



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas  
Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI  
Laboratorio de Inmunología y Cáncer

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA hMENA  
Y SU ASOCIACIÓN CON LA PROLIFERACIÓN Y  
MOVILIDAD CELULAR EN LÍNEAS CELULARES DE  
CÁNCER CÉRVICO-UTERINO (CaCu).**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**BIÓLOGO**

Presenta:

**Juan Pablo Pacheco González**

**Director de Tesis:**

Dr. Alberto Monroy García

**Asesor Interno:**

Dra. María de Lourdes Mora García

México, D.F. - Junio, 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.

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Inmunología y Cáncer, de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas (UIMEO), Hospital Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS; en colaboración con el laboratorio de Inmunología y Cáncer, de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

La investigación realizada fue llevada a cabo bajo la tutoría principal del Dr. Alberto Monroy García y la dirección tutorial de la Dra. María de Lourdes Mora García, gracias al financiamiento del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (DGAPA-PAPIIT) de la UNAM, clave del proyecto IN226516 y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), clave del proyecto 240635, registro FIS-IMSS-1383.

## **AGRADECIMIENTOS**

A cada uno de los profesores de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM por enriquecer mi formación académica, haciendo que con sus conocimientos, experiencias y consejos fuera un mejor estudiante y persona.

Al Dr. Alberto Monroy García por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por brindarme su apoyo, confianza y paciencia, por enriquecer con sus enseñanzas mi desarrollo profesional. Muchas Gracias.

A la Dra. María de Lourdes Mora García por permitir desempeñar mi trabajo en su laboratorio, por el apoyo y asesoría brindada para el desarrollo de mis proyectos.

Al Dr. Héctor Mayani Viveros, al Dr. Juan José Montesinos Montesinos y la Dra. Patricia Piña Sánchez por proporcionarme el material y equipo necesario para realizar mis experimentos.

A los miembros del jurado integrado por el M. en C. José Misael Vicente Hernández Vázquez, al Dr. Alberto Monroy García, a la Dra. María de Lourdes Mora García, al Dr. Edgar Ledesma Martínez y la M. en C. Itzen Aguiñiga Sánchez quienes por sus valiosas aportaciones, observaciones y sugerencias, permitieron enriquecer mi trabajo.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

A mi mamá Laura González de la Rosa por el apoyo que me ha brindado a lo largo de mi vida, por sus cuidados, por sus desvelos, por sus sacrificios, por estar conmigo cuando más lo he necesitado y por siempre darme todo sin esperar nada a cambio. Eres mi orgullo y mi inspiración. Te amo mucho.

A mis hermanos Christian Pacheco, Maribel Pacheco y Eduardo Pacheco ya que me han ofrecido su apoyo, compañía y amistad en los momentos más importantes de mi vida, gracias por las experiencias, los consejos y el cariño que me han brindado, los quiero mucho.

A mi tía Silvia González de la Rosa por el amor que nos ha mostrado a lo largo de los años, por estar en los momentos difíciles y siempre ofrecernos días en familia llenos de alegría.

A mi padre Raúl Pacheco Loperena por el apoyo que me brindó para poder salir adelante, por esos consejos y orientación que me permitieron ser mejor persona.

A los miembros del laboratorio de Inmunología y Cáncer del UMIEO, Centro Médico Nacional SXXI, así como a los miembros del laboratorio de Inmunología y Cáncer de la UMIEZ, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, por el apoyo que me brindaron en la realización de mi trabajo de tesis, en especial a la Dra. Rosario García Rocha y a la TLC. María del Carmen Fuentes Castañeda que me guiaron y ayudaron en la elaboración de mis experimentos. También agradezco a la Biol. Gabriela Molina Castillo que gracias a su apoyo y orientación me permitieron desarrollar mi trabajo de servicio social.

Al Dr. Edelmiro Santiago Osorio, a la M. en C. Itzen Aguiñiga Sánchez y a los miembros del laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia de la UMIEZ, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM por haberme apoyado en el inicio de mi carrera, permitiéndome progresar como estudiante e investigador.

Al Biol. Francisco Hernández Cervantes y a la Biol. Viridiana Enríquez González por ser parte importante en mi formación académica, por darme la motivación de seguir adelante y creer en mí mismo, agradezco su apoyo y que compartieran parte de su conocimiento conmigo. De la misma manera, agradezco a mis compañeros de equipo, la Biol. Jessica Delgadillo Gamboa y el Biol. Omar Guzmán Urieta por los proyectos desarrollados en el laboratorio de investigación, por enseñarme el valor del trabajo en equipo y por los momentos divertidos que hicieron agradable mi estancia en la carrera.

A mis amigos Alejandro Briones Peña, Hugo Campos Cabrera, Julio Pérez Juárez, Gerardo Nolasco Ángeles y Ernesto Pineda Alfaro por los momentos memorables y experiencias divertidas que han compartido a mi lado, porque son personas valiosas de las cuales estoy feliz de haber conocido.

A la empresa Estudios y Análisis Ambientales S.A. de C.V. por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo y poder aplicar mis conocimientos en el mejoramiento y crecimiento de la misma; de igual manera, agradezco al QFB. Héctor Hernández Hernández por compartir su conocimiento, por sus consejos y por ayudarme a ser un mejor profesionalista.

De manera especial quiero agradecer a Samara Torres Avila por compartir parte de su vida a mi lado, por apoyarme en los momentos difíciles, estar conmigo cuando más lo he necesitado, por llenar de alegría mis días, por los consejos, las palabras de aliento, gracias por llenar mi mundo de colores, la vida toma otro significado cuando estoy a tu lado. ¡Te amo Babitas!

## DEDICATORIA

*Por los que ya no están,  
por los que luchan cada día,  
por los que han ganado la batalla.*

# ÍNDICE

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	1
<b>ABREVIATURAS</b> .....	2
<b>RESUMEN</b> .....	3
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	5
1.1 Cáncer .....	5
1.2 Cáncer Cérvico-Uterino .....	6
1.3 Virus del Papiloma Humano .....	8
1.4 Diagnóstico de Lesiones de Cuello Uterino y VPH .....	11
1.5 Biomarcadores para el Diagnóstico de CaCu .....	12
1.6 Proteína hMENA .....	15
<b>2. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA</b> .....	18
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	19
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	20
<b>5. OBJETIVO GENERAL</b> .....	21
<b>6. OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	21
<b>7. MATERIAL Y MÉTODO</b> .....	22
7.1 Líneas Celulares .....	22
7.2 Expresión de hMENA por Inmunohistoquímica .....	22
7.3 Expresión de la proteína hMENA por Citometría de Flujo .....	23
7.4 Migración Celular <i>In Vitro</i> “Scratch” .....	24
7.5 Ensayo de Proliferación Celular (MTS).....	25
7.6 Análisis Estadístico .....	25



<b>8. RESULTADOS</b> .....	26
8.1 Expresión de la proteína hMENA es mayor en líneas celulares negativas a VPH con respecto a las líneas positivas a VPH .....	26
8.2 Las líneas celulares positivas a VPH presentan una mayor actividad proliferativa que las líneas celulares negativas a VPH .....	29
8.3 Las líneas celulares positivas a VPH mostraron una mayor velocidad de migración que aquellas líneas negativas a VPH .....	31
<b>9. ANÁLISIS DE RESULTADOS</b> .....	34
<b>10. CONCLUSIONES</b> .....	39
<b>11. PERSPECTIVAS</b> .....	40
<b>12. LITERATURA CITADA</b> .....	41
<b>13. ANEXOS</b> .....	49

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Tasa de incidencia y mortalidad estimada en diferentes tipos de cáncer en la población mundial femenina .....	7
<b>Figura 2.</b> Estructura y organización del VPH .....	9
<b>Figura 3.</b> hMENA es una proteína reguladora del citoesqueleto implicada en la regulación de la motilidad y adhesión celular .....	16
<b>Figura 4.</b> Expresión cualitativa de la proteína hMENA en diferentes líneas celulares .....	27
<b>Figura 5.</b> Análisis cuantitativo de la expresión de hMENA en líneas celulares de CaCu .....	28
<b>Figura 6.</b> Análisis cuantitativo de la expresión de la proteína hMENA en las líneas celulares HeLa, CaSki, HaCaT y C33A.....	29
<b>Figura 7.</b> Proliferación de las líneas celulares HeLa, CaSki, HaCaT y C33A .....	30
<b>Figura 8.</b> Capacidad migratoria de las líneas celulares HeLa, CaSki, HaCaT y C33A.....	32
<b>Figura 9.</b> Velocidad de migración de las líneas celulares HeLa, CaSki, HaCaT y C33A .....	33
<b>Figura 10.</b> Análisis por Western Blot de lisados de líneas celulares de cáncer pulmonar .....	36

## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>ARP</b>	Proteínas Relacionadas con la Actina*
<b>CaCu</b>	Cáncer Cérvico-Uterino
<b>CC1</b>	Solución Celular Acondicionada*
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de Carbono
<b>ELISA</b>	Ensayo por Inmuno-adsorción Ligado a Enzimas*
<b>ESRP</b>	Proteína Reguladora de Empalme Epitelial*
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína*
<b>h</b>	Horas
<b>INEGI</b>	Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática
<b>IMF</b>	Intensidad Media de Fluorescencia
<b>IARC</b>	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer*
<b>IMDM</b>	Medio de Dulbecco modificado de Iscove*
<b>ME</b>	Microscopia Electrónica
<b>ml</b>	Mililitro
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>hMENA</b>	Ortólogo Humano Habilitado en Mamíferos*
<b>pb</b>	Pares de Bases
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de Hidrógeno
<b>PBS</b>	Solución Buffer de Fosfatos*
<b>LCR</b>	Región Larga de Control*
<b>RPMI</b>	Medio Conmemorativo al Instituto Roswell Park*
<b>SFB</b>	Suero Fetal Bovino
<b>SH</b>	Suero Humano
<b>VPH</b>	Virus Papiloma Humano
<b>µg</b>	Microgramo
<b>µl</b>	Microlitro

\* por sus siglas en inglés.

## RESUMEN

El Cáncer Cérvico-Uterino (CaCu) es una de las principales causas de muerte en las mujeres de todo el mundo. En México, se estimó una incidencia de 12,000 nuevos casos y 6,000 muertes por este padecimiento, lo que representa un problema importante de salud pública. La infección por Virus de Papiloma Humano (VPH) de alto riesgo, desempeña un papel importante en la progresión e invasividad del CaCu; sin embargo, poco se sabe acerca de la expresión de las proteínas implicadas en la invasión y metástasis en CaCu. La proteína reguladora de actina hMENA, que pertenece a la familia ENA/VASP, desempeña un papel clave en la adhesión y motilidad celular en el cáncer. De hecho, esta proteína se sobreexpresa en lesiones preneoplásicas de alto riesgo y en cáncer de mama, cerebro, colon y pulmón, mientras que su expresión en CaCu aún no ha sido esclarecida.

El objetivo de este estudio fue analizar la expresión de la proteína hMENA y su posible relación con la proliferación y migración en CaCu. Para este propósito, la expresión de la proteína hMENA se analizó por inmunocitoquímica y citometría de flujo en las líneas celulares de CaCu HeLa (HPV-18+), CaSki (HPV-16+) y C33A (VPH-), así como en la línea de queratinocitos HaCaT (VPH-), mediante el uso de un anticuerpo monoclonal Pan-hMENA. La proliferación celular se determinó mediante un ensayo colorimétrico (MTS); y la migración celular, mediante la técnica de rasgado en los cultivos celulares.

Las líneas celulares C33A y HaCaT mostraron la expresión más intensa de hMENA en la superficie celular, la cual se asoció con un aumento en la proliferación celular respecto a HeLa y CaSki. Sin embargo, las células CaSki y HeLa mostraron una mayor capacidad de migración que C33A y HaCaT. Teniendo en cuenta que se han identificado al menos dos isoformas de hMENA, con función diferencial en la migración celular, será importante identificar la expresión específica de las isoformas de hMENA en las líneas celulares de cáncer de cuello uterino, así como, su asociación con la presencia de VPH de alto riesgo en estudios posteriores.

## **ABSTRACT**

Cervical cancer (CC) is one of the leading causes of death in women worldwide. In Mexico it has been recently reported an incidence of 12,000 new cases and 6,000 deaths from this disease, resulting in a major public health problem. Infection with high risk Human Papilloma Virus (HPV) plays an important role in the progression and invasiveness of CC, however little is known about the expression of proteins involved in the invasion and metastasis in CC. The Human Mena (hMENA), an actin regulatory protein of the ENA/VASP family, plays a key role in cancer cell adhesion and motility. In fact, this protein is overexpressed in high-risk preneoplastic lesions and cancer of breast, brain, colorectal and lung, while its expression in CC, remains to be elucidated.

