

205
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"COMPARACION DE PATRONES PROTEICOS DE
MEMBRANA CITOPLASMATICA DE CELULAS
EPITELIALES DE CARCINOMA CERVICO-UTERINO
EPIDERMIOIDE INVASOR Y DE CELULAS
EPITELIALES NORMALES DE CERVIX UTERINO"

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
CATALINA TREJO BECERRIL

MEXICO, D. F.

FALLA DE ORIGEN

1991.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

I N D I C E

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	3
3. HIPOTESIS	29
4. OBJETIVOS	29
5. MATERIAL	30
6. METODO	31
7. RESULTADOS	
7.1. Observación Microscópica de los Tejidos de Cérvix Uterino.	38
7.2. Actividad Enzimática de las Fracciones Ce- lulares Aisladas.	43
7.3. Observación Morfológica de las Fracciones Ricas en Membrana Citoplasmática Aislada.	45
7.4. Separación de Proteínas Membranales por Electroforesis.	
7.4.1. Análisis de las Proteínas Membrana- les de las Células Epiteliales de Tejido Humano de Cérvix Uterino Nor- mal (Cu.N.).	47
7.4.2. Subgrupo I del Tejido de Cáncer Cé- vico Uterino (Ca.Cu.) Invasor.	54
7.4.3. Subgrupo II del Tejido de Ca.Cu. In- vasor.	60
7.4.4. Subgrupo III del Tejido de Ca.Cu. - Invasor.	66
7.4.5. Análisis Comparativo de las Protei- nas Membranales de Células Epite- liales de cada uno de los Subgrupos del Tejido de Ca.Cu. Invasor.	72

7.4.6. Análisis Comparativo de las Proteínas Membranales de Células Epiteliales de Tejido de C.M. contra cada uno de los Subgrupos del Tejido de C.C. Invasor.

79

8. DISCUSION	87
9. CONCLUSIONES	105
10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	107
11. APENDICE	
11.1. Reactivos	118
11.2. Soluciones	120
11.3. Equipo	128
11.4. Técnicas	129

1. RESUMEN.

El cáncer es una enfermedad, cuyo origen es multifactorial en la que se modifica la célula tanto genotípica como fenotípicamente. Dentro de las modificaciones fenotípicas que presenta la célula transformada o cancerosa están las de su membrana citoplasmática; que sufre alteraciones a nivel de sus elementos constitutivos y de sus actividades funcionales. Debido a que las proteínas, constituyentes fundamentales de la membrana celular, están alteradas en las células cancerosas o neoplásicas es interesante hacer un estudio comparativo de éstas macromoléculas en células normales y cancerosas, con el propósito de conocer el tipo de modificaciones que presentan; y de ser posible su repercusión en la actividad de la membrana de las células malignas.

El Objetivo de este trabajo, es determinar el patrón proteico de la membrana citoplasmática de células epiteliales de tejido en fresco humano de Cérnix Uterino tanto Normal (Cu. N.) como Canceroso (Ca. Cu.); y establecer las semejanzas y diferencias que tienen entre sí. Para tal efecto se utilizó la técnica de electroforesis unidimensional en geles cilíndricos de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS) al 7.5%. Se hizo un análisis comparativo de los resultados y se observó lo siguiente:

- 1) El contenido proteico de la membrana del tejido de Cu. N., fue característico y constante en los 29 casos analizados; es decir, existe un Patrón Proteico altamente reproducible. Contrariamente, en los 50 casos analizados de Ca. Cu., invasor no hubo un patrón proteico único que fuese característico para todas las biopsias o muestras; ya que se encontraron 3 distintos patrones proteicos y uno de ellos fue el predominante.

- 2) Los 3 patrones protéicos derivados del tejido de *Cu. Cu.* mostraron alteraciones con respecto al patrón de *Cu. N.*, en proteínas de alto y bajo peso molecular (PM). Básicamente se encontró: pérdida de bandas protéicas de alto PM y un aumento en el número de bandas protéicas de bajo PM. Estas observaciones fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$).
- 3) Otra observación, fue que en los 3 patrones protéicos de *Cu. Cu.*, hubo una menor concentración de proteína con respecto al patrón protéico de *Cu. N.*. Este aspecto fue muy evidente en una banda protéica con un PM de 63 kDaltons (kD), la cual tiene una concentración de proteína 10 veces mayor en el patrón protéico de *Cu. N.*, que el que muestran los 3 patrones de *Cu. Cu.*. Estos resultados fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

2. INTRODUCCION.

El conocimiento de la célula se inició hace poco más de 300 años; desde entonces hasta las últimas décadas, los estudios sobre las propiedades de la misma, se han desarrollado enormemente, englobando para ello diversos aspectos; como los fisiológicos, anatómicos, morfológicos, moleculares, bioquímicos, etc., aspectos que conllevarán, finalmente, al conocimiento biológico de la célula en su totalidad. Actualmente se conoce que la célula eucariótica, específicamente, presenta una estructura interna bastante compleja ya que consta de diversos organelos que se encuentran separados por membranas; tales como mitocondrias, núcleo, vacuolas, lisosomas, retículo endoplásmico (rugoso y liso), aparato de Golgi y microcuerpos (peroxisomas y glioxisomas) (1 y 2).

Las membranas, en particular, son estructuras celulares bastante activas con una complejidad e importancia extraordinaria, aunque por mucho tiempo el estudio de las mismas permaneció sin avance debido a que no se le consideraba un organelo de gran importancia dentro del complejo celular; además de que las metodologías de las que se disponían en esos momentos, no eran las más adecuadas para llevar a cabo un estudio profundo de la membrana, tanto a nivel estructural como a nivel funcional. Sin embargo, en los últimos 20 años se han realizado grandes adelantos en las investigaciones sobre este organelo celular (3), lo que ha permitido conocerlo un poco más de tal forma, que en la actualidad se sabe que todos los sistemas aislados o individualizados por membrana (citoplasmático, nuclear, mitocondrial, etc.), de los que constan las células "son una asociación lipo-protéica, en la cual los componentes se mantienen juntos en una delgada lámi-

mina por medio de enlaces no covalentes" (2). Concepto que se derivó del actual Modelo de la estructura membranal: "El Modelo del Mosaico Fluido" (4).

Estructuralmente, uno de los componentes mayoritarios de la membrana celular son las proteínas (1, 5 y 6) las cuales, además de ser algunas de ellas de tipo estructural, son las responsables de la mayoría de las propiedades funcionales activas de la membrana así como de las de la célula en general. El análisis de estas macromoléculas membranales, ha sido en los últimos años, de gran trascendencia en el conocimiento de tan fundamental organelo celular (7, 8 y 9). La caracterización de las proteínas membranales, requiere de su extracción de este organelo; y una vez que esta población de macromoléculas se separa en sus diversos tipos, se hace notable de inmediato, su variedad y se presenta la oportunidad de estudiar cada proteína sin interferencia de las demás (10, 11, 12 y 13).

La Electroforesis en general y la de Poliacrilamida-Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) en particular, es un método de fraccionamiento y/o caracterización de macromoléculas como las proteínas (14, 15, 16 y 17); esta técnica se basa en las propiedades de carga eléctrica, peso y tamaño de las macromoléculas que se van a separar. Así mismo, el método electroforético es una herramienta indispensable en la resolución de algunos problemas clínicos y, sobre todo, bioquímicos. En la clínica, la técnica de electroforesis se utiliza para establecer las alteraciones que puede haber en una imagen electroforética de cierto tipo de proteínas de una lesión específica del organismo (en éste caso humano); comparada con la imagen electroforética de las mismas proteínas, pero las cuales no presentan ninguna o ningún tipo de alteración, es decir, son normales. Este tipo de imágenes electroforéticas de una misma muestra, ya sea normal o patológica, que se repite constantemente de una electroforesis a otra, se dice que son imágenes electroforéticas "patrones".

Por otra parte, la separación de proteínas por electroforesis, es utilizada, en los laboratorios de investigación que se relacionen con aspectos bioquímicos. La electroforesis, es una de las herramientas que se usan en el estudio de macromoléculas; desde un grupo amplio de proteínas hasta la caracterización de una sola de ellas; tanto en modelos experimentales como en tejidos humanos. También se analizan patrones electroforéticos de proteínas de diversos organelos celulares, que suelen ser característicos de un organelo en particular y de un organismo específico (18 y 19). Por ejemplo, se han hecho los patrones electroforéticos en gel, de la membrana citoplasmática (2) de eritrocito humano, de membrana fotorreceptora de células cilíndricas retinianas y de la membrana del retículo sarcoplásmico de músculo. Se compararon los patrones obtenidos y se observó que estas tres membranas, poseen una composición protéica muy diferente. Además, se visualizó que hay diferencia en el número de tipos de cadenas polipeptídicas y en la distribución de sus pesos moleculares. Este tipo de análisis bioquímicos además de otros de distinta índole, como los fisiológicos, morfológicos, moleculares, etc.; han permitido concluir que la complejidad e importancia de la membrana celular, radica no sólo en su sistema estructural sino además en la diversidad de funciones que lleva a cabo; mismas que se mencionan a continuación: transporta diferentes moléculas polares (micromoléculas y macromoléculas), interviene en la interacción entre célula y célula (uniones intercelulares), ayuda en el reconocimiento entre célula y célula, proporciona protección mecánica, interviene en la comunicación celular; participa en el movimiento celular, proporciona fuerza mecánica, participa en la secreción celular, actúa como aislante eléctrico, conduce impulsos nerviosos, etc. (1, 2, 4, 5, 6, 7, 20, 21, 22, 23, 24).

Todas las funciones de la membrana citoplasmática antes mencionadas, son de suma importancia para la célula; ya que influyen de manera decisiva y determinante en el buen desarrollo de las actividades de ésta, repercutiendo en el teji-

do, órgano, sistema y por lo tanto en todo el individuo. Por ello, cuando la estructura de la membrana citoplasmática se ve afectada por algún tipo de factor (mitógenos, virales etc.), conocido o desconocido, también se modifican sus funciones y, por ende el comportamiento de la célula en su totalidad. Un ejemplo del comportamiento celular alterado, a consecuencia, entre otros aspectos, de las modificaciones que presenta la membrana citoplasmática; es el que tiene una célula cuando se ha transformado en maligna o cancerosa (4, 20, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 y 33). El cáncer es una enfermedad que implica modificaciones de la célula a nivel genotípico y consecuentemente a nivel del fenotipo celular; estos cambios pueden ser heredables y le confieren a la célula las características de proliferar de una manera descontrolada, invadir tejido normal y metastatizar en sitios distantes (28 y 34). En la actualidad se considera que el desarrollo de tumores malignos es el resultado de múltiples procesos complejos así como de una serie de diversos fenómenos causales conocidos y desconocidos; por lo que se estima que el Cáncer es de origen multifactorial (34 y 35).

Los desórdenes que presentan las células neoplásicas comparadas con las células normales son numerosos y muy variables (Tabla 4 y Fig. 1), pero la membrana citoplasmática es el organelo celular en el que se han observado alteraciones fundamentales y esenciales tanto para los procesos biológicos que caracterizan a una célula transformada (la invasión y la metastasis); así como para explicar la inmunobiología de los tumores (26, 27, 29 y 36).

Las proteínas membranales, tanto las simples como las conjugadas, son de los componentes de la membrana que presentan diversas modificaciones en una célula transformada (2, 25 y 32). Además las proteínas alteradas pueden ser tanto estructurales como funcionales; por ejemplo, pueden ser enzimas, que catalizan procesos celulares importantes (30). La alteración en éstas enzimas, puede afectar sus características cinéticas y/o su respuesta a los metabolitos, lo cual repercute en el metabolismo celular.

TABLA A. CAMBIOS QUE PRESENTAN LAS CELULAS EUKARIOTICAS MALIGNAS.

Propiedades Alteradas	E f e c t o	Referencias
1) Alteraciones a Nivel Nuclear.		
* Cambios cromosómicos:	<ul style="list-style-type: none"> + Rompimiento + Duplicación/Pérdida + Interacciones membrana/matriz + Regiones de coloración homogénea + Complejos transcripcionales + Complejos de replicación + Intercambio de cromátidas hermanas. 	<ul style="list-style-type: none"> + Karp (2) + Nicolson (34) + Sandberg (37)
* Cambios en el ADN:	<ul style="list-style-type: none"> + Mutaciones + Translocaciones + Deleciones + Amplificaciones + Oncogenes/Virus + Genes supresores + Errores de reparación del ADN + Errores de replicación del ADN + Elementos transposables. 	<ul style="list-style-type: none"> + Karp (2) + Nicolson (34) + Sandberg (37)
2) Alteraciones a Nivel Citoplásmico.		
* Cambios en el Citoesqueleto:	<ul style="list-style-type: none"> - Organización - Reducción + Interacciones membranales + Morfología de la célula. 	<ul style="list-style-type: none"> + Karp (2) + Nicolson (34) + Vora (38)

continúa.....

Propiedades Alteradas	E f e c t o	Referencias
<ul style="list-style-type: none"> * Cambios en el Citosol: 	<ul style="list-style-type: none"> + Incremento del metabolismo celular (glucólisis anormal) + Segundos mensajeros + Proteínas-cinasas + Ión/Cofactor. 	<ul style="list-style-type: none"> + Karp (2) + Nicolson (34) + Vora (38)
3) Alteraciones a Nivel de Membrana Citoplasmática.		
<ul style="list-style-type: none"> * Cambios en la carga de la superficie membranar y en la topografía de los grupos ionogénicos: 		<ul style="list-style-type: none"> + Gallez (26 y 27) - Karp (2) + Nicolson (25) + Nicolson (34) + Zucker (39)
<ul style="list-style-type: none"> * Cambios en la organización estructural de la membrana plasmática: 	<ul style="list-style-type: none"> - Reducción de los microfilamentos asociados a la membrana y de otros elementos del citoesqueleto + Incremento de la movilidad lateral de las proteínas intrínsecas. 	
<ul style="list-style-type: none"> * Cambios en el comportamiento celular influenciado por la organización de la superficie de la célula: 	<ul style="list-style-type: none"> + Pérdida del control de la división por inhibición por contacto + Pérdida del movimiento por inhibición por contacto + Pérdida de la dependencia de anclaje + Pérdida de la adhesividad a los sustratos (<i>IN VITRO</i>) + Carencia de uniones en hendidura entre célula y célula. 	
<ul style="list-style-type: none"> * Cambios en la composición lipídica y en su fluidez: 	<ul style="list-style-type: none"> + Alteración en la microviscosidad + Incremento en la movilidad de los lípidos y de las proteínas intrínsecas. 	

continúa

Propiedades Alteradas	E f e c t o	Referencias
<ul style="list-style-type: none"> • Cambios en las enzimas asociadas a membrana: 	<ul style="list-style-type: none"> - Reducción en la actividad de la adretilciclasa - Pérdida de la dependencia por densidad y reducción de la actividad enzimática - Aumento en la actividad de enzimas proteolíticas secretadas al medio intercelular. 	<ul style="list-style-type: none"> + Gallez (26 y 27) + Karp (2) + Nicolson (25) + Nicolson (34) + Zucker (39)
<ul style="list-style-type: none"> • Cambios en la actividad de transporte de la membrana: 	<ul style="list-style-type: none"> - Aumento del transporte de azúcares y aminoácidos - Secreción de enzimas intracelulares; así como de antígenos y otras glicoproteínas al medio circundante - (factores bloqueadores). 	
<ul style="list-style-type: none"> • Cambios en las glicoproteínas, glicolípidos y mucopolisacáridos membranales: 	<ul style="list-style-type: none"> - Diversas modificaciones en las actividades y reactividades con anticuerpos - Aparición de nuevas proteínas (antígenos asociados a tumores) - Marcada reducción de los receptores para la fibronectina. 	

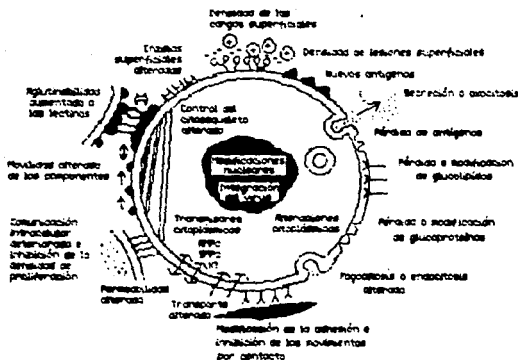


FIGURA 1.

Diagrama de las diferentes alteraciones que presenta la superficie celular, después de la transformación neoplásica. (Tomado de Nicolson, G.L., 40).

Uno de los cambios más predominantes de las proteínas de membrana en las células neoplásicas, es el decremento o pérdida completa o parcial de algunas de estas moléculas (18, 25, 30, 41 y 42) (Tabla A). La pérdida de proteínas conlleva a diversas consecuencias para la membrana celular y, obviamente,

para la célula en general (2 y 25); por ejemplo que las glicoproteínas no se asocien en número suficiente a la membrana citoplasmática; además es posible que algunas de estas moléculas no se orienten correctamente en la superficie celular; y pueden existir cambios conformacionales de las proteínas integrales o de las glicoproteínas restantes.

De manera similar, la secreción de proteasas o de glicosidasas al medio circundante por parte de las propias células transformadas (25), también implica ciertas anomalías para la membrana y por consiguiente para la célula; así se puede observar pérdida de la regulación del crecimiento; alteraciones en la habilidad de las lectinas para aglutinarse, en la movilidad de los componentes de la superficie celular, en el transporte de azúcar y fosfato, en la reactividad con anticuerpos y cambios conformacionales en proteínas integrales o en glicoproteínas.

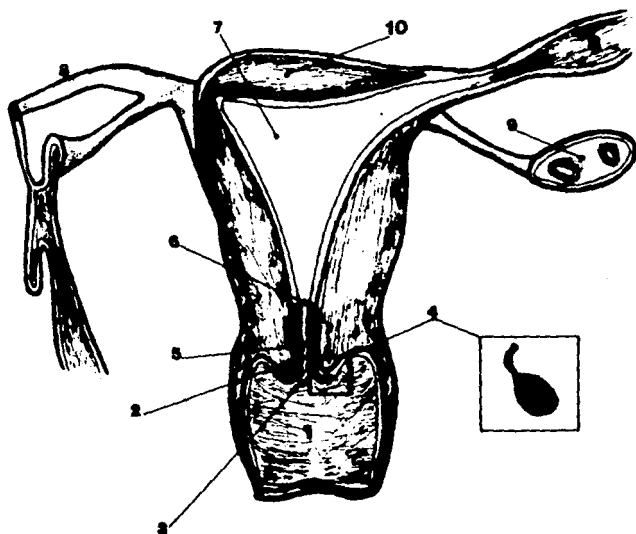
La capacidad que tiene una célula neoplásica de subsistir a pesar del sistema inmune con el que cuenta el individuo al que está afectando, se ha atribuido a su composición genética (34), que al parecer es muy inestable. Esto implica, que las células pueden tener en su genotipo, gran cantidad de alteraciones espontáneas cuyo resultado final podría ser una gran variabilidad en su fenotipo, propiedades de superficie, composición cromosómica, resistencia a los fármacos, dependencia a las hormonas y potencial para metastatizar, entre otros aspectos (34).

Debido a que las células cancerosas presentan una membrana citoplasmática con características muy peculiares distintas a las de las células normales, sería interesante hacer una caracterización de las proteínas de la membrana citoplasmática de células neoplásicas y compararlas con su contraparte normal. En el caso del presente trabajo de investigación, las células malignas que se seleccionaron para tal efecto, fueron las células epiteliales del Cáncer Cérvico Uterino (Ca.Cu.) Epidermoide Invasor Humano y las células normales fueron las epiteliales de Cérvix Uterino Normal Humano (Cu.N.). A con-

tinuación se describen algunas de las características más sobresalientes (anatómicas, morfológicas, biológicas, epidemiológicas y etiológicas), de éste tipo de neoplasia.

El cérvix uterino junto con el cuerpo uterino, constituyen el aparato genital femenino: el Utero (43). El cérvix (portio o ectocérvix), en particular, tiene una forma tubular y presenta 2 orificios unidos por un canal endocervical. El orificio externo o exocérvix, se comunica con la vagina y el interno o endocérvix comunica con el cuerpo uterino (Fig. 2).

El cérvix uterino normalmente presenta un patrón histológico característico. El epitelio que recubre la vagina y el exocérvix es de tipo plano estratificado no queratinizante y prácticamente está desprovisto de glándulas (44). Este epitelio consta de cinco capas celulares (Fig. 3) (43): capa germinal o estrato cilíndrico; estrato espinoso profundo o capa basal; estrato espinoso superficial o capa intermedia; zona intraepitelial de Dierks y capa superficial o capa funcional.



FIGURA

Esquema del Aparato Genital Femenino. 1) Vagina; 2) Portio o Ectocervix; 3) Orificio Externo o Exocervix; 4) Zona Escamocolumnar; 5) Canal Cervical o Endocervical; 6) Orificio Interno o Endocervix; 7) Cavidad Endometrial; 8) Trompas de Falopio; 9) Ovario; 10) Cuerpo Uterino. (Tomado de Fentanes, T.E., 43).

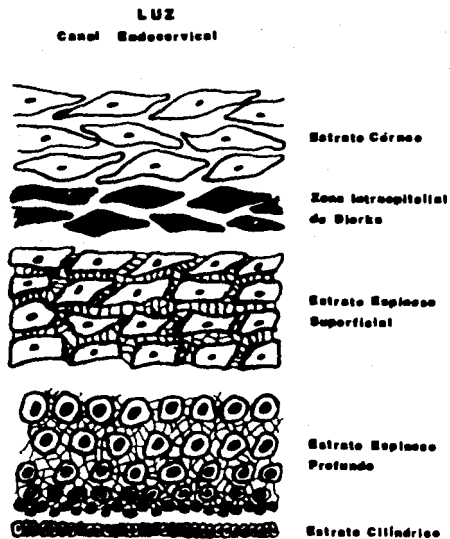


FIGURA 3.

Esquema de las Capas Celulares del Epitelio Endocervical. (Tomado de Fentanes, T.F., 43).

El canal endocervical, está constituido por un epitelio de tipo cilíndrico productor de moco, llamado Epitelio Endocervical. La zona donde se une el epitelio plano estratificado con el epitelio endocervical, se le denomina Zona Escamocolumnar del Endocérvix (Fig. 2) (43). Y es el sitio en donde, generalmente, se inician los carcinomas del cérvix. En un corte histológico, la zona escamocolumnar del endocérvix, presenta un epitelio compuesto por células columnares. En el endocérvix, estas células tienen una posición perpendicular a la membrana basal con su núcleo desplazado hacia la base. Algunas de las células presentan cilios y otras se ven cargadas de moco.

La presencia de una neoplasia en cualquier tejido, pero en éste caso específico en el cérvix uterino, implica una modificación en el patrón histológico que caracteriza al tejido normal. Sin embargo, este cambio no sucede de manera drástica ni espontáneamente; sino que es paulatino y va sucediendo conforme va avanzando la enfermedad. Este hecho se ha podido establecer, estudiando el comportamiento de las lesiones malignas del cérvix uterino, que es una de las neoplasias humanas más conocidas ya que es de fácil acceso para su detección.

El Ca.Cu. usualmente se origina en la unión escamocolumnar del endocérvix; y, comúnmente, es precedida por lesiones precancerosas (displasias) y por carcinomas *IN SITU* (45). Se podría decir, que esta secuencia "evolutiva" de la enfermedad, es la historia natural del Ca.Cu.; sin embargo, la progresión de la enfermedad, puede tener variaciones, como se ilustra en el Diagrama I (44), que señala las diversas posibilidades que tiene un epitelio normal del cérvix uterino de transformarse; de tal forma que el cérvix que muestra pequeñas anomalías puede tornarse displásico o directamente modificarse a carcinoma *IN SITU* o a carcinoma invasor. Puede suceder que una lesión displásica progrese a carcinoma *IN SITU* y luego a carcinoma invasor; pero la displasia o el carcinoma *IN SITU*, pueden retornar, antes de que la invasión

ocurra, a ser un epitelio "normal". Es probable también, que la displasia pueda progresar, directamente hacia un carcinoma invasor pasando por la fase de carcinoma *IN SITU*. O bien de displasia a carcinoma invasor directamente (44).



DIAGRAMA 1.

Secuencia evolutiva del Carcinoma Cervicouterino Invasor Humano. (Tomado de Langley, F.A., 44).

La relación secuencial anteriormente descrita, está soportada por varias evidencias (44); aunque no del todo concluyentes. La secuencia evolutiva más común del Ca.Cu., se inicia con un precursor que puede ser el condiloma (46); proseguir hacia una displasia que a su vez progresa a un carcinoma *IN SITU*; de ahí a lesiones microinvasoras hasta llegar a las francamente invasoras (45). La evolución de éste tumor es muy lenta en sus fases iniciales dependiendo del tipo histopatológico de que se trate; así, en las 3 etapas iniciales el

tiempo promedio que transcurre de una etapa a otra es de aproximadamente 5 años; éste lapso se acorta en las fases siguientes. Esto dá un período de casi 15 años para su detección y manejo o hasta la total cura de la lesión cuando se detecta tempranamente (35).

Cada una de las fases por las que atraviesa un epitelio normal del cérvix uterino, para transformarse en maligno (displasia, carcinoma *IN SITU* y carcinomas invasores), presentan características muy particulares que permiten diferenciarlas entre sí (43). Estas fases o etapas, se pueden dividir en dos grupos: aquellas que se les considera como pre-invasoras o pre-malignas; y aquellas, que son francamente malignas (44). Dentro del primer grupo, se encuentran las displasias y el carcinoma *IN SITU*; mientras que los carcinomas invasores, son del segundo grupo. En la actualidad las lesiones preinvasoras del cérvix uterino, son descritas por dos diferentes sistemas de clasificación; ambos ampliamente aceptados y muy usados (35). El primer sistema de clasificación divide a las lesiones premalignas en displasias (leves, moderadas y severas), y carcinomas *IN SITU*. La segunda clasificación las divide en tres, con el término de neoplasia cervical intraepitelial (NIC-1, NIC-2 y NIC-3). En el presente trabajo se usará la primera clasificación (displasia y carcinoma *IN SITU*).

Generalmente, las displasias y los carcinomas *IN SITU*, no presentan anomalías macroscópicas; por lo que su diagnóstico, se hace mediante citología exfoliativa y colposcopia (35). Las lesiones visibles o con anomalías macroscópicas, pueden ser divididas en dos: endofíticas y exofíticas (35 y 43).

Las neoplasias del cérvix uterino en sus etapas iniciales (displasias leves), presentan cambios morfológicos, a nivel microscópico, mínimo. Conforme progresa la enfermedad las modificaciones se van agrandando; el epitelio se va constituyendo de células malignas (en el carcinoma *IN SITU*), que al proliferar atraviesan todas las capas epiteliales y entran en

contacto con el estroma (carcinoma invasor). En ésta etapa, se presentan los mayores cambios a nivel microscópico (35).

