



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Determinación de la expresión de Ube2i3; posible papel del AhR en el desarrollo de cáncer cervicouterino.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

P R E S E N T A

NAVARRETE RAMÍREZ ROSA MARÍA

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Octavio Daniel Reyes Hernández

ASESOR INTERNO: Dr. Luis Sánchez Sánchez.



CD. México, 2017



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

"ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.**

Comunico a usted que la alumna **NAVARRETE RAMÍREZ ROSA MARÍA**, con número de cuenta **308227978**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **30 de mayo de 2017** a las **11:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE Dr. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO

VOCAL Dr. OCTAVIO DANIEL REYES HERNÁNDEZ

SECRETARIO M. en C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ

SUPLENTE Dr. HUGO LÓPEZ MUÑOZ

SUPLENTE Dra. ITZEN AGUIÑIGA SÁNCHEZ

por pte de

El título de la tesis que presenta es: **Determinación de la expresión de Ube213; posible papel del AhR en el desarrollo de cáncer cervicouterino.**

Opción de titulación: Tesis

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad de México, a 25 de abril de 2017

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"
DIRECCIÓN

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Citogenética y Diagnóstico Molecular del Hospital Juárez de México bajo la dirección del Dr. Octavio Daniel Reyes Hernández y la asesoría del Dr. Luis Sánchez Sánchez, de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza así como de los miembros del comité evaluador.

Cd. México, 2017

“Después de todo ¿Qué es un científico? Es un hombre curioso mirando a través del ojo de una cerradura, la cerradura de la naturaleza, tratando de saber lo que está sucediendo”

- Jacques Yves Cousteau

“Si he logrado ver más lejos, ha sido porque he subido a hombros de gigantes”

-Isaac Newton

Dedicatoria

A mi mamá Carmen Navarrete por todo tu esfuerzo y por estar a mi lado en cada momento de mi vida, por tus sacrificios, por guiarme, protegerme y apoyarme incondicionalmente. Gracias por todo, mis triunfos siempre serán tus triunfos.

A mi abuela Consuelo Ramírez, aunque ya no te encuentres aquí siempre serás parte de mi crecimiento. Gracias por fomentar humanidad y buenos valores en mí, por apoyarme, cuidarme, creer en mí y estar a mi lado. Siempre te llevaré conmigo a donde vaya.

A mi hermano Erik Navarrete, por ser la persona que me impulsa a ser mejor cada día, y mostrarme que siempre existirá alguien que siga tus pasos, alguien que cree en ti y que te apoyará en todo momento. Siempre he admirado tu fortaleza y tu gran corazón.

A Fernando J. Estudillo, por compartir tu vida conmigo, por apoyarme siempre, por cada momento y palabra en el momento preciso, por la paciencia, apoyo incondicional y el crecimiento mutuo. Gracias por mostrarme el camino cuando no es claro.

A Rosy Avigdor, por su entereza y tanto apoyo, por ser una persona muy importante en mi vida, por sus consejos, su ejemplo y por ser la persona que siempre esperó lo mejor de mí. Madrina, gracias por todo. Estaré eternamente agradecida.

A Arnaldo Saenz por ser la persona que me proporcionó los mejores consejos de vida, que me orientó para continuar mi crecimiento académico, por todo su apoyo y generosidad.

A mis amigos de la Facultad Adrián, Clari, Poncho y Axel. Todo fue mejor estando con ustedes. Les agradezco su compañía, amistad, risas y los momentos difíciles que superamos juntos. Espero poder encontrarnos después en el ámbito profesional y continuar compartiendo conocimiento y nuevos momentos. Los extrañaré muchísimo.

A mis amigas Mich, Ari y Laura por su incondicionalidad, por ser las mejores amigas que alguien puede tener, me siento muy afortunada de encontrar confianza y hermandad en ustedes. Gracias por todos los momentos compartidos, por todos los consejos y acompañarme en cada momento. Las Quiero mucho.

A todos los profesores que he tenido a lo largo de mi vida académica, porque son una pieza fundamental en cada persona. Gracias por todo el conocimiento proporcionado, por su entrega compromiso y dedicación.

Agradecimientos

A mi director de Tesis: **Dr. Octavio Daniel Reyes Hernández.**

Muchas gracias por todo el apoyo, paciencia, disposición, por creer en mí, por enriquecer mi formación académica y por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo.

A mi asesor: **M. en C. Luis Sánchez Sánchez.**

Gracias por darme la oportunidad de ampliar mi panorama académico, por la disposición, paciencia y sus todos sus aportes.

A todos los miembros de mi jurado:

Dr. Juan José Rodríguez Mercado

Dr. Hugo López Muñoz

Dra. Itzen Aguiñiga Sánchez

Por su tiempo y todas sus observaciones para enriquecer mi trabajo.

A la M. en C. Mónica Sierra Martínez.

Por su apoyo para que pudiera ser parte del laboratorio de citogenética y diagnóstico molecular así como su disposición.

Al Dr. Enoc Mariano Cortés Malagón.

Por todos sus aportes, sugerencias y apoyo.

A la Dra. Sofía Lizeth Alcaraz Estrada.

Muchas gracias por su paciencia, su tiempo y por compartir sus conocimientos que enriquecieron enormemente mi formación académica, por el gran apoyo y la confianza que me brindo durante mi estancia en el laboratorio.

A la MCIB. Claudia Vanessa Arellano Gutiérrez.

Gracias por su compañerismo, por compartir todo su conocimiento, paciencia, dedicación, amabilidad y por su amistad.

A la Lic. Samantha Deyane Galván Reyes.

Por su amistad, apoyo, por compartir y adquirir conocimiento juntas.

ÍNDICE

1.-ABREVIATURAS	1-2
2.-RESÚMEN	3-4
3.-MARCO TEÓRICO	
3.1 Aparato reproductor femenino	
3.1.1 Anatomía del cérvix.....	5-7
3.2 Adaptación celular	
3.2.1 Displasia.....	7
3.2.2 Hiperplasia.....	8
3.2.3 Metaplasia.....	8
3.3 Neoplasias y cáncer cervicouterino	8-9
3.3.1 Estadísticas.....	9-10
3.4 Virus del Papiloma Humano	
3.4.1 Etiología.....	10-11
3.4.2 Ciclo de replicación.....	11-13
3.4.3 Infección por VPH y desarrollo de malignidad.....	13-16
3.5 P53	
3.5.1 Localización y estructura.....	17
3.5.2 Funciones de la proteína p53.....	18
3.5.3 Regulación de la actividad de p53.....	19-21
3.6 Sistema Ubiquitina Proteasoma (SUP).....	21-23
3.7 Ube2L3.....	23-24
3.8 Receptor de Hidrocarburos Arilo (AhR).....	24-27
3.9 Citocromo P450.....	28-29
3.9.1 Familia CYP1A1.....	29-30
4. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	31
5. HIPÓTESIS	32
6. OBJETIVOS	
6.1 General.....	33
6.2 Particulares.....	33
7. MATERIAL Y MÉTODO	
7.1 Material Biológico.....	34
7.2 Extracción de ARN de tejido mediante técnica TRizol.....	34
7.3 Integridad de RNA total: Electroforesis en Gel de agarosa.....	35
7.4 Síntesis de ADNc a partir de ARNm.....	35-36
7.5 Amplificación ADNc RT-PCR.....	37
7.6 Extracción y purificación de ADN.....	38
7.7 Cuantificación de ADN.....	38
7.8 Homogeneización del tejido.....	39
7.9 Cuantificación de proteína por BCA (Ácido bicinconínico).....	39-40
7.10 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	
7.10.1 Preparación de la muestra.....	40
7.10.2 Preparación del Gel y corrida.....	41-42
7.11 Western Blot	

7.11.1	Transferencia semi-húmeda a la membrana de nitrocelulosa.....	42-43
7.11.2	Inmunodetección.....	43-44
7.12	Análisis estadístico de resultados.....	44
8.-	RESULTADOS.....	45-51
9.-	DISCUSIÓN.....	52-54
10.-	CONCLUSIONES.....	55
11.-	PERSPECTIVAS.....	56
12.-	BIBLIOGRAFÍA.....	57-63

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Amortiguador para electroforesis TAE 50X

Tabla 2. Mix I síntesis de ADNc.

Tabla 3. Mix II síntesis de ADNc.

Tabla 4. Diseño de oligonucleótidos.

Tabla 5. Condiciones de reacción de la RT-PCR.

Tabla 6. Reactivos para PCR.

Tabla 7. Composición de amortiguador RSB/NP40.

Tabla 8. Diluciones de BCA.

Tabla 9. Preparación del gel separador de poliacrilamida al 15%.

Tabla 10. Preparación del gel concentración de poliacrilamida al 15%.

Tabla 11. Amortiguador de carga de proteínas.

Tabla 12. Amortiguador de corrida electroforesis proteína 10x. (para 1 L).

Tabla 13. Composición Buffer de Transferencia Semi-Humeda. 1x (para 1L).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Unión escamo-columnar del cérvix.

Figura 2. Incidencia y mortalidad de cáncer cervicouterino en mujeres mexicanas.

Figura 3. Mortalidad por diferentes tipos de cáncer a nivel mundial.

Figura 4. Genoma viral del VPH.

Figura 5. Ciclo del VPH.

Figura 6. Replicación de las partículas del virus del papiloma humano.

Figura 7. Las oncoproteínas y las vías de señalización reguladora del crecimiento negativo de la célula huésped.

Figura 8. Participación de las oncoproteínas E6 y E7 en el desarrollo de cáncer

Figura 9. Esquema del SUP.

Figura 10. Activación del AhR.

Figura 11. Mecanismo básico de inducción de CYP1A1 y CYP1A2.

Figura 12. Amplificación de los genes *GAPDH* y *Ube2I3* a partir de ADNc de biopsias cervicales.

Figura 13. Niveles de ARNm del gen *Ube2I3* de tejido sin cáncer y tejido canceroso de cérvix.

Figura 14. Amplificación de los genes *GAPDH* y *CYP1A1* a partir de ADNc de biopsias cervicales con CaCu.

Figura 15. Niveles de ARNm del gen *GAPDH* y *CYP1A1* de tejido canceroso de cérvix.

Figura 16. Membrana de nitrocelulosa teñida con rojo de Ponceau.

Figura 17. Bando obtenido por medio de Western Blot.

Figura 18. Expresión de la proteína *Ube2I3* en el grupo control y en el grupo CaCu.

Figura 19. Bando obtenido por medio de Western Blot.

Figura 20. Expresión de la proteína *Ube2I3* en el grupo control y en el grupo CaCu.

1.- ABREVIATURAS

- **ADN:** Ácido desoxirribonucleico.
- **AhR:** Receptor de hidrocarburos Arilo.
- **ARN:** Ácido ribonucleico.
- **ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero.
- **ATP:** Adenosin trifosfato.
- **b(a)p:** Benzo (a) pireno.
- **BCA:** Ensayo con ácido bicinconínico.
- **CaCu:** Cáncer cervicouterino.
- **CDK:** Quinasas dependientes de ciclina.
- **g:** Gramo.
- **GAPDH:** Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.
- **HAH:** Hidrocarburos aromáticos halogenados.
- **Kb:** Kilobase.
- **kDa:** Kilodaltones.
- **L:** Litro.
- **LCR:** Región de control reguladora.
- **nm:** Nanómetros.
- **mL:** Mililitro.
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud.
- **ORF:** Marco abierto de lectura.
- **PM:** Peso molecular.
- **PAH:** Hidrocarburos aromáticos policíclicos.
- **pb:** Pares de bases.
- **pH:** Potencial hidrógeno.
- **pRB:** Proteína retinoblastoma.

- **RBS:** Tampón de señalización recesivo.
- **RT-PCR:** Retrotranscripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa.
- **SUP:** Sistema ubiquitina proteasoma.
- **Ube2I3:** Enzima ubiquitinadora tipo E2 de conjugación.
- **UBEs:** Enzimas ubiquitinadoras.
- **UEC:** Unión escamo-columnar del cérvix.
- **VPH:** Virus del Papiloma Humano.
- **XRE:** Elemento de respuesta a xenobióticos.
- **µg:** Microgramo.
- **µL:** Microlitro.

2.- RESÚMEN

Según GLOBOCAN el CaCu es el segundo cáncer más común en incidencia y mortalidad en las mujeres mexicanas y a nivel mundial ocupa el cuarto lugar en mortalidad.

El virus del papiloma humano (VPH) se ha considerado como la segunda infección más común entre mujeres de todo el mundo. Es un virus que no presenta una sintomatología clara y evidente hasta un tiempo considerable después de la infección primaria; éste se encuentra fuertemente asociado con el desarrollo de lesiones benignas (condilomas o papilomas) fácilmente controlables; sin embargo, los VPH de alto riesgo como el 16 y 18 que infectan el tracto genital, están asociados con la formación de lesiones malignas o precancerosas que pueden derivar en cáncer cervicouterino (CaCu).

Por otra parte, existen otros factores que promueven el desarrollo de cáncer, como la activación del receptor de hidrocarburo arilo (AhR) el cual, se une con alta afinidad a los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) que se encuentran en diferentes fuentes como el humo del tabaco, las emisiones de los motores diesel y el consumo de combustibles como el carbón. Estudios en ratones genéticamente modificados sugieren que el AhR tiene un papel importante en la carcinogénesis. Este factor activado a través de su heterodimerización induce la expresión de genes diana que codifican para enzimas implicadas en desintoxicación, tanto de la fase I (citocromos P450, CYP450) como de la fase II (transferasas).

Sin embargo, el papel del AhR no se limita a ser el mediador de efectos tóxicos por exposición a compuestos como los HAP, ya que recientemente se ha observado que es el responsable de la expresión de genes que participan en la ubiquitinación de proteínas (las cuales posteriormente son degradadas). La ubiquitinación consistente en la adición de una o varias moléculas de ubiquitina, una proteína

pequeña, de manera covalente a proteínas blanco en residuos de lisina. Existe poca información acerca de la regulación transcripcional de los genes que codifican ubiquitina.

Por lo tanto, se investigó el papel del AhR en la modulación del sistema ubiquitina proteasoma a través de la regulación de la transcripción del gen *Ube2I3*, una enzima de conjugación de ubiquitina, la cual está implicada en la ubiquitinación y degradación de la proteína p53 utilizando como modelo de estudio tejido de endocérvix canceroso positivo para VPH 16 y 18 y tejido sin cáncer. Se realizó RT-PCR para medir los niveles de transcrito de los genes *Ube2I3* y *CYP1A1* y a nivel de proteína se realizó por medio de Western blot, utilizando como proteína constitutivas GAPDH.

Los resultados sugieren una tendencia en el aumento de los niveles de transcrito de *Ube2I3* y *CYP1A1* del grupo CaCu respecto al grupo control así como en los niveles de proteína, sin embargo, debido al valor de (p) dado por la prueba estadística U de Mann-Whitney, no es significativo teniendo una $p=0.1489$ en ARNm y $p=0.2812$, $p=0.3865$ a nivel de proteína.

3.- MARCO TEÓRICO

3.1 APARATO REPRODUCTOR FEMENINO

Los órganos genitales femeninos incluyen la vagina, el útero, las trompas uterinas y los ovarios. (Castillo, 2011).

El útero es un órgano muscular hueco piriforme y de pared gruesa, situado en la pelvis menor, normalmente en anteversión con el extremo hacia delante en relación con el eje de la vagina y flexionado anteriormente en relación con el cuello uterino. La posición del útero cambia con el grado de plenitud de la vejiga y el recto. El útero se divide en dos porciones principales:

- El cuerpo: forma los dos tercios superiores y tiene dos porciones, el fondo –la porción redondeada del cuerpo situada por encima de los orificios de las trompas uterinas- y el istmo –la región del cuerpo relativamente contraída inmediatamente por encima del cuello uterino. (Castillo, 2011).
- El cuello: la porción inferior estrecha que protruye en la parte superior de la vagina. (Castillo, 2011).

3.1.1 Anatomía del cérvix

El cérvix o cuello uterino se compone de diferentes tipos de células epiteliales, el canal cervical medio y el cérvix superior están compuestos por epitelio columnar secretor, originado embriológicamente de la invaginación de los conductos müllerianos. (Yoshikazu *et al.*, 2003)

La vagina y el ectocérvix distal están compuestos de epitelio escamoso, estas células escamosas reemplazan las células columnares müllerianas originales

cuando se forma el canal útero vaginal. Existe un pequeño potencial neoplásico para este tipo celular. (Warren *et al.*, 2009)

La unión escamo-cilíndrica (UEC) es el punto donde las células escamosas y columnares se encuentran. Esta unión se encuentra típicamente entre el ectocérnix central y el canal cervical inferior, pero la localización varía a lo largo de la vida de la mujer, por el desarrollo fetal y la menopausia. La unión escamo-cilíndrica original es una zona de transformación. La transformación normal de un tipo celular maduro en otro es llamada metaplasia. Cuando la metaplasia ocurre, existe siempre un potencial neoplásico. (Fig. 1) (Chavaro *et al.*, 2009).

