



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**ANÁLISIS MOLECULAR DE LA INTERACCIÓN ENTRE CÉLULAS TRONCALES DE TEJIDO
ADIPOSO ADSC Y CÉLULAS TUMORALES DE CÁNCER**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ALANIS MANRIQUEZ ERIKA CLAUDIA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. VILMA MALDONADO LAGUNAS

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. PEDRO ULISES OSTOA SALOMA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DRA. ERIKA PATRICIA RENDON HUERTA

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, D.F. MAYO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 19 de enero de 2015, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **ALANIS MANRIQUEZ ERIKA CLAUDIA** con número de cuenta **300156034**, con la tesis titulada "**ANÁLISIS MOLECULAR DE LA INTERACCIÓN ENTRE CÉLULAS TRONCALES DE TEJIDO ADIPOSITO ADSC Y CÉLULAS TUMORALES DE CÁNCER**", realizada bajo la dirección de la **DRA. VILMA MALDONADO LAGUNAS**:

Presidente: DRA. MARTHA ROBLES FLORES
Vocal: DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL
Secretario: DR. PEDRO ULISES OSTOA SALOMA
Suplente: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA
Suplente: DRA. ERIKA PATRICIA RENDÓN HUERTA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 04 de marzo de 2015

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por todo el conocimiento que adquirí en la maestría.

Al CONACyT el apoyo económico brindado (CUV: 479976, No. Registro becario: 282021).

A mi Tutora la Dra. Vilma Maldonado Lagunas quien me ha dado herramientas valiosas para mi desarrollo académico y personal y que gracias a su conocimiento, dirección, confianza y gran calidad humana se pudo llevar a cabo de manera satisfactoria este proyecto.

Al Comité Tutor integrado por la Dra. Martha Robles Flores, la Dra. Yolanda López Vidal, el Dr. Pedro Ulises Ostoá Saloma, Dra. Leticia Rocha Zavaleta y la Dra. Erika Patricia Rendón Huerta quienes con sus observaciones enriquecieron mi trabajo final.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Ana y Jesus, mis hermanos Erik y Jesus y mis sobrinos Erik y David; que siempre están ahí para apoyarme y que son pilares en cada uno de los proyectos que me propongo. Mis infinitas gracias por su ayuda, paciencia, consejos y sonrisas.

A Héctor Eduardo por el amor y apoyo que nos ha unido todo este tiempo y nos ha llevado a realizar proyectos importantes como este.

A mis compañeros del laboratorio: Claudia, Caro, Vale, Paulina, Gisela, Javier, Karla, Enrique, Laura, Magali, Jisela y Floria, gracias por su ayuda y buena convivencia en mi estancia en el laboratorio.

DEDICATORIA

Para el gran amor de mi vida, mi musa y por quien daría todo,
para mi hermosa hija Milka Arhirani

*“El Amor es la fuerza más humilde,
pero la más poderosa de que dispone el ser humano.”*

—Mahatma Gandhi

ÍNDICE

I. RESUMEN	1
A. ABSTRACT	2
II. MARCO TEORICO.....	3
A. CÁNCER	3
a. Cáncer Cérvico-uterino.....	5
b. Factores de riesgo para CaCu.....	8
B. SOBREPESO Y OBESIDAD.....	9
C. CÁNCER Y OBESIDAD.....	11
D. ASOCIACIÓN ENTRE ADSC Y CÁNCER.....	13
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
IV. HIPÓTESIS.....	16
V. OBJETIVO	16
VI. DISEÑO EXPERIMENTAL	17
VII. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	23
VIII. CONCLUSIÓN.....	39
IX. LITERATURA CITADA.....	40

I. RESUMEN

El cáncer es una enfermedad genética en donde las mutaciones pueden “activar” o “desactivar” ciertos genes. Estos genes inducen cambios en la regulación de mecanismos celulares tales como el crecimiento, división celular y muerte celular. El cáncer cérvico-uterino (CaCu) ocupa el segundo lugar en mortandad en mujeres a nivel mundial. Estudios epidemiológicos indican que el sobrepeso y la obesidad son factores que influyen de manera negativa en la progresión y el tratamiento de CaCu. Además, se ha sugerido que la población de células troncales que se encuentran en el tejido adiposo (ADSC) ejerce también influencia sobre la carcinogénesis. El análisis de ARNs aporta información valiosa para entender mecanismos de regulación que ocurren en cáncer. El objetivo del presente estudio fue analizar el RNAoma en co-cultivos de células ADSC y células de cáncer cérvico-uterino (HeLa) por medio de secuenciación masiva de transcritos. La secuenciación masiva mostró la modificación de 2190 genes, 7 RNAs no codificantes de novo y 23 redes de moléculas, en células HeLa co-cultivadas con ADSC.

Palabras clave: co-cultivos, cáncer cérvico-uterino, ADSC, secuenciación masiva.

A. ABSTRACT

Cancer is a genetic disease where mutations can "turn on" or "off" certain genes. These genes induce changes in the regulation of cellular mechanisms such as growth, cell division and cell death. The cervical cancer (CC) is second in mortality in women worldwide. Epidemiological studies indicate that overweight and obesity are factors that negatively influence the progression and treatment of cervical cancer. Furthermore, it has been suggested that the population of stem cells found in adipose tissue (ADSC) also influences carcinogenesis. The analysis of RNAs provides valuable information for understand the regulatory mechanisms implicated in cancer. The aim of this study was to analyze the RNAoma in co-cultures of ADSC cells and cervical cancer cells (HeLa) by massive sequencing of transcripts. The massive sequencing showed the modification of 2190 genes, 7 novo noncoding RNAs and 23 molecular networks in HeLa cells co-cultured with ADSC.

Keywords: co-cultures, cervical cancer, ADSC, massive sequencing.

II. MARCO TEORICO

A. CÁNCER

Cáncer, es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar cualquier parte del organismo; también se denominan «tumores malignos» o «neoplasias malignas¹».

El cáncer es una enfermedad genética², resultado de mutaciones, o cambios anómalos, en los genes que regulan el crecimiento de las células; las mutaciones pueden “activar” ciertos genes y “desactivar” otros, provocando, de esta manera que la célula modificada adquiera la capacidad de dividirse sin ningún tipo de control u orden y generar un tumor^{3, 4}. De esta forma, el cáncer se caracteriza por el crecimiento celular modificando la invasión y propagación (metástasis) de células desde su sitio de origen a otros sitios del cuerpo⁴.

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo; en 2008 causó 7,6 millones de defunciones (aproximadamente un 13% del total)⁵. En México es la tercera causa de muerte, y aunque muchos son tratables a tiempo, sólo el 40% se detectan en una etapa oportuna⁶.

Aproximadamente un 30% de las muertes por cáncer se relacionan a cinco factores de riesgo conductuales y dietéticos: índice de masa corporal elevado, ingesta reducida de frutas y verduras, falta de actividad física, consumo de tabaco y consumo de alcohol. Los cánceres causados por infecciones víricas, tales como las infecciones por virus de las hepatitis B

(VHB) y C (VHC) o por virus del papiloma humano (VPH), son responsables de hasta un 20% de las muertes por cáncer en los países de ingresos bajos y medios⁷.

La OMS refiere que el cáncer de cérvix es el segundo cáncer más común en mujeres en todo el mundo, con cerca de 500 mil nuevos casos y 250 mil muertes cada año⁸ Según Globocan en 2012⁹, la presencia de tumores malignos en el cuello del útero, es el tercer tipo de cáncer con mayor prevalencia en México y alrededor del 9.4% de los pacientes presentaban este tipo de cáncer (Figura 1⁹).

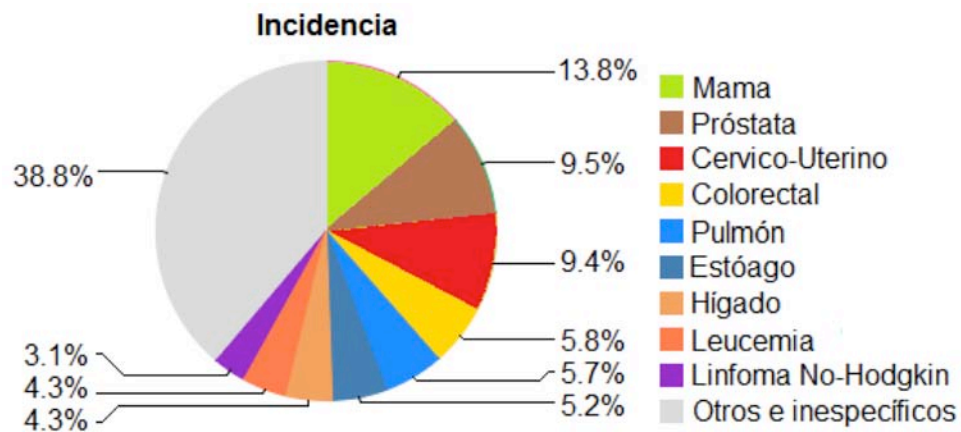


Figura 1. Incidencia estimada de tipos de cáncer en la población mexicana.

a. Cáncer Cérvico-uterino

El útero es un órgano con forma pera invertida y está situado en la pelvis, entre el recto y la vejiga¹⁰. Está formado por dos partes: la zona más inferior, situada en el interior de la vagina, llamada cérvix o cuello del útero por ser de forma más alargada y estrecha y la parte más ancha, situada por encima del cuello, que se denomina cuerpo del útero¹¹. El cuerpo del útero está constituido por dos capas. Como se muestra en la figura 2¹², la capa más interna se denomina **endometrio** y por fuera de ella se sitúa la capa muscular o **miometrio**^{10,12}.

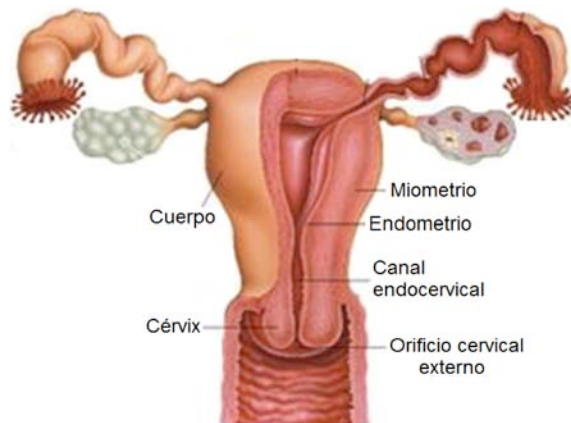


Figura 2. Anatomía del útero.

El cuello uterino o cérvix es de forma cilíndrica y cuelga en el interior de la vagina. La mucosa que lo recubre está en contigüidad con la vagina y se denomina **ectocérvix** el cual está cubierto por epitelio escamoso estratificado^{10, 13, 14}. Mientras que la que recubre el conducto o canal cervical, que lleva hasta la cavidad del cuerpo uterino se denomina **endocérvix**, y está cubierto por epitelio columnar-cilíndrico muco-secretor^{10, 14}. El sitio anatómico donde se localiza la unión de ambos epitelios (Zona de transformación) es muy variable, depende de la acción de las hormonas ováricas, lo que a su vez está relacionado con la edad además de ser una zona sensible a eventos neoplásicos^{10, 12, 14} (Figura 3^{14, 85}).

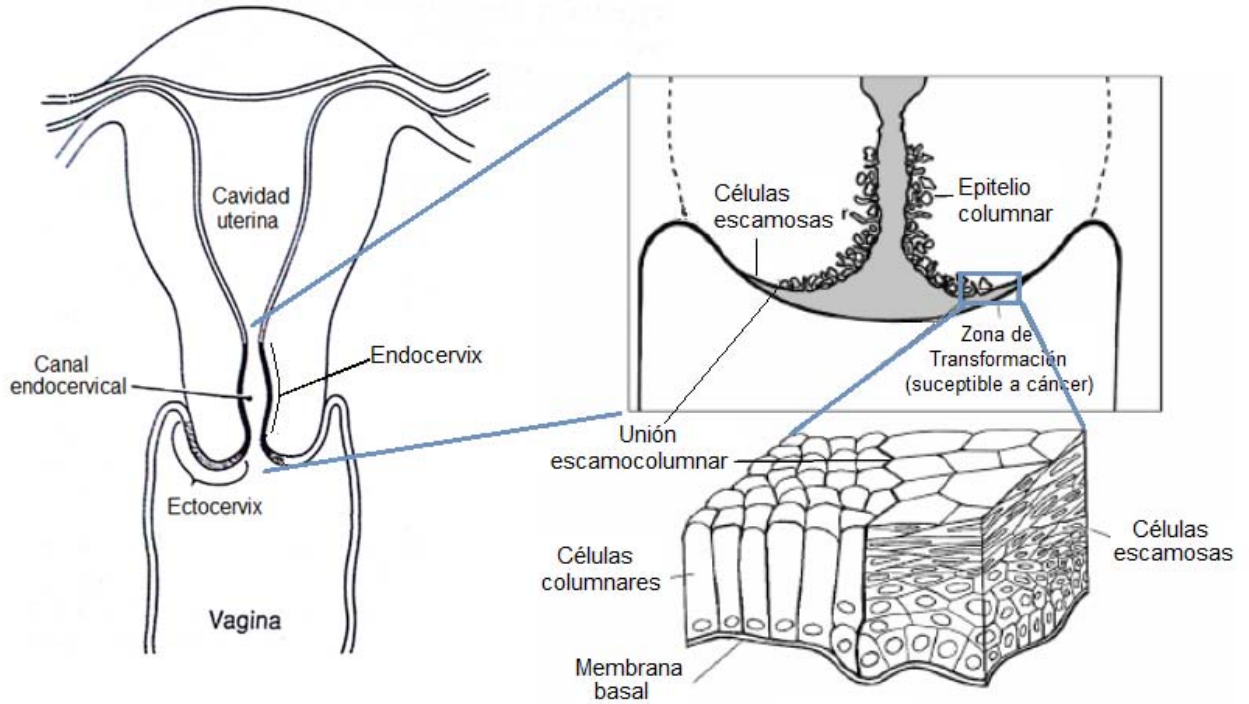


Figura 3. Anatomía del cérvix.