The aim of this study was to analyze the expression of hMENA protein and its possible relationship with the proliferation and migration on CC. For this purpose, the expression of hMENA protein was analyzed by immunocytochemical and flow cytometry on the CC cell lines HeLa (HPV-18+), CaSki (HPV-16+) and C33A (HPV-), as well as in the queratinocyte cell line HaCaT (HPV-), by using a Pan-hMENA monoclonal antibody. Cell proliferation was determined by colorimetric assay (MTS); and cell migration, by "scratch" technique on the cell cultures.

C33A and HaCaT cell lines, showed the most intensive expression of hMENA on cell surface, which was associated with an increased cell proliferation related to HeLa and CaSki cell lines. However, CaSki and HeLa cells showed a higher cell migration capacity than C33A and HaCat cells. Taking into consideration that it have been identified several hMENA isoforms, with differential function in cell migration. It will be important to identify the specific expression of the hMENA isoforms in the CC cell lines, as well as, their association with the presence of high risk HPV in further studies.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Cáncer

El cáncer es un grupo amplio y heterogéneo de enfermedades, provocado por diversos cambios en la conducta de las células que se originan por alteraciones en la información genética, debido a lo cual proliferan sin control formando tumores malignos que tienden a crecer de manera invasiva, destruyendo tejidos y órganos normales (Carrero, 2012; Karp, 2006), convirtiéndose en un problema creciente de salud pública a nivel mundial.

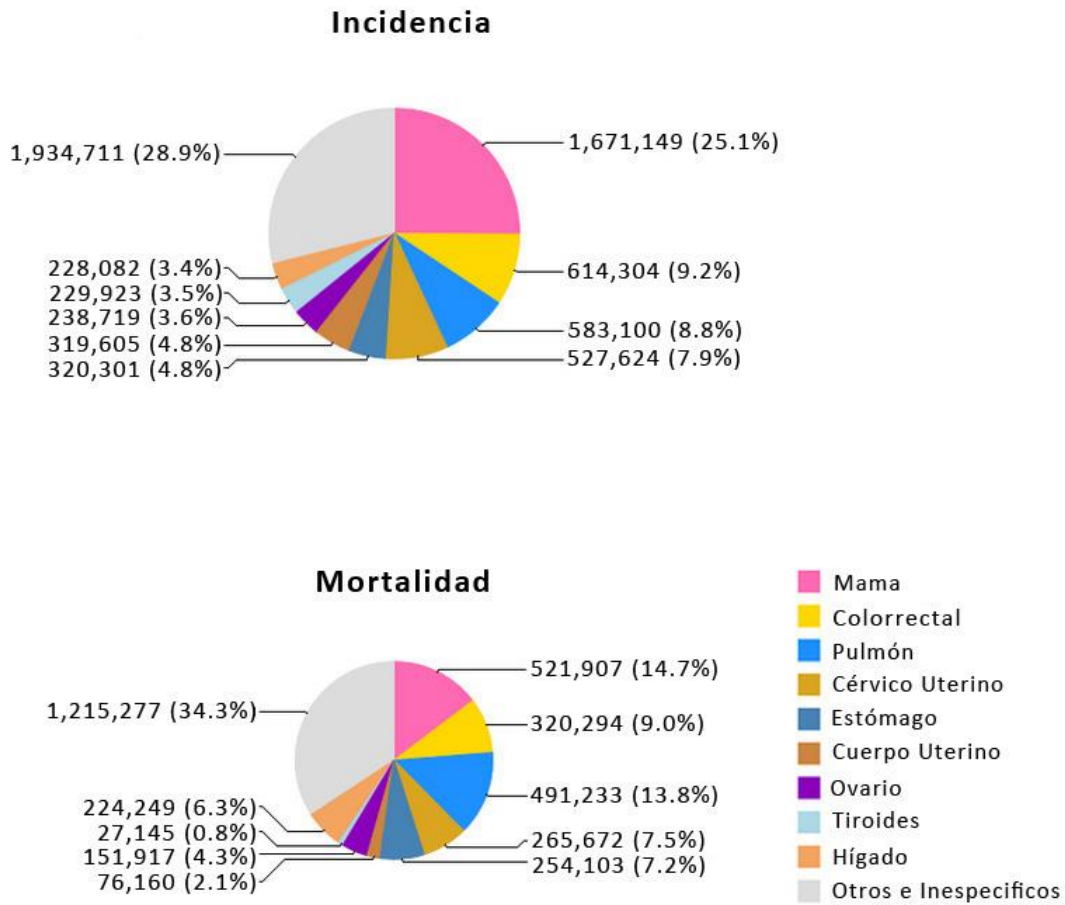
Las causas que provocan tales cambios en las células se deben a la acumulación de alteraciones genéticas inducidas por agentes físicos, químicos o biológicos (Karp, 2006; Yocota, 2000), tales como: radiación ultravioleta, emisiones radioactivas, exposición a compuestos químicos cancerígenos, daños en el sistema inmune, desequilibrio endocrino, infecciones recurrentes con organismos patógenos y condiciones fisiológicas del organismo (Weinberg, 1996).

En el 2012, se registraron 14.1 millones de casos nuevos por cáncer y una mortalidad de 8.2 millones de personas en el mundo. Más del 65% (5.3 millones) de las muertes generadas por el cáncer se registraron en países menos desarrollados, siendo el cáncer de pulmón, próstata, colon y estómago los más frecuentes en hombres, mientras que en mujeres destacan el cáncer de mama, colon, pulmón y cérvico-uterino (Globocan, IARC. 2012). En México, el cáncer es la tercera causa de muerte, y aunque muchos son tratables a tiempo, solo el 40% se detectan en etapas oportunas (Alanis, 2015).

A pesar de las mejoras en el tratamiento de varios cánceres comunes, los avances por erradicar estas enfermedades siguen en aumento debido a la falta de prevención e ineficacia en los métodos de diagnóstico, por lo que es necesario seguir estudiando la evolución y mecanismos de las diferentes enfermedades para un mejor tratamiento.

## **1.2 Cáncer Cérvico-Uterino**

En 2012, el cáncer Cérvico-Uterino o Carcinoma de Cuello Uterino (CaCu) constituyó el 30% de los tumores malignos a nivel mundial con más de 527,624 (7.9%) nuevos casos y más de 265,653 (7.5%) muertes al año, convirtiéndose en la cuarta causa de muerte por cáncer en el mundo (Figura 1) (Globocan, IARC. 2012; OMS, 2014). En México, el CaCu ocupa el segundo lugar en morbilidad con un 16.7% de todos los casos de cáncer, y una incidencia de muerte de 13.43 por cada 100 mil habitantes, siendo el grupo más afectado entre los 40 y 59 años de edad (representando el 48% de las pacientes con tumores malignos) (INEGI, 2014). Sin embargo, cada vez es más común ver a las mujeres, cuyas edades oscilan entre los 20 y 30 años, ser diagnosticadas con CaCu (4.1%) (Globocan, IARC. 2012), lo que representa un problema de salud pública muy importante a nivel nacional.



**Figura 1. Tasa de incidencia y mortalidad estimada en diferentes tipos de cáncer en la población mundial femenina (Tomado de Globocan, IARC. 2012).**

El CaCu es una enfermedad que afecta a las mujeres, ocasionada por mutaciones en el ADN de las células somáticas del cuello uterino, caracterizadas por un crecimiento anormal acelerado, pérdida de la diferenciación celular, potencial replicativo ilimitado, aumento en la invasividad y supervivencia celular prolongada (Park & Lee, 2006). Esta patología se origina en el epitelio escamoso estratificado del cuello uterino, y se manifiesta a través de lesiones microscópicas de lenta y progresiva evolución, que pueden avanzar en etapas de displasia leve, moderada y severa. Finalmente, la lesión clínica puede llegar a evolucionar a cáncer *in situ*,



caracterizada por la aparición de tumores visibles limitados en la superficie epitelial y/o cáncer invasor, cuando esta sobrepasa la membrana basal (Franco, 2008).

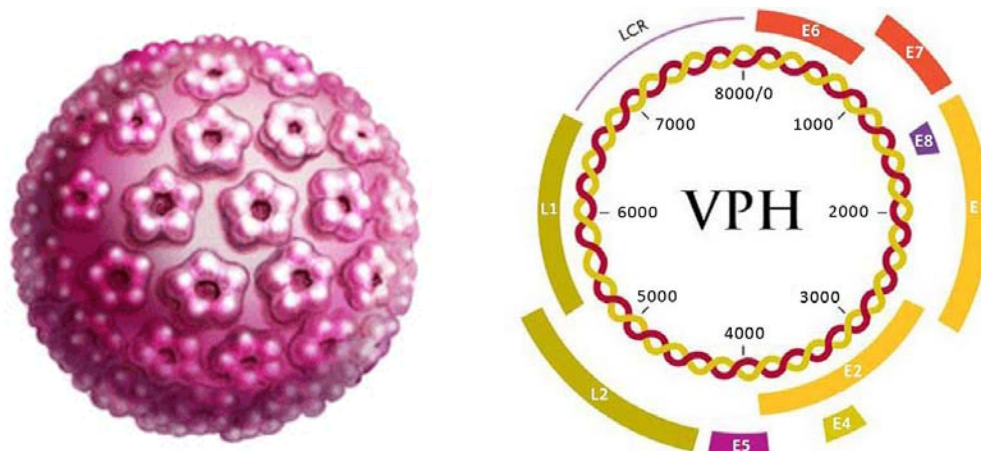
En México se han realizado diversos estudios sobre CaCu, algunos de tipo descriptivo y otros de casos y controles. Estos últimos se han enfocado al estudio de los factores de riesgo asociados a CaCu o a las lesiones premalignas (Tirado *et al.*, 2005). Entre los diferentes factores de riesgo para el desarrollo del CaCu, se encuentran: un nivel socioeconómico bajo, el inicio temprano de la vida sexual, el antecedente de haber tenido dos o más parejas sexuales, elevado número de partos, edad temprana del primer embarazo, el uso de anticonceptivos hormonales, el tabaquismo, y la infección persistente por Virus del Papiloma Humano (Chavez *et al.*, 2008; Atalah *et al.*, 2001; Olmos, 2001). Actualmente, se ha observado que el 99.7% de los cánceres cérvico-uterinos están relacionados con la infección por Virus del Papiloma Humano (Tirado *et al.*, 2005; Clifford *et al.*, 2003).

### **1.3 Virus del Papiloma Humano**

El Virus del Papiloma Humano (VPH) es un grupo de virus de ADN perteneciente a la familia de los *Papillomaviridae* que afectan la mucosa y epitelio cutáneo de los mamíferos causando lesiones benignas hiperproliferativas (papilomas, verrugas y condilomas) (Castellanos, 2006) y, que a su vez, pueden generar lesiones en el útero o matriz favoreciendo el desarrollo de neoplasias (Tirado *et al.*, 2005).

La partícula viral está conformada por 72 capsómeros (60 hexámeros y 12 pentámeros), con un diámetro aproximado de 55 nm (Casas, 2010); contiene un ADN circular de doble cadena, sin envoltura, cuyo genoma está constituido por 8,000 pares de bases (pb) aproximadamente (Figura 2) (Santin *et al.*, 2005).

El genoma está funcionalmente dividido en 3 regiones: una región de expresión temprana E (Early), la cual codifica para las proteínas virales (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) necesarias para la replicación del ADN viral, la regulación de la transcripción y la transformación e inmortalización de la célula huésped; una región de expresión tardía L (Late), que codifica para las proteínas estructurales de la cápside (L1 y L2) y una región reguladora conocida como región larga de control LCR (Long Control Region), que contiene la secuencia de ADN que permiten el control de la replicación y de la expresión del genoma viral (McMurray *et al.*, 2001).



**Figura 2. Estructura y organización del VPH, donde se muestran las regiones y principales proteínas del genoma viral (Tomado de López & Lizano, 2006).**

En la patogénesis del cáncer cérvico-uterino, la infección por VPH juega un papel importante en el desarrollo, ya que condiciona la pérdida de las funciones de algunas vías de regulación celular (Carrero, 2012). El VPH, tras penetrar en la célula a través de la membrana plasmática por endocitosis, se ubica en el citoplasma interrumpiendo la síntesis de proteínas, siendo capaz de utilizar macromoléculas y energía de la célula huésped (Muñoz, 2003).

Tras un periodo largo de persistencia de la infección, las partículas del ADN viral que se encuentran de manera episomal, sufren un proceso de integración dentro del genoma celular conduciendo a un bloqueo de proteínas funcionales del ciclo celular como p53 (encargada de la reparación del ADN y la inducción de apoptosis cuando fallan los mecanismos de reparación) y Rb (proteína supresora de tumor), provocando que las señales de transducción reguladas por estas proteínas se vean afectadas, generando alteraciones en el crecimiento normal y diferenciación de la célula infectada, dando inicio a una lesión intraepitelial y posteriormente, originar un proceso neoplásico (Carrero, 2012; Rincón *et al.*, 2007; Archibal *et al.*, 1997).