En la *Tabla B* se presenta un resumen de las alteraciones celulares a nivel microscópico (morfológicas y fisiológicas), del Ca.Cu. Invasor (35 y 43). Así mismo, en la *Tabla C* (35 y 43), se presentan las variedades histopatológicas de éste carcinoma.

El porcentaje de sobrevida de las pacientes que presentan Ca. Cu. varía de acuerdo al tipo y clasificación histopatológica que presenten; por ejemplo, las pacientes con Ca.Cu. Epidermoide de Células Grandes sin Queratina, sobreviven en un 68.3%; las de Ca.Cu. Epidermoide de Células Grandes con Queratina, un 41.7%; y las de Ca.Cu. Epidermoide de Células Pequeñas sin Queratina, sólo un 20%. La sobrevida en las demás clases histopatológicas, es muy baja (35).

TABLA B. ALTERACIONES MORFOLOGICAS Y FISIOLOGICAS QUE PRESENTA EL CANCER CERVICO UTERINO.

ORGANELO	A L T E R A C I O N
NUCLEO	<ul style="list-style-type: none"> ■ Gran variedad en el tamaño nuclear, aún en células con el mismo grado de diferenciación (anisonucleosis); ■ Incremento en el contenido de ADN; ■ Mitosis anormales; ■ Variaciones en el número y estructura cromosómica; ■ Anormalidades en la cromatina sexual; ■ Protusión del núcleo; ■ Polimorfismo nuclear; ■ Cambios en el patrón cromático del núcleo; la cromatina se agrupa en gruesos grumos densos hiper-cromáticos y empujan el líquido nuclear dejando áreas claras anormales de paracromatina; ■ Irregularidades en la membrana nuclear. Presenta dobleces, plegamientos y variaciones en el grosor, incluso en una misma célula; ■ Multinucleación; ■ Cambios en la relación Núcleo/Citoplasma.
CITOPLASMA	<ul style="list-style-type: none"> ■ Pleomorfismo citoplásmico. Células con formas caprichosas. Frecuentemente los límites del citoplasma son imprecisos; ■ Vacuolización; ■ Variaciones en su capacidad de decoloración; ■ Alto nivel de glucólisis; ■ Incremento en los niveles de la isoenzima Lactato deshidrogenasa Láctica-5; ■ Mucógeno generalmente ausente.

Tomado de De Vita, V.T. (33) y Fentanes, T.E. (43).

TABLA C. TIPOS HISTOPATOLÓGICOS DE CÁNCER CERVICO UTERINO INVASOR.

Clasificación Histopatológica	% De Prevalencia	Tipo Histopatológico	Grado Histopatológico
<u>Carcinoma Escleromóide o de células escamosas:</u> (se compone principalmente de células epiteliales).	80	<ul style="list-style-type: none"> * Células grandes sin queratina * Células grandes con queratina * Células pequeñas sin queratina. 	<ul style="list-style-type: none"> * Bien diferenciado * Moderadamente diferenciado * Pobremente diferenciado.
<u>Adenocarcinoma:</u> (se compone de células glandulares y proviene de las células columnares del endométrix).	16 - 34	- - - - -	<ul style="list-style-type: none"> * Bien diferenciado * Moderadamente diferenciado * Pobremente diferenciado.
<u>Carcinoma Adenoescamoso:</u> (es una mezcla de células de carcinoma escleromóide y de células de adenocarcinoma).	2 - 5	- - - - -	<ul style="list-style-type: none"> * Pobremente diferenciado.
<u>Carcinoma de Células Claras.</u>	muy poca	- - - - -	<ul style="list-style-type: none"> * Pobremente diferenciado.
<u>Carcinoma de Células Vidriosas.</u>	muy poca	- - - - -	<ul style="list-style-type: none"> * Pobremente diferenciado.
<u>Carcinoma Adenoide Cístico.</u>	muy poca	- - - - -	<ul style="list-style-type: none"> * Pobremente diferenciado.
<u>Carcinoma Mucoscleromóide.</u>	muy poca	- - - - -	<ul style="list-style-type: none"> * Pobremente diferenciado.

Desde el punto de vista epidemiológico, el Ca.Cu. junto con el cáncer de mama, son de las enfermedades neoplásicas más comunes en mujeres en edad reproductiva (entre los 30 a 55 años de edad). La frecuencia mundial reportada del Ca. Cu. es del 15%; siendo la tercera más frecuente de las neoplasias genitales femeninas (35, 46).

En 1988 a nivel mundial, se diagnosticaron 12,900 casos de Ca.Cu. invasor; pero no se incluyeron más de 50,000 casos de Ca.Cu. *IN SITU*, así como casos de lesiones preinvasoras del cérvix -displasias- (35).

Particularizando, según datos de la OMS (46), en países del primer mundo, se presenta un 20% de casos de Ca.Cu.; mientras que en países del tercer mundo, el porcentaje se eleva a un 80%.

Específicamente, en nuestro país, el Ca.Cu. es la neoplasia de mayor frecuencia; de tal forma, que se le ha considerado como un problema de salud pública. Tan sólo en el año de 1984, según informes del Registro Nacional del Cáncer de la Secretaría de Salud, se presentaron 3,364 casos nuevos de Ca.Cu. (47). Ahora bien, de las neoplasias atendidas en el Instituto Nacional de Cancerología en 1983 (de acuerdo con el Registro Nacional de Tumores); el 43.4% correspondieron a Ca.Cu. En el 76% de los casos las pacientes presentaron lesiones en etapas clínicas II, III y IV; es decir, la mayoría de las enfermas que acuden al Instituto Nacional de Cancerología, llegan en estadios avanzados de la enfermedad (47).

Recientemente, se ha considerado la posibilidad de que ciertos agentes virales pueden ser factores etiológicos en el desarrollo del Ca.Cu. (35); como es el caso del *Herpes Virus Tipo 2* y el *Papiloma Virus Humano*. De éste último hay varios tipos pero los que se les ha asociado con lesiones del cérvix uterino son: el 6 y 11, con enfermedades benignas del cérvix; mientras que el 16, 18, 31 y 33-35; se encuentran muy comúnmente en neoplasias intraepiteliales y en carcinomas francamente invasoras del cérvix uterino (46). Además, se

ha sugerido la participación de distintos factores de riesgo, y diversas causas que se asocian con el desarrollo del Ca.Cu. Dentro de los factores de riesgo, se encuentran aspectos tales como (35): nivel socioeconómico bajo; inicio a temprana edad de una vida sexual activa; múltiples parejas sexuales; primer embarazo a temprana edad; múltiples embarazos y una menarca temprana.

En contraste, el Ca.Cu. es poco frecuente en mujeres nulíparas, con una vida sexual inactiva o en mujeres con una sola pareja sexual y pocos hijos.

Otros factores que se encuentran implicados en el desarrollo del Ca.Cu. son los niveles de Receptores Hormonales, para Estradiol (E_2) y Progesterona (Pg) (49, 50 y 51). Normalmente, el cérvix uterino, es un tejido que responde a la acción hormonal y muestra un contenido de receptores; tanto para E_2 como para Pg (52, 53). En Ca.Cu. se ha sugerido que el contenido de receptores hormonales tiene una clara correlación con la sobrevida de las pacientes; así, las pacientes cuyas células tumorales tienen receptores hormonales positivos, presentan una mayor sobrevida que aquellas pacientes cuyas células tumorales muestran receptores hormonales negativos.

En el desarrollo del Ca.Cu. además de la influencia hormonal, se ha reportado la activación y/o expresión de ciertos genes denominados Proto-oncogenes; por ejemplo el c-myc y c-ras (54, 55 y 58). Recientemente también se ha considerado que los Factores de Crecimiento y sus Receptores están involucrados (57, 58 y 59), específicamente, los niveles (o número) de receptores para el Factor de Crecimiento Epidérmico; que han sido asociados con la agresividad biológica de los Carcinomas del Cérvix Uterino.

A pesar que en los últimos tiempos, la caracterización de la membrana citoplasmática de células transformadas comparada con su contraparte normal, ha tenido un gran auge con el advenimiento de técnicas sofisticadas para su análisis más completo y profundo, hasta el momento todavía hay muchos as-

pectos sobre tal organelo (de una célula normal y sobre todo de una neoplásica), a nivel funcional, morfológico y estructural que se desconocen. Las investigaciones que se han llevado a cabo para tal efecto, han sido extensas y diversas; y se han hecho tanto *IN VITRO* como *IN VIVO*. Por ejemplo, se han realizado estudios comparando células cultivadas (de rata, ratón, pollo o hamster), transformadas viralmente contra aquellas no transformadas (31, 32, 33, 60 y 61); en ellos se describen las alteraciones específicas de algunas proteínas de la membrana citoplasmática principalmente las de tipo superficial.

Chatterjee y col. (62) reportó un estudio bioquímico comparativo *IN VIVO*, de la membrana plasmática de tumores mamarios de rata con diferente capacidad metastásica y encontró diferencias sustanciales.

También han sido múltiples los estudios de la membrana plasmática de células epiteliales en cultivo, de hígado y hepatoma de rata y ratón (35, 41, 63, 64 y 65). En ellos se ha examinado tanto la composición química y la actividad enzimática de las membranas, así como su patrón de proteínas superficiales y se han encontrado diferencias entre una célula normal y una neoplásica.

Hogg (42) y Bannikov y col. (18), trabajaron líneas celulares derivadas de tumores de rata o ratón, comparando las proteínas de membrana de células transformadas y normales. Para ello utilizaron la técnica de Electroforesis en Gelas de Poliacrilamida-SDS. Además, previamente, las membranas fueron tratadas, para un análisis electroforético más fino, marcándolas con una onzima iodínada: Lactoperoxidasa- I^{125} , la cual se une de una manera específica, a aquellas proteínas superficiales de membrana con residuos de tirosina. Ellos encontraron que el bandeo protéico de las membranas de las células transformadas, fue esencialmente similar al de las células normales; con la excepción de la ausencia o el incremento en la intensidad de una o varias bandas protéicas.

Las investigaciones en general de la membrana plasmática de tumores humanos y en particular de sus componentes protéicos, se han retrasado debido principalmente a la imposibilidad de obtener continuamente el material tumoral suficiente y adecuado (66). La mayoría de los reportes en los que se analiza la membrana citoplasmática de tumores humanos, lo hacen a partir ya sea de líneas celulares establecidas derivadas de una determinada neoplasia humana o bien, transplantando el tumor en un sistema animal adecuado (por ejemplo, en ratones atómicos). Muy pocos son los trabajos realizados, en los que se estudia la membrana plasmática de tumores en fresco.

Knowles y col. (66), purificó la membrana plasmática de 5 tumores humanos transplantados en ratón atómico BALB/nu con el propósito de hacer una caracterización morfológica, funcional y estructural. Dicho autor estudio un astrocitoma grado IV, un carcinoma de células avieniformes y 3 melanomas, encontrando que a nivel funcional, la actividad enzimática específica de las enzimas que analizó (ATPasa-Mg²⁺, 5'-Nucleotidasa, Citocromo C reductasa-NADH, Glucosidrolasa-NAD⁺ y Fosfatasa ácida), varía en cada uno de los tumores individuales, y aún en los tumores del mismo tipo. El análisis de los patrones electroforéticos en geles de poliacrilamida-SDS de las fracciones de membrana citoplasmática de los 5 tumores, mostró una composición protéica membranar muy compleja, encontrándose más de 40 bandas protéicas discernibles. Además hubo diferencias notables entre los 5 tumores estudiados. Sin embargo, es importante mencionar que en éste trabajo se enfatiza que no se sabe si las resiembras en el ratón, puedan afectar o alterar la composición bioquímica de las células tumorales, aunque se vió una notable reproducibilidad de los ensayos realizados.

Por su parte Rogan y col. (67), analizó mediante electroforesis en geles planos de poliacrilamida-SDS en gradiente, las proteínas de membrana marcadas con Metionina (³⁵S), de 6 líneas celulares de linfoma humano con el objeto de identificar

diferencias moleculares entre esos tumores. En primera instancia se observaron patrones electroforéticos de al menos 100 bandas proteicas membranales por línea celular; dichos patrones fueron altamente complejos pero reproducibles y además, únicos para cada tumor, por lo que se sugiere que pueden ser "huellas dactilares" de los tumores. Al analizar los patrones proteicos se vió que presentan diversas proteínas, unas cuantas de ellas aparecen únicamente en uno o en pocos tumores. Además, algunas de las bandas proteicas fueron identificadas por ser serológicamente reconocidas como antígenos de membrana; ésta identificación se hizo por electroforesis de los antígenos inmunopurificados, experimento realizado en paralelo a las muestras de membrana. Se identificaron dos complejos proteicos, el p44.12 (con un peso molecular de 44,000 y 12,000 daltons) y el p29.34 (con un peso molecular de 29,000 y 34,000 daltons). El primero corresponde a los antígenos HLA-A, HLA-B y a la β_2 -microglobulina, y el segundo al antígeno HLA-E. De acuerdo a estos resultados obtenidos, Rogan propone que la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS de alta resolución, pueda ser usada como un "necropsia"; ya que describe las proteínas membranales de los linfocitos. Además sugiere que el patrón proteico obtenido de las proteínas membranales de estos linfocitos, puede servir para identificar subgrupos de leucemias y linfomas al correlacionar el patrón proteico con la evolución clínica de los pacientes.

Litin y col. (68) utilizó la técnica de electroforesis bidimensional y 3 distintos métodos de marcaje (Metionina- S^{35} , Glucosamina- C^{14} y Lactoperoxidasa- I^{125}), para comparar las proteínas de superficie celular, glicoproteínas y proteínas membranales, de células normales y transformadas, con el objetivo de determinar, si las células transformadas tienen un patrón proteico bidimensional característico como ya lo habían sugerido otros autores. Para ello, se utilizó un sistema de fibroblastos de ratón, que incluye tanto células normales como transformadas espontáneamente o por virus. En

éste reporte se demostró que no todas las líneas celulares transformadas, tienen un patrón protéico neoplásico característico; pero sí difiere en poca o en gran medida según la línea celular de que se trate, del patrón de las células normales. En general, por las diferencias observadas entre los patrones protéicos transformados y normales, se sugiere que estas alteraciones están relacionadas con cambios en el contenido de carbohidratos y glicoproteínas membranales y que, dichas modificaciones se pueden correlacionar con la inmunogenicidad y tumorigenicidad de las células. Esto último debido a que se observó que la línea celular más maligna de todas las células transformadas estudiadas, tiene un patrón protéico muy similar al de las células normales. De esto se puede proponer que los cambios múltiples en las proteínas membranales, se correlacionan con un incremento en la inmunogenicidad y un decremento en su tumorigenicidad. Finalmente, en este estudio se hace hincapie de que la técnica de electroforesis bidimensional, puede ayudar a la clasificación de varias células tumorales.

Como ya se hizo notar, son pocos los estudios en los que se ha tratado de caracterizar la membrana citoplasmática de un tejido tumoral en fresco. Entre éstos reportes, se encuentra el de Irwin (69), cuyo trabajo consistió en el análisis de los patrones protéicos en geles de poliacrilamida-SDS, de la fracción soluble y de la no soluble (fracciones resultantes de una centrifugación a 100,000 g) de 3 tipos de tumores humanos y su correspondiente tejido normal; se estudió carcinoma de mama, linfoma de Hodgkin y carcinoma de colon. El objetivo del trabajo fue demostrar que no sólo los tumores tienen distintos patrones protéicos; sino también que en algunos casos, los patrones protéicos de la mayoría de los tumores son los mismos que los de su tejido normal respectivo. Es importante mencionar, que en este trabajo no se analizó una fracción purificada de membrana citoplasmática; pero es un intento de trabajar con tumores en fresco. Además para el análisis se eligieron únicamente 3 proteínas (código de

tripleto protéico), de cada una de las fracciones aisladas. Se observó que en la fracción soluble de los tejidos tumorales, el código protéico no fue específico; mientras que el que se presentó en la fracción no soluble, no sólo fue específico para cada uno de los 3 tipos de tejidos, sino que también (como en el caso del linfoma y el carcinoma de colon) la fracción codifica un juego exacto al de su tejido normal respectivo. Otra observación importante, fue que a pesar de la alteración neoplásica, la distribución de las proteínas mayores, determinadas sólo por su tamaño, es similar a las de su contraparte normal. Esto permitió sugerir que las neoplasias se asocian con alteraciones de proteínas presentes en bajas concentraciones. En el resto de las proteínas, o puede no haber modificaciones o éstos cambios son tan sutiles, que no tienen un efecto detectable en su tamaño.

Finalmente, no se encontraron antecedentes directos sobre el análisis protéico de membrana citoplasmática de las células epiteliales de tejido en fresco de *Ca. N.* y de *Ca. Co.* Sin embargo existen 2 reportes en los que se utilizó la técnica de inmunoelectroforesis de proteínas tumorales totales, como prueba diagnóstica de lesiones malignas tempranas; entre ellas las de tipo cervical (*Ca. Cerv.*):

Debido a que los reportes en los que se ha llevado a cabo el análisis de la membrana citoplasmática, y específicamente el de sus componentes protéicos, en tejidos en fresco son escasos; resulta interesante usar este método para conocer y analizar las alteraciones en el contenido protéico de la membrana plasmática de las células neoplásicas de *Ca. Co.* comparada con su contraparte normal. Esta nueva información aunada a la ya existente de otros factores ya conocidos en este tipo de neoplasia (histológicos, clínicos, etc.), permitirá comprender la conducta biológica de esta clase de cáncer. Además es importante tener un mayor conocimiento del *Ca. Co.*, debido a que es la neoplasia de mayor incidencia en nuestro país. Posiblemente el estudio de las proteínas membranales de este tipo de cáncer relacionado con la evolución clínica de la pa-

de la paciente, pueda servir como un parámetro adicional de utilidad pronóstica y/o diagnóstica, que influya en el tipo de tratamiento que se le proporcione a la enferma.

3. HIPOTESIS

El patrón protéico de la membrana citoplasmática de las células epiteliales de Cu.N., es diferente al de las células epiteliales de Co.Cu., Epidermoide Invasor.

4. OBJETIVOS.

- I. Estudiar por medio de Electroforesis en geles de Poliacrilamida-SDS, el patrón protéico de la membrana citoplasmática de células epiteliales de Cu.N.
- II. Analizar por el método mencionado anteriormente, el patrón protéico de la membrana citoplasmática de células epiteliales de Co.Cu. Epidermoide Invasor.
- III. Comparar los patrones protéicos obtenidos de la membrana citoplasmática de células epiteliales de Co.Cu. Epidermoide Invasor y de células epiteliales de Cu.N.
- IV. Establecer las diferencias que se presentan entre los patrones protéicos que se obtengan, tanto de Co.Cu., Epidermoide Invasor como de células epiteliales de Cu.N.

5. MATERIAL.

5.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

El estudio se llevó a cabo en 50 biopsias de tumores con un diagnóstico histopatológico de *Carcinoma Cérvico Uterino Epidermoide Invasor (Ca.Cu.)*, obtenidas de pacientes que acudieron al Servicio de Ginecología del Instituto Nacional de Cancerología. El rango de edad de estas pacientes fue de 28 a 79 años y ninguna tuvo tratamiento previo a la obtención de la muestra.

El grupo control, estuvo constituido por muestras de tejido de cérvix uterino normal de 29 pacientes con un rango de edad de 27 a 74 años. Este tejido fue obtenido de piezas quirúrgicas (histerectomía por patología benigna), de mujeres operadas en los Servicios de Ginecología del Hospital Gen González, S.S., y de la Clínica 32 del IMSS.

Todas las muestras de cérvix uterino colectadas, tanto las normales como las tumorales, tuvieron un peso mínimo promedio de 0.300g.

6. METODO.

Las biopsias o muestras tanto de tejido de *Cu.H.* como de *Ca.Cu.*, se colectaron paulatinamente y se procesaron de manera semejante desde su obtención hasta el estudio de los patrones protéicos. Las biopsias se recibieron en un vial con solución de NaCl al 0.9% (11.2.1.1.), con el fin de lavarlas y eliminar los residuos de sangre y detritus celulares.

A cada una de las biopsias, se les tomó una impronta con el propósito de corroborar que la muestra con la que se trabajó, fuese únicamente tejido maligno o benigno según el caso (11.4.1.). Las improntas más representativas del estudio, se fotografiaron (11.4.2.1.).

Enseguida de practicada la impronta, las biopsias se colocaron en papel aluminio, se etiquetaron y se almacenaron a -70°C hasta la siguiente prueba.

Debido a que las biopsias de tejido normal y tumoral de cervix uterino están constituidas por tejido conectivo (estroma) y epitelio escamoso estratificado plano no queratinizante, se hizo una microdissección para separar el epitelio (11.4.3.).

De este epitelio escamoso estratificado plano no queratinizante se obtuvo, primeramente, una fracción de homogenado celular de la siguiente manera: El epitelio se colocó en una solución de sacarosa-TRIS-HCl (11.2.2.2.) y se homogenizó; primero en politrón y después con el homogenizador vidrio-teflón. Este homogenado se sometió a centrifugación diferencial, para obtener una fracción rica en membrana citoplasmática (11.4.4.); la cual se utilizó para la obtención de los patrones protéicos.

En ambas fracciones celulares (homogenado y membrana citoplasmática) se cuantificó la cantidad de proteína mediante el Método de Lowry (11.4.5. -72-).

Con el objeto de confirmar la pureza de la fracción rica en membrana citoplasmática (microsomos) se hizo un análisis de la actividad enzimática en esta fracción y en el homogenado

celular, como la de la Deshidrogenasa Láctica (11.4.6.3.), (enzima marcadora específica de citosol); así como la actividad de la 5'-Nucleotidasa (11.4.6.1.), (enzima intrínseca de membrana citoplasmática). Dicha actividad se determinó en 10 biopsias de tejido de C.C.A. y 11 de C.C.C. *Epidermoide Invasor*. Además se realizaron observaciones morfológicas de la fracción microsomal, con el microscópio electrónico de transmisión (11.4.9.).

Las proteínas contenidas en la fracción microsomal, se separaron por su Peso Molecular (PM), a través de Electroforesis en Geles de Poliacrilamida con SDS en condiciones desnaturalizantes por el Método de Weber y Osborn (73), que permite conocer el PM mediante la movilidad relativa de las proteínas en un campo eléctrico (11.4.7.); y obtener así, un patrón protéico de la fracción rica en membrana citoplasmática aislada tanto de células epiteliales normales como de las cancerosas.

Las proteínas marcadoras de peso molecular conocido que se utilizaron fueron: Hemocianina (70 kD), Albúmina Sérica Bovina (66 kD), Albúmina de Huevo (45 kD), Pepsina (34.7 kD), Tripsinógeno (24 kD), β -Lactoglobina (18.4 kD) y Lisozima (14.3 kD). Dichas proteínas se procesaron junto con las contenidas en las fracciones microsomales y bajo las mismas condiciones. Cabe mencionar, que el corrimiento electroforético de cada una de las fracciones microsomales de las biopsias de tejido de cérvix uterino normal y tumoral, se hizo por duplicado confirmándose así la reproducibilidad del procedimiento.

Los patrones protéicos más representativos de la fracción de membrana citoplasmática tanto de células epiteliales normales como neoplásicas así como los patrones protéicos de las proteínas marcadoras de peso molecular conocido, fueron fotografiados (11.4.2.2.).

Los datos que se obtuvieron de la electroforesis fueron el número de bandas protéicas y la movilidad electroforética relativa. Esta última, se calculó midiendo la distancia de migración de cada una de las proteínas desconocidas a partir de su origen y utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{MOVILIDAD RELATIVA} = \frac{\frac{(A)}{(B)} \times (1)}{(X)} \times (2)$$

DONDE:

- A = Distancia de migración de la proteína;
- B = Distancia de migración del colorante;
- 1 = Longitud del gel antes de teñirse; y
- 2 = Longitud del gel después de la decoloración.

A partir de estos datos se calculó, por extrapolación, el PM de las proteínas problema contenidas en las fracciones mitocondriales. Para tal efecto, se utilizó la siguiente ecuación: $PM = \text{ANTILOGARITMO } b \times 10^{(m \cdot r)}$. Donde PM = peso molecular; b = ordenada al origen de la curva; m = pendiente de la curva; y m.r. = movilidad relativa.

Dicha ecuación es el producto de la representación gráfica del logaritmo del PM de cada una de las proteínas marcadoras de PM vs la movilidad relativa (m.r.) de cada una de éstas proteínas. En esta ecuación se calculó mediante Densitometría (11.4.H), la concentración de cada una de las fracciones protéicas problema.

Los resultados obtenidos a partir de la comparación de los patrones protéicos de células epiteliales normales y cancerosas, se analizaron estadísticamente. Las pruebas estadísticas de χ^2 y Suma de Rangos, se emplearon para los datos de promedio de bandas protéicas que hubo en cada uno de los

rangos de PM observados, concentración proteica y promedio de bandas proteicas por muestra o biopsia; mientras que en el análisis comparativo del porcentaje de biopsias procesadas que presentaron proteínas con los PM encontrados, se utilizó la prueba binomial no paramétrica.

ESQUEMA METODOLOGICO PARA LA OBTENCION DE PATRONES PROTEICOS DE LA MEMBRANA CITOPLAS-
MATICA DE CELULAS EPITELIALES DEL CERVIX UTERINO NORMAL Y NEOPLASICO.