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) es una neoplasia maligna donde el 90% de los casos surge en la zona de transformación del ectocervix y el 10% restante son adenocarcinomas en la capa glandular columnar del endocervix ⁸⁵. Este tipo de cáncer se desarrolla a partir de lesiones preexistentes en las que se identifican células displásicas; aproximadamente el 99.8% se debe a infecciones por algunos tipos específicos del virus del papiloma humano (VPH) ^{3, 15}.

Clasificación de lesiones precursoras del CaCu.

El término Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC), es referido para denotar las múltiples posibilidades de atipia celular confinada al epitelio y su clasificación se basa en hallazgos citológicos cervicales ⁸⁶. Las características importantes de la NIC son: inmadurez y

desorganización celular, anormalidad nuclear e incremento de la actividad celular mitótica. Si células mitóticas inmaduras están presentes solo en el tercio inferior del epitelio la lesión se designa como NIC1; lesión en el tercio inferior y medio NIC2 y las relacionadas con el tercio superior NIC3³.

Otra clasificación es la del Sistema Bethesda (TBS, por sus siglas en inglés); que además proporciona resultados histopatológicos; con este sistema se originó el concepto de lesiones escamosas intraepiteliales (LEI), subdividiéndose en lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado (LEIBG) y lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado (LEIAG); en las LEIBG quedan incluidas las infecciones por VPH y la displasia leve o NIC I. Las displasias moderada y severa o NIC II-III quedan agrupadas en las LEIAG¹⁶. El Sistema Bethesda contempla una nueva categoría: las células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS, por sus siglas en inglés), estas células no satisfacen los criterios de las LEIBG^{17, 86}. Las equivalencias de los dos sistemas de clasificación se observan en la Tabla 1⁸⁶.

Tabla 1.		
Sistema de clasificación de las lesiones precursoras del cáncer cérvico-uterino		
Terminología de la displasia	Terminología NIC	Terminología TBS
Normal	Normal	Dentro de los límites normales
Atipia		Cambios celulares benignos (ASCUS)
Displasia leve	NIC I	LEIBG
Displasia moderada	NIC II	LEIAG
Displasia grave	NIC III	LEIAG
Carcinoma <i>in situ</i>	NIC III	LEIAG
Carcinoma invasor	Carcinoma invasor	Carcinoma invasor
LEIBG: Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado LEIAG: Lesión escamosa intraepitelial de alto grado ASCUS: Células escamosas atípicas de significado indeterminado VPH: Infección por virus del papiloma humano NIC: Neoplasia intraepitelial cervical		

Estudios epidemiológicos y moleculares han demostrado una estrecha relación entre el VPH, la NIC y el carcinoma invasivo del cérvix. Como se mencionó anteriormente el VPH se ha identificado en más del 99% de los cánceres cervicales y la infección con dicho virus es aceptada ahora como la causa de la mayoría de los cánceres cervico-uterinos³. Los VPH son una familia de más de 100 virus relacionados y no todos desencadenan en cáncer. Los VPH transmitidos sexualmente se clasifican en dos categorías: los de bajo riesgo (VPH-BR), los cuales no causan cáncer pero pueden causar verrugas en la piel, genitales o el ano (VPH: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54,61, 62, 64, 71, 74, etcétera); y los de alto riesgo u oncogénicos (VPH-AR), los cuales pueden causar cáncer (VPH: 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45. 51 etcétera). Se sabe que los VPH-AR 16 y 18 causan casi el 70% de los cánceres cervico-uterinos¹⁹.

b. Factores de riesgo para CaCu.

La Norma Oficial Mexicana para la Prevención, Tratamiento y Control del Cáncer Cérvico-uterino establece los siguientes factores de riesgo para el desarrollo de esta enfermedad ²⁰, ²¹. Mujer entre 25-64 años de edad, inicio temprano de relaciones sexuales (antes de los 18 años), múltiples parejas sexuales, infección por VPH, antecedentes de enfermedad de transmisión sexual, tabaquismo, desnutrición, deficiencia de antioxidantes, pacientes con inmuno-deficiencias y nunca haberse practicado un estudio citológico. Se ha encontrado también, que el sobrepeso y la obesidad son factores que influyen de manera negativa en la progresión y el tratamiento de CaCu ²²⁻²⁴.

B. SOBREPESO Y OBESIDAD

La Organización Mundial de la Salud (OMS), define el sobrepeso y la obesidad como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. La causa fundamental del sobrepeso y la obesidad es un desequilibrio energético entre calorías consumidas y gastadas²⁵. El índice de masa corporal (IMC) es un indicador simple de la relación entre el peso y la talla que se utiliza frecuentemente para identificar el sobrepeso y la obesidad en los adultos, este se calcula dividiendo el peso de una persona en kilos entre el cuadrado de su talla en metros (kg/m^2)²⁶. La tabla 2 muestra la clasificación de sobre peso y obesidad de acuerdo al IMC según la OMS²⁷. La obesidad es asociada con la prevalencia del incremento de múltiples enfermedades tales como hipertensión, diabetes, enfermedades cardiovasculares y cáncer²⁸.

Tabla 2. Clasificación de sobre peso y obesidad de acuerdo al IMC según la OMS ²⁷		
IMC (Kg/m^2)		
Clasificación	Valores principales	Valores adicionales
Normal	18.50 – 24.99	18.50-22.99 23.00-24.99
Sobrepeso	≥ 25.00	≥ 25.00
Pre-obeso	25.00 – 29.99	25.00-27.49 27.50-29.99
Obeso	≥ 30.00	≥ 30.00
Obeso tipo I	30.00 – 34.99	30.00-32.49 32.50-34.99
Obeso tipo II	35.00 – 39.99	35.00-37.49 37.50 – 39.99
Obeso tipo III	≥ 40.00	≥ 40.00

IMC: Índice de masa corporal; OMS: Organización Mundial de la Salud

Hay dos tipos principales de tejido adiposo; subcutáneo y visceral, siendo el visceral más activo metabólicamente²⁹. El tejido adiposo contiene varios tipos de células incluyendo los adipocitos, pre-adipocitos, fibroblastos, células endoteliales, los macrófagos residentes y células troncales mesenquimales^{30,31}, que producen una amplia gama de citocinas, adipocitocinas y factores de crecimiento, tales como la adiponectina, la leptina, la resistina, la visfatina, VEGF, PAI-1, MCP-1 y TNF α ³².

El tejido adiposo es principalmente un sitio de almacenamiento de triglicéridos, pero también secreta hormonas, factores angiogénicos, factores de crecimiento, citocinas, factores de crecimiento pro-angiogénico. Los niveles de expresión de algunas adipocinas incluyendo leptina y adiponectina están correlacionadas ya sea positiva o negativamente con la masa adiposa. Por lo tanto, la expansión del tejido adiposo debe ser acompañada por la expansión de su vascularización, a través de procesos de angiogénesis, mientras que la pérdida de peso se asocia con la regresión de los vasos sanguíneos³⁰.

La inflamación y la angiogénesis comparten vías comunes; como la mayoría de las citocinas y adipocitocinas tienen, efectos pro-angiogénicos, contribuyendo a la irrigación de los tejidos, así como a la progresión del cáncer³².

C. CÁNCER Y OBESIDAD

En México, el sobrepeso y obesidad son problemas que afectan a cerca del 70% de la población (mujeres, 71.9 %, hombres, 66.7%) entre los 30 y 60 años ³³. La FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations, por sus siglas en inglés) en su último informe “The State of Food and Agriculture 2013” basado en estadísticas del 2008, ubicó a México como el país con más obesidad en el mundo, con un porcentaje de 32.8% de adultos con este problema, arriba de Estados Unidos con un 31.8%³⁴.

Estudios de corte, han relacionado el exceso de peso y la obesidad con un mayor riesgo a padecer cáncer y de mortalidad asociada a esta enfermedad^{35, 36}. Algunos cánceres asociados a la obesidad son: adenocarcinoma de esófago, de páncreas, de colon, de endometrio, de riñón, algunas leucemias como el mieloma múltiple, cáncer mamario post-menopáusico y cáncer cérvico-uterino^{24, 28, 36, 37}.

El INEGI³⁸ en 2010 reportó que el cáncer cérvico-uterino ocupa el segundo lugar como causa de muerte en mujeres de 20 años y más afectando al 9.7% de la población femenina. Estudios epidemiológicos señalan que las mujeres con sobrepeso presentan mayor riesgo de padecer cáncer cervical y endometrial^{24, 39}.

Los mecanismos por los que la obesidad se ha relacionado con un riesgo mayor de padecer cáncer han sido poco estudiados, sin embargo se han vinculado con altos niveles de insulina^{40, 41}, la acción de adipocinas u hormonas derivadas de los adipocitos⁴², elevada secreción de citocinas pro-inflamatorias⁴³, entre otros. Por otra parte, trabajos recientes han

sugerido que la población de células troncales que yace en el tejido adiposo ejerce también influencia sobre la carcinogénesis^{44, 45}.

Silberteín en 2001⁴⁶ propone que el crecimiento y progresión tumoral no solo depende del potencial que las propias células tumorales tienen de diseminarse y de proliferar rápidamente en el organismo, sino también de cómo son afectadas por otros tipos celulares así como por factores que éstas secretan. En este sentido cabe destacar que se ha propuesto que el tejido adiposo juega un papel preponderante en el desarrollo tumoral²⁸.

El tejido adiposo posee una población de células troncales o mesenquimales también referida como células troncales derivadas de tejido adiposo (ADSC por sus siglas en inglés “*adipose tissue-derived stromal cells*”). Se ha propuesto que las ADSC yacen en nichos especializados dentro de las redes microvasculares⁴⁷ en donde también se incluyen progenitores vasculares (de pericitos y endotelio), preadipocitos, fibroblastos, endotelio, músculo liso y células del sistema inmune como macrófagos⁴⁸. Las células ADSC presentan una gran plasticidad ya que pueden diferenciarse en: adipocitos, cartílago, hueso, músculo esquelético, células neuronales, endotelio, cardiomiocitos y músculo liso^{47, 49}. Las células troncales, incluyendo las de tejido adiposo, se caracterizan por ser una población capaz de dar origen al tejido del que forman parte así como también pueden trans-diferenciarse en otros tipos celulares distintos⁵⁰. Una célula troncal se define por ser multipotente, presentar división asimétrica en la que se produce una célula multipotencial (autorrenovación) y otra célula con capacidad de diferenciarse⁵⁰; otra característica es que las ADSC presentan marcadores de superficie específicos que resultan muy útiles durante su aislamiento, ya que

éste se basa en la presencia o ausencia de dichos marcadores. El inmunofenotipo característico de las ADSC es: CD29⁺, CD73⁺, CD44⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD14⁻, CD31⁻, CD45⁻ ⁴⁷.