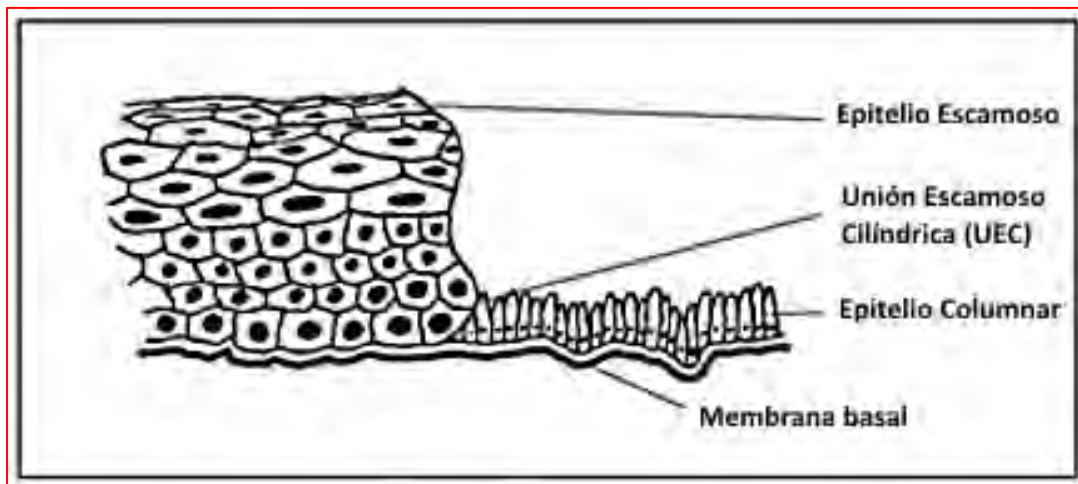


Figura 1. Unión escamo-columnar del cérvix. Epitelio escamoso estratificado conformado de una capa ancha, que en su parte superior está estructurada por capas de células planas. El epitelio columnar está conformado por una sola capa de células alargadas, que cubre el canal cervical y se extiende hacia el exterior a una zona variable del exocérnix. Es mucho más delgada y frágil que el epitelio escamoso del exocérnix y contiene varias glándulas que lubrican el canal. La unión escamoso-cilíndrica (UEC) es donde los dos tipos de epitelios se unen. (Tomado de: <http://cancercervicouterino.com.mx/anatomía-básica-del-cérvix/>).

En las mujeres en edad reproductiva, la UEC se mueve hacia afuera por influencia hormonal. El pH ácido vaginal provoca irritación mecánica que induce el proceso de metaplasia escamosa, resultando una nueva UEC. Esta área entre la original y la nueva UEC es referida como la zona de transición. Las células escamosas inmaduras metaplásicas en esta zona de transformación son teóricamente las más vulnerables a neoplasia. (Warren *et al.*, 2009).

La mayoría de los carcinomas de células escamosas se originan en la UEC. En mujeres jóvenes la UEC es localizada fuera del orificio cervical externo y el tumor tiende a crecer hacia afuera (crecimiento exofítico), en contraste, en pacientes de mayor edad, la UEC es localizada en el canal cervical, por lo que el cáncer cervical tiende a crecer hacia adentro, a lo largo del canal cervical (crecimiento endofítico). Las células de reserva en la unión escamocolumnar han sido vigiladas con interés como origen del adescocarcinoma cervical. Sin embargo, la mayoría de los adenocarcinomas cervicales surgen en la unión escamocolumnar. (Jhingran, 2008).

3.2 ADAPTACIÓN CELULAR

Se define como la respuesta de las células ante estímulos fisiológicos excesivos o patológicos, mediante la cual consiguen mantener, aunque algo alterado un estado de equilibrio relativo que les permite preservar la viabilidad y función de la propia célula. (Rubiano, 2008).

Estas adaptaciones celulares pueden ser debidas a numerosos mecanismos: por la estimulación o inhibición de receptores celulares específicos implicados en el metabolismo, por la estimulación directa de las células por factores producidos por otras células o por la misma célula (crecimiento celular), inducción de síntesis de nuevas proteínas producidas por células efectoras y también pueden estar relacionadas con el cese de alguna familia de proteínas y su sustitución por otra. (Rubiano, 2008).

3.2.1 Displasia

La displasia (*dis*, “malo”; *plasia*, “formación”) es una condición en la cual se alteran el desarrollo y maduración celulares. Las células individuales varían en tamaño y forma y su relación una con otra también anormal. La displasia de las células epiteliales puede ser consecuencia de la irritación o inflamación crónica. En algunos casos, la displasia puede progresar a la formación de un tumor, lo que se conoce

como neoplasia. El epitelio que recubre el cuello uterino es un sitio común de displasia, y la displasia epitelial del cuello uterino en ocasiones progresa a cáncer cervicouterino. (Crowley, 2013).

3.2.2 Hiperplasia

Es el incremento en el tamaño de tejidos u órganos por aumento en el número de células. La hiperplasia ocurre en respuesta al incremento de la demanda. (Crowley, 2013).

3.2.3 Metaplasia

La metaplasia es un cambio de un tipo celular a otro tipo, que es mejor para tolerar algunas condiciones ambientales adversas. (Crowley, 2013).

3.3 NEOPLASIAS Y CÁNCER CERVICOUTERINO

Las neoplasias son masas anormales de tejido que crecen de forma incontrolada, excesiva, autónoma e irreversible, superando a los tejidos normales en velocidad de crecimiento y que poseen rasgos funcionales y morfológicos diferentes a los de sus precursoras. Esta proliferación de células persiste incluso tras la desaparición del estímulo que la desencadenó. (Soimout, 2007).

Las neoplasias están divididas en neoplasias malignas y neoplasias benignas. Las neoplasias malignas son todas aquellas enfermedades en las que existen células anormales que se multiplican sin control y que invaden los tejidos cercanos. Estas células se pueden diseminar a otras partes del cuerpo a través del torrente sanguíneo y el sistema linfático. Existen varios tipos de estas neoplasias que se identifican de acuerdo al lugar en el que aparecen. El carcinoma empieza en la piel o en los tejidos que revisten o cubren los órganos internos. A toda neoplasia maligna, también se le llama cáncer. Las neoplasias benignas son aquellas enfermedades en donde existe alteración en las células de los tejidos, lo que produce un aumento en

su volumen, pero no tienen la capacidad de extenderse a otras partes del cuerpo. (Soimout, 2007).

La neoplasia intraepitelial cervical es una lesión que se considera la antecesora del cáncer cervicouterino (CaCu). La infección por el virus del papiloma humano (VPH) en el aparato genital, sobre todo algunos subtipos llamados oncogénicos, juega un papel relevante en la aparición de las lesiones intraepiteliales y su posible evolución al cáncer invasor en esas localizaciones. Existe además un importante grupo de factores de riesgo o cofactores que asociados a la infección por el VPH pueden producir esos cambios celulares en el cérvix. (Sarduy, 2009).

3.3.1 Estadísticas

Según GLOBOCAN (2012) el CaCu es el segundo cáncer más común en incidencia y mortalidad de las mujeres mexicanas y el tercero en ambos casos tomando en cuenta la población de hombres y mujeres. (Fig. 2). A nivel mundial ocupa el cuarto lugar en mortalidad. (Fig. 3).

En 2012, aproximadamente 270 000 mujeres murieron de CaCu; más del 85% de esas muertes se produjeron en países de ingresos bajos y medianos. (OMS, 2015).

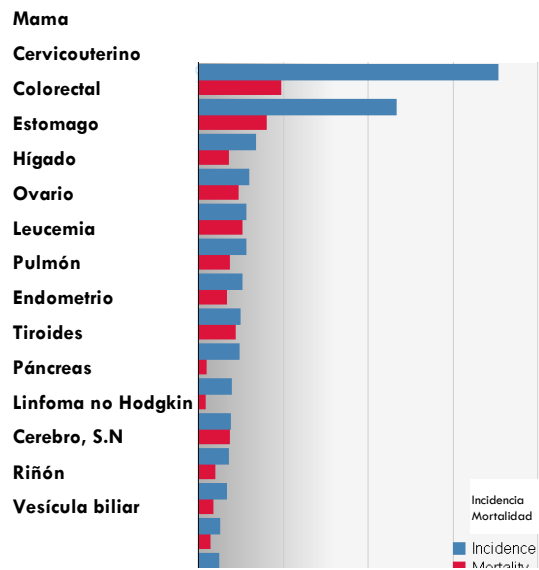


Figura 2. Incidencia y mortalidad de cáncer cervicouterino en mujeres Mexicanas. (Tomado y modificado de: GLOBOCAN, 2012).

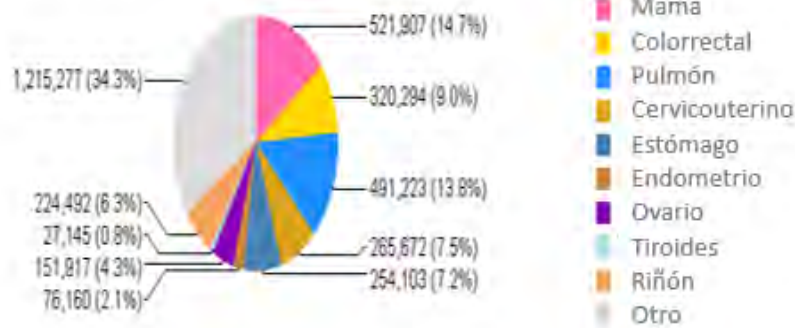


Figura 3. Mortalidad por diferentes tipos de cáncer a nivel mundial. (Tomado y modificado de: GLOBOCAN, 2012).

3.4 VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH)

3.4.1 Etiología

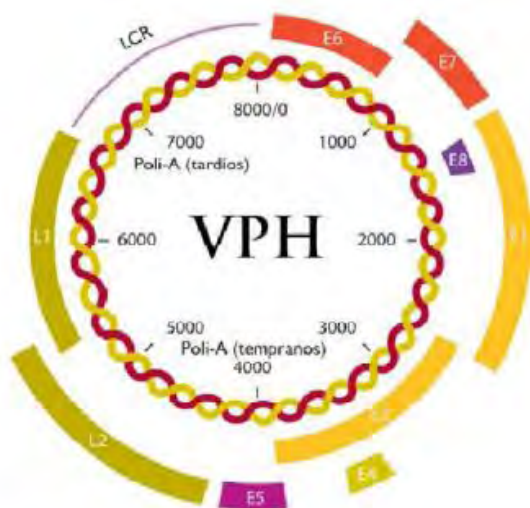


Figura 4. Genoma viral del VPH. Se muestra las regiones que codifican para proteínas tempranas y tardías, mostrando en rojo las que tienen una acción importante en la transformación celular y la generación del cáncer (Tomado de López y Lizano, 2006).

Los papilomavirus son miembros de la familia Papovaviridae, que también incluye el virus del polimovirus y el virus vacuolador del simio. (Burd, 2003).

El VPH es un virus relativamente pequeño, no envuelto, de 55 nm de diámetro. Tiene una cápside icosaédrica compuesta de 72 capsómeros, que contienen al menos dos proteínas de la cápside, L1 y L2. Cada capsómero es un pentámero de la proteína principal de la cápside, L1. Cada cápside del virión contiene varias copias (aproximadamente 12 por virión) de la proteína menor de la cápside, L2. (Burd, 2003).

El genoma del VPH consiste en una única molécula de ADN circular de doble cadena que contiene aproximadamente 7900 pb asociado con histonas. (Burd, 2003).

Todas las secuencias de codificación de proteínas de marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés) están restringidas a una cadena. El genoma está funcionalmente dividido en tres regiones. El primero es una región reguladora no codificante río arriba de 400 a 1000 pb, que se ha denominado región no codificante, región de control (LCR, por sus siglas en inglés) o la región reguladora superior. Esta región contiene el promotor del núcleo p97 junto con secuencias intensificadoras y silenciadoras que regulan la replicación del ADN controlando la transcripción de los ORF. Esta región también contiene el mayor grado de variación en el genoma viral. El segundo es una región temprana, que consiste en ORFs E1, E2, E4, E5, E6 y E7, que están implicados en la replicación viral y la oncogénesis. La tercera es una región tardía, que codifica las proteínas estructurales L1 y L2 para la cápside viral. (Fig. 4) (Burd, 2003).

3.4.2 Ciclo de replicación

El ciclo de los VPH está estrechamente ligado al crecimiento y diferenciación de las células epiteliales hospederas. El VPH inicia su ciclo replicativo infectando a las células poco diferenciadas de las capas basales del epitelio, donde inicia la transcripción de sus genes. La forma en que el VPH alcanza las células de los estratos bajos del epitelio es a través de lesiones, micro heridas y abrasiones del tejido. El virus se une a su célula blanco a través de un receptor de membrana, la molécula $\alpha 6$ -Integrina. Una vez ocurrida la infección, el virus se establece dentro del núcleo de las células basales. El ADN viral permanece en estado episomal (circular) fuera de los cromosomas del hospedero, replicándose a niveles muy bajos en coordinación con la división celular. (Fig. 5) (Sanabria *et al.*, 2011).

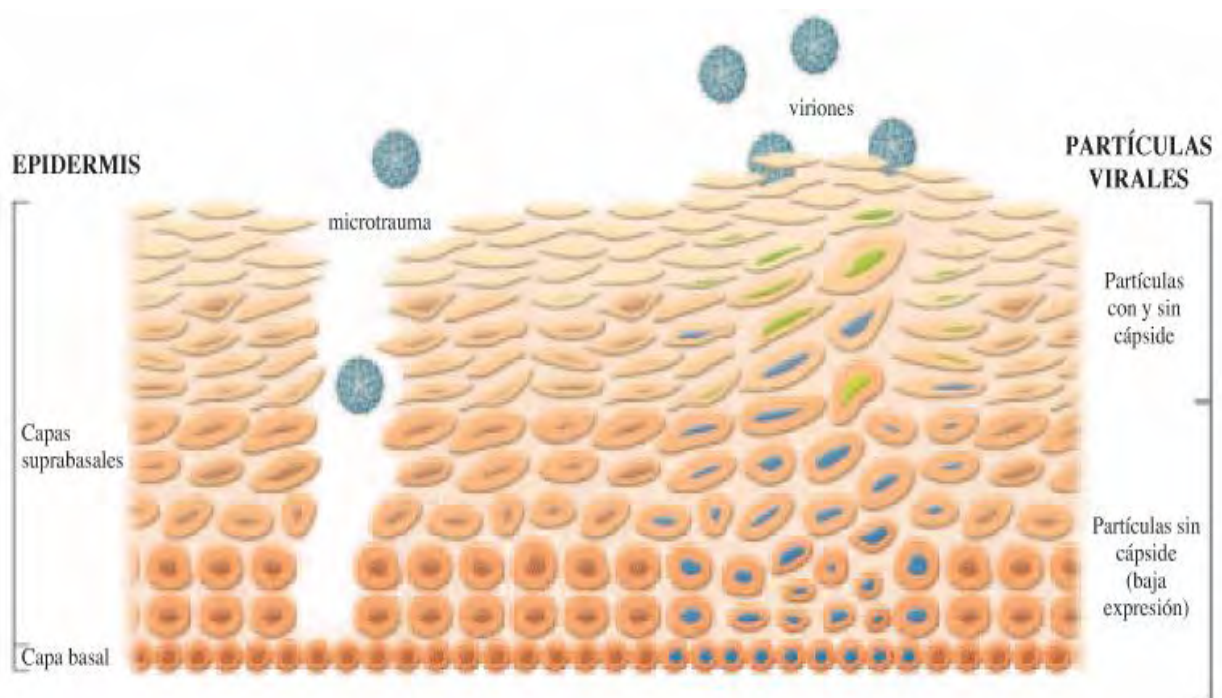


Figura 5. Ciclo del VPH. Un microtrauma en las capas suprabasales del epitelio de la unión escamo-columnar facilita la infección del virus en las capas basales, permaneciendo en situación episómica con baja expresión. La replicación y expresión viral se produce en las capas superiores, induciendo alteraciones en el epitelio. Las nuevas partículas virales se liberan con la descamación de las células superficiales y diferenciadas del epitelio escamoso. (Tomado y modificado de: Lowy *et al.*, 2006)

El ciclo de replicación del VPH puede dividirse en dos etapas: una productiva y otra no productiva. (De la Cruz *et al.*, 2005).

En la etapa no productiva, el genoma vírico permanece como un elemento extracromosomal en forma de episoma (elemento genético autorreplicativo). Este evento ocurre en las células basales del epitelio estratificado, donde el virus replica su ADN para mantener un número de 50-100 copias del genoma dentro de las células basales y parabasales. Al dividirse la célula infectada, una de las células hijas permanece en la parte basal del epitelio, mientras que la otra célula inicia un proceso de diferenciación en la parte superior del epitelio. El virus necesita la maquinaria replicativa de la célula para la síntesis del ADN vírico, la cual es poco eficiente en las células diferenciadas. Sin embargo, el virus estimula la progresión de la fase celular

G1-S en una célula diferenciada y de esta forma produce un ambiente adecuado para la replicación del ADN. (De la Cruz *et al.*, 2005)

En la etapa productiva, el genoma vírico se amplifica de modo que aumenta el número de copias presentes en la célula y se expresan los genes tardíos que codifican a las proteínas de la cápside. Los promotores tardíos que regulan la transcripción del ARNm que codifica las proteínas de la cápside (L1 y L2), se activan solamente en células parcialmente diferenciadas. La síntesis de las proteínas de la cápside sólo ocurre dentro del programa de diferenciación celular, dado que puede observarse exclusivamente en los estratos superiores del epitelio y no en las placas basales. Debido a que la producción de las partículas víricas está restringida a las placas superiores del epitelio, las células basales no son lisadas durante la producción de los viriones, y así la infección permanece durante largos períodos. (De la Cruz *et al.*, 2005).

