



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL INTERFERÓN
ÉPSILON Y DEFENSINA BETA 4 A COMO POSIBLES
MARCADORES EN CÁNCER DE CÉRVIX.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

VÍCTOR BAEZA XOCHIHUA



MÉXICO, D.F.

AÑO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA

VOCAL: GIBRÁN PÉREZ MONTESINOS

SECRETARIO: DANIEL MARRERO RODRÍGUEZ

1er. SUPLENTE: GUSTAVO OLVERA GARCÍA

2° SUPLENTE: ROSA CAMACHO SANDOVAL

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO DE ONCOLOGÍA GENÓMICA , UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN ENFERMEDADES ONCOLÓGICAS, INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL, COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD, HOSPITAL DE ONCOLOGÍA, CMN SXXI-IMSS., MÉXICO DISTRITO FEDERAL.

M. EN C. DANIEL MARRERO RODRÍGUEZ

ASESOR DEL TEMA

VICTOR BAEZA XOCHIHUA

SUSTENTANTE

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO

ÍNDICE GENERAL	I
Índice figuras.....	III
Índice de tablas	IV
Abreviaturas	V
Resumen.....	1
1 Introducción	2
2 Antecedentes	4
2.1 Cérvix.....	4
2.2 Cáncer de Cérvix	6
2.3 Inmunología del cérvix.....	12
2.4 Interferón épsilon	14
2.5 Defensina beta 4 A	15
3 Justificación	16
4 Hipótesis.....	17
5 Objetivo general.....	17
5.1 Objetivos específicos	17
6 Metodología.....	18
6.1 Material biológico	18
6.2 Diseño de primers para DEFB4A	18
6.3 Diseño de primers para IFNe.....	19
6.4 Extracción de RNA	19
6.5 Síntesis de DNA complementario (cDNA).....	20

6.6 Programa de PCR	21
6.7 Programa de PCR para detección de VPH	22
6.8 Programa de PCR para gen ribosoma 18s	22
6.9 Electroforesis.....	23
6.10 Análisis densitométrico	23
6.11 Genotipificación de VPH	23
6.12 Análisis estadístico	24
7 Resultados.....	25
7.1 Diseño y estandarización de primers	25
7.2 Expresión de IFNe y DEFB4A en tejido sano.....	28
7.3 Expresión de IFNe en los diferentes tipos de tejido	29
7.4 Expresión de la DEFB4A en los diferentes tipos de tejido.....	33
7.5 Detección y genotipificación de VPH	36
8 Discusión.....	38
9 Conclusiones	42
10 Perspectivas.....	42
11 Bibliografía	43

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1.- Microfotografía del cérvix.....	5
Figura 2.- Niveles de incidencia y mortalidad en cáncer de cérvix en México.....	6
Figura 3.- Ciclo de replicación del virus del papiloma humano.....	9
Figura 4.- Hallmarks del cáncer.....	11
Figura 5.- Inmunología del tracto genital femenino.....	13
Figura 6.- Características del par de primers para IFNe.....	27
Figura 7.- Características del par de primers para DEFB4A.....	27
Figura 8.- Fotografía de la electroforesis en gel de agarosa al 2% para los amplicones correspondientes a IFNe y para la DEFB4A en tejido sano.....	28
Figura 9.- Fotografía de la electroforesis en gel de agarosa al 2% para los amplicones correspondientes a IFNe en LIEBG.....	29
Figura 10.- Fotografía de la electroforesis en gel de agarosa al 2% para los amplicones correspondientes a IFNe en LIEAG.....	30
Figura 11.- Fotografía de la Electroforesis en gel de agarosa al 2% para los amplicones correspondientes a IFNe en CaCu.....	31
Figura 12.- Diferencia en intensidad de las bandas de IFNe en las diferentes etapas de la neoplasia.....	32
Figura 13.- Aumento en la expresión del transcrito del IFNe.....	32
Figura 14.- Fotografía de la electroforesis en gel de agarosa al 2% para los amplicones correspondientes a DEFB4A en LIEBG.....	33
Figura 15.- Fotografía de la electroforesis en gel de agarosa al 2% para los amplicones correspondientes a DEFB4A en LIEAG.....	34

Figura 16.- Fotografía de la electroforesis en gel de agarosa al 2% para los amplicones correspondientes a DEFB4A en CaCu.....35

Figura 17.- Niveles de expresión del gen de DEFB4A.....35

Figura 18.- Frecuencia de los genotipos virales en las muestras de CaCu.....37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Características histológicas de las lesiones precursoras cervicales (LIEBG y LIEAG).....7

Tabla 2.- Oligonucleótidos utilizados como primers para la PCRpf en la detección de VPH..... 22

Tabla 3.- Secuencias de los oligonucleótidos diseñados para la PCRpf del ribosoma 18s.....23

Tabla 4.- Secuencias de los oligonucleótidos diseñados para la PCRpf de las moléculas de interés.....25

ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de varianza
AP-1	Proteína activadora 1*
BrEt	Bromuro de etidio
CaCu	Cáncer cervico uterino
cDNA	DNA complementario
DEFB4A	Defensina Beta 4 A
DNA	Ácido desoxirribonucleico*
dNTP	Deoxinucleótido trifosfato
EGFR	Receptor del Factor de crecimiento epidermal*
GAS	Secuencia activadora gamma *
GP	General primer*
IFN	Interferón
IFNa	Interferón alfa
IFNb	Interferón beta
IFN γ	Interferón gamma
IFNe	Interferón épsilon
IFNk	Interferón kappa
IFN λ	Interferón lambda

IFNt	Interferón tau
IFNw	Interferón omega
iNKT	Natural killer T invariante
ISGF-3	Factor estimulador de genes por interferón 3 *
LIEAG	Lesión intraepitelial escamosa de alto grado
LIEBG	Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado
mRNA	RNA mensajero *
NK	Natural killer
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa *
PCRpf	Reacción en cadena de la polimerasa de punto final
PRR	Receptor de reconocimiento de patrones *
Rb	Retinoblastoma
RNA	Ácido ribonucleico *
RT-PCR	PCR de transcripción reversa *
STAT-1	Transductor de señal y activador de transcripción 1 *
TAM	Macrófagos asociados a tumor *
TNFa	Factor de necrosis tumoral alfa *
TNFR	Receptor del factor de necrosis tumoral *
TLR	Receptor tipo Toll *
VPH	Virus del papiloma humano

* Por sus siglas en inglés

RESUMEN

El cáncer de cérvix es el segundo tipo de cáncer con mayor incidencia y mortalidad en mujeres no sólo en nuestro país sino en todo el mundo. Las células tumorales son capaces de evadir el sistema inmunológico a través de un proceso dinámico llamado inmuoedición el cual consta de tres fases las cuales son: eliminación, equilibrio y escape. Es debido a este proceso que en este trabajo se proponen como posibles marcadores moleculares proteínas involucradas en el sistema inmune que se encuentran en la región del cérvix para su posible aplicación en diagnóstico las cuales son: el interferón épsilon y la defensina beta 4 A.

En este trabajo se analizaron 29 muestras, de las cuales 2 son muestras de tejido sano, 9 pertenecen a lesiones intraepiteliales de bajo grado, 9 lesiones intraepiteliales de alto grado y 9 correspondientes a cáncer de cérvix (CaCu). Se llevó a cabo una RT-PCR semi-cuantitativa por medio de un análisis densitométrico para buscar los transcritos de las moléculas antes mencionadas.

El tejido sano se utilizó para determinar la expresión basal de ambas moléculas de estudio. Se obtuvo un valor **p=0.0425** lo que significa que hay una diferencia estadísticamente significativa en el aumento en la expresión del IFNe y en adición se obtuvo un valor **p=0.928** indicando que no hay una asociación de la expresión del IFNe con la infección por VPH. En el caso de la DEFB4A, se obtuvo un **p=0.5799** lo que implica que no existe una diferencia estadísticamente significativa en los patrones de expresión de la DEFB4A en los diferentes tipos de tejido que se analizaron. No se encontró una relación entre la expresión del transcrito de DEFB4A con la presencia de VPH en las muestras al obtener un valor **p=0.872**.

En conclusión, El IFNe se propone como un potencial marcador molecular de progresión en CaCu, mientras que en el caso de la DEFB4A se sugiere como un posible oncogén, aunque no se encontró una posible relación entre la expresión de los transcritos del IFNe y de la DEFB4A con la infección por VPH.

1 INTRODUCCIÓN

El cérvix es la región anatómica que comienza en la parte inferior del útero y desemboca en la parte superior de la vagina y está constituido por dos secciones, el exocérvix que se caracteriza por poseer un epitelio escamoso estratificado no queratinizado y el endocérvix cuyo epitelio está formado por una capa sencilla de células cilíndricas (Wiebe *et al.*, 2012).

En México y en el mundo, el cáncer de cérvix es el segundo tipo de neoplasia de mayor incidencia y mortalidad en mujeres. Se estima que en el 2012, 13,960 mujeres fueron diagnosticados con cáncer de cérvix (23.3% del total de todas las neoplasias) (Jemal *et.al*, 2011).

Los estudios de la inmunidad del aparato reproductor femenino (principalmente la región del cérvix), se han encontrado una serie de moléculas que confieren protección frente a una gran gama de agentes infecciosos; entre los más importantes encontramos a las defensinas, de manera específica, la defensina beta 4 A (DEFB4A) se encuentra en el cérvix y tiene capacidad para formar poros en las membranas de bacterias, además de afectar virus, hongos, algunos protozoos. Así mismo existe una relación en el número de copias del gen de esta molécula con la predisposición de desarrollar CaCu (Abe *et al.*,2013). Por otra parte, el interferón épsilon (IFNe) pertenece a la familia de interferones del tipo I, los cuales se han reportado que tienen actividad antiviral. El IFNe está relacionado con la transcripción de genes que codifican para proteínas pro inflamatorias manteniendo así un estado de inflamación; además posee una expresión constitutiva en la región del cérvix (Fung *et al.*, 2013) lo cual la convierte en una molécula de importancia en el combate contra agentes patógenos y contra células cancerosas.

Respecto a las características que poseen las células tumorales descritas por Hanahan y Weinberg (2011) se pueden mencionar dos que tienen relevancia con este trabajo los cuales son: la capacidad para evadir al sistema inmunológico y la promoción de la inflamación en el tumor. En el primero se puede mencionar al proceso dinámico donde las células malignas evolucionan a variantes que son menos inmunogénicas lo que les confiere la capacidad de escapar del reconocimiento y subsecuente eliminación por el sistema inmunológico, este proceso se le llama inmunoección (Dunn *et al.*, 2004). Por otro lado, las células tumorales son capaces de liberar al medio proteínas pro-inflamatorias para mantener un estado de inflamación crónica favoreciendo a la liberación de moléculas como factores de crecimiento, factores pro-angiogénicos, enzimas modificadoras de matriz extracelular o especies reactivas de oxígeno que son capaces de interactuar con el DNA y provocar mutaciones que pueden favorecer la aparición de otras características clave en la carcinogénesis (Colotta *et al.*, 2011).

Es por lo anterior, que en este trabajo se estudiaron dos moléculas de la respuesta inmune innata que se pueden encontrar en el cérvix: el interferón épsilon y la defensina beta 4 A y su posible uso como marcadores moleculares de progresión en el cáncer de cérvix.

2 ANTECEDENTES

2.1 Cérvix

El útero se puede dividir en dos segmentos , el segmento mayor o cuerpo y el caudal o mejor conocido como cérvix. Estas dos partes se encuentra unidas por el istmo (Wiebe *et al.*,2012).

El cérvix, también conocido como cuello uterino, es la parte fibromuscular que se encuentra localizada en la parte inferior del útero, además posee una forma cilíndrica con un diámetro aproximado de 2.5 cm y un rango aproximado de 3 a 4 cm de largo. En el contexto anatómico encaja con la cúpula vaginal por la pared anterior y es sostenido por el ligamento redondo y el ligamento uterosacro. El conducto cervical desemboca en la vagina por el orificio cervical externo. Cabe mencionar que el cérvix se divide en dos partes anatómicas histológicamente diferentes, el exocérvix y el endocérvix los cuales presentan características histológicas particulares las cuales son descritas más adelante, que nos ayudarían a entender la propensión al cáncer de cérvix y el entendimiento de su principal factor de riesgo la infección por el virus del papiloma humano (VPH) (Zur Hausen, 2002).