D. ASOCIACIÓN ENTRE ADSC Y CÁNCER

Hay una interacción entre ADSC y las células tumorales. El proceso más estudiado es la atracción que ejercen las células del tumor sobre las ADSC. Se ha sugerido que la capacidad de las ADSC de migrar específicamente al tumor podría ser utilizada para usarse como vectores para transportar drogas antineoplásicas⁵¹. Así, Zolochovska *et al.* en 2012⁵² demostraron que ADSC que son transfectadas y sobre-expresan PEDF (factor derivado de pigmento epitelial) y MDA7 (factor asociado con diferenciación de melanoma) reducen el crecimiento del tumor en ratones inmuno-deficientes. Cuando las ADSC son transfectadas con el virus Myxoma que expresa proteínas oncolíticas y son inyectadas en cerebro inducen la muerte de células de glioblastoma multiforme en ratones⁵³. Una vez instaladas las ADSC cerca del tumor tienen varios efectos sobre el tumor, como aumentar el crecimiento de la masa tumoral. Se ha sugerido que esta acción podría deberse a que secretan tanto factores de crecimiento como factores angiogénicos que permite al tumor tener acceso a nutrientes y oxígeno que le permiten crecer más rápido³⁰. Si bien el mecanismo celular y molecular de la interacción entre estas dos poblaciones se desconoce a fondo, diversos estudios han demostrado que las células troncales mesenquimales tienen un papel dual al interactuar con células cancerosas y que éste depende del contexto celular en donde residan⁵⁴.

No queda duda que ambas poblaciones celulares provocan un cambio fenotípico entendiéndose éste como cambios en su capacidad de migración ó proliferación sobre la otra población celular. Al utilizar medio condicionado de ADSC se observó que este influye de manera negativa en el crecimiento de carcinoma hepatocelular, inhibe la viabilidad, proliferación y promueve la muerte de células derivadas de adenocarcinoma pancreático ductal, cáncer de colon y cáncer de próstata, no siendo así para células de cáncer cervical o cáncer de mama^{55, 56}. Estudios de co-cultivos directos de células de cáncer pancreático (líneas celulares: SW1990 y PANC-1) con ADSC demostraron que estas últimas promueven la proliferación celular de células cancerosas además de estimular una conducta migratoria e invasiva⁵⁷. Samoylovich et al., (2013)⁵⁸ demostraron que células ADSC extraídas de personas sanas o con cáncer de mama influyen de manera positiva en la supervivencia, proliferación y formación de contactos intercelulares estrechos al ser co-cultivadas con células de mieloma U266. Cuando ADSC son cultivadas directamente con células H358 (línea de cáncer de pulmón) se observan cambios morfológicos y en la motilidad; esto sugiere que las ADSC pueden diferenciarse a estroma tumoral y desempeñar funciones de apoyo durante la progresión del cáncer⁴⁵.

En toda célula el cambio de fenotipo y/o comportamiento celular que se da en respuesta a cambios en el medio ambiente, se asocia con cambios en la expresión o actividad de proteínas, muchas de las cuales se regulan a nivel de expresión de sus RNAs mensajeros.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hay una asociación entre obesidad y el riesgo (en términos de probabilidad) de desarrollar ciertos tipos de cáncer (cérvico-uterino, de mama, de colon, y recto, del endometrio, próstata, ovario, entre otros).

Las células ADSC son una fuente importante de factores y citocinas⁴⁷ Estas moléculas secretadas al medio extracelular pudieran estar ejerciendo una acción paracrina sobre las células tumorales afectando su comportamiento y asimismo la progresión y malignidad del cáncer. Ante una respuesta inflamatoria las células progenitoras empiezan a circular para acercarse a tejidos dañados y ayudar a su recuperación, si bien diversos grupos de investigación han demostrado que las ADSC promueven el fenotipo maligno de las células de cáncer, los mecanismos moleculares se desconocen. A su vez se sabe que las células de cáncer atraen a las células troncales aunque el mecanismo molecular también se desconoce.

En este trabajo se propone que esta interacción de ADSC provenientes de grasa abdominal de pacientes obesos y células de cáncer producen cambios en la metilación del ADN de ambas células lo cual produce cambios en los niveles de ARN codificantes.

De tal forma que se analizará a nivel molecular los cambios de expresión génica que ocurren cuando las células HeLa se co-cultivan 24 horas con ADSC humanas.

IV. HIPÓTESIS

El co-cultivo de células ADSC con células de cáncer cervical provocará cambios en la expresión de ARN codificante en las células de cáncer cervical.

V. OBJETIVO

Analizar el RNAoma de células de cáncer cérvico-uterino (HeLa) en co-cultivo con células ADSC.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtención y caracterización de células ADSC de pacientes con sobrepeso.
2. Analizar la expresión génica (RNAoma) en células HeLa en co-cultivo con células ADSC.
3. Con el software IPA analizar las redes moleculares modificadas de la expresión génica de células HeLa en co-cultivo con células ADSC.

VI. DISEÑO EXPERIMENTAL

Cultivo de células: Las células HeLa se obtuvieron del ATCC (CCL-2). Las células HeLa son células epiteliales humanas de un carcinoma de cuello uterino. La línea celular se deriva de células de cáncer cervical tomadas de Henrietta Lacks, en 1951. Las células se cultivaron en medio DMEM al 5% de Suero Fetal Bovino (SFB), a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

Obtención y aislamiento de células troncales de tejido adiposo humano: Se recolectaron cuatro muestras de tejido adiposo humano a partir de bypass gástrico o también llamada de cirugía bariátrica de mujeres con índice de masa corporal mayor o igual a 30. Las muestras se obtuvieron del Servicio de Gastrocirugía del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

La muestra se lavaron con solución PBS dos veces, se trituraron con bisturí y se sometieron a una digestión con colagenasa tipo I (Millipore Cat. SCR103) a una concentración de 0.075% por 40 minutos a 37°C con movimiento suave. Por centrifugación diferencial se colectó la fracción estromal, que contiene a las células troncales (ADSC) y se sembró en placas de cultivo celular T25 con medio DMEM, estreptomycin y penicilina (P/E) y SFB al 15% el primer día, bajando la concentración de éste hasta un 5% para evitar diferenciación celular. Se propagaron y se tripsinizaron entre el 1er y 3er pase para asegurar que todas las muestras se encontraran en el mismo pase, se criopreservaron en nitrógeno líquido con medio de congelación.

La tabla 3 muestra la relación de las pacientes con su índice de masa corporal, las fechas de extracción de ADSC, crio-preservación, realización del pool, caracterización y extracción de ARN y ADN:

Tabla 3. Relación de pacientes con su IMC, extracción de ADSC y pases de las ADSC en las que se realizaron distintos ensayos.								
NP	IMC	Ex	Cp	D	Pool	2ªCt	Ex-ARN	Ex-ARN
1 B	42	14 marzo	P2					
2 A	39.2	4 abril	P2	P3	P5	P5	P6	P8
3 A	49	18 abril	P2	P3	P5	P5	P6	P8
3 B	49	18 abril	P5 1ª Ct					
4 A	52	25 abril	P2	P2	P4	P5	P6	P8
4 B	52	25 abril	P4 1ª Ct					

NP: número de paciente; P: pase número; Cp: crio-preservación; D: descongelación; Ct: citometría de flujo; Ex: extracción.

Caracterización de las células ADSC: La población estromal del tejido adiposo contiene, además de las células troncales, una fracción menor de células endoteliales y macrófagos. Con el propósito de caracterizar y determinar el porcentaje de células troncales, y de los otros tipos celulares de nuestra fracción, se analizó por citometría de flujo la presencia de marcadores de superficie en los tipos celulares a evaluar. Es así que para las células estromales de tejido adiposo se evaluó la presencia de CD44+ y CD9+. Y como control negativo se evaluó la presencia de CD31- y CD45-. Este ensayo se realizó solo en los paciente 3 y 4 antes de crio-preservar las células y, después de descongelar se analizaron los pacientes 2, 3 y 4. Finalmente se realizó un pool de tres pacientes para trabajar.

El ensayo de citometría para cada marcador para cada paciente se realizó con el siguiente protocolo: el medio DMEM de las placas de 100mm donde se mantenían a las ADSC de cada paciente fue aspirado y las placas se lavaron con PBS 2 veces. Para despegar las células de la placa se les agregó 1mL de acutasa (Millipore, EUA) o acumax o 6mL de non-

enzymatic cell dissociation solution (ATCC 30-2103) y se dejó incubar durante 20-30 min a 37°C y 5% CO₂. Las células se transfirieron a un tubo Falcon para centrifugarlas a 1,000rpm durante 4min. Se retiró el sobrenadante y el botón se re-suspendió en 1mL PBS más 1%SFB y se dejó incubar por 5 minutos. Se realizó el conteo en la cámara de Neubauer. Una vez que se obtuvo el número de células se realizaron alícuotas para cada uno de los marcadores e isotipos, éstas se centrifugaron en nanofuga durante 3min. Se retiró el sobrenadante. El botón se diluyó en 100µL de PBS más 1%SFB. Se agregó en cada alícuota 10µL del anticuerpo o isotipo por cada millón de células (CD44-FITC human MACS 120-006-945; CD90-FITC Millipore FCMAB211F; CD31-FITC Chemicon 925090; Mouse IgG1-FITC Mack Miltenyi Biotec y CD45-PE Millipore FCMAB118P). Se re-suspendieron suavemente las células y se dejó incubar por 30min a 4°C sin presencia de luz. Se procedió a centrifugar 30 segundos para precipitar las células y se tiró el sobrenadante. Se lavó tres ocasiones con 200µL de PBS más 1%SFB. Finalmente se diluyeron las células en 500µL de PBS más 1%SFB y se analizaron las muestras en el citómetro de flujo.

Pool de ADSC: Las muestras de cada paciente se descongelaron y se cultivaron en placas de 100mm con medio DMEM, P/E y 5% SFB en una atmósfera con 5% de CO₂ a 37°C. Las ADSC se mantuvieron bajo estas condiciones entre el pase 4 y 5 en el cual se cuantificaron las células de cada paciente quedando un número aproximadamente igual de cada paciente en cada placa de 100mm. Se sembraron aproximadamente 200,000 células ADSC-pool en cada caja a una confluencia de 80%.

Co-cultivos para extracción de ARN: El día previo al inicio del co-cultivo se tripzinizaron y cultivaron a una confluencia del 100% ADSCpool en 12 placas de 100mm. 6 placas se utilizaron para el co-cultivo con células HeLa y 6 placas como grupo control. Las células HeLa se tripzinizaron y cultivaron a una confluencia de 90% células en 3 insertos de 75mm (poros de 0.4 μm Costar Cat. 3420) para los co-cultivos con ADSCpool y tres placas de 100mm como grupos control. El procedimiento para el co-cultivo y los grupos, se realizaron igual que el co-cultivo para extracción de ADN, solo que en este caso el medio de cada grupo se recuperó para su posterior análisis.

Extracción de RNA para transcriptoma: los insertos de 75mm con células HeLa se apartaron de las placas de co-cultivo para poder realizar la extracción. Se tomó 1mL de medio donde se encontraban las células y el resto se reservó en tubos Falcon para su posterior análisis. Se agregó a cada placa o inserto el mL reservado y con ayuda de escrapers se raspó el fondo de las placas de 100mm que contenían a las ADSC, las placas de 100mm que contenían a las células HeLa y de los insertos de 75mm que contenían a las células HeLa en co-cultivo. El cúmulo de células de cada grupo experimental se recuperó en tubos eppendorf de 1.5mL y se centrifugaron las muestras a 1,200rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se retiró. Al botón celular se le agregó 500 μL de Quiazol (Quiagen Cat. 79306) más 10 μL de Triton X-100 al 2% (SIGMA Cat. T8787). Se re-suspendió el botón suavemente y se dejó incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se agregó 100 μL de cloroformo y se agitó por inversión 3 ocasiones. Se centrifugaron las muestras a 10,000rpm durante 15 minutos. Se recuperó la fase acuosa (aproximadamente 250 μL) y a ésta se le agregó 0.5 μL de glucógeno y 250 μL de isopropanol frío. Se agitó por inversión y se dejó incubar durante

10 minutos a 4°C. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 10,00rpm durante 30min. Se retiró el sobrenadante y el botón se lavó con 50µL de etanol al 70% en tres ocasiones, centrifugándose a 10,000rpm durante 5 min en cada lavado. Después del tercer lavado el botón se deja secar. Cada muestra se re-suspendió en 25µL de agua GIBCO sin DMSO.

Medición de expresión génica por secuenciación masiva: después de la extracción de ARN total, cada muestra de cada grupo se traó con el kit Ribominus TM Eukaryoter RNA-Seq (Cat. A10837-8) de invitrogen, con la finalidad de eliminar los ARN ribosomales. Este kit se basa en sondas complementarias a las moléculas del RNA ribosomal (28S, 18S, 5S y 5.8S) marcadas con biotina que posteriormente son eliminadas a través de perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina. Después se realizó una secuenciación masiva con la plataforma de análisis del genoma Ix illumina (GAI) y por medio de un alineamiento con la secuencia de referencia (genoma humano NCBI 37, Hg19), utilizando el software Genome analyzer pipeline 1.4 y en combinación con otros software, se identificaron RNAm desregulados. Para la identificación de las principales vías de transducción implicadas se utilizó el software IPA.

