrollo embrionario, biología del cáncer, y respuesta del sistema inmune, entre muchos otros. Los 2 más considerables cambios epigenéticos estudiados son la metilación del ADN y la acetilación de histonas; sin embargo (no obstante), la representación es mucho más complicada que esta, con nuevos actores viniendo a la escena tales como el fenómeno de interferencia de ARN, el cual ha provisto para ser implicado en el silenciamiento transcripcional a través de pequeñas moléculas dobles de ARN que reclutan complejos silenciando a la cromatina [Jablonka E, 2002].

Epigenética y cáncer

Varias líneas de evidencia indican que la tumorigenesis en humanos es un proceso de múltiples etapas en las cuales una sucesión de cambios genéticos conduce a una progresiva conversión de células normales. Mientras las alteraciones genéticas pueden explicar algunos de estos cambios, muchas de las alteraciones en la expresión genética observadas con el cáncer son causadas por modificaciones epigenéticas. Estas observaciones elevan la relevancia de mecanismos epigenéticos hacia el establecimiento de la propia función celular. La mala regulación de estos mecanismos coopera con mutaciones genéticas y contribuye al establecimiento y progresión de enfermedades neoplásicas. Desbalanceo de la acetilación/desacetilación de histonas en regiones promotoras contribuye a la desregulación de la expresión genética y ha sido asociada con la carcinogénesis y la progresión del cáncer [Lermann H, 2002].

Cambios genéticos y epigenéticos

Los cambios genéticos tienen lugar a través de un proceso llamado mutación que altera permanentemente las secuencias del ADN así que generaciones subsecuentes reciben malas copias de las secuencias alteradas sin regreso (Richards JE, 2005).

Los cambios epigenéticos dejan el orden de As, Cs, Gs y Ts inalterados mientras hacen otras modificaciones reversibles y temporales en el ADN que tiene efectos locales sobre la habilidad de las secuencias que son usadas por la célula para producir un fenotipo. En las situaciones del señalamiento hablamos acerca del efecto que es condenado a una posición de encendido o apagado, o giro de un controlador de regulación o desregulación o cambio cuando o donde los genes son expresados. La lámpara controlada por el switch es la misma lámpara, pero va a actuar diferente dependiendo de la posición de control del switch, y la posición de este switch puede ser cambiada (Richards JE, 2005).

La transcripción puede también ser silenciada por la metilación de ADN, las enzimas responsables de este fenómeno son las metiltransferasas del ADN. Esta clase de silenciamiento es común en células de mamíferos. La metilación de secuencias de ADN puede inhibir la unión de proteínas, incluyendo la maquinaria transcripcional, y por lo tanto bloqueando la expresión genética. Pero la metilación puede inhibir la expresión en otras vías, por ejemplo, algunas secuencias que son reconocidas solamente cuando la metilación por represores específicos que apagan genes cercanos, con frecuencia por reclutamiento de desacetilasas de histonas. (Watson JD, 2004).

El desarrollo del cáncer es conducido por cambios genéticos y epigenéticos que activan oncogenes e inactivan genes supresores del tumor. Los genes supresores del tumor (GST) son inactivados por mutaciones o deleciones, sin embargo, el apagado transcripcional por cambios epigenéticos es otro mecanismo diferente bien establecido de inactivación (Baylin SB, 2000). En el cáncer la actividad transcripcional de los GST está usualmente suprimida o apagada (Amalfitano, Parks 2002).

La metilación de la citosina ocurre predominantemente en regiones genómicas pobres en islotes de citosina precedidas de guanina (CpG) (Bird AP, 1986). Esta metilación suprime la expresión de los (GST) como lo es el p16, el retinoblastoma, el VHL, el E-Cadherin, el Hmlhi, el BRCA1, y otros más incluyendo el ER (Merlo A, 1995).

Por el contrario, regiones discretas localizadas en la región 5' regulatorias de genes, expresando islotes ricos de citosina precedidos de guanina (CpG), están siempre desmetiladas en células normales con la excepción de genes transcripcionalmente apagados en la inactividad del cromosoma X (Migeon BR, 1990).

La reversión de metilación de los promotores de GST es un atractivo blanco para el tratamiento del cáncer. Un gran conjunto de evidencias experimentales demuestran que la reexpresión con fármacos desmetilantes de GSTs silenciados conducen a un gran efecto inhibitorio del crecimiento celular del cáncer in vivo e in vitro (Bender CM, 1998).

En las células eucariotas, las histonas juegan un papel importante en el control de la transcripción para el empaquetamiento del ADN dentro de un arreglo de nucleosomas y una estructura de la cromatina su altamente ordenada. Las colas amino-terminales de histonas son ricas en residuos de lisina cargados positivamente los cuales forman estrictos contactos con las cargas negativas de la columna del ADN, restringiendo la accesibilidad del ADN para las uniones de reguladores transcripcionales. Estas condiciones restrictivas necesitan ser relevadas para permitir la regulación de la estructura y función de la cromatina, y finalmente para que pueda ocurrir la activación genética, la cual a menudo es llevada a cabo a través de la acetilación de las colas histónicas a través de acetiltransferasas. Por otro lado, la desacetilación de las colas histonas a través de desacetilasas de histonas (HDAC) restaura la restricción de las histonas resultando en represión genética. (Jihong C, 2006)

Como el ADN de doble hélice es empaquetado dentro de la estructura dinámica de la cromatina es crucial para los procesos de control transcripcional a través de la accesibilidad de la regulación de factores de transcripción para secuencias regulatorias del ADN. La cromatina esta constituida de nucleosomas, los cuales están comprimidos de 146 pares de bases alrededor de la cubierta del ADN un centro de 2 copias cada una de H2A, H2B, H3 y H4 proteínas histónicas [Chakravarthy S, 2005].

Estas proteínas sufren modificaciones post-transcripcionales que juegan un papel prominente en la regulación de la expresión genética y vías de transducción de señales tales como la metilación, acetilación, ubiquitinación, fosforilación, la cual determina la arquitectura de la cromatina y finalmente la transcripción genética [Chakravarthy S, 2005].

La más ampliamente modificación estudiada es la acetilación. Añadido de grupos acetilo de carga neutralizante hacia residuos de lisina sobre histonas que rompen las interacciones con el ADN, resultando en la descompactación de la cromatina, gran acceso del ADN a factores de transcripción, y la presencia de un locus genómico activo transcripcional. Esta modificación post-transcripcional depende del balance local entre las actividades de las acetiltransferasas de histonas (HAT) y desacetilasas de histonas (HDAC). En general, el incremento de los niveles de acetilación de histonas (hiperacetilación) esta encontrando en más descondensación de la heterocromatina, por el contrario decreción en los niveles de acetilación (hipoacetilación) son características de más heterocromatina condensada [Kuo MH, 1998].

Por otra parte, el complejo DNA: histonas es auto regulativo bajo el control del hospedero, a través de la acción de la desacetilación de histonas que regulan las interacciones de histonas con el ADN, modificando así la transcripción genética. (Herbar A, 2003)

La remodelación de la cromatina resulta del efecto de actividades desacetilasas de histonas (HDAC) en equilibrio fisiológico con actividades antagónicas acetilasas de histonas. Mecánicamente, la inhibición de HDAC afecta la actividad del equilibrio fisiológico con acetilasas de histonas antagónicas, se sabe de la influencia positiva de la expresión genética para abrir la heterocromatina hacia la maquinaria transcripcional. (Workman JL, 1998).

AGENTES DESMETILANTES Y AGENTES INHIBIDORES DE LA DESACETILACIÓN

La hidralazina es un compuesto usado como antihipertensivo que recientemente se ha empezado a utilizar en el tratamiento del cáncer (Dueñas A. 2003).

La hidralazina, un potente vasodilatador arterial que reduce la resistencia periferal directamente por la relajación del suave músculo de la capa celular en los vasos arteriales, ha sido utilizado para el manejo de trastornos hipertensivos y fallas cardíacas (Herting RL, 1967 y Klein L, 2003), no obstante, su actual uso esta limitado casi a trastornos hipertensivos durante el embarazo (Magee LA, 2003 y Powers DR, 1998). A pesar de numerosos estudios con el fármaco, su mecanismo de acción ha permanecido desconocido pero se ha sugerido que la hidralazina puede funcionar a través de la modulación de los efectos de compuestos como purinas liberados de finales del nervio simpático, y/o por producir un alterado balance de Ca^{+} en células del suave músculo vascular (Ellershaw DC, 2001, Jacobs M, 1984 y Bang L, 1998). La mayoría de sus efectos son confinados al sistema cardiovascular. Decremento de la presión en sangre después de la administración de la hidralazina es asociada con un decremento selectivo en la resistencia cardiovascular la circulación coronaria, cerebral y renal, con un efecto más pequeño en piel y músculo. La hidralazina baja la resistencia vascular periférica igual en débil y fuertes posiciones; también baja la resistencia vascular pulmonar e incrementa la producción cardíaca causando hipertensión pulmonar moderada (Herting RL, 1967 y Klein L, 2003).

La hidralazina es bien adsorbida a través del tracto gastrointestinal, pero su viabilidad sistémica es baja. Porque el compuesto acetilado es inactivo, la dosis necesaria para producir un efecto sistémico es alta en acetiladores rápidos. La N-acetilación de la hidralazina ocurre en intestinos y/o hígado. La vida media de la hidralazina es de 1 hora y la eliminación sistémica del fármaco es de 50 mL/kg/min. La hidralazina combina rápidamente con circulación de ácido keto α para formar hidrazones, y el principal metabolito recuperado del plasma es hidralazina hidrazona ácido pirúvico. Este metabolito posee una larga vida media mayor a la hidralazina pero no parece ser muy activo.

El metabolismo sistémico esta dependiendo sobre hidroxilación seguida por conjugación con ácido glucorionico en hígado, el cual no es dependiente sobre la velocidad de acetilación; por lo tanto, la vida media no difiere a un gran grado entre acetilación baja y rápida (Jounela AJ, 1975).

El pico de concentración de la hidralazina en plasma y el pico del efecto hipo-tensivo del fármaco ocurre entre los 30-120 min. de ingestión. Aunque su vida media en plasma es aproximadamente 1 h, la duración del efecto hipotensivo puede durar hasta 12 h; no hay una clara explicación para esta discrepancia. Los efectos antihipertensivos de la hidralazina no tienen claros efectos de dosis-respuesta. La dosis varía de 10 mg cuatro veces al día a 50 mg cuatro veces diarias. Después de de la estabilización con múltiples dosis diarias, un régimen de dosis doble diario puede ser efectivo. Acetilaciones lentas requieren bajas dosis. Para fallas cardíacas, las dosis recomendadas son altas (por arriba de 800 mg diarios o más); como una regla. 10-100 mg cuatro veces al día pueden ser efectivos (Johnston GD, 1992).

2 tipos de efectos secundarios ocurren después del uso de la hidralazina. El primer tipo es una extensión del efecto farmacológico de la hidralazina, incluye dolor de cabeza, náusea enrojecimiento, hipotensión, palpitación, taquicardia, aturdimiento y angina de pecho; la hidralazina puede producir retención de sal con congestivo desarrollo de falla cardíaca. El segundo tipo de efecto secundario es causado por reacciones inmunológicas, de las cuales la inducción del fármaco al síndrome semejante al lupus es el más común (Jounela AJ, 1975 y Johnston GD, 1992).