El exocérvix está cubierto por un epitelio plano estratificado no queratinizante rico en glucógeno. Este tipo de epitelio se encuentra caracterizado por presentar múltiples capas celulares según se encuentra reportado en la literatura se hablan de 15 a 20 capas de células además de presentar un tono rosa pálido (figura 1). Este tipo de epitelio presenta en el fondo una capa de células basales redondas que ostentan un núcleo de gran tamaño y poco citoplasma; en adición, la posición del núcleo se encuentra en la parte inferior de la célula y se encuentra cerca de la membrana basal. La membrana basal se encarga de separar el epitelio del estroma y su principal función es servir como soporte (Geneser, 2003).

Por otro lado, el endocérnix está cubierto por una capa sencilla de células cilíndricas cuya morfología peculiar es la presencia de células largas ricas en citoplasma y núcleos cerca de la membrana basal además de presentar una coloración oscura (figura 1). Este tipo de epitelio es el encargado de formar glándulas que secretan moco al medio (Geneser, 2003).

Es de vital importancia mencionar a la zona de transformación ya que en esta zona existe una mezcla de los dos tipos de tejido que han sido descritos con anterioridad. Esta zona presenta una alta tasa de crecimiento y puede ser infectada por VPH y así comienza su ciclo de replicación, ya que puede alcanzar de una forma más rápida a las células basales las cuales presentan una tasa de proliferación alta y son capaces de diferenciarse (Geneser, 2003).

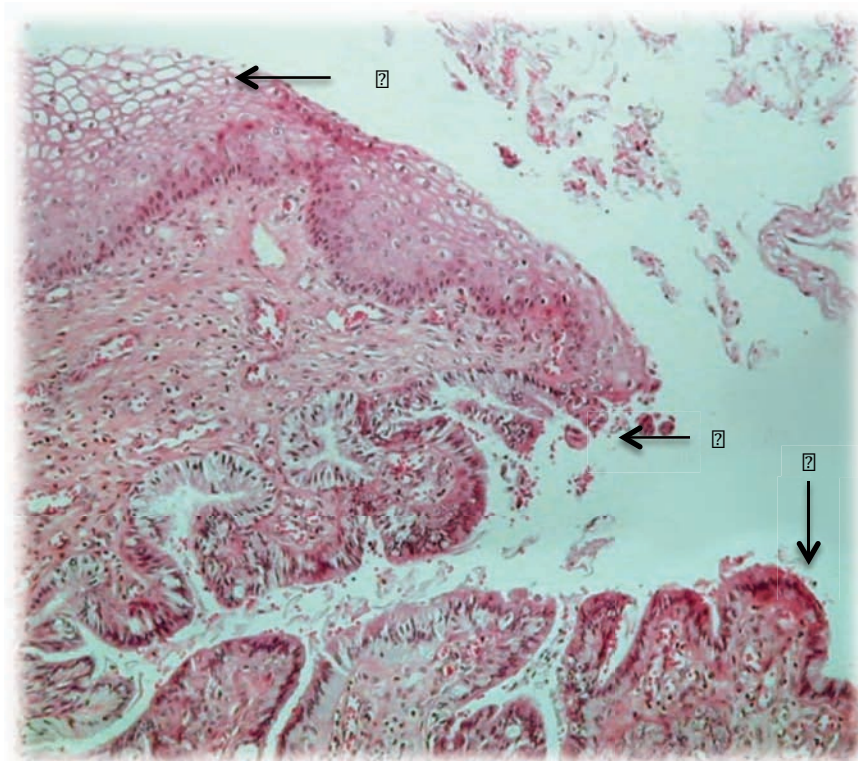


Figura 1. Microfotografía de un fragmento de cérvix. La letra A señala la zona del exocérnix, B la zona de transición epitelial y C la zona del endocérnix. Imagen editada del Atlas de Histología Fac. Med. UNAM. Fotografía: Dr. Enrique A. Sampedro Carrilo.

2.2 Cáncer de Cérvix

2

El cáncer cérvix es la neoplasia ginecológica más frecuente después del cáncer de mama, en nuestro país representa uno de los problemas que tienen un mayor impacto en las mujeres (figura 2). Es el estadio final de una serie de lesiones precursoras bien definidas por sus características histológicas, en el caso de las LIEBG se caracteriza por una displasia leve y la LIEAG por una displasia que va de severa a un carcinoma *in situ* (tabla 1). El CaCu representa el segundo lugar en incidencia y mortalidad, precedido solo por el cáncer de mama tanto a nivel mundial así como a nivel nacional. Según se ha reportado en la literatura, posee una incidencia del 15.5% (13960 pacientes) y una mortalidad de 12.8% (4769 defunciones) del total de muertes por neoplasias (Jemal *et.al*, 2011).

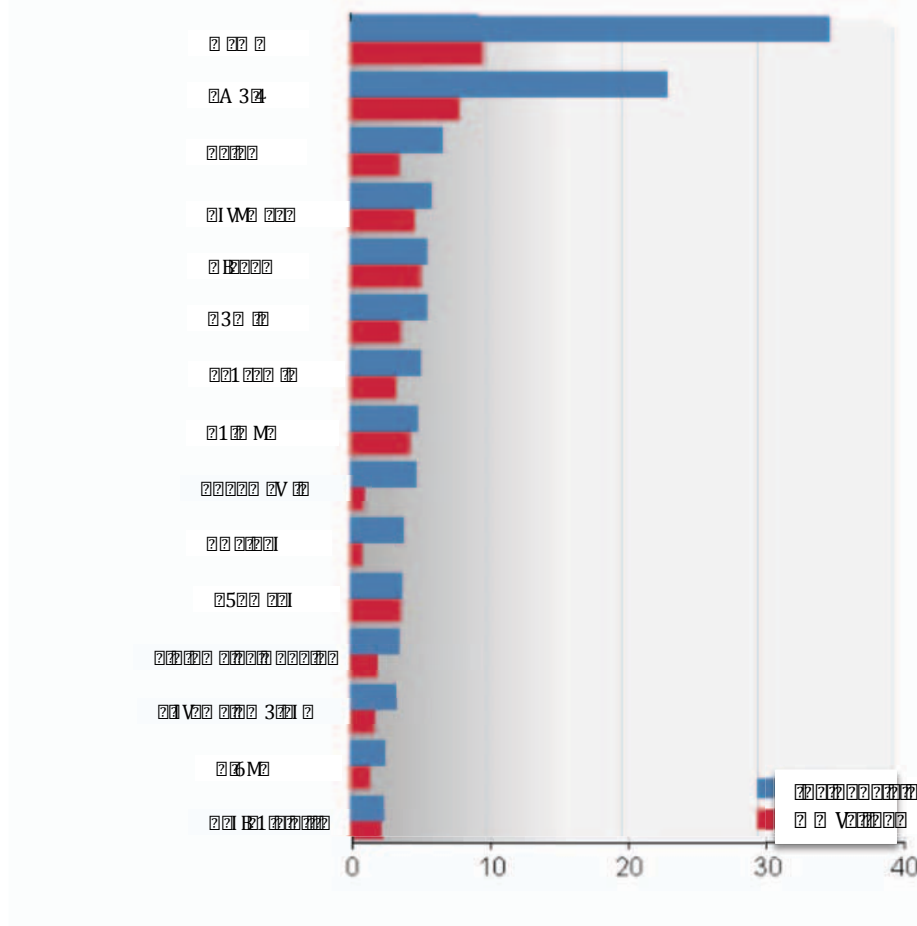


Figura 2. Niveles de incidencia y mortalidad de cáncer en mujeres de México. El cáncer de cérvix es el segundo tipo de cáncer a nivel nacional, el primer lugar lo tiene el cáncer de mama, GLOBOCAN 2012.

Características lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LIEBG)	Características lesión intraepitelial escamosa de alto grado (LIEAG)
El núcleo es 3 ó más veces el tamaño de un núcleo de célula intermedia normal.	Las células con citoplasma delicado o denso; ocasionalmente se encuentra densamente queratinizado.
Las células binucleadas o multinucleadas no son comunes.	Los bordes nucleares son irregulares.
Hipercromasia con cromatina uniformemente distribuida. La cromatina puede aparecer degenerada o borrosa si se asocia con cambios por VPH.	Hipercromasia en los núcleos y la cromatina es granular y está uniformemente distribuida (fina o gruesa).
Nucleolos son poco frecuentes.	Las células aparecen de forma individual o agrupadas en láminas o en grupos similares al sincitio.
Presencia de coilocitos (células con un halo perinuclear bien definido y ópticamente vacío y citoplasma periférico denso).	Citoplasma disminuido.
Displasia leve, maduración de los dos tercios superiores del epitelio.	Displasia grave.
Mitosis confinada en capa basal.	Mitosis en todo el espesor del epitelio.

Tabla 1. Características histológicas de las lesiones precursoras cervicales (LIEBG y LIEAG). (WHO 2013)

Existen varios subtipos de esta neoplasia, entre los más frecuentes se encuentra el carcinoma de células escamosas cervicales el cual es el más predominante ya que comprende el 80% de los casos de CaCu y se origina en el exocérvix. El segundo subtipo con mayor frecuencia es el adenocarcinoma con una predominancia del 15% y se presenta en las células secretoras de moco del endocérvix. (Fernández *et al.*, 2013). El 5% restante lo ocupan los tipos raros de cáncer de cérvix (Östör A., 2000).

Los factores de riesgos para desarrollar esta neoplasia son diversos ya que, existen múltiples factores de riesgo para poder desarrollar un cáncer de cérvix, entre los que podemos mencionar son: número de parejas sexuales, tabaquismo, uso de anticonceptivos hormonales, inmunosupresión, número de partos, inicio de vida sexual a edad temprana e infección con VPH (Cancer Research UK, 2015). La infección con VPH es considerado como el principal factor de riesgo ya que se le ha encontrado en el 90% de pacientes con CaCu, si bien la infección con este virus no implica, necesariamente, el desarrollo del cáncer de cérvix (figura 3), esto se debe a que existen tipos virales con un alto poder oncogénico y otros con un bajo poder oncogénico (Amador *et al.*, 2013). En la población mexicana los tipos virales de VPH con alto poder oncogénico son: 16,18,31,33,45,52 y 58 (Salcedo M. *et al.*, 2014).

Es importante mencionar que algunos de los factores de riesgo antes mencionados se relacionan con la inmadurez del epitelio cervical ya que este tipo de tejido deja de crecer en las mujeres a una edad aproximada entre los 21 a los 25 años lo que podría derivar en un aumento en la tasa de crecimiento de las células que residen en dicha parte anatómica. Otro factor a considerar es el aumento en la probabilidad de contagiarse con un tipo viral de alto poder oncogénico a una edad temprana y tener mayor tiempo para que ocurran los cambios moleculares necesarios para la aparición y desarrollo de la neoplasia cervical (International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer, 2009).