Co-cultivos para extracción de ADN: El día previo al inicio del co-cultivo se tripzinizó y cultivó a una confluencia del 100% ADSCpool en cada pozo de 100mm. Se realizó en total el cultivo de 6 pozos de los cuales tres se utilizaron para el co-cultivo y 3 como grupo control. En el caso de las células HeLa se tripzinizaron y cultivaron a una confluencia de 90% de células en tres insertos de 75mm (poros de 0.4µm Corning Cat. 3450) para los co-cultivos y tres pozos de 100mm como grupos control. Todas las células se cultivaron con medio DMEM,

penicilina/estreptomicina1N y 5% SFB hasta el siguiente día. El día del co-cultivo (Día 0) las placas y los insertos se lavaron tres ocasiones con solución PBS. Posteriormente cada inserto con células HeLa se colocó en una placa de 100mm que contenía células ADSC, dando un total de 3 pozos con co-cultivo de células ADSCpool/HeLa, 3 pozos con ADSC como grupo control y 3 pozos con células HeLa como grupo control. Estos grupos se mantuvieron 24 horas con medio DMEM, penicilina/estreptomicina1N y 0% SFB en una atmósfera con 5% de CO₂ a 37°C. Pasadas las 24 horas (Día 1) se realizó la extracción de ADN de los siguientes grupos: **A**=ADSCpool control, **H**=Hela control, **AH**=ADSCpool co-cultivadas con HeLa y **HA**=HeLa co-cultivadas con ADSCpool. Cada grupo experimental se hará por triplicado.

Análisis de Datos: Se realizaron la integración y análisis de datos en formato .cel y .txt con el programa Partek Genomic Suite Software (PGS) y con el Ingenuity Pathway Análisis (IPA).

VII. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Células ADSC y células HeLa.

Inicialmente se aislaron células ADSC de cuatro pacientes del hospital Siglo XXI, con un IMC mayor de 30. De estas pacientes 3 fueron pre-menopáusicas y 1 pos-menopáusica. El promedio de edad de las pacientes fue de 37 años, con un rango de 27 a 43 años. En la tabla 4 se muestran los datos generales de las pacientes de las cuales se obtuvo la muestra de grasa total. Todos los ensayos se realizaron entre los pases 2 y pase 10. En este último pase no se detectó algún cambio en la morfología y no hubo indicios de diferenciación a adipocitos. Las células del paciente 1 fueron descartadas ya que se obtuvo poca cantidad de éstas y se observó que iniciaban su diferenciación en adipocitos.

Tabla 4. Datos de las pacientes donadoras de tejido adiposo.						
No.	Edad	Pm	P	T	IMC	D-Qx
1	34	SÍ	105	153	44.85	14/03/2013
2	26	SÍ	98	155	40.8	04/04/2013
3	47	NO	140	170	48.5	18/04/2013
4	39	SÍ	130	157	52	25/04/2013

Pm: Pre-menopáusica; P: Peso en Kg; T: Talla en cm; IMC: Índice de Masa Corporal; D-Qx: Día de la cirugía

Caracterización de células ADSC:

A nivel morfológico. Como se muestra en la figura 4A la morfología de las ADSC concuerda con la reportada por otros investigadores, tiene forma fibroblastoide y se observa una población homogénea. En la figura 4B también se muestra la morfología de las células HeLa que son células epiteliales de un carcinoma de cuello uterino ya establecida.

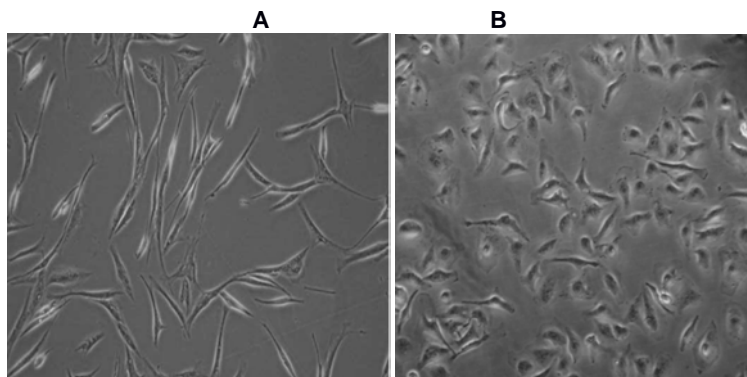


Figura 4. A) Células ADSC extraídas deL paciente 2; B) Células HeLa de ATCC.

Caracterización de ADSC por marcadores de superficie celular específicos. Para corroborar la identidad de las ADSC y determinar la pureza del cultivo celular se procedió a la determinación por citometría de flujo de los marcadores CD31 (marcador de células endoteliales), CD44 (marcador de células hematopoyéticas), CD90 (marcador de superficie para células troncales), CD45 (marcado de leucocitos).

Es importante mencionar que la caracterización con los marcadores de superficie se realizó en las ADSC de los pacientes 3 y 4 antes de crio-preservarse y de los pacientes 2, 3 y 4 después de crio-preservarse para asegurar que no había cambios en la población celular. En

la tabla 5 se muestran los porcentajes de los marcadores positivos y negativos para ADSC. Se obtuvo en promedio el 95.3% de marcadores positivos CD44 y CD90 antes de congelar y 94.1% para los mismos marcadores después de descongelar, lo cual indica que la poblaciones fueron estables durante la crio-preservación. Los marcadores negativos CD31 y CD45 fueron de alrededor de 0.15% antes de después de crio-preservarse, lo cual indica que nuestras poblaciones de ADSC están enriquecidas, el marcador negativo 45 no se determinó después de criopreservarse las células ya que no se obtuvo el número suficiente de esta mismas para poder realizar la prueba. Cabe mencionar que para cada anticuerpo se corrió paralelamente el isotipo correspondiente para asegurar la especificidad del anticuerpo.

Tabla 5. Porcentaje de marcadores para ADSC		
Anticuerpo	% Antes de criopreservarse	%Después de criopreservarse
Isotipo Ig FICT	0.15%	0.1%
CD31-	0.15%	0.16%
CD45-	0.15%	ND
CD44+	93.95%	96.2%
CD90+	96.8%	92%
ND= No Determinado		

En la figura 5, la gráfica A muestra la delimitación del espacio muestral de las células ADSC para realizar la caracterización con los marcadores de superficie. En la gráfica B se observa en color rojo las células vivas y en color lila las células vivas y en singuilete, esto es, células que no se encuentran unidas unas o otras, ese grupo de células son las de interés para las mediciones.

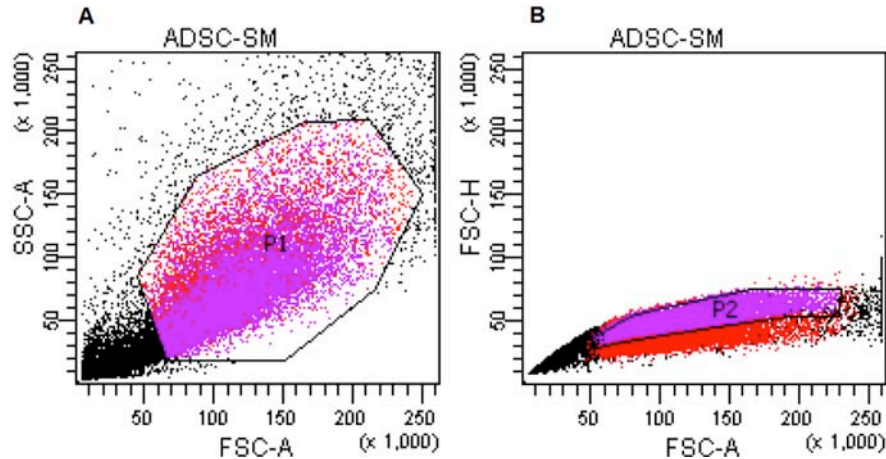


Figura 5 Gráfica A) Delimitación del espacio muestral de células ADSC en el citómetro de flujo. B) Delimitación del espacio muestral de células ADSC que se encuentran vivas y en singuilete.

Se muestra en la figura 6 un análisis representativo de los marcadores de superficie de CD por citometría de flujo. La sección A y B muestran la caracterización de las células ADSC de los pacientes 3 y 4 respectivamente antes de crio-preservarse. Las gráficas SM muestran la fluorescencia per se de las células y las gráficas Iso IgG FiCT muestran la fluorescencia del isotipo IgG que fue el control negativo. Como se observa en la figura, las gráficas correspondientes a los marcadores CD45 y CD31 muestran la campana a la izquierda e indica valores entre 0.1-0.2% con lo cual estas células fueron negativas para dichos marcadores. Finalmente las gráficas correspondientes a los marcadores CD44 y CD90 se posicionaron a la derecha y presentaron valores entre 92%-97% lo que indicó que son positivas para estos marcadores.

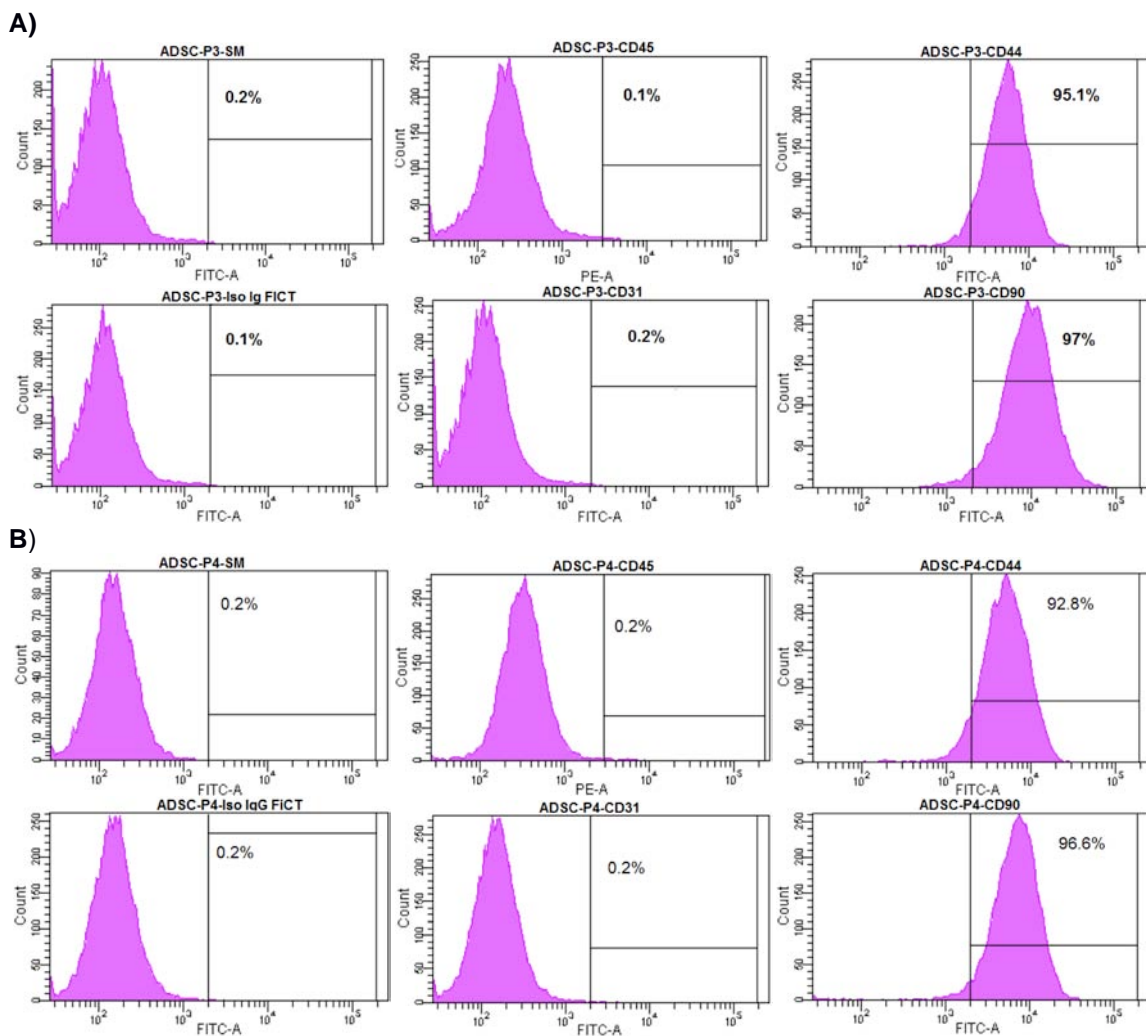


Figura 6. Caracterización de las células ADSC antes de crio-preservarse.

A) Paciente 3; grupos control: SM e Iso-IgG; marcadores de superficie CD31, CD44, CD90 y CD 45.