Existen reportes que indican que la hidralazina tiene efectos inhibitorios sobre la proliferación celular, así como de que es un reactivador de genes supresores de tumor. Por lo cual tiene grandes efectos antitumorales como es la capacidad para revertir la resistencia a drogas y un poder desmetilante (Dueñas A. 2003).

El ácido valproico un ácido graso de doble cadena de 8 carbonos, es bien conocido y efectivo fármaco antiepiléptico (Loscher W, 2002). Sus efectos farmacológicos involucran una variedad de mecanismos incluyendo incremento en ácido butírico amino- γ (GABA) reducción de la liberación y/o efectos de excitación de ácido aminos, deficiencias de entradas de voltaje de los canales de sodio, y modulación de transmisión serotónica y dopaminérgicas. Por su efectividad, buena tolerabilidad y biabilidad oral, el ácido valproico es ampliamente utilizado como una terapia crónica antiepiléptica (Chávez A., 2005).

El ácido valproico tiene una buena tolerabilidad buena seguridad como lo ha demostrado durante 35 años de uso como terapia crónica para trastornos epilépticos. Su vida media en suero es de 9- 18 horas y es administrado oralmente (Loscher W, 2002).

Se ha reportado recientemente que el ácido valproico es un efectivo inhibidor de las desacetilasas de histonas a las concentraciones conocidas entre los rangos terapéuticos utilizados para la epilepsia. Así como, el ácido valproico auxilia la represión de factores de transcripción que reclutan desacetilasas de histonas y activan la transcripción de diversos promotores. El ácido valproico causa hiper-acetilación de las colas N-terminales de las histonas H3 y H4 *in vivo* e *in vitro*. Si actividad inhibitoria de las HDAC, probablemente por la unión del centro catalítico y por lo tanto bloqueando el acceso al sustrato (Phiel CJ, 2001 y Kramer OH, 2003).

El ácido valproico es un agente farmacológico que incrementa la expresión genética (Fan S, 2004). Esta molécula es única entre HDACs por la virtud de su habilidad para inhibir preferencialmente la clase I de HDACs mientras también dispara la degradación proteosomal de HDAC2. (Kramer et al 2003, y Phiel et al 2001) Asimismo, puede inducir la desmetilación del ADN de plásmidos exógenos en células de mamífero. (Fan S, 2004).

La habilidad del ácido valproico como un inhibidor de la desacetilación de histonas, tiene menor citotoxicidad que la tricostatina A (TSA), sugiriendo su uso como una alternativa segura, además de que si son tomados juntos incrementan la expresión genética. Por tanto, puede representar un compuesto bien tolerado con el potencial para incrementar significativamente la expresión genética (Fong S, 2004).

Asimismo, ha sido reportado que el ácido valproico inhibe significativamente el crecimiento de cáncer cervical sin efectos celulares tóxicos (Takai N, 2004).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La transformación celular y el consecuente desarrollo de tumores en el proceso de cáncer resultan de una serie de eventos genéticos y ambientales que destruyen el equilibrio de la proliferación y muerte de las células. Este equilibrio es mantenido por mecanismos especializados y altamente eficientes. Por ejemplo, podemos mencionar a los genes supresores de tumores que se encargan de verificar el buen estado y reparación del genoma, y al sistema inmune que es capaz de detectar y en su caso destruir a células transformadas.

Cuando la capacidad de estos sistemas es superada se llega al establecimiento de un tumor, como ocurre en el caso del cáncer cérvico uterino. En esta patología, el virus del papiloma humano produce proteínas que inactivan a las proteínas P53 y retinoblastoma, importantes para la regulación del ciclo celular, al tiempo que evade la respuesta inmune mediada por linfocitos.

En este contexto, la hidralazina, agente desmetilante, así como el ácido valproico, inhibidor de agentes desacetilantes de histonas, se presentan como potenciales herramientas para la reversión del crecimiento tumoral por su capacidad para potenciar la expresión de genes que regulan el ciclo celular y favorecer la supresión del tumor. Actualmente, existen protocolos de investigación clínica en los que se prueba la capacidad de estos fármacos en pacientes con cáncer cérvico-uterino. Uno de estos estudios está siendo efectuado por la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, del Instituto Nacional de Cancerología.

De este modo, en colaboración con la Unidad de Investigación antes mencionada, resulta atractivo investigar *in vitro* si estos agentes tienen capacidad inhibitoria de la proliferación en células de cáncer cérvico uterino. Además, existen evidencias que sugieren que la respuesta inmune es evadida por las células del cáncer cérvico uterino. Así, es interesante evaluar si la acción de estos fármacos favorece también la expresión de moléculas relevantes para la respuesta inmune celular, como lo son las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase-I, las cuales actúan como puentes de comunicación entre las células transformadas y los linfocitos efectores.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto de la hidralazina y del ácido valproico en la proliferación celular y la expresión de moléculas de MHC clase I en líneas celulares derivadas de cáncer cérvico-uterino.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Cuantificar la proliferación de líneas celulares derivadas de cáncer cérvico-uterino al tratarlas con los fármacos hidralazina y ácido valproico.
- Evaluar la expresión de moléculas MHC-I en líneas celulares derivadas de cáncer cérvico-uterino al tratarlas con los fármacos hidralazina y ácido valproico.
- Determinar la expresión de los transcritos de los locus HLA-A, HLA-B y HLA-C de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad relevantes en el procesamiento de antígenos en líneas celulares derivadas de cáncer cérvico-uterino al tratarlas con los fármacos hidralazina y ácido valproico.

HIPÓTESIS

La hidralazina, con capacidad desmentilante del ADN, y el ácido valproico, que tiene la capacidad de inhibir la desacetilación de histonas, se ha visto que restauran la actividad de los genes supresores del tumor e incrementan la expresión genética, con lo que debido a sus propiedades se propone que favorezcan el incremento de la expresión de las moléculas HLA clase I y la inhibición de la proliferación en líneas celulares derivadas de cáncer cérvico-uterino.

MATERIALES Y MÉTODOS

CULTIVO Y TRATAMIENTO DE LÍNEAS CELULARES.

Se trabajó con tres líneas celulares derivadas de cáncer cérvico uterino: CASKI positiva para el genoma del virus de papiloma tipo 16 (+VPH-16), MS751 positiva para el tipo 45 (VPH-45) y C33A negativa para el virus de papiloma humano (VPH-). Se utilizaron linfocitos de sangre periférica como control positivo para los locus HLA-A, B y C, de un donador sano para las pruebas de RT-PCR.

Las tres líneas celulares al igual que los linfocitos fueron cultivados en medio de cultivo RPMI 1640 (GibcoBRL Life Technologies) complementado con suero fetal de bovino (GibcoBRL Life Technologies) al 10 % mantenidos en una incubadora (Forma Scientific CO₂ Water Jacketed Incubator USA) a 37 °C con 5 % de CO₂.

Se sembraron 100,000 células en cada caja de cultivo, de poliestireno de 60 mm (Corning USA), con cinco tratamientos diferentes: una caja sin tratamiento (negativo), otra con hidralazina (Sigma H1753) a una concentración de 10 μ M, una con interferón γ a 200 U/mL, uno con ácido valproico 1 mM (Sigma P4543), y uno último con hidralazina más ácido valproico con medio de cultivo RPMI 1640 de GibcoBRL (Life Technologies) complementado con suero fetal de bovino (GibcoBRL Life Technologies) al 10 %. El tratamiento se realizó por un periodo de 5 días.

EXTRACCIÓN DE ARN

Pasado el tiempo del tratamiento, para la extracción del ARN las células se lisaron directamente en la caja de cultivo agregando 1 mL de agente TRIzol (Invitrogen USA), e incubando el homogenizado por 5 min. a temperatura ambiente. Entonces se agregaron 0.2 mL de cloroformo por cada mL de TRIzol, y se agitó vigorosamente por 15 seg. e incubó de 2 a 3 minutos. Después se centrifugó a 12,000 RPM por 15 min en una termocentrífuga (Hettich universal 32 R) a una temperatura de 2 a 8 °C. Se colectó la fase acuosa y se agregaron 0.5 mL de isopropanol por cada mL de TRIzol para precipitar el ARN mezclándose ligeramente. Luego se incubó de 15 a 30 °C por 10 minutos y se centrifugó a 12,000 RPM por 10 min a temperatura de 2 a 8 °C. Se eliminó el sobrenadante y entonces se agregó 1 mL de etanol al 75 %, se agitó y se centrifugó a 7,500 RPM durante 5 min a temperatura de 2 a 8 °C. Se dejó secar ligeramente a temperatura ambiente por 5 o 10 minutos. Finalmente, se disolvió el ARN en agua ultrapura libre de DNAsas y RNAsa (Gibco USA) de 20 a 30 µL, Posteriormente se cuantificó la cantidad de ARN mediante su lectura de absorbancia en un Biofotómetro Eppendorf AG 22331 Hamburg a 260 nm longitud de onda.

TRANSCRIPCIÓN REVERSA

La reacción de transcripción reversa se efectuó en tubos para PCR en un volumen de 100 µL. En cada tubo se agregaron los siguientes reactivos, cuya concentración final fue: ARN 10 µg, MgCl₂ 25 mM, Buffer RT 10X, dNTP's 100 mM, inhibidores de RNAsas 25 U (Invitrogen), Oligo-dt 1:5, dithiothreitol (DTT) 25 mM, enzima transcriptasa reversa M-MLV 200 U, H₂O cbp 100 µL. La reacción se efectuó a 42 °C durante 1 hora para finalizar a 95 °C durante 5 minutos en un termociclador Mastercycler (Eppendorf Netheler-Hinz-GmbH 22331 Hamburg).

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Esta reacción se efectuó en un volumen final de 25 μ L. Para tal efecto se mezclaron los siguientes reactivos, cuya concentración final fue la siguiente: ADNc 5 μ L; Buffer RT 10X, MgCl₂ 25 M, dNTP's 100 mM, enzima polimerasa de ADN 1 U, oligonucleótidos específicos para β -actina 0.1 mM, H₂O cbp 25 μ L.

Los oligonucleótidos empleados para dirigir la polimerización específica fueron los siguientes: HLA-A, HLA-B, HLA-C y β -actina.

Oligos y condiciones utilizadas para el PCR:

Oligo	Sentido 5'-3'	Antisentido 5'3'	Medida pb	Alineamiento
HLA-A	gacagcgacgccgagcca	ggcagcgaccacagctccag	807	64 °C
HLB-B	gacagcgacgccgagtc	agtagcgaccacagctccga	907	60 °C
HLC-C	gagatcacactgacctggca	gaacacagtcagtggtggg	589	53 °C
B-actina	gggtcagaaggattcctatg	ggtctcaaacatgatctggg	238	58 °C

Se corrió un gel de agarosa al 1.8 % en electroforesis para separar el producto de cada PCR en una cámara Horizont 58 (GibcoBRL Life Technologies).