I. Obtención del Epitelio Escamoso Estratificado.

T E J I D O

(Biopsia de 0.300g)

(Tejido Conjuntivo + Epitelio Escamoso Estratificado)

Impronta

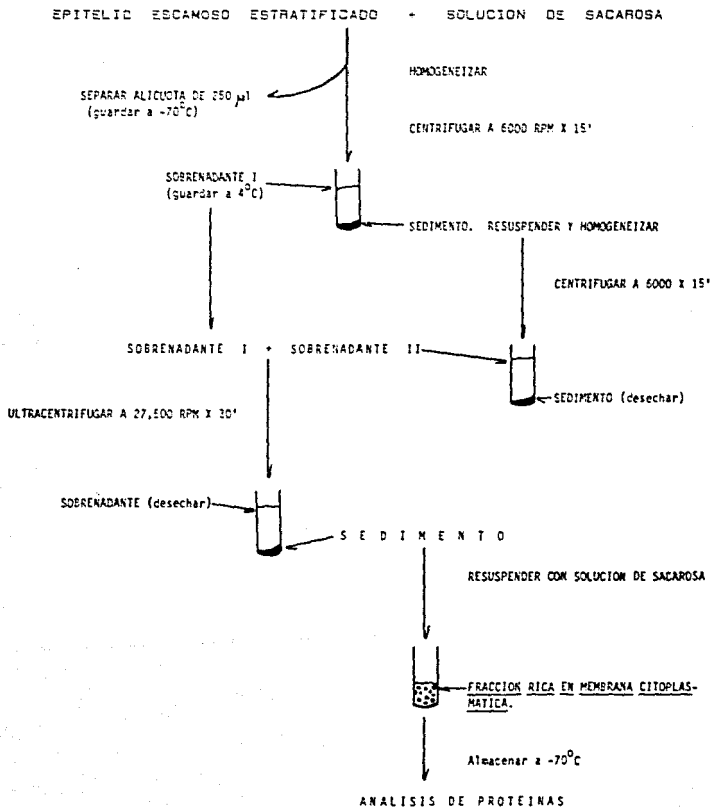
Lavado en Solución Salina a 4°C

Microdissección a través de Microscopio

EPITELIO ESCAMOSO ESTRATIFICADO

Almacenaje a -70°C

II. Obtención de la Fracción Rica en Membrana Citoplasmática.



III. Análisis de las Proteínas de la Membrana Citoplasmática.

1. Cuantificación de Proteínas por el Método de Lowry.

2. Pruebas de Funcionalidad Enzimática

- ± 5'-Nucleotidasa
- ± Deshidrogenasa Láctica

3. Electroforesis en Geles de Poliacrilamida-SOS al 7.5%

- ± Número de Bandas Protéicas
- ± Movilidad Relativa
- ± Peso Molecular

4. Densitometría (Concentración Protéica)

IV. Observaciones Morfológicas de la Membrana Citoplasmática.

1. Microscopía Electrónica de Transmisión

7. RESULTADOS.

7.1. OBSERVACION MICROSCOPICA DEL EPITELIO DE CERVIX UTERINO.

Las improntas tomadas del tejido de Cu.N. como Ca.Cu. muestran células epiteliales correspondiente al estrato o capa intermedia y a la capa superficial del epitelio. Estas células son grandes y aplanadas, con un núcleo pequeño; además, de que el fondo de la preparación, se visualiza limpio de detritus celulares (Fig. 4 y 5). Es importante señalar que a pesar de que las preparaciones son de un extendido celular y no de un corte histológico, la uniformidad morfológica de éstas células es muy evidente; característica distintiva de un tejido normal.

Las preparaciones de extendidos de tejido de Ca.Cu., *Epidermoide Invasor* muestran, predominantemente, células epiteliales con morfología muy diversa y núcleos sumamente grandes que, en algunos casos, abarcan casi la totalidad del citoplasma. Además no existe una delimitación clara de los diferentes estratos celulares (Fig. 6 y 7). Todas estas características son distintivas de un tejido neoplásico.



FIGURA 4.

Células del Epitelio Plano Estratificado poligonales de Cu.N. Observe las células con abundante citoplasma, núcleos centrales picnóticos con cromatina levemente grumosa. La presencia de linfocitos mononucleares (flecha) denota una leve reacción inflamatoria. (Tinción: Papanicolaou. Aumento 245.12 veces).



FIGURA 5.

Células Epiteliales de C.N.I. del estrato intermedio. Observe las células con abundante citoplasma, núcleos redondos u ovalados y cromatina homogénea. Dichas células están agrupadas y presentan plegamientos. (Tinción: Papanicolaou. Aumento 520 veces).

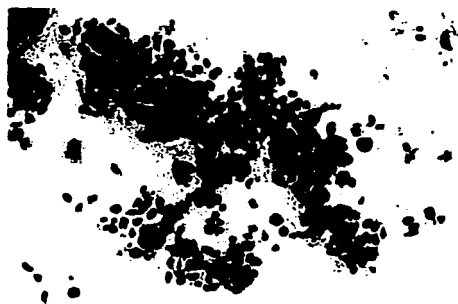


FIGURA 6.

Células Epiteliales de Ca. Cu. Epidermoide de Células Grandes no Queratinizante. Se observan células del Epitelio Plano Estratificado, con citoplasma escaso mal definido, núcleo grande de contornos irregulares y algunos de ellos hiper cromáticos. La imagen se acompaña de linfocitos, histiocitos y leucocitos poliformo nucleares. (Tinción: Hematoxilina-Eosina. Aumento 230.8 veces).

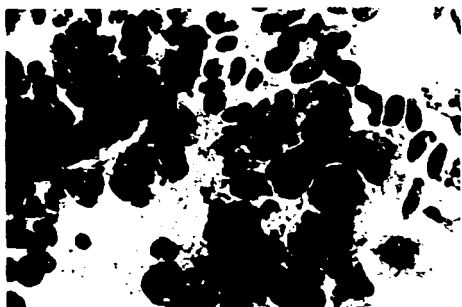


FIGURA 7.

Células Epiteliales de Ca.Cu. Epidermoide de Células Grandes no Queratinizante. Se observan abundantes células con desproporción núcleo-citoplasma, a expensas de aumento de tamaño del núcleo que muestra cromatina gruesa. Los contornos nucleares son irregulares y el citoplasma está mal definido. (Tinción: con Hematoxilina-Eosina. Aumento 512 veces).

7. E. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS FRACCIÓNES CELULARES AISLADAS.

La pureza de la fracción rica en membrana citoplasmática, se confirmó a través del ensayo de la actividad enzimática de la 5'-Nucleotidasa marcador específico de la membrana citoplasmática; y de la Deshidrogenasa Láctica, enzima específica del citoplasma. También se realizó un experimento control en el que se determinó la actividad de éstas enzimas en el homogenado celular (Tabla D). La actividad enzimática promedio de la 5'-Nucleotidasa, fue más alta en la fracción rica en membrana plasmática, 2.7 veces en el caso de Cu.N. y 2.11 veces en el Ca.Cu., comparada con la encontrada en el homogenado celular. Mientras que la actividad enzimática específica de la Deshidrogenasa Láctica, fue mayor en el homogenado, 8.36 veces en el caso de Ca.Cu. y 3.0 veces en el de Cu.N., comparada con la analizada en la fracción membranar.

Al comparar la actividad enzimática de la Deshidrogenasa Láctica del homogenado de Cu.N. con la del Ca.Cu., se ve que ésta actividad es menor en Cu.N. por 5.6 veces. Todos estos resultados (Tabla D) nos permiten concluir que la fracción celular con que se trabajó sí cuenta con un enriquecimiento de Membrana Citoplasmática; hecho que se corroboró con las observaciones morfológicas de microscopía electrónica.

TABLA D. ACTIVIDAD ENZIMATICA DE FRACCIONES CELULARES DE CELULAS EPITELIALES, TANTO DE TEJIDO HUMANO DE C.U.N. COMO DE C.A.C.U. EPIDERMIDE INVASOR.

TEJIDO DE CERVIX UTERINO	FRACCION CELULAR	³² P-NUCLEOTIDASA ^a	DESHIDROGENASA LACTICA ^b
C.U.N.	H ¹ C10 ²	97.304	0.1957
	MC10 ³	204.927	0.0676
C.A.C.U.	H C11 ²	55.040	1.096
	MC11 ³	116.174	0.131

1 H : Homogenado.

MC: Membrana Citoplasmatica.

2 Número de Casos Experimentados.

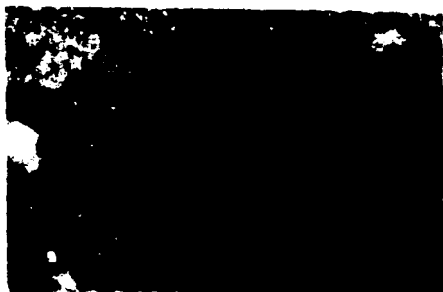
3 Unidad de la Actividad Enzimática: nmoles Pi liberado/min/mg prot.

b Unidad de la Actividad Enzimática: µmoles L-lactato producido/min/mg prot.

7.3. OBSERVACION MORFOLOGICA DE LAS FRACCIONES AISLADAS RICAS EN MEMBRANA CITOPLASMATICA

Con el propósito de completar el análisis de pureza de la fracción rica en membrana citoplasmática producto de las células epiteliales del tejido de Cu.N. y Co.Cu., se llevó a cabo su observación morfológica. Para tal efecto, se tomó una alícuota de la fracción rica en membrana citoplasmática, de dos muestras de cérvix uterino seleccionadas al azar y se procesaron para su observación en microscopio electrónico de transmisión.

Se observaron predominantemente, vesículas de tamaños variados, cuyos contornos se visualizan con un aspecto trilaminar; lo que es sugestivo de un tipo de membrana celular (Fig. 3 y 4). Y dado su grosor y morfología se sugiere que se trata de membrana citoplasmática (2,3), propuesta confirmada por los resultados de los ensayos enzimáticos.



FIGURAS 8 Y 9.

Fotomicrografías electrónicas de la "Fracción Rica en Membrana Citoplasmica" de células epiteliales correspondientes a Tejido de Cérvix Uterino Humano. Observe la presencia de abundantes vesículas membranales (microsomas). No se detectó contaminación con otros organelos celulares como lisosomas o mitocondrias; aunque si se observaron (*flecha*) vestigios de retículo endoplásmico (Aumento X 25,700).

7.4. SEPARACION ELECTROFORETICA DE LAS PROTEINAS MEMBRANALES.

Utilizando la Técnica de Electroforesis en Geles de Poliacrilamida-SDS al 7.5% (9.7), se separaron las proteínas de la membrana citoplasmática de las células epiteliales, tanto de tejido de Cu.N., como de Co.Cu. Este tipo de análisis comprendió tres aspectos fundamentales: La obtención del número de bandas proteicas por muestra analizada; el cálculo del PM de cada una de las bandas proteicas y su concentración. Este último dato se obtuvo por Densitometría.

7.4.1. ANALISIS DE LAS PROTEINAS MEMBRANALES DE LAS CELULAS EPITELIALES DE TEJIDO HUMANO DE CU.N.

La Fig. 10 muestra un gel de poliacrilamida-SDS al 7.5% teñido con azul de Coomassie, en el que se observa la imagen electroforética de las proteínas localizadas en la fracción membranal de las células epiteliales de Cu.N.

Cualitativamente se aprecia que el mayor número de bandas proteicas poco densas, están entre los 90 y 160 kD de PM. Además existen dos grupos de proteínas muy bien definidos, constituidos, cada uno, por 3 bandas proteicas con los siguientes PM:

- a) Primer Grupo: I 75,000 daltons
 II 63,000 daltons
 III 54,000 daltons
- b) Segundo Grupo: I 44,000 daltons
 II 38,000 daltons
 III 33,000 daltons

Es importante hacer notar que:

- 1) La imagen electroforética de las proteínas de membrana que se observa en la Fig. 10 es reproducible, ya que fue constante en las 29 muestras de Cu.N. procesadas (se presentó en más del 70% de las muestras analizadas).
- 2) La banda protéica, cuyo PM es de 63 kD, es la que tiene la mayor concentración de material.

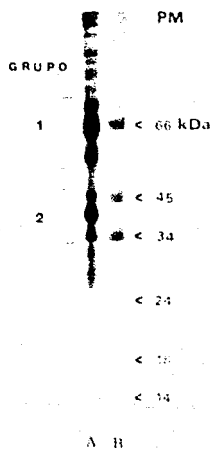
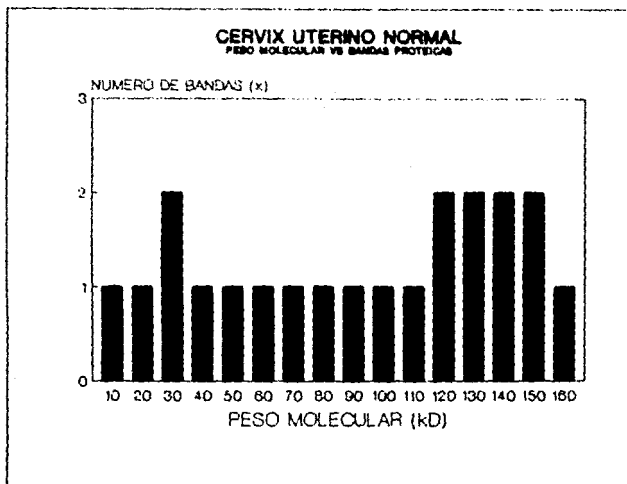


FIGURA 10.

Imagen electroforética en geles de poliacrilamida-SDS al 7.5%, teñidos con Azul de Coomassie. A) Proteínas de membrana citoplasmática de células epiteliales de tejido humano en fresco de Cu.N. B) Estándares de PM: Sero Albúmina Bovina (66 kD); Albúmina de Huevo (45 kD); Pepsina (34.7 kD); Tripsinógeno (24 kD); β -Lactoglobulina (18.4 kD); y Lisozima (14.3 kD).

El análisis cuantitativo del contenido proteico de las 29 muestras de tejido de Cu.N., mostró que el promedio de bandas proteicas, fue de 16.93±1.95. Dichas bandas tuvieron un PM de entre 15 a 163 kD

En la Gráfica 1, se observa que el mayor número de bandas proteicas está en un rango de PM de 120 a 150 kD



GRAFICA 1.

Promedio de bandas proteicas de tejido de Cu.N., que hay en cada uno de los rangos de Peso Molecular estudiados que se indican en la Gráfica.

El análisis densitométrico de las imágenes electroforéticas de las proteínas de la fracción membranal de las células epiteliales de las muestras de tejido de Cu.N. (Fig. 11), muestra las áreas de las 10 bandas más reproducibles observadas en éste tipo de tejido. Además se encontraron 2 regiones heterogéneas; la I que se localiza entre el origen y la banda I y la II que se encuentra entre la banda 10 y el final del trazo. Dichas áreas engloban diversas bandas proteicas, que no fueron bien evidenciadas aún densitométricamente pero es material proteico contenido en la fracción membranal. Es importante señalar que en la Fig. 11 se observan dos aspectos interesantes: la presencia de una banda (la número 6) que corresponde a un PM de 63 kD, con una cresta o pico muy pronunciado con respecto a los demás; y la presencia de 5 picos más (del 5 al 10) muy bien definidos.

El análisis cuantitativo de los resultados densitométricos (Tabla E), muestra que la banda número 6 contiene la mayor concentración proteica (12.90 μ g); y, obviamente, representa el mayor porcentaje en peso del total de bandas (25.30%).

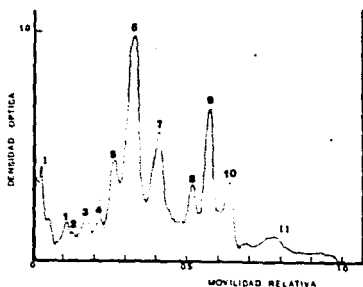


FIGURA 11.

Trazo Densitométrico representativo de Geles de Poliacrilamida-SDS al 7.5% teñidos con Azul de Coomassie, que contienen una concentración de $50\mu\text{g}$ de proteína total (por gel), obtenidas de la Fracción Rica en Membrana Citoplasmática de Células Epiteliales de Cu.N. Las 12 áreas delimitadas (I, 1-10, II), representan las bandas proteicas más reproducibles del gel. El origen del trazo densitométrico, coincide con el inicio del gel. Estos trazos se usaron para obtener los resultados de la Tabla E.

TABLA E. ANALISIS CUANTITATIVO DEL TRAZO DENSITOMETRICO DE LOS GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS AL 7.5%, TEÑIDOS CON AZUL DE COOMASSIE, DE PROTEINAS DE MEMBRANA CITOPLOSMATICA DE CELULAS EPITELIALES DE CD.N.

NUMERO DE BANDA PROTEICA	PESO DE LA BANDA PROTEICA (g) ^a	PORCENTAJE QUE REPRESENTA LA BANDA PROTEICA (%) ^b	CONCENTRACION PROTEICA DE LA BANDA POLIPEPTIDICA (μg) ^c
I	0.01504 ^d	7.960 ^d	3.980 ^d
1	0.00412	2.180	1.090
2	0.00236	1.250	0.624
3	0.00708	3.740	1.870
4	0.00376	1.990	0.990
5	0.01582	8.370	4.200
6	<u>0.04870</u>	<u>25.800</u>	<u>12.900</u>
7	0.02380	13.960	6.980
8	0.01772	9.370	4.690
9	0.02098	11.100	5.550
10	0.01364	7.220	3.610
II	0.01516	8.020	4.010
T O T A L	0.18820	100.00	50.00

a* Estos valores se determinaron pesando cada uno de los picos o bandas protéicas más reproducibles trazados en el densitómetro.

b* Estos datos representan el porcentaje con el que contribuye cada una de las bandas protéicas encontradas densitométricamente, en relación con el peso total.

c* Estos valores determinan la concentración protéica, con la que contribuye cada una de las bandas protéicas trazadas densitométricamente, en relación con la concentración total de proteína adicionada por gel; que fue de 50μg.

d* Valores promedio de 5 muestras tomadas al azar.

7.4.2. ANALISIS DE LAS PROTEINAS MEMBRANALES DE LAS CELULAS EPITELIALES DE TEJIDO HUMANO DE CA. CU. INVASOR. SUBGRUPO I.

La imagen electroforética del contenido protéico de la fracción membranal de las células epiteliales de Ca. Cu. no es constante como sucede en el caso del Cu. N. Se visualizaron 3 distintos comportamientos en el corrimiento electroforético que a continuación se describen:

La Fig. 12 muestra un gel cilíndrico de poliacrilamida-SDS al 7.5%, teñido con Azul de Coomassie, en el que se observa la imagen electroforética representativa del Subgrupo I que se repite en 12 de las 50 muestras analizadas (23.1%) de Ca. Cu. Cualitativamente, a lo largo del gel se observan 8 bandas protéicas, que sobresalen de todas las demás, debido a que son las que se visualizaron con una mejor definición y a que son las más densas; éstas proteínas se encuentran entre los 34 a los 160 kD de PM (Fig. 12).

El análisis cuantitativo mostró que todas las bandas protéicas se encuentran en el rango de PM entre 17 a 160 kD; y que el promedio de bandas por muestra, fue de 17.75 ± 3.30 . Además se observó que más del 80% de las muestras de este Subgrupo, presentaron las 17 bandas evidenciadas en el gel. Y en la Gráfica II se observa que la mayoría de las muestras presentaron un promedio de 7 bandas protéicas con un PM abajo de 50 kD.

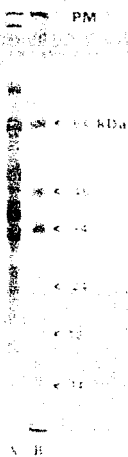
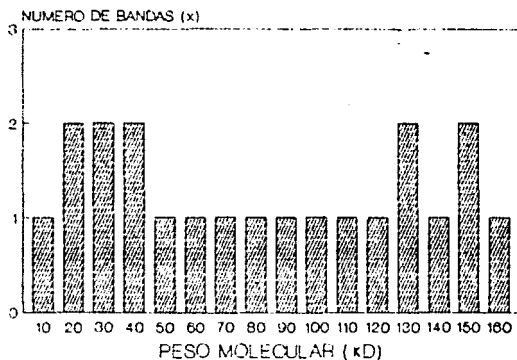


FIGURA 12.

Imagen electroforética en gel de poliacrilamida-SDS al 7.5%, teñidos con Azul de Coomassie. A) Proteínas de membrana citoplasmática de células epiteliales de tejido humano en fresco de Ca.Cu. Invasor: Subgrupo I. B) Estándares de PM: Sero Albúmina Bovina (66 kD); Albúmina de Huevo (45 kD); Pepsina (34.7 kD); Tripsinógeno (24 kD); β -Lactoglobulina (18.4 kD); y Lisozima (14.5 kD).

GRUPO I DE CANCER CERVICO UTERINO
PESO MOLECULAR VS BANDAS PROTEICAS



GRAFICA 11.

Promedio de bandas proteicas del Subgrupo I del tejido de Ca. Ci. Invasor; que hay en cada uno de los rangos de Peso Molecular que se indican en la Gráfica.

Los resultados obtenidos en el análisis densitométrico de la imagen electroforética del Subgrupo I de Ca.Cu. (Fig. 13) difieren de los obtenidos en el tejido normal (Fig. 11). Se encontraron 12 áreas correspondientes a las bandas más reproducibles y 2 regiones heterogéneas: una al inicio (I) y otra al final del trazo densitométrico (II) (Fig. 13). En esta última área heterogénea se encuentra una serie de bandas proteicas de bajo PM (10 a 20 kD), cuyo trazo densitométrico no es lo suficientemente reproducible sin embargo, es material proteico que forma parte de la fracción membranal aislada. Dentro de las 12 áreas mayormente reproducibles, se distinguen 6 cuyas crestas o picos son los más pronunciados (1, 3, 5, 7, 9 y 10); y los otros 6 picos son menos prominentes (2, 4, 6, 8, 11 y 12) (Fig. 13).

El análisis cuantitativo de los trazos densitométricos de (Tabla F), muestra que las bandas o picos proteicos que tienen una mayor concentración de proteína, por cierto muy similar entre sí, son la 3 (3.435 μ g), 5 (4.06 μ g), 7 (5.3 μ g), 9 (4.631 μ g), 10 (5.28 μ g), 11 (3.13 μ g) y la 12 (4.453 μ g). Estas 7 bandas proteicas representan obviamente, el mayor porcentaje del total de bandas. El resto de picos proteicos, (1, 2, 4, 6 y 8) tienen una concentración proteica que oscila entre 1 a 2.3 μ g. Es interesante mencionar, que la zona heterogénea II, engloba un total del 19.9% de las proteínas.

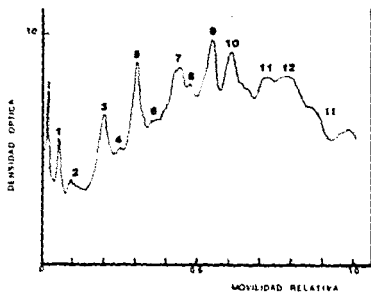


FIGURA 13.

Trazo densitométrico representativo de geles de poliacrilamida-SES al 7.5% (teñidos con Azul de Coomassie), que contienen una concentración de 50 μ g de proteína total (por gel). Obtenido de la fracción rica en membrana citoplasmática de células epiteliales de Ca.Cu. Invasor, correspondientes al Subgrupo I.

Las 14 áreas delimitadas (I, 1-12, III), representan las bandas proteicas más reproducibles del gel. El origen del trazo densitométrico, coincide con el inicio del gel. Estos trazos se usaron para obtener los resultados de la Tabla F.

TABLA F. ANALISIS CUANTITATIVO DEL TRAZO DENSITOMETRICO DE LOS GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS AL 7.5%. TEÑIDOS CON AZUL DE COOMASSIE, DE PROTEINAS DE MEMBRANA CITOPLASMATICA DE CELULAS EPITELIALES DE CA.CU., INVASOR, CORRESPONDIENTES AL SUBGRUPO I.

NUMERO DE BANDA PROTEICA	PESO DE LA BANDA PROTEICA (g) ^a	PORCENTAJE QUE REPRESENTA LA BANDA PROTEICA (%) ^b	CONCENTRACION PROTEICA DE LA BANDA POLIPEPTIDICA (µg) ^c
I	0.0117 ^d	2.977 ^d	1.490 ^d
1	0.0100	2.544	1.272
2	0.0105	2.672	1.336
3	0.0270	6.870	3.435
4	0.0085	2.163	1.081
5	0.0319	8.117	4.060
6	0.0173	4.402	2.201
7	0.0421	10.712	5.360
8	0.0183	4.656	2.328
9	0.0364	9.262	4.631
10	0.0415	10.560	5.280
11	0.0246	6.259	3.130
12	0.0350	8.906	4.453
II	0.0781	19.873	9.936
TOTAL	0.3930	100.00	50.00

^a Estos valores se determinaron pesando cada uno de los picos o bandas protéicas más reproducibles trazados en el densitómetro.

^b Estos datos representan el porcentaje con el que contribuye cada una de las bandas protéicas encontradas densitométricamente, en relación con el peso total.

^c Estos valores determinan la concentración protéica, con la que contribuye cada una de las bandas protéicas trazadas densitométricamente, en relación con la concentración total de proteína adicionada por gel; que fue de 50 µg.

^d Valores promedio de 5 muestras tomadas al azar.

7.4.3. SUBGRUPO II DEL TEJIDO DE CA. CU. INVASOR.

La Fig. 14 muestra un gel cilíndrico de poliacrilamida-SDS al 7.5% teñido con azul de Coomassie, en el que se observa la imagen electroforética representativa del Subgrupo II.

Esta imagen se encontró en 16 casos (30.8%) de las muestras de Ca.Cu. procesadas.

Este subgrupo se caracteriza por presentar, a nivel cualitativo, una imagen de bandeo protéico, en su mayoría, bien definido; sobre todo 10 bandas que tienen una densidad mayor, y muy similar entre sí. Los PM en los que se engloban estas 10 proteínas, van de 35 a los 160 kD (Fig. 14). También existe una serie de bandas protéicas de bajo PM de entre 16 a 31 kD (Fig. 14). Otro aspecto interesante, es que se visualizan 6 bandas protéicas bien demarcadas cuyo PM se encuentra entre los 35 a los 100 kD. Además, entre estas proteínas se observan bandas protéicas muy difusas (Fig. 14).

El análisis cuantitativo mostró que el promedio de bandas protéicas por muestra es de 17.40±3.10; que los PM en los que se encuentran todas estas bandas protéicas es de 16 hasta 160 kD; y que más del 70% de las muestras tienen las bandas protéicas que se observan en la Fig. 11.

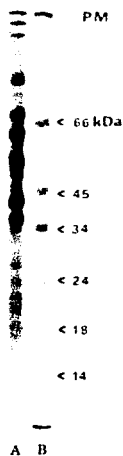


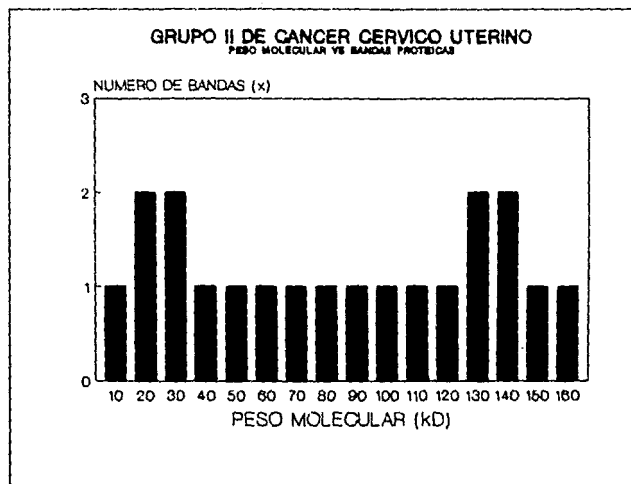
FIGURA 14.