B) Paciente 4; grupos control: SM e Iso-IgG; marcadores de superficie CD31, CD44, CD90 y CD 45.

Posterior a que se descongelaran las células ADSC de cada paciente se realizó nuevamente la caracterización de éstas por citometría de flujo. La figura 7 solo muestra dos marcadores positivos para células troncales que son CD44 y CD31 con un porcentaje entre 85-98% y un marcador negativo para troncales que es CD90 en las células de cada paciente. El marcado CD45 negativo ya no se pudo comprobar por falta de células. Sin embargo, estos resultados concuerdan con los obtenidos antes de crio-preservar las ADSC.

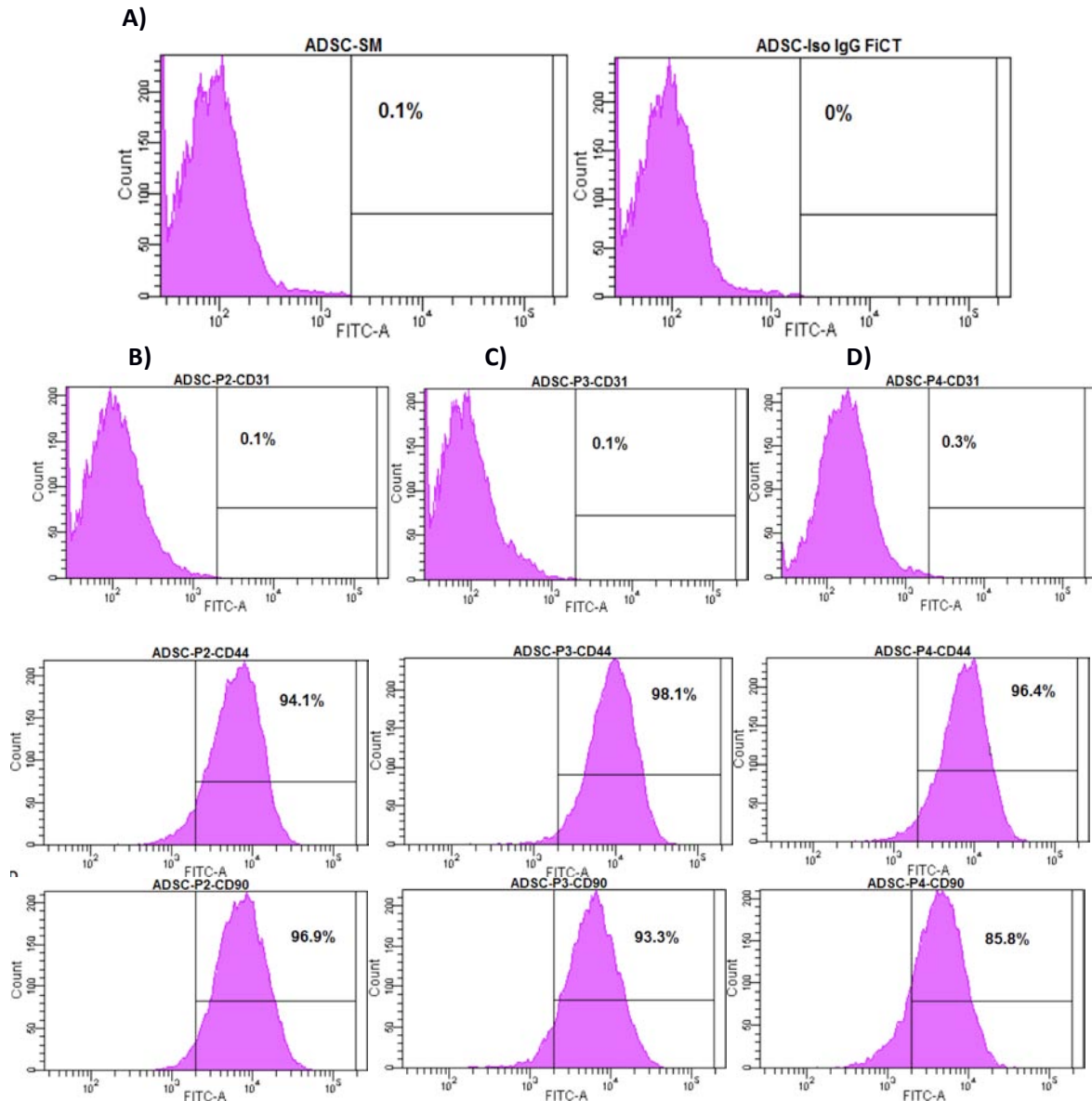


Figura 7. Caracterización de las células ADSC después de crio-preservarse.

A) Paciente 3; grupos control: SM e Iso-IgG; marcadores de superficie CD31, CD44, CD90 y CD 45.

B) Paciente 4; grupos control: SM e Iso-IgG; marcadores de superficie CD31, CD44, CD90 y CD 45.

Por otra parte estudios de caracterización de células troncales y ADSC muestran que estos marcadores (CD31-, CD45-, CD44+ y CD90+) son característicos de este tipo de células⁵⁹.
⁶⁰. Con estos resultados se comprueba que las células de cada paciente sí tienen el fenotipo de troncalidad característico de ADSCs.

Resultados de la extracción de ARN para secuenciación de transcrito:

Análisis de RNA. En la tabla 6 se muestran las cantidades de RNA total que se obtuvieron; 70.29 ug para ADSC y 68.97 ug para ADSC en co-cultivo con células HeLa, 52.11ug para HeLa y 33.99 ug para HeLa en co-cultivo con ADSC; y los índices de RIN (RNA Integrity Number, por sus siglas en inglés) para cada grupo (ADSC promedio $9.6\pm$, ADSC/Hela promedio $9.3\pm$, Hela promedio $9.3\pm$ y HeLa/ADSC promedio $8.7\pm$); lo que indicó que obtuvo la calidad adecuada para el corrimiento de la secuenciación masiva.

Muestra	$\mu\text{g}/30\mu\text{L}$	RIN	Muestra	$\mu\text{g}/30\mu\text{L}$	RIN
A1	31.560	9.5	H1	14.310	8.7
A2	15.510	9.4	H2	14.040	9.6
A3	23.220	10	H3	23.760	9.7
AH1	16.560	9.6	HA1	9.420	8.7
AH2	25.560	9.7	HA2	15.660	9.1
AH3	26.850	8.7	HA3	8.910	8.3

Antes de someter las muestras a secuenciar se eliminó los RNA ribosomales con el Kit de Ribominus el cual retira los ribosomales por medio de sondas específicas y perlas magnéticas. La figura 8 muestra la gráfica control donde se observan dos grandes picos correspondiente a una muestra con ARN ribosomal 18S y 28S; también muestra cómo los grupos experimentales ya no presentan ambos picos después de depletar los ARN ribosomales.

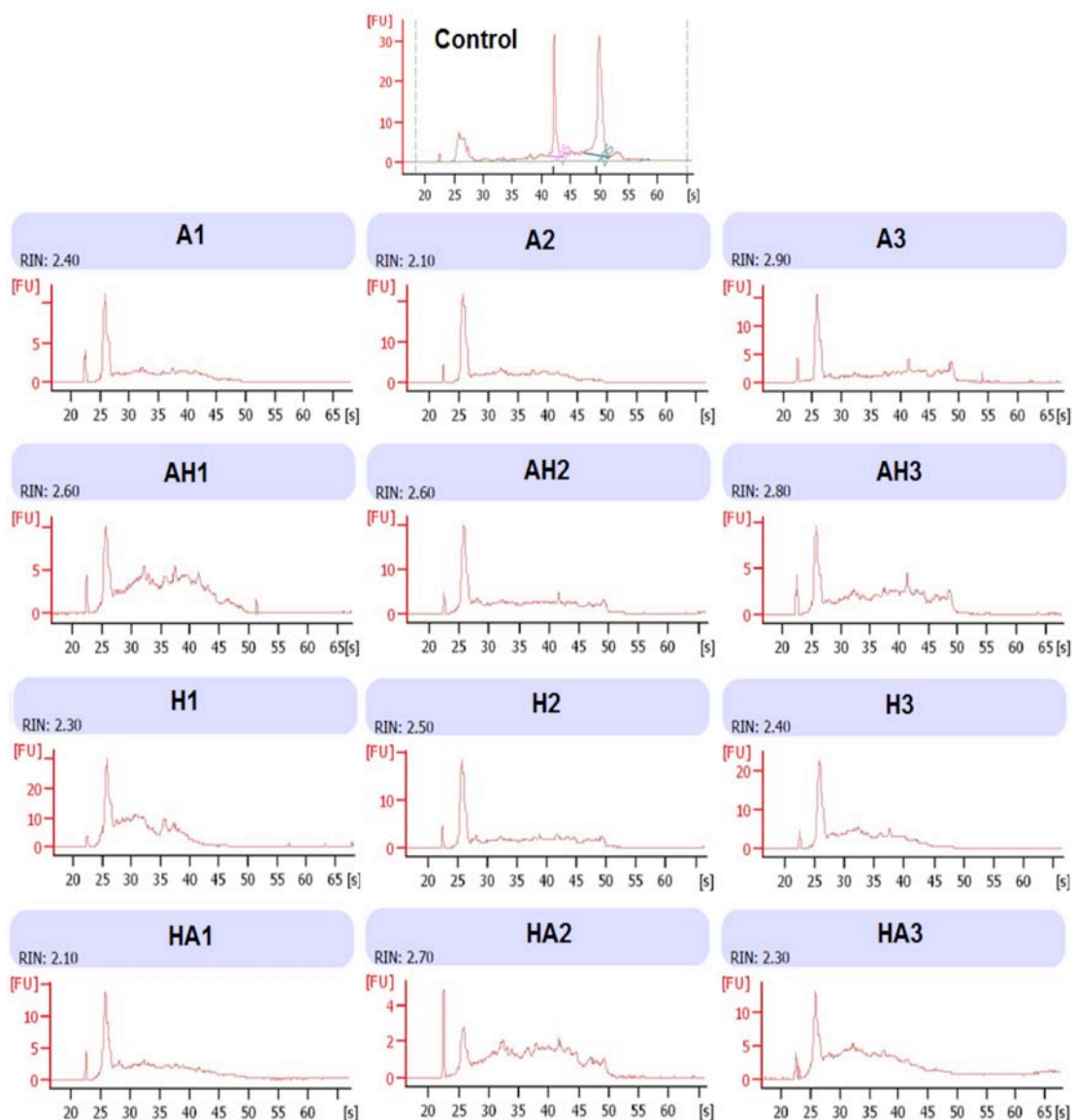


Figura 8. Depleción del ARN ribosomal.

La gráfica Control indica las unidades 18S y 28S correspondientes al ARN ribosomal. Los grupos experimentales A, AH, H y AH 1, 2 y 3 respectivamente después de ser tratados con ribominus.

Después de realizar la secuenciación masiva, los resultados de ésta muestran que se modificó la expresión de 2190 genes en células HeLa al ser cultivadas en co-cultivo por 24 horas con ADSC. De esos 2081 genes aumentaron su expresión al menos 2 veces en escala logarítmica, y solo 106 genes disminuyeron su expresión, esto se puede deber a que

las células en co-cultivo se mantienen en medio sin suero para tener factores de crecimiento u hormonas u otros factores solo secretados por las células en cultivo (Figura 9).

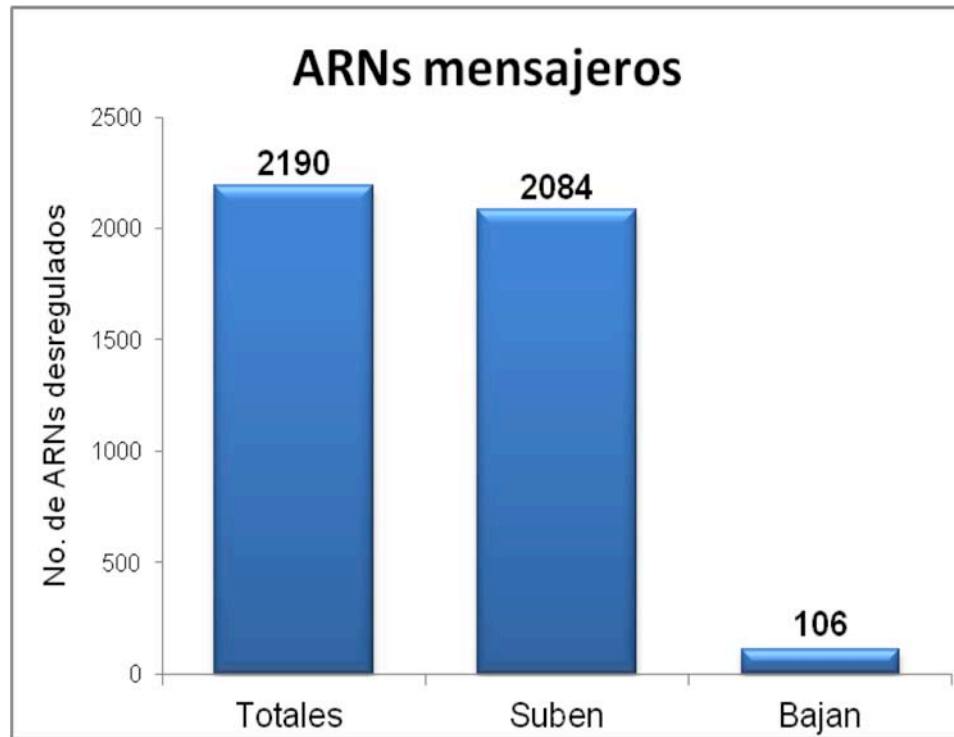


Figura 9. Expresión de RNAs mensajeros en células HeLa cultivadas por 24 horas en co-cultivo con células ADSC.