Visualizados a través de teñido con bromuro de etidio en un transiluminador de luz ultravioleta (UVP Transilluminator NM – 26), las bandas fueron documentadas con una cámara fotográfica.

CITOMETRÍA DE FLUJO

Se pusieron en una placa de 6 pozos 200,000, células y se rotularon con su respectivo tratamiento, en el primer día se le adicionaron 25 μ L de hidralazina (10 mM), al tercer día se le agregarán 50 μ L de ácido valproico (1 mM) y 50 μ L de Interferón γ (200 U/mL).

Una vez pasados los cinco días de tratamiento, las células fueron incubadas por 30 minutos a 4 °C con un anticuerpo primario W6/32 (que reconoce a las moléculas de HLA-I durante una hora).

Después de lavar dos veces con solución salina, se agregó un anticuerpo secundario con una partícula fluorescente (isotiocianato de fluoresceína), se incubaron durante quince minutos para finalmente volver a lavar y evaluar en un citómetro de flujo (FACScalibur Becton Dickinson).

CINÉTICA DE PROLIFERACIÓN (Incorporación de Timidina).

Se sembraron por triplicado en tres placas de 96 pozos, 5,000 células/pozo, de cada línea con los tratamientos para cuantificarlas al primero, al tercero y al quinto día de tratamiento. Un día antes de cada evaluación se adicionaron a cada pozo 1 μ Ci de (3 H)-timidina/mL.

Después de concluido el tiempo de cultivo, las células se lavaron con solución salina, y se agregó tripsina al 0.025% en PBS hasta cubrir completamente a las células durante 20 minutos. Entonces, las células fueron cosechadas en una cosechadora de células (Brandel MH-12); filtros de papel Watman, los filtros correspondientes fueron transferidos a viales de centelleo (Mini Poly-Q vial Beckman) y se adicionaron 3 mL de líquido de centelleo Beckman Coulter.

Se cuantificaron los tubos en un contador de centelleo marca Beckman LS 6500 de emisión Beta, que reporta lecturas en cuentas por minuto (CPM).

RESULTADOS

En este trabajo se utilizaron las líneas celulares CASKI (VPH-16), MS751 (VPH-45) y C33A (negativa para VPH) todas derivadas de cáncer cérvico uterino. Fueron cultivadas durante 5 días en presencia de hidralazina y al tercer día se adicionó ácido valproico, para evaluar el efecto en cuanto a la inhibición de la proliferación celular.

Las cinéticas de proliferación celular obtenidas tuvieron un comportamiento semejante para las tres líneas celulares: se observó que la incubación con los fármacos en forma individual causó poca disminución en la proliferación celular al quinto día del tratamiento, mientras que la incubación con la mezcla de la hidralazina y del ácido valproico, sí fue observada una disminución respecto al negativo, significativa a partir del tercer día y sostenida hasta el quinto día (Figuras 1, 2 y 3).

En los casos de las células CASKI y C33 el número de cpm obtenidas los días 3 y 5 disminuyó sustancialmente con respecto a las obtenidas el día 1, en tanto que para las MS751 se obtuvieron cpm semejantes durante los tres días, cuando fueron incubadas con los dos fármacos simultáneamente. La incubación con interferón γ (empleado como testigo del ensayo) no modificó la proliferación de forma significativa respecto al negativo. (Figs. 1 y 3).

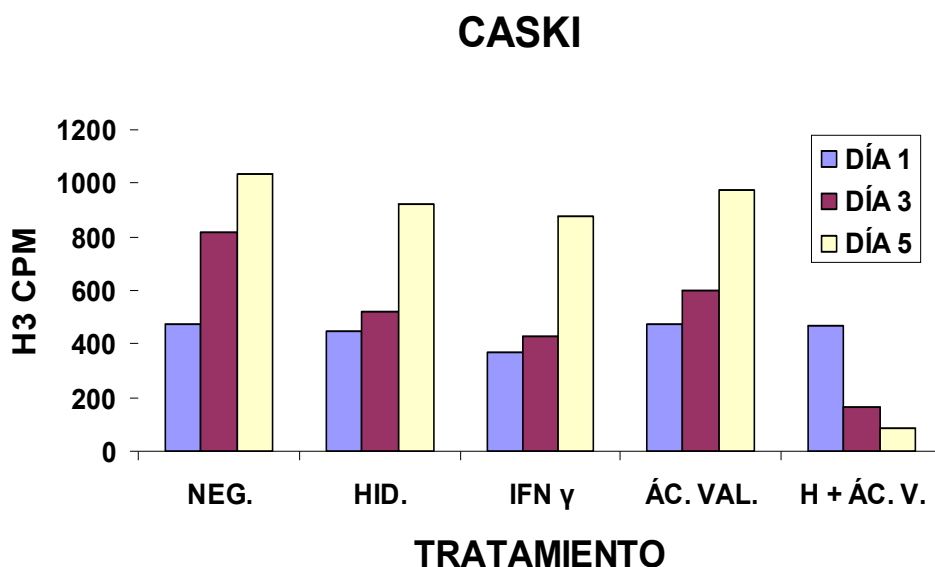


Figura 1. Efecto de la hidralazina (HID.) y el ácido valproico (ÁC.VAL.) en la cinética de proliferación de células CASKI derivadas de cáncer cérvico uterino.

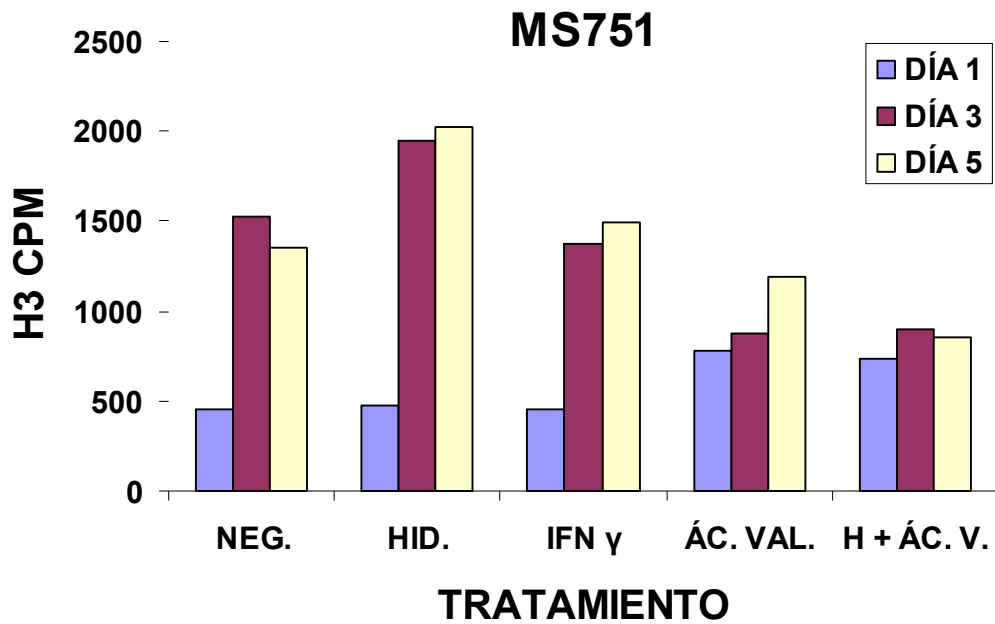


Figura 2. Efecto de la hidralazina (HID.) y el ácido valproico (ÁC.VAL.) en la cinética de proliferación de células MS751 derivadas de cáncer cérvico uterino.

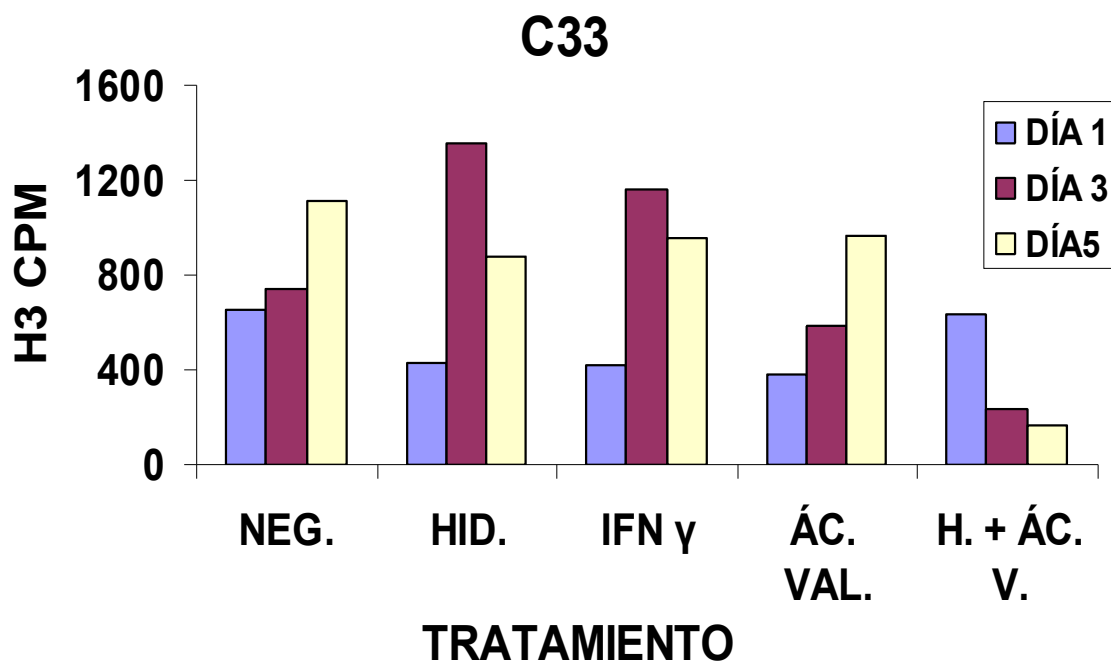


Figura 3. Efecto de la hidralazina (HID.) y el ácido valproico (ÁC.VAL.) en la cinética de proliferación de células C33A derivadas de cáncer cérvico uterino.

Las fotografías tomadas durante el ensayo muestran en la línea celular MS751 que las menores densidades celulares fueron obtenidas por los tratamientos con la hidralazina y el ácido valproico o por su combinación, respecto al negativo, durante el tratamiento por 5 días (Figura 4).