Podría pensarse que el ciclo vírico productivo y no productivo ocurre de forma independiente, pero sucede dentro de la misma célula. De esta forma las células infectadas y parcialmente diferenciadas amplifican el ADN vírico en la placa granular, transcriben y traducen los genes tardíos en la parte superior del epitelio, donde se ensamblan las partículas víricas infecciosas. (De la Cruz *et al.*, 2005).

3.4.3 Infección por VPH y desarrollo de malignidad

El carácter oncogénico del VPH se debe a que carece de ADN y ARN polimerasas requeridas para el ciclo vital viral, por lo que debe integrar su genoma al de la célula huésped y conducirla a un estado proliferativo para inducir la producción de proteínas de replicación. (De Guglielmo Z *et al.*, 2010).

Las oncoproteínas virales E6 y E7 interaccionan con las proteínas supresoras tumorales del huésped p53 y pRb, llevando a la célula infectada a procesos de hiperproliferación e inmortalización que pueden ser revertidos molecularmente. Para completar su ciclo, el virus debe dejar el control de la célula, por lo que se activa el

regulador viral E2, cuya función consiste en la regulación negativa de la transcripción de los oncógenes virales E6 y E7; esto permite la expresión de las proteínas de la cápside viral L1 y L2, así como el reclutamiento de ADN polimerasas celulares para la replicación intensiva de genomas virales. (Fig. 6) (De Guglielmo Z *et al.*, 2010).

Simultáneamente tiene lugar la diferenciación terminal de la célula infectada, produciendo grandes cantidades de viriones infectivos en las escamas queratinizadas convertidas en cápsulas de VPH que se liberan al medio al igual que las células epiteliales no infectadas. La asociación de la proteína E6 con la p53 resulta en la degradación proteosomal ubiquitina-dependiente de esta proteína supresora de tumor; E6 también puede enlazarse, por lo menos, a otras doce proteínas celulares. Por su parte, E7 puede interaccionar con la proteína supresora de tumor (pRB) marcándola para su degradación, lo cual resulta en la liberación del factor de transcripción E2F y la consecuente progresión incontrolada del ciclo celular (ko *et al.*, 2003)

E7 inhibe las funciones de p21 por la unión directa y contribuye de este modo, a la actividad de las quinasas dependientes de ciclina (CDK). Las CDK son las más importantes en el ciclo de división celular. La expresión de las ciclinas E y A y el regulador de subunidades de CDK2, conducen la progresión y entrada a la fase S, las cuales están bajo control de E2F y ambos son expresados en elevadas concentraciones en células que expresan a E7. (Fig. 7) (Félix y Beltrán, 2014).

El resultado observable de la infección por VPH es la aparición de cúmulos de células de naturaleza benigna conocidas como verrugas o condilomas, en las cuales el genoma viral se encuentra en forma episomal. No obstante, la combinación de células altamente proliferativas y la replicación de genomas de VPH pueden ocasionar que el genoma del virus se rompa y se integre al genoma celular. Esta integración interrumpe el ciclo del virus, interrumpiendo la continuidad del gen E2, se produce la expresión constitutiva de E6 y E7. Incapaces de producir más virus, los genes de VPH llevan a la célula a un estado proliferativo descontrolado y permanente en ausencia de la proteína p53, lo que en conjunto puede producir y mantener

alteraciones en genes celulares que promueven la formación de un tumor. (Álvarez, 2006).

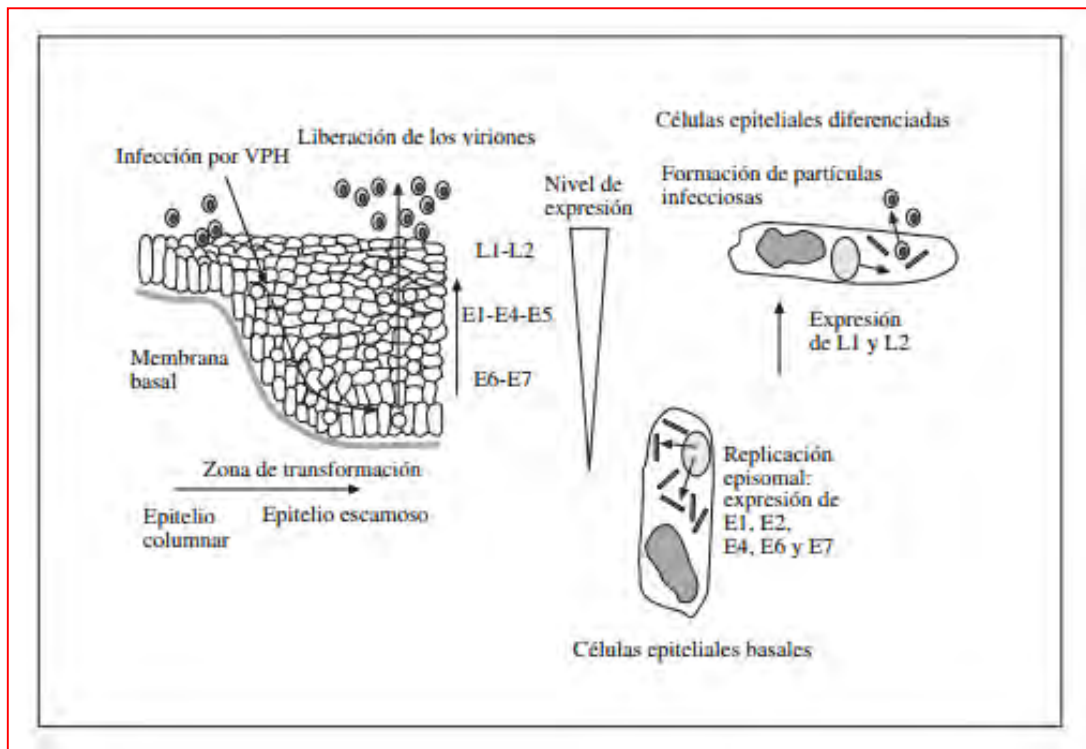


Figura 6. Replicación de las partículas del virus del papiloma humano (VPH). En las células basales, la expresión de los genes víricos está controlada por factores celulares, mientras que en los estratos superiores, las células infectadas amplifican el genoma vírico. Finalmente, las partículas víricas son liberadas a lo largo de las células escamosas, las cuales son exfoliadas a la superficie del epitelio. (Tomado de: De la Cruz et al., 2004)

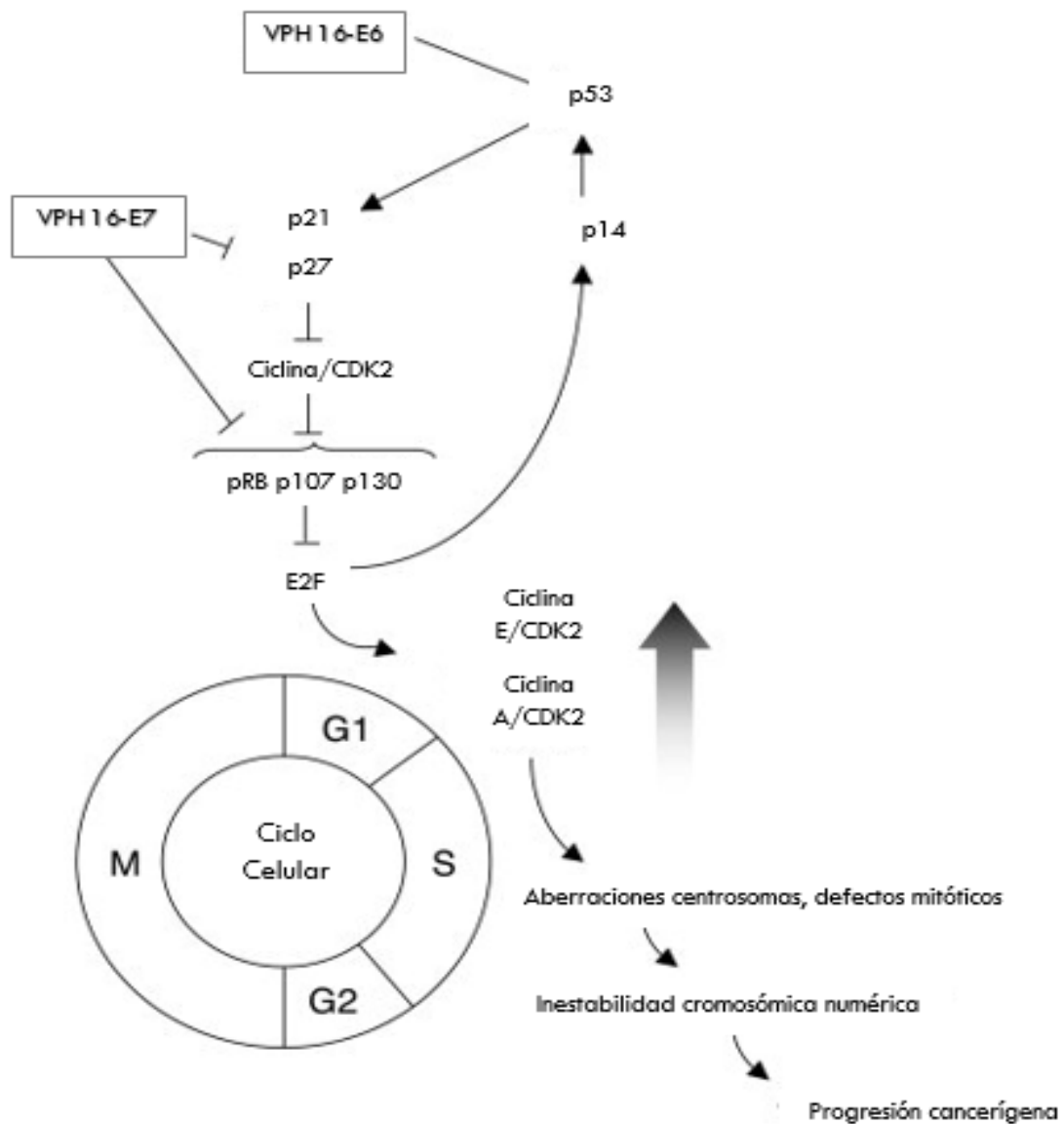


Figura 7. Las oncoproteínas y las vías de señalización reguladora del crecimiento negativo de la célula huésped. La oncoproteína E7 de HPV-16 se une y degrada a pRB y los miembros p107 y p130 de la familia de pRB relacionados. Esto conduce a aberrante E2F mediada por la transcripción de genes y la activación no programada de complejos de la cilina CDK2, así como los niveles elevados de CDC25A. Existe evidencia que sugiere que la actividad de CDK2 desregulada puede dar lugar a una duplicación anormal del centrosoma lo que conduce a un mayor riesgo de desregulación cromosómica, aneuploidía y progresión carcinogénica. La co-expresión de VPH-16 E7 con la oncoproteína E6, que induce una degradación proteasomal acelerada de p53, aumenta aún más la proporción de células con defectos mitóticos relacionados con centrosomas, muy probablemente mediante la abrogación del control de punto de control G2 / M. (Tomado y modificado de: Duensing *et al.*, 2004).

3.5 P53

3.5.1 Localización y estructura

Ya se mencionó que p53 evita un estado proliferativo descontrolado y permanente, de ahí su relevancia en la carcinogénesis en cérvix. Esta proteína deriva del gen *p53* el cual está localizado en el brazo corto del cromosoma 17, banda 13 (17p13.1), y tiene aproximadamente 20 kb. Consta de 11 exones, siendo el primero no codificante y colocado a 8-10 kb de los exones 2-11, produce un transcrito de ARNm de 2,8 kb cuyo resultado es una proteína de 53 kD que tiene 393 aminoácidos. El análisis de los niveles del ARNm de p53 sugiere que el gen se expresa en todos los tejidos corporales durante el desarrollo. (López *et al.*, 2001).

La proteína de tipo silvestre normalmente reside en el núcleo celular y tiene una vida media muy corta en los tejidos normales. Esta proteína está siendo producida constantemente, sin embargo, es rápidamente degradada. (López *et al.*, 2001).

La proteína incluye varios dominios, tales como la región ácida N-terminal para la transactivación, el dominio core contiene una secuencia enlazante al ADN y el dominio terminal tiene propiedades reguladoras. Las modificaciones postranscripcionales de la región terminal por acetilación, fosforilación y O-glicosilación generan cambios conformacionales en p53 que regulan la unión específica a secuencias del ADN así como el reconocimiento de ADN dañado, aunque estos mecanismos no son del todo conocidos. (López *et al.*, 2001).

Normalmente p53 se encuentra en bajos niveles y transcripcionalmente inactivo, el daño genético y celular desencadena un incremento en las concentraciones de la proteína p53 y la activación de la vía post-traducciona. Una vez activado, p53 inicia las vías para la reparación del ADN, el ciclo celular se detiene y toma la vía de apoptosis basado en el grado del daño sobre el ADN. (Félix, 2014).

3.5.2 Funciones de la proteína p53

La proteína p53 es un factor de transcripción capaz de activar y/o inhibir la transcripción de una amplia variedad de genes. Cuando el ADN está dañado p53 se activa para mantener la integridad de la secuencia del ADN, bien por medio de la inhibición de la proliferación celular mientras el daño es reparado, o alternativamente, dirigiendo la célula hacia la apoptosis (Brown, 1997).

Una p53 mutante puede perder su función supresora de tumor, etapa clave que resulta en la cascada neoplásica. Además, p53 es capaz de activar la vía apoptótica, por tanto, su inactivación podría incrementar el grupo de células proliferantes, así como su probabilidad de transformación neoplásica al inhibir la muerte celular programada (Harris y Holstein., 1993).

Por lo tanto, p53 es un factor de transcripción multifactorial, implicado en el control de la progresión del ciclo celular, integridad del ADN y supervivencia de las células expuestas a agentes que dañan al ADN. (López *et al.*, 2001).

Un ejemplo que demuestra la importancia de p53 en la respuesta celular a agentes citotóxicos es que, aproximadamente la mitad de los tumores malignos humanos presentan mutaciones en el gen p53. Estas mutaciones dificultan la capacidad de p53 para desencadenar las vías apropiadas de señalización para reparar el daño o desencadenar la muerte celular cuando la reparación del ADN es casi imposible. Además de los daños genotóxicos y citotóxicos, p53 es también activada por la síntesis incorrecta del ADN, como la inducida durante la infección por el VPH. (Félix, 2014).

3.5.3 Regulación de la actividad de p53

El principal estímulo de respuesta de p53 es el daño celular. La proteína p53 es activada como consecuencia de diversas condiciones de estrés celular, incluido el daño del ADN, cambios de potencial redox de la célula, una reducción en el pool de ribonucleótidos y expresión de oncogenes. (Fritsche, 1993).

La proteína p53 está regulada principalmente de dos maneras:

- a) estabilidad de la proteína.
- b) activación mediante el paso desde un estado latente a un estado activo.

La estabilidad de la proteína p53 está determinada principalmente por la proteína celular mdm2 la cual ha demostrado enlazarse en, o próxima al, dominio de activación transcripcional de p53 para bloquear su función como factor transcripcional. (Oliner, 1993).

Se establece así un mecanismo de retroalimentación negativa entre ambas proteínas. En cuanto a la activación bioquímica de p53, el paso del estado latente al activo, es controlado por la interacción con el ADN dañado mediante modificaciones postranscripcionales de p53 o bien por interacciones proteína-proteína (López *et al.*, 2001).

La proteína silvestre puede existir en una forma latente, incapaz de enlazarse al ADN, la cual puede ser modificada por cambios covalentes en el extremo amino-terminal y en el extremo C-terminal de la molécula (los últimos 30 aminoácidos). Este extremo C-terminal es un dominio regulador negativo, ya que su mera eliminación activa constitutivamente a la proteína (López *et al.*, 2001).

Por otra parte, ciertas interacciones proteína-proteína afectan a la función de p53 como factor de transcripción, así como su capacidad de respuesta celular. Estas interacciones se producen entre p53 y reguladores tanto positivos de su actividad

(HIF-a, c-abl, p300, PARP, WT-1, p19, pRB) como negativos (hsp70, BRCA 2, bcl-2, c-jun) (Sionov y Haupt., 1997).

Además de que la proteína p53 debe ser estable y activa es necesario que se produzca un transporte adecuado de la misma del citoplasma al núcleo que es donde lleva a cabo sus funciones. Todos estos mecanismos de regulación de p53 permiten que la proteína se torne estable y activa cuando la célula tiene lesiones en el ADN, siendo muy inestable en caso contrario. (Hansen y Oren., 1997).