Imagen electroforética en gel de poliacrilamida-SDS al 7.5%, teñido con Azul de Coomassie. A) Proteínas de membrana citoplasmática de células epiteliales de tejido humano en fresco de Ca.Cu. Invasor, correspondientes al Subgrupo II; B) Estándares de PM: Sero Albúmina Bovina (66 kD); Albúmina de Huevo (45 kD); Pepsina (34.7 kD); Tripsinógeno (24 kD); β -Lactoglobulina (18.4 kD); y Lisozima (14.3 kD).

En la Gráfica III, ha diferencia del Subgrupo anterior (Gráfica II), sólo se observa un promedio de 6 bandas abajo de los 40 kD de PM.

El análisis densitométrico de la imagen electroforética de las proteínas del Subgrupo II de Ca.Cu. (Fig. 15), muestra características diferentes a las del Cu.N. (Fig. 11) y a las del Subgrupo I (Fig. 13). Se encontraron 13 áreas que corresponden a las bandas protéicas más reproducibles de este Subgrupo II de Ca.Cu. Al igual que en el Subgrupo I, se presentaron 2 zonas heterogéneas de bandas protéicas poco reproducibles densitométricamente; el área I se localiza al principio del trazo, mientras que la II se ubica al final. Los picos protéicos 1, 3, 5, 6, 7, 8 y 9 están bien definidos y contienen una mayor concentración de proteínas. En cambio, los picos protéicos 2, 4, 10, 11, 12 y 13; son menos pronunciados y se requiere del análisis cuantitativo, para conocer la cantidad de proteína que contiene cada uno de ellos.

El análisis cuantitativo de los resultados densitométricos (Tabla 6) muestra que las bandas 7 y 8 contienen la mayor concentración de proteína comparadas con el resto de las bandas (5.98 y 5.64 μg respectivamente) y cada una representa el 11% del total de proteínas; mientras que los picos 4, 1 y 2 son los que tienen la menor concentración de proteína (0.978, 1.267 y 1.422 μg respectivamente). La zona heterogénea II, presenta una concentración de 4.6 μg de proteína.



GRAFICA III.

Promedio de bandas proteicas del Subgrupo II de tejido de Ca.Cu. Invasor; que hay en cada uno de los rangos de Peso Molecular que se indican en la Gráfica.

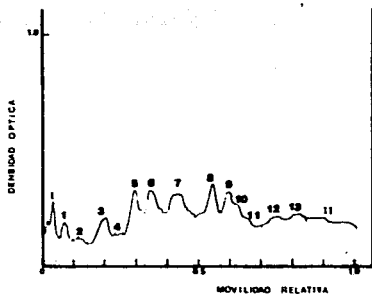


FIGURA 15.

Trazo densitométrico de geles de poliacrilamida-SDS al 7.5% teñidos con Azul de Coomassie, que contienen una concentración de 50 μ g de proteína total (por gel), de fracción de membrana citoplasmática de células epiteliales de Ca.Cu. Invasor, correspondientes al Subgrupo II.

Las 15 áreas delimitadas (I, 1-13, II), representan las bandas proteicas más reproducibles del gel; y el origen del trazo densitométrico, coincide con el inicio del gel. Los trazos observados, se usaron para obtener los resultados de la Tabla 6.

TABLA G. ANALISIS CUANTITATIVO DEL TRAZO DENSITOMETRICO DE LOS GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS AL 7.5%, TEÑIDOS CON AZUL DE COOMASSIE, DE PROTEINAS DE MEMBRANA CITOPLASMATICA DE CELULAS EPITELIALES DE CA.CU. INVASOR, CORRESPONDIENTES AL SUBGRUPO II.

NUMERO DE BANDA PROTEICA	PESO DE LA BANDA PROTEICA (g) ^a	PORCENTAJE QUE REPRESENTA LA BANDA PROTEICA (%) ^b	CONCENTRACION PROTEICA DE LA BANDA POLIPEPTIDICA (μg) ^c
I	0.0079 ^d	3.511 ^d	1.755 ^d
1	0.0057	2.533	1.267
2	0.0064	2.844	1.422
3	0.0091	4.044	2.022
4	0.0044	1.955	0.978
5	0.0145	6.444	3.222
6	0.0193	8.578	4.289
7	0.0269	11.955	5.978
8	0.0254	11.289	5.644
9	0.0145	6.444	3.222
10	0.0143	6.355	3.178
11	0.0181	8.044	4.022
12	0.0133	5.911	2.955
13	0.0109	4.844	2.422
II	0.0208	9.244	4.622
T O T A L	0.2250	100.00	50.00

65

^a Estos valores se determinaron pesando cada uno de los picos o bandas proteicas más reproducibles trazados en el densitómetro.

^b Estos datos representan el porcentaje con el que contribuye cada una de las bandas proteicas encontradas densitométricamente, en relación con el peso total.

^c Estos valores determinan la concentración proteica, con la que contribuye cada una de las bandas proteicas trazadas densitométricamente, en relación con la concentración total de proteína adicionada por gel; que fue de 50μg.

^d Valores promedio de 5 muestras tomadas al azar.

3.4.4. SUBGRUPO III DEL TEJIDO DE CA. CU. INVASOR.

El tercer grupo de *C. Cu. Invasor*, consta de 22 muestras (42.31%); las cuales presentan una imagen electroforética representativa como la que se observa en el gel cilíndrico de poliacrilamida-SDS al 7.5% teñido con Azul de Coomassie (Fig. 16). En esta imagen se observan de 8 bandas protéicas con un PM entre 34 a 140 kD que sobresalen de las demás debido a la mayor cantidad de colorante que absorbieron y a que se visualizan con una buena definición (Fig. 16). Contrariamente, abajo de los 30 kD de PM se observa una serie de 5 bandas difusas y con poca absorción de colorante (Fig. 16).

El análisis cuantitativo mostró que todas las bandas protéicas observadas, se encontraron en el rango de PM entre 17 a 161 kD; además de que el promedio de bandas, por muestra, fue de 17.20 ± 2.42 . Y más del 80% de las muestras, presentaron esta imagen electroforética (Fig. 16). Otra característica cuantitativa importante de este Subgrupo es que presentó un promedio de 6 bandas protéicas a PM por debajo de 40 kD (Gráfica IV).

El análisis densitométrico de la imagen electroforética de las bandas protéicas de este Subgrupo III, se muestra en la Fig. 17. En ella se observan 12 áreas que corresponden a las bandas protéicas mejor definidas que se visualizaron. También se marcaron dos zonas (I y II), que contienen diversas proteínas poco evidentes densitométricamente. La zona I, se encuentra al inicio del trazo; mientras que la zona II, está al final (Fig. 17). En esta Fig. 17 se aprecian 7 picos protéicos que al parecer tienen concentraciones similares entre sí; pero mayores al de las demás proteínas; dichos picos son: 1, 3, 5, 6, 7, 9 y 10. Las áreas 2, 4, 8, 11 y 12, cualitativamente parece que contienen menos material.

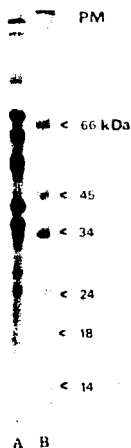
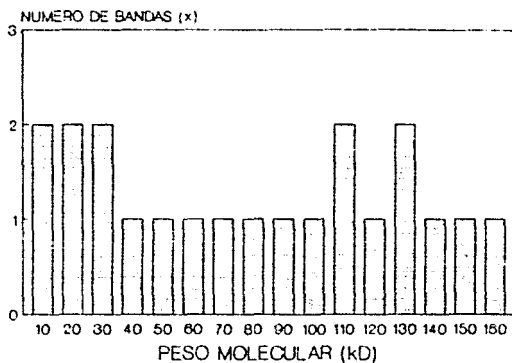


FIGURA 16.

Imagen electroforética en geles de poliacrilamida-SDS al 7.5%, teñidos con Azul de Coomassie. A) Proteínas de membrana citoplasmática de células epiteliales de tejido humano en fresco de Ca.Cu. Invasor, correspondientes al Subgrupo III. B) Estándares de PM: Sero Albúmina Bovina (66 kD); Albúmina de Huevo (45 kD); Pepsina (34.7 kD); Tripsinógeno (24 kD); β -Lactoglobulina (18.4 kD); y Lisozima (14.3 kD).

GRUPO III DE CANCER CERVICO UTERINO
PESO MOLECULAR VS BANDAS PROTEICAS



GRAFICA IV.

Promedio de bandas proteicas del Subgrupo III del tejido de Ca.Cu. Invasor; que hay en cada uno de los rangos de Peso Molecular estudiados.

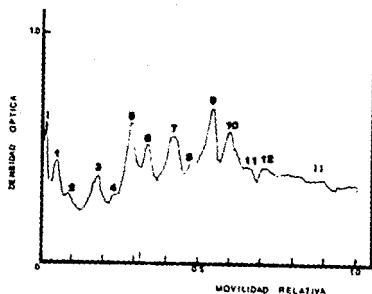


FIGURA 17.

Trazo densitométrico representativo de geles de poliacrilamida-SDS al 7.5% teñidos con Azul de Coomassie, que contienen una concentración de 50 μ g de proteína total (por gel), de fracción membranal de células epiteliales de tejido de Ca.Cv., correspondiente al Subgrupo III.

Las 14 áreas delimitadas (I, 1-12 y II), representan las bandas protéicas más reproducibles del gel. Los trazos observados se usaron para obtener los datos de la Tabla H.

El análisis cuantitativo de la Fig. 17, se muestra en la Tabla II. Como se esperaba los picos proteicos 3, 5, 6, 7, 9, 10 incluyendo además el 12 y con excepción del 1, muestran la mayor concentración proteica de las 12 áreas marcadas. Cabe resaltar, que de los 7 picos proteicos, los marcados con el número 7, 9 y 10; son los que más sobresalen, debido a la concentración de proteína que contienen con respecto a los otros 4 picos proteicos. Así, el pico 7 tiene una concentración proteica de 5.093 μg ; el 9 de 5.0 μg y el pico 10 contiene 4.894 μg de proteína. Y las bandas proteicas 1, 2, 4, 8 y 11 contienen una concentración proteica entre 1 y 2 μg , cada una de ellas.

Finalmente el área heterogénea II es la que representa el mayor porcentaje del total de proteínas siendo el 24.20%.

71

7

TABLA H. ANALISIS CUANTITATIVO DEL TRAZO DENSITOMETRICO DE LOS GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS AL 7.5%, TEÑIDOS CON AZUL DE COOMASSIE, DE PROTEINAS DE MEMBRANA CITOPLASMATICA DE CELULAS EPITELIALES DE CA.CU. INVASOR, CORRESPONDIENTES AL SUBGRUPO III.

NUMERO DE BANDA PROTEICA	PESO DE LA BANDA PROTEICA (μ) ^a	PORCENTAJE QUE REPRESENTA LA BANDA PROTEICA (%) ^b	CONCENTRACION PROTEICA DE LA BANDA POLIPEPTIDICA (μ g) ^c
I	0.0092 ^d	2.450 ^d	1.223 ^d
1	0.0145	3.850	1.930
2	0.0105	2.800	1.396
3	0.0256	6.810	3.404
4	0.0101	2.686	1.343
5	0.0275	7.314	3.657
6	0.0218	5.798	2.899
7	0.0383	10.186	5.093
8	0.0139	3.697	1.848
9	0.0376	10.000	5.000
10	0.0368	9.787	4.894
11	0.0166	4.415	2.207
12	0.0229	6.090	3.045
II	0.0910	24.202	12.101
TOTAL	0.3760	100.00	50.00

^a Estos valores se determinaron pesando cada una de las bandas o picos protéicos más reproducibles trazados en el densitómetro.

^b Estos datos representan el porcentaje con el que contribuye cada una de las bandas protéicas encontradas densitométricamente, en relación con el peso total.

^c Estos valores determinan la concentración protéica, con la que contribuye cada una de las bandas protéicas trazadas densitométricamente, en relación con la concentración total de proteína adicionada por gel; que fue de 50 μ g.

^d Valores promedio de 5 muestras tomadas al azar.

7.4.5. ANALISIS COMPARATIVO DE LAS PROTEINAS MEMBRANALES DE CELULAS EPITELIALES DE CADA UNO DE LOS SUBGRUPOS DEL TEJIDO DE CA. CU. INVASOR.

Como ya se mencionó el contenido proteico de la membrana plasmática de las células epiteliales del tejido humano en fresco de Ca. Cu., no mostró un patrón proteico característico en los 50 casos estudiados, sino que se visualizaron 3 distintas imagenes electroforéticas cuyas características distintivas a continuación se comparan y analizan:

Una de las primeras diferencias es el número de casos de que consta cada uno de estos subgrupos. Así el subgrupo III es el que engloba el mayor número de muestras: 22; mientras que el subgrupo II, tiene 16 y el menor número lo presenta el subgrupo I, con 12. Esto quiere decir que aunque el grupo de Ca. Cu., no tiene una misma imagen electroforética en todos los casos estudiados: si hay una de ellas que predomina.

Cualitativamente se observan varias diferencias sobresalientes (Fig. 18):

- 1) El subgrupo I muestra 8 bandas proteicas sobresalientes que se encuentran entre los 34 a 160 kD de PM, mientras que en el subgrupo II se observan 10 bandas bien definidas pero entre los 35 a 160 kD y el subgrupo III muestra también 8 bandas proteicas mayormente densas y definidas, entre los 34,000 a 160,000 kD de PM.
- 2) Los 3 subgrupos muestran una serie de bandas proteicas poco densas abajo de los 30 kD de PM.

A nivel cuantitativo las características más sobresalientes de este análisis comparativo entre los subgrupos de Ca. Cu. fueron:

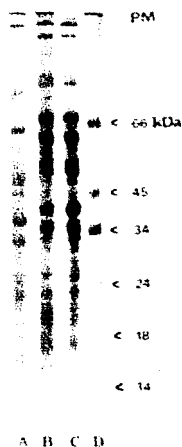


FIGURA 18.

Comparación de las imágenes electroforéticas en geles de poliacrilamida-SDS al 7.5%, teñidos con Azul de Coomassie, de los Subgrupos resultantes del tejido en fresco humano de Ca.Cu. Invasor. A), B) y C) Proteínas de membrana citoplásmica de células epiteliales de los Subgrupos I, II y III respectivamente.

D) Estándares de PM: Sero Albúmina Bovina (66 kD); Albúmina de Huevo (45 kD); Pepsina (34.7 kD); Tripsinógeno (24 kD); β -Lactoglobulina (18.4 kD); y Lisozima (14.3 kD).

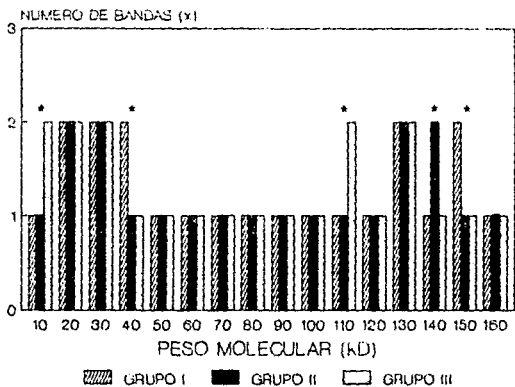
- 1) El promedio de bandas proteicas por muestra observado en cada uno de estos subgrupos fue muy similar entre si (17.4 bandas promedio), no existiendo una diferencia estadisticamente significativa.

- 2) En el análisis comparativo del número de bandas proteicas por rango de PM (*Gráfica V*) se observaron diferencias estadisticamente significativas tanto en bajos como en altos PM. En PM menores de 50 kD, los subgrupos I y III tienen un promedio de 7 bandas; mientras que en el subgrupo II hay 6.
En PM mayores a 110 kD las diferencias más importantes son: El subgrupo III, tiene 3 bandas proteicas promedio en un rango de 110 a 120 kD comparado con los otros 2 subgrupos que tienen 2 bandas proteicas en este mismo rango de PM ($p < 0.0001$). Entre los 140 a 150 kD el subgrupo II tiene 3 bandas proteicas en promedio comparado con los otros 2 subgrupos ($p < 0.0001$). Y el subgrupo I, tiene 3 bandas proteicas entre los 150 a 160 kD ($p = 0.0001$).

En la *Fig. 19*, se muestran los trazos densitométricos representativos de cada uno de los 3 subgrupos de Ca.Cu., estudiados; cualitativamente, en este tipo de trazos, se visualizan un poco mejor las diferencias que hay entre los subgrupos de Ca.Cu.; así tenemos que el subgrupo que tiene un mayor número de áreas delimitadas correspondientes a las bandas proteicas más reproducibles, fue el subgrupo II, que constó de 13 áreas además de las 2 áreas heterogéneas en donde se engloban aquellas proteínas poco reproducibles densitométricamente. En tanto el subgrupo I y III presentaron 12 áreas proteicas y sus dos respectivas zonas heterogéneas.

Otra de las diferencias fue que mientras que en el subgrupo I se visualizaron 6 picos proteicos muy bien definidos y pronunciados, en los subgrupos II y III, se observaron 7.

GRUPOS DE CANCER CERVICO UTERINO INVASOR
PESO MOLECULAR VS BANDAS PROTEICAS



*p < 0.05

GRAFICA V.

Comparación del Promedio de bandas proteicas, entre cada uno de los Subgrupos formados del tejido de Ca.Cu. Invasor (I, II y III); que hay en cada uno de los rangos de Peso Molecular que se indican en la Gráfica.

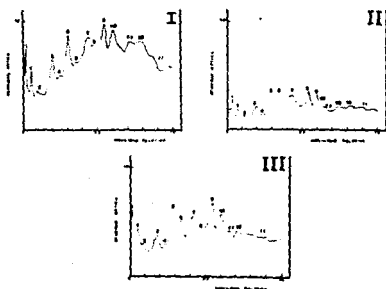


FIGURA 19.

Comparación de cada uno de los Trazos Densitométricos representativos de geles de poliacrilamida-SDS al 7.5% teñidos con Azul de Coomassie, que contienen una concentración de 50 μ g de proteína total por gel, de fracción de membrana citoplasmática de células epiteliales de cada uno de los 3 Subgrupos de Ca.Cu. Invasor (I, II y III). Todas las áreas delimitadas, en cada uno de los 3 trazos densitométricos correspondientes a los 3 subgrupos, representan las bandas proteicas más reproducibles del gel. El origen de cada uno de éstos 3 trazos, coincide con el inicio del gel. Los trazos observados se utilizaron, para obtener los resultados de la Tabla I.

También se comparó la concentración protéica de los picos más reproducibles y mejor definidos de los 3 subgrupos de *Ca. Cu.* (Tabla I). Cabe mencionar, que cada uno de los picos protéicos escogidos para realizar el análisis comparativo, se acomodaron de acuerdo a su PM y no por el número que se le asignó en el trazo densitométrico.

En primera instancia, se puede observar (Tabla I), que los subgrupos que presentan un mayor número de diferencias son los subgrupos II y III, debido a que no tienen 2 de los 5 picos protéicos mejor definidos y que se observan en el subgrupo I. Estas diferencias son estadísticamente significativas ($p < 0.001$). Respecto a la concentración protéica de los picos con un PM aproximado de 50 y 38 kD, es mayor en el subgrupo II, comparado con el subgrupo I. Las diferencias son estadísticamente significativas ($p < 0.001$ y $p < 0.0001$ respectivamente).

El subgrupo III tiene un pico protéico con un PM aproximado de 40 kD cuya concentración protéica es mayor que la presentada por el subgrupo I. La diferencia es estadísticamente significativa ($p < 0.0001$). Finalmente, el subgrupo I tiene el pico con mayor concentración protéica a un PM de 30 kD; comparado con los otros dos subgrupos de *Ca. Cu.* También la diferencia es estadísticamente significativa ($p < 0.001$).

En cuanto al contenido protéico de membrana citoplasmática, a través de este análisis queda de manifiesto que el subgrupo I de *Ca. Cu.* es el que presenta las mayores diferencias con respecto a los otros 2 subgrupos de *Ca. Cu.*

TABLA I. COMPARACION DE LA CONCENTRACION PROTEICA DE LAS BANDAS POLIPEPTIDICAS MEJOR DEFINIDAS A PARTIR DEL TRAZO DENSITOMETRICO; DE LOS SUBGRUPOS DE CA.CU., -- INVASOR.

SUBGRUPO I			SUBGRUPO II			SUBGRUPO III		
Nb. de Banda	PM (daltons)	[Prot] μg	Nb. de Banda	PM (daltons)	[Prot] μg	Nb. de Banda	PM (daltons)	[Prot] μg
6	65,000	2.201	No se observa una banda proteica con - un PM, similar.*			6	64,000	2.899
7	51,000	5.360	7	50,000	5.978*	No se observa una banda proteica con un PM, similar.*		
8	42,000	2.328	No se observa una banda proteica con - un PM, similar.*			9	40,000	5.000*
9	38,000	4.631	8	38,000	5.644*	No se observa una banda proteica con un PM, similar.*		
10	31,000	5.280*	10	32,000	3.178	11	32,000	2.207

* p40.05

7.4.6. ANALISIS COMPARATIVO DE LAS PROTEINAS MEMBRANALES DE CELULAS EPITELIALES DE TEJIDO DE CU.N., CONTRA CADA UNO DE LOS SUBGRUPOS DEL TEJIDO DE Ca.Cu. INVASOR.

Después de haber analizado comparativamente cada uno de los subgrupos de *Ca.Cu.* queda por aclarar qué tan parecidos o diferentes son estos subgrupos de *Ca.Cu.* con el grupo control de *Cu.N.* en cuanto al contenido protéico. Anteriormente ya se habían vislumbrado algunas observaciones al respecto.

Ahora se hará el análisis comparativo del contenido protéico de membrana citoplasmática de cada uno de los subgrupos de *Ca.Cu.* contra el contenido protéico de membrana citoplasmática del grupo control de *Cu.N.*

Al observar y comparar en la *Figura 20* que contiene cada una de las imagenes electroforéticas del contenido protéico de *Cu.N.* y de los subgrupos de *Ca.Cu.* es factible determinar a priori, ciertas diferencias cualitativas. Lo primero es la presencia en el patrón protéico del *Cu.N.* de una banda con un PM de 63 kD que se observa bastante densa y teñida (*Fig. 20-A*), lo que indica, una concentración de material protéico mayor; mientras que en las imagenes electroforéticas del contenido protéico de membrana plasmática de los 3 subgrupos de *Ca.Cu.* (*Fig. 20-B, C y D*) aunque existe una banda con un PM similar no se observa tal característica.

También es evidente en el patrón protéico de *Cu.N.* la presencia de dos grupos protéicos muy marcados cuyos PM van de 30 a 75 kD. En el caso de los subgrupos de *Ca.Cu.* aunque se observan agrupaciones de proteínas estas difieren de las del *Cu.N.*; así tenemos que en los 3 subgrupos de *Ca.Cu.* se observan 5 proteínas más sobresalientes que están entre los 30 a 76 kD de PM y que difieren en sí, tanto en PM como en concentración (*Fig. 20 B, C y D*).

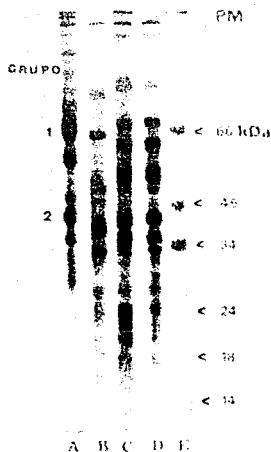


FIGURA 20.

Imágenes electroforéticas en geles de poliacrilamida-SDS al 7.5% teñidos con Azul de Coomassie; del tejido humano en fresco de Cu.N. y de los 3 Subgrupos resultantes del tejido de Ca.Cu. Invasor. A Proteínas de membrana citoplasmática de células epiteliales del tejido de Cu.N. B, C y D Proteínas de membrana citoplasmática de células epiteliales de los Subgrupos del tejido de Ca.Cu. E Estándares de PM: Sero Albúmina Bovina (66 kD); Albúmina de Huevo (45 kD); Pepsina (34.7 kD); Tripsinógeno (24 kD); β -Lactoglobulina (18.4 kD); y Lisozima (14.3 kD).

Otra observación cualitativa distintiva entre los subgrupos de *Ca.Cu.*, con respecto al *Cu.N.*; es que en los primeros, se visualizó una mayor cantidad de bandas protéicas de bajo PM (30 kD). Contrariamente, en el *Cu.N.* se observa un mayor número de bandas protéicas de alto PM entre los 75 a los 160 kD (Fig. 30).

Cuantitativamente este análisis comparativo mostró lo siguiente:

- 1) El promedio de bandas protéicas, por muestra observado en el grupo de *Cu.N.* (16.93±1.95), difiere del que se presenta en cada uno de los subgrupos de *Ca.Cu.* (subgrupo I = 17.75±3.30; subgrupo II = 17.40±3.10 y subgrupo III = 17.2±2.42); pero éstas diferencias no son estadísticamente significativas.
- 2) El rango de PM en el que se engloban las bandas protéicas observadas, en el grupo de *Cu.N.*, difiere con respecto a los de los 3 subgrupos de *Ca.Cu.*; ya que mientras en los subgrupos de *Ca.Cu.* el rango va de 17 a 161 kD; el grupo de *Cu.N.* se encuentra entre 15 a 163 kD de PM. Es decir, este último grupo tiene el rango de PM más extremo pues incluye el PM más bajo (15 kD) y el PM más alto (163 kD);
- 3) También se analizó comparativamente el número o promedio de bandas protéicas que hay en cada uno de los rangos de PM estudiados en cada grupo de *Ca.Cu.* y en el *Cu.N.* (Gráfica VI) observándose lo siguiente:
 - a) El grupo de *Cu.N.* muestra un mayor número de bandas protéicas promedio en rangos altos de PM (120 a 160 kD). La diferencia más notable se observó en el rango de PM de 120 a 130 kD, donde el grupo de *Cu.N.* tiene el mayor número de bandas protéicas promedio ($p < 0.0001$), que los 3 subgrupos de *Ca.Cu.*;

b) Contrariamente el grupo de Cu.N. tiene el menor número de bandas proteicas promedio en PM bajos (10 a 40 kD);

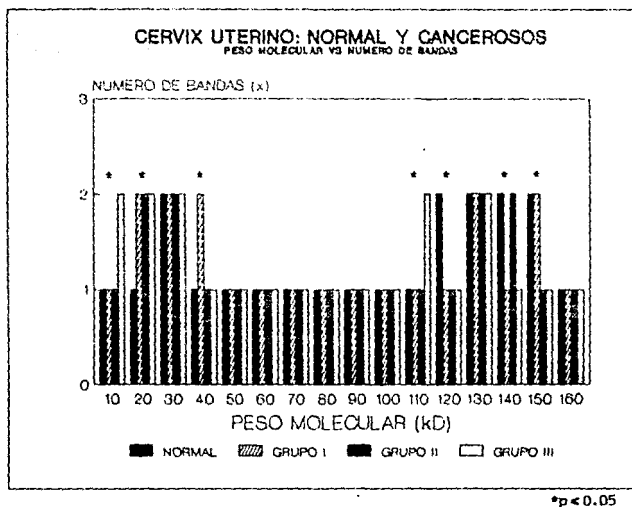
c) Las diferencias más notables se visualizan en el rango de 20 a 30 kD de PM en el que el grupo de Cu.N. es el que tiene el menor número de bandas proteicas ($p < 0.0001$);

En este análisis comparativo (Figura 11) el subgrupo III de Cu.Cu. es el que tiene las mayores diferencias comparado con el grupo de Cu.N. Los otros dos subgrupos de cáncer (I y II) se asemejan al grupo normal de Cu.