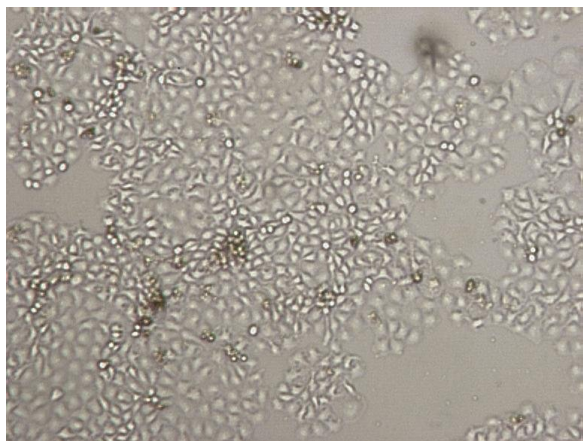


Figura 4-A. Línea MS751 negativo

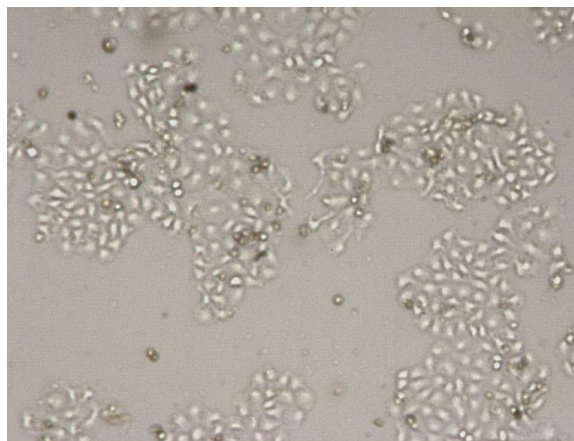


Figura 4-B. Línea MS751 hidralazina

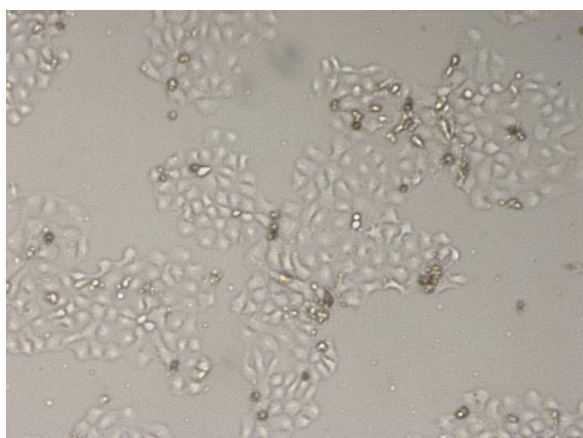


Figura 4-C. Línea MS751 interferón γ

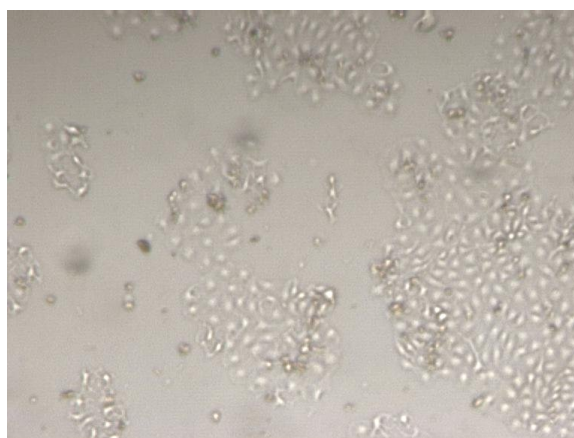


Figura 4-D. Línea MS751 ácido valproico

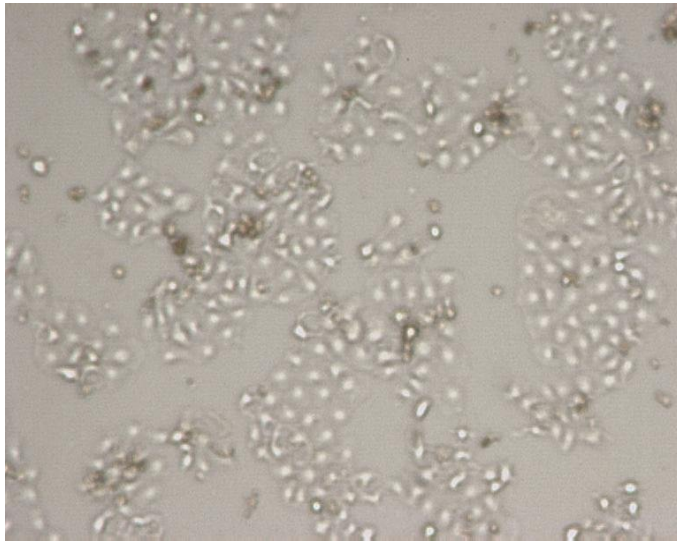


Figura 4-E. Línea MS751 hidralazina y ácido valproico.

Se puede observar en la Figura 4A como es que las células que no tienen tratamiento han crecido de una forma normal y armoniosa dado que se puede apreciar claramente una monocapa de células.

No así en las imágenes 4B, 4C, 4D, y 4E con los diferentes tratamientos donde al quinto día se observó que las células no proliferaron formando una monocapa homogénea y constante, ya que presentan grandes espacios entre islotes aislados, lo que sugiere como resultado del ensayo de proliferación que estos fármacos inhiben la proliferación del ciclo celular.

El siguiente objetivo fue analizar a través de citometría de flujo, la expresión total de las moléculas de histocompatibilidad MHC clase I (HLA-I) en las tres líneas celulares de cáncer cérvico uterino C33A, CASKI Y MS751. Para ello, se utilizó el anticuerpo monoclonal W6/32, el cual reconoce conformacionalmente la porción constante de todas las moléculas HLA clase I.

Se observó que la Hidralazina por sí sola indujo un incremento marginal en la expresión de moléculas HLA-I para las líneas C33A y MS751, pero no así para la línea celular CASKI (Figura 5). Por otro lado, con el ácido valproico se observó un incremento de la expresión de moléculas totales de HLA-I en la línea celular CASKI, así como un ligero incremento para la línea C33A.

En tanto, cuando se utilizaron la hidralazina y el ácido valproico juntos se observó un incremento mayor de la expresión de moléculas HLA clase I totales en las tres líneas celulares, siendo mucho mayor en las CASKI y las MS751 y menor en la línea C33A. Para C33 y MS751 el efecto en la proliferación observado por la combinación de hidralazina y ácido valproico fue mayor que el observado por el interferón γ (conocido inductor de la expresión de moléculas de HLA-I). De hecho, el Interferón γ no aumentó la ya de por sí baja expresión de moléculas HLA-I en la línea C33, en tanto que la suma de los fármacos estudiados, sí la aumentó (Figura 5).

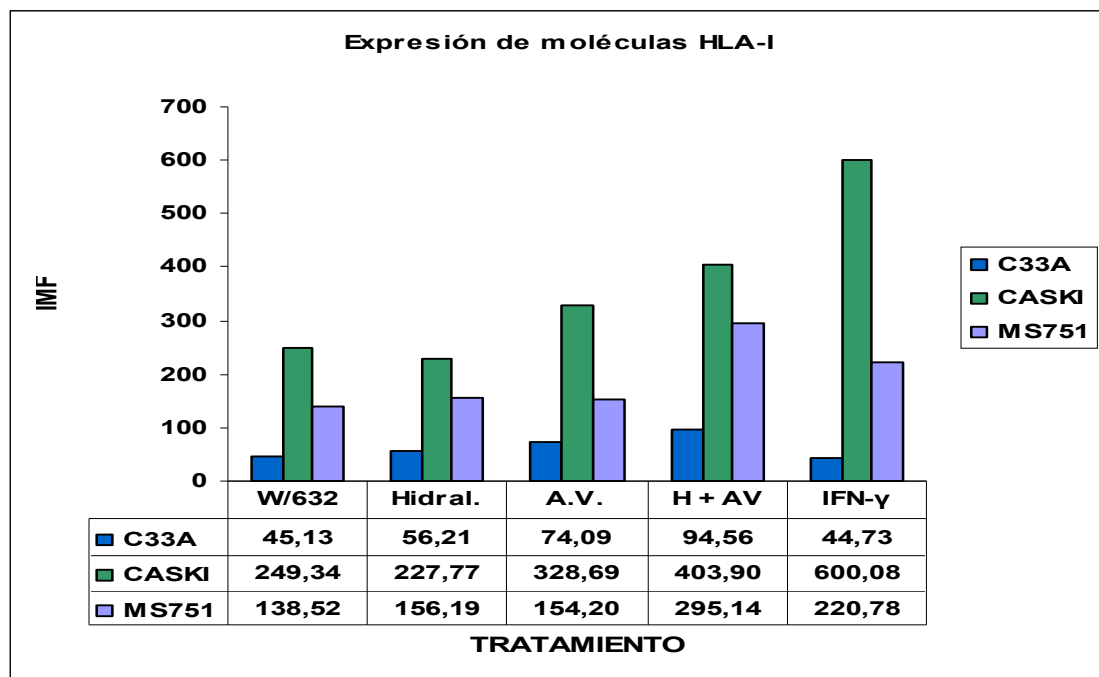


Figura 5. Efecto de la hidralazina (Hidral.) y el ácido valproico (A.V.) en la expresión total de moléculas HLA clase I (HLA-I) en líneas celulares derivadas de cáncer cérvico uterino. W6/32 (negativo), expresión basal de moléculas HLA-I.

Para profundizar en la evaluación del efecto de la hidralazina y del ácido valproico sobre la expresión de las moléculas HLA-I en líneas celulares derivadas de cáncer cérvico-uterino se procedió a evaluar mediante la técnica de RT-PCR la expresión individual de los locus A, B y C de las moléculas HLA-I.

En la línea celular C33 se observó un aumento en la expresión de las moléculas HLA- locus A, causado por el ácido valproico y más notablemente en el locus B, tanto individualmente como en conjunto con la hidralazina. En ambos casos, el efecto fue mayor al inducido por interferón γ . Figura 6.

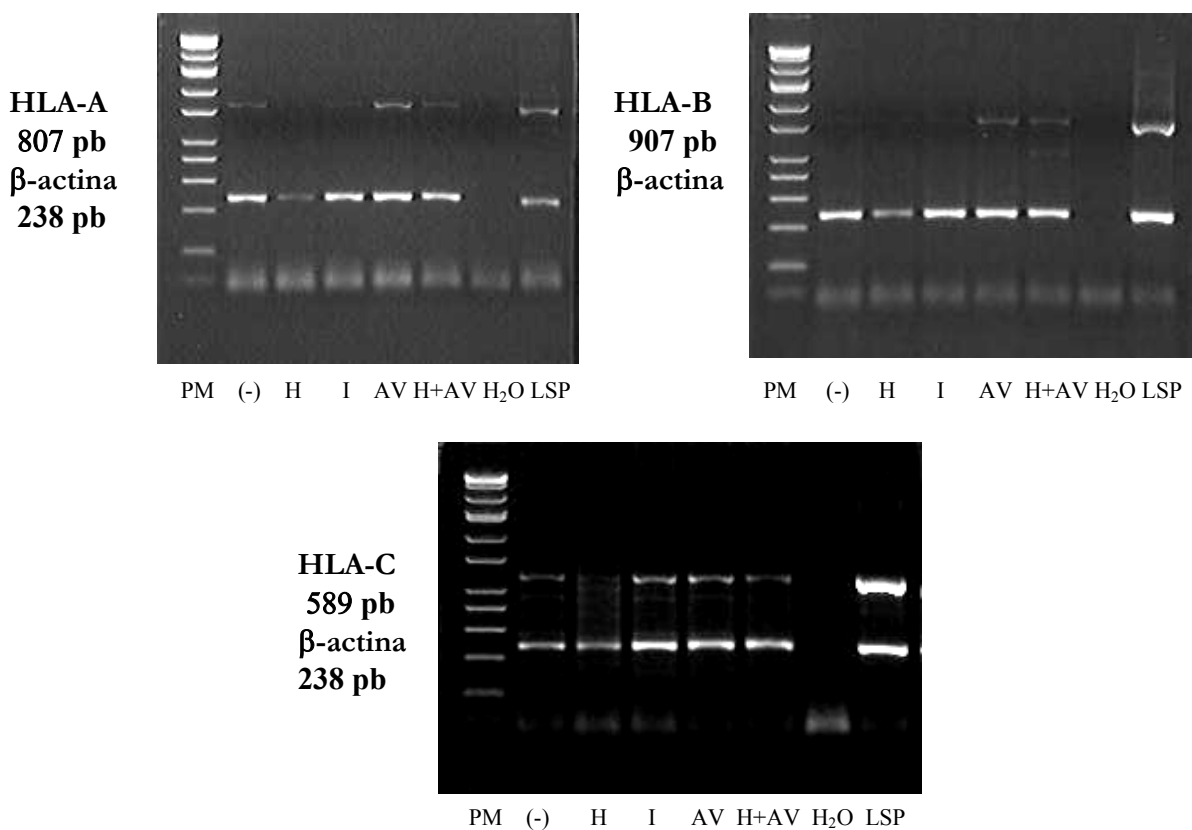


Figura 6. Análisis RT-PCR para observar la expresión de las moléculas HLA clase I en la línea celular C33A, donde en los carriles de izquierda a derecha tenemos las bandas de pesos moleculares, seguido por los tratamientos, (-) negativo, H hidralazina, I interferón, AV ácido valproico, H+AV hidralazina + ácido valproico, agua y al final el control positivo para las moléculas HLA-I, la banda superior molécula HLA-I, banda inferior la banda de β -actina como control celular.