La lista de genes modificados se sometió a análisis con el programa IPA (Ingenuity Pathway Analysis) el cual es un software para explorar, interpretar y analizar los datos ómicos y modelar sistemas biológicos. El programa utiliza una base de conocimiento que contiene las interacciones biológicas y químicas y anotaciones funcionales creados a partir de millones de relaciones modeladas individualmente entre proteínas, genes, complejos, células, tejidos, fármacos y enfermedades. Estas relaciones modeladas incluyen detalles contextuales, enlace al artículo original, y son revisados manualmente para mayor exactitud. Cada relación tiene su origen en hechos experimentales reportados de fuentes bibliográficas primarias, incluyendo artículos en revistas revisadas por pares, artículos de revisión y los libros de

texto. Además de los hallazgos de la literatura, la Base de conocimiento de Ingenuity contiene conclusiones y anotaciones de otras fuentes, incluyendo EntrezGene, RefSeq, OMIM, base de datos de GWAS, Gene Ontology, Expresión tisular Atlas del cuerpo, NCI-60 Línea Celular Expresión Atlas, HumanCyc, proteína-interacciones de las proteínas (de BIND, DIP, MINT, MIPS , BIOGRID , AVERÍA, y Cognia) y microRNA- mRNA interacciones objetivo (de ARGONAUTE 2, TARBASE). Los genes más desregulados se observan en la tabla 7.

Tabla 7. Genes más desregulados analizados por IPA.de los grupos H vs HA.

Genes Inhibidos		Genes sobre-expresados	
Gen	Fch	Gen	FCh
EDN1	-20	AMOT	0
AP1M2	-6.5	CELF6	0
HOXC11	-5.3	CHI3L2	0
RDM1	-4.5	CSTA	0
ZNF579	-3.5	EFHB	0
RNF125	-3.5	EGR1	0
NBPF10	-3.5	HGF	0
HRCT1	-3.5	LCN1	0
GAL3ST3	-3.4	MGAT3	0
PLAC8	-20	MUC20	0

FCh= Fold Change

Dentro de los resultados de la secuenciación masiva también se encontraron siete RNAs no codificantes que se expresaron de novo: LOC100128252, LOC100420587, LOC100506555, LOC100506622, LOC100652898, LOC286094, LOC643015 y cuatro tuvieron un aumento de entre 40 y 50 veces LOC100507098, LOC100505881, LOC100507115, LOC100507193; y 32 genes expresados de novo en células Hela que fueron co-cultivadas con células ADSC (Tabla 8).

Tabla 8. Genes expresados de novo de los grupos H comparado con HA.

Gen	FCh	Gen	FCh	Gen	FCh	Gen	FCh	Gen	FCh
AMOT	0	EFHB	0	OLAH	0	PPAPDC3	0	TRIM58	0
BET3L	0	EGR1	0	OLFML1	0	SLC24A5	0	UROC1	0
C9orf144B	0	FAM66D	0	P2RX7	0	SLC6A1	0	WHAMMP3	0
CELF6	0	MGAT3	0	PARP15	0	STC1	0	YAP1P1	0
CHI3L2	0	MUC20	0	PLA2G5	0	STEAP2	0	ZNF300P1	0
CSTA	0	NR1I2	0	PODN	0	TGM5	0	ZNF43	0
ZNF773	0	ZSCAN18	0	FCh= Fold Change					

Los genes que modificaron sus niveles de expresión entre 30 y 1720 veces se muestran en la tabla 9 y los genes que más bajaron su expresión se muestran en la tabla 10 si bien los cambios fueron más discretos alrededor de 2.0 veces.

Tabla 9. Genes con expresión entre 30 y 1720 veces de los grupos H comparado con HA

Gen	FCh	Gen	FCh	Gen	FCh	Gen	FCh	Gen	FCh	Gen	FCh
BST1	38.00	DCN	43.24	GPC6	56.64	IL33	71.00	ABCA9	89.20	XAF1	328.00
WASF3	38.67	COL5A2	43.36	PDZRN3	57.78	FAM198B	72.00	STMN2	91.67	POSTN	343.75
MAN1A1	38.75	PTGS1	43.86	CLEC2B	61.00	PLIN2	72.29	ISLR	92.33	MEG3	363.00
SCN8A	39.20	SLC8A1	45.50	BCHE	61.50	DLC1	74.33	NTF3	93.00	XIST	436.50
SLFN11	39.33	ADAMTS2	45.86	CCL5	64.33	TCF4	75.77	TRIM22	96.60	PDGFRA	502.20
HS3ST3A1	39.75	FAM110B	46.57	TMEM200A	67.33	GBP4	79.00	RUNX1T1	113.33	COL6A3	597.75
IL1R1	39.86	ZNF667	48.00	FMOD	68.50	PDPN	80.00	CFI	129.00	VCAN	733.73
MFGE8	40.85	GFRA1	53.83	EFHA2	69.00	PAMR1	80.40	SERPINE1	131.98	COL1A2	986.00
NRK	41.50	LRCH2	54.00	DMGDH	70.00	GPR133	86.00	ABCA6	203.00	THBS2	1492.00
COL6A2	41.55	MX2	54.50	EPSTI1	70.00	UNC5B	88.67	CDH11	310.00	SPARC	1724.00
FCh= Fold Change											

Tabla 10. Genes con expresión de -2.0 veces de los grupos H comparado con HA			
Gen	FCh	Gen	FCh
BFSP1	-2.1	TIGD6	-2.1
C3orf62	-2.1	HCFC1R1	-2.1
POLR2J2	-2.1	RMI2	-2
RFK	-2.1	OCLN	-2
AIF1L	-2.1	MARS2	-2
FCh= Fold Change			

Integrando los genes modificados con ayuda del programa IPA se encontraron 25 redes modificadas. Entre las redes que nos interesa estudiar más a fondo está la red número 20 (Figura 10) que contiene dos de las proteínas más modificadas AMOT y ZNF432.

Angiomotín, también conocido como AMOT, es una proteína de 1084 aminoácidos⁶¹. Pertenece a la familia de proteínas de unión a angioestatina. Regula las uniones célula-célula y la motilidad celular en células endoteliales⁶². Presenta 2 isoformas, la p80 implicada en el fenotipo migratorio y la isoforma p130 que es importante durante la angiogénesis^{63, 64}. Angiomotín juega un rol importante en la vía Hippo-YAP, una vía involucrada en regulación de la proliferación celular, diferenciación y apoptosis^{65, 66}. La inapropiada activación transcripcional de YAP promueve el crecimiento excesivo de tejido, esto podría darle a la célula una característica de célula troncal cancerígena que promueve la iniciación del tumor^{67, 68}. Varios estudios han implicado a AMOT en tumores de hemangioendotelioma, mamarios y hepáticos^{63, 69, 70}. Esto sugiere que Angiomotín puede ser un jugador importante en la angiogénesis y progresión tumoral y podría servir como una diana terapéutica potencial en el cáncer.

En la red 20 también participa la proteína ZNF 432 (zinc finger protein 432), la cual es una proteína nuclear con actividad transcripcional⁷¹. Se conoce poco acerca de este gen en relación al cáncer y solo se ha encontrado que está desregulado en algunos cánceres^{72, 73}.

Otra red interesante es la red número 13 (Figura 11) la cual presenta varios genes regulados por insulina. El gen de la insulina se ubica en el cromosoma 11 y consta de 179pb. Altos niveles de insulina activan genes que promueven la proliferación, migración y metástasis de células cancerígenas⁷⁴. Estudios demuestran que la insulina regula genes implicados en la inhibición de la apoptosis en adipocitos humanos, además de inducir la formación de gotas lipídicas en estas células⁷⁵. También se ha estudiado que altas concentraciones de insulina en sangre inducen a bajas concentraciones de IGRP-1 que a su vez desencadenan altas concentraciones de IGF-1 y que IGF-1 actúa como un pro-carcinógeno ya que disminuye la muerte celular y aumenta el crecimiento celular^{76, 77, 78}. De esta forma la insulina pudiera estar señalando una conexión directa entre obesidad y cáncer.

Y finalmente la red número 13 (Figura 12) también resultó interesante ya que contiene a la molécula EGR1- como una de las moléculas más desreguladas. La proteína codificada por el gen EGR-1 (Proteína de respuesta de crecimiento temprano 1) que consta de 543 aminoácidos tiene la función de regulador transcripcional, siendo una proteína nuclear^{79, 80}. Diversos estudios implican a este gen como un gen supresor de tumor y otros estudios lo implican en la regulación del comportamiento invasivo y metastásico de células cancerosas^{81, 82, 83}.

Se he demostrado que células de cáncer cérvico-uterino expresan altas concentraciones de EGR-1 las cuales regulan negativamente las concentraciones de telomerasa sugiriendo una actividad reguladora⁸⁴.

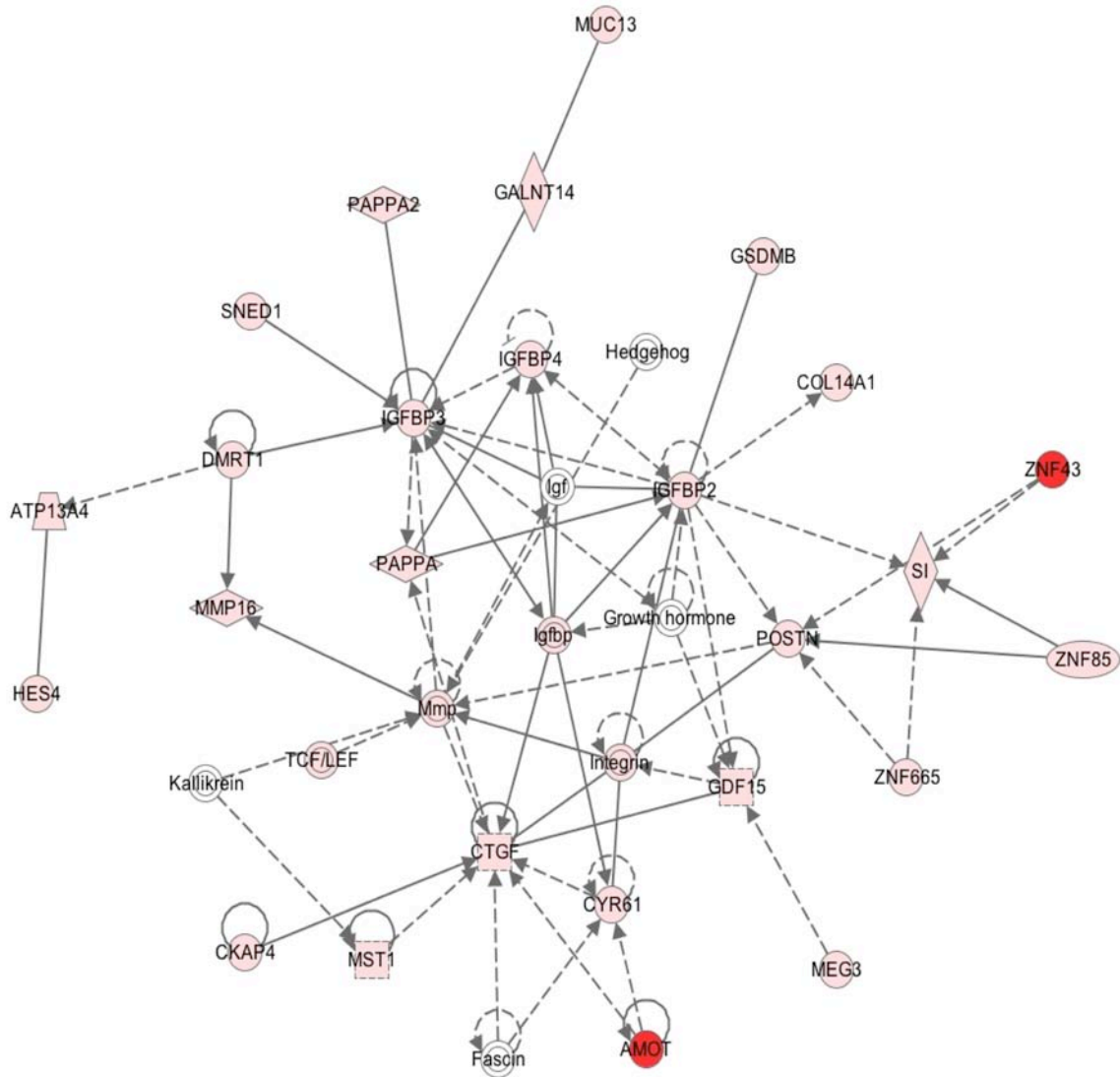


Figura 10. Red 20 de las vías analizadas por el software IPA. Contiene a AMOT y ZNF43 que son de las proteínas más modificadas. La escala de color rojo va indicando que el grado de expresión del gen, mientras más rojo indica que aumentó más su expresión. El color verde indica que la expresión del gen disminuyó, mientras más verde se considera que disminuyó más su expresión.