4) Finalmente, también se realizó el análisis comparativo de las imagenes densitométricas, cuyos aspectos más sobresalientes se revisan a continuación:

La Fig. 21 muestra los trazos densitométricos representativos tanto del grupo de Cu.N. como el de los 3 subgrupos del tejido de Ca.Cu. En primera instancia se observa que los subgrupos de Ca.Cu. muestran mayor número de áreas correspondientes a las bandas proteicas más reproducibles comparados con las que tiene el grupo de Cu.N. Este hecho apoya la sugerencia de que el contenido proteico de membrana citoplasmática de Ca.Cu. consta de un mayor número de proteínas que las que cuenta la membrana plasmática de Cu.N. Otra observación sobresaliente es la existencia de un pico proteico bastante prominente (el número 5), en el trazo densitométrico del grupo de Cu.N. En ninguno de los trazos densitométricos de los 3 subgrupos de Ca.Cu. existe un trazo equivalente. Esta característica distintiva del grupo de Cu.N. ya se había visualizado y descrito al estudiar la imagen electroforética de su contenido proteico y se confirma a nivel densitométrico.

Respecto al análisis comparativo de la concentración proteica de las bandas mejor definidas tanto del grupo de Cu.N. como de los subgrupos de Ca.Cu. (Tabla 11), se observa que una de las diferencias más notables, con una $p < 0.001$, es la que muestra la proteína con un PM de 63 kD del grupo de Cu.N.; pues es la que tiene una mayor concentración comparada con las pro



GRAFICA VI.

Comparación del Promedio de Bandas Protéicas, entre el Grupo del tejido de Cu.N. *VERSUS* los Subgrupos resultantes del tejido de Co.Cu., Invasor (I, II y III); que hay en cada uno de los rangos de Peso Molecular que se muestran en la Gráfica.

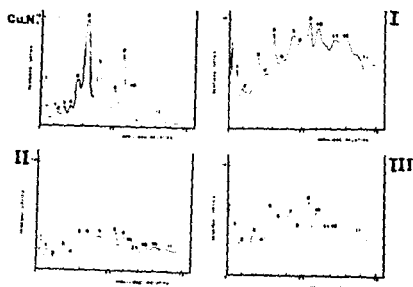


FIGURA 5.

Comparación de cada uno de los trazos Densitométricos representativos de geles de poliacrilamida-SDS al 7.5% (tenidos con Azul de Coomassie), que contienen una concentración de 50 μ g de proteína total (por gel), de fracción de membrana citoplasmática de células epiteliales del tejido de Cu.N., y de cada uno de los Subgrupos resultantes del tejido de Cu.Cu. Invasor (I, II, III).

Todas las áreas delimitadas, en cada uno de los 4 trazos densitométricos observados, representan las bandas proteicas más reproducibles del gel, y el origen de cada uno de estos 4 trazos, coincide con el inicio del gel. Los trazos observados, se utilizaron para obtener los resultados de la Tabla 2.

teínas, con un similar PM, de los 3 subgrupos de Ca.Cu. Comparando el grupo de Cu.N. con cada uno de los subgrupos de Ca.Cu., a nivel de concentración proteica, se observa que los subgrupos de Ca.Cu. II y III, muestran las mayores diferencias con respecto al grupo de Cu.N. y éstas diferencias son estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Mientras que el subgrupo I de Ca.Cu. es el que tiene una mayor semejanza en este aspecto con el grupo de Cu.N. así como en el número de bandas seleccionadas, por ser las mayormente reproducibles, a nivel densitométrico.

Es importante señalar que los picos proteicos se acomodaron de acuerdo a su PM y no por el número que se les asignó en el trazo densitométrico.

TABLA J. COMPARACION DE LA CONCENTRACION PROTEICA DE LAS BANDAS POLIPEPTIDICAS MEJOR DEFINIDAS, A PARTIR DEL TRAZO DENSITOMETRICO, ENTRE EL GRUPO DE CU.N., -- VERSUS SUBGRUPOS DE CA.CU. INVASOR.

CERVIX NORMAL			SUBGRUPO I			SUBGRUPO I I			SUBGRUPO I I I		
A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
5	72,000	4.200	No se observa una banda proteica con un PM, similar.*			5	71,000	3.200	No se observa una banda proteica con un PM, similar.*		
6	63,000	12.900 *	6	65,000	2.201	No se observa una banda -- proteica con un PM, similar *			6	64,000	2.899
7	53,000	6.980	7	51,000	5.360	7	50,000	5.978	No se observa una banda proteica con un PM, similar.*		
8	41,000	4.690	8	42,000	2.328	No se observa una banda -- proteica con un PM, similar *			9	40,000	5.000
9	37,000	5.550	9	38,000	4.631	8	38,000	5.644	No se observa una banda proteica con un PM, similar.*		
10	33,000	3.610	10	31,000	5.280	10	32,000	3.178	11	32,000	2.207

*p < 0.05

A = No. de banda proteica.
 B = PM (daltons).
 C = [Prot] μ g

5. DISCUSION

El análisis del contenido protéico de la membrana citoplasmática de una célula eucariótica depende de una serie de factores; los que determinan que los resultados obtenidos sean altamente reproducibles y confiables. Entre estos factores están:

- a) El modelo experimental que se utilice para el estudio. Este factor es de suma importancia cuando se trata de explicar un fenómeno ocurrido en un ser humano, porque dependiendo del modelo experimental utilizado, los resultados obtenidos serán más o menos extrapolables a lo que sucede en el hombre. En este aspecto el uso de tejido humano en fresco es el modelo de experimentación más adecuado; aunque también tiene algunos inconvenientes como el no poder contar continuamente con el suficiente material de estudio proveniente de la misma fuente. Por ello los reportes usando tejido humano en fresco, son pocos pero de gran valía (68).

En el presente trabajo de investigación, se hizo el análisis de los componentes protéicos de membrana plasmática de células de tejido epitelial, tanto tumoral como normal de cérvix uterino humano en fresco. La obtención de las muestras, fue relativamente fácil y aunque no fue posible coleccionar más de una vez tejido de la misma paciente sólo se procesaron aquellas muestras cuyo peso fue el suficiente para realizar duplicados del análisis protéico.

b) Otro factor que influye en la confiabilidad de los resultados, es la técnica utilizada para el aislamiento de membrana citoplasmática. Este punto es crucial, ya que de ella dependen los resultados que se obtengan y la interpretación de los mismos. En este trabajo la purificación de la fracción rica en membrana citoplasmática se realizó utilizando la Técnica de Jorgensen (74), que consiste en someter el tejido a una homogenización en politrón y en homogenizador vidrio-teflón para disgregar y romper las células. Posteriormente por centrifugación diferencial, se obtiene una fracción rica en membrana citoplasmática. El amortiguador de homogenización contiene principalmente Sacarosa y Tris y es libre de inhibidores de proteasas. El aislamiento de membrana plasmática del tejido humano en fresco de cérvix uterino, presentó cierta dificultad dependiendo del tipo de tejido (Cu.N. o Ca.Cu.).

La dificultad fue mayor en el caso del Cu.N. ya que en este tejido, las células epiteliales están muy unidas una con otra sin que el tejido conectivo se entremezcle en ellas, lo que da como resultado un tejido duro y muy compacto de difícil disgregación; por lo que la trituración con bisturí tuvo que ser muy fina y aún así la homogenización resultó difícil. Es posible que el rompimiento de la membrana celular en fragmentos muy pequeños pudiera causar pérdida de éstos, repercutiendo en el rendimiento de la fracción rica en membrana citoplasmática.

Contrariamente, la purificación de la membrana celular del tejido de Ca.Cu. fue más sencillo; debido a que este tejido es muy friable; es decir, las células son de fácil disgregación. En éste caso el tejido conectivo, se encuentra infiltrado por las células epiteliales; lo cual resulta en un tejido epidérmico sumamente blando. La trituración con bisturí a la que se sometió este tejido no fue tan fina y la homogenización resultó fácil.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Uno de los puntos que se tiene que tomar en cuenta para considerar si la técnica empleada para la purificación de la membrana celular es la adecuada, es el grado de pureza de la fracción membranal aislada. Esta evaluación generalmente se realiza mediante la cuantificación de la actividad de enzimas marcadoras específicas de membrana citoplasmática y la observación de las características morfológicas de la muestra con microscopía electrónica. Con el propósito de determinar el grado de pureza de la fracción membranal aislada a partir de las células epiteliales de tejido humano en fresco de cérvix uterino, se utilizaron estas dos metodologías.

El análisis enzimático se realizó tanto en el homogenado como en la fracción rica en membrana citoplasmática y se usaron 2 marcadores: uno de membrana citoplasmática (la 5'-Nucleotidasa) y otra de citoplasma (la Deshidrogenasa Láctica). Respecto a la actividad específica de la 5'-Nucleotidasa, los niveles encontrados en la fracción membranal tanto de Cu.N. como de Ca.Cu. no fueron comparables a los reportados en la literatura, para otro tipo de tejido. Así, en cérvix uterino se encontró que esta enzima tiene un enriquecimiento en la fracción de membrana celular de 2 a 3 veces comparada con el homogenado; mientras que en otros tejidos como pulmón humano (75); tumores humanos diversos, como astrocitoma, melanomas y carcinoma de células en avena (66); glándula mamaria de rata (77); hígado de rata (65); y aún en una línea celular derivada de un carcinoma de cérvix uterino como Hela (78); el enriquecimiento de ésta enzima en membrana celular, va de 10 a 120 veces en comparación con la encontrada en homogenado celular. Esta actividad tan disminuida encontrada en el presente trabajo podría sugerir en primera instancia, que la fracción membranal obtenida por nosotros, no fue del todo pura y que probablemente esté contaminada con fracciones de otros organelos celulares. Sin embargo, el análisis morfológico con microscopía electrónica de la fracción membranal aislada descartó una probable contaminación, ya que en las microfografías se observa claramente que predominan vesículas mem

branales y solamente se visualizan algunos vestigios de retículo endoplásmico liso.

Sería conveniente para futuros trabajos determinar el grado de pureza de la fracción membranal aislada de tejido de cérvix uterino, usando además de la 5'-Nucleotidasa otras enzimas marcadoras específicas de membrana plasmática, tales como la ATPasa - Na^+/K^+ (79); aunque hay que recordar que se ha demostrado que algunos de los marcadores enzimáticos estándar de membrana celular (88), tienen diferentes patrones de distribución en distintos tejidos y células.

También es recomendable realizar el análisis enzimático, enseguida que se aisle la fracción microsomal; ya que la actividad específica de una enzima, disminuye conforme pasa el tiempo (79). Así que se debe considerar el tiempo de almacenaje de la fracción microsomal, antes de realizar un análisis enzimático.

Otro aspecto que hay que tomar en cuenta es la lateralidad de la membrana. Se ha demostrado que cuando se aisle este organelo, al encontrarse en un medio acuoso, forman vesículas cerradas que muchas veces al sellarse invierten su orientación original; es decir, la parte de la superficie membranal externa ahora queda como superficie interna en la vesícula; y la parte interna de la membrana, queda hacia el exterior de la vesícula. Debido a esto los componentes macromoleculares de la membrana cambian también de orientación (2). Además, de cambiar su orientación original las vesículas membranales al sellarse pueden atrapar en su interior otras macromoléculas principalmente, de origen citoplasmático y restos de otros organelos de la célula.

Estos hechos son sumamente importantes, ya que el sitio activo de la mayoría de las enzimas que se encuentran en la membrana celular, está ubicado en su parte interna (8); y si éste quedó en el interior de la vesícula, por lo tanto los niveles de actividad específica de las mismas, son bajos. Para evitar ésta situación, se recomienda agregar un detergente como el tritón, para disolver un poco la matriz lipídica membranar; liberando de ésta forma sus otros componentes macromole-

culares (proteínas y carbohidratos) (79) permitiendo así, el paso del sustrato para que pueda ser cuantificada la actividad de la enzima marcadora en estudio.

Por su parte, la Deshidrogenasa Láctica mostró una mayor actividad específica en el homogenado celular que en la fracción membranal, tanto en *Cc. Cu.* como en *Cu. N.* Esta actividad fue de 3 a 8 veces más alta. En éste caso también se esperaba que hubiera un mayor enriquecimiento de ésta enzima en el homogenado celular y casi ninguno en la fracción membranal. Pero, como ya se señaló en el caso anterior, se debe tener mucho cuidado en la interpretación de los resultados por las razones anteriormente expuestas. Lo que sí es de llamar la atención es que la actividad enzimática de la Deshidrogenasa Láctica en el homogenado celular del tejido de *Cc. Cu.* fue 56 veces mayor que en el homogenado celular del *Cu. N.* Está reportado (80) que niveles altos de Deshidrogenasa Láctica en suero, se asocian con algunos procesos tumorales malignos: como en Linfomas No Hodgking y Sarcomas; por lo que la cuantificación de ésta enzima es un apoyo en el diagnóstico de éste tipo de lesiones. Los niveles de Deshidrogenasa Láctica en suero, junto con otras enzimas como creatinina fosfoquinasa, transaminasa oxalacética, transaminasa pirúvica, entre otras, son parámetros que sirven de apoyo en el diagnóstico de padecimientos cardíacos (infartos al miocardio); o hepáticos (17 y 80). Respecto al tejido humano en fresco de cérvix uterino neoplásico se ha reportado (81), que existe un incremento en los niveles de la isoenzima Deshidrogenasa Láctica-5.

La función de la enzima Deshidrogenasa Láctica, es la de intervenir en la última etapa de la Glucólisis; en la que el piruvato se reduce a lactato. Debido a que ésta reacción es catalizada por la Deshidrogenasa Láctica (5); se sugiere que la alta actividad de la Deshidrogenasa Láctica encontrada en el homogenado celular de *Cc. Cu.* comparada con *Cu. N.* es una indicación de que las células transformadas tienen una alta actividad energética; característica distintiva de éste tipo de

células. Este punto es tema de otro trabajo de investigación que sería interesante abordar en un futuro.

Uno de los factores que se sugiere que altera la estructura y configuración de la membrana celular y específicamente de sus proteínas, es la acción proteolítica de algunas enzimas (25 y 61). Por ello, en varios de los reportes donde se trabaja con membrana citoplasmática, al momento de su aislamiento, se utiliza un amortiguador el cual contenga, entre otros compuestos, inhibidores de proteasas (42, 61, 68 y 75). Sin embargo, en este trabajo no se utilizó ningún tipo de inhibidor de proteasas para la separación de la membrana celular. A pesar de ello, se obtuvo una gran reproducibilidad en la imagen electroforética de las proteínas membranales; tanto las del tejido de *Cu.N.*, como las del tejido de *Ca.Cu.* Si las enzimas proteolíticas hubieran afectado a las proteínas membranales, se esperaría que las imágenes electroforéticas tuvieran una enorme variabilidad y no se hubiera podido observar un patrón proteico membranar. Este aspecto ya se ha reportado en la literatura por Rogan y col. (67), quien llevó a cabo ensayos para determinar si la proteólisis celular, era un factor importante en la variabilidad de los patrones proteicos membranales de distintas líneas celulares y encontró que no existe diferencia en los patrones proteicos obtenidos en presencia o ausencia de inhibidores proteolíticos. Estos resultados concuerdan con nuestros hallazgos respecto a que la proteólisis celular es un factor que aparentemente no afecta la imagen electroforética de las proteínas membranales. Tal vez lo que sucede, es que la acción de las enzimas proteolíticas se dé en mayor o menor medida, dependiendo del tipo de tejido con el que se trabaja. Sin embargo no hay que olvidar, que en el caso de un tejido neoplásico, incluyendo el de cérvix uterino, hay una actividad proteolítica elevada (25 y 76), que ayuda a que las células tumorales, invadan o metastatizen otros tejidos. Además se ha observado, que ésta actividad proteolítica es todavía mayor cuando en el tejido neoplásico hay sitios con procesos inflamatorios (35).

Se puede sugerir para completar y confirmar este estudio la reproducibilidad de los patrones proteicos de la presente investigación llevar a cabo un experimento similar al realizado por Rogan y col' (67), para comprobar si las proteasas no alteran las imágenes electroforéticas obtenidas de membrana celular de cérvix uterino.

Ya se había señalado que la selección de la Técnica de aislamiento de membrana citoplasmática más adecuada, era un punto crucial y que de ello dependían los resultados que se obtuvieran así como la interpretación de los mismos. Al evaluar la Técnica de Jorgensen (74) utilizada en este trabajo a partir de los resultados obtenidos, se puede decir, que esta técnica será más adecuada para este tipo de tejido haciéndole ciertas modificaciones; como son:

- a) Usar enzimas proteolíticas (tripsina, pronasa, papaína, etc) (79), como tratamiento para aquellos tejidos de difícil disgregación celular, debido a su consistencia compacta y dura; como es el caso del tejido en fresco humano de C.V.N. No obstante, se debe tener mucho cuidado con este tipo de tratamientos, ya que se ha reportado que las enzimas proteolíticas, ocasionan la eliminación de parte de los polipéptidos expuestos en la membrana celular (81):
- b) La utilización de un gradiente discontinuo de Sacarosa después de la obtención de la fracción microsomal; para asegurar una mayor purificación y enriquecimiento de la fracción de membrana citoplasmática. Casale (75) y Charterjee (62) usaron gradientes discontinuos de Sacarosa para un mayor rendimiento y pureza de su fracción membranar aislada a partir de tejidos en fresco;
- c) Determinar el grado de pureza de la fracción membranar aislada, por medio del análisis de por lo menos 3 ó 4 marcadores enzimáticos de distintos organelos celulares además de los de membrana citoplasmática. Tales como la

Citocromo C oxidasa o la Deshidrogenasa Succinica ambas enzimas especificas de mitocondria; la Citocromo C reductasa marcadora de microsomas en general; la D-Glucouronidasa o Fosfatasa Acida especificas de lisosomas, y la Glucosa 6 Fosfatasa marcadora de reticulo endoplasmico, entre otras (88, 79, 82 y 89).

El objetivo principal del presente trabajo de investigación, fue determinar un patrón proteico de membrana citoplasmatica de células epiteliales, tanto de tejido de Cu.M. como de tejido de Co.Cu. y establecer las semejanzas y diferencias que tienen entre sí. Los resultados obtenidos al respecto se analizan a continuación:

Uno de los hallazgos más sobresalientes, fue que el contenido proteico de la membrana citoplasmatica de células epiteliales de tejido en fresco humano de Cu.M. presenta una reiterada constancia y una alta reproducibilidad de su imagen electroforética, en los 29 casos analizados; es decir, muestran un Patrón Proteico característico. Se han reportado resultados similares en otro tipo de células, tal es el caso de Hogg (42), quien trabajando con líneas celulares de fibroblastos, derivados de ratón BALB C 3T3; encontró que las bandas proteicas de membrana plasmática de células normales marcadas con Lactoperoxidasa iodinada (I^{125}), tienen un patrón proteico idéntico en todos los casos estudiados.

El hecho de determinar un patrón proteico de membrana citoplasmática de cualquier tipo celular, ya es un avance muy importante; pero el hacerlo a partir de células de un tejido humano en fresco, tiene aún más relevancia debido al grado de dificultad que representa trabajar con un tejido humano en fresco y a las perspectivas de investigación que representa éste hallazgo. El análisis del patrón proteico obtenido de Cu.M. permitió observar la existencia de dos grupos proteicos que van de 30 a 75 kD de PM, cuya concentración es mayor que

la del resto de las bandas proteicas. Además la banda que presenta la mayor cantidad de proteína forma parte de uno de los 2 grupos proteicos antes mencionados y su PM es de 63 kD. Esta banda proteica, altamente densa, es la característica distintiva del patrón proteico del tejido de *D.M.V.* Las técnicas de análisis de proteínas utilizadas en éste trabajo de investigación, no permiten tener un conocimiento más completo de las proteínas que constituyen los dos grupos que caracterizan el patrón proteico de *D.M.V.* y en general, de todas las demás proteínas que lo conforman. A este respecto sería muy interesante estudiar a que tipo de proteínas membranales pertenecen (periféricas, integrales o transmembranales). Este análisis, por lo general, se realiza usando técnicas de marcaje enzimático de proteínas que evidencian un determinado tipo de proteína según la enzima marcadora utilizada; por ejemplo la Lactoperoxidasa que incorpora un átomo de yodo radiactivo a los residuos de Tirosina de un polipéptido expuesto o la Galacto-oxidasa, que asocia átomos de tritio en los residuos de galactosa y galactosamina de las cadenas de carbohidratos (2). Otra forma de abordar este problema es incubando las membranas con enzimas proteolíticas; como tripsina, pronasa, papaína, etc., (79 y 84); las cuales eliminan las proteínas completas o las partes expuestas dependiendo del tipo de proteína de que se trate (integral o periférica). Después de que las membranas se someten al tratamiento enzimático, se hace la separación proteica por electroforesis. Finalmente se identifican el tipo al que pertenecen estas proteínas, por medio de la tinción con un determinado colorante (en el caso de que las membranas se incuben con enzimas proteolíticas); o por medio de autorradiografía (si se marcan radioactivamente). Para determinar si las moléculas que constituyen las diferentes bandas son proteínas puras (glucoproteínas o lipoproteínas); generalmente se usan ciertos colorantes para teñir las bandas proteicas separadas por electroforesis (15 y 85). Así, el azul de Coomassie, tiñe casi a todas las proteínas, a excepción de aquellas que contengan grandes cantidades de azú

cares y las que se encuentran en poca cantidad. El ácido periódico de Schiff (PAS) tiñe carbohidratos, en particular, el ácido siálico por lo que colorea aquellas proteínas altamente glucosiladas, mientras que el nitrato de plata, es usado para teñir la mayor parte de las proteínas; y se caracteriza por ser un método altamente sensible y con una excelente resolución ya que es capaz de teñir proteínas con un bajo contenido de material.

También es necesario conocer si las distintas bandas proteicas observadas están constituidas por una sola o varias proteínas. Este punto se podría elucidar utilizando la electroforesis bidimensional (85); o las técnicas de purificación de proteínas por electroforesis unidimensional (87 y 87); entre otras.

También es importante saber la función que desempeñan las proteínas observadas. Este análisis es más complicado ya que se requiere, primeramente, de la caracterización de la proteína para poder investigar la función que lleva a cabo.

Estos son algunos aspectos que se podrían abordar en futuros trabajos de investigación a partir del patrón proteico de C.v.N. obtenidos. A nivel clínico, también existen cuestiones interesantes que se podrían analizar a partir de los resultados encontrados, como es investigar si el perfil proteico de membrana citoplasmática de C.v.N. es igual en cada una de las etapas endocrinomenopáusicas de la mujer? y ¿cómo se altera dicho patrón proteico de C.v.N. con el uso de agentes hormonales como los anticonceptivos?. Como puede observarse, queda bastante por estudiar con relación al contenido proteico de membrana citoplasmática de células epiteliales de C.v.N.; ya que lo aquí encontrado y planteado apenas es un punto de inicio de lo que puede analizarse al respecto.

Por su parte, el contenido proteico de membrana plasmática de células epiteliales de tejido humano en fresco de Ca.Cu. no mostró una misma imagen electroforética igual en los 50 casos estudiados. Se encontraron 3 imágenes distintas por lo cual el total de casos se dividió en 3 subgrupos bien defini-

dos para su posterior análisis. Los reportes que hay al respecto con otro tipo de células, son un tanto controver-sionales; Litin y col. (68), trabajando con líneas celulares de fibroblastos de ratón BALB C, normales y transformadas, demostraron que no todas las líneas celulares transformadas dan un patrón proteico característico y que las imágenes electroforéticas encontradas de estas líneas celulares transformadas están alteradas con respecto a la imagen observada en líneas celulares normales. Contrariamente August y Strand (69), sugirieron que algunas células transformadas, pueden tener un patrón proteico bidimensional característico, el cual está alterado con relación al patrón de las células normales. En el presente trabajo a pesar de que el tejido de Ca.Cu. no presenta un patrón único en las 50 muestras analizadas, se observó que algunas de las muestras presentan imágenes electroforéticas similares entre ellas; por lo que se puede deducir que tienen un contenido proteico semejante y por lo tanto un patrón proteico característico. Además es obvio que los patrones proteicos de membrana celular de Ca.Cu. están alterados con respecto al patrón proteico de Cu.N. lo cual se discutirá más adelante.

El análisis de los estudios comparativos entre los 3 subgrupos de Ca.Cu. permitió observar varios aspectos interesantes: La mayoría de las diferencias entre estos 3 subgrupos de Ca.Cu. se presentan en PM altos, mayores a los 90 kD. Contrariamente Knowles y col. (66), trabajando con membrana cito-plasmática de tumores en fresco de melanoma, astrocitoma y carcinoma de pulmón, encontraron que electroforéticamente, las diferencias distintivas entre los diferentes tumores, fueron en péptidos de bajo PM (40 kD).

Otro aspecto interesante fue que dos de los subgrupos de Ca.Cu. el II y el III, son muy similares entre sí ya que a nivel cuantitativo, las diferencias observadas fueron realmente pocas. Este hecho sugiere dos posibilidades: una es que a pesar de que las diferencias son mínimas, en verdad se trate de

dos subgrupos de *Ca.Cu.* distintos, o bien puede tratarse de un sólo subgrupo de *Ca.Cu.* y las pequeñas diferencias observadas, son debidas a las diferentes condiciones de experimentación en las que se realizaron los ensayos. Este tipo de cuestionamientos podrían elucidarse realizando ensayos más sensibles de separación de proteínas, como los ya mencionados anteriormente (electroforesis bidimensional, marcaje de membranas, etc.).