Para la línea celular CASKI se observó un efecto menos notable del incremento de la expresión de las moléculas HLA-I causado por los fármacos hidralazina y ácido valproico. La mayor expresión es observada para el locus B, cuando las células fueron incubadas en presencia de los dos fármacos simultáneamente.

Para el locus A se observa un mínimo incremento de la expresión respecto al negativo, también con la suma de los fármacos, comparable con el incremento producido por el interferón γ . Para las moléculas HLA-C no se observó un incremento en la expresión, ni con la incubación con los fármacos individualmente, ni con la mezcla de ambos (Figura 7).

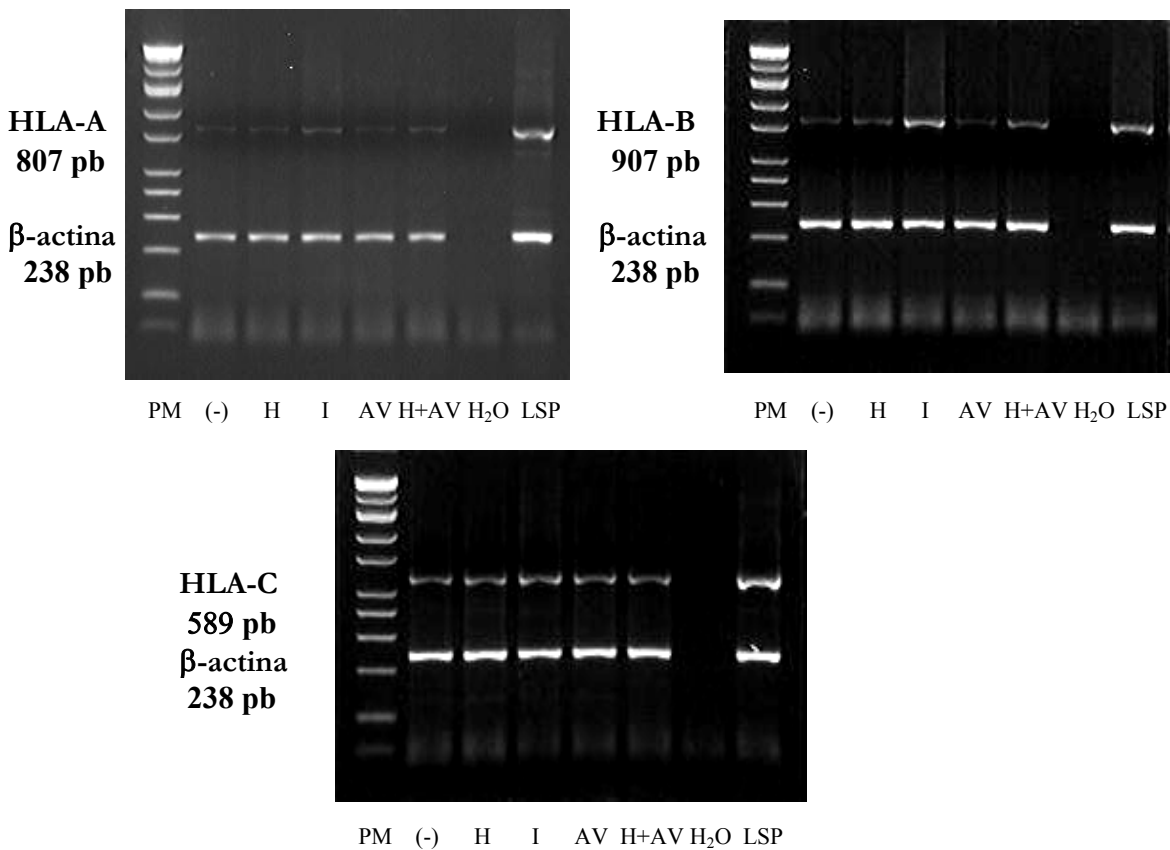


Figura 7. Análisis RT-PCR para observar la expresión de las moléculas HLA clase I en la línea celular CASKI, donde en los carriles de izquierda a derecha tenemos las bandas de pesos moleculares, seguido por los tratamientos, (-) negativo, H hidralazina, I interferón, AV ácido valproico, H+AV hidralazina + ácido valproico, agua y al final el control positivo para las moléculas HLA-I, la banda superior molécula HLA-I, banda inferior la banda de β -actina como control celular.

Para el locus HLA-A en la línea celular MS751 se observó el mayor incremento con el interferón γ , y el ácido valproico indujo un ligero incremento en la expresión aparentemente menor que el que se produjo con el interferón γ .

Para el locus HLA-B, se observó un incremento semejante al producido el interferón γ , tanto con el ácido valproico como con la mezcla de los fármacos hidralazina y el ácido valproico.

En cuanto a el locus HLA-C se observo un ligero incremento con el ácido valproico con respecto al negativo, así como el mayor incremento de la expresión fue con el interferon γ , (Figura 8).

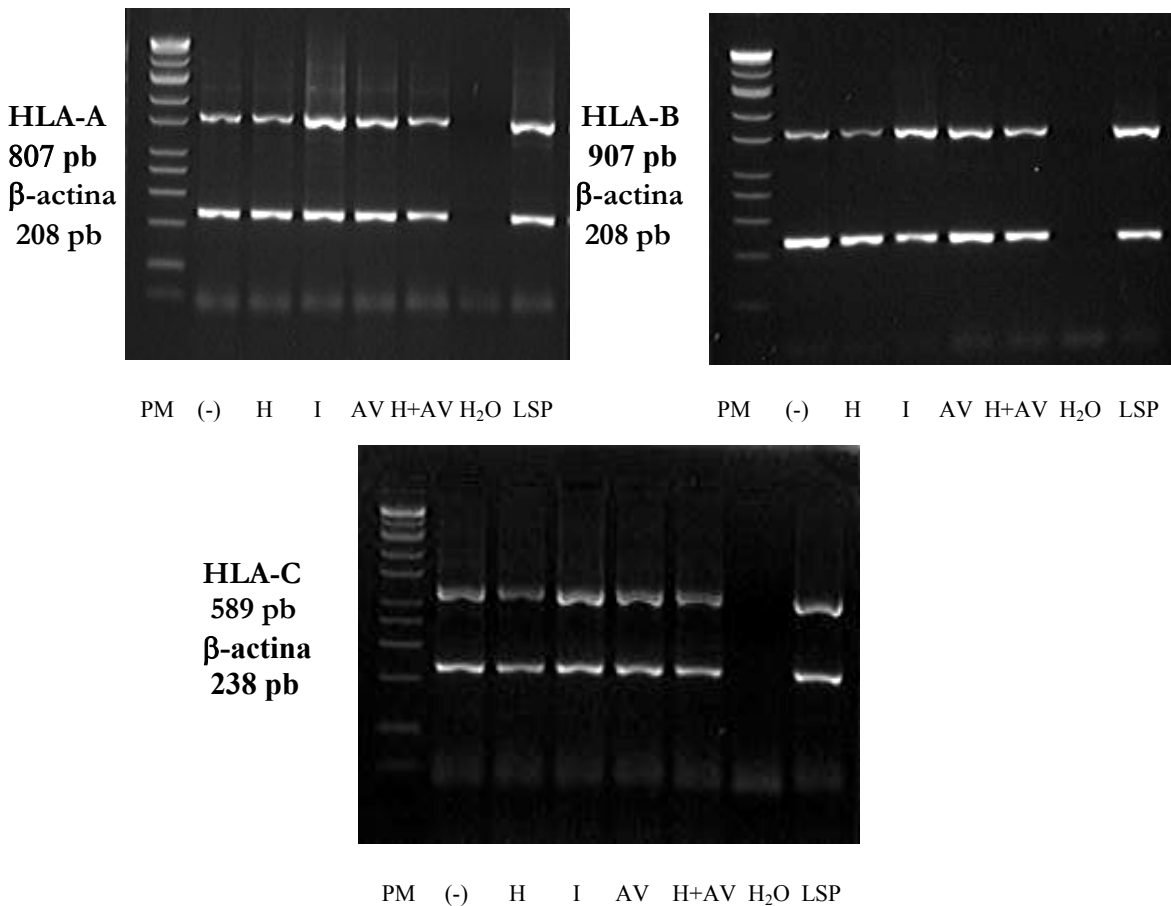


Figura 8. Análisis RT-PCR para observar la expresión de las moléculas HLA clase I en la línea celular MS751, donde en los carriles de izquierda a derecha tenemos las bandas de pesos moleculares, seguido por los tratamientos, (-) negativo, H hidralazina, I interferón, AV ácido valproico, H+AV hidralazina + ácido valproico, agua y al final el control positivo para las moléculas HLA-I, la banda superior molécula HLA-I, banda inferior la banda de β -actina como control celular.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La transcripción genética es un fenómeno altamente regulado. Aunque el proceso total tiene estrictos niveles de regulación, en la cima de éstos, el estado de la estructura de la cromatina afecta la habilidad de las proteínas reguladoras transcripcionales y de la polimerasa de ARN para encontrar acceso a promotores específicos y activar la transcripción genética (Lee, Young 2000). La hipermetilación del ADN y la desacetilación de histonas son críticos para determinar una estructura cerrada de la cromatina que puede ser responsable de la transcripción aberrante de genes, y conducir a ciertas patologías; sin embargo, esta condición puede ser revertida utilizando inhibidores de la metilación así como inhibidores de la desacetilación de histonas. (García, Kantarjian 2005)

En consecuencia, han sido desarrolladas drogas con estas propiedades con el propósito de aplicarlas para uso clínico. Los agentes desmetilantes clásicos comprenden algunos análogos de la deoxicitidina: 5-azacitidina, 5-aza-2-deoxicitidina, 1-β-D-arabinofuranosil-5-azacitosina, y dihidro-5-azacitidina, desarrollados en los pasados treinta años como agentes citotóxicos, y consecuentemente descubiertos como inhibidores de la metilación del ADN (Jones, Taylor 1980); además, se ha descrito una actividad semejante para el compuesto antihipertensivo hidralazina. Por otra parte, se ha reportado recientemente que el ácido valproico es un efectivo inhibidor de la desacetilación de histonas a concentraciones bien toleradas entre las dosis terapéuticas utilizados para uso original en la epilepsia (Arce C, 2006).