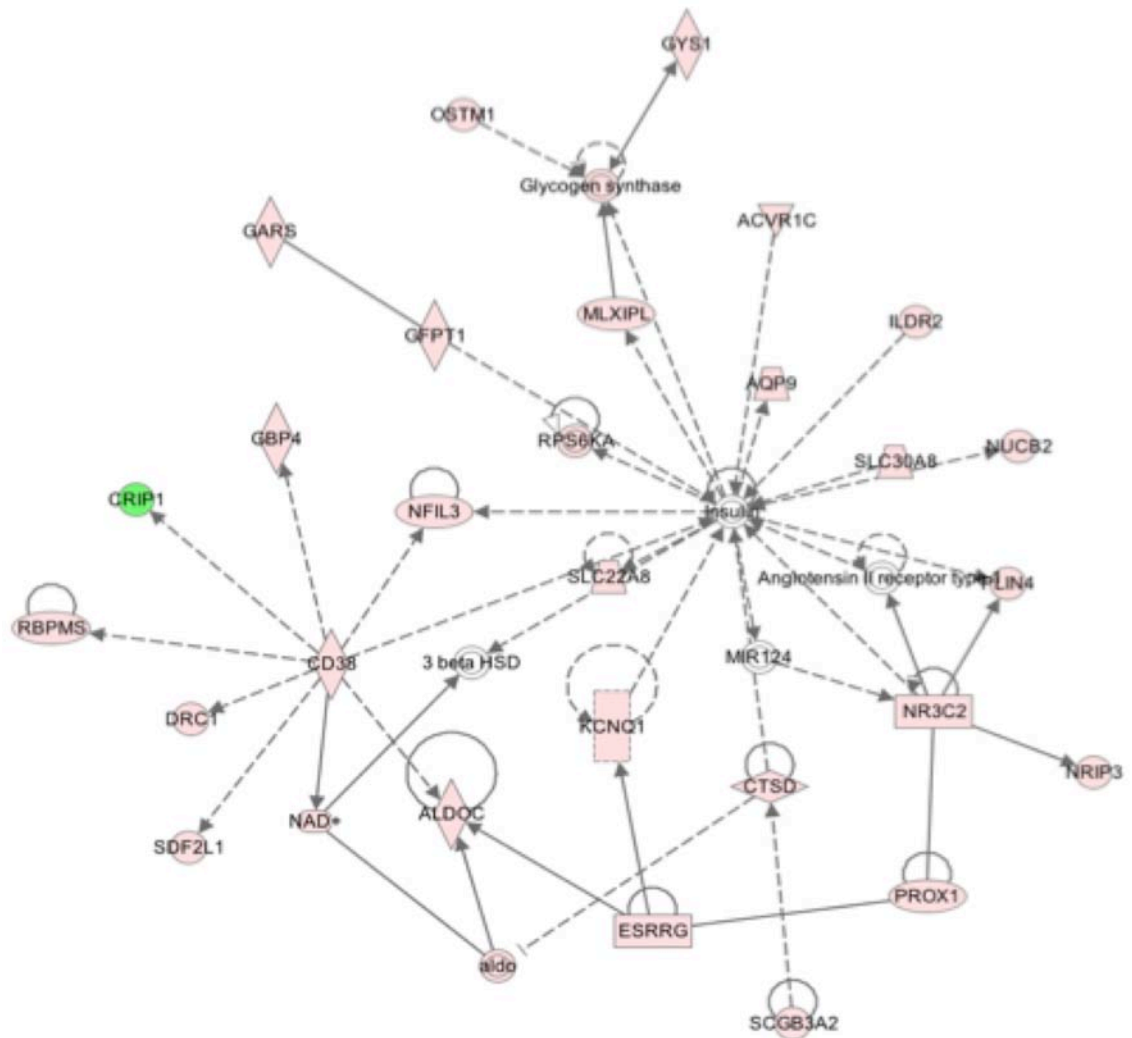


Figura 11. Red 13 de las vías analizadas por el software IPA. Contiene a Insulina que es una hormona que regula gran variedad de procesos metabólicos. La escala de color rojo va indicando que el grado de expresión del gen, mientras más rojo indica que aumentó más su expresión. El color verde indica que la expresión del gen disminuyó, mientras más verde se considera que disminuyó más su expresión.

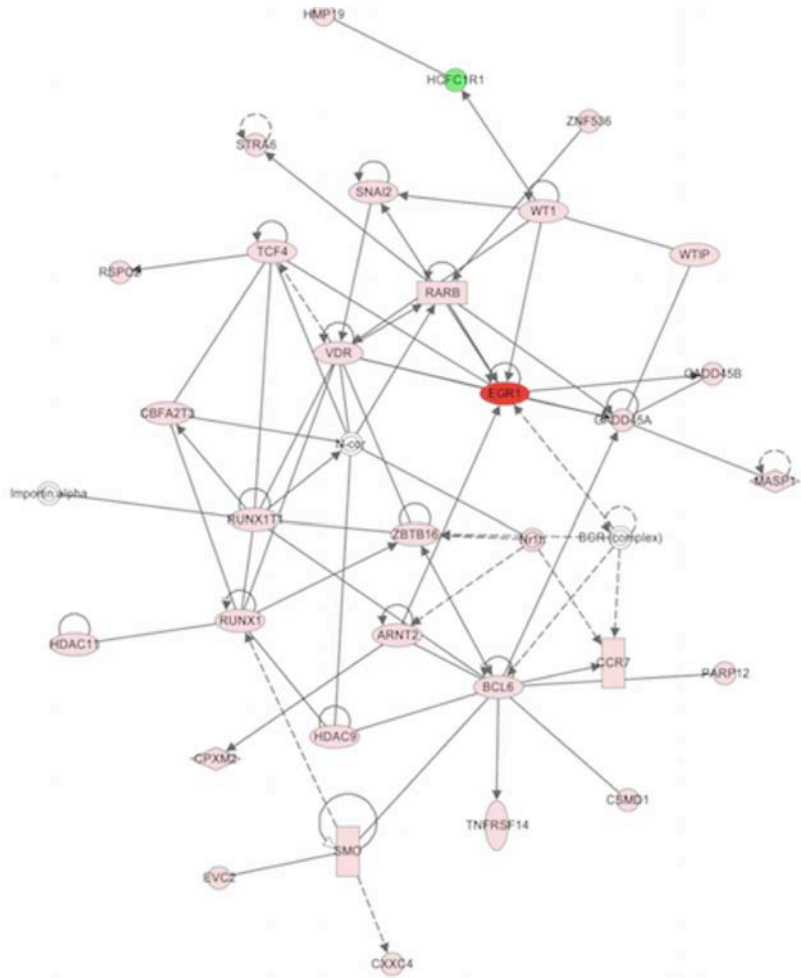


Figura 12. Red 13 de las vías analizadas por el software IPA. EGR1 es la molécula más desregulada. El color rojo indica el aumento en el grado de expresión del gen, mientras más rojo se considera que aumento más su expresión. El color verde indica que la expresión del gen disminuyó, mientras más verde se considera que disminuyó más su expresión.

VIII. CONCLUSIÓN

Datos clínico recientes señalan una asociación entre obesidad y cáncer. Cuando se co-cultivan ADSC de personas con IMC mayor a 30, con células de cáncer cérvico-uterino, se provoca un cambio en el transcriptoma de las células cancerígenas con más de 2000 genes desregulados (FC <2 y p>0.001).

La mayoría de estos genes aumentaron su expresión; este cambio en el transcriptoma provoca cambios fenotípicos que pudieran explicar el efecto de las ADSC de personas obesas sobre el aumento del crecimiento tumoral.

Es necesario validar la expresión de genes desregulados específicos en pacientes obesas y/o con cáncer cérvico-uterino.

Además, resta terminar de hacer el análisis bio-informático de las células ADSC en co-cultivo con células HeLa.

IX. LITERATURA CITADA

1. OMS. Cáncer. Centro de prensa. Nota Descriptiva No.297
2. Rollins BJ GT, Polyak K and Stiles CD. Chapter 1. Molecular Biology. In: Holland-Frei Cancer Medicine. Bast RC, Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Holland LF, Frei E. 5a Edition 2000
3. DeVita VT LTaRS. Cancer: principles and practice of oncology. 9th Edition. Philadelphia, Pennsylvania; USA. 2011
4. L. P. Chapter 1 Introduction. In: Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets and therapeutics. 3th Edition. UK. 2012
5. Globocan. <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp#BOTH>. Most frequent cancers: both sexes
6. Hanako Taniguchi. Los 5 tipos de cáncer que más afectan a mexicanos. CNN, México. <http://mexico.cnn.com/salud/2013/02/04/cancer-cervico-uterino>. 2013
7. OMS. Cáncer. Centro de prensa. Nota descriptiva No. 297. Febrero 2014. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/> 2014
8. OMS. Comprehensive cervical cancer prevention and control: a healthier future for girls and women.://www.who.int/reproductivehealth/topics/cancers/en/index.html
9. Globocan. Most frequent cancers: both sexes. Section of Cancer.
10. Alonso PR. Cuello uterino normal. En: Alonzo RP, Lazcano PE, Hernandez AM. Cáncer cérvico-uterino: Diagnostico, prevención y control. México, D. F. 2000
11. Casado HA, Vidart AJA y Coronado MP. Capítulo 6 Cáncer de cérvix. En: Enfermedades oncológicas: consejos para pacientes. Díaz-Rubio E y García SA. Por P. Permanyer 2007
12. Cáncer. aAEce. 24/06/2013
<https://www.aecc.es/SobreElCancer/CancerPorLocalizacion/Cancerdecervix/Paginas/anatomia.aspx>
13. Wright TC, Ferenczy A. Anatomy and histology of the cervix. In: Kurman, RJ Blaustein´s Patology of female Genital tract. New York: Springer-Verlag. 2002
14. Schottenfeld D and Fraumeni JF. CANCER: Epidemiological and prevention. Oxford University press. New York, USA. pp 1044-1067. 2006

15. López SA y Lizano SM. Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. *Cancerología* 1. pp 31-55. INCAN. México D.F.. 2006
16. o: Diagnostico y tratamiento. McGraw Hill Interamericana. México D.F. 2004
17. Broso PR, Buffetti G. [The Papanicolaou classification in the Bethesda system (National Cancer Institute, Bethesda, Maryland)]. *Minerva Ginecol*; 45:557-563. 1993
18. Dzul-Rosado KR, Puerto-Solís M, González-Losa MR. Cáncer cérvico-uterino: Métodos actuales para su detección. *Rev Biomed*; 15:233-241. 2004
19. Badoual C, Tartour E, Roussel H, Bats AS, Pavie J, Pernot S, Weiss L, Si Mohamed A, Thariat J, Hoffmann C, Péré H. HPV (Human Papilloma Virus) implication in other cancers than gynaecological. *Rev Med Interne*. 2015 Feb 5.
20. Lorincz AT, Reid R, Jenson AB y cols: Human Papillomavirus Infection of the cervix: relative risks association of 15 common anogenital tipos. *Obstet Gynecol*; 79: 328-37. 1992
21. Diario Oficial de la Federación. SECRETARIA DE SALUD. MODIFICACION a la Norma Oficial Mexicana NOM-014-SSA2-1994, Para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer cérvico uterino. México. Mayo. 2007
22. IMSS. Cáncer cérvico uterino.
<http://www.imss.gob.mx/salud/Cancer/tipos/Pages/cancercervico.aspx> 2009
23. Maruthur NM, Bolen S, Brancati FL and Clark JM. The Association of Obesity and Cervical Cancer Screening: A Systematic Review and Meta-Analysis *Obesity* (Silver Spring). February; 17(2):375-381. 2009
24. Gu W, Chen C, Zhao KN. Obesity-associated endometrial and cervical cancers. *Front Biosci (Elite Ed)*. Jan 1;5:109-18. 2013
25. Lim J, Durbin-Johnson B, Valicenti R, Mathai M, Stern RL, Mayadev J. The impact of body mass index on rectal dose in locally advanced cervical cancer treated with high-dose-rate brachytherapy. *Brachytherapy* 1538-4721(13). May 22. 2013
26. Barrera-Cruz A, Rodríguez-González A, Molina-Ayala MA. [The current state of obesity in Mexico]. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*; 51:292-299. 2013
27. OMS. Obesidad y sobrepeso. Centro de Prensa. Nota descriptiva No. 11, mayo 2012.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>