Contrariamente, el subgrupo I fue el que tuvo las mayores diferencias comparándolo con los otros dos subgrupos (II y III); dichas variaciones fueron principalmente a nivel cuantitativo, sobresaliendo el hecho que el subgrupo I tiene un mayor número de bandas protéicas, altamente reproducibles entre los 31 a 65 kD de PM. Esto se determinó mediante el análisis densitométrico; ya que en la imagen electroforética no fue posible visualizarlo con una buena definición. Además este subgrupo presenta una menor concentración de proteína, al menos en la mayoría de las bandas protéicas analizadas en éste aspecto.

LITIN y col. (88), analizando por electroforesis bidimensional el contenido protéico de membrana celular de diferentes líneas celulares de fibroblastos de ratón, observaron que aquellas células transformadas que tenían un mismo origen, mostraron muchas similitudes; mientras que aquellas con diferente origen; tenían mayores desigualdades en su contenido protéico membranaral. sin embargo no hay que perder de vista que todas las líneas celulares fueron de fibroblastos de ratón BALB/C 3T3.

Los resultados obtenidos a partir de la comparación de los subgrupos de *Ca.Cu.* son de gran importancia, ya que sugieren que en una misma neoplasia aún con el mismo diagnóstico histopatológico hay una heterogeneidad, en cuanto al contenido protéico de membrana plasmática. Esto podría llevar a suponer que la evolución biológica del tumor, es diferente en cada uno de los 3 subgrupos de *Ca.Cu.* que se encontraron. Lo que se podría corroborar realizando otro estudio correlacionando nuestros resultados con algunos parámetros clínicos e

histopatológicos de las muestras de las pacientes estudiadas.

La comparación de los patrones protéicos de la membrana citoplasmática de células epiteliales del tejido de *Cu.Cu.* contra el patrón protéico de membrana plasmática de células epiteliales del tejido de *Cu.N.* dió como resultado varios puntos de suma importancia. En principio, la observación más interesante fue que los 3 tipos distintos de patrones protéicos resultantes del tejido de *Cu.Cu.* están alterados con respecto al patrón protéico del tejido de *Cu.N.* Las modificaciones se encontraron en proteínas tanto de alto como de bajo PM. Respecto a las alteraciones observadas en PM altos, se puede mencionar que en el tejido de *Cu.N.* existe un mayor número de bandas protéicas con un PM mayor de 110 kD, comparado con los 3 patrones protéicos de membrana del tejido de *Cu.Cu.* En otros tipos celulares, se ha reportado que las mayores alteraciones que se observan en las proteínas membranales de una célula transformada, se encuentran en altos PM. Así, Litin y col. (88), trabajando con fibroblastos de ratón BALB/C normales y neoplásicos, observaron que la mayoría de las diferencias entre estas células ocurren en las proteínas de membrana y en las glicoproteínas membranales de un PM mayor a 100 kD. Hogg (42), por su parte trabajando también con líneas celulares de fibroblastos de ratón BALB/C, encontró que la mayor diferencia entre las células normales y transformadas fue la presencia en la célula normal comparada con la ausencia en la célula neoplásica, de una proteína membranal de aproximadamente 250 kD. Y Bannikov y col. (18), utilizando líneas celulares epiteliales de hígado de rata normal y transformado; reportó que todas las líneas celulares transformadas, tienen una proteína alterada de 135 kD de PM.

Debido a éstos y a otros reportes de la literatura, se ha llegado a la conclusión de que una de las características distintivas de una célula cancerosa y específicamente de su membrana celular, es la pérdida completa o parcial de algunos de sus elementos protéicos; o bien la modificación de los mismos. En el caso de esta última alteración también se modifi

ca la migración electroforética de estos elementos y cambian de posición. Por lo general, se ha observado que las moléculas que muestran este tipo de alteraciones son glicoproteínas de alto PM (19 y 25). Pero cabe resaltar, que la mayoría de los reportes a éste respecto, son trabajos realizados en líneas celulares; y muy pocas son las publicaciones donde se ha trabajado con tejido en fresco.

También se encontró que los 3 patrones proteicos del tejido de *Ca.Cu.*, constan de un mayor número de bandas proteicas de bajo PM entre 10 a 40 kD. Nicolsen y col. (25), entre otros, reportaron que otra de las características por las que se diferencia una célula transformada es la aparición, en la membrana citoplasmática, de nuevos antígenos (proteínas tumorales). Se ha sugerido que dichos antígenos son uno de los elementos macromoleculares que proporcionan a la célula cancerosa la capacidad para evadir el sistema inmune del individuo que las contiene y evitar ser eliminadas; así como la destreza para invadir y metastatizar otros órganos del mismo individuo y así seguir proliferando y subsistiendo. Esta es una de las explicaciones más factibles respecto a la aparición de otras bandas proteicas en la membrana citoplasmática de las células cancerosas. En el presente trabajo de investigación existe la posibilidad de que las bandas proteicas de bajo PM presentes exclusivamente en los patrones proteicos del tejido de *Ca.Cu.*, sean producto de la degradación de proteínas existentes en el mismo patrón proteico debido a la acción de enzimas proteolíticas presentes en el contenido polipeptídico de la membrana citoplasmática, ya que se usó un amortiguador libre de inhibidores de éstas enzimas. Y aunque los 3 patrones proteicos del tejido de *Ca.Cu.* encontrados en este trabajo fueron reproducibles y homogéneos, cabe la posibilidad de que existan una o varias enzimas proteolíticas que actúen siempre sobre una misma proteína. Es necesario para futuros trabajos del mismo tipo que el presente, introducir ensayos en los que se incluyan inhibidores de proteasas

dos para su posterior análisis. Los reportes que hay al respecto con otro tipo de células, son un tanto controversiales; Latin y col. (82), trabajando con líneas celulares de fibroblastos de ratón BALB C, normales y transformadas, demostraron que no todas las líneas celulares transformadas dan un patrón proteico característico y que las imagenes electroforéticas encontradas de éstas líneas celulares transformadas están alteradas con respecto a la imagen observada en líneas celulares normales. Contrariamente August y Strand (88), sugirieron que algunas células transformadas, pueden tener un patrón proteico bidimensional característico, el cual está alterado con relación al patrón de las células normales. En el presente trabajo a pesar de que el tejido de Ca.Cu. no presenta un patrón único en las 50 muestras analizadas, se observó que algunas de las muestras presentan imagenes electroforéticas similares entre ellas; por lo que se puede deducir que tienen un contenido proteico semejante y por lo tanto un patrón proteico característico. Además es obvio que los patrones proteicos de membrana celular de Ca.Cu. están alterados con respecto al patrón proteico de Cu.N. lo cual se discutirá más adelante.

El análisis de los estudios comparativos entre los 3 subgrupos de Ca.Cu. permitió observar varios aspectos interesantes: La mayoría de las diferencias entre estos 3 subgrupos de Ca.Cu. se presentan en PM altos, mayores a los 90 kD. Contrariamente Knowles y col. (86), trabajando con membrana citoplasmática de tumores en fresco de melanoma, astrocitoma y carcinoma de pulmón, encontraron que electroforéticamente, las diferencias distintivas entre los diferentes tumores, fueron en péptidos de bajo PM (40 kD).

Otro aspecto interesante fue que dos de los subgrupos de Ca.Cu. el II y el III, son muy similares entre sí ya que a nivel cuantitativo, las diferencias observadas fueron realmente pocas. Este hecho sugiere dos posibilidades; una es que a pesar de que las diferencias son mínimas, en verdad se trate de

dos subgrupos de Co.Cu. distintos; o bien puede tratarse de un sólo subgrupo de Co.Cu. y las pequeñas diferencias observadas, son debidas a las diferentes condiciones de experimentación en las que se realizaron los ensayos. Este tipo de cuestionamientos podrían elucidarse realizando ensayos más sensibles de separación de proteínas, como los ya mencionados anteriormente (electroforesis bidimensional, marcaje de membranas, etc.).

Contrariamente, el subgrupo I fue el que tuvo las mayores diferencias comparándolo con los otros dos subgrupos (II y III); dichas variaciones fueron principalmente a nivel cuantitativo, sobresaliendo el hecho que el subgrupo I tiene un mayor número de bandas proteicas, altamente reproducibles entre los 31 a 65 kD de PM. Esto se determinó mediante el análisis densitométrico, ya que en la imagen electroforética no fue posible visualizarlo con una buena definición. Además este subgrupo presenta una menor concentración de proteína, al menos en la mayoría de las bandas proteicas analizadas en éste aspecto.

Litin y col. (88), analizando por electroforesis bidimensional el contenido proteico de membrana celular de diferentes líneas celulares de fibroblastos de ratón, observaron que aquellas células transformadas que tenían un mismo origen, mostraron muchas similitudes; mientras que aquellas con diferente origen; tenían mayores desigualdades en su contenido proteico membranar, sin embargo no hay que perder de vista que todas las líneas celulares fueron de fibroblastos de ratón BALB/C 3T3.

Los resultados obtenidos a partir de la comparación de los subgrupos de Co.Cu. son de gran importancia, ya que sugieren que en una misma neoplasia aún con el mismo diagnóstico histopatológico hay una heterogeneidad, en cuanto al contenido proteico de membrana plasmática. Esto podría llevar a suponer que la evolución biológica del tumor, es diferente en cada uno de los 3 subgrupos de Co.Cu. que se encontraron. Lo que se podría corroborar realizando otro estudio correlacionando nuestros resultados con algunos parámetros clínicos e

histopatológicos de las muestras de las pacientes estudiadas.

La comparación de los patrones protéicos de la membrana citoplasmática de células epiteliales del tejido de Co.Cu. contra el patrón protéico de membrana plasmática de células epiteliales del tejido de Cu.N. dió como resultado varios puntos de suma importancia. En principio, la observación más interesante fue que los 3 tipos distintos de patrones protéicos resultantes del tejido de Co.Cu. están alterados con respecto al patrón protéico del tejido de Cu.N. Las modificaciones se encontraron en proteínas tanto de alto como de bajo PM. Respecto a las alteraciones observadas en PM altos, se puede mencionar que en el tejido de Cu.N. existe un mayor número de bandas protéicas con un PM mayor de 110 kD, comparado con los 3 patrones protéicos de membrana del tejido de Co.Cu. En otros tipos celulares, se ha reportado que las mayores alteraciones que se observan en las proteínas membranales de una célula transformada, se encuentran en altos PM. Así, Litin y col. (58), trabajando con fibroblastos de ratón BALB/C normales y neoplásicos, observaron que la mayoría de las diferencias entre estas células ocurren en las proteínas de membrana y en las glicoproteínas membranales de un PM mayor a 100 kD. Hogg (42), por su parte trabajando también con líneas celulares de fibroblastos de ratón BALB/C, encontró que la mayor diferencia entre las células normales y transformadas fue la presencia en la célula normal comparada con la ausencia en la célula neoplásica, de una proteína membranal de aproximadamente 250 kD. Y Bannikov y col. (18), utilizando líneas celulares epiteliales de hígado de rata normal y transformado; reportó que todas las líneas celulares transformadas, tienen una proteína alterada de 135 kD de PM.

Debido a éstos y a otros reportes de la literatura, se ha llegado a la conclusión de que una de las características distintivas de una célula cancerosa y específicamente de su membrana celular, es la pérdida completa o parcial de algunos de sus elementos protéicos; o bien la modificación de los mismos. En el caso de esta última alteración también se modifi

ca la migración electroforética de estos elementos y cambian de posición. Por lo general, se ha observado que las moléculas que muestran este tipo de alteraciones son glicoproteínas de alto PM (19 y 25). Pero cabe resaltar, que la mayoría de los reportes a éste respecto, son trabajos realizados en líneas celulares; y muy pocas son las publicaciones donde se ha trabajado con tejido en fresco.

También se encontró que los 3 patrones protéicos del tejido de *Ca.Cu.*, constan de un mayor número de bandas protéicas de bajo PM entre 10 a 40 kD. Nicolson y col. (25), entre otros, reportaron que otra de las características por las que se diferencia una célula transformada es la aparición, en la membrana citoplasmática, de nuevos antígenos (proteínas tumorales). Se ha sugerido que dichos antígenos son uno de los elementos macromoleculares que proporcionan a la célula cancerosa la capacidad para evadir el sistema inmune del individuo que la contiene y evitar ser eliminadas; así como la destreza para invadir y metastatizar otros órganos del mismo individuo y así seguir proliferando y subsistiendo. Esta es una de las explicaciones más factibles respecto a la aparición de otras bandas protéicas en la membrana citoplasmática de las células cancerosas. En el presente trabajo de investigación existe la posibilidad de que las bandas protéicas de bajo PM presentes exclusivamente en los patrones protéicos del tejido de *Ca.Cu.*, sean producto de la degradación de proteínas existentes en el mismo patrón protéico debido a la acción de enzimas proteolíticas presentes en el contenido polipeptídico de la membrana citoplasmática, ya que se usó un amortiguador libre de inhibidores de estas enzimas. Y aunque los 3 patrones protéicos del tejido de *Ca.Cu.* encontrados en este trabajo fueron reproducibles y homogéneos, cabe la posibilidad de que existan una o varias enzimas proteolíticas que actúen siempre sobre una misma proteína. Es necesario para futuros trabajos del mismo tipo que el presente, introducir ensayos en los que se incluyan inhibidores de proteasas

en el amortiguador utilizado para el aislamiento de membrana citoplasmática y otros en donde no se usen inhibidores y entonces comparar los patrones proteicos resultantes sugierencia que ya se había planteado en la presente discusión.

La disminución en la concentración de ciertas bandas proteicas en los 3 distintos patrones del tejido de *Ca.Cu.* comparados con el perfil proteico del tejido de *Cu.N.*, es otra de las diferencias más notables. Este aspecto fue más evidente en las bandas polipeptídicas con un PM mayor de 30 kD (33; 37; 41; 53 y 72 kD). Sin embargo, el decremento de material proteico más importante observado en los 3 perfiles del tejido de *Ca.Cu.* fue en la banda polipeptídica de 63 kD de PM; la cual se presenta, en una concentración muy alta en el patrón proteico del tejido de *Cu. N.* (13 μ g), comparada con los de *Ca.Cu.* (3 μ g).

En primera instancia lo que se tendría que analizar es si dicha banda proteica corresponde a la misma proteína altamente densa y con un PM similar que se observa en el patrón del tejido de *Cu.N.* Esto sería factible de llevar a cabo a través de la utilización de técnicas con anticuerpos monoclonales o policlonales (79).

Una vez que se tuviera la seguridad de que se trata de la misma o mismas proteínas en ambos tejidos, se podría sugerir que esta banda proteica de 63 kD presente en una alta concentración en el patrón de *Cu.N.*, está en menor concentración o está alterada de alguna forma en los patrones de *Ca.Cu.* El mismo análisis puede realizarse a todas aquellas bandas polipeptídicas de los patrones de *Ca.Cu.* que presentaron un decremento en el contenido de su material proteico.

Otra de las observaciones interesantes, producto de la comparación entre los perfiles proteicos de los tejidos de cérvix uterino normal y neoplásico; es que el subgrupo I del tejido de *Ca.Cu.* muestra características muy similares a las descritas para el patrón de *Cu.N.* sobre todo a nivel densitométrico. Los otros dos subgrupos tienen un patrón proteico

diferente al del C.U.A. Litin y col. (58), realizaron un análisis comparativo del contenido proteico de membrana citoplasmática en 5 líneas celulares transformadas y una normal derivadas de un sistema de fibroblastos de ratón BALB/C; y observaron que una de las clonas celulares, la 3T12T, presentaba características proteicas muy similares a las mostradas por la línea celular normal (A₃₁); a pesar de ser la línea celular más maligna de todas las estudiadas en este reporte. Por lo que sugirieron que, aparentemente, cambios múltiples en las proteínas y en glicolípidos membranales dan como resultado un incremento en la inmunogenicidad y un decremento en la tumorigenicidad de la célula transformada. En el presente estudio no se puede definir una situación similar a la reportada por Litin, dado que se desconocen la mayoría de las características histopatológicas así como la evolución clínica de las pacientes de las que se tomaron las muestras. Pero son puntos de sumo interés que quedan por estudiar y que se podrían retomar para futuras investigaciones.

La Técnica de Electroforesis en Geles de Poliacrilamida-SDS del tipo unidimensional, es uno de los métodos más empleados actualmente para el análisis bioquímico de proteínas celulares (2 y 5); y se considera que es capaz de una resolución altamente fina de las diferencias entre las proteínas en base a su carga y su tamaño (5). Por ello se considera adecuada para el estudio inicial del contenido proteico de la membrana citoplasmática de células epiteliales de tejido en fresco humano de cérvix uterino, tanto normal como canceroso; ya que no se tenían antecedentes de los cuales se pudiera partir. Sin embargo, hay que tener en cuenta en este estudio que es posible que no todas las proteínas estén en cantidad suficiente como para sobresalir en los patrones proteicos; pero a pesar de ello, pueden tener un papel muy importante en la función de la membrana. De aquí que se tenga que hacer uso de técnicas adicionales (79) que le proporcionen al método de electroforesis comúnmente empleado una mayor sensibilidad para el registro de proteínas escasas. Otro punto es

que algunas bandas protéicas, pueden ser representativas de polipéptidos citoplásmicos; que se adhieren a la membrana durante su preparación; o a la inversa, algunas proteínas de la membrana que están laxamente unidas pueden perderse. Por ello, se debe tener mucho cuidado en la interpretación de los patrones protéicos que se obtengan; así como en el manejo de las fracciones membranales de donde se van a extraer las proteínas para su análisis. Finalmente no hay que olvidar que algunas de las bandas que parecen ser una sólo proteína pueden estar formadas por varias de ellas. Debido a ésto, después de un primer análisis protéico por electroforésis unidimensional común, es indispensable realizar otras pruebas con mayor sensibilidad que permitan obtener resultados más veraces.

Como ocurre en la mayoría de los trabajos de investigación, a pesar de haber cumplido con los objetivos de este trabajo y haber corroborado la hipótesis; surgen nuevas inquietudes, algunas de ellas ya planteadas en la discusión, y que requieren del empleo de técnicas más sensibles y sofisticadas. Algunas de estas cuestiones son:

- 1) ¿Qué tipo de proteínas membranales, ya sea funcionales o estructurales, son las que están alteradas en los patrones protéicos del tejido de Ca.Cu.?
- 2) ¿Podría haber, una o varias proteínas cuyas características o su presencia o ausencia, defina el tipo de comportamiento que va a tener un determinado tipo tumoral de Ca.Cu.?
- 3) Tomando en cuenta los resultados aquí obtenidos como antecedente, ¿se podría llevar a cabo un estudio similar al presente en lesiones pre-cancerosas del Cu.; cuyo comportamiento biológico es aún impredecible? Quizás, algunas de las proteínas alteradas que se observaron en los

patrones del tejido de Ca.Cu., tengan un significado biológico clave relevante (por su presencia o ausencia), en el desarrollo de este tipo de lesiones.

Tal vez en un futuro el uso de la Electroforesis en el conocimiento del contenido protéico de la membrana celular, sea una herramienta más indispensable, para predecir o definir, el tipo de comportamiento biológico que pudiera tener una determinada lesión de tipo cancerosa del Cu.; lo cual ayudaría al clínico a elegir el tipo de tratamiento que se le proporcionaría a la paciente. Más aún, si el estudio se realizara en lesiones pre-malignas y resultara positivo, sería de mucho más valor ya que se podría predecir, junto con otros parámetros clínicos ya establecidos, cuando una lesión precancerosa evolucionaría a una francamente cancerosa, o cuando retornaría a un estado "normal"; algo ideal en el estudio del Cáncer.

9. CONCLUSIONES.

El objetivo fundamental del presente trabajo de investigación, fue conocer de manera general, las alteraciones en el contenido protéico de la membrana citoplasmática de células epiteliales de tejido en fresco humano de *Ca.Cu.* comparado con *Cu.N.* y las conclusiones a las que se llegaron fueron las siguientes:

- 1) Fue posible obtener un Patrón Protéico característico altamente reproducible, de membrana citoplasmática de células epiteliales de tejido de *Cu.N.*
- 2) Al estudiar el contenido protéico de membrana citoplasmática de las células epiteliales de tejido de *Ca.Cu.*, *Epidermoide Invasor*, se observaron 3 tipos distintos de patrones protéicos de los cuales, uno de ellos fue el más predominante. Pero no se encontró, un patrón protéico único y característico del *Ca.Cu.*

Al hacer un análisis comparativo de los patrones protéicos obtenidos, tanto de *Cu.N.* como de *Ca.Cu.* se encontró lo siguiente:

- a) Los 3 patrones protéicos derivados de *Ca.Cu.*, están alterados con respecto al de *Cu.N.*
- b) Las alteraciones que mostraron los patrones protéicos de *Ca.Cu.*, se presentaron tanto en proteínas de alto PM como en proteínas de bajo PM.

- c) Las modificaciones que se observaron en los patrones proteicos de Ca.Cu., fueron: pérdida de bandas proteicas, predominantemente de alto PM; así como la presencia de un mayor número de bandas proteicas, sobre todo, de bajo PM. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas.
- d) Finalmente, otra de las alteraciones encontradas en los patrones proteicos de Ca.Cu., fue en cuanto a la cantidad de material proteico o concentración de proteína. Así se observó, que en los patrones proteicos de Ca.Cu., hay una menor cantidad de material proteico, comparado con los patrones del tejido de Cu.N.; sobre todo, en una banda con un PM de 63 kD, lo cual fue estadísticamente significativo.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. CONN, EE., STUMPF, PK. *Biología Fundamental*. Ediciones Limusa, México. p. 350, 1982.
2. KARP, G. *Biología Celular*. Ed. Mc. Graw-Hill, México. p. 950, 1987.
3. PEÑA, A. *Las membranas de las Células*. Ed. Fondo de Cultura Económica, México. p. 161, 1986.
4. NICOLSON, GL., POSTE, G. The Cancer Cell: Dynamic Aspects and Modifications in Cell-Surface Organization. (First of Two Parts). *The New England Journal of Medicine*. 295(4): 197-203, (1976).
5. LEHNINGER, AL. *Biología*. Ediciones Omega, S.A., Barcelona. p. 1117, 1982.
6. BRUNCE, A., BRAY, D., LEWIS, J., et. al. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing Inc., New York & London. p. 500, 1983.
7. BRETSCHER, MS. The Molecules of the Cell Membrane. *Sci. Amer.* 253(4): 86-90, (1985).
8. UNWIN, N., HENDERSON, R. The Structure of Proteins in Biological Membranes. *Sci. Amer.* 250(2): 78-94, (1984).
9. BURN, P. Amphitropic Proteins: A New Class Of Membrane Proteins. *Trends Biochem. Sci.* 13: 79-83, (1988).

10. BRETSCHER, M.S., RAFF, M.C. Mammalian Plasma Membranes. *Nature*. 258: 45-49, (1975).
11. KIEHN, D.E., HOLLAND, J. Multiple Protein Components of Mammalian Cell Membranes. *Proc. Natl. Acad. USA*. 61: 1370-1377, (1968).
12. MAZIA, D., RUBY, A. Dissolution of Erythrocyte Membranes in Water and Comparison of the Membrane Protein with other Structural Proteins. *Proc. Natl. Acad. USA*. 61:1005-1012, (1968).
13. ROSENBERG, S.A., GUIDOTTI, G. The Protein of Human Erythrocyte Membranes. *J. Biol. Chem.* 243(8): 1985-1992, (1968).
14. TERRANCE, G.C. *The Tools of Biochemistry*. Interscience Publication. John Wiley & Sons, New York. pp. 194-233, 1977.
15. GORDON, H. *Electroforesis de Proteínas en Geles de Poliacrilamida y de Almidón. Técnicas de Laboratorio en Biología Molecular y Bioquímica*. Ed. El Manual Moderno, S.A., México. p. 132, 1975.
16. CHRAMBACH, A., RODBARD, D. Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Science*. 172: 440-451, (1971).
17. TETZ, N.W. *Química Clínica Moderna*. Ed. Interamericana, México p. 1010, 1972.
18. BANNKOV, G.A., VINCENT, L.S., and MONTESANO, R. Surface Proteins in Normal and Transformed Rat Liver Epithelial Cells in Culture. *Br. J. Cancer*. 42: 596-609, (1980).

19. KKUCHI, Y., SATO, S., and SUGMURA, T. Hexokinase Isozyme Patterns of Human Uterine Tumors. *Cancer*. 30 (2): 444-447, (1972).
20. EDDIN, M., WER, M. Mobility of Membrane Proteins and the Social Life of Cells. *Biochem. Soc. Trans.* 14(5): 818-821, (1986).
21. LAGUNA, J., PÑA, GE. *Biología*. Ediciones La Prensa Médica Mexicana, S.A., México, p. 826, 1981.
22. STAEHELIN, L.A., HULL, EB. Uniones Intercelulares. *Invest. Científica*. 238(5): 71-86, (1978).
23. SNYDER, SH. The Molecular Basis of Communication Between Cells. *Sci. Amer.* 253(4): 114-123, (1985).
24. BERRIDGE, M.J. The Molecular Basis of Communication within the Cell. *Sci. Amer.* 253(4): 124-134, (1985).
25. NICOLSON, G.L., POSTE, G. The Cancer Cell: Dynamic Aspects and Modifications in Cell-Surface Organization. (Second of Two Parts). *The New England Journal of Medicine*. 295(5): 253-258, (1976).
26. GALLEZ, D. Cell Membranes after Malignant Transformation Part I: Dynamic Stability at Low Surface Tension. *J. Theor. Biol.* III: 323-340, (1984).
27. GALLEZ, D. Cell Membranes After Malignant Transformation Part II: Dynamic Stability with Surface Chemical Reactions. *J. Theor. Biol.* III: 341-354, (1984).
28. NICOLSON, G.L. Metástasis Cancerosas. *Invest. Científica*. 240(3): 66-76, (1979).

29. HOELZL, W.D.F. Cellular Membranes and Tumor Behavior: A New Hypothesis. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*. 61: 868-874, (1968).
30. WARREN, L. The Malignant Cell and its Membranes. *Am. J. Pathol.* 77(1): 69-76, (1974).
31. PASTAN, I., WILLINGHAM, M. Cellular Transformation and the Morphologic Phenotype of Transformed Cells. *Nature*. 274: 645-650, (1978).
32. BRADY, R.O., FISHMAN, P.H., and MORA, P.T. Membrane Components and Enzymes in Virally Transformed Cells. *Federation Proceedings*. 32(1): 102-108, (1973).
33. WARREN, L., FUHRER, J.P., and BUCK, C.A. Surface Glycoproteins of Cell Before and after Transformation by Oncogenic Viruses. *Federation Proceedings*. 32(1): 80-85, (1973).
34. NICOLSON, G.L. Tumor Cell Instability, Diversification and Progression to the Metastatic Phenotype: from Oncogene to Oncofetal Expression. *Cancer Research*. 47: 1473-1483, (1987).
35. DE VITA, V.T., HELLMAN, S.Jr., and ROSENBERG, A.S. *Cancer. Principles & Practice of Oncology*. Ed. Lippincott, Philadelphia, USA. p. 2489, 1989.
36. LYPE, P.T., TURNER, S., and SIDDIQI, M.S. Markers for Transformation in Rat Liver Epithelial Cells in Culture. *Ann. New. Y. Acad. Sci.* 349: 312-322, (1980).
37. SANDBERG, A.A., TURC-CAREL, C. The Cytogenetics of Solid Tumors. *Cancer* 59: 387-395, (1987).