Recientemente, se han mostrado efectos antitumorales en modelos *in vivo* e *in vitro* mediante la modulación en la expresión de genes silenciados por cambios en la metilación del ADN y la modificación transcripcional a través del uso de desmetilantes del ADN e inhibidores de la acetilación de histonas. (Zhu, Otterson 2003). En ese sentido, y como se mencionó anteriormente, se ha mostrado el efecto desmetilante y la reactivación transcripcional de genes supresores del tumor mediados por el compuesto antihipertensivo hidralazina, un fármaco bien tolerado sin los efectos negativos comunes de los agentes quimioterapéuticos citotóxicos (Segura P; 2003). Asimismo, la actividad de los desacetilantes de histonas representa un potencial para el tratamiento del cáncer.

Su inhibición induce la diferenciación de las células tumorales, apoptosis o detención del crecimiento (Shao, Gao 2004 y Knupfer, Pulzer 2001) y sensibiliza a las células a la quimioterapia, (Kim, Blake 2003) o radiación terapéutica. (Zhang, Jung 2004). También ha sido descrito que la acetilación de histonas puede incrementar la eficiencia de severas drogas anticáncer con blanco en el ADN. En ese sentido, resulta atractiva la evaluación del ácido valproico como una opción en el tratamiento del cáncer.

Es por esto que en el presente estudio fue evaluado el efecto de los fármacos hidralazina (desmetilante del ADN), y el ácido valproico (inhibidor de la desacetilación de histonas) en la inhibición de la proliferación de tres líneas celulares derivadas de cáncer cérvico uterino. Como era de esperarse, indujeron la inhibición de la proliferación de las líneas celulares, probablemente debido a la inducción de la expresión de genes supresores de tumor; además, los ensayos de cinética de proliferación mostraron que su acción conjunta tiene como resultado un efecto sinérgico. El comportamiento fue semejante en las tres líneas celulares aunque portan diferentes secuencias genómicas de virus de papiloma humano lo que sugiere que este efecto puede ser generalizado y que es independiente del tipo de virus de papiloma humano infectante.

Por otro lado, las células neoplásicas pueden perder la capacidad para presentar eficientemente antígenos tumorales al sistema inmune hospedero como resultado de diferentes mecanismos entre los que destacan defectos que afectan la biosíntesis de moléculas HLA clase I. Las transformaciones malignas están asociadas entre otros factores, con cambios en la expresión y/o función de antígenos HLA-I, que inducen a la pérdida total de la expresión de estas moléculas, a una baja expresión, o a la pérdida selectiva de distintos alelos específicos. (Seliger B, 2002). Así, las células tumorales son deficientemente reconocidas por las células T, contribuyendo a que el tumor escape de la vigilancia inmune. La ausencia de un antígeno tumoral específico y/o pérdida o baja regulación de la expresión de las moléculas HLA clase I representan el más frecuente mecanismo de bloqueo de reconocimiento de células T hacia células cancerígenas. (Seliger B, 2002)

En ese contexto, se ha sugerido que la hipermetilación del ADN puede ser el principal mecanismo para la inactivación transcripcional de genes de HLA clase I en células cancerígenas escamosas en esófago humano (Nie Y, 2001), y en melanomas, la hipermetilación es responsable de la pérdida de la expresión de antígenos HLA clase I (Serrano A, 2001). Sin embargo, los agentes farmacológicos que inducen hipometilación de ADN 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.

Para evaluar el efecto de la hidralazina y el ácido valproico en la expresión de las moléculas HLA I, fueron cuantificadas por citometría de flujo o por RT-PCR después del tratamiento a las tres líneas celulares derivadas de cáncer cérvico uterino. El resultado obtenido coincide en general con lo observado para la inhibición de la proliferación: un incremento de la expresión de HLA-I en las tres líneas celulares con los fármacos individualmente, y aun más significativamente con la mezcla de los dos, comprobando con estos resultados que los efectos de cada uno de los fármacos que tienen por sí solos se potencian al combinarlos.

El efecto más marcado se observó en la línea C33A, la cual no presenta secuencias de ADN de HPV y por tanto se considera como negativa para el virus, pero presenta una marcada disminución en la expresión de moléculas HLA-I constitutivas. Mediante la técnica de RT-PCR fueron analizados los tres alelos HLA-A, -B y -C individualmente, y fue observado un incremento en la intensidad de las bandas para las moléculas HLA-A y HLA-B cuando es tratada con el ácido valproico individualmente, incluso mayor que con el interferón γ ; el mismo efecto fue observado para la combinación de los fármacos. En el caso de la molécula HLA-B hubo una restauración en la expresión de la molécula, ya que no se expresa en el negativo, y cuando se trató con el ácido valproico se restableció la expresión del HLA-B en forma semejante que con el interferon γ , y de la misma forma con la combinación.

Mediante citometría de flujo se analizó la expresión de moléculas HLA-I en la superficie celular, sin discriminar entre alelos. Aquí, sin embargo, nuevamente se observa el efecto marcado de los fármacos, pues inducen un aumento en la expresión de las moléculas, cuando el interferón γ , considerado un inductor clásico, no tiene efecto en C33, debido a que se ha encontrado que esta línea celular tiene defectos en la expresión de las moléculas del procesamiento de antígenos LMP7 y LMP10 (Hernández J, 2002).

Con los resultados aquí obtenidos podemos concluir que los fármacos probados en este ensayo, tienen la capacidad de inducir la expresión genética en las células derivadas de cáncer cervical, de acuerdo con las capacidades desmetilante e inhibidora de la desacetilación de histonas que se les han adjudicado. Como resultado, las líneas celulares detuvieron su proliferación, el cual es un fenómeno deseable en células transformadas. Dados los efectos sinérgicos observados, puede deducirse que ambos fármacos presentan actividad anti-tumoral.

Además de inhibir la proliferación celular, la hidralazina y el ácido valproico indujeron la expresión de las moléculas del HLA-I, la cual es una actividad novedosa en el uso de estos fármacos para el tratamiento de células tumorales. La importancia radica en su potencial doble para el tratamiento de las células tumorales: por una parte inhibe su proliferación y por otra aumenta la “presentación” de antígenos vía HLA-I, lo cual puede conducir a un reconocimiento por parte de los linfocitos T y eventualmente, a la eliminación vía la capacidad citotóxica de esas células inmunológicas.

Actualmente, estos fármacos son ya evaluados dentro de protocolos de investigación clínica. Con los resultados presentados aquí se refuerza la idea de que su utilización como una posible alternativa terapéutica para células tumorales es muy promisoría ya sea aplicados individualmente o en conjunto.

CONCLUSIONES

- De acuerdo con nuestros resultados, concluimos que la hidralazina así como el ácido valproico tienen la capacidad de inhibir la proliferación de células tumorales de cáncer cérvico-uterino, así como de incrementar la expresión genética y protéica de moléculas HLA clase I, lo que podría favorecer el reconocimiento antigénico por linfocitos T citotóxicos.
- En consecuencia será importante evaluar el efecto de estos fármacos como coadyuvantes en la terapia antitumoral.

PERSPECTIVAS

- La utilización de la hidralazina y el ácido valproico juntos o separados es prometedora al tratar por un lado de detener o disminuir la proliferación celular y por otra parte incrementar el reconocimiento inmune por medio del MHC a través de la modulación epigenética, con lo cual se incrementa el reconocimiento inmune y el ataque por medio de los linfocitos T citotóxicos.
- Por lo tanto estos fármacos deben de ser probados en un tratamiento clínico en pacientes con esta enfermedad, para poder comprobar o contrastar los resultados obtenidos *in vitro* en este laboratorio.

LITERATURA CITADA

- Abbas K, (2005), *Inmunología Celular y Molecular*, Quinta Edición, Mc-Graw Hill Interamericana, España.
- Aguirre R, Álvarez C, Briozzo L, Varela R. (2001) Carcinoma verrugoso y carcinoma condimatoso de vulva. *Arch. Ginecol Obst*, Vol. 39, 20-27.
- Alonso de Ruiz P, Lazcano Ponce EC, Hernández Ávila M, (2000), *Cáncer Cérvico Uterino diagnóstico, prevención y control*, Medica Panamericana, México.
- Arce C, Segura B, Perez E, Taja L, Candelaria M, Duenas A, (2006), Hydralazine target: From blood vessels to the epigenome, *Journal of Translational Medicine*, Vol. 4: 10.
- Band V, Zaychowski D, Kulesa V, Sager R, (1990), Papillomavirus DNAs immortalize normal human mammary epithelial cells and reduce their growth factor requirements. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 87, 463–467.
- Bang L, Nielsen-Kudsk JE, Gruhn N, Trautner S, Theilgaard SA, Olesen S-P, Beosgaard S, Aldershvile J, (1998), Hydralazine-induced vasodilation involves opening of high conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels, *Eur J Pharmacol* Vol. 361: 43-49
- Baylin SB, Herman JG, (2000); DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics, *Trends Genet.*, 16: 168-174
- Belich MP, Glynn RJ, Senger G, Sheer D, Trowsdale J, (1994), Proteasome components with reciprocal expression to that of the MHC-encoded LMP proteins, *Curr. Biol*, Vol. 4: 769-776
- Bender CM, Pao MM, Jones PA, (1998), Inhibition of DNA methylation by 5-deoxycytidine suppresses the growth of human tumor cell lines, *Cancer Res.*, 58: 95-101

-
- Benitez R, Godelaine D, Lopez NM, (1998), Mutations of β_2 -microglobulina gene result in lack of HLA class I molecules on melanoma cells of two patients immunized with MAGE peptides. *Tissue Antigens* 52: 520-529
 - Beral V, Hermon C, Muñoz N, Devesa SS, (1994), Cervical cancer, *Cancer Surv.*, Vol. 19-20, 265-285.
 - Berumen J, Ordoñez RM, Lazcano EC, Salieron J, Galvan SC, Estrada RA, Yunes E, Garcia-Carranca A, Gonzalez-Lira G, Madrigal-de la Campa A, (2001), Asian-American Variants of Human Papillomavirus 16 and Risk for Cervical Cancer: a Case–Control Study, *Journal of the National Cancer Institute* 93(17):1325-1330 .
 - Blaheta, RA, Cinatl, JJr, (2002), Anti-tumor mechanisms of valproate: a novel role for an old drug, *Medicinal Research Reviews*, Vol. 22 (5), 492-511.
 - Bird A. P, (1986), CpG islands and the function of DNA methylation, *Nature (Lond.)*, 321: 209-213
 - Bodmer JG, Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Charron D, Dupont B, Erlich HA, Fauchet R, Mach B, Mach B, Mayr WR, Parham p, Sasazuki T, Schreuder GM, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI, (1997), Nomenclature for factors of the HLA Sistem, *Hum. Immunol*, Vol. 53: 98-128
 - Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV, (1995) Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwilde perspective, *International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. J Natl Cancer Inst.*, Vol 87(11):796-802.
 - Castellanos MR, (2003), Cáncer cervico-uterino y el VPH. Opciones de detección, *Rev. Fac. Med UNAM*, Vol. 46, 63-66.