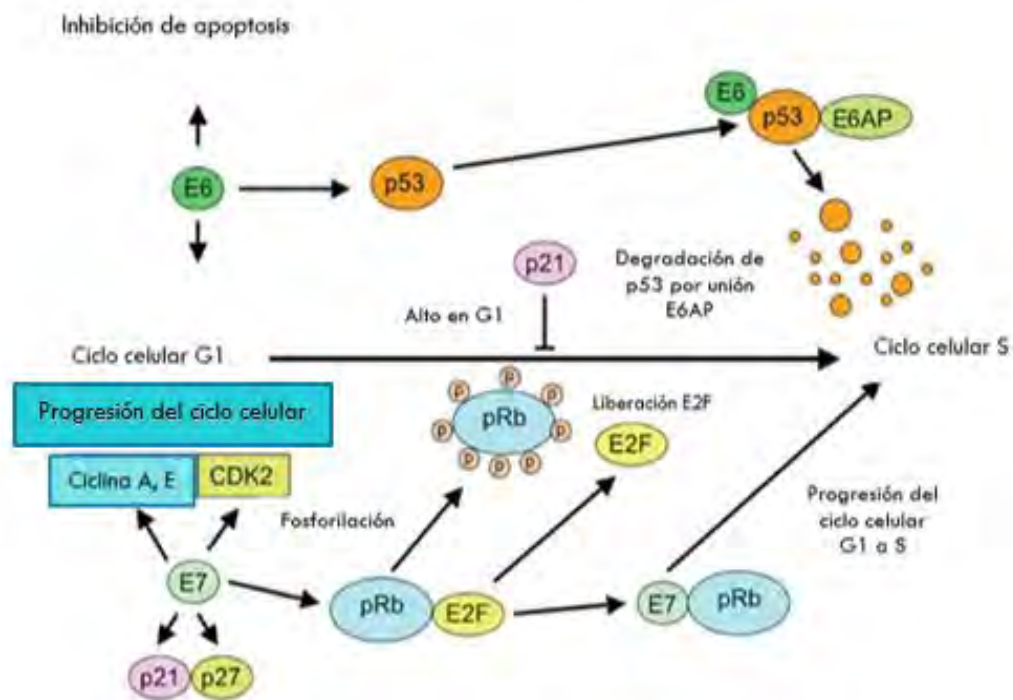


Figura 8. Participación de las oncoproteínas E6 y E7 en el desarrollo de cáncer. Las proteínas E6 y E7 de papiloma humano de alto riesgo juegan un papel crítico en el desarrollo de cánceres asociados al VPH. E7 y E6 reaccionan con los productos del gen supresor tumoral pRb y p53 en las proteínas de la célula huésped, respectivamente, dando como resultado la immortalización celular inducida, la transformación y la carcinogénesis. E7 induce hiperproliferación a través de la inhibición de los miembros de la familia retinoblastoma y la activación constitutiva de E2F genes de respuesta. E6 inhibe la detención del crecimiento dependiente de p53 y la apoptosis, dando como resultado la inducción de la inestabilidad genómica y la acumulación de mutaciones celulares. La degradación de p53 evita la detención normal del crecimiento del ciclo celular de las fases G1 a S. (Tomado y modificado de: Senba y Mori 2012).

En el caso particular del cáncer cervicouterino se presenta un mecanismo alternativo para la inactivación de p53. La región c-terminal de la proteína p53 contiene sitios donde se une la proteína E6 de los VPH, a través de la proteína celular E6AP. Se sabe que la presencia de E6 en este complejo (p53-E6AP-E6) promueve la degradación de p53 a través de la vía de proteólisis dependiente de ubiquitina. (Fig. 8) (Vega *et al.*, 2014).

Algunas líneas celulares derivadas del cáncer cervical y en los tumores que presentan secuencias activas de VPH de los tipos de alto riesgo, la p53 se encuentra normal. Esto se debe a que p53 es inactivado funcionalmente por E6, haciendo innecesaria su inactivación por mutaciones. Los tumores que no contienen secuencias virales presentan generalmente alteraciones de p53. En los casos donde no se detectan secuencias virales ni alteraciones de p53, se sugiere que su función es eliminada por otros mecanismos, tales como la sobre expresión de mdm2. Los datos anteriores sugieren fuertemente que p53 juega un papel muy importante en la carcinogénesis de los tumores del cérvix ya que de una u otra manera se elimina su función. (Vega *et al.*, 2014).

El sistema celular encargado de degradar proteínas como p53 o E7 es conocido como sistema ubiquitina proteasoma 26S (SUP). (De la Cruz *et al.*, 2004)

3.6 SISTEMA UBIQUITINA PROTEASOMA (SUP)

La vía de la ubiquitina-proteasoma es el principal mecanismo en la célula para el catabolismo proteico, interviniendo de manera directa en el funcionamiento y recambio de muchas proteínas reguladoras. Esta importante vía se encuentra involucrada en la regulación de procesos celulares críticos, tales como: control del ciclo celular, reparación del ADN, oncogénesis, catabolismo de proteínas anormales, modulación de la respuesta inmune e inflamatoria, modulación de receptores de superficie y canales iónicos, procesamiento de antígenos, biogénesis de los

ribosomas, transcripción, infección vírica, degeneración neural y muscular, diferenciación celular, respuesta al estrés, etc. (Cascales, 2005).

La degradación de una proteína por el SUP implica dos etapas sucesivas: 1) conjugación covalente de múltiples residuos de ubiquitina a una proteína, y 2) degradación de la proteína ubiquitinada por el complejo proteosoma, con la liberación de trozos de la proteína y de ubiquitina libre reutilizable. Para asegurar la eliminación eficiente de una cierta proteína en un determinado momento, tanto la conjugación de la ubiquitina como la degradación de los sustratos ubiquitinados han de estar estrictamente regulados. (Cascales, 2005).

El proceso de conjugación de la ubiquitina, demostrado por Avram Hershko, es reminiscencia de la activación de los aminoácidos y ocurre en tres etapas: 1) En una reacción dependiente de ATP, el c-terminal de la ubiquitina se conjuga mediante un enlace tioéster con el enzima activadora de la ubiquitina E1; 2) La ubiquitina se transfiere a un grupo -SH de la enzima conjugadora, transportadora de ubiquitinas (E2) y 3) La ubiquitina ligasa E3 transfiere la ubiquitina activada en E2 a un grupo ϵ amino de una lisina de una proteína sustrato formando un enlace isopeptídico. Esto sugiere que E3 es clave en la selección de la proteína a ubiquitinar. (Fig. 9) (Cascales, 2005).

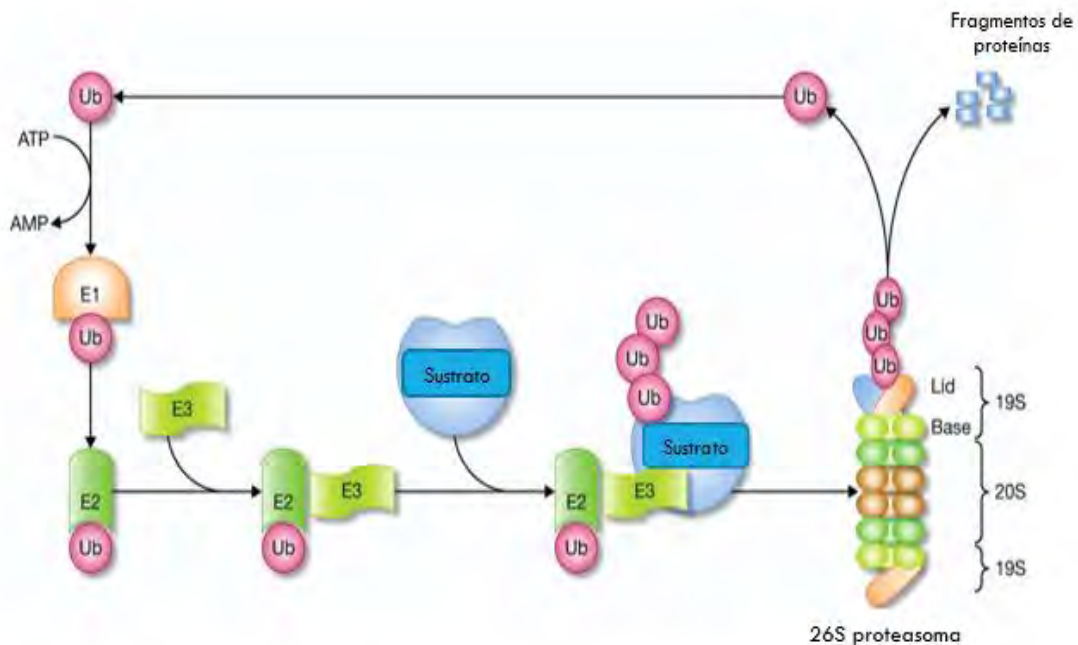


Figura 9. Esquema del SUP. La ubiquitina es activada por la enzima activadora de ubiquitina (E1) y luego transferida a una enzima de conjugación de ubiquitina (E2). E2 transfiere los restos de ubiquitina activados al sustrato de proteína que está unido específicamente a una ubiquitina ligasa particular (E3). La transferencia de ubiquitina tiene lugar directamente (en el caso de las ligas de dedo RING) o mediante un intermediario tior éster adicional sobre la ligasa (en el caso de las ligas del dominio HECT). La conjugación repetida de fracciones de ubiquitina entre sí genera una cadena de poliubiquitina que sirve como la señal de unión y degradación para el proteasoma 26S. El sustrato proteico se degrada, generando péptidos cortos y ubiquitina libre que puede reutilizarse adicionalmente. (Tomado y modificado de: Rahimi, 2012).

3.7 Ube2I3

En la actualidad se sabe que la enzima de conjugación de ubiquitina encargada de ubiquitinar a p53 es Ube2I3, también llamada Ubch7, proteína que en humanos es codificada por el gen *Ube2I3*. Al igual que una enzima E2, Ube2I3 participa en la ubiquitinación para dirigir las proteínas para la degradación. El gen *Ube2I3* se encuentra en el cromosoma 22q11.21, que consta de 6 exones. Se han encontrado dos variantes de transcripción que se codifican para distintas isoformas para este gen. (NCBI, 2016).

Tiene un peso molecular previsto de aproximadamente 18 kDa. La proteína Ubch7 humana comparte una similitud en la secuencia aminoacídica del 100% con los

ortólogos de ratón y de rata. Ubch7 tiene un dominio de núcleo catalítico E2 que contiene un residuo de cisteína de sitio activo y comprende 152 de sus 154 residuos. Ubch7 es catalíticamente activa con el dominio HECT y RBR de las familias de ubiquitina ligasas (E3). (NCBI, 2016).

Ubch7 se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células humanas. En ratones, su ortólogo se expresa en muchos tejidos incluyendo cerebro, músculo, corazón, pulmón, ganglio linfático, bazo, timo y testículo. La depleción de Ubch7 da como resultado una fase S extendida y una tasa reducida de proliferación, lo que sugiere que puede desempeñar un papel en el ciclo celular. En los seres humanos, los polimorfismos de un solo nucleótido en Ubch7 están asociados con el lupus eritematoso sistémico y la enfermedad de Crohn, lo que sugiere que Ubch7 es importante para la función adecuada del sistema inmune. (NCBI, 2016).

3.8 RECEPTOR DE HIDROCARBUROS ARILO (AhR)

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH, por sus siglas en inglés) son compuestos químicos xenobióticos conformados por dos o más anillos aromáticos fusionados. Son producto de combustiones incompletas de combustibles fósiles, madera, carbón y tabaco, principalmente. Son componentes importantes del material particulado de 2.5 micras y 10 micras de tamaño (PM 2.5 y PM 10, respectivamente) los cuales se han relacionado con alteraciones respiratorias. El benzo[a]pireno es un PAH considerado como carcinógeno y está relacionado con la etiología de cáncer de pulmón. Este compuesto activa la vía de señalización del receptor de hidrocarburos de arilo (AhR, por sus siglas en inglés). (Vázquez *et al.*, 2016).

El AhR es un factor de transcripción dependiente de ligando perteneciente a la familia de proteínas bHLH-PAS. Inicialmente este factor fue caracterizado debido a que media los efectos tóxicos de contaminantes ambientales, particularmente de los PAH y los hidrocarburos aromáticos y halogenados (HAH, por sus siglas en inglés) (Reyes *et al.*, 2015).

El AhR también media la expresión genética de enzimas metabolizadoras como los citocromos P450 y enzimas de Fase II a través de interactuar con los promotores de sus genes blanco en regiones específicas denominadas elementos de respuesta para xenobióticos (XRE, por sus siglas en inglés). Aunque este factor de transcripción juega un papel importante en la respuesta adaptativa a agentes xenobióticos, recientemente se ha demostrado que tiene un papel relevante en varios procesos celulares como pueden ser la proliferación y diferenciación celular, ritmo circadiano, cardiopatías y el metabolismo de la glucosa y el colesterol. (Reyes *et al*, 2015)

En ausencia de ligando, AhR está presente en el citosol en un complejo que incluye un dímero de la chaperona Hsp90. Una vez que un PAH tales como benzo[a]pireno se une al AhR, este se transloca al núcleo y forma un heterodímero con el translocador nuclear del AhR (ARNT). El complejo de AhR/ARNT activado se une a las regiones reguladoras río arriba de los genes que contienen XRE, lo que resulta en la inducción de una red de genes incluyendo *CYP1A1*, un gen el cual depende de AhR para su expresión transcripcional (Fig. 10) (McLemore, 1990).

Li y cols. (2014) demostraron que los niveles de expresión de AhR en tejidos de cáncer de mama fueron significativamente más altos que en los tejidos no cancerosos. Además, existen datos que sugieren una correlación negativa entre p53, AhR y los niveles de expresión de proteínas. Esta evidencia demuestra que los niveles altos de AhR se expresaron en la mayoría de tejidos de cáncer de mama y está estrechamente asociado con el estado de p53 y los tipos histológicos de cáncer de mama. AhR y su expresión anormal pueden jugar un papel importante en múltiples etapas de la progresión del cáncer de mama. Existe evidencia que demuestra que la proteína E7 del VPH 16 es regulada a través de la proteólisis por el SUP. (Reinstein *et al.*, 2000).

Diversos grupos de trabajo han demostrado la ubiquitinación y degradación de E7 a través del SUP en diferentes modelos experimentales. Wang y cols. (2001) observaron una acumulación de formas poliubiquitinadas de E7 en células

Caski (línea celular derivada de carcinoma cervical), después de ser tratadas con un inhibidor del proteasoma 26S.

Por otra parte, Oh y cols. (2004) demuestran en la línea celular Caski que las enzimas ubiquitinadoras o entidades acopladoras de Ubiquitinas (UBEs, por sus siglas en inglés) requeridas para la ubiquitinación y proteólisis de E7, son UbcH7 y el complejo ubiquitina ligasa E3, Cul1-Skp2 (Ube E3). La relevancia de UbcH7 es que participa en la regulación de procesos celulares a través de la regulación de la ubiquitinación y degradación de c-fos, E7 y p53.

En el presente trabajo se evaluó la participación de UbcH7 en el desarrollo de CaCu a través de una vía dependiente de AhR.

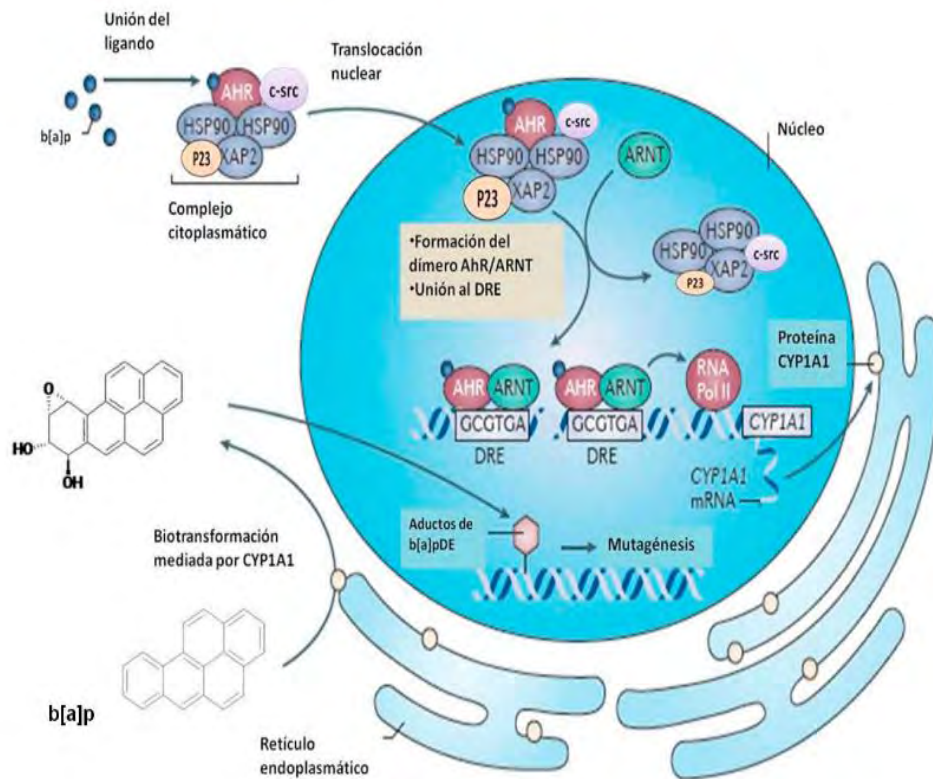


Figura 10. Activación del AhR. El receptor en su forma inactiva (sin un ligando unido) se localiza en el citoplasma celular formando un complejo con un dímero de la proteína de choque térmico 90 (Hsp90), una proteína de choque térmico con un peso de 23 KDa (P23) y una proteína de interacción con el AhR parecida a la inmunofilina (AIP), también conocida como XAP2, y una cinasa de tirosina (c-src). Una vez unido su ligando, el complejo AhR se transloca al núcleo y forma un heterodímero con la proteína ARNT. Este heterodímero es capaz de unirse a los XRE (GCGTGA) y reclutar coactivadores y así favorecer la transcripción de sus genes blanco como el CYP1A1. Este citocromo metabolizará al b[a]p en intermediarios que pueden interactuar con el ADN para formar aductos iniciando así un proceso carcinogénico. (Tomado de: Vázquez et al., 2016).