La familia de los VPH cuenta con más de 180 tipos virales identificados que, en relación a su patogenia oncológica, se clasifican en cepas de alto y de bajo riesgo, según el grado de transformación maligna que ocasiona en la célula infectada (Bosch *et al.*, 2006). Entre los tipos de VPH de bajo riesgo se encuentran el 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 y 81, que pueden causar cambios leves en el cuello del útero de la mujer, sin embargo, no son perjudiciales y se revierten espontáneamente en individuos inmunocompetentes (Burd, 2003; Torres, 2015). Mientras que los tipos de VPH 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82 son considerados de alto riesgo debido a que son más frecuentes en tumores genitales, específicamente el 16 y 18 que son tres veces más frecuentes en los casos de cáncer epitelial escamoso (Sehr *et al.*, 2013).

El tiempo de evolución a carcinoma invasor, a partir de una lesión inicial, puede durar hasta 20 años (dependiendo del tipo de cepa infectante, factores genéticos, hormonales, la inmunidad del huésped y la carga viral) y no todas las mujeres que presentan las lesiones precursoras desarrollan la forma invasora de esta enfermedad (Cordero *et al.*, 2015; Torres, 2015).

#### **1.4 Diagnóstico de Lesiones de Cuello Uterino y VPH**

La experiencia de los países desarrollados ha permitido demostrar que la mejor opción para disminuir la mortalidad por CaCu es la detección y el tratamiento adecuado de lesiones precursoras y lesiones malignas por medio de programas de detección oportuna. El CaCu es absolutamente prevenible y su tratamiento es relativamente fácil, cuando el diagnóstico es adecuado (Hidalgo, 2006).

El diagnóstico para la identificación del VPH en lesiones de pacientes o muestras biológicas, se dificulta al carecer de pruebas serológicas, así como la falta de crecimiento del virus en cultivos celulares. El hallazgo clínico de verrugas o lesiones visualizadas por cambios citológicos o histopatológicos, son las herramientas empleadas en el diagnóstico de la infección por VPH (Velásquez *et al.*, 2002). Las técnicas de diagnóstico habituales están basadas en el estudio de características morfológicas del núcleo, citoplasma y relación núcleo-citoplasma de las células que son tomadas del cérvix y fondo del saco vaginal. Estos métodos tratan de analizar la diferenciación escamosa de las células cervicales y los cambios morfológicos que ocurren en éstas cuando hay patologías (Dzul *et al.*, 2004).

Históricamente, la prueba de elección para el diagnóstico de lesiones preinvasivas ha sido la citología exfoliativa con tinción de Papanicolaou, considerado un método efectivo para la detección oportuna de CaCu (Carrero, 2012). El objetivo de esta prueba consiste en determinar el grado de diferenciación de las células del cuello uterino que son precursoras del cáncer, mediante la aplicación de colorantes alcohólicos que tiñen de forma diferencial cada tipo celular de la muestra, permitiendo generar tratamientos eficaces antes de que empiece el desarrollo de neoplasias en el epitelio cervical (LaCruz *et al.*, 2003). Otra de las técnicas implementadas es la colposcopia, la cual examina el cérvix a través de un microscopio, observando detalles del epitelio y vasos sanguíneos, permitiendo

identificar cualquier lesión en el epitelio cervical y emitir un diagnóstico con cierto grado de certeza (Dzul *et al.*, 2004).

Tanto la citología como la colposcopia han logrado reducir la mortalidad mediante la detección en etapas tempranas, ya que resultan ser técnicas de bajo costo, cuyos recursos materiales son fáciles de obtener y no requiere de una gran infraestructura (Dasari *et al.*, 2015). A pesar de estos éxitos, el campo de la detección ha estado plagado de problemas que dificultan el identificar la lesión; éstas son su sensibilidad, su baja especificidad, errores en la calidad de las muestras así como errores en la interpretación de las mismas, lo que provoca falsos negativos llevando a diagnósticos erróneos (Gullota *et al.*, 1997). La citología y la colposcopia no son un método de diagnóstico definitivo, son una importante herramienta en el estudio de mujeres con resultados de citología anormal, ya que por medio de estas técnicas se verifica la presencia de una lesión, se determina su topografía, extensión y severidad, y permite tomar una biopsia dirigida; sin embargo, el diagnóstico final y requisito indispensable para aplicar un proceso terapéutico es el histopatológico (Massad *et al.*, 2003). Por lo tanto, el uso exitoso de estas técnicas dependerá de la realización de múltiples pruebas para cada caso (Killeen *et al.*, 2014).

### **1.5 Biomarcadores para el diagnóstico del CaCu**

El diagnóstico del cáncer dentro de las primeras etapas de la progresión de la enfermedad se asocia generalmente con una mejor respuesta al tratamiento y eventualmente resulta en una mejora de la supervivencia de los pacientes (Zavesky *et al.*, 2015). Recientemente, la identificación de biomarcadores moleculares ha permitido comprender de una manera más completa el desarrollo de distintos

tipos de cáncer, ayudando a generar nuevas terapias así como tratamientos de diagnóstico más eficientes.

Un biomarcador es un indicador de los procesos patogénicos normales o una respuesta farmacológica a una intervención terapéutica. El objetivo principal del desarrollo de biomarcadores no sólo se centra en terapias mejoradas, sino también en la mejora de los métodos para determinar la evaluación del riesgo de un individuo en el desarrollo del cáncer, así como para detectar los cánceres en etapas tempranas, cuando pueden ser tratados de manera más efectiva (Wang *et al.*, 2003).

El evento patológico principal implicado en la carcinogénesis cervical es la integración del ADN viral en el ADN cromosómico del huésped que inicia con la formación de células preneoplásicas con expresión desregulada de oncogenes virales conduciendo a carcinoma invasivo del cuello uterino. Por lo tanto, los ensayos basados en ADN pueden ser diseñados y aplicados para demostrar la presencia del ADN responsable del cáncer de cérvico-uterino (Wentzensen *et al.*, 2005). El ADN de VPH es el único marcador molecular desarrollado para el diagnóstico de cáncer cervical. Las anomalías moleculares tales como aberraciones cromosómicas, mutaciones en el ADN, marcadores de apoptosis, regulación epigenética, la expresión de oncogenes y genes supresores tumorales pueden ser evaluados como biomarcadores en función de su utilidad clínica (Syrjanen *et al.*, 2005).

Con los recientes avances en las técnicas moleculares, se ha vuelto más fácil de detectar la presencia de ADN de VPH mucho antes de la aparición de cualquier lesión, siendo de gran utilidad para la investigación y el diagnóstico clínico (Wick, 2000). Actualmente, se disponen de métodos con una especificidad superior a las técnicas histológicas clásicas, como técnicas inmunohistoquímicas para detección

de antígenos, la localización de las partículas víricas por microscopía electrónica (ME) y la captura de híbridos para la detección de distintos tipos de VPH en muestras clínicas, que han sido utilizadas en la localización de la infección viral en personas que carecen de sensibilidad en la ubicación de infecciones subclínicas y latentes (Martínez, 2010; Dzul *et al.*, 2004). Sin embargo, la desventaja principal de estas técnicas es la inespecificidad, ya que una prueba positiva no indica el genotipo específico de VPH ni el tipo de lesión; además, se requiere de estricto control de calidad, estandarización precisa y manejo adecuado para evitar reacciones inespecíficas que produzcan diagnósticos erróneos (Dzul *et al.*, 2004).

Aun con las actuales técnicas de diagnóstico, los pacientes con enfermedad progresiva tienen pobres resultados clínicos, estimando una tasa de supervivencia a cinco años del 65%, mientras que la tasa cae a 10% o menos en los pacientes con enfermedad avanzada (Jemal *et al.*, 2007), por lo que muchos estudios se han centrado en la expresión de genes implicados en la invasión y metástasis, con el fin de determinar la evolución de la enfermedad, porque no es el tumor primario, sino la invasión y metástasis en sitios distantes la causa principal de morbilidad y mortalidad (Toyoda *et al.*, 2011).

Los biomarcadores de proteínas podrían facilitar la detección temprana de la enfermedad en una fase curable, y ayudar a distinguir subgrupos de pacientes que responden bien a ciertos tipos de tratamientos con respecto de aquellos que no responden al tratamiento (Dasari *et al.*, 2014).

Los diversos estudios en la historia natural del cáncer cérvico-uterino pretenden definir los factores de riesgo y los biomarcadores, para que de alguna manera indiquen el comportamiento de progresión en una lesión premaligna. Los hallazgos al respecto repercutirán en un diagnóstico temprano y tratamiento oportuno de las lesiones precursoras de cáncer cérvico uterino (Lizano *et al.*, 2009).

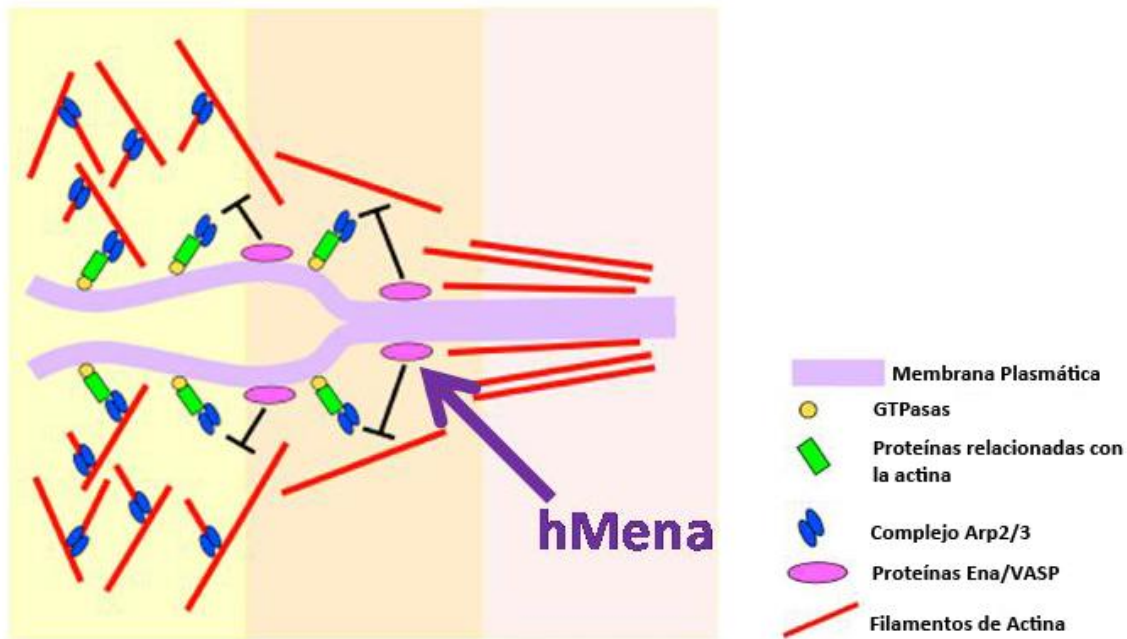
## 1.6 Proteína hMENA

Cuando una célula cancerígena invade otros tejidos, múltiples pasos están involucrados: disociación del tumor primario, invasión de estroma circundante e intravasación en el sistema vascular. Durante estos pasos, células de carcinoma invasivo adquieren un fenotipo migratorio asociado con el aumento de expresión de varios genes que regulan la polimerización de actina, que también son necesarios para los procesos de migración celular en células normales, la morfogénesis embrionaria, la curación de heridas y el tráfico de células inmunes (Toyoda *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2005; Friedl and Wolf, 2003). Por lo tanto, es crítico para la comprensión de la invasión y la metástasis del cáncer analizar la expresión de genes que regulan la polimerización de actina.

La migración celular implica un cambio en la morfología celular debido a una reordenación dinámica del citoesqueleto de actina. En los últimos años, las proteínas de actina asociadas han sido estudiadas más a detalle, en relación con la migración celular, así como la invasión de células tumorales (Toyoda *et al.*, 2009). Actualmente, la sobreexpresión del ortólogo humano habilitado en mamíferos (hMENA) ha sido fuertemente asociada a la carcinogénesis humana. La proteína humana MENA es miembro de la familia de las proteínas Ena/VASP en mamíferos, que incluye Mena, VASP y Evl (Di Modugno *et al.*, 2010).