-
- Castellsagué X, (2005), El papel del hombre en la transmisión del VPH y en la carcinogénesis cervical: implicaciones para la prevención, Institut Catalá d'Oncologia, Barcelona Spain
 - Chakravarthy S, Park YJ, Chodaparambil J, Edayathumangalam RS, Luger K, (2005), Structure and dynamic properties of nucleosome core particles, *FEBS Lett*, Vol, 579: 895-898
 - Chavez A, Perez C, Perez E, Carrasco C, Rangel E, Segura B, Taja L, Trejo C, Gonzalez A, Candelaria M, Cabrera G, Duenas A, (2006), Antineoplastic effects of the DNA methylation inhibitor hydralazine and the histone deacetylase inhibitor valproic acid in cancer cell lines, *Cancer Cell International* 2006, Vol. 6:2.
 - Chavez A, Segura B, Perez E, Taja L, Cetina L, Candelaria M, Cantu D, Gonzalez A, Garcia P, Zambrano P, Perez C, Cabrera G, Trejo C, Angeles E, Duenas 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, Vol.
 - Cheung YK, Cheng SCS, Sin Fion WY, Xie Y, (2004), Plasmid encoding papillomavirus Type 16 (HPV16) DNA constructed with codon optimization improved the immunogenicity against HPV infection, *Vaccine* Vol 23, 629-638.
 - Cole CN, (1996), Polyomavirinae: The viruses and their replication: in Fields BN, Knipe DM, Howley PM,,: Fields, *Virology*, ed 3, Philadelphia, Lippincott-Raven, 1997-2025
 - Coral S, Sigalotti L, Altomonte M, Engelsberg A, Colizzi F, Cattarossi I, Maraskovsky E, Jager E, Seliger B, Maio M, (2002), 5-aza-2'-Deoxycytidine-induced Expression of Functional Cancer Testis Antigens in Human Renal Cell Carcinoma, *Clinical Cancer Research* Vol. 8, 2690-2695.

-
- Coral S, Sigalotti L, Gasparollo A, Cattarossi I, Visintin A, Cattelan A, Altomonte M, Maio M, (1999), Prolonged upregulation of the expression of HLA class I antigens and costimulatory molecules on melanoma cells treated with 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AZA-CdR), *J. Immunother*, Vol. 22, 16-24.
 - Covens A, Brunetto VL, Markman M, Orr JW, Lentz SS, Benda J, (2003), Phase II trial of danazol in advanced, recurrent, or persistent endometrial cancer: a Gynecologic Oncology Group study, *Gynecol Oncol.*, Vol. 89 (3) :470-474.
 - DeFranco AL, Locksley RM, Robertson M, (2007), 4-3 The MHC and Polymorphism of MHC Molecules, from *Immunity: The Immune Response in Infectious and Inflammatory Disease*, Chapter 4: Adaptive Immunity and the Detection of Infection by T Lymphocytes
 - Dell G, Gaston K, (2001), Contributions in the domain of cancer research: Review Human papillomaviruses and their role in cervical cancer, *Cell. Mol. Life Sci.* Vol. 58 1923–1942.
 - Devesa S, Young JL, Brinton LA, Fraumeni JF Jr, (1989), Recent trend in cervix uteri cancer, *Cancer*, Vol 64, 2184-2190.
 - Dubiel W, Pratt G, Ferrel K, Rechsteiner M, (1992), Purification of an 11S regulator of the multicatalytic protease, *J. Biol. Chem*, Vol. 267: 22369-22377
 - Duensing S, Duensing A, Crum CP, Münger K, (2001), Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein-induced abnormal centrosome synthesis is an early event in the evolving malignant phenotype. *Cancer Res.* 61, 2356–2360.
 - Dueñas A, (2003), Compuesto usado como antihipertensivo podría utilizarse en el tratamiento del cáncer, *Boletín UNAM-DGCS-054*.
 - Dyson N, Howley PM, Münger K, Harlow E, (1989) The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product, *Science*, Vol. 243, 934–937.

-
- Ellershaw DC, Gurney AM, (2001), Mechanisms of hydralazine induced vasodilatation in rabbit aorta and pulmonary artery, *Br J Pharmacol*, Vol. 134: 621-631
 - Fan S, Maguire CA, Ramirez SH, Bradel-Tretheway B, Sapinoro R, Sui Z, Chakraborty-Sett S, Dewhurst S, (2004), Valproic acid enhances gene expression from viral gene transfer vectors, *J Virol Methods*, Vol. 125(1): 23-33
 - Finzer P, Ventz R, Kuntzen C, Seibert N, Soto U, (2002), Growth arrest of HPV-positive cells after histone deacetylase inhibition is independent of E6/E7 oncogene expression, *Virology*, Vol. 304 (2), 265-273.
 - Fonsatti E, Sigalotti L, Coral S, Colizzi F, Altomonte M, Maio M, (2003), *Int. J. Cancer*, Vol. 105:430-431
 - Galloway DA, (2003), Papillomavirus vaccines in clinical trials, *The Lancet infectious Diseases*, Vol. 3, 469-475.
 - González-Losa MR, Laviada Mier y Teran MA, Puerto-Solís M, García-Carrancá A, (2003), Molecular variants of HPV type 16 E6 among Mexican women with LSIL and invasive cancer, *Journal of Clinical Virology*, Vol. 29(2):95-8.
 - Groettrup M, Soza A, Eggers M, Kuehn L, Dick TP, Schild H, Rammensee HG, Koszinowski UH, Kloetzel PM, (1996), A role for the proteasome regulator PA28 alpha in antigen presentation, *Nature*, Vol. 381: 166-168
 - Grommé M, Neefjes J, (2002), Antigen degradation or presentation by MHC class I molecules via classical and non-classical pathways, *Molecular Immunology*, Vol. 39, 181-202.
 - Hagasse ME, Yaegashi N, Galloway DA, (1993), Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins, *J Virol*, Vol. 67, 315-322.

-
- Halbert, CL, Demers, GW, Galloway, DA, (1991), The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells, *J. Virol.* Vol. 65, 473–478.
 - Hendil KB, Khan S, Tanaka K, (1998), Simultaneous binding of PA28 and PA700 activators to 20S proteasomes, *Biochem J*, Vol. 322: 749-754
 - Herting RL, Hunter HL, (1967), The physiologic and pharmacologic basis for the clinical treatment of hypertension, *Med Clin North Am.* 1967;**51**:25–37
 - Hwang ES, Nottoli T, Dimaio D, (1995), The HPV 16 E5 protein: expression, detection, and stable complex formation with transmembrane proteins in COS cells. *Virology* **211**, 227–233.
 - International Agency of Research on Cancer, (1995), Monograph on cancer Human papillomavirus, Geneva, Switzerland: World Health Organisation.
 - Jablonka E, Lamb MJ, (2002), The changing concept of epigenetics, *Ann N Y Acad Sci*, Vol. 981: 82-96.
 - Jackson S, Harwood C, Thomas M, Banks L, Storey A, (2000), Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins, *Genes Dev.*, Vol. 14, 3065–3073.
 - Jacobs M, (1984), Mechanism of action of hydralazine on vascular smooth muscle, *Biochem Pharmacol*, Vol. 33: 2915-2919
 - Jakobisiak M, Lasek W, Golab J, (2003), Natural mechanisms protecting against cancer, *Immunology Letters*, Vol. 90, No.2, 103-122.
 - Jentsch S, (1992), The ubiquitin-conjugation system, *Annu, Rev, Genet*, Vol. 26, 179-207.

-
- Jihong C, Feras MG, Wafae B, Qiao L, (2006), Valproic acid and butyrate induce apoptosis in human cancer cells through inhibition of gene expression of Akt/protein kinase B, *Molecular cancer*, Vol. 5: 71.
 - Janeway Ch, (2001), *Immunobiology, The immune system in health and disease*. 5a. ed. Churchill Livingstone–Garland Publishing
 - Jardetzky T, (1996), Crystal structures of MHC class I and class II molecules. In: Browning MJ, McMichael AJ, *HLA and MHC: Genes, Molecules and Function*, Bios Scientific Publishers Ltd, Oxford, 249
 - Jentsch S, (1992), The ubiquitin-conjugation system, *Annu, Rev, Genet*, Vol. 26, 179-207
Jihong C, Feras MG, Wafae B, Qiao L, (2006), Valproic acid and butyrate induce apoptosis in human cancer cells through inhibition of gene expression of Akt/protein kinase B, *Molecular cancer*, Vol. 5: 71
 - Johnsen AK, Templeton DJ, Sy MS, (1999), Deficiency of transporter for antigen presentation TAP in tumor cells allow evasion of immune
 - Johnston GD, (1992), Dose response relationship with antihypertensive drugs, *Pharma Ter*, Vol. 55: 53-93
 - Jounela AJ, Pasanan M, Mantilla NJ, (1975), Acetylator phenotype and the antihypertensive response to hidralazine, *Acta Med Scand* Vol. 197: 303-306
 - Jones DL, Alani RM, Münger K, (1997), The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21CIP1-mediated inhibition of CDK2, *Genes Dev.*, Vol. 11, 2101–2111.