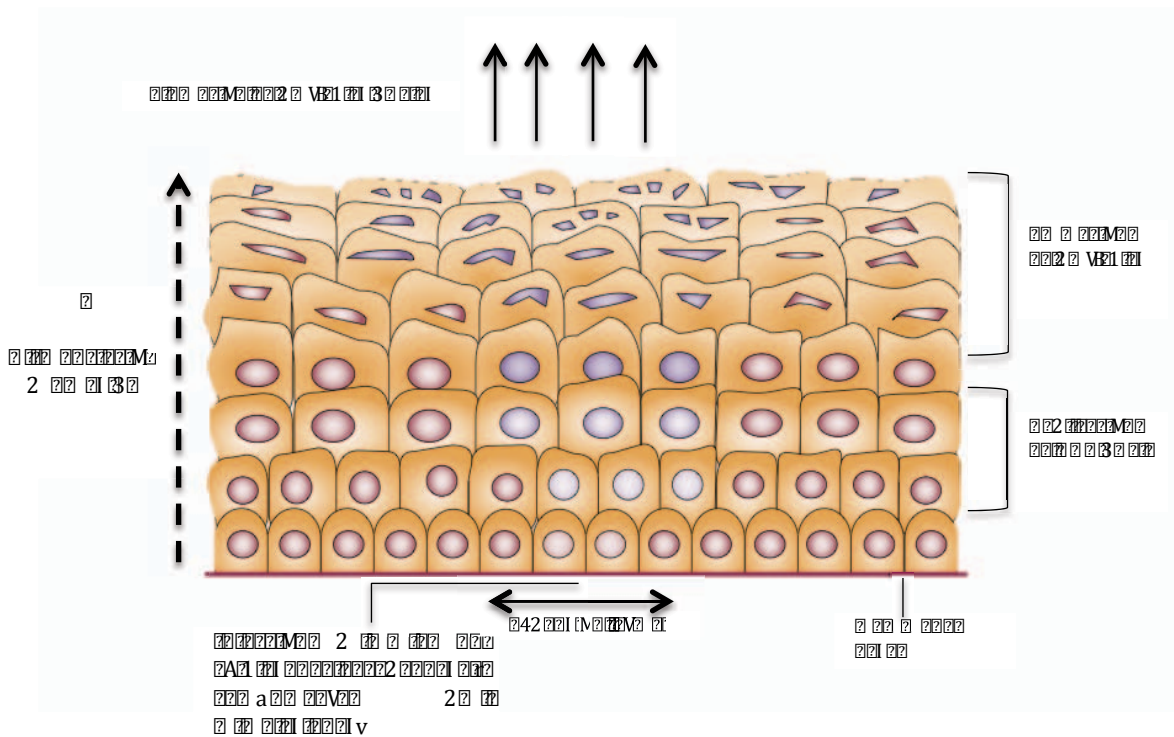


Figura 3. Ciclo de replicación del virus del papiloma humano. El ciclo de replicación del VPH depende directamente de la diferenciación celular de las células epiteliales ya que este virus tiene un gran tropismo por este tipo de estirpe celular. El DNA viral se puede encontrar en las células basales mientras que la expresión de los genes tempranos se da en el estrato espinoso; por último, las proteínas de la cápside se encuentran en los queratinocitos diferenciados (Muñoz *et al.*, 2006). Imagen tomada y editada de Zur Hausen, 2002 .

Así mismo, el tabaquismo también se ha asociado como un factor de riesgo para el desarrollo del cáncer de cérvix, esto se debe a que los productos generados como la cotinina y benzopirenos (McCann *et al.*, 1992) son capaces de viajar en el torrente sanguíneo y de esta forma llegan a las células epiteliales del cérvix donde estos productos pueden ser encontrados en el moco cervical (McCann *et al.*, 1992). Otro mecanismo que se le ha asociado al tabaquismo, es la inducción indirecta de inmunosupresión en la región cervical provocando de esta manera un mayor riesgo de contraer una infección por VPH (Acladious *et al.*, 2002).

Por otra parte, el uso de anticonceptivos orales también ha sido asociado como un factor de riesgo ya que se ha reportado que las mujeres que consumen este tipo de fármacos por un periodo mayor a los 5 años tienen un incremento de 4 veces de riesgo en desarrollar este tipo de neoplasia en mujeres portadoras de VPH (Cruz L. *Et al.*, 2004). Se ha visto que los esteroides se unen a regiones de DNA específicas del genoma del VPH, las hormonas esteroideas también pueden ser capaces de incrementar la expresión de los oncogenes E6 y E7 del VPH 16 los cuales interactúan con los productos proteicos de p53 y Rb lo que lleva a una falla en la apoptosis y a un aumento en el ciclo celular (Moodley M. *et al.*, 2003). Otro factor que se asocia con el uso de anticonceptivos orales tiene que ver más con la disminución del uso del condón lo cual aumenta la probabilidad de contraer una infección con VPH (Cruz L. *et al.*, 2004).

De acuerdo con el trabajo de Hannahan y Weinberg (2011), las células cancerosas tienen la capacidad de modular la respuesta inmunológica, esto es a través de citocinas que pueden afectar la respuesta inmune tanto celular lo que le permite a éstas células la capacidad de seguir creciendo sin ser eliminadas por los mecanismos de defensa que posee el cuerpo (figura 4). Por otro lado, las células malignas son capaces de mantener un estado de inflamación crónico siendo este el inicio de la carcinogénesis, cuyo efecto secundario es provocar un daño en el genoma por medio de la formación de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno que son capaces de interaccionar con

el DNA y de esta manera podría aumentar el número de mutaciones en el genoma de las células (DeNardo *et al.*, 2010; Grivennikov *et al.*, 2010; Qian and Pollard, 2010; Colotta *et al.*, 2009).



Figura 4. Hallmarks del cáncer. La inflamación crónica tiene un papel importante en la carcinogénesis, esto es por la liberación de especies reactivas de Oxígeno y Nitrógeno que pueden dañar al DNA provocando inestabilidad del genoma (Grivennikov *et al.*, 2010). La evasión del sistema inmune está relacionada con las estirpes celulares de macrófagos M2 y células Treg los cuales liberan citocinas que inhiben la activación de células T citotóxicas CD8 y células NK evitando así la destrucción de las células malignas (DeNardo *et al.*, 2010) .Imagen editada de Hanahan & Weinberg, 2011.

2.3 Inmunología del cérvix

Como se ha mencionado anteriormente, existe una relación entre las células cancerosas y el sistema inmunológico; en este apartado se abordará la inmunología del cérvix primero en condiciones normales y posteriormente se explicará el proceso de inmunomodulación.

El tracto genital de la mujer posee una serie de mecanismos de defensa para combatir infecciones por bacterias, hongos, protozoos y virus. La primera herramienta con la que cuenta es la barrera física compuesta por las células epiteliales que son capaces de secretar moco el cual posee una serie de moléculas que ayudan a la destrucción de patógenos. Además, las células epiteliales poseen receptores tipo Toll (TLR's) que les permiten reconocer una gran variedad de moléculas presentes en agentes infecciosos los cuales permiten despertar una respuesta inmunológica adecuada (Horne *et al.*, 2008), y que promueven la síntesis de péptidos antimicrobianos como las defensinas (figura 5). (Hickey *et al.*, 2011).

Otro mecanismo de defensa es el pH ácido (4-4.5) de la vagina. Esta característica del medio dificulta que muchos agentes infecciosos no proliferen de manera adecuada. Este pH se mantiene en niveles ácidos gracias a las bacterias comensales de esta región ya que producen ácido láctico el cual excretan al medio. Las principales bacterias que promueven este efecto protector son aquellas que pertenecen al género *Lactobacillus* (Hickey *et al.*, 2011).

En el cérvix, se encuentran una serie de moléculas que también son capaces de destruir agentes infecciosos como los péptidos antimicrobianos naturales como las defensinas alfa y beta, interferón épsilon, quimiocinas, antiproteasas y enzimas (Ganz, 2013).

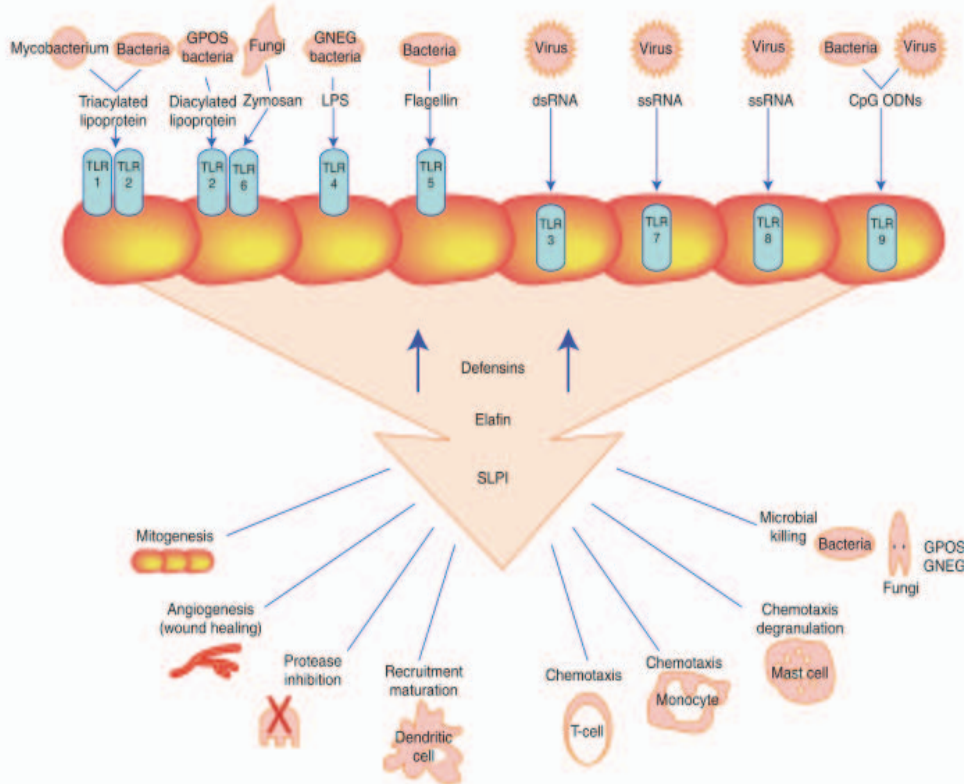


Figura 5. Inmunología del tracto genital femenino ,receptores TLR's y los efectos fisiológicos provocados por las defensinas, elafina y SLP1. (Horne *et al.*,2008)

Las células tumorales son capaces de evadir el sistema inmunológico a través de un proceso dinámico llamado inmunoedición el cual consta de tres eventos clave los cuales son: eliminación, equilibrio y escape. La fase de eliminación es el paso donde el sistema inmune destruye a las células tumorales; sin embargo, hay células que no son eliminadas y entran en un estado de equilibrio con el sistema inmune donde se contribuye a la formación de nuevas subpoblaciones de células tumorales con menor inmunogenicidad. Por último, la fase de escape se da cuando las variantes celulares que son resistentes al ataque inmunológico logran crecer incontroladamente y es en este momento cuando el tumor es clínicamente detectable (Dunn & Schreiber, 2004).

2.4 Interferón épsilon

Los interferones son glicoproteínas pequeñas de una sola cadena peptídica cuya función principal es fungir como una segunda línea de defensa contra las infecciones producidas principalmente por virus y bacterias (González *et al.*, 2012) (Kallioliás *et al.*, 2010). Además, se ha reportado que también tienen un papel importante en la inhibición del crecimiento de tumores y como moduladores de la respuesta inmune (Cheon *et al.*, 2012). Se clasifican en tres grupos de acuerdo con el tipo de receptor con el que interactúan. La familia de interferón tipo I comprende a las siguientes citocinas: IFN α , IFN β , IFN ϵ , IFN κ , IFN τ e IFN ω (Pestka *et al.*, 2004). Estas moléculas interactúan con los receptores IFNAR1 e IFNAR2. En la familia de interferón tipo II podemos encontrar al IFN γ . La familia de interferón tipo III tiene como integrantes a IFN λ -1, IFN λ -2 e IFN λ -3 los cuales interactúan con los receptores IFNLR1 e IL10R2 (Uze *et al.*, 2007).

En este trabajo se hablará del IFN ϵ , el cual se le ha clasificado como un interferón de tipo I debido a la similitud del tipo de receptor, por la estructura de su proteína y por el locus del gen que se encuentra dentro del cluster de la familia de IFN tipo I (Hardy *et al.*, 2004). El gen del IFN ϵ se encuentra en el cromosoma 9 (región 9p21.3), posee un exón y a nivel de proteína contiene 209 aminoácidos, además, sufre de glucosilación como modificación post-traducciona (Genecards). Por otro lado, la proteína posee solo el 30% de similitud con las secuencias de aminoácidos del IFN α e IFN β (Fung *et al.*, 2013). A pesar de tratarse de un interferón de tipo I, se descubrió que no posee una buena actividad antiviral (Peng *et al.*, 2007) y de acuerdo con la literatura, es producido por células epiteliales del tracto genital femenino y masculino (Peng *et al.*, 2006), cerebro, pulmón e intestino, (Xi *et al.*, 2012). Además, es el único interferón de tipo I que posee una regulación hormonal ya que sus niveles son más altos en la fase proliferativa del ciclo menstrual y se reducen en mujeres posmenopáusicas. Otra característica importante de esta molécula es que su expresión no es inducida por PRR's ya que es expresado de forma constitutiva por células epiteliales del útero, cérvix y ovarios (Fung *et al.*, 2013). Cabe mencionar, que no hay información reportada en la literatura de esta citocina en cáncer.