La proteína hMENA es una molécula moduladora de los filamentos de actina, que juegan un papel importante en la vinculación de las vías de señalización para la remodelación de la estructura del citoesqueleto, incluyendo la formación de lamelipodios y filopodios que conducen a la motilidad, adhesión y migración celular, cuyos procesos se ven desregulados después de la transformación neoplásica (Figura 3) (Bria *et al.*, 2014; Di Modugno *et al.*, 2010; Dong *et al.*, 2011).





**Figura 3. hMENA es una proteína reguladora del citoesqueleto implicada en la regulación de la motilidad y adhesión celular.** (Tomado de Di Modugno *et al.*, 2006).

La proteína hMENA se ha identificado como un regulador de la invasividad en las células y el potencial metastásico de acuerdo a la expresión de dos isoformas de empalme alternativos: hMENA11a y hMENA $\Delta$ v6, que han demostrado tener funciones reguladoras opuestas, con hMENA11a que actúa para suprimir la invasión de células de cáncer y hMENA $\Delta$ v6 estimulando el fenotipo invasivo (Di Modugno *et al.*, 2012; Bria *et al.*, 2014; Pino *et al.*, 2008). Estudios recientes indican que hMENA está controlada por las proteínas reguladoras de empalme epitelial (ESRP 1/2), involucradas en el mantenimiento de isoformas específicas de células epiteliales (Shapiro *et al.*, 2011; Thiery *et al.*, 2009). La desregulación de estas características contribuyen a la adquisición de fenotipos malignos por las células

cancerosas, incluyendo la invasión en los tejidos estromales y metástasis a distancia (Thiery *et al.*, 2009).

La sobreexpresión de hMENA representa un marcador temprano de tumorigénesis en algunos tipos de cáncer como pulmón, glioma, mama y carcinoma colorrectal, siendo indetectable en epitelios normales, sobreexpresándose en lesiones benignas con mayor riesgo de transformación y en más del 70% de los tumores (Di Modugno *et al.*, 2006). Se ha encontrado que la sobreexpresión de hMENA se correlaciona con la etapa clínica y la naturaleza invasiva, y que desempeña un papel clave en el progreso del tumor (Tanaka *et al.*, 2014; Dong *et al.*, 2011); sin embargo, se desconoce si existe alguna asociación con el cáncer cérvico-uterino, y si esta sobreexpresión es diferente de acuerdo al tipo de VPH presente en diferentes lesiones cancerígenas.

El presente proyecto tiene como finalidad, a través de una combinación de estudios experimentales, analizar la relación que existe entre la expresión de la proteína hMENA en la proliferación y migración celular de diferentes líneas celulares obtenidas de tumores de cáncer de cuello uterino, lo cual será de gran importancia para evaluar la posibilidad de utilizar este tipo de marcadores moleculares en el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad, otorgando así información que permita diseñar mejores estrategias en el desarrollo de terapias contra el cáncer cérvico-uterino y otros tipos de cáncer que expresen estas moléculas.

## **2. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA**

La proteína hMENA, miembro de la familia de las proteínas Ena/VASP en mamíferos, juega un papel importante en la intervención de las vías de señalización para la remodelación de los filamentos de actina que constituyen el citoesqueleto, las cuales son asociadas a la formación de filopodios que conducen a la motilidad, adhesión y migración celular. Se ha reportado que durante el desarrollo de una neoplasia, la desregulación y sobreexpresión de hMENA se correlaciona con la etapa de progresión clínica y la naturaleza invasiva del tumor en diferentes tipos de cáncer como glioma, pulmón y mama. Sin embargo, se desconoce si la expresión de la proteína hMENA presenta una relación con respecto a células tumorales de cáncer cérvico-uterino.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer cérvico-uterino es un problema importante de salud pública, siendo la cuarta causa de muerte por cáncer a nivel mundial. Actualmente, las técnicas de diagnóstico para la detección temprana del cáncer no han generado resultados favorables en pacientes con enfermedades progresivas, por lo que es necesario investigar más a fondo la expresión de genes implicados en la invasión y metástasis del CaCu, con la finalidad de conocer la evolución de la enfermedad y así poder generar indicadores pronósticos que favorezcan la localización del cáncer en etapas tempranas.

En los últimos años, se ha encontrado que la proteína hMENA, regulador dinámico del citoesqueleto de actina, participa en la progresión tumoral así como en el comienzo de la invasión en tejidos adyacentes, relacionando su sobreexpresión en los casos de etapas clínicas avanzadas en diferentes tipos de cáncer. Por lo que surge la posibilidad de constituir un marcador de diagnóstico temprano que permita conocer el grado de evolución de la enfermedad así como identificar la naturaleza invasiva en lesiones precursoras del cáncer cérvico-uterino, contribuyendo a la elaboración de tratamientos oportunos y estrategias terapéuticas más efectivas.

#### **4. HIPÓTESIS**

Recientemente se ha reportado que el incremento en la expresión de la proteína hMENA juega un papel importante en la progresión tumoral, a través del aumento en la capacidad migratoria e invasiva a sitios primarios en diferentes tipos de cáncer como mama, pulmón, cerebro y colorrectal. Por lo que se espera que a mayor expresión de la proteína hMENA, exista una mayor capacidad proliferativa y migratoria en las líneas celulares derivadas de cáncer cérvico-uterino.

## **5. OBJETIVO GENERAL**

Analizar la expresión de la proteína hMENA y su asociación con la capacidad de proliferación y migración en líneas celulares tumorales derivadas de CaCu.

## **6. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Analizar la expresión de la proteína hMENA en las líneas celulares C33A (VPH-), CaSki (VPH-16+) y HeLa (VPH-18+); y en queratinocitos normales HaCaT.
  
- Analizar la capacidad proliferativa de las líneas celulares C33A (VPH-), CaSki (VPH-16+) y HeLa (VPH-18+); y en queratinocitos normales HaCaT.
  
- Analizar la capacidad de migración de las células C33A (VPH-), CaSki (VPH-16+) y HeLa (VPH-18+); y en queratinocitos normales HaCaT.

## **7. MATERIALES Y MÉTODO**

### **7.1 Líneas Celulares**

Las líneas celulares utilizadas son derivadas de tumores de cáncer cérvico-uterino: HeLa deriva de un carcinoma epitelial (VPH-18+), CaSki un carcinoma epidermoide (VPH-16+), C33A derivada de carcinoma epitelioide (VPH-); mientras que HaCaT es una línea celular de queratinocitos humanos. Las líneas celulares fueron mantenidas bajo condiciones de cultivo, empleando medio de cultivo RPMI 1640 de GibcoBRL (Life Technologies, USA) suplementado con suero fetal bovino (SFB) de GibcoBRL (Life Technologies, USA) al 10%; 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y mantenidas en condiciones de esterilidad en una incubadora (Forma Scientific, USA) a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>, en un ambiente de humedad saturante.

### **7.2 Expresión de hMena por Inmunocitoquímica**

Las líneas celulares fueron cultivadas durante 24 h en laminillas (portaobjetos) a una densidad de  $3 \times 10^4$  células por pozo, empleando medio RPMI suplementado con 10% de SFB, a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Después de la incubación, las muestras se trataron durante 30 minutos con solución tapón de citratos (CC1) para dejar expuestos los sitios antigénicos. Posteriormente, se añadió una solución de 5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para reducir al mínimo la tinción de fondo que produce la peroxidasa endógena o la unión de proteínas no específicas. Cada laminilla fue incubada durante 30 minutos con el anticuerpo primario pan-MENA (BD, Biosciences, USA) a una dilución 1:300 en agua inyectable. Se adicionó un anticuerpo secundario acoplado con peroxidasa de rábano, y se procedió a incubar durante 60 minutos.

Transcurrido este tiempo, se aplicó una contra-tinción con hematoxilina durante 8 minutos. Finalmente, las laminillas se lavaron con agua jabonosa entre 3 y 5 minutos para eliminar los residuos del líquido sellador y cubrirse posteriormente con cubreobjetos para su análisis en microscopio óptico con cámara integrada para fotografías (Leica Microsystems, Germany).

### **7.3 Expresión de hMENA por citometría de flujo.**

La expresión de la proteína hMENA se analizó mediante la técnica de citometría de flujo. Para ello, muestras de  $3 \times 10^5$  células viables, contadas con ayuda de un hemocitómetro y colorante azul de tripano, fueron fijadas durante 30 minutos en una solución de paraformaldehído al 2% disuelto en PBS suplementado con 2% con SFB. Las células se lavaron con saponina al 0.3% en PBS + 2% de SFB, con la finalidad de generar poros en la membrana plasmática y permitir el acceso de anticuerpos pan-MENA. Posteriormente se adicionaron 100  $\mu$ l de SFB y se incubaron durante 30 minutos a 4°C. En seguida se adicionó el anticuerpo primario pan-MENA a una dilución 1:300 empleando solución de saponina al 0.1%. Las células se incubaron durante 30 minutos y transcurrido ese tiempo, se realizaron 3 lavados con saponina al 0.1% para eliminar el exceso de anticuerpo. Después, se adicionó el anticuerpo secundario marcado con FITC (Caltag Laboratories, USA) a una dilución 1:500 en una solución de saponina al 0.1%. Las células se incubaron a 4°C durante 30 minutos y se eliminó el exceso de anticuerpo con 2 lavados para finalmente resuspenderlas nuevamente en paraformaldehído. Las células marcadas se analizaron contando un mínimo de 10,000 eventos en el citómetro de flujo FACSArialI (BD Biosciences, USA). El análisis de los datos obtenidos se realizó con el software Summit V4.3 (Dako Colorado, Inc. USA).



#### **7.4 Migración Celular *In Vitro* - “Scratch”**

En una placa de 6 pozos se cultivaron las células de las líneas HeLa, CaSki, C33A y HaCaT en una cantidad de  $3 \times 10^5$  células/pozo. Se dejaron incubando durante 72 h hasta formar una monocapa de células en adherencia. Una vez que la monocapa celular recubrió de manera homogénea el fondo del pozo, se procedió a “rascar” la monocapa celular en línea recta con una punta de pipeta de 200  $\mu$ l para crear una herida. Las células desprendidas fueron retiradas mediante lavados suaves con PBS. Después de eliminar el PBS se adicionaron 5 ml de medio RPMI + 1% de SFB, con el fin de minimizar la proliferación celular, pero justo lo suficiente para prevenir la apoptosis y/o desprendimiento de células. Se tomaron fotos de la zona de rasguño a tiempo 0 y 24 h, y se determinó la distancia promedio que recorrieron las células de borde a borde con ayuda de un microscopio invertido y un equipo analizador de imágenes. Finalmente se calculó la velocidad de migración de las células en al menos 5 puntos de la zona de herida, empleando la siguiente fórmula:

$V = (D1 - D2) / 24$  en donde,

D1= distancia promedio del ancho del rasguño a T0 (tiempo cero o inicial) en micras.

D2= distancia promedio del ancho del rasguño a 24 h (tiempo final) en micras.

### **7.5 Ensayo de proliferación celular por método colorimétrico (MTS).**

Para evaluar la proliferación de las células tumorales de CaCu en los cultivos celulares, se hicieron cultivos de  $1 \times 10^3$  células por pozo, en una placa de 96 pozos de fondo plano estéril (Corning, Costar, USA) con 200  $\mu$ l de medio IMDM sin rojo fenol (Life Technologies, USA) suplementado con suero humano (SH) al 10%. La cantidad de células en cada pozo de cultivo se determinó a las 24, 48, 72 y 96 h adicionando 20  $\mu$ l/pozo del reactivo de proliferación CellTiter 96 Aqueous One Solution (Promega, USA) conteniendo una sal de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio; MTS] a una concentración final de 317  $\mu$ g/ml, durante 4 h de incubación a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente la placa fue leída en un lector de placas para ELISA (Molecular Devices, USA) a una longitud de onda de 490 nm. Los datos de absorbancia obtenidos fueron comparados con los obtenidos de la curva patrón de número celular (20 000, 10 000, 5 000, 2 500, 1 250 y 625) elaborada para cada línea celular. Finalmente se trazaron los datos para obtener las correspondientes curvas de proliferación.