28. OMS. Datos y cifras. 10 datos sobre la obesidad.
<http://www.who.int/features/factfiles/obesity/facts/es/>
29. Renehan AG, Roberts DL, Dive C. Obesity and cancer: pathophysiological and biological mechanisms. *Arch Physiol Biochem*; 114:71-83. 2008
30. Soto MT LS. Obesidad y cáncer: un enfoque epidemiológico. (revisión bibliográfica). *REVISTA MEDICA DE COSTA RICA Y CENTROAMÉRICA*; 587:27-32. 2009
31. Lemoine AY, Ledoux S, Larger E. Adipose tissue angiogenesis in obesity. *Thromb Haemost*; 110:661-668. 2013
32. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P *et al.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*; 13:4279-4295. 2002
33. Matafome P, Santos-Silva D, Sena CM, Seíça R. Common mechanisms of dysfunctional adipose tissue and obesity-related cancers. *Diabetes Metab Res Rev*; 29:285-295. 2013
33. Rivera DJ, Cuevas NL, Shamah LT, Villalpando HS, Avila MA. Estado nutrición. En: ENSANUT2006. México, Octubre, pp 85-103. 2006
34. FAO. "The State of Food and Agriculture 2013" FOOD SYSTEMS FOR BETTER NUTRITION. Roma. pp 69-82. 2013
35. Bergström A, Pisani P, Tenet V, Wolk A, Adami HO. Overweight as an avoidable cause of cancer in Europe. *Int J Cancer*; 91:421-430. 2001
36. Gallardo-Fernández MA. Riesgo oncológico de la obesidad. *Med Clin (Barc)*; 126(7):270-6. 2006
37. Reeves GK, Pirie K, Beral V *et al.* Cancer incidence and mortality in relation to body mass index in the Million Women Study: cohort study. *BMJ* 2007; 335:1134.
38. INEGI. Estadística a propósito del día mundial contra el cáncer. 2013:1-19.
39. McCawley GM, Ferriss JS, Geffel D, Northup CJ, Modesitt SC. Cancer in obese women: potential protective impact of bariatric surgery. *J Am Coll Surg* 2009; 208:1093-1098.
40. Amling CL, Riffenburgh RH, Sun L *et al.* Pathologic variables and recurrence rates as related to obesity and race in men with prostate cancer undergoing radical prostatectomy. *J Clin Oncol* 2004; 22:439-445.

41. Goodwin PJ, Ennis M, Pritchard KI *et al.* Insulin-like growth factor binding proteins 1 and 3 and breast cancer outcomes. *Breast Cancer Res Treat* 2002; 74:65-76.
42. MacDougald OA, Burant CF. The rapidly expanding family of adipokines. *Cell Metab* 2007; 6:159-161.
43. Fischer-Posovszky P, Wabitsch M, Hochberg Z. Endocrinology of adipose tissue - an update. *Horm Metab Res* 2007; 39:314-321.
44. Takahara K, Li M, Inamoto T *et al.* Adipose-derived stromal cells inhibit prostate cancer cell proliferation inducing apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2014.
45. Park YM, Yoo SH, Kim SH. Adipose-derived Stem Cells Induced EMT-like Changes in H358 Lung Cancer Cells. *Anticancer Res* 2013; 33:4421-4430.
46. Silberstein GB. Tumour-stromal interactions. Role of the stroma in mammary development. *Breast Cancer Res* 2001; 3:218-223.
47. Zhao M, Dumur CI, Holt SE, Beckman MJ, Elmore LW. Multipotent adipose stromal cells and breast cancer development: Think globally, act locally. *Mol Carcinog* 2010; 49:923-927.
48. Zhao W, Ren G, Zhang L *et al.* Efficacy of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue in inhibition of hepatocellular carcinoma cells in vitro. *Cancer Biother Radiopharm* 2012; 27:606-613.
49. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res* 2007; 100:1249-1260.
50. Sylvester KG, Longaker MT. Stem cells: review and update. *Arch Surg* 2004; 139:93-99.
51. Studeny M, Marini FC, Dembinski JL *et al.* Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96:1593-1603.
52. Zolochovska O, Yu G, Gimble JM, Figueiredo ML. Pigment epithelial-derived factor and melanoma differentiation associated gene-7 cytokine gene therapies delivered by adipose-derived stromal/mesenchymal stem cells are effective in reducing prostate cancer cell growth. *Stem Cells Dev* 2012; 21:1112-1123.

53. Josiah DT, Zhu D, Dreher F, Olson J, McFadden G, Caldas H. Adipose-derived stem cells as therapeutic delivery vehicles of an oncolytic virus for glioblastoma. *Mol Ther* 2010; 18:377-385.
54. Gomes CM. The dual role of mesenchymal stem cells in tumor progression. *Stem Cell Res Ther* 2013; 4:42.
55. Cousin B, Ravet E, Poglio S *et al.* Adult stromal cells derived from human adipose tissue provoke pancreatic cancer cell death both in vitro and in vivo. *PLoS One* 2009; 4:e6278.
56. Zhao M, Sachs PC, Wang X *et al.* Mesenchymal stem cells in mammary adipose tissue stimulate progression of breast cancer resembling the basal-type. *Cancer Biol Ther* 2012; 13:782-792.
57. Ji SQ, Cao J, Zhang QY, Li YY, Yan YQ, Yu FX. Adipose tissue-derived stem cells promote pancreatic cancer cell proliferation and invasion. *Braz J Med Biol Res* 2013; 46:758-764.
58. Samoïlovich MP, Pinevich AA, Shashkova OA, Vartanian NL, Kiseleva LN, Klimovich VB. [Influence of mesenchymal stromal cells on B-cell line growth and immunoglobulin synthesis]. *Tsitologiya* 2013; 55:45-51.
59. Macías-Abraham C dV-PL, Hernández-Ramírez P, Ballester-Santovenia JM. Características fenotípicas y funcionales de las células madre mesenquimales y endoteliales. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 2010; 26:256-275.
60. Zimmerlin L, Donnenberg VS, Rubin JP, Donnenberg AD. Mesenchymal markers on human adipose stem/progenitor cells. *Cytometry A* 2013; 83:134-140.
61. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=AMOT>
62. Bratt A1, Birot O, Sinha I, Veitonmäki N, Aase K, Ernkvist M, Holmgren L. Angiotensin regulates endothelial cell-cell junctions and cell motility. *J Biol Chem*. 2005 Oct 14;280(41):34859-69.
63. Ernkvist M1, Birot O, Sinha I, Veitonmaki N, Nyström S, Aase K, Holmgren L. Differential roles of p80- and p130-angiotensin in the switch between migration and stabilization of endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Mar;1783(3):429-37.

64. Troyanovsky, T. Levchenko, G. Månsson, O. Matvijenko, L. Holmgren, Angiomotin: An angiostatin binding protein that regulates endothelial cell migration and tube formation. *J. Cell Biol.* 152, 1247–1254 (2001).
65. Zhao, B., Tumaneng, K., and Guan, K. L. (2011) The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal. *Nat. Cell Biol.* 13, 877–883
66. Chan SW1, Lim CJ, Guo F, Tan I, Leung T, Hong W. Actin-binding and cell proliferation activities of angiomotin family members are regulated by Hippo pathway-mediated phosphorylation. *J Biol Chem.* 2013 Dec 27;288(52):37296-307
67. Yi C1, Shen Z, Stemmer-Rachamimov A, Dawany N, Troutman S, Showe LC, Liu Q, Shimono A, Sudol M, Holmgren L, Stanger BZ, Kissil JL. The p130 isoform of angiomotin is required for Yap-mediated Hepatic epithelial cell proliferation and tumorigenesis. *Sci Signal.* Sep 3;6(291):ra77. 2013
68. Hiemer SE1, Varelas X. Stem cell regulation by the Hippo pathway. *Biochim Biophys Acta.* Feb;1830(2):2323-34. 2013
69. Levchenko, T., Bratt, A., Arbiser, J.L. and Holmgren, L. Angiomotin expression promotes hemangioendothelioma invasion. *Oncogene* 23, 1469–1473. (2004)
70. Jiang, W.G., Watkins, G., Douglas-Jones, A., Holmgren, L. and Mansel, R.E. Angiomotin and angiomotin like proteins, their expression and correlation with angiogenesis and clinical outcome in human breast cancer. *BMC Cancer* 6, 16. (2006)
71. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ZNF432&search=bdca1d8247d7ce0d39b3e3b53f87fdf6>
72. Zhan X1, Desiderio DM. Nitroproteins from a human pituitary adenoma tissue discovered with a nitrotyrosine affinity column and tandem mass spectrometry. *Anal Biochem.* 2006 Jul 15;354(2):279-89.
73. Sjöblom T1, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD, Mandelker D, Leary RJ, Ptak J, Silliman N, Szabo S, Buckhaults P, Farrell C, Meeh P, Markowitz SD, Willis J, Dawson D, Willson JK, Gazdar AF, Hartigan J, Wu L, Liu C, Parmigiani G, Park BH, Bachman KE, Papadopoulos N, Vogelstein B, Kinzler KW, Velculescu VE. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science.* 2006 Oct 13;314(5797):268-74.

74. Masur K1, Vetter C, Hinz A, Tomas N, Henrich H, Niggemann B, Zänker KS. Diabetogenic glucose and insulin concentrations modulate transcriptome and protein levels involved in tumour cell migration, adhesion and proliferation. *Br J Cancer*. 2011 Jan 18; 104(2):345-52.
75. Ito M, Nagasawa M, Hara T, Ide T, Murakami K. Differential roles of CIDEA and CIDEA in insulin-induced anti-apoptosis and lipid droplet formation in human adipocytes. *J Lipid Res*. 2010 July; 51(7): 1676–1684.
76. Powell D R, Suwanichkul A, Cabbage M L. et al Insulin inhibits transcription of the human gene for insulin-like growth factor-binding protein-1. *J Biol Chem* 1991.
77. LeRoith D, Baserga R, Helman L. et al Insulin-like growth factors and cancer. *Ann Intern Med* 1994.
78. Baserga R, Hongo A, Rubini M. et al The IGF-1 receptor in cell growth, transformation and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1997.
79. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1958>
80. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=EGR1>
81. Liu C1, Calogero A, Ragona G, Adamson E, Mercola D. EGR-1, the reluctant suppression factor: EGR-1 is known to function in the regulation of growth, differentiation, and also has significant tumor suppressor activity and a mechanism involving the induction of TGF-beta1 is postulated to account for this suppressor activity. *Crit Rev Oncog*. 1996;7(1-2):101-25.
82. Myung DS1, Park YL1, Kim N1, Chung CY1, Park HC1, Kim JS1, Cho SB1, Lee WS1, Lee JH2, Joo YE. Expression of early growth response-1 in colorectal cancer and its relation to tumor cell proliferation and apoptosis. *Oncol Rep*. 2014 Feb;31(2):788-94. doi: 10.3892/or.2013.2884. Epub 2013 Nov 29.
83. Baron V1, Adamson ED, Calogero A, Ragona G, Mercola D. The transcription factor Egr1 is a direct regulator of multiple tumor suppressors including TGFbeta1, PTEN, p53, and fibronectin. *Cancer Gene Ther*. 2006 Feb;13(2):115-24.
84. Akutagawa O1, Nishi H, Kyo S, Terauchi F, Yamazawa K, Higuma C, Inoue M, Isaka K. Early growth response-1 mediates downregulation of telomerase in cervical cancer. *Cancer Sci*. 2008 Jul; 99(7):1401-6.

85. WHO. Comprehensive cervical cancer control: a guide to essential practice-2nd ed. Australia. 2014
86. IARC Screening Group. Online screening material. La colposcopia de la neoplasia intraepitelial cervical: Manual para principiantes. Capitulo 2: Introducción a la neoplasia intraepitelial cervical. <http://screening.iarc.fr/colpochap.php?lang=3&chap=2>