2.5 Defensina beta 4 A

Las defensinas, son una familia de péptidos antimicrobianos catiónicos de tamaño pequeño que son capaces de formar poros en las membranas de las bacterias, hongos y virus (García *et al.*, 2001), en adición, gracias a la distribución de los residuos de cisteína y los puentes disulfuro se pueden clasificar en dos categorías las defensinas alfa, las cuales se encuentran en granulocitos (Nakatsuji *et al.*, 2012) y en células epiteliales del intestino delgado, y las defensinas beta que son expresadas por muchas células epiteliales (Ganz *et al.*, 2013).

El gen DEFB4A, se encuentra en el cromosoma 8p23.1, es un gen expresado en el tracto reproductivo de mujeres no embarazadas, especialmente en útero, cérvix y vagina (Horne *et al.*, 2008). El gen está conformado por 2 exones, los cuales codifican para una proteína que posee 64 residuos de aminoácidos (NCBI). La proteína no tiene procesamiento post-traducciona (Genecards).

Se ha reportado en la literatura que las defensinas pueden inducir el reclutamiento de células dendríticas a través de la unión con CCR6 (Gallo *et al.*, 2002) cuando existe una infección por VPH en keratinocitos. Se ha demostrado que poseen un efecto inhibitorio en la angiogénesis y en la infección por este virus (Hubert *et al.*, 2007). Por otro lado, se ha visto que existe una posible relación entre el número de copias del gen DEFB4A, y la susceptibilidad para desarrollar cáncer de cérvix (Hollox *et al.*, 2003), las pacientes con un número de copias menor a 4 tienen un mayor riesgo de desarrollar CaCu, además en estudios *in vitro* se ha observado que a mayor número de copias del gen hay mayores niveles del transcrito después de la inducción por TNFa que tiene como finalidad una mejor actividad antimicrobiana (Abe *et al.*, 2013). En contraste, esta reportado en la literatura los efectos que provocan las defensinas a nivel de proliferación celular (Markeeva *et al.*, 2005), quimioatrayente de células dendríticas (Hubert *et al.*, 2007), e interaccionar con metaloproteasas (Tjabringa *et al.*, 2003).

3 JUSTIFICACIÓN

El CaCu es un problema de Salud pública debido a que presenta una incidencia del 15.5% de pacientes con neoplasias y una mortalidad de 12.8% del total de muertes por neoplasias. En el proceso de desarrollo del CaCu ocurre un desbalance en la respuesta del sistema inmune, ya que pasa de una respuesta pro-inflamatoria hacia una inmunosupresión local, esto mediado por distintas moléculas. En adición, el número de copias del gen de la DEFB4A está relacionado con la propensión a desarrollar cáncer de cérvix, sin embargo, aún no hay mucha información acerca de este péptido antimicrobiano y se espera que con este trabajo se encuentre más información acerca de la función de esta molécula en el cérvix.

Así mismo, se propone al interferón épsilon como un marcador molecular debido a que se ha reportado que posee una expresión constante en el cérvix; en adición, es un interferón que ha sido estudiado en menor proporción con respecto a los IFNa e IFNb y su participación en el desarrollo de CaCu. Además, se ha reportado que sus niveles de expresión aumentan al existir una mayor concentración de TNFa el cual es una molécula que puede ser encontrada en un ambiente tumoral, favoreciendo así la inflamación crónica y la tumorigénesis del tejido cervical.

Este trabajo aportará información sobre la expresión de las moléculas que están asociadas con los procesos de inmunomodulación en CaCu como la DEFB4A y el IFNe y que en adición se pueden proponer como marcadores moleculares de progresión.

4 HIPÓTESIS

En el tejido cervical con un grado mayor de lesión presentará niveles más altos del transcrito del IFNe y menos del transcrito DEFB4A que el tejido sano o aquel con niveles menores de lesión.

5 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la expresión de los genes IFNe y DEFB4A en tejido cervical sano y con distintos grados de lesión.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Diseñar los primers utilizando herramientas bioinformáticas para IFNe y DEFB4A.
- ❖ Evaluar la expresión del IFNe y DEFB4A en tejido sano por medio de la técnica de RT-PCRpf.
- ❖ Evaluar la expresión del IFNe y DEFB4A en tejidos con LIEBG y en LIEAG por medio de la técnica de RT-PCRpf.
- ❖ Evaluar la expresión del IFNe y DEFB4A en lesiones invasoras por medio de la técnica de RT-PCRpf.

6 METODOLOGÍA

6.1 Material biológico

Se utilizaron 29 muestras de tejido cervical, las cuales fueron recolectadas en la clínica de displasias del Hospital General de México, México, D.F., México. Las muestras fueron autorizadas bajo consentimiento informado de las pacientes y el protocolo de trabajo fue aprobado por el comité de ética del hospital.

Se establecieron tres grupos con 9 muestras respectivamente con base en el diagnóstico de las pacientes, el primer grupo pertenece a 2 muestras de tejido sano, el segundo son aquellas que presentaron una lesión de bajo grado, el tercer conjunto de pacientes con lesión de alto grado y por último aquellas pacientes con un diagnóstico de CaCu.

Por otro lado, las muestras que se utilizaron en este trabajo cumplen con los requisitos de exclusión e inclusión que consta de un diagnóstico histopatológico y por estudios de colposcopia, el tejido sano está libre de infección por VPH, y no presenta alteraciones a nivel histológico y por colposcopia.

6.2 Diseño de primers para DEFB4A

Para el diseño de los primers fue necesario utilizar la base de datos del NCBI. Lo primero fue buscar la secuencia del gen de la defensina beta 4A (DEFB4A) en *Homo sapiens*, una vez que se encontró el gen se buscó la secuencia del mRNA ([NM_004942.3](#)) para posteriormente utilizar el programa de Primer-Blast® y poder diseñar los primers específicos para esta citocina. Para tener una mayor especificidad se buscó que los primers reconocieran las uniones exón-exón del mRNA.

Una vez que se obtuvieron los primers, se eligió el primer par que es arrojado como resultado en el programa. Después por medio de Oligo Calc® se buscó que las secuencias de los primers no presentaran estructuras secundarias ni sean complementarias entre si.

6.3 Diseño de primers para IFNe

Para el diseño de los primers correspondientes al IFNe se utilizó la secuencia de su mRNA ([NM_176891.4](#)) en la base de datos del NCBI y fueron diseñados siguiendo los pasos anteriormente mencionados y con las características previamente descritas.

6.4 Extracción de RNA

Lo primero que se llevó a cabo fue la extracción a partir de las biopsias (tejido cervical) a partir de un fragmento de aproximadamente 35 mg de tejido. Una vez que se obtuvieron fragmentos del tamaño homogéneo del tejido se colocaron en unos tubos Eppendorf especiales para TissueLyser y posteriormente se llevaron al equipo TissueLyser II de QIAGEN. Una vez que se obtuvo una mezcla homogénea de tejido/TRIZOL se colocaron en hielo y se procedió a la extracción del RNA. Para el siguiente paso se utilizó el KIT de extracción RNeasy® Mini kit de QIAGEN y se siguieron los pasos que vienen en el inserto del kit el cual se explica brevemente a continuación: el primer paso que se efectuó fue agregar en un tubo Eppendorf una mezcla que consistió del lisado con cloroformo para poder separar la parte acuosa para ello, se centrifugó durante 15 minutos a 12500 rpm. Posteriormente, se recuperó la fase acuosa y se transfirió a un tubo nuevo y se le agregó etanol al 70%, después se transfirieron 700 µL de la muestra incluyendo cualquier precipitado a una columna RNeasy Mini spin de 2 mL de capacidad y se llevó a centrifugar a 8000 x g durante 15 s. Una vez que se terminó el tiempo de centrifugado, se desechó el líquido que se encontraba en el tubo, luego se agregaron 700 µL de Buffer RW1 a la columna RNeasy

spin y se centrifugó a 8000 x g por 15 s y se volvió a descartar el líquido del tubo. Después se agregaron 500 µL del Buffer RPE a la columna y se centrifugó como en el paso anterior. Posteriormente, se colocaron 500 µL del Buffer RPE y se centrifugó durante 2 min a 8000 x g. Por último, la columna RNeasy spin se colocó en un tubo de 1.5 ml de colección y después se agregaron directamente a la membrana, 30 µL de agua libre de RNasa y se llevó a centrifugar 1 min a 8000 x g para eluir el RNA.

Finalmente, se cuantificó el material genético extraído por medio del espectrofotómetro Nanodrop®1000 para conocer la pureza y posteriormente se preparó un gel de agarosa al 1.5% para conocer la integridad del RNA.

6.5 Síntesis de DNA complementario (cDNA)

Para poder efectuar los análisis de expresión de los transcritos de las moléculas a estudiar en este trabajo se llevó a cabo la técnica de técnica de la retro-transcripción acoplada a reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

Para cada una de las reacciones, se agregaron 4 µL SuperScript® VILO™ master mix Life Technologies™ (CA,USA), el cual contiene: random primers, proteína cooperadora, inhibidor de ribonucleasas recombinante, MgCl₂, dNTP's, RNaseOUT™ y el SuperScript® III RT. Posteriormente se agregó 1 µg de RNA a retrotranscribir y por último se vertió H₂O libre de RNAsas c.b.p. 20 µL.

El programa que se utilizó para la realización de la retrotranscripción fue el siguiente: 10 minutos a una temperatura de 25 °C para activar a la enzima, posteriormente se llevó la extensión a 42 °C durante un tiempo de 120 minutos y para terminar la reacción se elevó la temperatura a 85°C por 5 minutos. El último paso del programa de

retrotranscripción está conformado por una disminución en la temperatura hasta los 4°C por tiempo indefinido para conservar el material genético recién sintetizado.

6.6 Programa de PCR

Antes de empezar la reacción, es necesario realizar una dilución de los primers hasta llegar a una concentración de 20 pM. Para poder realizar la PCR, se prepararon 20 µL de reacción en tubos Eppendorf de los cuales se adicionaron 10 µL de Go Taq® Green Master Mix Promega™ (WI,USA) cuya composición es de 2X de buffer de reacción Green GoTaq® (pH 8.5), 3 mM de MgCl₂, 400 µM de dATP, 400 µM de dGTP, 400 µM de dCTP y 400 µM de dTTP. Además se agregó 1 µL de primer Forward (F), 1 µL del primer Reverse (R), 7 µL de H₂O libre de RNAsas y por último se le agregó 1 µg de cDNA.

El programa de PCR que fue utilizado para esta parte del trabajo consistió en una desnaturalización inicial de 95°C durante 5 minutos; sin embargo, durante los demás ciclos de la reacción este paso sólo tendrá una duración de 30 segundos. Para la fase de alineamiento se utilizó una temperatura de 60°C por un intervalo de 30 segundos y posteriormente, para la fase de extensión se aumentó la temperatura hasta los 72°C durante 30 segundos. Una vez que se cumplieron los 30 ciclos se llevó a cabo una extensión final para la reacción, la cual tuvo una duración de 5 minutos. El paso final del programa de PCR consiste en disminuir la temperatura hasta los 4°C. Este programa fue el mismo para la amplificación de los transcritos de IFNe y de DEFB4A.

6.7 Programa de PCR para detección de VPH

La reacción de PCR se llevó a cabo con los reactivos y cantidades descritas anteriormente. La reacción de PCR se realizó con las siguientes condiciones: 94°C 5min, seguido de 40 ciclos con 30 s a 95°C, 60 s a 44°C, 72°C por 90 s con una etapa de extensión final de 10 min. a 72°C. Para llevar a cabo esta reacción de PCR fue necesario utilizar los primers GP5 y GP6, en la siguiente tabla se resumen sus características.