### **7.6 Análisis Estadístico.**

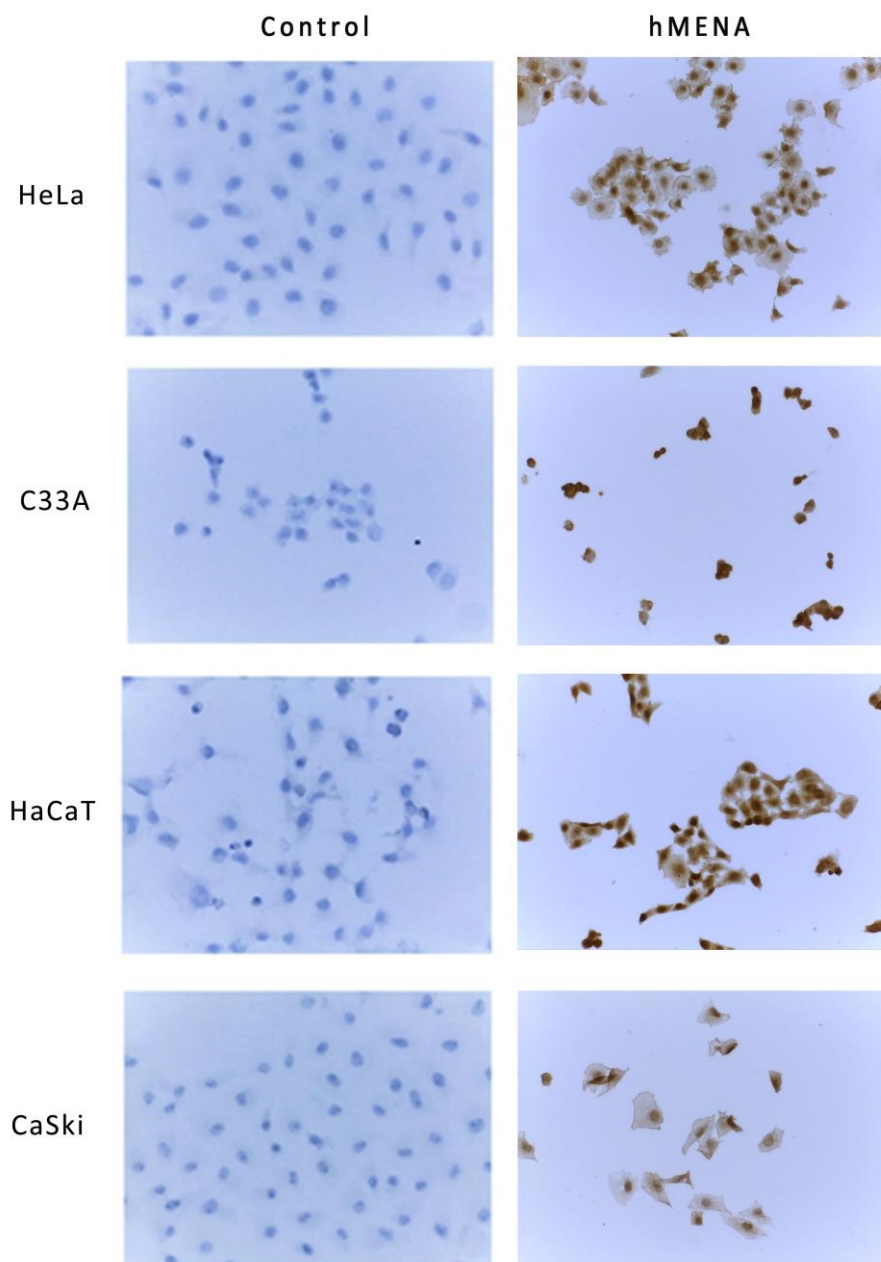
A los resultados obtenidos, se les realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95% seguido de una prueba de rasgos múltiples Tukey ( $p < 0.05$ ) para determinar diferencia estadística significativa entre los grupos de datos, empleando el programa estadístico GraphPad Prism 6.0.

## 8. RESULTADOS

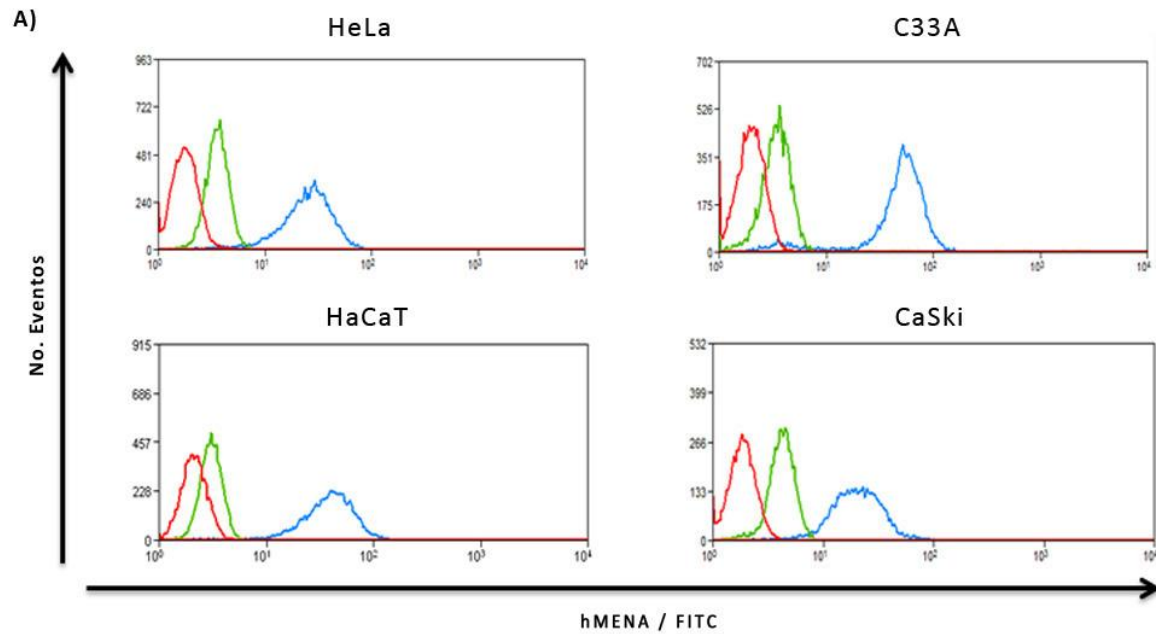
### 8.1 Expresión de la proteína hMENA es mayor en líneas celulares negativas a VPH con respecto a las líneas positivas a VPH.

Estudios recientes han mostrado que la sobreexpresión de la proteína hMENA juega un papel importante en la proliferación y metástasis de las células tumorales en diferentes tipos de cáncer, por ejemplo en cáncer de mama, cáncer pulmonar y gliomas (Dong X *et al.*, 2011; Di Modugno *et al.*, 2012); sin embargo, no hay reportes en la literatura sobre la expresión de hMENA en células tumorales de CaCu. Por tal motivo, en el presente trabajo se utilizaron líneas celulares de CaCu con diferente tipo de infección por VPH: HeLa (VPH-18+) y CasKi (VPH-16+); así como la línea celular C33A (VPH-), y la línea de queratinocitos humanos HaCaT (VPH-). Mediante el uso de la técnica de inmunohistoquímica se analizó la expresión de la proteína hMENA en las diferentes líneas celulares. La expresión de hMENA mostró una tinción más intensa en la membrana de las líneas celulares C33A y HaCaT, mientras que en HeLa y CaSki la tinción resultó ser más tenue (Figura 4).

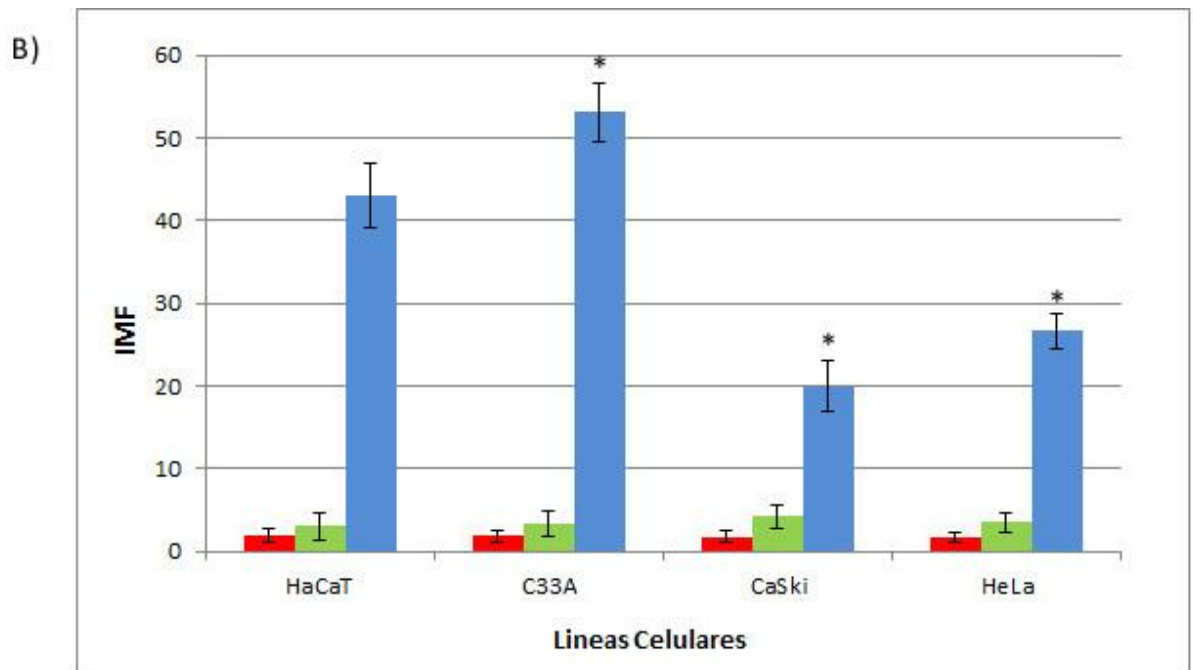
Por otro lado, con la finalidad de analizar de manera cuantitativa la expresión de la proteína hMENA en la membrana de las líneas celulares, se procedió a evaluar la intensidad media de fluorescencia (IMF) a través de citometría de flujo. La expresión de hMENA en las líneas celulares fue mayor en C33A y HaCaT con una IMF de 53.1 y 43.2 respectivamente; mientras que para las líneas celulares HeLa y CaSki se obtuvieron valores de IMF de 26.7 y 20.0 respectivamente, como puede observarse en los histogramas de las células positivas teñidas con anticuerpo anti-hMENA revelado con anticuerpo secundario marcado con FITC (Figura 5), y los valores correspondientes a la IMF (Figura 6).



**Figura 4. Expresión cualitativa de la proteína hMENA en diferentes líneas celulares.** La detección de la proteína hMENA fue determinada en las líneas celulares mediante la técnica de inmunohistoquímica. Las células fueron cultivadas y fijadas en portaobjetos, posteriormente fueron teñidas con el anticuerpo monoclonal pan-hMENA y después contrateñidas con hematoxilina; mientras que para los controles negativos de tinción, las células únicamente fueron teñidas con Hematoxilina (Todas las fotos fueron tomadas con un aumento de 20x).



**Figura 5. Análisis cuantitativo de la expresión de hMENA líneas celulares de CaCu.** La expresión de la proteína hMENA fue determinada en las líneas celulares mediante la técnica de citometría de flujo empleando el anticuerpo específico pan-hMENA y revelada posteriormente con un anticuerpo secundario marcado con FITC. Se muestran los histogramas correspondientes a la expresión de hMENA (líneas azules), la expresión de un anticuerpo isotipo control (verde) y la autofluorescencia (rojo). Ensayo representativo de 2 realizados.

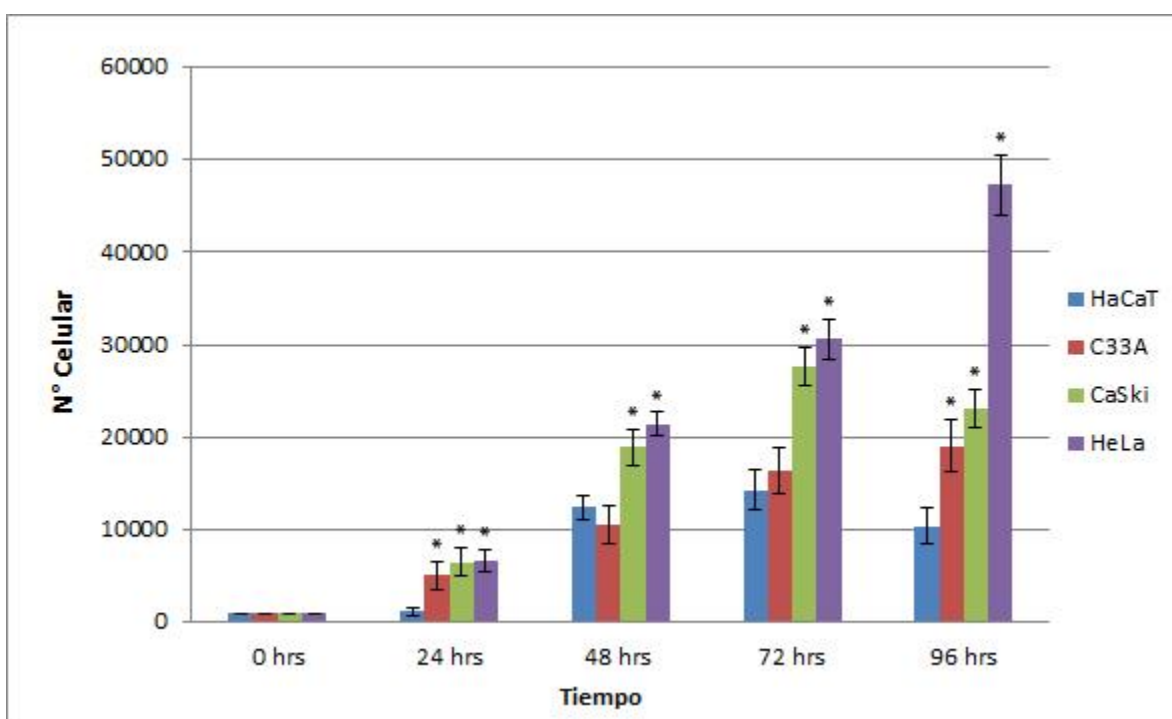


**Figura 6. Análisis cuantitativo de la expresión de la proteína hMENA en las líneas celulares HeLa, CaSki, HaCaT y C33A.** Se muestran los valores de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de la determinación de hMENA (en azul), de isotipo control (verde) y autofluorescencia (rojo). Para el análisis se consideraron 10 000 eventos, mostrando las medias y desviaciones estándar de 2 experimentos realizados de manera independiente, con una diferencia estadísticamente significativa de  $p < 0.05$  con respecto al control (HaCaT).