3.9 CITOCROMO P450

Los citocromos P450 son miembros de una superfamilia de hemoproteínas que activan dioxígeno para catalizar la oxidación de hidrocarburos inactivados. (Hamdane *et al.*, 2008).

Presentan una amplia versatilidad funcional, siendo capaz de catalizar una gran cantidad de procesos y unirse a un número elevado de sustratos (Gallego *et al.*, 2011).

En general el citocromo P450 de eucariotas tiene un peso molecular de unos 50 a 60 kDa. En cuanto a su localización, presentan una amplia distribución en el organismo, estando presentes prácticamente en todos los tejidos de mamíferos, presentándose en ellos uno o más citocromos diferentes, si bien son especialmente abundantes en hígado e intestino delgado. En el interior celular se localizan en diversos orgánulos celulares, aunque principalmente lo hacen en condriosomas y retículo endoplasmático liso (Gallego *et al.*, 2011).

Con el fin de eliminar los xenobióticos, en el organismo se producen reacciones de biotransformación, encaminadas a incrementar la hidrofilia de estas moléculas para facilitar su rápida excreción. Estas reacciones se pueden diferenciar en reacciones de Fase I y Fase II. (Guengerich, 2006).

En las reacciones de Fase I se produce una modificación del xenobiótico por oxidación, reducción o hidrólisis, dando lugar a la aparición de grupos polares en la molécula, lo que se traduce en un aumento de su hidrosolubilidad y por tanto una mayor facilidad para su excreción. En las de Fase II, el sustrato, que puede tratarse tanto de un xenobiótico como un metabolito proveniente de una reacción de Fase I, se conjuga con una sustancia endógena, lo que facilita su transporte en el organismo y su posterior excreción. Los P450s, así como otras enzimas, también pueden activar

profármacos u otras sustancias químicas, pudiendo incluso dar lugar a productos reactivos que pudieran dañar la célula (Guengerich, 2006).

A pesar de la gran cantidad de enzimas del citocromo P450 que se han identificado hasta el momento, se puede asegurar, que las familias génicas 1, 2, y 3 del citocromo P450 (CYP1, CYP2 y CYP3) codifican las enzimas que intervienen en la mayor parte de las biotransformaciones de los fármacos. Las demás familias tienen importancia en el metabolismo de compuestos endógenos, esteroides y ácidos grasos (Villar del Fresno *et al.*, 2004). Sin embargo, aquellos citocromos involucrados en el metabolismo de sustancias exógenas (CYP1, CYP2, y CYP3), también catalizan sustratos endógenos, particularmente esteroides (Schenkman, 1992).

3.9.1 Familia CYP1

Incluye dos subfamilias, 1A y 1B; a su vez 1A presenta dos citocromos muy parecidos, CYP1A1 y CYP1A2. La subfamilia 1B solamente el CYP1B1. Esta familia está representada por la aril hidrocarburo hidroxilasa, responsable de la activación metabólica de numerosos hidrocarburos policíclicos ambientales, promutágenos y procarcinógenos, como el benzopireno, presentes en el humo del cigarrillo y otros productos de combustión. (Fig. 11) (Gallego *et al.*, 2011).

Generalmente se expresa en Tejidos extrahepáticos, como el epitelio de Pulmón, piel y tracto gastrointestinal, aunque puede también ser detectada en la placenta, el feto y el embrión (Nishimura *et al.*, 2003).

Aunque los sustratos endógenos incluyen los mediadores inflamatorios ácido araquidónico y eicosapentoico y las hormonas β -estradiol y melatonina, el CYP1A1 es una de las enzimas mejor conocidas que llevan a cabo la bioactivación de procarcinógenos (Goldstein y De Morais., 1994).

Mediado por CYP1A, los contaminantes ambientales conducen a metabolitos reactivos que forman ADN aducto, que contribuye a la mutagénesis y finalmente formación de tumores (Wogan *et al.*, 2004).

Tales sustratos incluyen combustión y tabaco hidrocarburos aromáticos policíclicos aminas aromáticas heterocíclicas; encontrado en carne carbonizada y arilaminas industriales (Kim y Guengerich., 2005).

La expresión constitutiva del *CYP1A1* es generalmente baja, pero esta enzima puede ser inducida por muchos de sus propios sustratos, particularmente los PAH, a través del receptor nuclear aril hidrocarburo. (Hankinson, 1995).

Por ejemplo, los niveles de mRNA de CYP1A1 son muy altos en las células pulmonares de los fumadores, pero Indetectable en los no fumadores (Willey *et al.*, 1997).

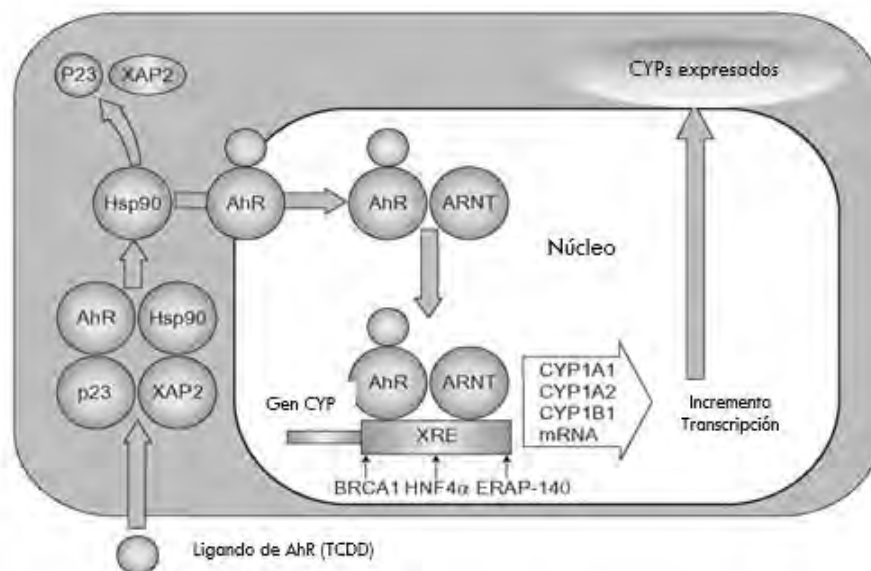


Figura 11. Mecanismo básico de inducción de *CYP1A1* y *CYP1A2*: el receptor AhR se une al inductor junto con Hsp90, pero sólo el receptor AhR y el inductor se cruzan en el núcleo para cumplir con ARNT y juntos se unen a elementos de respuesta xenobiótica de ADN (XRE). Los co-activadores que inducen la expresión de las isoformas de CYP incluyen BRCA1, ERAP-140 y HNF4α. (Tomado y modificado de: <http://what-when-how.com/human-drug-metabolism/mechanisms-of-enzyme-induction-induction-of-cytochrome-p450-systems-human-drug-metabolism-part-1/>).

4.- JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer cervicouterino ocupa el segundo lugar de mortalidad por cáncer en mujeres mexicanas y es un problema de salud pública. Numerosos estudios epidemiológicos y moleculares establecen que la infección persistente con el virus del papiloma humano es la principal causa para su desarrollo. Se han identificado más de 100 tipos del virus del papiloma humano, de los cuales las variantes 16 y 18 son causantes de más de 75% de todos los cánceres de cérvix. El receptor de aril hidrocarburos (AhR) es un factor de transcripción activado por ligando y juega un papel importante en el desarrollo del cáncer. Existen estudios epidemiológicos que sugieren que el AhR interactúa con los factores de respuesta a xenobióticos, funcionando como un factor en la transcripción de genes involucrados en el proceso, de carcinogénesis, por lo cual puede ser visto como blanco en la modulación de los niveles de proteínas que participan en este proceso generando posibles alternativas terapéuticas. Asimismo, se ha demostrado la participación de AhR en el desarrollo de tumores en tejido de hígado de ratón; debido a que éste se expresa en diferentes tejidos de mamíferos incluyendo el humano. Es importante elucidar el mecanismo de su posible participación en el desarrollo de cáncer cervicouterino y en el control de patologías mediadas por alteraciones en los niveles de Ube2l3.

5.- HIPÓTESIS

El receptor de hidrocarburos arilo participa como un factor transcripcional que cuando se activa se une a genes blanco como Ube2l3 induciendo la expresión del mismo y desencadenando respuestas ante mecanismos involucrados en el proceso de carcinogénesis. Por lo tanto, habrá un cambio significativo en los niveles de expresión del gen Ube2l3 en tejido sano y tejido canceroso de cuello uterino, teniendo en este último un aumento a nivel de transcrito primario y en la expresión de proteína.

6.- OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar la expresión de Ube2l3, en biopsias de cérvix de mujeres sin CaCu y mujeres diagnosticadas con CaCu.

6.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar el mecanismo de activación de AhR con la activación de *CYP1A1* mediante RT-PCR.
- Analizar la actividad transcripcional de AhR mediante la evaluación de los niveles de expresión de RNA mensajero, *CYP1A1* y Ube2l3 mediante RT-PCR.
- Analizar si existe diferencia en los niveles de expresión de Ube2l3 asociada a la etapa de carcinogénesis mediante RT-PCR y Western Blot.

7.- MATERIAL Y MÉTODO

7.1 Material Biológico

El material biológico consistió en tejido de endo-cérvix de aproximadamente 1 cm, obtenido de biopsias de mujeres sin CaCu y mujeres diagnosticadas con CaCu en el Hospital Juárez de México (HJM). Para cada grupo de estudio la n fue de cuatro.

Se consideraron pacientes del HJM que se canalizaron a los servicios de Displasias, Oncología o Tococirugía y que autorizaron por medio del consentimiento informado la toma de muestra; en el caso del grupo control se incluyeron mujeres cuyos resultados de la genotipificación fueron negativos a cualquier tipo de VPH. Para el grupo de pacientes con cáncer de cérvix se incluyeron mujeres cuyo resultado de la genotipificación por microarreglos de baja densidad fue positivo para VHP 16 y 18. En ambos casos el diagnóstico se corroboró con el Servicio de Patología del HJM. El tejido se conservó a -70° en un ultra congelador^(Revco).

Se utilizaron reactivos Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific.

7.2 Extracción de ARN de tejido mediante la técnica de TRIzol

Para la extracción de ARN se le adicionó al tejido 200 μ L de cloroformo y se mezcló hasta observar un color rosa, posteriormente se dejó 12 h a -70°C ^(Revco) transcurrido este tiempo se centrifugó^(Eppendorf) a 4°C durante 15 min a 12500 rpm, al término, la fase translúcida se retiró y se transfirió a un tubo nuevo donde se adicionaron 500 μ L de isopropanol se mezcló e incubó durante 24 h a -70°C ^(Revco) posteriormente se centrifugó^(Eppendorf) a 4°C durante 15 min a 12500 rpm, se decantó el sobrenadante y se adicionó 1 mL de etanol al 70%, se mezcló y se volvió a centrifugar^(Eppendorf) a 4°C por 5 min a 8000 rpm, finalizado este proceso se decantó el sobrenadante, resuspendiendo el botón en 30 μ L de H₂O de DEPC.

7.3 Integridad de RNA total: Electroforesis en Gel de agarosa

Se disolvió 1 g de agarosa en 100 mL de amortiguador TAE 1x (50:1) se calentó en el microondas por 1 min y se agregó 1.5 μ L de bromuro de etidio al matraz, se mezcló para disolver, una vez homogénea la mezcla se vertió su contenido sobre la placa de electroforesis^(BioRad) previamente preparada y se colocaron los peines en el gel una vez que ya polimerizó por completo el gel, se retiraron los peines y se colocó dentro de la cámara de electroforesis, posteriormente se vertió amortiguador de electroforesis y se cargó el gel con 5 μ L del producto de ARN y 1.5 μ L de buffer de carga en cada pocillo. Una vez cargado el gel se migraron las muestras a 100 voltios durante 1 h.

Tabla 1. Amortiguador para electroforesis TAE 50X

Reactivo	Cantidad
Tris base	24.2 g
Ac. acético glacial	5.7 mL
EDTA 0.5 M	10 mL

7.4 Síntesis de ADNc a partir de ARNm.

Por muestra se adicionó en un tubo de 250 μ L la cantidad de 10 μ L de Mix I, posteriormente se incubó durante 5 min a 65°C un vez concluido el tiempo se incubó durante 2 min en hielo y después se les adicionó 10 μ L del Mix II, esto se Incubó nuevamente pero ahora 50 min a 50°C ya terminado este proceso, se almacenó a -20°C^(Thermo Fisher)

Determinación de la expresión de Ube2l3; posible papel del AhR en el desarrollo de cáncer cervicouterino.

Tabla 2. Mix I. Síntesis de ADNc

Reactivo	Cantidad
Oligo dt	1 µL
dNTP's	1 µL
H ₂ O	6 µL
ARN	2 µL

Tabla 3. Mix II. Síntesis de ADNc

Reactivo	Cantidad
Amortiguador(Tris-HCl 250 mM, pH 8.3, KCl 375 mM y MgCl ₂ 15mM	4 µL
Cloruro de Magnesio	4 µL
Detergente ditioneitol (DTT) 0.1 M	2 µL
SSII	1 µL

Tabla 4. Diseño de Oligonucleótidos

Gen	Oligonucleótido	Secuencia del Primer	Tm	Longitud	%GC	Amolicon
CYP1A1	CYP1A1-F	5'-CTTTGAGAAGGGCCACATCC-3'	61.92	20	55	231
	CYP1A1-R	5'-GTGTCTAGCTCCTCTTGGATCTTTC-3'	61.08	25	48	
Ube2l3	Ube2l3-F	5'-CCTGACAACCCTCCATATGATAAG-3'	60.92	24	45.8	195
	Ube2l3-R	5'-GATTACTTGGTCGGTTTTGGTTG-3'	61.77	23	43.4	
GAPDG	GAPDH-F	5'-GACCTCAACTACATGGTTTACATGTTCC-3'	63.96	28	42.8	339
	GAPDH-R	5'-GGAGGCATTGCTGATGATCTTG-3'	64.15	22	50	

7.5 Amplificación de ADNc (RT- PCR)

Se realizó la amplificación logarítmica de ADN.

Tabla 5. Condiciones de reacción de la RT-PCR

T°C	Tiempo	Fase	
94	5 min	Desnaturalización inicial	
94	45 s	Desnaturalización	37 Ciclos
60	45 s	Alineamiento	
72	1 min 15 s	Enlogacion	
72	10 min	Extensión final	

Tabla 6. Reactivos para PCR

Reactivo	Cantidad
ADNc	2.5 µL
dNTP's	0.5 µL
Amortiguador Tris pH 8.4	2.5 µL
Cloruro de magnesio	1.5 µL
Ollgo dT	1.0 µL
Taq-polimerasa	0.2 µL
H2O	15.8 µL

Una vez terminada la reacción de PCR se visualizaron los productos de amplificación en un gel de agarosa al 1%, preparado con TAE 1x y bromuro de etidio, se cargó el gel con 5 µL del producto de PCR y 1.5 µL de buffer de carga en cada pocillo después de la escalera molecular de 100 pb. Una vez cargado el gel se migraron las muestras a 90 voltios durante 40 min.

7.6 Extracción y purificación de DNA

Para la extracción y purificación se utilizó un estuche de preparación de ADN de tejido^(Jena Bioscience). Se transfirieron 10-15 μm a un microtubo eppendorf de 1.5 mL se inició con la lisis celular agregando 300 μL de solución de lisis celular al tejido. Seguido de esto se agregaron 1.5 μL de solución de Proteinasa K y se mezcló invirtiendo el tubo varias veces. Posteriormente se incubó a 55°C^(Scientific Inc) toda la noche hasta que el tejido quedó disuelto. Para la precipitación de proteínas se agregaron 100 μL de solución de precipitación de proteínas y se centrifugó^(Eppendorf) a 14000 rpm por 3 min.

Para la precipitación del ADN se transfirió el sobrenadante a un microtubo de 1.5 mL limpio el cual contenía 300 μL de Isopropanol al 99% y esto se mezcló invirtiendo suavemente alrededor de unas 50 veces. Después se centrifugó^(Eppendorf) a 14000 rpm a 4°C durante un minuto. Se desechó el sobrenadante y se puso a drenar el tubo brevemente sobre un papel absorbente limpio. A la pastilla contenida en el fondo del tubo se le agregaron 500 μL de solución de lavado y el tubo se invirtió varias veces para lavar el sedimento de ADN. Posteriormente, se centrifugó^(Eppendorf) a 14000 rpm por un minuto y se desechó el etanol cuidadosamente. Por último, la pastilla al fondo del tubo se mantuvo a temperatura ambiente durante 10-15 min y para la hidratación del sedimento de ADN seco se agregaron 50 μL de solución de hidratación, se hicieron alícuotas las cuales se almacenaron a -70°C^(Revco) hasta su uso.

7.7 Cuantificación de ADN

El DNA extraído de las biopsias se cuantificó espectrofotométricamente con un equipo EPOCH^(BioTek)

Se agregaron 15 μL de blanco en un pozo de la placa y 15 μL de cada muestra en los pozos restantes. Los resultados se observaron mediante el Software Gen5 2.0.

7.8 Homogeneización del tejido

La homogeneización consistió en el procesamiento del tejido y posteriormente de las células con el que se obtuvo una mezcla fluida.

Se realizó homogenización por uso de cuchillas^(BioSpec) proceso magnificado por uso de solventes orgánicos y/o detergentes, en este caso se utilizó un amortiguador de RSB con NP40 agregando de 100-200 μL por muestra según el volumen de la misma.

Tabla 7. Composición de amortiguador RSB/NP40.