Primer	Secuencia (5'-3')	Tamaño de producto (pb)
GP-5	Sentido - TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC	150
GP-6	Antisentido - GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C	

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados como primers para la PCRpf en la detección de VPH.

6.8 Programa de PCR para gen ribosoma 18s

La reacción de PCR se realizó con las siguientes condiciones: 94°C 5min, seguido de 40 ciclos con 30 s a 95°C, 60 s a 44°C, 72°C por 90 s con una etapa de extensión final de 10 min. a 72°C. Para llevar a cabo esta reacción de PCR fue necesario utilizar los primers FRPS18 y RRPS18, en la siguiente tabla se resumen sus características.

Primer	Secuencia (5'-3')	Tamaño de producto (pb)
FRPS18	Sentido - AAT CCA CGC CAG TAC AAG ATC CCA	240
RRPS18	Antisentido - TTT CTT CTT GGA CAC ACC CAC GGT	

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados como primers para la PCRpf del ribosoma 18s.

6.9 Electroforesis

Una vez que se obtuvo el producto de PCR se preparó un gel de agarosa al 2%. Para ello se pesaron 0.7 g de agarosa grado biología molecular y 75 mL de TBE, se mezclaron y se disolvió la agarosa. Una vez que se obtuvo una solución transparente sin grumos ni cristales se procedió a enfriar la mezcla y una vez que llegó a una temperatura aceptable se agregó BrEt. Se vertió la agarosa a una cámara de electroforesis y se esperó a que se polimerizara el gel. Las condiciones a las cuales se efectuó las electroforesis fueron a 75V durante 30 minutos.

6.10 Análisis densitométrico

Las imágenes de la electroforesis se obtuvieron por medio de un transiluminador GEL DOC™ XR System de Bio-Rad Laboratories (CA, EUA). El análisis por densitometría se realizó utilizando el programa ImageJ.

6.11 Genotipificación de VPH

Para la genotipificación, se utilizó el equipo CAR® y el kit CLART® Papillomavirus huma 2 de la compañía GENOMICA (M, España) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

6.12 Análisis estadístico

El análisis estadístico para la comparación de las medias de la expresión relativa se realizó utilizando el software GraphPad Prism® versión 6.0a. Se utilizó ANOVA para analizar las diferencias entre grupos. Un valor $p \leq 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Se utilizó el software SPSS® versión 22.0 para realizar el análisis estadístico para determinar si existe una relación entre la infección con VPH y la expresión de las moléculas de estudio de este trabajo. Se utilizó una χ^2 de Pearson. Un valor $p \leq 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

7 RESULTADOS

7.1 Diseño y estandarización de primers

Los primers para las moléculas en estudio se diseñaron de acuerdo con lo descrito en el trabajo de Sambrook y Russel (2001). En el caso de los primers para IFN α se tienen que el Primer IFN-F tiene una longitud de 21 pb (tabla 2) mientras que el primer IFN-R posee una longitud de 20 pb. En adición el contenido de G y de C 52.38 y 55 respectivamente, además de que la T_m de ambos primers son muy parecidos en 60.54 °C (figura 6). El tamaño de producto amplificado posee una longitud de 104 pb. Así mismo, para el caso de los primers de la DEFB4A se siguieron los mismos parámetros, en este caso, se obtiene un producto de 155 pb (tabla 2). En la figura 7 se muestran las características principales de este par de primers. Posteriormente, se realizó la estandarización de los primers utilizando líneas celulares SiHa y HeLa, además se efectuó como una PCR para el cDNA del ribosoma 18s (control interno) para comprobar que se llevó a cabo la reacción de retrotranscripción de manera adecuada. Una vez que se obtuvieron las condiciones ideales para llevar a cabo la PCR, se utilizó el cDNA obtenido a partir de la línea celular HeLa del producto de PCR de HeLa como control positivo.

Primer	Secuencia (5'-3')	Tamaño de producto (pb)
IFN-F	Sentido - CCA AAA AGC ACA CAC TCT GGC	104
IFN-R	Antisentido - CCG TGT GGT TTT CCT CCC AA	
DEFB-F	Antisentido - ACC AGG GAC CAG GAC CTT TA	155
DEFB-R	Sentido - ACC ACC AAA AACACCTGG AAG	

Tabla 4. Secuencias de los oligonucleótidos diseñados para la PCRpf de las moléculas de interés.

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCAAAAAGCACACTCTGGC	21	60.54	52.38	3.00	3.00
Reverse primer	CCGTGTGGTTTTCTCCCAA	20	60.47	55.00	3.00	0.00

Products on target templates

>[NM_176891.4](#) Homo sapiens interferon, epsilon (IFNE), mRNA

product length = 104

Forward primer 1 CCAAAAAGCACACTCTGGC 21
Template 835G..... 855

Reverse primer 1 CCGTGTGGTTTTCTCCCAA 20
Template 938 919

Figura 6. Características del par de primers para IFNe. Resultados obtenidos a través del programa Primer-BLAST de la página del NCBI.

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	ACCAGGGACCAGGACCTTTA	20	59.80	55.00	5.00	2.00
Reverse primer	ACCACCAAAAACACCTGGAAG	21	58.89	47.62	3.00	1.00

Products on target templates

>[NM_004942.3](#) Homo sapiens defensin, beta 4A (DEFB4A), mRNA

product length = 155

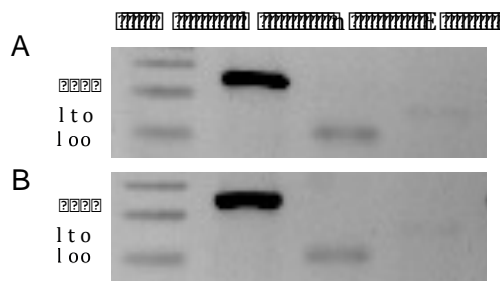
Forward primer 1 ACCAGGGACCAGGACCTTTA 20
Template 66 85

Reverse primer 1 ACCACCAAAAACACCTGGAAG 21
Template 220 200

Figura 7. Características del par de primers para DEFB4A. Resultados obtenidos a través del programa Primer-BLAST de la página del NCBI.

7.2 Expresión de IFNe y DEFB4A en tejido sano

En la figura 8, se muestra la fotografía de la electroforesis para observar la expresión del gen no solo del IFNe, sino también de la DEFB4A en las dos muestras de tejido sano. Se tomará como una expresión basal para estas moléculas siendo ligeramente mayor en el caso del IFNe, se puede observar y comprobar por medio de un análisis densitométrico que existe una menor expresión para la defensina.



Carril	Intensidad de expresión (ppi)
2A	1088.678
3A	755.385
2B	1212.749
3B	567.728

Figura 8. Fotografía de la electroforesis en gel de agarosa al 2% para los amplicones correspondientes a IFNe y para la DEFB4A en tejido sano. Carril 1 se muestra el amplicón para el ribosoma 18s como control interno. Donde M es el marcador de pares de bases. En carril 2 está la banda correspondiente a IFNe, mientras que en el carril 3 se encuentra la banda para DEFB4A.

7.3 Expresión de IFNe en los diferentes tipos de tejido

A continuación, se presentan los resultados correspondientes a la expresión del IFNe en los tres grupos de muestras (figuras 9,10 y 11). En la figura 12 se exhiben tres muestras seleccionadas al azar para observar el aumento de intensidad en la expresión del gen de IFNe con el fin de tener una mejor visualización del transcrito. Se llevó a cabo un análisis densitométrico de las imágenes de los geles y posteriormente se realizó un ANOVA de una vía, y se determinó que existe una diferencia estadísticamente significativa con un valor **p= 0.0425** ($p \leq 0.05$) lo que implica que sí hay un aumento de la expresión de la molécula conforme entre el tejido sano y la lesión invasora. Por otro lado, no se encontró una asociación entre la expresión de IFNe con la infección con VPH, ya que se obtuvo una **p=0.928**.

La figura 9 muestra los niveles de transcrito de IFNe en las muestras con lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LIEBG). Se detectó el transcrito en 7 de las 9 muestras (77.8%) y en promedio se encontró un incremento de **1.07** con respecto al tejido sano.

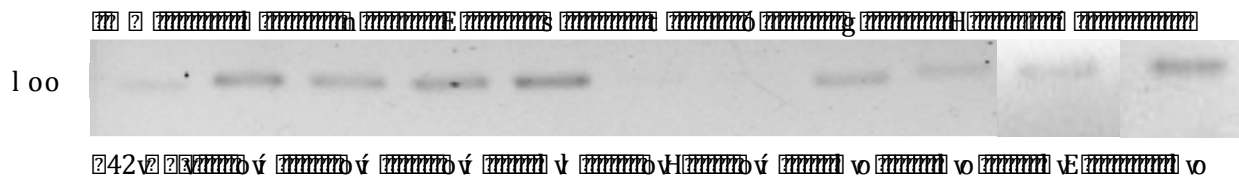


Figura 9. Fotografía de la electroforesis en gel de agarosa al 2% para los amplicones correspondientes a IFNe en LIEBG. En la tabla se pueden observar la intensidad de expresión obtenida por densitometría y el valor de expresión relativa es la comparación entre la densidad de expresión del tejido normal (N) respecto al valor de la densidad de cada muestra. Los valores cercanos a uno implican que la densidad es semejante en las muestras.

Las lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (LIEAG) son mostradas en la figura 10. Se encontró un aumento en las muestras que presentan el transcrito de IFNe (8/9) con un incremento de su promedio de **4.13** con respecto a las muestras con LIEBG.

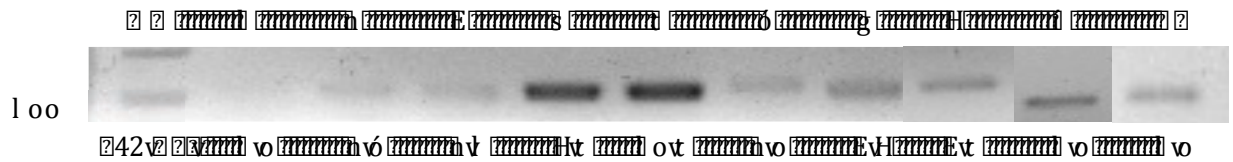


Figura 10. Fotografía de la electroforesis en gel de agarosa al 2% para los amplicones correspondientes a IFNe en LIEAG. En la tabla se pueden observar la intensidad de expresión obtenida por densitometría y el valor de expresión relativa es la comparación entre la densidad de expresión del tejido normal (N) respecto al valor de la densidad de cada muestra. Se logra observar un ligero aumento en los valores correspondientes a la expresión relativa en estas muestras en comparación con las pertenecientes a LIEBG. Las muestras de los carriles 4 y 5 poseen los valores más altos de densidad de expresión. En promedio se obtuvo un aumento del 4% respecto al tejido sano.

Por último en la figura 10 se presentan las muestras con lesiones invasoras (CaCu). Se detectó el transcrito de IFNe en todas las muestras (100%); además, se obtuvo un incremento en el promedio de intensidad del 6% (6.0), siendo así las muestras con una mayor expresión relativa respecto al tejido sano y a las muestras con lesiones precursoras.

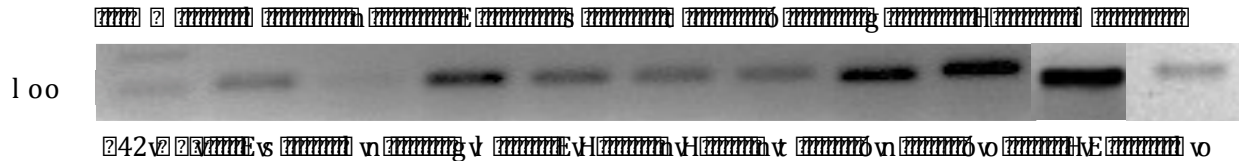


Figura 11. Fotografía de la Electroforesis en gel de agarosa al 2% para los amplicones correspondientes a IFNe en CaCu. En la tabla se pueden observar la densidad de expresión obtenida por densitometría y el valor de expresión relativa es la comparación entre la intensidad de expresión del tejido normal (N) respecto al valor de la densidad de cada muestra. Se puede observar que existe una mayor intensidad en las bandas, así mismo, los valores de expresión relativa son más altos en comparación con los obtenidos en las lesiones precursoras. Sólo la muestra del carril 2 es aquella que posee la menor densidad de expresión respecto a las demás. El promedio de expresión aumentó al 6% respecto al tejido sano.

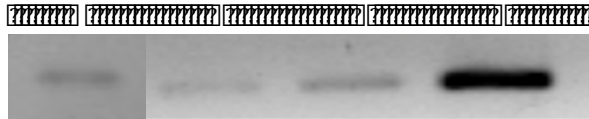


Figura 12. Diferencia en intensidad de las bandas de IFNe en las diferentes etapas de la neoplasia. Donde 1 pertenece a un espécimen con LIEGB, 2 una muestra con LIEAG y por último, a una muestra con CaCu. Las muestras 1, 2 y 3 fueron seleccionadas al azar y se corrieron en un gel de agarosa al 2%.

A continuación se presenta una gráfica donde se refleja el aumento en la expresión del transcrito del IFNe (figura 13), esto se llevó a cabo al dividir el valor densitométrico de cada una de las etapas de la neoplasia con respecto al tejido sano y posteriormente se calculó el promedio y con este valor se procedió a elaborar la gráfica. Cabe señalar, que se tomó como valor de 1 a la expresión basal del transcrito en el tejido sano.

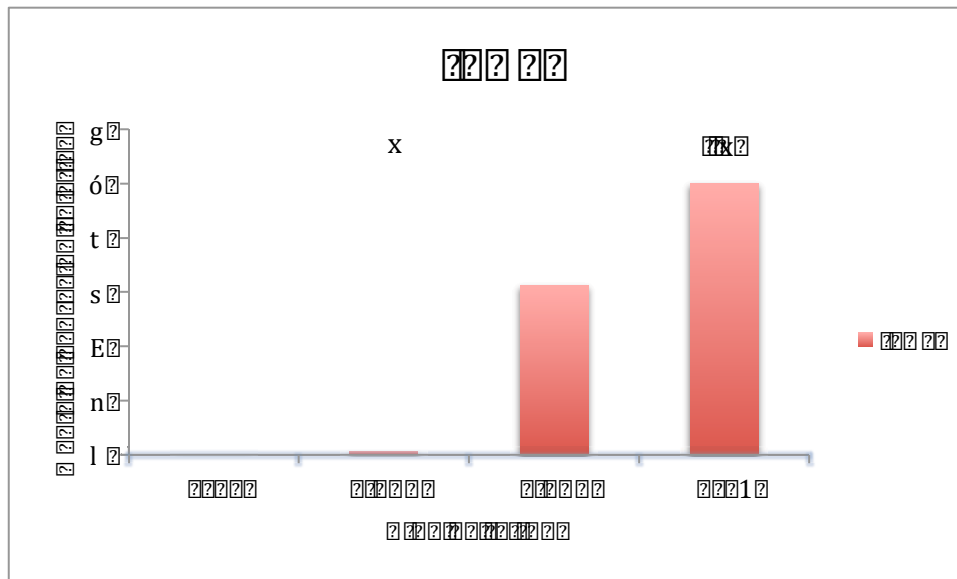


Figura 13. Aumento en la expresión del transcrito del IFNe. Para la construcción de esta gráfica se utilizó la media de cada grupo y se tomó como 1 el valor basal del tejido sano. Se puede observar el aumento en la media de expresión relativa respecto al tipo de tejido. Se tomó el valor del tejido sano como 1 para que se pudiera notar el ligero aumento de la media de expresión relativa en LIEGB, el promedio de expresión en LIEGB fue de 1.07, en LIEAG 4.13 y en CaCu se obtuvo un promedio de 6.0. El valor obtenido fue de $p=0.0425$. (*) Diferencia significativa entre estos dos tipos de tejido.

7.4 Expresión de la DEFB4A en los diferentes tipos de tejido

Para la DEFB4A se obtuvo una expresión heterogénea en los diferentes tipos de tejido donde los promedios de intensidad dando como resultado la formación de dos grupos un grupo positivo y otro negativo para la expresión del transcrito (figuras 14, 15 y 16). Además la intensidad de expresión en la mayoría de los ejemplares fue mayor en comparación con la expresión obtenida en el tejido sano.

Al igual que en el caso del IFNe, se llevó a cabo un análisis densitométrico y un ANOVA de una vía donde se obtuvo un valor **p=0.5799** lo que implica que no hay una diferencia estadísticamente significativa en los niveles de expresión de la molécula. En adición, no se encontró asociación entre la expresión de DEFB4A con la infección con VPH, ya que se obtuvo una **p=0.872**.

La figura 14 presenta los niveles de transcrito de DEFB4A en LIEBG. Se observa que el transcrito en el 66.6% de los ejemplares y se encontró un incremento del promedio de expresión relativa del **5.80%**.

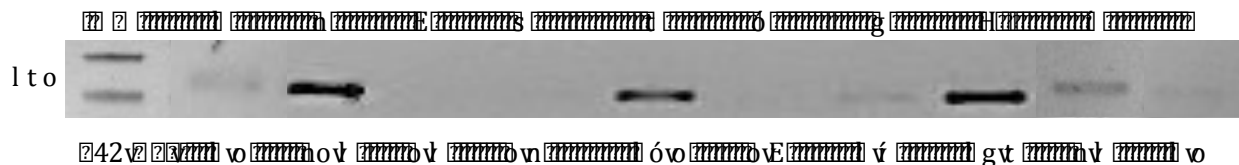


Figura 14. Fotografía de la electroforesis en gel de agarosa al 2% para los amplicones correspondientes a DEFB4A en LIEBG. Se puede observar que existe una expresión heterogénea en la expresión de esta molécula en las diferentes muestras.

En la figura 15 se muestran los niveles del transcrito de DEFB4A LIEAG. Se encontró un aumento en la detección del transcrito de 77.8% de las muestras; además, existe una disminución en el promedio de expresión (3.80) con respecto al tejido con una lesión de bajo grado.

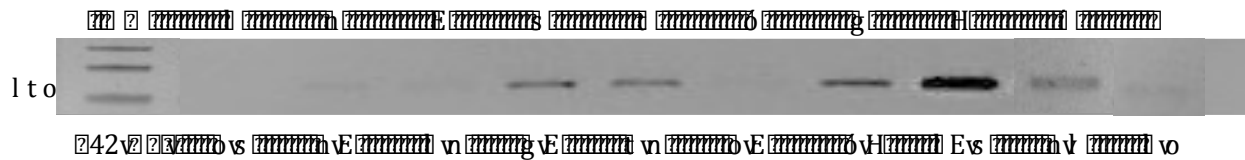


Figura 15. Fotografía de la electroforesis en gel de agarosa al 2% para los amplicones correspondientes a DEFB4A en LIEAG. Al igual que en las muestras con LIEBG se puede notar que la expresión de la DEFB4A de forma heterogénea sin presentar un patrón. Por un lado se puede observar que hay muestras que lo sobre-expresan (carriles 7 y 8), los carriles 1 y 6 no presentan una banda correspondiente a la molécula de interés esto observar los valores correspondientes a la densidad de expresión. En los carriles 2 y 3 hay muestras que presentan una expresión muy baja.

Las lesiones invasoras (CaCu) se presentan en la figura 16. Se encontró que el 77.8% de las muestras presentan la banda correspondiente al transcrito de DEFB4A; se tiene un incremento en el promedio de expresión de (6%) 6.70.

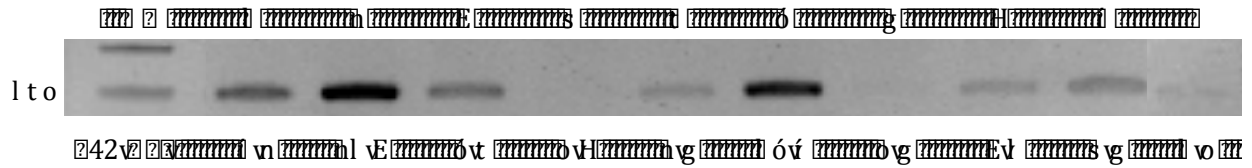


Figura 16. Fotografía de la electroforesis en gel de agarosa al 2% para los amplicones correspondientes a DEFB4A en CaCu. En este caso, se puede apreciar que la expresión de la molécula tiene un aumento en las muestras con lesiones invasoras. En los carriles 2 y 6 se presentan las muestras con la mayor densidad de expresión y, por lo tanto, aquellas que presentan un valor mayor de expresión relativa; en el caso de los carriles 4 y 7 se tienen las muestras que no expresan la DEFB4A.

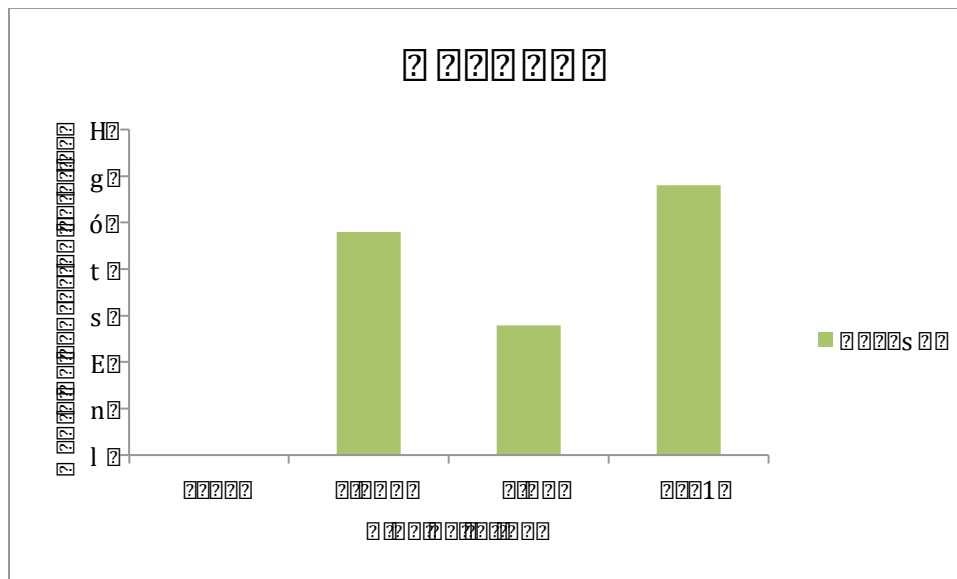


Figura 17. Niveles de expresión del gen de DEFB4A. Se tomó el valor del tejido sano como 1, el promedio de expresión en LIEBG fue de 5.80, en LIEAG 3.80 y en CaCu se obtuvo un promedio de 6.70. El valor obtenido fue de $p= 0.5799$.

7.5 Detección y genotipificación de VPH

Cada una de las muestras con CaCu se analizaron para detectar la presencia de VPH. Esto se realiza de forma rutinaria a cada muestra que llega al laboratorio ya que como se mencionó en la parte de antecedentes la infección por este virus es el factor principal para el desarrollo del cáncer de cérvix. Para efectuar estas reacciones, se utilizaron los General Primers (GP5 y GP6) y que se encargan de amplificar la región correspondiente al gen de la proteína L1 de VPH. El porcentaje más alto de muestras que son positivas para VPH son aquellas que pertenecen al grupo de especímenes con CaCu con un 90%.

Después de la detección de VPH en las muestras, se procedió a realizar la genotipificación para conocer los tipos virales que se encuentran en los especímenes que resultaron ser positivos en el tejido invasor. En la figura 17 se puede observar que el tipo viral con mayor frecuencia es el 16 con un 50% de frecuencia en las muestras, seguido por el tipo 18 con el 25%. Por otro lado, se encontró que existen muestras que presentan una infección múltiple con dos o tres tipos virales, en donde se puede notar la presencia del tipo viral 16 en una de las muestras.