## 8.2 Las líneas celulares positivas a VPH presentan una mayor actividad proliferativa que las líneas celulares negativas a VPH.

Por otro lado, es conocido que los pacientes con infección persistente por VPH de alto riesgo, como lo es VPH-16 y VPH-18, presentan un mayor pronóstico a progresar hacia lesiones malignas, debido a que las células infectadas adquieren propiedades que favorecen su proliferación e invasión, generando tumores genitales de cuello cérvico-uterino (Sehr *et al.*, 2013). En consecuencia, se procedió a analizar si las líneas celulares positivas a la infección por VPH de alto riesgo presentaban mayor capacidad proliferativa que aquellas negativas a la infección

por VPH. La proliferación celular se determinó por un método colorimétrico (MTS), cultivando las células a diferentes tiempos (24, 48, 72 y 96 h) y obteniendo el número celular en cada caso, interpolando los datos en curvas patrón con diferentes cantidades de células marcadas con MTS. De acuerdo a este método, se encontró que las líneas celulares CaSki y HeLa presentaron una mayor proliferación celular que las líneas celulares negativas a la infección por VPH (Figura 7).

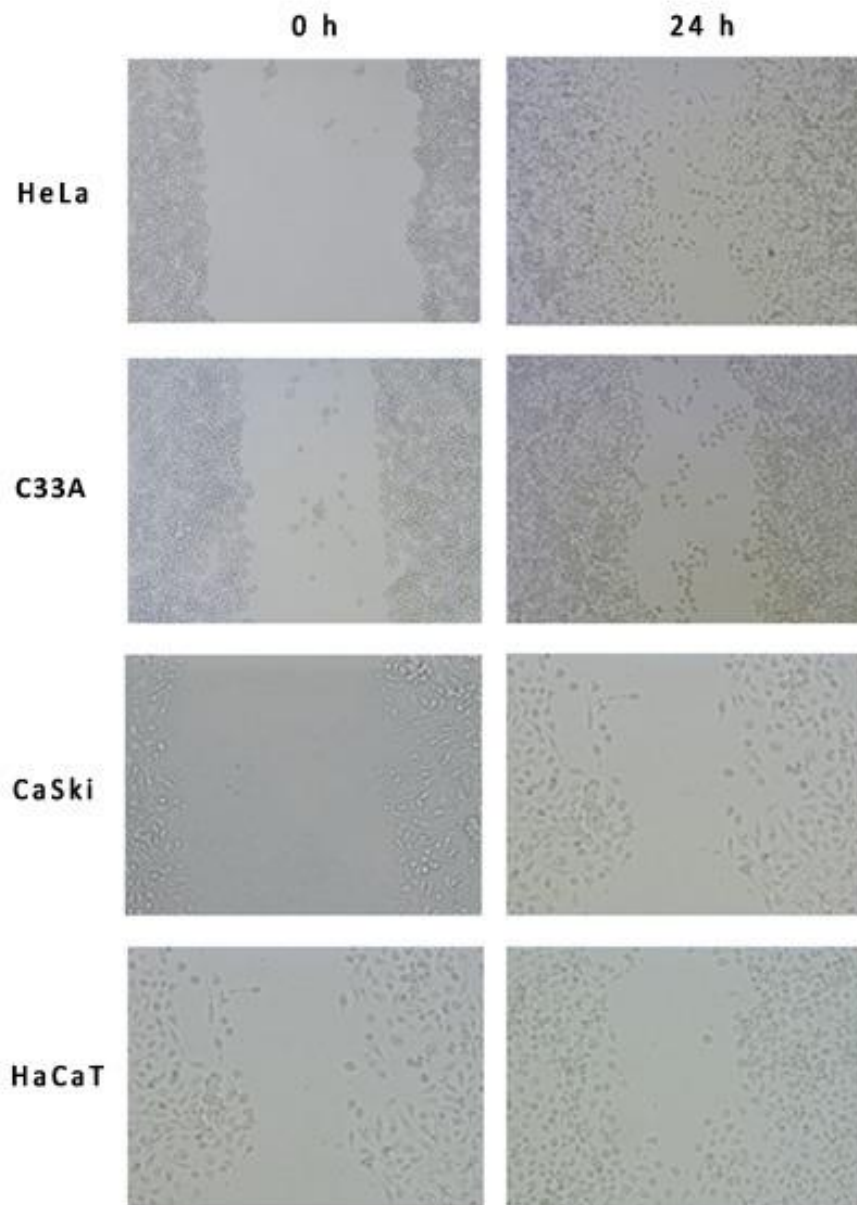


**Figura 7. Proliferación de las líneas celulares HeLa, CaSki, HaCaT y C33A.** La proliferación de las líneas celulares fue determinada durante 96 h empleando el método colorimétrico de MTS. Inicialmente se cultivaron  $1 \times 10^3$  células y el número celular fue evaluado a las 24, 48, 72 y 96 h. Los resultados obtenidos muestran el promedio de 3 experimentos realizados de manera independiente con una diferencia estadísticamente significativa de  $p < 0.05$  con respecto al grupo control (HaCaT).

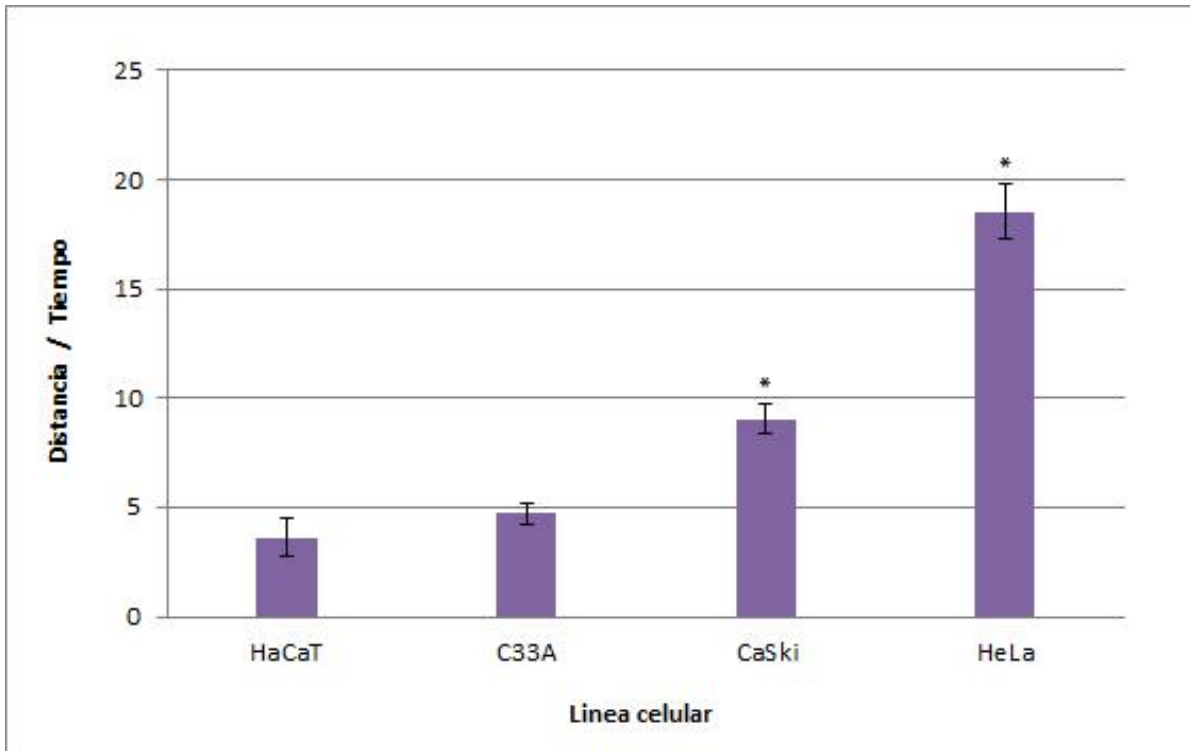
### **8.3 Las líneas celulares positivas a VPH mostraron una mayor velocidad de migración que aquellas líneas negativas a VPH.**

Con la finalidad de determinar si las células positivas a la infección por VPH presentan mayor capacidad de migración que aquellas negativas a la infección, las diferentes líneas celulares fueron cultivadas en monocapas empleando placas de 6 pozos, a las cuales se les realizó un “rasguño” o herida y después de 24 h se midió la velocidad de migración de las células hacia la zona dañada. En la figura 8 se muestran imágenes de las células que migraron hacia la zona del rasguño, apreciándose que las células HeLa y CaSki cubrieron en mayor proporción la superficie dañada en relación con las líneas C33A y HaCaT. Por otro lado, al calcular la velocidad de migración después de 24 horas de haber realizado el rasguño, las células HeLa mostraron la mayor velocidad de migración (18.53  $\mu$ /h), mientras que las líneas CaSki, C33A y HaCaT mostraron una velocidad de 9.04, 4.70 y 3.63  $\mu$ /h respectivamente (Figura 9).





**Figura 8. Capacidad migratoria de las líneas celulares HeLa, CaSki, HaCaT y C33A.** Las líneas celulares fueron cultivadas en placas de 6 pozos permitiendo la formación de una monocapa celular, posteriormente se realizó un rasguño o herida con un una punta plástica de aproximadamente 1 mm. Después de eliminar las células desprendidas mediante lavados, las células fueron incubadas durante 24 h. En las fotografías se muestra el desplazamiento de las células hacia el área dañada (Todas las fotos fueron tomadas a 10x).



**Figura 9. Velocidad de migración de las líneas celulares HeLa, CaSki, HaCaT y C33A.** La velocidad de migración ( $\mu/h$ ) se determinó a través de la distancia recorrida entre el tiempo transcurrido (24 h) para cada una de las líneas celulares. Los resultados obtenidos se graficaron de acuerdo a un promedio de 3 experimentos realizados con una diferencia estadísticamente significativa de  $p < 0.05$  con respecto al grupo control (HaCaT).

## 9. ANÁLISIS DE RESULTADOS

A nivel nacional, el cáncer cérvico-uterino representa la segunda causa de muerte por cáncer en la mujer mexicana (INEGI, 2014). El éxito del tratamiento ofrecido a las pacientes depende de diversos factores pronósticos ya identificados, que influyen en la localización, diagnóstico, tratamiento y carga viral (Lio, 2004). Actualmente, existe evidencia epidemiológica que relaciona al VPH con el grado de displasia cervical o con el desarrollo del CaCu, atribuyéndose en un 90% al VPH de alto riesgo como 16, 18, 31, 45, entre otros (Salcedo *et al.*, 2014). En las últimas décadas, se han sumado esfuerzos para encontrar herramientas que permitan desarrollar nuevos métodos de diagnóstico que faciliten la detección de lesiones precancerígenas, valorar el grado y progresión de lesión neoplásica de acuerdo al tipo de VPH, para poder fortalecer los tratamientos de detención y/o eliminación de las células cancerígenas.