-
- Karpf AR, Lasek AW, Ririe TO, Hanks AN, Grossman D, Jones DA, (2004), Limited Gene Activation in Tumor and Normal Epithelial Cells Treated with the DNA Methyltransferase Inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidine, *Molecular Pharmacology*, Vol. 65:18-27.
 - Kramer OH, Zhu P, Ostendorff HP, Golebiewski M, Tiefenbach J, Peters MA, Brill B, Groner B, Bach I, Heinzl T, Gottlicher M, (2003), The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2. *EMBO J*, Vol. 22:3411–3420.
 - Kiyono T, (1998), Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells, *Nature*, Vol. 396, 84–88.
 - Klein L, O'Connor CM, Gattis WA, Zampino M, de Luca L, Vitarelli A, Fedele F, Gheorghide M, (2003), Pharmacologic therapy for patients with chronic heart failure and reduced systolic function: review of trials and practical considerations, *Am J Cardiol.*, Vol. 91:18F–40F
 - Kloetzel PM, (2001), Antigen processing by the proteasome, *Nat. Rev. Mol., Cell Biol.*, Vol. 2, 179-187.
 - Koutsky LA, Kiviat NB, (1999), Genital human papillomaviruses. In: Holmes KK, Sparling PF, Mardh PA. Sexually transmitted diseases, 3rd edn. New York: McGraw Hill, 347-360.
 - Kuo MH, Allis CD,(1998), Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation, *Bioessays*, Vol. 20: 615-626
 - Laimins LA, (1998), Regulation of transcription and replication by human papillomaviruses; in McCance DJ, *Human Tumor Viruses*, Washington, American Society for Microbiology,201-223
 - Lazcano E, Herrero R, Muñoz N, Cruz A, Sha KV, Alonso P, Hernández P, (2001), Epidemiología of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology, *Int J Cancer* Vol. 91:412-420

-
- Lermann H, Pritchard LL, Harel-Bellan A, (2002), Histone Acetyltransferases and deacetylases in the control of cell proliferation and differentiation, *Adv Cancer Res*, Vol. 86: 41-65.
 - Loscher W; (2002), Basic pharmacology of valproate: a review after 35 years of clinical use for the treatment of epilepsy, *CNS Drugs*, Vol. 19:669
 - Lowe J, Stock D, Jap B, Zwickl P, Baumeister W, Huber R, (1995), Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution, *Science*, Vol. 268: 533-539
 - Lowy DR, Howley PM, (2001), Papilloma viruses In: Knipe DM, Howley PM, eds, *Fields virology*, 4th edn, New York: Lippincott Williams and Wilkins, 2231-2264.
 - Margni RA, (1996), *Inmunología e Inmunoquímica*, 5^a ed., Médica Panamericana, Argentina
 - Magner WJ, Kazim AL, Stewart C, Romano MA, Catalano G, Grande C, Keiser N, Santaniello F, Tomasi TB, (2000), Activation of MHC class I, II, and CD40 gene expression by histone deacetylase inhibitors, *J. Immunol.*, Vol. 165, 7017-7024.
 - Magee LA, Cham C, Waterman EJ, Ohlsson A, von Dadelszen P, (2003), Hydralazine for treatment of severe hypertension in pregnancy: Meta-analysis, *BMJ*, Vol. **327**: 955–965
 - McDougall, JK, (1994), Immortalization and transformation of human cells by human papillomavirus, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, Vol. 186, 101–119
 - Merlo A, Herman JG, Mao L., Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, Baylin SB, Sidransky D, (1995), 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers, *Nat. Med.*, Vol. 1: 686-692,
 - Migeon BR, (1990), Insights into X chromosome inactivation from studies of species variation. DNA methylation and replication, and vice versa, *Genet. Res.*, 56: 91-98.

-
- Münger K, Phelps WC, Bubb V, Howley PM, Schlegel R, (1989), The E6 and E7 genes of human papillomavirus type 16 are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes., *J. Virol.*, Vol. 63, 4417–4423 Description of the transforming properties of E6 and E7.
 - Muñoz N, Bosch FX, (1997), Cervical cancer and human papillomavirus: Epidemiological evidence and perspectives for prevention, *Salud pública Méx*, Vol.39 No.4.
 - Muñoz N, (2000), Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol*. Vol. 19, 1-5.
 - Myers G, Lu H, Calef C, (1996), Heterogeneity of papillomaviruses, *Cancer Biol*, 7: 349-358.
 - Nie Y, Yang G-y, Song Y, Zhao X, So C, Liao J, Wang L-D, Yang CS, (2001), DNA hypermethylation is a mechanism for loss of expression of the HLA class I genes in human esophageal squamous cell carcinomas, *Carcinogenesis*, Vol. 22, No. 10, 1615-1623.
 - O'connell J, (2003), RT-PCR protocols, Humana press. Totowa, NJ. USA.
 - Orłowski M, Cardoso C, Michaud C, (1993), Evidence for the presence of five distinct proteolytic components in the pituitary multicatalytic proteinase complex. Properties of two components cleaving bonds on the carboxyl side of branched chain and small neutral amino acids, *Biochemistry*, Vol. 32: 1563-1572
 - Parkin DM, Pisani P, Ferlay J, (1999), Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer*, Vol. 80, 827–841.
 - Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS, (2001), Histone Deacetylase Is a Direct Target of Valproic Acid, a Potent Anticonvulsant, Mood Stabilizer, and Teratogen, *J. Biol. Chem.*, Vol. 276, No 39, 36734-36741.

-
- Powers DR, Papadakos DJ, Wallin JD, (1998), Parenteral hydralazine revisited, J Emerg Med, Vol. 16: 191–196
 - Richards JE, Hawley RS, (2005), The Human Genome, Second edition, Elsevier Academic Press, China.
 - Rregueiro J, López C, Martínez E, (2003), Inmunología Biológica y Patología del Sistema Inmune, Tercera Edición, Medica Panamericana, España.
 - Rocha L, Ambrosio JP, Mora ML, Cruz F., Hernández J, Weiss B, Ortiz V, Monroy A, (2004), Detection of antibodies against a human papillomavirus (HPV) type 16 peptide that differentiate high-risk from low-risk HPV associated low-grade squamous intraepithelial lesions, Journal of general virology, Vol. 85, 2643-2650.
 - Rojas O, (2001), Inmunología, Segunda edición, Panamericana, México.
 - Roitt IM, Delves Peter J, (2003), Inmunología, Decima edición, Panamericana, Argentina.
 - Sánchez JA, Huerta MI, (2005), Infección por VPH y cáncer cervicouterino, Rev Mex Patol Clin, Vol. 52. Núm. 4, 222-233.
 - Schiffman MH, (1994), Epidemiology of cervical human papillomavirus infections: in zur Hausen H, Human Pathogenic Papillomaviruses, Heidelberg, Springer, 55-81
 - Segura B, Perez E, Taja L, Chavez A, Revilla A, Benitez L, Duenas A, (2006), Global DNA hypermethylation-associated cancer chemotherapy resistance and its reversion with the demethylating agent hydralazine, Journal of Translational Medicine 2006, 4:32.

-
- Segura B, Trejo C, Perez E, Taja L, Mariscal I, Chavez A, Acuña C, Salazar AM, Lizano M, Dueñas A, (2003), Reactivation of tumor Supresor genes by the cardiovascular drug hidralazine and procainide and their potencial use in cancer therapy, *Clinical Cancer Research*, Vol. 9, 1596-1603.
 - Seliger B, Cabrera T, Garrido F, Ferrone F, (2002), *Semin, Cancer Biol.*, Vol 12, 3-13.
 - Serrano A, Tanzarella S, Lionello I, Mendez R, Traversari C, Ruiz-Cabello F, Garrido F, (2001), Expression of HLA class I antigens and restoration of antigen-specific CTL response in melanoma cells following 5-aza-2'-deoxycytidine treatment, *Int. J. Cancer*, Vol. 94, 243-251.
 - Schwarz E, (1985), Structure and transcription of human papillomavirus type 18 and 16 sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* **314**, 111–114 (1985). Description of active HPV genes (E6/E7) in cervicalcancer cells and demonstration of specific HPV deletions after integration into host-cell DNA.
 - Schwartz S, (2000), Regulation of human papillomavirus late gene expression, *Ups J Med Sci*, Vol. 105, 171-192.
 - Seemuller E, Lupas A, Baumeister W, (1996), Autocatalytic processing of the 20S proteasome, *Nature*, Vol. 382, 468-471.
 - Seemuller E, Lupas A, Stock D, Lowe J, Huber R, Baummeister W, (1995), Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease, *Science*, Vol. 268, 579-582
 - Seliger B, Cabrera T, Garrido F, Ferrone F, (2002), *Semin, Cancer Biol.*, Vol 12, 3-13
 - Shah KV, Howley PM, (1996), Papillomaviruses. In: Fiels BN, Knipe DM, Howley PM, *Virology Philadelphia: Lipncott-Raven Publishers*, 2077-2109.

-
- Shi Huidong, Wei SH, (2003), Triple analysis of the cancer epigenome: an integrated microarray system for assessing gene expression, DNA methylation, and histone acetylation, *Cancer research*, Vol. 63, 2164-2171.
 - Shah KV, Howley PM, (1996), Papillomaviruses. In: Fiels BN, Knipe DM, Howley PM, *Virology Philadelphia: Lipncott-Raven Publishers*, 2077-2109.
 - Stanley MA, (2003), Progress in prophylactic and therapeutic vaccines for human papillomavirus infection, *Expert Rev, Vaccines* Vol, 2(3); 381-389
 - Takai N, Desmond JC, Kumagai T, Gui C, Said JW, Whittaker S, Miyakawa I, Koeffler HP, (2004), Histone deacetylase inhibitor have a profound antigrowth activity in endometrial cancer cells, *Clinical Cancer Research*, Vol. 10, 1141-1149.
 - Thomas M, Banks L, (1998) Inhibition of BAK-induced apoptosis by HPV-18 E6, *Oncogene* 17, 2943–2954.
 - Torroella M, Morsberger S, Carrillo A, Mohar A, Meneses A, Ibarra M, (1998), HPV prevalence among Mexican women with neoplastic and normal cervixes. *Gynecol Oncol*, Vol. 70, 115-120.
 - Townsend A, Bastin J, Gould K, Brownlee G, Andrew M, Coupar B, Boyle D, Chan S, Smith G, (1988), Defective presentation to class I-restricted cytotoxic T lymphocytes in vaccinia-infected cells is overcome by enhanced degradation of antigen, *J. Exp. Med*, Vol. 168: 1211-1224
 - Veldman T, Horikawa I, Barrett JC, Schlegel R, (2001), Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein, *J. Virol*, Vol. 75: 4467–4472.

-
- Virmani AK, Muller C, Rathi A, Zoechbauer-Mueller S, Mathis M, Gazdar AF, (2001), Aberrant Methylation during Cervical Carcinogenesis, *Clinical Cancer Research* Vol. 7, 584-589.
 - Walboomers JM, (1999), Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide, *J. Pathol*, 189:12–19
 - Wang X, Sapp M, Chistensen ND, Dilner J, (2005), Heparin-based ELISA reduces background reactivity in virus-like particle-based papillomavirus serology, *Journal of General Virology*, Vol. 86, 65-73.
 - Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R, (2004), *Molecular Biology of the Gene*, Fifth edition, Pearson Benjamin Cummings, U.S.A.
 - Werness BA, Levine AJ, Howley PM, (1990), Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* Vol. 248, 76–79.
 - Wenzel T, Baumeister W, (1995), Conformational constraints in protein degradation by the 20S proteasome, *Nat. Struct. Biol*, Vol, 2: 199-204
 - Workman, JL, Kingston, RE, (1998), Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu. Biochem*, Vol. 67, 545-579.
 - Yamada T, Manos M, Peto M, (1997), Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspectives, *J. Virol*, 71: 2463-2472
 - Zambrano P, Segura B, Perez E, Cetina L, Revilla A, Taja A, Chavez A, Angeles E, Cabrera G, Sandoval K, Trejo C, Chanona J, Duenas A, (2005), A phase I study of hydralazine to demethylate and reactivate the expression of tumor suppressor genes, *BMC Cancer*. 2005; Vol. 5, 44.

-
- Zerfass K, (1995), Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. *J. Virol*, Vol. 69, 6389–6399.
 - Zerfass K, (1996), Inactivation of the CDK inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein, *Oncogen*. Vol. 13, 2323–2330.
 - Zur HH, (1996) Papillomavirus infections: a major cause of human cancers. *Biochem. Biophys. Acta* 1288, F55–F78.