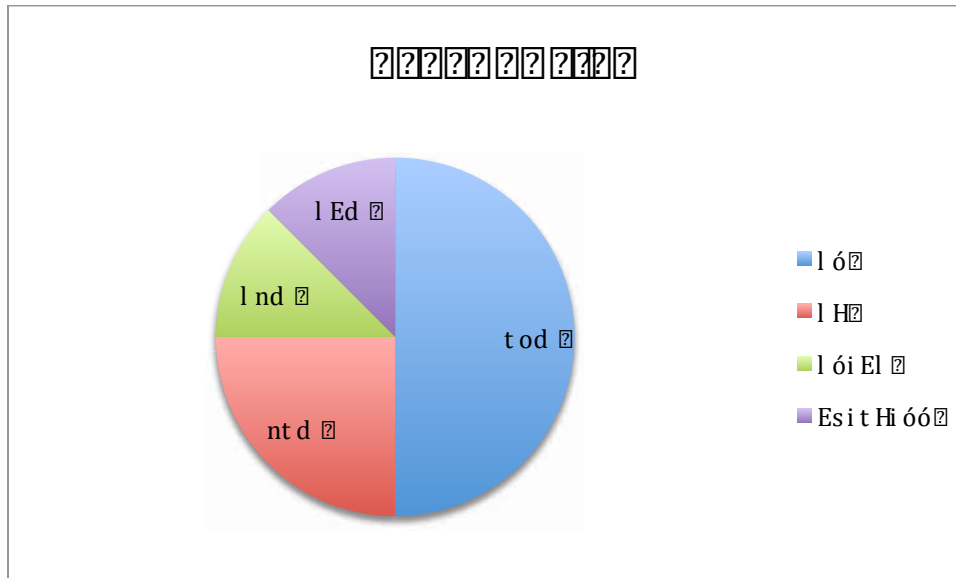


Figura 18. Frecuencia de los genotipos virales en las muestras de CaCu. Se puede apreciar que el tipo viral 16 es el más frecuente en las muestras con lesión invasora en un 50% de frecuencia, mientras que el genotipo 18 se encuentra en el 25% de las muestras; en adición, se encontraron infecciones múltiples con genotipos 16/31 con un 12%, en un 13% la triple infección con los genotipos 24/58/66.

8 DISCUSIÓN

Se ha reportado en la literatura que la expresión de los interferones tipo I está estrechamente relacionada con moléculas PRR's como los receptores TLR en cérvix; sin embargo, el IFN ϵ es el único IFN tipo I que no requiere de estas moléculas para expresarse, en cambio son las células epiteliales cervicales las encargadas de expresar esta citocina de manera constitutiva (Wijesundara *et al.*, 2014), esto se puede corroborar con los resultados que se tienen en la figura 8. Además, al no existir una diferencia molecular entre las células del tejido sano respecto a las células del tejido con LIEBG (International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer, 2009) se puede observar que las bandas poseen una intensidad similar.

Se ha visto que el interferón épsilon aumenta su expresión al existir una mayor síntesis de TNF α (una molécula que es capaz de promover proliferación, diferenciación, sobrevivencia celular e incluso muerte celular esto es dependiendo de la cascada de señalización que active) y esto puede indicar el porqué hay un aumento en la expresión del transcrito conforme la neoplasia va progresando, ya que las células cancerosas, células dendríticas, keratinocitos (Amador-Molina *et al.*, 2013), células NKT invariantes (iNKT) y macrófagos asociados a tumor (TAMs) son capaces de liberar al microambiente tumoral TNF α (Gomes *et al.*, 2013) ya sea forma autocrina o paracrina y de este modo, a interactuar con su receptor TNF-R y posteriormente inducir la expresión de no solo el mRNA del IFN ϵ sino también de factores de transcripción como NF κ B y AP-1 (Grivennikov *et al.*, 2010) que pueden ayudar a que las células puedan presentar un fenotipo maligno, además se ha visto que pueden fomentar diferenciación a macrófagos M2 y a células reguladoras los cuales suprimen la respuesta inmune contra las células malignas (Grivennikov *et al.*, 2010).

Se esperaba que las lesiones de bajo grado y tejido sano estuvieran dentro de un rango similar de expresión del transcrito del IFN ϵ debido a que esta etapa de la neoplasia no hay diferencias moleculares entre ambos tipos de estados (International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer, 2009).

Por otro lado, se puede observar que las muestras con lesiones invasoras (CaCu) presentan la banda correspondiente al IFNe con una mayor intensidad comparadas con las lesiones tanto de bajo como de alto grado, lo cual podría sugerir que esta citocina está siendo expresada, por lo menos a nivel transcripcional. La posible importancia del aumento en la expresión del IFNe se pueda deber a que esté favoreciendo un estado de inflamación crónico, esto se promueve a través de la interacción del IFNe con su receptores IFNAR1 o IFNAR2 y esto podría generar una cascada de señalización vía STAT-1 que podría interaccionar con secuencias activadoras gamma (GAS) que promueve la expresión de proteínas inflamatorias; además, los interferones de tipo I promueven re-modelamiento de cromatina a través de STAT-1 e ISGF3 alterando así el panorama epigenético. Por otro lado se ha reportado que STAT-1 participa en los procesos de diferenciación o polarización de células T y macrófagos (Ivashkiv *et al.*, 2013). En adición, es el único interferón de tipo I que es regulado por hormonas ya que se ha reportado que los niveles más altos de IFNe son más altos en la fase proliferativa del ciclo menstrual y sus niveles de expresión son más bajos en mujeres posmenopáusicas (Fung *et al.*, 2013), lo que podría explicar la incidencia de esta neoplasia en mujeres en edad reproductiva.

Se ha reportado que las defensinas confieren una protección contra microorganismos; además de que se ha visto que pueden funcionar como agentes quimioatrayentes de células dendríticas (Hubert *et al.*, 2007). Además algunos tipos de estas moléculas pueden controlar el ciclo celular dependiendo de las concentraciones que las células epiteliales puedan liberar (Markeeva *et al.*, 2005). Por otro lado, se ha descrito que las defensinas beta pueden interaccionar con el EGFR y , por lo tanto, inducir proliferación celular, además también se ha visto que pueden interaccionar con las metaloproteasas (Tjabringa *et al.*, 2003) , las cuales tienen un papel importante para la degradación de la matriz extracelular y permitir que las células cancerosas puedan migrar e invadir otros órganos. Como se ha mencionado anteriormente, se ha reportado que el número de copias del gen de la DEFBA4 puede estar relacionado con la predisposición al desarrollo de cáncer de cérvix (Abe *et al.*, 2013); sin embargo, la evidencia reportada en la literatura parece reforzar la idea de que la DEFBA4 podría tener un papel en la

carcinogénesis debido a los efectos que han sido reportados en la proliferación celular (Markeeva *et al.*, 2005).

En la literatura se ha reportado que algunos tipos de péptidos antimicrobianos poseen actividad contra virus envueltos; sin embargo, no está bien reportado su efecto en contra de virus no envueltos (Buck,2006), en este trabajo se encontró que no hay una asociación entre la infección con VPH y la expresión de la DEFB4A. Posiblemente al no tener un efecto relacionado con la presencia del VPH debido a que no es un mecanismo apropiado para eliminar dicha infección (Meng *et al.*, 2013). Al igual que en el caso del IFN α , se ha descrito que el TNF α tiene un papel importante en el aumento en la expresión de la DEFB4A (Joly *et al.*, 2005).

El gen de la DEFB4A se encuentra en la región citogenética 8p23.1, la cual es una zona donde se presenta un porcentaje alto de genes con un menor número de copias, es decir hay deleciones en los genes que componen dicha región, (www.progenetix.org) lo que nos podría decir que al existir un menor número de copias de este gen se tiene una mayor propensión al desarrollo de cáncer cervical.

Se ha mencionado anteriormente que el fenómeno de inmunoección tiene como primer paso la eliminación de las células tumorales (Dunn & Schreiber, 2004) y esto se podría corroborar con los efectos que tienen los interferones de tipo I para combatir infecciones virales y ayudar a la polarización de macrófagos y células T a través del transductor de señal STAT-1; sin embargo, se ha reportado que las infecciones virales o microbianas crónicas, en este caso podría ser la infección con VPH, tienen un efecto de inmunosupresión (Ivashkiv *et al.*, 2013).

Las características del microambiente tumoral, como la disminución de oxígeno en tumores sólidos (hipoxia), promueve que exista una alteración del equilibrio entre el sistema inmunológico y las células tumorales. La hipoxia en el tejido es una respuesta inflamatoria no específica y está reportado que aumenta la expresión de defensinas (Nickel *et al.*, 2012), otra característica de la hipoxia es su capacidad para reclutar macrófagos (Murdoch *et al.*, 2005) y las células tumorales son capaces de expresar HIF-1 un factor de transcripción que promueve la angiogénesis, inhibe apoptosis y sobre-expresa factores de crecimiento (Mantovani *et al.*, 2006).

La inflamación juega un papel importante en la carcinogénesis y se le podría considerar como un mecanismo de inmunoeedición ya que las células tumorales por un lado inhiben la respuesta inmunológica al secretar TGF- β el cual es capaz de diferenciar monocitos a macrófagos M2 (Colotta *et al.*, 2009) los cuales son inmunoreguladores y ayudan a la angiogénesis y metástasis (correspondiente a la fase de escape de la inmunoeedición) de las células tumorales (Qian and Pollard, 2010).

Con los resultados de este trabajo, se puede observar que el gen de IFN γ incrementa su expresión durante la progresión de la neoplasia y esto podría indicar su posible uso como marcador molecular. Para saber el papel que juega esta molécula, es necesario realizar un seguimiento a las pacientes y ver si la citocina puede brindar información para un buen o un mal pronóstico; es importante mencionar que el IFN γ puede interaccionar con RIG-1 el cual es un gen supresor de tumores y que se encuentra disminuida su expresión en CaCu (Matsumiya *et al.*, 2007); además, RIG-1 su expresión puede ser inducida por retinoides y éstos últimos actúan de manera sinérgica con la quimioterapia induciendo apoptosis en las células tumorales, teniendo así un mejor pronóstico para las pacientes (Altucci *et al.*, 2001).

Para la DEFB4A la evidencia reportada en la literatura (Wang & Li, 2008) parece indicar que la molécula actúa como un oncogén. Se esperaba que las muestras con CaCu tuvieran la menor expresión del gen o bien que no se expresara; sin embargo, fueron las que más presentaron el gen de la DEFB4A, lo que podría indicar que este gen está teniendo un papel en el CaCu que al aumentar la expresión del gen podría reforzar la idea de actuar como un oncogén; empero, es necesario realizar más trabajo para conocer el papel de esta molécula en el desarrollo de CaCu y las posibles implicaciones que tengan en el pronóstico de las pacientes.

9 CONCLUSIONES

- ❖ El IFNe se propone como un potencial marcador molecular de progresión en CaCu.
- ❖ No existe una asociación entre la infección con el VPH y la expresión de IFNe y DEFB4A a nivel transcripcional.
- ❖ Se sugiere que la DEFB4A actúa como un posible oncogén.
- ❖ Posiblemente la expresión de estas dos moléculas estén participando en procesos de inmunomodulación en tejido transformado.

10 PERSPECTIVAS

- ❖ Para contar con información a nivel de traducción , es decir proteína, se llevarían a cabo experimentos por la técnica de inmunohistoquímica para ambas moléculas.
- ❖ Se propone realizar una PCR específica de metilación para ver los factores epigenéticos de silenciamiento para la DEFB4A con el objetivo de esclarecer el papel que desempeña y la importancia esta molécula en el desarrollo de CaCu.
- ❖ Realizar la detección de ambas moléculas a partir de raspados cervicales con el fin de proponer un método de diagnóstico menos invasivo.

11 BIBLIOGRAFÍA

1. Abe, S., Miura, K., Kinoshita, A., Mishima, H., Miura, S., Yamasaki, K., Hasegawa, Y., Higashijima, A., Jo, O., Sasaki, K., Yoshida, A., Yoshiura, K., Masuzaki, H., 2013. Copy number variation of the antimicrobial-gene, defensin beta 4, is associated with susceptibility to cervical cancer. *J Hum Genet* 58, 250–253.
2. Acladios, N. N., Sutton, C., Mandal, D., Hopkins, R., Zaklama, M., & Kitchener, H., 2002. Persistent human papillomavirus infection and smoking increase risk of failure of treatment of cervical intraepithelial neoplasia (CIN). *International Journal of Cancer*, 98(3), 435-439.
3. Altucci, L., & Gronemeyer, H., 2001. The promise of retinoids to fight against cancer. *Nature Reviews Cancer*, 1(3), 181-193.
4. Amador-Molina, A., Hernández-Valencia, J. F., Lamoyi, E., Contreras-Paredes, A., & Lizano, M., 2013. Role of innate immunity against human papillomavirus (HPV) infections and effect of adjuvants in promoting specific immune response. *Viruses*, 5(11), 2624-2642.
5. Atlas de Histología. (N/A) Facultad de Medicina. UNAM disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/atlas2013A/genitalfem2/images/image089.jpg> [Accesado el 28 de junio dl 2015]
6. Baudis, M., 2008. Progenetix–cytogenetic abnormalities in human cancer. 2000. *Verfügbar unter: www. progenetix. net Zugriffe: Literaturrecherche und Datenentnahme am, 16. Array Map* disponible en: http://arraymap.org/tmp/144294212849387_process/connections.svg [Accesado el 23 de agosto de 2015]
7. Baudis, M., 2012. Progenetix oncogenomic online resource. *Retrieved onpublished at whilst December year, 1111.*
8. Buck, C., Day, P., Thompson, C., Lubkowski, J., Lu, W., Lowy, D., & Schiller, T., 2006. Human β -defensins block papillomavirus infection. *PNAS* 103. 1516–1521.
9. Cancer Research UK, 2015. About cervical cancer. [En línea]. Disponible en: <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/type/cervical-cancer/> [Accesado el 1 de julio del 2015]

10. Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., Mantovani, A., 2009. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 30, 1073–81.
11. Cruz L., Bosques, O., Silveira, M., 2004. Mecanismos moleculares de los cofactores asociados con el cáncer de cuello uterino. *Rev. Cubana de Obstet. Ginecol* 30,(3). [En línea]. disponible en: http://www.bvs.sld.cu/revistas/gin/vol30_3_04/gin07304.htm [Accesado el 1 de julio del 2015]
12. Cheon, H., Borden, E., Stark, G., 2014. Interferons and their stimulated genes in the tumor microenvironment. *Semin. Oncol.* 41, 156–173.
13. DeNardo, D.G., Andreu, P., and Coussens, L.M., 2010. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev.* 29, 309–316.
14. Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D., 2004. The three Es of cancer immunoediting. *Annual Review of Immunology*, 22(4), 329–360.
15. Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D., 2004. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, 21(2), 137–148.
16. Fernández, B. C., Sánchez, a. R., Raposo, C. G., & Castellanos, P. C. (2013). Cáncer de cérvix y endometrio. *Medicine (Spain)*, 11(27), 1649–1658.
17. Fung, K. Y., Mangan, N. E., Cumming, H., Horvat, J. C., Mayall, J. R., Stifter, S. a, Hertzog, P. J., 2013. Interferon-epsilon protects the female reproductive tract from viral and bacterial infection. *Science*, 339(6123), 1088–1092.
18. García, J.-R., Krause, A., Schulz, S., Rodríguez-Jiménez, F.-J., Klüver, E., Adermann, K., Forssmann, U., Frimpong-Boateng, A., Bals, R., Forssmann, W.-G., 2001. Human b-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *The FASEB Journal*.
19. Gallo, R. L., Murakami, M., Ohtake, T., & Zaiou, M., 2002. Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 110(6), 823–831.
20. Ganz, T., 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 710–720.
21. Genecards . [En línea]. Disponible en: <http://www.genecards.org> [Accesado el 1

- de julio del 2015]
22. GENESER, F., 2003. Histología 3a edición. Editorial Medica Panamericana. Buenos Aires. pp. 633-634.
 23. GLOBOCAN, 2012. Cervical Cancer Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. [En línea]. Disponible en: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx [Accesado el 1 de julio del 2015]
 24. González-Navajas, J. M., Lee, J., David, M., & Raz, E., 2012. Immunomodulatory functions of type I interferons. *Nature Reviews Immunology*, 12(2), 125–135.
 25. Gomes, F. G., Nedel, F., Alves, A. M., Nör, J. E., & Tarquinio, S. B. C., 2013. Tumor angiogenesis and lymphangiogenesis: tumor/endothelial crosstalk and cellular/microenvironmental signaling mechanisms. *Life sciences*, 92(2), 101-107.
 26. Grivennikov, S.I., Greten, F.R., and Karin, M., 2010. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140, 883–899.
 27. Hanahan, D., & Weinberg, R., 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674.
 28. Hardy, M. P., Owczarek, C. M., Jermini, L. S., Ejdebäck, M., & Hertzog, P. J., 2004. Characterization of the type I interferon locus and identification of novel genes. *Genomics*, 84(2), 331–345.
 29. Hickey, D. K., Patel, M. V., Fahey, J. V., & Wira, C. R., 2011. Innate and adaptive immunity at mucosal surfaces of the female reproductive tract: Stratification and integration of immune protection against the transmission of sexually transmitted infections. *Journal of Reproductive Immunology*, 88(2), 185–194.
 30. Hollox, E. J., & Armour, J. a L., 2008. Directional and balancing selection in human beta-defensins. *BMC Evolutionary Biology*, 8, 113.
 31. Horne, A. W., Stock, S. J., & King, A. E., 2008. Innate immunity and disorders of the female reproductive tract. *Reproduction (Cambridge, England)*, 135(6), 739–749.
 32. Hubert, P., Herman, L., Maillard, C., Caberg, J.-H., Nikkels, A., Pierard, G., Delvenne, P., 2007. Defensins induce the recruitment of dendritic cells in cervical human papillomavirus-associated (pre)neoplastic lesions formed in vitro and transplanted in vivo. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of*

- American Societies for Experimental Biology, 21(11), 2765–2775.
33. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer , 2009. Cervical Carcinoma and Sexual Behavior: Collaborative Reanalysis of Individual Data on 15,461 Women with Cervical Carcinoma and 29,164 Women without Cervical Carcinoma from 21 Epidemiological Studies. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 18(4), 1060–1069.
 34. Ivashkiv, L. B., & Donlin, L. T. 2014. Regulation of type I interferon responses. *Nature Reviews Immunology*, 14(1), 36-49.
 35. Joly, S., Organ, C. C., Johnson, G. K., McCray, P. B., & Guthmiller, J. M., 2005. Correlation between β -defensin expression and induction profiles in gingival keratinocytes. *Molecular Immunology*, 42(9), 1073–1084.
 36. Jemal A, Bray F, Center MM, 2011. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 61, 69-90.
 37. Kalliolias, G. D., & Ivashkiv, L. B., 2010. Overview of the biology of type I interferons, 12(Suppl 1), S1.
 38. Mantovani, A., Schioppa, T., Porta, C., Allavena, P., & Sica, A., 2006. Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. *Cancer and Metastasis Reviews*, 25(3), 315-322.
 39. Markeeva, N., Lysovskiy, I., Zhuravel, E., Soldatkina, M., Lyzogubov, V., Usenko, V., Pogrebnoy, P., 2005. Involvement of human beta-defensin-2 in proliferation of transformed cells of human cervix. *Experimental Oncology*, 27(4), 308–313.
 40. Matsumiya, T., Prescott, S. M., & Stafforini, D. M. 2007. IFN-epsilon mediates TNF-alpha-induced STAT1 phosphorylation and induction of retinoic acid-inducible gene-I in human cervical cancer cells. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 179(7), 4542–4549.
 41. Mccann, F., Irwin, D. E., Walton, L. a, Hulka, B. S., Morton, J. L., & Axelrad, C. M., 1992. Nicotine and Cotinine in the Cervical Mucus Passive Smokers , and Nonsmokers¹ of Smokers ,. *Prevention*, 1, 125–129.
 42. Meng, W., Du, R., Wang, Y., Chen, Z., & Ding, Y., 2013. Human A -Defensin Messenger RNA is Overexpressed in the Cervical Epithelia of Patients With Nongonococcal Cervicitis. *Journal of Lower Genital Tract Disease*, 17 (4), 7–12.
 43. Moodley, M., Moodley, J., Chetty, R., & Herrington, C. S., 2003. The role of

- steroid contraceptive hormones in the pathogenesis of invasive cervical cancer: A review. *International Journal of Gynecological Cancer*, 13(2), 103–110.
44. Munoz, N., Castellsagué, X., de González, A. B., & Gissmann, L. (2006). HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, 24, S1-S10.
 45. Murdoch, C., Muthana, M., & Lewis, C. E., 2005. Hypoxia regulates macrophage functions in inflammation. *The Journal of Immunology*, 175(10), 6257-6263.
 46. Nakatsuji, T., & Gallo, R. L. (2012). Antimicrobial Peptides: Old Molecules with New Ideas. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(3), 887–895.
 47. Nickel, D., Busch, M., Mayer, D., Hagemann, B., Knoll, V., & Stenger, S., 2012. Hypoxia triggers the expression of human β defensin 2 and antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages. *The Journal of Immunology*, 188(8), 4001-4007.
 48. Ostör, a G., 2000. Early invasive adenocarcinoma of the uterine cervix. *International Journal of Gynecological Pathology: Official Journal of the International Society of Gynecological Pathologists*, 19(1), 29–38.
 49. Peng G, Lei KJ, Jin W, Greenwell-Wild T, Wahl SM, 2006. Induction of APOBEC3 family proteins, a defensive maneuver underlying interferon-induced anti-HIV-1 activity. *J. Exp. Med.*, 203(1):41–6.
 50. Peng, F. W., Duan, Z. J., Zheng, L. S., Xie, Z. P., Gao, H. C., Zhang, H., & Hou, Y. D., 2007. Purification of recombinant human interferon- ϵ and oligonucleotide microarray analysis of interferon- ϵ -regulated genes. *Protein expression and purification*, 53(2), 356-362.
 51. Pestka, S., Krause, C.D. & Walter, M.R., 2004. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol. Rev.* 202, 8–32.
 52. Qian, B.Z., and Pollard, J.W., 2010. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141, 39–51.
 53. Salcedo, M., et al., 2014. Human Papillomavirus Genotypes among Females in Mexico: a Study from the Mexican Institute for Social Security, *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 15 (23), 10061-10066.
 54. Sambrook, J., Russell, DW., 2001. *Molecular cloning. A laboratory manual* Vol. 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

55. Tjabringa GS, Aarbiou J, Ninaber DK, Drijfhout JW, Sorensen OE, Borregaard N, Rabe KF, Hiemstra PS., 2003. The antimicrobial antimicrobial peptide LL-37 activates innate immunity at the airway epithelial surface by transactivation of the epidermal growth factor receptor. *J Immunol.*, 171: 6690–6696.
56. Uze, G., Schreiber, G., Piehler, J. & Pellegrini, S., 2007. The receptor of the type I interferon family. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 316, 71–95.
57. Wang, X., & Lin, Y., 2008. Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes? *Acta Pharmacologica Sinica*, 29(11), 1275–1288.
58. World Health Organization, 2013. WHO guidelines for screening and treatment of precancerous lesions for cervical cancer prevention. [En línea] Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/94830/1/9789241548694_eng.pdf
[Accesado el 14 de noviembre del 2015]
59. Wiebe, E., Denny, L., & Thomas, G., 2012. Cancer of the cervix uteri. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 119, S100–S109.
60. Wijesundara, D. K., Xi, Y., & Ranasinghe, C., 2014. Unraveling the Convolved Biological Roles of Type I Interferons in Infection and Immunity: A Way Forward for Therapeutics and Vaccine Design. *Frontiers in Immunology*, 5(August), 1–7.
61. Zur Hausen, H., 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Reviews. Cancer*, 2(5), 342–350.