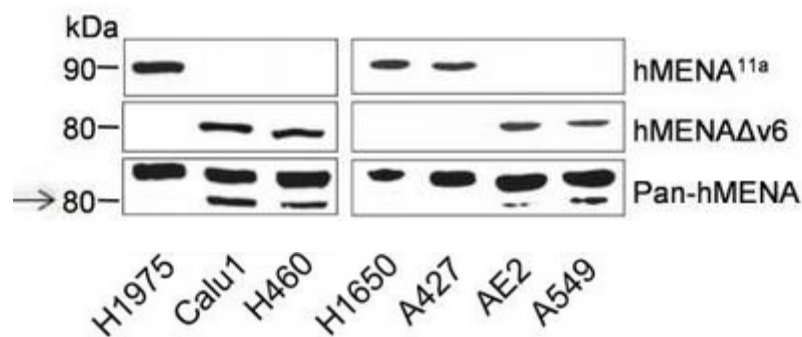
La sobreexpresión del ortólogo humano habilitado en mamíferos (hMENA) ha sido reportado como un marcador temprano en la progresión de lesiones premalignas de alto riesgo en diferentes tipos de cáncer como son cáncer de mama (Trono *et al.*, 2015; Tanaka *et al.*, 2014; Di Modugno *et al.*, 2012), cáncer pulmonar (Bria *et al.*, 2014), glioma (Dong *et al.*, 2011; Higashi *et al.*, 2009), cáncer de páncreas (Pino *et al.*, 2008) y carcinoma colorrectal (Toyoda *et al.*, 2009). La proteína hMENA se sobreexpresa en lesiones con malignidad franca pero se encuentra ausente de expresión en los tejidos normales (Di Modugno *et al.*, 2010). En relación a CaCu, en estudios previos se ha reportado que la expresión de hMENA incrementa con el grado de la lesión (Gurzu *et al.*, 2009), no obstante se desconoce si hay alguna relación entre la expresión de hMENA, la presencia de VPH de alto riesgo, la proliferación y migración celular.

En el presente estudio tuvo como objetivo analizar la expresión de hMENA en cuatro líneas celulares, encontramos que el grado de expresión de la proteína hMENA fue independiente de la presencia de infección de VPH, ya que la mayor expresión de hMENA se encontró en las líneas C33A y HaCaT negativas a la expresión por VPH. No obstante la capacidad de proliferación y migración celular fue relativamente mayor en las líneas HeLa y CaSki positivas a la infección por VPH 18 y 16 respectivamente. Aunque para llegar a una conclusión definitiva, sería conveniente analizar la expresión de hMENA en un mayor número de líneas celulares de CaCu, ya que parece ser que la expresión de hMENA en las células tumorales de CaCu no es determinante para su capacidad de proliferación y migración celular, como si lo es la presencia de VPH de alto riesgo.

Sin embargo, en estudios recientes se han reportado dos isoformas diferentes de hMENA: hMENA11a, la cual se encuentra sólo en un subconjunto de líneas celulares que muestran un fenotipo epitelial, y hMENA $\Delta$ v6 que se asocia a las líneas celulares con un fenotipo 'mesenquimal' invasivo (Bria *et al.*, 2014). La expresión diferencial de isoformas de hMENA pueden repercutir en otros aspectos al fenotipo maligno; las alteraciones en la organización del citoesqueleto celular pueden tener un impacto en la forma celular y la competencia funcional por medio de la proliferación, así como características invasoras (Di Modugno *et al.*, 2007). En consecuencia, resultará importante caracterizar las isoformas de hMENA en las células tumorales de CaCu, tomando en consideración que el CaCu se caracteriza por ser una neoplasia que invade de manera locorregional en contraste con la metástasis sistémica.

Otro aspecto importante a destacar es que la baja expresión de hMENA en las líneas celulares HeLa y CaSki positivas a VPH, puede estar relacionada a la dificultad de detectar ambas isoformas de hMENA por el anticuerpo pan-MENA utilizado en

el presente trabajo, ya que sólo es capaz de detectar una proteína de peso molecular de 80 kDa de acuerdo con el inserto que muestra el proveedor del anticuerpo, similar a la isoforma hMENA $\Delta$ v6; mientras que la isoforma hMENA11a, mostrado por Bria y colaboradores 2014, presenta un peso molecular de 90 kDa (Figura 10), en consecuencia resultará importante considerar el uso de un anticuerpo específico para la isoforma hMENA11a, para generar aclaraciones firmes con respecto a los resultados obtenidos.



**Figura 10. Análisis por Western Blot de lisados de líneas celulares de cáncer pulmonar.** Expresión de pan-hMENA y sus isoformas específicas hMENA $\Delta$ v6 y hMENA11a, con pesos moleculares de 80 kDa y 90 kDa respectivamente (Tomado de Bria *et al.*, 2014).

En relación con la capacidad de migración y proliferación de las células tumorales de CaCu, se ha reportado que la presencia de infección por VPH de alto riesgo, como lo son VPH-16 y VPH-18, generan inestabilidad genómica en las células, la cual puede conducir a una mayor capacidad de la célula tumoral a proliferar e invadir estructuras tisulares cercanas, como ocurre en los tumores de estadios clínicos avanzados (López & Lizano, 2006).

Por otro lado, se ha propuesto que la expresión de las isoformas de hMENA está estrechamente relacionada con la proliferación e invasión de las células cancerígenas para incrementar la organización del citoesqueleto y la producción de filopodios (Bria *et al.*, 2014). Esto puede vincularse con los datos obtenidos debido a que las líneas celulares positivas a VPH (HeLa y CaSki) que expresaron una menor intensidad de hMENA, presentaron una mayor actividad proliferativa y así como aumento en la migración celular en comparación con las líneas celulares negativas a VPH (C33A y HaCaT) cuya expresión de hMENA fue mayor, probablemente a la expresión de las isoformas hMENA11a y hMENA $\Delta$ v6 asociadas generalmente a células cancerosas con fenotipos invasivo y no invasivos, presentando funciones opuestas y antagónicas en la invasión y proliferación de las células de cáncer (Bria *et al.*, 2014; Di Modugno *et al.*, 2012). No obstante, no se puede comprender por completo si la expresión de hMENA presenta una relación directa con el efecto proliferativo e invasivo en las diferentes líneas celulares estudiadas, debido a la falta de sus anticuerpos isotopo.

A la luz de la evaluación anterior, los marcadores tumorales son herramientas importantes que pueden ayudar a los médicos con el diagnóstico oportuno, la predicción de la respuesta al tratamiento y el seguimiento de la enfermedad. El descubrimiento de nuevos biomarcadores clínicos, prevé la posibilidad de desempeñar un papel importante en la reestructuración de la investigación, influyendo en la detección y el tratamiento de muchos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de cuello uterino.

Tecnologías genómicas y proteómicas son bastante prometedoras en la identificación de nuevos biomarcadores, que pueden mejorar significativamente la eficacia de la gestión del tratamiento del cáncer. Una comprensión completa de cada biomarcador será importante para el diagnóstico de la enfermedad de

manera eficiente y para proporcionar la dirección en la selección de las alternativas terapéuticas adecuadas. En consecuencia, será interesante encontrar en estudios posteriores si existen diferentes isoformas de hMENA en CaCu dependiendo del grado de evolución de la enfermedad, como resultado del acondicionamiento celular dada por la presencia tanto de citocinas como de diferentes factores quimiotácticos presentes en el microambiente tumoral, producidos por las células estromales y las propias células tumorales, lo cual nos permitirá una mayor comprensión del fenómeno invasor en la evolución de esta enfermedad.

## 10. CONCLUSIONES

- La expresión de la proteína hMENA fue mayor en las líneas C33A y HaCaT (VPH-) que en HeLa y CaSki positivas a la infección por VPH-18 y VPH-16.
- La proliferación celular fue mayor en las líneas celulares HeLa y CaSki con respecto a las líneas celulares C33A y HaCaT.
- La velocidad de migración en las líneas celulares fue mayor en HeLa (VPH-18+), seguida de CaSki (VPH-16+), C33A (VPH-) y HaCaT (VPH-).



## 11. PERSPECTIVAS

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, será de gran importancia:

- Evaluar la expresión de las isoformas hMENA11a y hMENA $\Delta$ v6 en líneas celulares de CaCu positivas y negativas a VPH.
  
- Inhibir la expresión de hMENA en líneas celulares de CaCu y analizar si su capacidad proliferativa y migratoria es independiente de esta proteína.
  
- Evaluar la expresión de hMENA en tumores con diferentes grados de desarrollo y relacionarlo con los diferentes tipos de VPH presentes.

## 12. LITERATURA CITADA

- Alanis E. Análisis molecular de la interacción entre células troncales de tejido adiposo ADSC y células tumorales de cáncer. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina. UNAM, México, 2015.
- Archibal S. Molecular Biology of Cancer. Oncogenes. Cancer and Practice of Oncology, 1997; 5: 79-88.
- Atalah E, Urteaga C, Rebolledo A, Villegas R, Medina E, Csendes A. Diet, smoking and reproductive history as risk factor for cervical cancer. Revista Médica de Chile, 2001; 129: 597-603.
- Bosch J, Diaz S. Epidemiología de las infecciones por virus del papilomahumano (VPH): riesgo de carcinoma cérvico-uterino y de otros tumores anogenitales. Servicio de Epidemiología y Registro del Cáncer. IDIBELL, 2006.
- Bria E, Di Modugno F, Sperduti I, Lapicca P, *et al.* Prognostic impact of alternative splicing-derived hMENA isoforms in resected, node-negative, non-small-cell lung cancer. Journal of OncoTargets and Therapy, 2014; 5(22): 11054–11063.
- Burd E. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. Clinical Microbiology Reviews, 2003; 16(1): 1-17.
- Carrero Y. Patrones de infiltración leucocitaria y de expresión tisular de quimioquinas, factor de crecimiento endotelial vascular y mediadores del metabolismo oxidativo en lesiones inflamatorias y neoplásicas del cérvix. Tesis de Doctorado. Universidad de Alcalá, España, 2012.
- Casas N. Identificación del virus del papiloma humano por los métodos de captura de híbridos e inmunohistoquímica en muestras de mujeres con

hallazgos colposcópicos anormales. Tesis Licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Veracruzana, México, 2010.

- Castellanos A. Evaluación de la capacidad del péptido antigénico IHSMNTIL derivado de la cápside del virus del papiloma humano tipo 16 para inducir una respuesta inmune celular y de anticuerpos en un modelo murino. Tesis de Licenciatura. UAM Iztapalapa, México, 2006.
- Chávez M, Virelles M, Bermejo W, Viñas L. Intervención comunitaria sobre factores de riesgo del cáncer cervicouterino. *Revista de la Academia Mexicana de Ciencias*, 2008; 12(5): 53-56.
- Clifford G, Smith J, Plummer M, Munoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a metaanalysis. *British Journal of Cancer*, 2003; 88: 63-73.
- Cordero J, Maestri I, Gil R. Current methods of diagnosis of cervical cancer. *Revista de Ciencias Médicas La Habana*, 2015; 21(1): 1-8.
- Dasari S, Shouri R, Rajendra W, Valluru L. Effect of concurrent radiochemotherapy and chemotherapy on serum proteins for prospective predictors of patients with HPV induced cervical cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2014; 68: 315–320.
- Dasari S, Wudayagiri R, Valluru L. Cervical cancer: Biomarkers for diagnosis and treatment. *Clinica Chimica Acta*, 2015; 445: 7–11.
- Di Modugno F, DeMonte L, Balsamo M, Bronzi G, Nicotra M, Alessio M, Jager E, Condeelis J, Santoni A, Natali P, Nistico P. Molecular cloning of hMena (ENAH) and its splice variant hMena11a: epidermal growth factor increases their expression and stimulates hMena11a phosphorylation in breast cancer cell lines. *Cancer Research*, 2007; 67(6): 2657–2665.
- Di Modugno F, Lapicca P, Boudreau A, Mottolise M, Terrenato I, Perracchio L, Carstens R, Santoni A, Bissell M, Nistico P. Splicing program of human

MENA produces a previously undescribed isoform associated with invasive, mesenchymal-like breast tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012; 109(47): 19280–19285.

- Di Modugno F, Mottolese M, De Monte L, Trono P, Balsamo M, Conidi A. The cooperation between hMena overexpression and HER2 signalling in breast cancer. *PLOS One*, 2010; 5(12): 458- 469.
- Di Modugno F, Mottolese M, Di Benedetto A, Conidi A, Novelli F, Perracchio L, Venturo I, Botti C. The cytoskeleton regulatory protein hMena (ENAH) is overexpressed in human benign breast lesions with high risk of transformation and human epidermal growth factor receptor-2-positive/hormonal receptor-negative tumors. *Clinical Cancer Research*, 2006; 12(5): 1470-1478.
- Dong X, Yang X, Wang H, Wang W, Yu L, Zhang B, Yu S, Ming H. Expression and Distribution Characteristics of Human Ortholog of Mammalian Enabled (hMena) in Glioma. *Chinese Journal of Cancer Research*, 2011; 23(4): 312-316.
- Dzul K, Puerto M, González R. Cáncer Cervicouterino: métodos actuales para su detección. *Revista Biomédica*, 2004; 15: 233-241.
- Franco R. Café y Cáncer. *Revista Médica Clínica*, 2008; 131(16): 633-635.
- Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature Reviews Cancer*, 2003; 3: 362-374.
- Globocan, IARC. 2012. Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. [Consulta: 25 de Mayo de 2015].
- Gullota G, Margariti P, Rabitti C, Balsamo G, Valle D, Capelli A, Mancuso S. Cytology, histology and colposcopy in the diagnosis off neoplastic non invasive epithelial lesion of the cervix. *European Journal of Gynaecological Oncology*, 1997; 18: 36-38.