38. VORA, S., HALPER, J.P., and KNOWLES, D.M. Alterations in the Activity and Isozymic Profile of Human Phosphofruktokinase During Malignant Transformation *IN VIVO* and *IN VITRO*: Transformation and Progression-Linked Discriminants of Malignancy. *Cancer Research*. 45: 2993-3001, (1985).
39. ZUCKER, S., WEMAN, J.M., LYSK, R.M., et. al. Enrichment of Collagen and Gelatin Degrading Activities in the Plasma Membranes of Human Cancer Cells. *Cancer Research*. 47: 1608-1614, (1987).
40. NICOLSON, G.L. Trans-membrane control of the receptors on normal and tumors cells. II Surface changes associated with transformation and malignancy. *Biochim. Biophys. Acta*. 458: 1-71, (1976).
41. MONTESANO, R., BANNKOV, G., DREVON, C., et. al. Neoplastic Transformation of Rat Liver Epithelial Cells in Culture. *Ann. New. Y. Acad. Sci.* 349: 323-331, (1980).
42. HOGG, N. A Comparison of Membrane Proteins of Normal and Transformed Cells by Lactoperoxidase Labeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 71(2): 489-492, (1974).
43. FENTANES DE TORRES, E. *Citología Clínica*. Ed. La Prensa Médica Mexicana, México. p. 217, 1980.
44. LANGLEY, F.A., CROMPTON, A.C. *Recent Results in Cancer Research*. Berlin. p. 203, 1973.
45. NORRIS, H.J., HERTING, A.T., and ABELL, M.R. *The Uterus*. International Academy of Pathology. Monographs in Pathology. Wilkins Company, Baltimore. pp. 348-413, 1973.

46. RAMREZ, G.L. Carcinoma Cérvico Uterino. Análisis Epidemiológico de 140 Casos. *Revista del Instituto Nacional de Cancerología*. 33(3): 417-420, (1987).
47. TORRES, L.A., Cáncer Cérvico Uterino, 1983-1984. Experiencia de la Unidad de Oncología. Hospital General de México, S.S. *Revista del Instituto Nacional de Cancerología*. 34(3): 617-622, (1988).
48. REEVES, W.C., RAWLS, W.E. Epidemiology of Genital Papillomaviruses and Cervical Cancer. *Reviews of Infectious Diseases*. 11(3): 426-439, (1989).
49. HUNTER, E.R., LONGCOPE, CH., KEOUGH, P., et. al. Steroid Hormone Receptors in Carcinoma of the Cervix. *Cancer*. 60: 392-396, (1987).
50. TWIGGS, L.B., POTISH, R.A., LEUNG, B.S., et. al. Cytosolic Estrogen and Progesterone Receptors as Prognostic Parameters in Stage IB Cervical Carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 28: 156-160, (1987).
51. MARTIN, J.D., HAHNEL, R., NAT, R., et. al. The Influence of Estrogen and Progesterone Receptors on Survival in Patients with Carcinoma of the Uterine Cervix. *Gynecol. Oncol.* 23: 329-335, (1986).
52. SANBORN, B.M., HELD, B., and KUO, H.S. Specific Estrogen Binding Proteins in Human Cervix. *J. Steroid Biochem.* 6: 1107-1112, (1975).
53. SANBORN, B.M., HELD, B., KUO, H.S. Hormonal Action in Human Cervix-II Specific Progestogen Binding Proteins in Human Cervix. *J. Steroid Biochem.* 7: 665-672, (1976).

54. RIOU, G.F. Proto-oncogenes and Prognosis in Early Carcinoma of the Uterine Cervix. *Cancer Surveys*. 7(3): 441-456, (1988).
55. BAKER, V.V., HATCH, K.D., and SHINGLETON, H.M. Amplification of the *c-myc* Protooncogene in Cervical Carcinoma. *J. Surgical Oncol.* 39: 225-228, (1988).
56. SAGAE, S., KUDO, R., KUZUMAKI, N., et. al. Ras Oncogene Expression and Progression in Intraepithelial Neoplasia of the Uterine Cervix. *Cancer*. 66: 295-301, (1990).
57. GULLICK, W.J., MARSDEN, J.J., WHITTLE, N., et. al. Expression of Epidermal Growth Factor Receptors on Human Cervical, Ovarian, and Vulva Carcinomas. *Cancer Research*. 46: 285-292, (1986).
58. PFEFFER, D., STELLWAG, B., PFEFFER, A., et. al. Clinical Implications of the Epidermal Growth Factor Receptor in the Squamous Cell Carcinoma of the Uterine Cervix. *Gynecol. Oncol.* 33: 146-150, (1989).
59. GOPPINGER, A., WITTMACK, F.M., WINTZER, H.O., et. al. Localization of Human Epidermal Growth Factor Receptor in Cervical Intraepithelial Neoplasias. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 115: 259-263, (1989).
60. GUSTAV, G.C., HAKOMORI, S. Altered Growth Behavior of Malignant Cells Associated with Changes in Externally Labeled Glycoprotein and Glycolipid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 70(12); PART. I: 3329-3333, (1973).
61. HYNES, R.O. Alteration of Cell Surface Proteins by Viral Transformation and by Proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 70(11): 3170-3174, (1973).

62. CHATTERJEE, U., KIM, U., and BELAT, K. Plasma Membrane Associated Enzymes of Mammary Tumours as the Biochemical Indicators of Metastasizing Capacity. Analyses of Enriched Plasma Membrane Preparations. *Br. J. Cancer*. 33: 15-26, (1976).
63. EMMELOT, P., and BOS, C.J. Studies on Plasma Membranes. XVII. On the Chemical Composition of Plasma Membranes Prepared from Rat and Mouse Liver and Hepatomas. *J. Membr. Biol.* 9: 83-104, (1972).
64. VAN HOEVEN, R.P., and EMMELOT, P. Studies on Plasma Membranes. XVIII. Lipid Class Composition of Plasma Membranes Isolated from Rat Mouse Liver and Hepatomas. *J. Membr. Biol.* 9: 105-126, (1972).
65. NAVAS, P., NOWACK, D.D., and MORRE, D.J. Isolation of Purified Plasma Membranes from Cultured Cells and Hepatomas by Two-Phase Partition and Preparative Free-Flow Electrophoresis. *Cancer Research*. 49: 2147-2156, (1989).
66. KNOWLES, A.F., LEIS, J.F., and KAPLAN, N.O. Isolation and Characterization of Plasma Membranes from Transplantable Human Astrocytoma, Oat Cell Carcinoma, and Melanomas. *Cancer Research*. 41: 4031-4038, (1981).
67. ROGAN, M.K., FALDETTA, T.J., BOTO, W., *et. al.* Heterogeneity in the Membrane Proteins of Human Lymphoid Cell Lines as Seen in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Electrophoresis Slab Gels. *Cancer Research*. 38: 3604-3610, (1978).
68. LITIN, S.S., and GRIMES, W.J. Two-Dimensional Electrophoresis of Membrane Proteins from Normal and Transformed Cells. *Cancer Research*. 39: 2595-2603, (1979).

69. RWIN, D. Protein Pattern as Codes for Tumor Identification. *Analytical Biochem.* 118: 392-395. (1981).
70. TAUTZ, C., BOGELSPACHER, H.R., and KLAISSE, K. Electrophoretic Mobility Test in the Early Diagnosis of Malignant Tumors; Finding in the Prestages of Cervical and Breast Cancer. *Onkologie.* 2(5); 199-203. (1979).
71. BOGELSPACHER, H.R., TAUTZ, CH., and GEPPERT, M. The Electrophoresis Mobility (EM) Test in Cervical Intra-epithelial Neoplasia (c.i.n.). *Geburtshilfe. Frauenheilkd.* 40(6); 545-549. (1980).
72. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., et. al. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275. (1951).
73. WEBER, K., and OSBORN, M. The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244: 4406-4412. (1969).
74. JORGENSEN, P.L. Purification and Characterization of (Na⁺-K⁺)-ATPase. III. Purification from the Outer Medulla of Mammalian Kidney After Selective Removal of Membrane Components by Sodium Dodecyl-Sulphate. *Biochim. Biophys. Acta.* 356: 36-52. (1974).
75. CASALE, T.B., FRIEDMAN, M., PARADA, N., et. al. Preparation of a Human Lung Purified Plasma Membrane Fraction: Confirmation by Enzyme Markers, Electron Microscopy, and Histamine H₁ Receptor Binding. *J. Membrane Biol.* 79: 33-39. (1984).

76. BENITEZ, B.L., FREYRE, H.R., y GALLEGOS, V.G. Concentración de Proteasas y Antiproteasas en el Suero y el Líquido Vaginal de Pacientes con Carcinoma Cérvico-Uterino. *Arch. Invest. Med. (Méx.)*. 11(4): 523-545, (1980).
77. KEENAN, T.W., VALVULLAH, H.M., and DUNLEVY, J.T. Isolation of Plasma Membranes from Mammary Gland by Two-Phase Polymer Partitioning. *Anal. Biochem.* 177: 194-198, (1989).
78. EYLAR, E.H., and HAGOPIAN, A. Isolation of Plasma Membranes from Mammalian Cells. *Methods Enzymol.* 22: 124-130. (1971).
79. FINDLAY, J.B.C., and EVANS, W.H. *Biological Membranes. A Practical Approach.* Pl. Press, USA. p. 304, 1987.
80. FISCHBACH, T.F. *Manual de Pruebas Diagnósticas.* Ed. Interamericana. Mc. Graw-Hill, México. p.560, 1989.
81. OKABE, K., HAYAKAWA, K., HAMADA, T. et. al. Purification and Comparative Properties of Human Lactate Dehydrogenase Isozymes from Uterus, Uterine Myoma, and Cervical Cancer. *Biochemistry.* 7: 79-90, (1968).
82. COOPERSTEIN, S.J., and LAZAROW, A. A Microspectrophotometric Method for the Determination of Cytochrome Oxidase. *J. Biol. Chem.* 189: 665-670, (1951).
83. ERNSTER, L., SEKEVITZ, P., and PALADE, G.E. Enzyme Structure Relationships in the Endoplasmic Reticulum of Rat Liver. *J. Cell Biology.* 15: 541-562, (1962).

84. DZANDU, J.K., DEH, M.E., and WISE, G.E. A Re-examination of the Effects of Chymotrypsin and Trypsin on the Erythrocyte Membrane Surface Topology. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 126: 50-58, (1985).
85. WRAY, W., BOULKAS, T., WRAY, V.P., et. al. Silver Staining of Proteins in Polyacrylamide Gels. *Analytical Biochem.* 118: 197-203, (1981).
86. OFARRELL, P.H. High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins. *J. Biol. Chem.* 250: 4007-4021, (1975).
87. LAEMMLI, U.K. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of Head of Bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685, (1970).
88. STRAND, M., and AUGUST, J.T. Polypeptides of Cells Transformed by RNA and DNA Tumor Viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 2729-2733, (1977).
89. DIXON, T.F., PURDOM, M. Serum 5'-Nucleotidase. *J. Clin. Pathol.* 7:341, (1954).
90. TAUSSKY, H.H., and SHORR, E. A Microcolorimetric Method for the Determination of Inorganic Phosphorus. *J. Biol. Chem.* 202: 675-685, (1953).
91. FISHBEN, W.N. Quantitative Densitometry of 1-50 μ g Protein in Acrylamide Gel Slab with Coomassie Blue. *Anal. Biochem.* 46: 388-401, (1972).
92. GOROVSKY, M.A., CARLSON, K., and ROSENBAUMN, J.L. Simple Method for Quantitative Densitometry of Polyacrylamide Gels Using Fast Green. *Analytical Biochem.* 35: 359-370, (1970).

11. APENDICE.

11.1. REACTIVOS.

- Cloruro de Sodio (NaCl -Baker-).
- Agua Bidestilada (H_2O).
- Sacarosa ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ -Baker-).
- Acido Clorhídrico (HCl -Merck-).
- Carbonato de Sodio (Na_2CO_3 -Baker-).
- Hidróxido de Sodio (NaOH -Baker-).
- Tartrato de Sodio y Potasio:
($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -Baker-).
- Sulfato Cúprico ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -Baker-).
- Folin-Ciocalteu (-Sigma-).
- Sero Albumina Bovina (SAB -Sigma-).
- Acido Sulfúrico (H_2SO_4 -Baker-).
- Fosfato de Sodio Monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -Baker-).
- Fosfato de Sodio Dibásico Anhidro (Na_2HPO_4 -Baker-).
- Dodecil Hidrogenosulfato, Sal Sódica:
(SDS $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$ -Merck-).
- Acrilamida ($\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$ -Sigma-).
- Bis-Acrilamida (-Sigma-)
- Persulfato de Amonio ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{S}_2\text{O}_8$ -Baker-).
- NN,N',N' -Tetrametil-Etilenodiamina (TEMED -Sigma-).
- β -Mercaptoetanol ($\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ -Merck-).
- Etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ -Laitz-).
- Azul de Bromofenol (-Sigma-).
- Glicerol ($\text{C}_3\text{H}_5(\text{OH})_3$ -Sigma-).
- Azul Brillante de Coomassie (-Sigma-)
- Metanol (CH_3OH -Baker-).
- Acido Acético Glacial (CH_3COOH -Baker-).
- Acido Tricloroacético (CCl_3COOH -Sigma-).
- Acido Molibdico:Sal de Amonio:
($\text{C}_7\text{H}_4\text{O}_6\text{H}_2\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -Sigma-).

- Equipo de Reactivos de Prueba para la 5'-Nucleotidasa (-Sigma-).
- Equipo de Reactivos de Prueba para la Deshidrogenasa Láctica (-Lakeside-)
- Fosfato de Potasio (KH_2PO_4 -Baker-).
- Sulfato Ferroso ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$ -Baker-).
- TRIS (Hidrometil-Aminometano) ($C_4H_{11}NO_3$ -Sigma-).
- Glutaraldehído.
- Tetróxido de Osmio (OsO_4).
- Hematoxilina.
- Sulfato de Aluminio y Potasio.
- Oxido Rojo de Mercurio.
- Orange G-6.
- Acido Fosfotúngstico.
- Verde Claro SF.
- Pardo de Bismarck.
- Eosina Y.
- Eosina Azulosa.
- Carbonato de Litio.
- Xilol.
- Resina Sintética.

11.2. SOLUCIONES.

11.2.1. Solución para la Obtención del Epitelio Escamoso Estratificado.

11.2.1.1. Solución Salina al 0.9%.

Cloruro de Sodio	9.0 g.
Aforo con H ₂ O bidestilada a	1000.0 ml.

11.2.2. Soluciones para la Obtención de Membranas Citoplasmáticas.

11.2.2.1. Solución de TRIS 1 M

TRIS	12.1 g.
Aforo con H ₂ O bidestilada a	100.0 ml.

11.2.2.2. Solución Amortiguadora de Sacarosa 0.25 M, TRIS-HCl 0.03 M, pH 7.2.

Sacarosa	8.56 g.
Solución de TRIS 1 M	3.0 ml.
Aforo con H ₂ O bidestilada a	100.0 ml.

11.2.3. Soluciones para la Cuantificación de Proteína por el Método de Lowry.

11.2.3.1. Solución de Hidróxido de Sodio 0.1 N.

Hidróxido de Sodio	4.0 g.
Aforo con H ₂ O bidestilada a	1000.0 ml.

11.2.3.2. Solución de Carbonato de Sodio al 2% en Hidróxido de Sodio 0.1 N.

Carbonato de Sodio	200 g.
Aforo con Hidróxido de Sodio 0.1 N a	1000.0 ml.

11.2.3.3. Solución de Tartrato de Sodio-Potasio al 2%.

Tartrato de Sodio-Potasio	2.0 g.
Aforo con H ₂ O bidestilada a	100.0 ml.

11.2.3.4. Solución de Sulfato Cúprico al 1%.

Sulfato Cúprico	1.0 g.
Aforo con H ₂ O bidestilada a	100.0 ml.

11.2.3.5. Solución A.

Es una mezcla que está constituida por:

Solución de Carbonato de Sodio al 2% en:	
Hidróxido de Sodio 0.1 N	49.0 ml.
Solución de Tartrato de Sodio-Potasio al 2%	0.5 ml.
Solución de Sulfato Cúprico al 1%	0.5 ml.

11.2.3.6. Solución de Folín Cioaltea 1 N.

Folín-Cioaltea (2 N)	3.0 ml.
H ₂ O bidestilada	3.0 ml.

Se prepara en el momento de la prueba.

11.2.3.7. Solución estándar de Sero Albúmina Bovina (1 mg/ml).

Sero Albúmina Bovina (SAB)	1.0 mg.
H ₂ O bidestilada	1.0 ml.

11.2.4. Soluciones para la Determinación de la Actividad Enzimática de la 5'-Nucleotidasa.

11.2.4.1. Solución de Adenosín 5'-Monofosfato 2.38 mM, TRIS-HCl 100 mM, pH 7.5.

Adenosín 5'-Monofosfato	86.8 mg.
Solución TRIS 1 M	10.5 ml.
Aforo con H ₂ O bidestilada a	105.0 ml.

- 11.2.4.2. Solución de Glicerofosfato 1.52 mM, TRIS-HCl 100 mM, pH 7.5.
- | | |
|--|-----------|
| Glicerofosfato | 19.5 mg. |
| Solución TRIS 1 M | 10.5 ml. |
| Aforo con H ₂ O bidestilada a | 105.0 ml. |
- 11.2.4.3. Solución de Acido Tricloroacético al 30%.
- | | |
|--|-----------|
| Acido Tricloroacético | 30.0 g. |
| Aforo con H ₂ O bidestilada a | 100.0 ml. |
- 11.2.5. Soluciones para la Determinación de Fosfatos por el Método de Tanosky y Shorr.
- 11.2.5.1. Solución de Acido Sulfúrico 10 N.
- | | |
|--|------------|
| Acido Sulfúrico Concentrado | 278.0 ml. |
| Aforo con H ₂ O bidestilada a | 1000.0 ml. |
- 11.2.5.2. Solución de Molibdato Amónico al 10%.
- | | |
|---------------------------------|-----------|
| Molibdato de Amonio | 50.0 g. |
| Aforo con Acido Sulfúrico 10N a | 500.0 ml. |
- 11.2.5.3. Solución de Molibdato Ferroso.
- | | |
|--|-----------|
| Solución de Molibdato Amónico al 10% | 10.0 ml. |
| Sulfato Ferroso | 5.0 g. |
| Aforo con H ₂ O bidestilada a | 100.0 ml. |
- 11.2.5.4. Solución Patrón de Fosfato de Potasio 5 mM en Acido Tricloroacético al 0.5%.
- | | |
|--|-----------|
| Fosfato de Potasio | 0.068 g. |
| Acido Tricloroacético | 0.5 g. |
| Aforo con H ₂ O bidestilada a | 100.0 ml. |

11.2.6. Soluciones para la Determinación de la Actividad Enzimática de la Deshidrogenasa Láctica.

11.2.6.1. Solución Amortiguadora de Fosfato de Potasio 50 mM, pH 7.5.

Fosfato de Potasio	0.68 g.
Aforo con H ₂ O bidestilada a	100.0 ml.

11.2.6.2. Solución de Piruvato (Sustrato) 0.6 mM.

Piruvato	5.3 mg.
Aforo con Solución Amortiguadora de Fosfato de Potasio 50 mM, pH 7.5 a	100.0 ml.

11.2.6.3. Solución de Adenosin Nicotinamida Dinucleótido, forma reducida (NADH), 0.18 mM.

Tableta de NADH con Solución de Piruvato 0.6 mM en Solución Amortiguadora de Fosfato de Potasio 50 mM pH 7.5	0.359 mg.
	3.0 ml.

11.2.7. Soluciones para la Elaboración de los Geles de Poliacrilamida-SDS.

11.2.7.1. Solución Amortiguadora de Fosfatos-SDS, 0.2 M, pH 7.2.

Fosfato de Sodio Monobásico	7.8 g.
Fosfato de Sodio Dibásico Anhidro	20.5 g.
Dodecil Sulfato de Sodio	2.0 g.
Aforo con H ₂ O bidestilada a	1000.0 ml.

11.2.7.2. Solución de Acrilamida al 40%.

Acrilamida	40.0 g.
Aforo con H ₂ O bidestilada a	100.0 ml.

Esta solución se filtra después de que se prepara y se guarda en un frasco amber a 4°C.

- 11.2.7.3. Solución de Bis-Acrilamida al 2%.
 Bis-Acrilamida 2.0 g
 Aforo con H₂O bidestilada a 100.0 ml.
Esta solución se filtra después de que se prepara y se guarda en un frasco ambar a 4°C.
- 11.2.7.4. Solución de Persulfato de Amonio (15 mg/ml).
 Persulfato de Amonio 15.0 mg.
 H₂O bidestilada 1.0 ml.
Esta solución se prepara momentos antes de usarse.
- 11.2.7.5. Solución de TEMED.
 TEMED 0.030 ml.
- 11.2.7.6. Solución Amortiguadora de Fosfatos-SDS 0.1 M, pH 7.2. Solución Amortiguadora de Fosfatos-SDS 0.2 M, pH 7.2
 Aforo con H₂O bidestilada a 500.0 ml.
 1000.0 ml.
- 11.2.7.7. Solución para Desnaturalizar Proteínas (Solución I).
 Dodecil Sulfato de Sodio 1.0 g.
 β-mercaptoetanol (14 M) 1.0 ml
 Aforo con Solución Amortiguadora de Fosfatos-SDS 0.1 M, pH 7.2 a 10.0 ml
- 11.2.7.8. Solución Indicadora del Frente de la Corrida Electroforética (Solución II).
 β-mercaptoetanol (14M) 0.5 ml.
 Azul de Bromofenol 2.3 mg.
 Glicerol 5.0 ml.
 Aforo con Solución Amortiguadora de Fosfatos-SDS 0.2 M, pH 7.2 a 13.0 ml
- 11.2.7.9. Solución de Metanol al 50%.
 Metanol al 100% 250.0 ml.
 Aforo con H₂O bidestilada a 500.0 ml.

11.2.7.10. Solución de Coloración.

Azul Brillante de Coomassie	125 g.
Acido Acético Glacial	46.0 ml.
Aforo con Solución de Metanol al 50% a	500.0 ml.

Una vez mezclados los componentes, se filtra la solución.

11.2.7.11 Solución de Decoloración.

Acido Acético Glacial	75.0 ml.
Metanol al 100%	50.0 ml.
Aforo con H ₂ O bidestilada a	1000.0 ml.

11.2.7.12. Solución de Conservación.

Acido Acético Glacial	75.0 ml.
Aforo con H ₂ O bidestilada a	1000.0 ml.

11.2.8. Soluciones para la Tinción con Papanicolaou.

11.2.8.1. Solución de Hematoxilina de Harris.

Cristales de Hematoxilina	2.5 g.
Sulfato de Amonio y Potasio	50.0 g.
Oxido de Mercurio Rojo	125 g.
Alcohol Etilico Absoluto (100%)	25.0 ml.
Aforo con H ₂ O bidestilada a	500.0 ml.

11.2.8.2. Solución de "Orange G-6".

Orange G-6 en cristales	5.0 g.
Acido Fosfotúngstico	0.075 g.
H ₂ O bidestilada	50.0 ml.
Aforo con Alcohol Etilico al 95% a	500.0 ml.

11.2.8.3. Solución de EA-50.		
Verde Claro S. F. (amarillento)		2.5 g.
Pardo de Bismarck		2.5 g.
Eosina Y (amarillenta)		2.5 g.
Acido Fosfotungstico		1.0 g.
Solución saturada de carbonato de Litio en H ₂ O bidestilada		5 gotas.
H ₂ O bidestilada		75.0 ml.
Aforo con Alcohol Etilico al 95% a		500.0 ml.

11.2.9. Soluciones para la preparación de las muestras para Microscopia Electrónica de Transmisión.

11.2.9.1. Solución de Glutaraldehido al 70%.		
Glutaraldehido		70.0 ml.
Aforo con H ₂ O bidestilada a		100.0 ml.

11.2.9.2. Solución Amortiguadora de Fosfatos 0.1 M, pH 7.35.		
Fosfato de Sodio Dibásico		3.55 g.
Fosfato de Sodio Monobásico Anhidro		3.45 g.
Aforo con H ₂ O bidestilada a		500.0 ml.

11.2.9.3. Solución de Glutaraldehido al 2.5% en Amortiguador de Fosfatos 0.1 M, pH 7.35.		
Glutaraldehido al 70%		0.4 ml.
Aforo con Amortiguador de Fosfatos 0.1 M, pH 7.35 a		100.0 ml.

11.2.9.4. Solución de Tetróxido de Osmio al 1% en Amortiguador de Fosfatos 0.1 M, pH 7.35.		
Tetróxido de Osmio		1.0 g.
Amortiguador de Fosfatos 0.1 M, pH 7.35		40.0 ml.
Aforo con H ₂ O bidestilada a		100.0 ml.

11.2.10. Soluciones para la Tinción con Hematoxilina-Eosina.

11.2.10.1. Solución de Hematoxilina de Harris.

Hematoxilina	1.0 g.
Oxido Rojo de Mercurio	0.5 g.
Sulfato de Aluminio y Amonio o Potasio	20.0 g.
Alcohol Etílico Absoluto (100%)	10.0 ml.
Aforo con H ₂ O bidestilada a	200.0 ml.

11.2.10.2. Solución de Eosina-Alcohólica.

Eosina Azulosa	1.0 g.
Orange G	1.0 g.
Aforo con Alcohol al 70% a	100.0 ml.

11.3. EQUIPO.

- Balanza Analítica (Sartorius, 2001-MP2).
- Potenciómetro (Corning, Modelo 5).
- Homogenizador Vidrio-Teflón (Pyrex, 7725).
- Politrón (PCU, Drehzahlregler, Kinematica GmbH).
- Centrifuga Refrigerada (Sorvall, RC-5B).
- Rotor tipo SS34 (Sorvall).
- Refrigerador (Bendix).
- Ultracentrifuga (Beckman, Modelo L5-65B).
- Rotor Tipo 50 (Beckman).
- Espectrofotómetro (Zeiss, PM2-DL).
- Micropipetas de 0-50 μ l (Finnpipette).
- Micropipetas de 0-250 μ l (Finnpipette).
- Termómetro (Propper Trophy, F 3498).
- Baño de H₂O con control de Temperatura (Modelo BMT-8).
- Barras Magnéticas.
- Agitador Magnético (Corning, PC-351).
- Vortex (Corning).
- Cámara de Electroforesis (Buchler, 3-1500).
- Fuente de Poder para la Electroforesis, (Buchler, 3-1500).
- Densitómetro (Gelman, DCD-16).
- Microscopio de Disección (Zeiss).
- Microscopio Óptico (Zeiss, Modelo 730).
- Congelador -70°C (Ultra Low, Rovco).
- Fotomicroscopio III, para luz transmitida, (Carl Zeiss, D-7082, Oberkochen).

11.4. TÉCNICAS.

11.4.1. TÉCNICA PARA LA OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE IMPRONTAS.

Se tomaron improntas de cada una de las muestras o biopsias colectadas de Cu.N. y Ca.Cu. para confirmar el diagnóstico histopatológico y verificar que la muestra con la que se trabajó, fuese únicamente tejido normal o canceroso (neoplásico), según el caso.

Una vez colectada la biopsia, se lavaba en solución salina (11.2.1.1.) para retirar el detritus celular y la sangre. El tejido se colocaba, con unas pinzas finas, sobre un porta objetos limpio y seco que previamente se había rotulado con el número de expediente de la paciente, fecha y número de muestra. Posteriormente se hacía un extendido delgado y uniforme del tejido sobre la laminilla. Dicha preparación se colocaba en un lugar seco y aerado a temperatura ambiente para que se eliminara el exceso de agua. Enseguida se fijaba la preparación sumergiéndola en alcohol etílico al 96%, hasta que se hicieron las tinciones correspondientes.

Las preparaciones de improntas de cada biopsia de tejido tanto normal como neoplásico, se hicieron por duplicado con el objeto de realizar dos técnicas de tinción diferente que permitan un mejor diagnóstico. Se usó la Técnica de Papanicolaou (11.4.1.1.) y la Técnica de Hematoxilina-Eosina (11.4.1.2.). El tejido restante de la impronta, se almacenó a -70°C convenientemente etiquetado.

11.4.1.1. TÉCNICA DE TINCIÓN DE PAPANICOLAOU.

Esta técnica es muy útil para las preparaciones de impresas (extendidos), y se basa en la reacción química de los colorantes con los elementos celulares. Es una tinción tricrómica a base de Hematoxilina de Harris, que tiñe los núcleos; el " Orange G-6 ", que colorea los citoplasmas transparentes y el " EA-50 ", que tiñe los citoplasmas más densos. La técnica consiste en lo siguiente:

Las preparaciones fijadas en alcohol etílico al 96%, se fueron sumergiendo secuencialmente en las soluciones que a continuación se mencionan:

Agua de la llave	5 baños.
Hematoxilina de Harris (11.2.8.1.)	3 minutos.
H ₂ O bidestilada	3 baños.
Alcohol al 96%	10 baños.
Alcohol al 96%	10 baños.
Alcohol al 96%	10 baños.
Orange G-6 (11.2.8.2.)	30 segundos.
Alcohol al 96%	10 baños.
Alcohol al 96%	10 baños.
Alcohol al 96%	10 baños.
EA-50 (11.2.8.3.)	3 minutos.
Alcohol al 96%	10 baños.
Alcohol al 96%	10 baños.
Alcohol al 96%	10 baños.
Xilol	10 baños.
Xilol	10 baños.
Xilol	10 baños.

Sin permitir que se seque el material teñido, se cubrió con una resina sintética y se colocó encima una laminilla cubre-objetos.

11.4.2.2. TÉCNICA DE REGISTRO FOTOGRAFICO PARA LOS PATRONES PROTEICOS DE CERVIX UTERINO NORMAL Y NEOPLASICO.

Se tomaron fotografías de los patrones proteicos más representativos del estudio de la membrana citoplasmática de las células epiteliales del *Cv.N.* y del *Ca.Cu.* También se tomaron fotografías de los patrones de las proteínas marcadoras de peso molecular conocido las que se utilizaron como referencia para calcular el peso molecular de las proteínas estudiadas de *Cervix Uterino.*

Las fotografías se tomaron con una cámara Nikon de 95mm, en la cual se colocó un Filtro Amarillo en el lente. La película que se utilizó, fue la Kodalith, Ortho 6556, Tipo 3; con un Diafragma 4 ^{2/3}; ASA 6, DIN 9. Y el papel que se usó para imprimir las fotos en blanco y negro fue el Ilford # 4.

11.4.3. TÉCNICA PARA LA OBTENCIÓN DEL EPITELIO ESCAMOSO ESTRATIFICADO PLANO NO QUERATINIZANTE, DEL CERVIX UTERINO.

Debido a que el *Cv.N.* como el *Ca.Cu.* está constituido histológicamente por capas de células de epitelio escamoso estratificado plano no queratinizante y por una capa de tejido conectivo celular (estroma), fue necesario realizar una microdissección a cada una de las biopsias colectadas de *cervix uterino*, para obtener el epitelio libre del estroma. Con este propósito se colocó la muestra en una caja de petri con solución de NaCl al 0.9% (11.2.1.1.). El tejido conectivo se fue separando poco a poco del tejido epitelial de manera mecánica, observando a través de un microscopio de disección

y con la ayuda de un bisturí y unas pinzas muy finas. Una vez aislado el tejido epitelial, se lavó varias veces con solución fría de NaCl al 0.9% para quitar los restos de estroma. Después, el epitelio se colocó en una gasa para eliminar el exceso de líquido y enseguida se pesó en una balanza analítica. Posteriormente se almacenó a -70°C hasta la realización del siguiente procedimiento. Para conservar la funcionalidad de las proteínas que constituyen la membrana citoplasmática y evitar desnaturalización de las mismas, el manejo del epitelio fue a 4°C .

11.4.4. TECNICA PARA LA OBTENCION DE MEMBRANA CITOPASMATICA.

La fracción rica en membrana citoplasmática se obtuvo siguiendo la metodología reportada por Jorgensen (74). Y que consiste en lo siguiente:

- 1) La muestra de epitelio escamoso estratificado plano no queratinizante libre de estroma, se colocó en un tubo de polietileno y se le adicionaron 10 ml de solución de Sacarosa-TRIS-HCl (11.2.2.2.) por cada gramo de epitelio.
- 2) El tejido epitelial suspendido en la solución de Sacarosa TRIS-HCl, se homogenizó primero en politrón durante 1 minuto a velocidad media y posteriormente en un homogenizador de vidrio-teflón, dando 5 golpes a velocidad total. De este homogenado celular, se separó una alícuota de 250 μl y se guardó a -70°C para utilizarlo en pruebas posteriores.

- 3) El homogenizado se centrifugó en una centrifuga Sorvall (RC-5B), a 7,250 RPM, durante 15 minutos a 4°C, en un rotor tipo SS34. Se separó el sobrenadante y se guardó a 4°C.
- 4) El sedimento se resuspendió por homogenización en el homogenizador de vidrio-teflón en el volumen original de la solución de Sacarosa-TRIS.HCl y se centrifugó a 7,250 RPM por 15 minutos.
- 5) Los sobrenadantes de la primera y segunda centrifugación, se combinaron y se centrifugaron a 27,500 RPM en una ultracentrifuga Beckman (Modelo L5-65B), durante 30 minutos en un rotor tipo 50.
- 6) El sedimento, que es la fracción rica en membrana citoplasmática, se resuspendió en la solución de Sacarosa TRIS.HCl y se almacenó a -70°C hasta que se hicieron las siguientes pruebas.

11.4.5. TECNICA PARA LA CUANTIFICACION DE PROTEINAS.

Las proteínas de la fracción rica en membrana y del homogenado celular, se cuantificaron por el método de Lowry (72) que a continuación se describe:

- 1) Se construyó una curva patrón, vertiendo en tubos de ensayo de 13 x 100 mm, una solución estándar de Sero Albúmina Bovina (SAB) de 1 mg/ml (11.2.3.7.) a las siguientes concentraciones:

TUBO	SAB (μg)	SAB (μl)	H ₂ O bidest (μl)	VOLUMEN TOTAL (μl)
1	0	0	50	50
2	10	10	40	50
3	20	20	30	50
4	30	30	20	50
5	40	40	10	50
6	50	50	0	50

- 2) Se tomaron 50 μl de las muestras problema. Los tubos de la solución estándar de SAB y los de las muestras problema se procesaron de manera semejante.
- 3) Se adicionaron a cada tubo 2 ml de la solución A (11.2.3.5.) y se agitaron.
- 4) Se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente.
- 5) Se agregaron a cada tubo 0.2 ml de la solución de Folin Ciocalteu 1 N (11.2.3.6.) en cada tubo y se agitaron inmediatamente.
- 6) Se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente para que se desarrollara el color.
- 7) Se leyó la densidad óptica a 750 nm , en un espectrofotómetro (Zeiss). Se utilizó agua bidestilada como referencia.
- 8) En papel milimétrico se hizo una gráfica de la Densidad Óptica (ordenada) vs Concentración de SAB (abscisa), para obtener la Curva Patrón.

Ejemplo:

SAB $\mu\text{g}/50\mu\text{l}$	DENSIDAD OPTICA (750nm)
0	0
10	0.067
20	0.128
30	0.185
40	0.250
50	0.314

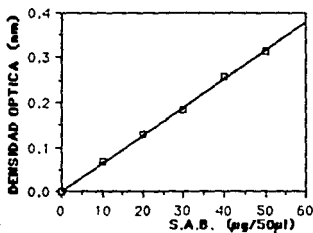
DATOS DE LA REGRESION LINEAL.

Ordenada al Origen (b) = 0.0031

Pendiente (m) = 0.00625

Factor de Correlación (f.c.) = 0.99909

G R A F I C A

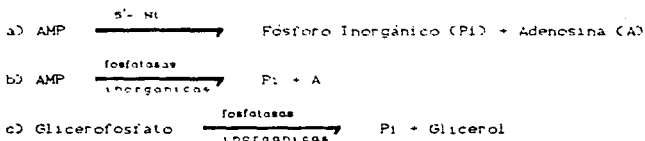


- 9) El cálculo de los μg de proteína en $50 \mu\text{l}$ de cada muestra problema se hizo extrapolando su Densidad Óptica en la Curva Patrón
- 10) Los resultados se transformaron a mg/ml .

11.4.6. TECNICAS PARA LAS PRUEBAS DE FUNCIONALIDAD ENZIMÁTICA.

11.4.6.1. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA 5'-NUCLEOTIDASA.

La determinación de la actividad enzimática de la 5'-Nucleotidasa (5'Nt), se llevó a cabo siguiendo el método de Dixon y Purdon (89). El método toma en consideración que el Adenosín 5'-monofosfato (AMP), no sólo es sustrato de la 5'-Nt, sino que también lo es de fosfatasas inespecíficas, por ello propone una forma de estimar la actividad real de la 5'-Nt sobre el AMP para ello utilizan un segundo sustrato sólo para las fosfatasas inespecíficas: el Glicerofosfato. Las reacciones que se llevan a cabo en este proceso son:



Debido a que las tres reacciones se realizan simultáneamente, se considera la producción de P_i total. Por lo que, al terminar la reacción, se resta el P_i formado en la reacción c) del producido en las reacciones a) + b). De ésta forma, se logra calcular la actividad real de la 5'Nt, que se reporta en nmoles de P_i liberados/mg proteína/minuto.

Se utilizaron dos diferentes medios de reacción: Adenosín 5'-monofosfato 2.39 mM, TRIS-HCl 100 mM a pH 7.5 (11.2.4.1.); y Glicerofosfato 1.52 mM, TRIS-HCl 100 mM a pH 7.5 (11.2.4.2.). La metodología fue la siguiente: A 480 μ l del medio de reacción (I y II), se le adicionaron 20 μ l de la fracción rica en membrana citoplasmática (0.01 a 0.03 mg de proteína) u homogenado celular (0.05 a 0.01 mg de proteína), según el caso, el volumen final fue de 1.0 ml. La reacción se llevó a cabo a 37°C, siguiendo por espacio de 100 minutos y deteniéndola

por la adición de 1 ml de ácido tricloroacético frío al 30% (11.2.4.2.). El fósforo inorgánico que se liberó durante el proceso, se determinó mediante la técnica de Taussky y Shorr (11.4.6.2.).

11.4.6.2. DETERMINACION DE FOSFATOS.

Se cuantificó el Fósforo Inorgánico (P_i), siguiendo la técnica reportada por Taussky y Shorr (90), que consiste en lo siguiente:

- 1) Se construyó una Curva Patrón de Fosfato de Potasio (KH_2PO_4) 5 mM en ácido Tricloroacético al 0.5% (11.2.5.4.), la cual contenía las siguientes concentraciones de P_i 1 ml de H_2O bidestilada:

TUBO	P_i (nmoles)	SOL. KH_2PO_4 (μl)	H_2O BIDESE. (μl)	VOLUMEN TOTAL (μl)
0	0	0	1000	1000
1	125	25	975	1000
2	250	50	950	1000
3	375	75	925	1000
4	500	100	900	1000

- 2) Se adicionó a todos los tubos de la curva-patrón así como a los tubos que contenían las muestras problema tratadas para la determinación enzimática de la 5'-Nt, 2ml de solución de Molibdato Ferroso (11.2.5.3.) y se agitaron vigorosamente.

- 3) Se incubaron por 1 minuto a temperatura ambiente para que se desarrollara el color.
- 4) Se leyó la Densidad Óptica a 660 nm, en espectrofotómetro (Zeiss) y se utilizó H₂O bidestilada como referencia.
- 5) Se hizo una grafica en papel milimétrico de la Densidad Óptica vs Concentración de Pi.
- 6) La Densidad Óptica obtenida por cada muestra problema, se extrapoló en la curva-patrón y se obtuvieron los nmoles de Pi liberado en las muestras problema.

11.4.6.3. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA DESHIDROGENASA LACTICA.

La actividad de la Deshidrogenasa Láctica (LDH), se determinó por el método "estándar optimizado de la Sociedad Alemana de Química Clínica: Monotest b"; en el cual la LDH cataliza la conversión de Piruvato a L-lactato llevándose a cabo una oxidación del NADH a NAD. La reacción química en la que se basa ésta prueba es:



La técnica utiliza un medio de reacción que contiene:

NADH 0.18 mM (11.2.6.3.), Piruvato 0.6 mM (11.2.6.2.) en amortiguador de Fosfato de Potasio 50 mM, pH 7.5 (11.2.6.1.) y la metodología fue como sigue:

A 675 μ l del medio de reacción, se le adicionaron 25 μ l del homogenado celular (de 0.01 a 0.2 μ g de proteína); o bien, de

la fracción rica en membrana citoplasmática (0.01 a 0.1mg de proteína),teniendo un volúmen final de 700 μ l.

La actividad de la enzima LDH, se determinó a 23.5°C a 365 nm (U.V.), por espacio de 5 minutos, registrando los cambios de densidad óptica (D.O.) cada minuto. Una unidad de la actividad de la LDH, se define como la cantidad de actividad de LDH que cataliza la conversión de 1 micromol de piruvato a 1 micromol de lactato en un minuto a 365 nm y se reporta como los μ moles de lactato producido/minuto/mg proteína.

11.4.7. TECNICAS PARA LA SEPARACION DE PROTEINAS CONTENIDAS EN LA FRACCION DE MEMBRANA CITOPLASMATICA.

La separación de las proteínas contenidas en la Fracción Rica en Membrana Citoplasmática, se hizo por medio del método de Electroforesis en Gales Cilindricos de Poliacrilamida-SDS, en condiciones desnaturalizantes, técnica reportada por Weber y Osborn (73). De esta manera se conoce el número de proteínas existentes en la fracción microsomal así como su P.M. Esto además permite visualizar, si la imagen electroforética de la muestra de tejido de Cu.H. difiere de la de Ca.Cu. Invasor.

11.4.7.1 PREPARACION DE GELES DE POLIACRILAMIDA AL 7.5% CON SDS.

- a) Con el propósito de preparar el gel separador de poliacrilamida-SDS al 7.5%, se hizo la siguiente mezcla a temperatura ambiente y con agitación constante.

Solución amortiguadora de fosfatos-SDS	
0.2 M, pH 7.2 (11.2.7.1.)	15.0 ml.
Solución de acrilamida al 40% (11.2.7.2.)	5.63 ml.
Solución de bis-acrilamida al 2% (11.2.7.3.)	3.05 ml.
Solución de persulfato de amonio (11.2.7.4.)	1.50 ml.
Solución de TEMED (11.2.7.5.)	0.03 ml.
H ₂ O bidestilada	4.8 ml.

El Persulfato de Amonio así como el TEMED, se adicionan al final de la mezcla.

- b) Para preparación el gel concentrador de poliacrilamida-SDS al 3%, se hicieron las siguientes mezclas con agitación constante y a temperatura ambiente:

Solución amortiguadora de fosfatos-SDS	
0.2 M, pH 7.2 (11.2.7.1.)	1.25 ml.
Solución de acrilamida al 40% (11.2.7.2.)	0.2 ml.
Solución de bis-acrilamida al 2% (11.2.7.3.)	0.1 ml.
Solución de persulfato de amonio (11.2.7.4.)	0.125ml.
Solución de TEMED (11.2.7.5.)	0.003ml.
H ₂ O bidestilada	0.82 ml.

El Persulfato de Amonio así como el TEMED, se adicionan al final de la mezcla.

- c) Los geles se prepararon en tubos de vidrio de 12.5 cm de longitud con un diámetro interno de 4 mm; se sellaron de un extremo con parafilm. En estos tubos, se vertieron 2 ml de la mezcla de poliacrilamida-SDS al 7.5%. Sobre ésta solución se añadieron 300 µl de la mezcla de poliacrilamida-SDS al 3% en forma de gradiente y encima de ésta úl-

tima capa de poliacrilamida, se colocó 250 μl de H_2O bi-distilada. Los geles se dejaron polimerizar a temperatura ambiente.

11.4.7.2. TRATAMIENTO DE LAS PROTEINAS MEMBRANALES, PARA SEPARARLAS A TRAVÉS DE ELECTROFORESIS.

Se trataron 50 μg de proteína de cada una de las muestras problema, de la siguiente manera:

- a) En un tubo de ensaye de vidrio de 12 x 75 mm, se colocó la proteína a la cual se le adicionaron 10 μl de la Solución I (11.2.7.7.). El tubo se puso en un baño María, a punto de ebullición por 1 minuto. El volumen total de la proteína más el de la Solución I, fue de 100 μl .
- b) Se adicionaron a la mezcla anterior 50 μl de la Solución II (11.2.7.8.). Esta mezcla total fue la que se corrió en la electroforesis.

11.4.7.3. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS.

- a) Se extrajo el H_2O del extremo superior del tubo que contenía el gel de poliacrilamida.
- b) Se colocaron los tubos en la cámara de electroforesis (Fig. 22).

- c) Se llenaron las cámaras con la Solución amortiguadora de fosfatos-SDS 0.1 M, pH 7.2 (11.2.7.6.), hasta que se cubrieron bien los tubos.
- d) Se colocó en los tubos con el gel de poliacrilamida 150 μ l de la mezcla de proteína tratada.
- e) La electroforesis se corrió aplicando una corriente eléctrica de 4 mA por tubo durante 1 hr.
- f) Una vez pasada la hora de corrida a 4 mA, se aumentó la corriente eléctrica a 8 mA por gel, hasta que el frente del colorante indicador (Solución II. -11.2.7.9.-) llegó al extremo inferior del tubo.
- g) Se sacaron los tubos de la cámara y se extrajeron los geles.
- h) Se midió la distancia de migración del colorante indicador desde el origen, hasta la zona de tinción más densa del mismo.
- i) Se tiñieron los geles durante 5 hrs, en la Solución de coloración (11.2.7.10)
- j) El exceso de colorante de los geles se eliminó colocándolos en la Solución de decoloración (11.2.7.11.), hasta que sólo las bandas de proteínas, estuvieron teñidas.
- k) Finalmente, los geles se sumergieron en la Solución de conservación (11.2.7.12.).

- 1) Tubos de Vidrio.
- 2) Cámara Inferior
- 3) Cámara Superior
- 4) Electrodo.

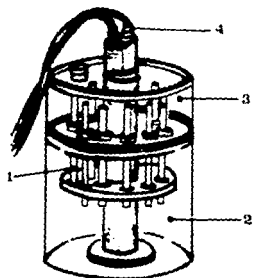


FIGURA 20. Esquema del Aparato de Electroforesis en Geles Cilíndricos de Poliacrilamida

11.4.5. TÉCNICA DE ANÁLISIS DE LA CONCENTRACION PROTEICA.

11.4.5.1. DENSITOMETRIA.

El análisis cuantitativo de las fracciones o bandas proteicas que se separaron por Electroforesis, se hizo por medio de un Densitómetro (Gelman, DCD-16) (16 y 17). En este método mediante un Sistema Optico especial, se mide la cantidad de luz transmitida o la intensidad de luz reflejada por la fracción de la proteína teñida. Para el registro de estas mediciones, el densitómetro tiene acoplado un sensor en forma de plumilla, que muestra en forma esquemática de valles y picos, los cambios en el índice de refracción a lo largo del gel. Estos picos y valles, reflejan cambios en la concentración de cada una de las proteínas separadas por electro-

foresis y que se encuentran contenidas en el gel. Por lo que el área bajo un pico, es proporcional a la concentración del componente correspondiente en la mezcla de proteínas.

Los pasos que se siguieron para el análisis densitométrico de las bandas proteicas separadas por electroforesis, se enumeran a continuación:

- 1) El gel una vez teñido, decolorado y puesto en conservación, se montó y centró, en una plancha de vidrio delgado 3 mm de espesor, que se colocó sobre el soporte para las muestras, y se aseguró con unas pequeñas pinzas (Fig. 23).

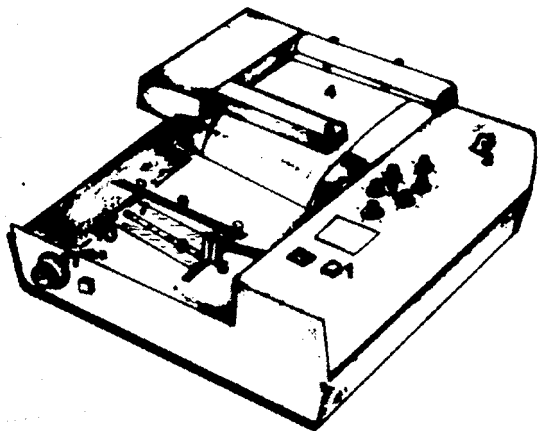


FIGURA 23.

Esquema del Densitómetro (DD-10). 10 Botón de arranque; 20 Botones de funciones diversas; 30 Botón de encendido; 40 Papel para grabar; 50 Plomilla de registro; 60 Salida del haz de luz; 70 Plancha de vidrio; 80 Gel; 90 Soporte de muestras; 100 Carriles ajuste horizontal; 110 Control de posición del carril (ajuste vertical).

- 2) Utilizando los tornillos de ajuste vertical del densitómetro, la plancha de vidrio se fue deslizando manualmente hasta que el haz de luz del aparato, quedó en el centro del gel.
- 3) El carril de deslizamiento horizontal del densitómetro, se acomodó al tamaño del gel con los tornillos de ajuste horizontal.
- 4) Se seleccionó la longitud de onda a la que se registraron las fracciones proteicas. En éste caso fue de 575 nm; porque en ésta, el Azul de Coomassie (91) tiene su máxima absorción. La densidad óptica fue de 1.0.
- 5) Se marcó en el aparato, la longitud total del gel, y el modo en el que el densitómetro debía de funcionar; en éste caso fue en automático.
- 6) Se presionó el botón de inicio de funcionamiento del densitómetro y empezó el análisis densitométrico.
- 7) Los trazos densitométricos se registraron en un papel de Gráfica especial con el que cuenta el aparato.

El análisis cuantitativo de los trazos obtenidos en el Densitómetro se hizo según la Técnica descrita por Gorovsky y col. (92).

11.4.9. TECNICA PARA PREPARAR MUESTRAS DE MEMBRANA CITOPLASMATICA PARA MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION.

Con el propósito de corroborar la presencia de membranas citoplasmáticas en la fracción que se aisló de tejido de Cérvix Uterino (11.4.4), se realizaron observaciones morfológicas en el Microscopio Electrónico de Transmisión. Para tal efecto, se tomó una pequeña porción del botón o sedimento resultante de la centrifugación a 27,500 RPM, que se hizo en la técnica para la obtención de membrana citoplasmática (11.4.4.). El sedimento de fracción rica en membrana citoplasmática, se sometió a los siguientes pasos para la obtención de las preparaciones:

- 1) El botón de fracción microsomal se fijó en una solución de Glutaraldehído al 2.5% en Amortiguador de Fosfatos 0.1 M, pH 7.35 (11.2.9.3.). La fijación se llevó a cabo durante 1 hr. a 4°C; sin embargo, 5 minutos después del inicio de la fijación la muestra se centrifugó a 3000 RPM durante 5 minutos para que se formara un botón.
- 2) Pasado el tiempo de fijación, el botón se lavó 3 veces con el amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.35, (11.2.9.2.) con el fin de eliminar el exceso de fijador.
- 3) El botón se post-fijó durante 1 hr. a temperatura ambiente en Solución de Tetróxido de Osmio al 1% en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.35 (11.2.9.4.); y se lavó el 3 veces con Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.35 (11.2.9.2.).
- 4) Se deshidrató el botón microsomal, con alcoholes del 70, 80, 90 y 100%. La deshidratación con cada uno de los alcoholes fue durante 10 minutos. Y con el alcohol al 100% se hicieron 2 cambios.

- 5) Se hicieron 2 lavados con Oxido de Propileno cada uno de 10 minutos.
- 6) La pre-inclusión se hizo en 3 pasos: primero una una mezcla 1:1 de Oxido de Propileno y EPON, durante 1 hr.; segundo en una mezcla 2:1 de EPON y Oxido de Propileno; durante toda la noche y tercero en EPON puro por 1 hr.
- 7) El botón se incluyó en EPON puro y se metió al horno a 60°C para que se polimerizara.
- 8) Se hicieron cortes ultrafinos. se montaron en las rejillas para microscopía electrónica y se tiñieron con plomo y uranilo.

Sólo se hicieron preparaciones de microscopía electrónica, de una muestra de tejido tumoral y una muestra de tejido normal, las cuales fueron elegidas al azar; como representativas del estudio.