Reactivo	Cantidad
Cloruro de Magnesio	150 μL
Tris 1M	1000 μL
Cloruro de Sodio	1000 μL
NP40 1%	100 μL

Se realizaron ciclos de dos min en contacto con las cuchillas y dos min en contacto con hielo. El número de repeticiones fue en relación a la observación en cuanto a la desintegración total del tejido. Al finalizar este proceso la consistencia de la mezcla es lechosa y color café.

Posteriormente las muestras se centrifugaron a 14000 rpm^(Eppendorf) a 4°C durante 6 min obteniendo el extracto de proteínas (sobrenadante) el cuál se transfirió a un tubo eppendorf limpio y se realizaron alícuotas de 40 μL

7.9 Cuantificación de proteína por BSA (Ácido bicinonínico)

La cuantificación de proteínas se realizó con el estuche (Pierce BCA Protein Assay)^(Thermo Scientific). Se diluyó la muestra 1:100 (1 μL +99 μL de PBS 1x), Se realizaron las diluciones de BCA. Posteriormente en un tubo de 10 mL, se mezcló

Reactivo A y Reactivo B del estuche, en la siguiente proporción: 9800 μL Reactivo A / 100 μL Reactivo B= 1 mL (WR).

Se utilizó una multiplaca y se agregaron 25 μL en cada pozo de muestra estándar y de la muestra a analizar. Se realizó por triplicado. Posteriormente se agregaron 200 μL de la solución WR y se incubó^(Panasonic) a 37°C por 30 min. Se dejó la multiplaca a temperatura ambiente por 10 min.

Se leyó^(TECAN) con una longitud de onda de 562 nm específica para proteínas con el software TECAN- Magellan™ Se realizaron los cálculos de absorbancia en el software Excel.

Tabla 8. Diluciones de BCA

	Diluyente		Concentración de BCA
A	300 μL	100 μL BCA 2mg/mL	500 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
B	200 μL	200 μL de A	250 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
C	200 μL	200 μL de B	125 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
D	225 μL	150 μL de C	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$
E	200 μL	200 μL de D	25 $\mu\text{g}/\text{mL}$
F	200 μL	50 μL de E	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$
G	200 μL	0	0

7.10 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

7.10.1 Preparación de la muestra

Dados los valores de la cuantificación, se realizaron cálculos en para determinar la cantidad de cada muestra a cargar en el gel de acuerdo a la cantidad en $\mu\text{g}/\text{mL}$ obtenidos en la cuantificación por BCA. Se preparó la muestra con un amortiguador de carga y H_2O para completar un volumen final de 40 μL en cada pozo. Las muestras se hirieron a baño maría durante 8 min.

7.10.2 Preparación del gel y corrida

Se preparó un gel concentrador y un gel separador. Se añadió en primer lugar el gel separador y se dejó polimerizar a temperatura ambiente aproximadamente 10 min. Posteriormente se agregó el gel concentrador y se colocó el peine sobre él, de igual forma se dejó polimerizar a temperatura ambiente. Una vez polimerizado se retiró el peine y se colocó el gel en la cámara de electroforesis^(BioRad). Se adicionó el amortiguador de corrida para proteína 1x.

Tabla 9. Preparación de gel separador de poliacrilamida al 15%

Reactivo	Cantidad
H ₂ O	2.2 mL
Acrilamida bis/acrilamida	5 mL
1.5M TRIS (pH 8.8)	2.6 mL
10% SDS	0.1 mL
Persulfato de amonio 10%	200 µL
TEMED	10 µL

Tabla 10. Preparación del gel concentrador de poliacrilamida al 15%

Reactivo	Cantidad
H ₂ O	2.975 mL
Acrilamida bis/acrilamida	0.67 mL
0.5M TRIS (pH 6.8)	1.25 mL
10% SDS	50 µL
Persulfato de amonio 10%	100 µL
TEMED	5 µL

Tabla 11. Amortiguador de carga de proteínas

Reactivo	Cantidad
TRIS 1M pH 6.8	1.25 mL
SDS al 10%	4.00 mL
2-mercaptoetanol	1.00 mL
Glicerol	3.25 mL
Azul de bromofenol al 1%	0.50 mL

Tabla 12. Amortiguador de corrida electroforesis proteína 10x. (para 1 L)

Reactivo	Cantidad
Tris	5.8 g
Glicina	29 g
SDS	1 g
Metanol	200 mL

7.11 Western Blot

7.11.1 Transferencia semi-húmeda a la membrana de nitrocelulosa.

Se dejó el gel de poliacrilamida en el amortiguador de transferencia semi húmeda aproximadamente 10 min. Posteriormente se realizó la transferencia Gel – Membrana en un equipo de transferencia semi húmeda^(BioRad) colocando en el equipo papel filtro, membrana de nitrocelulosa, el gel de poliacrilamida, papel filtro y se dejó correr a 16 voltios durante 30 min^(BioRad). Para confirmar la transferencia se agregó rojo de Ponceau a la membrana durante aproximadamente 1 min.

Tabla 13. Composición Buffer de Transferencia Semi-Humeda. 1x (para 1L).

Reactivo	Cantidad
Glycina	144 g
Tris	30 g
SDS	10 g

7.11.2 Inmunodetección

* Se realizó la inmunodetección utilizando GAPDH^(Jackson Inmuno Research) monoclonal como anticuerpo primario control en cada uno de los grupos de estudio.

* Posterior a ello se utilizó el anticuerpo primario Ube2L3^(abcam) (monoclonal)

* Como anticuerpo secundario se utilizó en ambos casos anti Ratón^(Jackson Inmuno Research)

Bloqueo

Se bloqueó la membrana durante 1 h con TBS Tween y leche light en polvo (5%)/20 mL TBS tween. En agitación constante con un equipo shaker^(LabNet)

Incubación con anticuerpo primario.

El anticuerpo GAPDH se incubó a 4°C en un refrigerador^(Thermo scientific) a una concentración de 2 µL de anticuerpo por 3 mL de TBS Tritón y leche en polvo al 5%. Se dejó toda la noche. Posteriormente se realizaron 3 lavados con TBS Tritón por 5 min cada uno.

El anticuerpo Ube2l3 se incubó a 4°C en un refrigerador^(Thermo scientific) a una concentración de 3 µL / 1.5 mL de TBS Tritón y leche el polvo al 5%. Se dejó toda la noche. Posteriormente se realizaron 3 lavados con TBS Tritón por 5 min cada uno. Se realizó un segundo bloqueo con las mismas condiciones del primero y comenzó la incubación con el anticuerpo secundario. En ambos casos (GAPDH y Ube2l3) se

utilizó anticuerpo secundario anti ratón en una concentración de 1:5000 es decir 1 μ L de anticuerpo secundario / 5 mL de TBS Tritón con un volumen de leche al 5%. Posteriormente se realizaron en ambos casos 3 lavados con TBS de 5 min cada uno.

Revelado

Se utilizó un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (HRP). Por lo tanto se utilizó el sustrato luminol^(Femto Super Signal). Y se visualizó la proteína con un equipo^(Li-Con). Se analizó con el software Image Studio Lite 2.0.

7.12 Análisis estadístico

Los niveles de proteína se trabajaron con el software STATA 16.0 y se aplicó la prueba estadística no paramétrica de suma de rangos U de Mann-Whitney. En ambos casos únicamente se consideraron significativas aquellas diferencias en las que la probabilidad (p) sean igual o menor a 0.05.

8.- RESULTADOS

8.1 Expresión de CYP1A1 y Ube2I3 (Activación de AhR).

El ARN, es la molécula que dirige las etapas intermedias en la síntesis proteica mediante tres formas principales (ARNr, ARNm y ARNt), la molécula de ARNm está formada por una cadena de nucleótidos enlazados mediante enlaces fosfodiéster cargados negativamente. Cada nucleótido a su vez está ligado a un monosacárido de cinco carbonos llamado ribosa. Este ARNm lleva la información sobre la secuencia de aminoácidos para formar las proteínas, desde el ADN, lugar en que está inscrita, hasta los ribosomas en el citoplasma, lugar en donde se traduce y sintetiza la proteína.

Con el propósito de medir los niveles de ARNm del gen *GAPDH* como control de carga, *CYP1A1* y *Ube2I3* se realizó la técnica RT-PCR a partir de tejido de endocervix de mujeres sin CaCu y mujeres diagnosticadas con CaCu.

Se obtuvo un ARN de los grupos de estudio con la técnica de TRIzol. La pureza del ARN fue de 1.79 siendo este un promedio entre los grupos y una concentración de 716.7 µg/mL.

En la figura 12 se representan los niveles de transcrito de los genes *GAPDH* y *Ube2I3* en el grupo control y el grupo CaCu.

En la figura 14 se observan los niveles de transcrito del gen *GAPDH* y *CYP1A1* en el grupo CaCu.

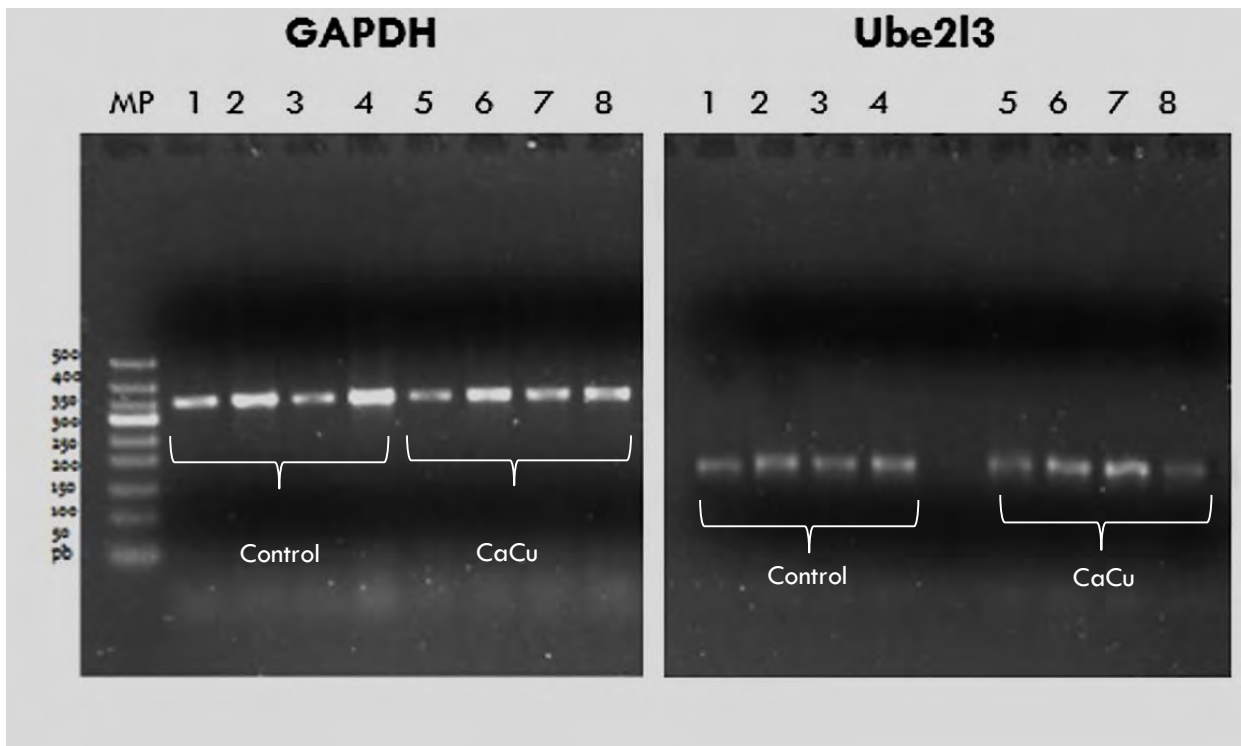


Figura 12. Amplificación de los genes *GAPDH* y *Ube2I3* a partir de ADNc de biopsias cervicales. Se utilizó un marcador de 500 pb-Invitrogen. Los productos fueron separados en gel de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio. (100V, 1h) 1-4 Grupo control. 5-8 grupo CaCu.

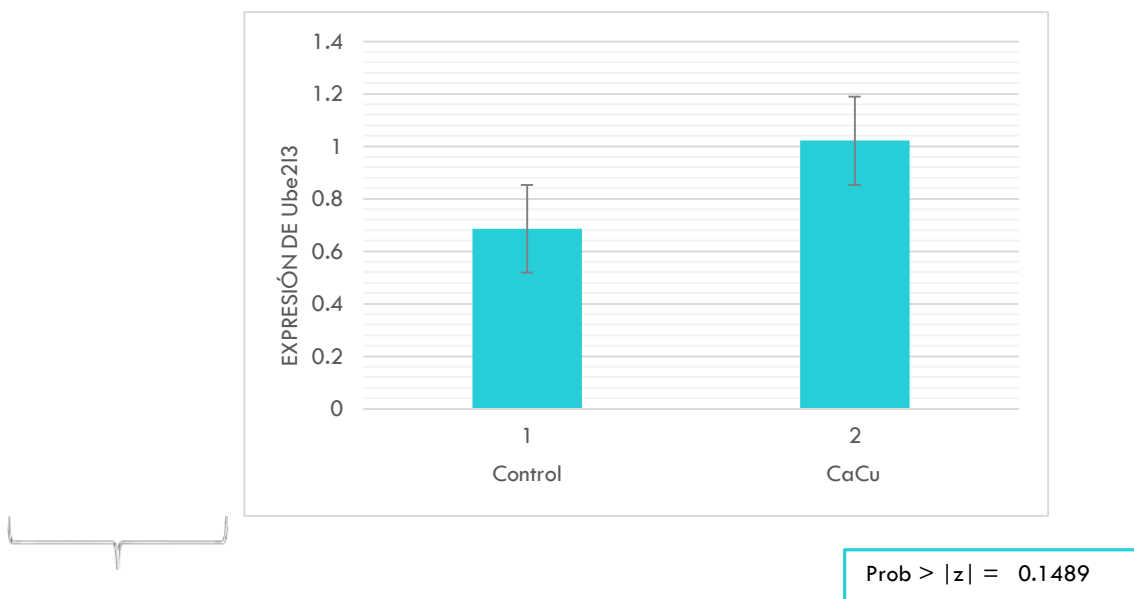


Figura 13. Niveles de ARNm del gen *Ube2I3* de tejido sin cáncer y tejido canceroso de cérvix

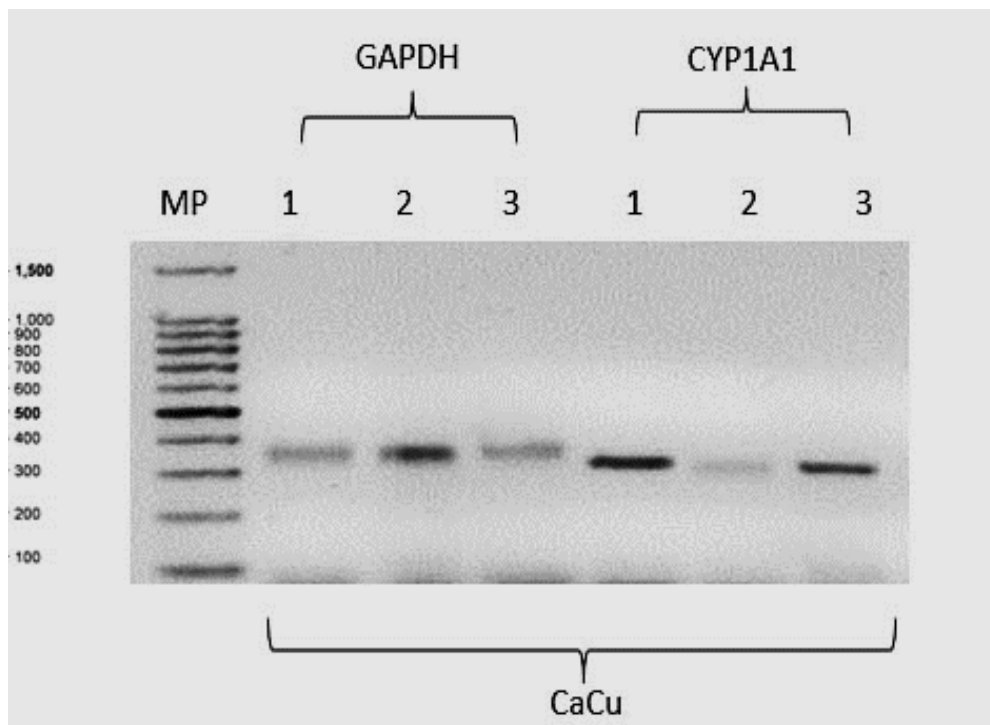


Figura 14. Amplificación de los genes *GAPDH* y *CYP1A1* a partir de ADNc de biopsias cervicales con CaCu. Se utilizó un marcador de 1500 pb-Invitrogen. Los productos fueron separados en gel de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio. (100V, 1h).

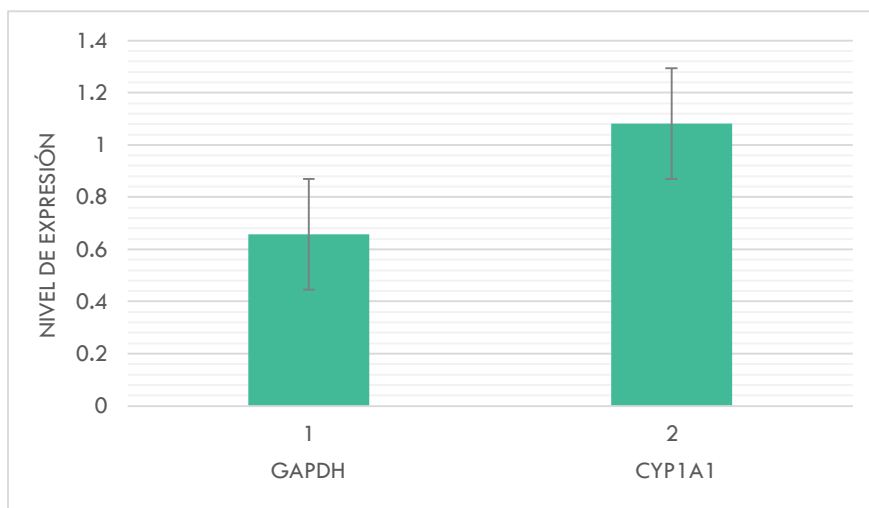


Figura 15. Niveles de ARNm del gen *GAPDH* y *CYP1A1* de tejido canceroso de cérvix.

En la figura 16 se observa la tinción de proteínas con rojo de Ponceu en la membrana de nitrocelulosa. Se observan las bandas distribuidas en la totalidad de la membrana indicando una adecuada transferencia de proteínas del gel a la membrana.

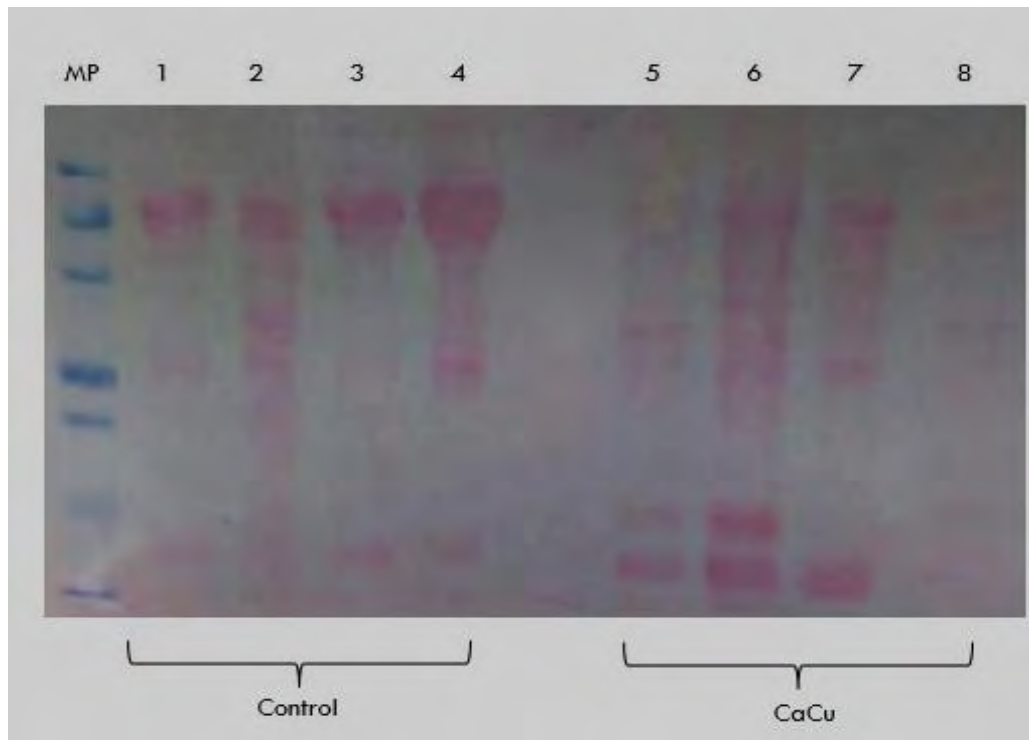


Figura 16. Membrana de nitrocelulosa teñida con rojo de Ponceau. Las bandas color azul corresponden al marcador de peso molecular Benchmark Pre-stained protein ladder (Invitrogen). Las bandas color rojo corresponden a la totalidad de proteínas transferidas y distribuidas en la de acuerdo a su peso molecular.

Por medio de la técnica de inmunodetección Western Blot se observa en las figuras 17 y 19 las imágenes correspondientes a la detección específica de la proteína Ube2I3, y el control de carga GAPDH.

En las figuras 18 y 20 se representa gráficamente la relación de la proteína Ube2I3 y el control de carga, GAPDH. Se obtuvo el cociente y normalización entre los valores numéricos obtenidos por la cuantificación de la abundancia relativa de proteínas.

Se presenta el valor de (p) en cada caso obtenido con la prueba estadística U de Mann-Whitney para demostrar si existen diferencias entre grupos independientes con variables cuantitativas que tienen libre distribución. Dado el valor, las diferencias no son significativas.

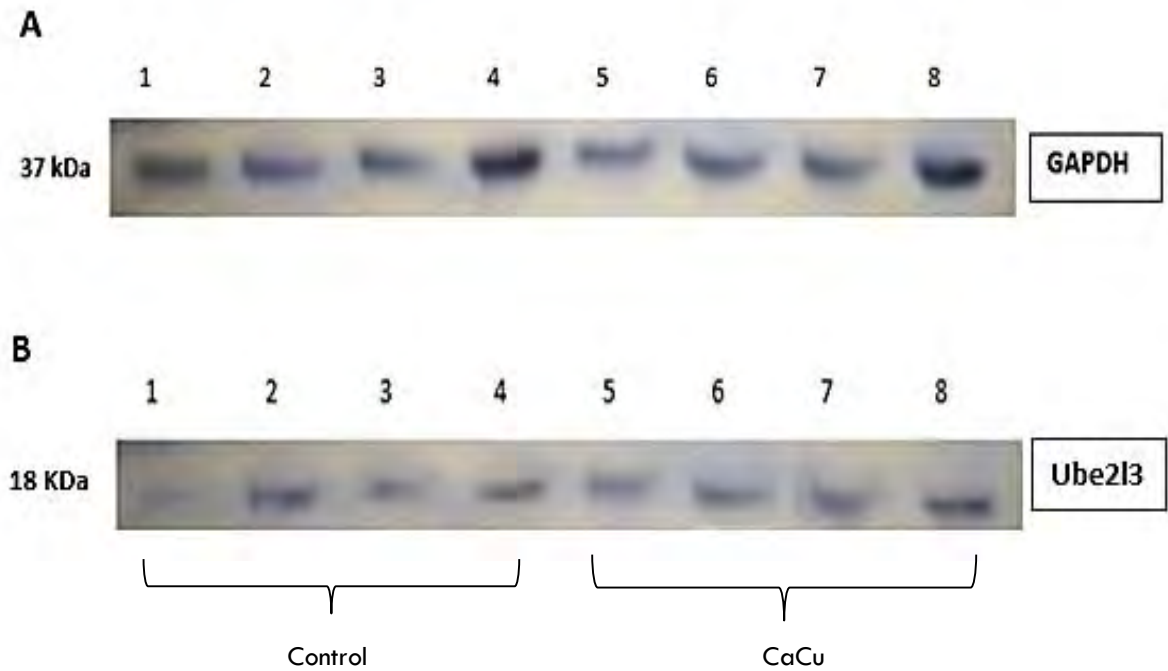
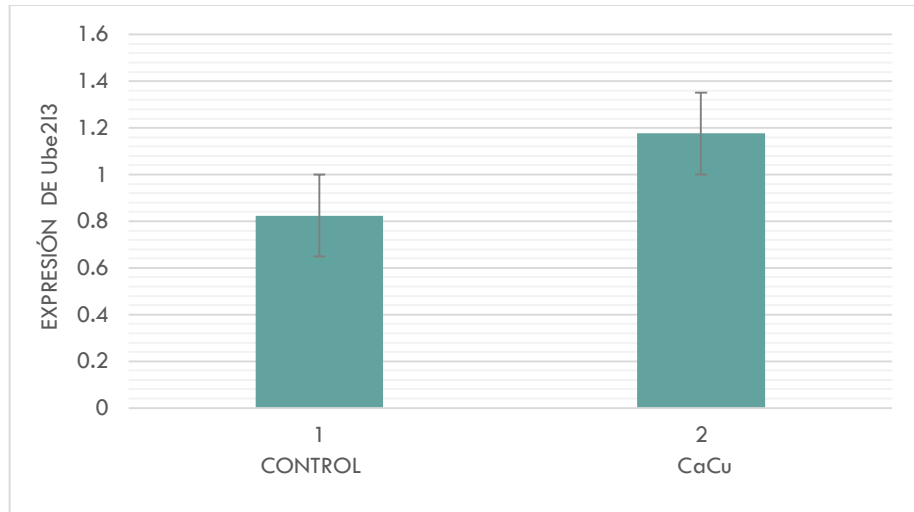


Figura 17. Bando obtenido por medio de Western Blot. **A** Correspondiente a la proteína constitutiva GAPDH de 30-40 kDa. Cada banda representa la concentración de proteína de cada muestra de tejido de cérvix. Las muestras (1,2,3,4) representan el grupo control y las muestras (5,6,7,8) el grupo de mujeres diagnosticadas con CaCu. **B**. Bando obtenido por medio de Western Blot correspondiente a la proteína Ube213 de 18 kDa. Cada banda representa la concentración de proteína de cada muestra de tejido de cérvix. Las muestras (1,2,3,4) representan el grupo control y las muestras (5,6,7,8) el grupo de mujeres diagnosticadas con CaCu



Prob > |z| = 0.2812

Figura 18. Expresión de la proteína Ube2l3 en el grupo control y en el grupo CaCu.

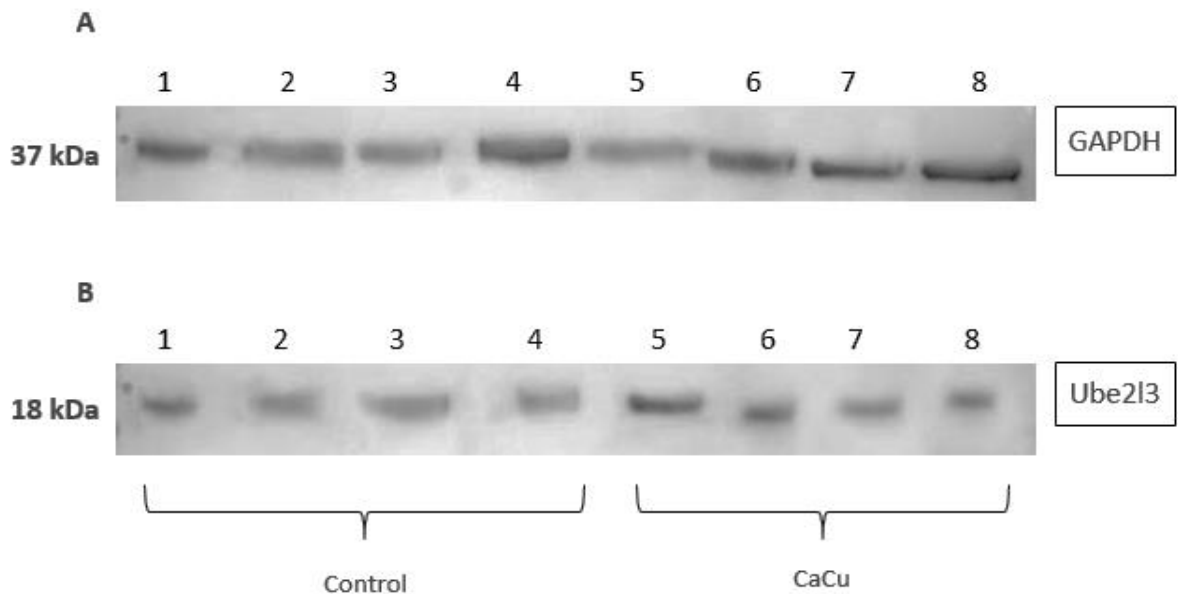
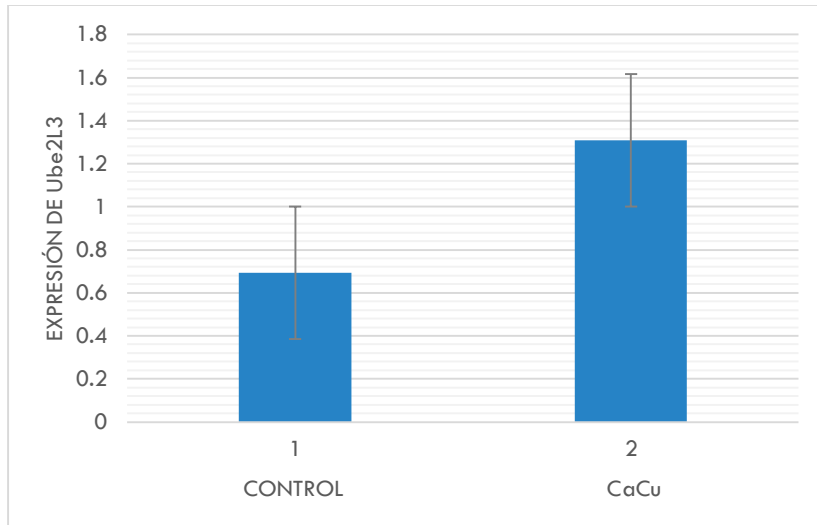


Figura 19. Bando obtenido por medio de Western Blot. **A.**Correspondiente a la proteína constitutiva GAPDH de 30-40 kDa. Cada banda representa la concentración de proteína de cada muestra de tejido de cervix. Las muestras (1,2,3,4) representan el grupo control y las muestras (5,6,7,8) el grupo de mujeres diagnosticadas con CaCu. **B.** Bando obtenido por medio de Western Blot correspondiente a la proteína Ube2l3 de 18 kDa. Cada banda representa la concentración de proteína de cada muestra de tejido de cervix. Las muestras (1,2,3,4) representan el grupo control y las muestras (5,6,7,8) el grupo de mujeres diagnosticadas con CaCu.

Determinación de la expresión de Ube2l3; posible papel del AhR en el desarrollo de cáncer cervicouterino.



Prob > |z| = 0.3865

Figura 20. Expresión de la proteína Ube2l3 en el grupo control y en el grupo CaCu.

9.- DISCUSIÓN

Desde su descubrimiento en mamíferos se pensó que la única función del AhR era participar en la respuesta adaptativa al estrés celular, actuando como un sensor de señales endógenas o inducidas por xenobióticos. Sin embargo, existe evidencia experimental que vincula al AhR con la alteración de diversos procesos celulares como proliferación celular, apoptosis, diferenciación, promoción de tumores, reproducción y respuesta inmune. Esto sugiere que además de ser un sensor de xenobióticos, el AhR es esencial en la homeostasis celular. (Vázquez *et al.*, 2016).

Diversos contaminantes ambientales la mayoría cancerígenos como los PAH y HAH (benzopirenos, dioxinas, etc) funcionan como ligandos del AhR. Una vez activado, AhR se transloca al núcleo e interacciona con ARNT formando un heterodimero que induce la expresión de genes que contienen sitios XRE en su promotor (Barouki *en al.*, 2007). Estos genes están implicados en respuestas de desintoxicación y metabolismo, por ejemplo genes de la familia CYP (Citocromo p450). Asimismo genes como *CYP1A1* y *Ube2l3* son dianas de AhR (Mimura *et al.*, 1999; Reyes Hernández *et al.*, 2010).

Otros ligandos exógenos del AhR tales como la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) causan una variedad de efectos tóxicos a diferentes órganos y tejidos. Entre otros efectos, la exposición a TCDD a animales de laboratorio conduce a la atrofia del timo y a la inmunosupresión, y a la formación de tumores. (Chopra & Schrenk., 2011).

Los mecanismos exactos de la inhibición de la apoptosis por TCDD no se conocen completamente, pero tanto los estudios *in vivo* como *in vitro* demostraron consistentemente una implicación del supresor tumoral p53 en este efecto. Se han

establecido diversas secuencias de evidencia que relacionan la apoptosis con los efectos perjudiciales de la activación exógena del AhR. (Chopra & Schrenk., 2011).

(Reyes *et al.*, 2010) Identificaron la enzima de conjugación de ubiquitina Ube2I3 como un nuevo gen diana para AHR en hígado murino, promoviendo así la ubiquitinación de p53 y la posterior degradación a través del proteasoma.

Sin embargo, estudios recientes demostraron que el nivel de la oncoproteína E7 en las células cancerosas está regulado por la proteólisis dependiente de ubiquitina a través del proteasoma 26S. Caracterizaciones de las enzimas implicadas en la proteólisis ubiquitina dependiente demostraron que Ube2I3 participa como una enzima de conjugación-ubiquitina E2 involucrada en la ubiquitinación de E7. Esto sugiere que el gen *Ube2I3* tiene diversas funciones en el proceso de carcinogénesis. (Oh *et al.*, 2004)

Por otro lado el *AHRR* un gen que codifica una proteína que reprime la señalización dependiente del AhR compete con el factor de transcripción de este para la heterodimerización con la proteína translocadora nuclear y la unión a la secuencia del elemento de respuesta xenobiótica (XRE) en muchos genes. Esta proteína está implicada en la regulación del crecimiento y diferenciación celular, así como en la mediación de la toxicidad de las dioxinas. El empalme alternativo da como resultado múltiples variantes de transcripción actuando como un represor transcripcional de la función de AhR. (Zudaire *et al.*, 2008)

Las funciones biológicas y toxicológicas de la *AHRR* no se conocen bien, pero hallazgos recientes sugieren que está implicada en la fisiología reproductiva humana y en la regulación del crecimiento celular. (Zudaire *et al.*, 2008)

La sobreexpresión de *AHRR* inhibe el crecimiento de células tumorales humanas en cultivo (Manzano *et al.*, 2002). Por el contrario, la reducción de la expresión de *AHRR* aumenta el crecimiento celular y confiere resistencia a la apoptosis.

(Zudaire *et al.*, 2008) demuestran que *AHRR* es un supuesto nuevo gen supresor de tumores en múltiples tipos de cánceres humanos incluyendo colon, mama, pulmón,

estomago, cuello uterino y ovario por medio de una regulación negativa consistente del ARNm de AHRR en tejidos malignos humanos y demuestran hipermetilación de ADN como mecanismo regulador del silenciamiento génico de AHRR. En este contexto, como un regulador de AhR, AHRR está potencialmente involucrado en una amplia gama de procesos normales y patológicos que van desde la respuesta xenobiótica a la progresión tumoral.

En el presente trabajo se observaron niveles de transcrito de los genes *CYP1A1* en el grupo CaCu y *Ube2l3* en el grupo control y CaCu mediante RT-PCR. Asimismo, se observó la presencia de proteína de Ube2l3 y GAPDH como proteína constitutiva, por medio de Western Blot. En ambos casos se observa una posible tendencia orientada hacia el aumento en los niveles de transcrito y proteína Ube2l3 en el grupo CaCu. Sin embargo, el valor de p dado por la prueba estadística U de Mann-Whitney es de $p=0.1489$ en ARNm y $p=0.2812$, $p=0.3865$ a nivel de proteína, es decir, no es estadísticamente significativo.

Es probable que el número de observaciones pueda interferir con el valor de p en la prueba estadística ya que con una muestra grande es más probable detectar diferencias significativas entre los grupos cuando éstas existen.

Por otro lado es posible que, dados los múltiples mecanismos reportados en diversos estudios sobre Ube2l3 como enzima ubiquitinadora que además participa en la degradación de oncoproteínas como E7 y AhR como factor transcripcional que interactúa con distintos factores para su heterodimerización, estos estén participando además, de diversas formas en distintos procesos celulares.

10.- CONCLUSIONES

- ✚ Se comprobó la activación de *CYP1A1* mediante RT-PCR.
- ✚ No se encontró evidencia estadística significativa de la actividad transcripcional de AhR mediante la evaluación de los niveles de expresión de ARN mensajero de *CYP1A1* y Ube2l3.
- ✚ No se encontró evidencia estadística significativa en los niveles de expresión de la proteína Ube2l3 asociada a la etapa de carcinogénesis.

11- PERSPECTIVAS

- Aumentar el número de individuos por grupo, para obtener posiblemente una tendencia más definida entre los grupos de estudio.
- Medir los niveles de expresión de la proteína p53 en cada uno de los grupos de estudio.
- Observar la activación del AhR es decir, su presencia en el núcleo por medio de inmunofluorescencia.
- Detectar la presencia o ausencia de pRb en los grupos de estudio.

12.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ❖ Alfaro A., Fournier M. (2013). Virus del Papiloma Humano. *Médica de Costa Rica y Centroamérica LXX*. 606, 211-2017.
- ❖ Álvarez Salas L. (2006). Ácidos nucleicos terapéuticos contra cáncer cervical: una alternativa viable. *Cinvestav*. 4,44-48.
- ❖ Aubin F., Pretet L., Mougin C., Riethmuller D.(2007). Infection a Paillomavirus humains. *Annales De Dermatologie Et De Venereologie*. 134(1): 94-9.
- ❖ Barouki R., Coumoul X., Fernandez-Salguero P. (2007). The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein. *FEBS Letters*. 581, 3608-3615.
- ❖ Brown M.A. Tumor suppressor genes and human cancer (1997). *Advances in Genetics*. 36, 45-135.
- ❖ Burd, E.M. (2003). Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clinical Microbiology Reviews*. 16(1):1–17.
- ❖ Cabezas C. E. (1998). Conducta frente a la Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC). *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*. 24(3): 156-160.
- ❖ Cascales A. M. (2005). Vía Ubiquitina Proteosoma. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*. 71(1): 45-82.
- ❖ Castillo A. (2011). Anatomía y fisiología del aparato reproductor femenino y la mama. *Complejo Hospitalario Universidad de Albacete*. 2-4.
- ❖ Chavaro N., Arrollo G., León F., Walter G., Pérez I. (2009) *Cáncer cervicouterino*. *Análes de radiología*. 1: 61-79.
- ❖ Chopra M., Schrenk D. (2011). Dioxin toxicity, aryl hydrocarbon receptor signaling, and apoptosis-persistent pollutants affect programmed cell death. *Reviews in toxicology*. 41(4):292-320.

- ❖ Crowley, L. V. (2013). An introduction to human disease: Pathology and pathophysiology correlations. Editorial McGraw Hill. México. 32.
- ❖ De Guglielmo Z., Rodríguez A., Ávila M., Veitía D., Fernandes A., Correnti De Plata M. (2010). Virus del Papiloma Humano y Factores de Riesgo en el desarrollo de cáncer cérvicouterino. *Revista Venezolana de Oncología*. 22(1):32-38.
- ❖ De la Cruz E., Mohar A., Lizano M. (2004). Elementos víricos y celulares que intervienen en el proceso de replicación del virus del papiloma humano. *Reviews Oncology*. 6(5): 263-271.
- ❖ Doerfler D., Bernhaus A., Kottmel A, Sam C, Dieter K, Joura E. (2009). Human papilloma virus infection prior to coitarche. *American Journal of Obstetrics Gynecology*. 200(5):487.
- ❖ Duensing S., Münger K. (2004). The Human Papillomavirus Type 16 E6 and E7 Oncoproteins Independently Induce numerical and Structural Chromosome Instability. *Cáncer Research*. 62(23):7075-82.
- ❖ Félix B.L.J (2014). Aspectos generales sobre la estructura y función de las proteínas codificadas por el virus del Papiloma Humano. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 45(2):108-118.
- ❖ Fenteany G., Staendaert R., Lane W. (1995). Inhibition of proteasomeactivities and subunit-specific amino terminal threonine modification by lactacystine. *Science*. 268, 726-731.
- ❖ Ferrá T., Estrada D., Bermejo W. (2009). Factores de riesgo medioambientales del cáncer cervicouterino. *Revista Archivo Médico de Camagüey*. 13(2). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102502552009000200006&lng=es&tlng=es.
- ❖ Finley D., Ciechanover, A., Varshavsky A. (1984). Thermolability of ubiquitin-activating enzyme from the mammalian cell cycle mutant ts85. *Cell*. 37,43-55.
- ❖ Fritsche C., Haessler C., Brandner G. (1993). Induction of nuclear accumulation of the tumor suppressor protein p53 by DNA-damaging agents. *Oncogene*. 8, 307-318.

- ❖ Gallego A., Asuncion de Sade M., Marín A., Blanco S., González M. (2011). Aspectos fundamentales del citocromo P450. *Eptisa Salud Casta. Colección Docena Universitaria*. 7-33.
- ❖ García J., Schneider J. (2007). Enfermería en reproducción humana. Editorial Dikson. Madrid, España. 27.
- ❖ GLOBOCAN (2012). Estimated cáncer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>.
- ❖ Goldstein J., y De Morais S. (1994). Biochemistry and molecular biology of the human CYP2C subfamily. *Pharmacogenetics*. 4(6): 285-99.
- ❖ Guengerich, P. (2006). Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *The AAPS Journal*; 8(1). 101-105.
- ❖ Hamdane D., Zhang H., Hollenberg P. (2008). Oxygen Activation by Cytochrome P450 Monooxygenase. *Official Journal of the International Society of Photosynthesis Research*. 98(1-3): 657- 666.
- ❖ Hankinson, O. (1995). The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annual Review Pharmacology Toxicology*. 35, 307-340.
- ❖ Hansen R., Oren M. (1997). p53; from inductive signal to cellular effect. *Current Opinion in Genetics & Development Journals*. 7, 46-51.
- ❖ Harris C., Holstein M. (1993). Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *The New England Journal of Medicine*. 329(18): 1318-1327.
- ❖ Hilt W., Wolf D. (1996). Proteasomes: destruction as a programme. *Trends in Biochemical Sciences*. 21, 96-102.
- ❖ Hoffman B., Schorge J., Schaffer J., Halvorson L., Bradshaw K., Cunningham F. (2009). Williams Ginecologia, Editorial Mc Graw Hill. México. 617-642, 646-653.
- ❖ Jesenberger V., Jentsch S. (2002). Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 3, 112-121.
- ❖ Jhingran A. Abeloff. (2008). Cancers of the cervix, vulva, and vagina; Abeloff's Clinical Oncology. 4th edición. Editorial ELSEVIER. Capítulo 91.
- ❖ Kim D y Guengerich F. (2005). Cytochrome P450 activation of arylamines and heterocyclic amines. *Annual Reviews Pharmacology Toxicology*. 45, 27-49.

- ❖ Ko J., Han Lee Y., Yong S., Soo Y., Min S., Hoon J., Kim J., Wook J., Jang S., Young Z., Kim I., Namkoong S., Woo J. (2003). Identification and differential expression of novel human cervical cancer oncogene HCCR-2 in human cancers and its involvement in p53 stabilization. *Oncogene*. 22, 4679-4689.
- ❖ König J., Nies A., Cui Y., Leier I. y Keppler, D. (1999). Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1461, 377-394.
- ❖ López M., Anzola M., Cuevas Salazar N., Aguirre J., Martínez de Pancorbo M. (2001). p53, un gen supresor tumoral. *Gaceta medica de Bilbao*. (98)1: 22-32.
- ❖ López S y Lizano S. (2006) Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina, *Cancerología*. 1(1): 31-55.
- ❖ Lowy D y Schiller J. (2006). Prophylactic human papillomavirus vaccines. *Journal of Clinical Investigation*. 116(5):1167-73.
- ❖ Manzano R., Montuenga L., Dayton M *et al.* (2002). CL100 expression is down-regulated in advanced epithelial ovarian cancer and its re-expression decreases its malignant potential. *Oncogene*. 21, 4435-4447.
- ❖ Mastandrea C., Chichizola C., Ludueña B., Sánchez H., Álvarez H., Gutiérrez A. (2005). Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores. *Acta bioquímica clínica Latinoamericana*. 39(1): 27-36.
- ❖ McLemore T., Adelberg S., Lui M., McMahon N., Yu S., Hubbard W., Czerwinski M., Wood., Storeng R., Lubet R. (1990). Expression of *CYP1A1* gene in patients with lung cancer: evidence for cigarette smoke-induced gene expression in normal lung tissue and for altered gene regulation in primary pulmonary carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute*. 82(16): 1333-1339.
- ❖ Modificación a la Norma Oficial Mexicana (NOM-014-SSA2-1994) para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer cervicouterino. Diario Oficial, 2007.
- ❖ Moynihan T., Ardley H, Leek J. (1996). Characterization of a human ubiquitin-conjugating enzyme gene UBE2L3. *Mammalian Genome*. 7(7): 520.

- ❖ Muñoz N, Franceschi S., Bosseti C., Role. (2002). Of parity and human papillomavirus in cervical cancer: IARC multicentric case-control study. *Lancet*. 359 (9312): 1093-1101.
- ❖ Muñoz N., Bosch F., De Sanjose S., Herrero R, Castellsagué X, Shah K., Snijders P, Meijer C. (2003). Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *The New England Journal of Medicine*. 348(6): 518-527.
- ❖ Nishimura M., Yaguti, H., Yoshitsugu, H., Naito S., Satoh T. (2003) Tissue distribution of mRNA expression of human cytochrome P450 isoforms assessed by high sensitivity real-time reverse transcription PCR. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*. 123, 369-375.
- ❖ Oh K., Kalinina A., Wang J., Nakayama K., Bagchi S. (2004). *Journal of Virology*. 78, 5338–5346.
- ❖ Oliner J., Pietenpol J., Thiagalingam S., Gyuris J., Kinzler K., Vogelstein B. (1993). Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumor suppressor p53. *Nature*. 362, 857-860.
- ❖ Rahimi Nader. (2012). The Ubiquitin-Proteasome System Meets Angiogenesis. *Molecular Cancer Therapeutics*. 11(3): 0F1-0F11.
- ❖ Reinstein E., Scheffner M., Oren M., Ciechanover A., Schwartz A. (2000) Oncogenes. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 19(1): 54-67.
- ❖ Reyes O., Mejia A., Sanchez E., Cabañas M., Ramírez P., Chavez L., González F., Elizondo G. (2010). Ube2l3 gene expression is modulated by activation of the aryl hydrocarbon receptor. Implications for p53 ubiquitination. *Biochemical Pharmacology*. 15(6): 932-940.
- ❖ Rubiano M.C (2007). Adaptaciones celulares. Crecimiento celular. Interacción célula matriz. Disponible en: http://eusalud.uninet.edu/apuntes/tema_03.pdf
- ❖ Rubin M. (2006). Patología estructural: Fundamentos clinicopatológicos en Medicina. Cuarta edición., Mc Graw Hill Interamericana. España, 154-180.
- ❖ Sanabria J., Fernández Z., Cruz I., Oriolo L., Llanuch M. (2011). El cáncer cervicouterino y las lesiones precursoras. *Revista Ciencias Médicas de Pinar del Río*. 15(4). 295-302.

- ❖ Sarduy M. (2009). Correlación citohistológica en las neoplasias intraepiteliales cervicales y en la identificación del VPH en esas lesiones. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*, 35(1). Disponible en: http://scieloprueba.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-600X2009000100007&lng=es&nrm=iso
- ❖ Schenkman, J.B. (1992). Steroid metabolism by constitutive cytochromes P450». *Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 43, 1023- 1030.
- ❖ Senba M., Mori N. (2012). Mechanisms of virus immune evasion lead to development from chronic inflammation to cancer formation associated with human papillomavirus infection. *Oncology reviews*. 6(2). Disponible en: <http://oncologyreviews.org/index.php/or/issue/view/23>.
- ❖ Shimada T., Inoue K., Suzuki Y., Kawai T., Azuma E., Nakajima T., Shindo M., Kurose K., Sugie A., Yamagishi Y., Fujii-Kuriyama Y., Hashimoto M (2002) Arylhydrocarbon receptor-dependent induction of liver and lung cytochromes P450 1A1,1A2 and 1B1 by polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in genetically engineered C57BL/6J mice. *Carcinogenesis*. 23, 1199-1207.
- ❖ Sionov R., Haupt Y. (1993). The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene*. 18, 6145-6157.
- ❖ Smiraglia D., Szymanska J., Kraggerud S., Lothe R., Peltomäki P, Plass C.(2002). Distinct epigenetic phenotypes in seminomatous and nonseminomatous testicular germ cell tumors. *Oncogene*. 21, 3909-3916.
- ❖ Soimout F. (2007). Neoplasias, Definiciones, Nomenclatura. Características Disponible en: de http://eusalud.uninet.edu/apuntes/tema_14.pdf
- ❖ Talis A., Huibregtse., Howley P. (1998). The role of E6AP in the regulation of p53 protein levels in human papillomavirus (HPV)-positive and HPV-negative cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 273(11): 6439-45.
- ❖ Torres K., Cruz A., Madrid V., (2014). Epidemiología del cáncer cervicouterino, *Gaceta Mexicana de Oncología*. 13(4): 4-17.
- ❖ Vázquez G., Rubio J., Espinosa J., (2016). Mecanismos de acción del receptor de Hidrocarburos de Aros en el metabolismo del Benzo a pireno y el desarrollo de

tumores. *Revista especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 20(1). Disponible en: <http://www.revistas.unam.mx/index.php/tip/article/view/54509>.

- ❖ Vega G., Ávila P., García N., Camacho A., Becerril A., Vega G. (2014). Infección por el virus del Papiloma Humano. *Biología Molecular. European Scientific Journal*. (10)18: 357-360.
- ❖ Villar del Fresno., Bermejo P., Martín-Aragón S. (2004) Aspectos farmacológicos del Citocromo P-450. *Real Academia de Farmacia*: 364-365.
- ❖ Wang, J., Sampath A., Raychaudhuri P., Bagchi S. (2001). Both Rb and E7 are regulated by the ubiquitin proteasome pathway in HPV-containing cervical tumor cells. *Oncogene*. 20, 4740–4749.
- ❖ Warren J., Gullett H., King V. (2009). Cervical Cancer Screening and Update Guidelines. *Primare Care. Clinics in Office Practice*: 36(1): 131-149.
- ❖ Willey J., Coy E., Frampton M., Torres A., Apostolakos J., Hoehn G., Schuermann H., Thilly G., Olson E., Hammersley R., Crespi C., Utell M.. (1997) Quantitative RT-PCR measurement of cytochromes p450 1A1, 1B1, and 2B7, microsomal epoxide hydrolase, and NADPH oxidoreductase expression in lung cells of smokers and nonsmokers. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 17, 114-124.
- ❖ Winer R., Hughes J., Feng Q. (2006). Condom Use and the Risk of Genital Human Papillomavirus Infection in Young Women. *The New England Journal of Medicine*. 354, 2645-2654.
- ❖ Wogan G., Hecht S., Felton S., Conney H., Loeb A. (2004) Environmental and chemical carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*. 14, 473-486.
- ❖ Yoshikazu O., Yumiko T., Masato N. (2003). MRImaging of the Uterine Cervix: Imaging Pathologic Correlation. *Radiographics*. 23,425-45.