- Gurzu S, Jung I, Prantner I, Chira L, Ember I. The immunohistochemical aspects of protein Mena in cervical lesions. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 2009; 50(2): 213-216.
- Hidalgo A. El cáncer cérvico-uterino: su impacto en México. *Revista Biomedica*, 2006; 17(1): 81-84.
- Higashi M, Ishikawa C, Yu J, Toyoda A, Kawana H, Kurokawa K, Matsuda M, Kitagawa M, Harigaya K. Human Mena associates with Rac1 small GTPase in glioblastoma cell lines. *PLoS ONE*, 2009; 4(3): 783-829.  
[http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)
- INEGI. 2014. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. [Consulta: 25 de Mayo de 2015]. <http://www.inegi.org.mx/>
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun M. Cancer statistics. *A Cancer Journal for Clinicians*, 2007; 58: 43-66.
- Karp G. *Biología Celular y Molecular*. McGraw-Hill Interamericana. México, 2006.
- Killeen J, Dye T, Grace C, Hiraoka M. Improved abnormal Pap smear triage using cervical cancer biomarkers. *Journal of Lower Genital Tract Disease*, 2014; 18(1): 1–7.
- LaCruz C, Fariña J. *Citología Ginecológica de Papanicolaou a Bethesda*. Ed. Complutense. España, 2003. Págs. 132.
- Lio L. Carga viral por Virus del Papiloma Humano de alto riesgo y subtipo 16 como factores pronósticos de respuesta en pacientes con cáncer cérvico-uterino invasor sometidas a radioterapia. Tesis de Especialidad en Radio-Oncología. Hospital de Oncología. México, 2004.
- Lizano M, Carillo A, Contreras A. Infección por Virus del Papiloma Humano: epidemiología, historia natural y carcinogénesis. *Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer. Instituto Nacional de Cancerología*, 2009; 205-206.

- López A, Lizano M. Cáncer Cérvico-uterino y el Virus del Papiloma Humano. Unidad de Investigación Biomédica, México, 2006; 31-55.
- Martínez J. Diagnostico microbiológico de infecciones de transmisión sexual. Revista Chilena de Infectología, 2010; 27: 60-64.
- Massad L, Collins Y. Strength of correlations between colposcopic impression and biopsy histology. Gynecologic Oncology Journal, 2003; 89: 424-428.
- McMurray H, Nguyen D, Westbrook T, McAnce D. Biology of human papillomaviruses. International Journal of Experimental Pathology, 2001; 82: 15-33.
- Muñoz N, Bosch F. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. The New England Journal of Medicine, 2003; 348(6): 518-527.
- Olmos, A. Influencia de los niveles hormonales y uso de los anticonceptivos como factor de riesgo para infección por virus del papiloma humano y presentación de neplasia intracervical. Tesis de Especialidad Médica en Ginecología y Obstetricia, México, 2001.
- Organización Mundial de la Salud, 2014. Cáncer. [Consulta: 25 de Mayo de 2015]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- Park M, Lee S. Cell Cycle and Cancer. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2008; 36(1): 60-65.
- Pino M, Balsamo M, Di Modugno F, Mottolise M, Alessio M, Melucci E, Milella M, McConkey D, Philippar U, Gertler F, Natali P, Nisticó P. Human MENA11a isoform serves as a marker of epithelial phenotype and sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition in human pancreatic cancer cell lines. Clinical Cancer Research, 2008; 14(15): 4943 – 4950.

- Rincón O, Pareja L, Jaramillo S. Human Papillomavirus, immune response and cervical cancer: a complex relationship. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 2007; 58(3): 202-212.
- Salcedo M, Pina P, Vallejo V, Monroy A, Aguilar A, Cortes E, Santos G, Montoya H, Grijalva R, Madrid V, Apresa T, Hernandez D, Jave L, Romero P, Poot A, Salgado E, Ramos P, Gonzalez R, Canton J, Jimenez L, Parra M, Paniagua L, Mendoza M, *et al.* Human papillomavirus genotypes among females in Mexico: a study from the Mexican institute for social security. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2014; 15(23): 10061-10066.
- Santin D, Bellone S, Roman J, Burnett A, Cannon J, Pecorelli S. Therapeutic vaccines for cervical cancer; Dendritic cell-based immunotherapy. *Pharmaceutical Desing*, 2005; 11: 3485-3500.
- Sehr P, Rubio I, Seitz H, Putzker K, Ribeiro L, Pawlita M, Müller M. High-throughput pseudovirion-based neutralization assay for analysis of natural and vaccine-induced antibodies against human papillomaviruses. *PLOS One*, 2013; 8(10): 756-777.
- Shapiro I, Cheng A, Flytzanis N, Balsamo M, Condeelis J, Oktay M, Burge C, Gertler B. An EMT-driven alternative splicing program occurs in human breast cancer and modulates cellular phenotype. *PLOS Genet*, 2011.
- Syrjanen J. Immunohistochemistry in assessment of molecular pathogenesis of cervical carcinogenesis. *European Journal of Gynaecological Oncology*, 2005; 26: 118–124.
- Tanaka N, Yoshida H, Suzuki Y, Harigaya K. Relative expression of hMena11a and hMena1NV splice isoforms is a useful biomarker in development and progression of human breast carcinoma. *International Journal of Oncology*, 2014; 45(5): 1921-1928.

- Thiery J, Acloque H, Huang R, Nieto M. Epithelial to mesenchymal transitions in development and disease. *Cell Journal*, 2009; 139: 871–890.
- Tirado L, Mohar A, Lopez M. Factores de Riesgo del Cáncer Cervicouterino invasor en mujeres mexicanas. *Revista Salud Pública Mexicana*, 2005; 47(5): 342-350.
- Torres B. Análisis de la expresión de la vía adenosinérgica en tumores de cáncer de cuello uterino. Tesis de Licenciatura. México, 2015.
- Toyoda A, Kawana H, Azuhata K, Yu J, Omata, Kishi H, Higashi M, Harigaya K. Aberrant expression of human ortholog of mammalian enabled (hMena) in human colorectal carcinomas: Implications for its role in tumor progression. *International Journal of Oncology*, 2009; 34(1): 53-60.
- Toyoda M, Shinohara J, Okuda J, Watanabe I. Expression of surviving correlates with apoptosis, proliferation and angiogenesis during human colorectal carcinogenesis. *Cancer Journal*, 2011; 91: 2026-2032.
- Trono P, Di Modugno F, Circo R, Spada S, Di Benedetto A, Melchionna R, Palermo B, Matteoni S, Soddu S, Mottolese M, De Maria R, Nisticó P. hMENA11a contributes to HER3-mediated resistance to PI3K inhibitors in HER2-overexpressing breast cancer cells. *Revista Oncogene*, 2015.
- Velásquez A, Barboza M. Expresión de IL-10 y TGF-B1 en lesiones premalignas y malignas en Cérvix Uterino. *Revista FASPYN*, 2002; 2: 14-25.
- Wang E, Panelli M, Marincola F. Genomic analysis of cancer. *Principles and Practice of Pediatric Oncology*, 2003; 17: 1–16.
- Wang W, Goswami S, Sahai E, Wyckoff J, Segall J, Condeelis J. Tumor cells caught in the act of invading: their strategy for enhanced cell motility. *Trends in Cell Biology*, 2005; 15: 138-145.
- Weingberg R. How cancer arises. *Scientific American*, 1996; 275: 62-70.



- Wentzensen N, Bergeron C, Cas F, Eschenbach D, Vinokurova S. Evaluation of a nuclear score for p16INK4a-stained cervical squamous cells in liquid-based cytology samples. *Cancer Journal*, 2005; 105: 461–467.
- Wick M. Diagnosis of human papillomavirus gynaecologic infections. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 2000; 20: 271-287.
- Yocota J. Tumor progression and metástasis. *Life Science Carcinogenesis*, 2000; 21: 497-503.
- Zavesky L, Jandakova E, Turyna R, Langmeierova L, Weinberger V, Minar L. New perspectives in diagnosis of gynaecological cancers: Emerging role of circulating microRNAs as novel biomarkers. *Bratislava Medical Journal*, 2015; 10: 41-49.

## 13. ANEXOS

### **Rx1. Reactivo de Trabajo Medio de Cultivo RPMI 1640**

R1a. Botella de 1 litro de medio RPMI líquido (Life Technologies, USA).

\* Comprobar que el líquido contiene glutamina y bicarbonato.

\* En caso de no tener, añadir 2.1 g de  $\text{NaHCO}_3$  (bicarbonato de sodio) y 10 ml de glutamato (100X).

R2a. 10 ml de penicilina/estreptomicina (100X).

Mezclar R1a y R2a transfiriendo el contenido de manera estéril en alícuotas de 50 ml conservándose en refrigeración de  $4^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ .

### **Rx2. Reactivo de Trabajo Suero Fetal Bovino**

R1b. Botella de 500 ml de Suero Fetal Bovino (Life Technologies, USA).

Retirar la botella del congelador y dejar descongelar durante toda la noche. Una vez que el R1b esté completamente descongelado, incubar durante 30 minutos a  $56^\circ\text{C}$  invirtiendo la botella cada 10 minutos. Retirar el R1b del baño maria y dejar enfriar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Transferir el R1b en alícuotas de 50 ml conservándose en congelación a  $-20^\circ\text{C}$  o a  $4^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  cuando el reactivo este en uso.

### **Rx3. Reactivo de Trabajo Anticuerpo Pan-MENA para Inmunohistoquímica**

R1c. Anticuerpo monoclonal de ratón pan-MENA (BD Biosciences, USA).

R2c. Solución de agua inyectable.

Mezclar 1  $\mu\text{l}$  del R1c en 300  $\mu\text{l}$  del R2c. Homogenizar el reactivo y conservar a  $4^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  protegiendo de la luz.

#### **Rx4. Reactivo de Trabajo Solución Buffer de Fosfatos**

R1d. 1000 ml de Agua Bidestilada (1.0 L).

R2d. 8.0 g de Cloruro de Sodio (Sigma, Chem, USA).

R3d. 2.16 g de Fosfato monoácido de Sodio (Sigma, Chem, USA).

R4d. 0.2 g de Fosfato diácido de Potasio (Sigma, Chem, USA).

R5d. 0.2 g de Cloruro de Potasio (Sigma, Chem, USA).

Diluir los reactivos R2d, R4d y R5d en 800 ml del reactivo R1d. Una vez disuelto todo, ajustar el pH a 7.2-7.4 utilizando el reactivo R3d. Posteriormente se afora a 1000 ml, vaciando en botellas de vidrio y esterilizando por autoclave a 121°C . Después, dejar enfriar y almacenar a 4°C ± 2°C.

#### **Rx5. Reactivo de Trabajo Solución de Saponina**

R1e. 50 ml de Solución Buffer de Fosfatos.

R2e. 0.15 g de Saponina (Sigma Aldrich, USA) para solución al 0.3%.

R3e. 0.05 g de Saponina (Sigma Aldrich, USA) para solución al 0.1%.

R4e. 2 ml de Suero Fetal Bovino.

Mezclar los reactivos R1e y R4e homogenizando completamente. Después adicionar el reactivo R2e o R3e dependiendo la dilución requerida y disolver calentando a baño maria. Mantener en refrigeración a 4 ± 2°C.

#### **Rx6. Reactivo de Trabajo Anticuerpo Pan-MENA para Citometría**

R1f. Anticuerpo monoclonal de ratón pan-MENA (BD Biosciences, USA).

R2f. Solución de Saponina al 0.1%.

Mezclar 1 µl del R1f en 500 µl del R2f. Homogenizar el reactivo y conservar a 4°C ± 2°C protegiendo de la luz.

**Rx7. Reactivo de Trabajo para proliferación celular MTS.**

R1g. Reactivo CellTiter 96 Aqueous One Solution (Promega, USA).

R2g. Fenazina Metosulfato (Promega, USA).

Extraer 2 ml del reactivo R1g de manera aséptica y transferir a un tubo de ensayo. Añadir 100  $\mu$ l del reactivo R2g girando suavemente el tubo para asegurar una mezcla homogénea. Mantener en refrigeración a  $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .