



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EXPRESIÓN DE LOS GENES ESPECÍFICOS DE PLACENTA 8
Y 9 (PLAC8 Y PLAC9) EN CÉLULAS DE CÉRVIX UTERINO**

T E S I S

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

P R E S E N T A

LEONEL DÍAZ MUÑIZ



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX.

2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA

VOCAL: SAMUEL CANIZALES QUINTEROS

SECRETARIO: KEIKO TANIGUCHI PONCIANO

1ER. SUPLENTE: CLAUDIA TERESA TOVAR PALACIO

2° SUPLENTE: SARA MARGARITA GARZA AGUILAR

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA: LABORATORIO DE ONCOLOGÍA GENÓMICA, UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN ENFERMEDADES ONCOLÓGICAS, HOSPITAL DE ONCOLOGÍA, CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.

M. EN C. KEIKO TANIGUCHI PONCIANO

ASESOR DEL TEMA

DR. MAURICIO SALCEDO VARGAS

SUPERVISOR TÉCNICO

LEONEL DÍAZ MUÑIZ

SUSTENTANTE



ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	v
ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	vii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Cérvix	1
1.2 Lesiones precursoras del cérvix	2
1.2.1 Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado	3
1.2.2 Lesión intraepitelial escamosa de alto grado/ Carcinoma in situ .	3
1.3 Cáncer de cérvix	4
1.4 Factores de riesgo	6
1.4.1 Virus del papiloma humano (VPH)	6
2. ANTECEDENTES	8
2.1 Relación embarazo-cáncer.....	8
2.1.1 Células del trofoblasto y células tumorales.....	9
2.1.1.1 Proliferación.....	10
2.1.1.2 Angiogénesis.....	11
2.1.1.3 Invasión.....	12
2.1.1.4 Propiedades inmunológicas de la interfase fetomaternal y el microambiente tumoral.....	13
2.2 Minería de datos del análisis serial de expresión de genes (SAGE) .	14
2.3 Plac8.....	16
2.3.1 Plac8 en cáncer.....	18
2.4 Plac9.....	20
2.4.1 Plac9 en cáncer.....	21
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	24
4.1 Hipótesis	24



4.2	Objetivo general	24
4.2.1	Objetivos específicos	24
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	25
5.1	Análisis in silico de microarreglos de expresión	25
5.2	Toma de muestra.....	25
5.3	Extracción de ácidos nucleicos	26
5.3.1	Extracción de RNA	26
5.3.2	Extracción de DNA	27
5.3.2.1	Genotipificación de VPH.....	28
5.4	Síntesis de cDNA.....	29
5.5	Condiciones de PCR.....	29
5.6	Electroforesis	30
6.	RESULTADOS	31
7.	DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	38
8.	CONCLUSIONES	42
9.	PERSPECTIVAS	42
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
1.	Esquema del cérvix	1
2.	Lesiones precursoras del cérvix	2
3.	Lesión de bajo grado del cérvix	3
4.	Lesión de alto grado de cérvix y carcinoma <i>in situ</i>	4
5.	Gráfica de incidencia y mortalidad de cáncer cérvicouterino	5
6.	Genoma del VPH	7
7.	Comparación entre la placenta y el microambiente tumoral	8
8.	Minería de datos de la familia Plac en librerías de placenta y cérvix sano	15
9.	Búsqueda de familia Plac en cérvix sano y lesión de alto grado	16
10.	Dot Blot de Plac8 y Plac9 del análisis <i>in silico</i> de microarreglos de expresión	31
11.	Expresión de Plac8 y 9 en líneas celulares de cáncer de cérvix y cérvix sano	32
12.	PCR de Plac8 y 9 en lesiones de bajo grado	33
13.	PCR de Plac8 y 9 en lesiones de alto grado	33
14.	PCR de Plac8 y 9 en CaCU	34
15.	PCR de L1 en lesiones de bajo grado	35
16.	PCR de L1 en lesiones de alto grado	36
17.	PCR de L1 en CaCU	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Pág.
1.	Resultados de la PCR punto final para observar la expresión de Plac8 y 9 en células del cérvix	35
2.	Resultados de la PCR punto final para observar la presencia de VPH en células del cérvix	36
3.	Resultados de la prueba estadística Chi-cuadrada para observar la asociación entre la expresión de Plac8 y 9 con la presencia de VPH en células del cérvix	37



ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
PDCA*	Adenocarcinoma ductual pancreático
FFL*	Bucle de avance
CaCU	Cáncer cervicouterino
MSC*	Células estromales multipotenciales
GDM*	Diabetes mellitus gestacional
Plac8	Gen específico de placenta (Plac8)
Plac9	Gen específico de placenta (Plac9)
L	Gen de expresión tardía del virus de papiloma humano
E	Gen de expresión temprana del virus de papiloma humano
miARN	Micro ácido ribonucleico
SAGE*	Minería de datos del análisis serial de expresión de genes
NIC III	Neoplasia intraepitelial cervical de tercer grado
pan-cáncer	Panel de cáncer
PCR*	Reacción en cadena de la polimerasa
NCR*	Región no codificante del virus de papiloma humano
SI	Sistema inmunológico
VPH	Virus del Papiloma humano
ZT	Zona de transformación

*Por sus siglas en ingles



RESUMEN

El cáncer cérvicouterino es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, ocupando el cuarto lugar y el segundo lugar en México tanto en incidencia como mortalidad correspondientemente. El proceso carcinogénico del cáncer cérvicouterino (CaCU), al igual que en los demás tipos de cáncer comprende de una serie de mecanismos celulares los cuales presentan ciertas irregularidades o anormalidades, así como algunas modificaciones en sus vías de señalización moleculares. Las células trofoblásticas tienen cierta identidad con las características de las células cancerosas, como son, la capacidad de proliferación, invasión, angiogénesis y la evasión respuesta inmunológica, las vías de señalización moleculares que están involucradas en estos procesos, pueden ser utilizadas por células trofoblásticas o células cancerosas. Plac8 y Plac9 son genes específicos de placenta que están implicados en el éxito del desarrollo placentario. Aunque se desconoce la función biológica de ambos genes, se sabe que el gen Plac8 está involucrado en distintos procesos celulares y dependiendo del tipo de célula y el contexto celular en el que se exprese, será el papel que desempeñe. Por otro lado, Plac9 interviene en la función placentaria y sus niveles de expresión son muy altos en embriones de etapa media. Ambos genes se les ha asociado con algún tipo de participación en diferentes tipos de cáncer. En el presente estudio se realizó un análisis *in silico* para tener una noción del comportamiento de expresión de estos dos genes en el cáncer cérvicouterino (CaCU), se validaron los resultados con una PCR punto final y se obtuvo una visión más amplia de la participación de estos genes en células del cérvix uterino. Para Plac8 se encontró una expresión en cérvix sano, lesiones de bajo y alto grado, así como en CaCU, con un diferente patrón de expresión, entre las diferentes muestras de los grupos. Plac9 por su parte tuvo expresión en tejido sano pero no así en lesiones precursoras y en CaCU teniendo un valor estadístico de $p=0.0000003$ y a su vez una $p=0.0132$ sugiriéndonos que la presencia del virus de papiloma humano (VPH) está modificando su expresión en las células del cérvix uterino. El comportamiento de expresión de ambos genes en diferentes condiciones del tejido cervical, los posicionan como posibles candidatos, a Plac8 como blanco terapéutico y a Plac9 como marcador molecular de progresión.



1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cérvix

La parte inferior del útero está constituida por el cuello uterino o cérvix. El cérvix está integrado por dos partes, hacia el interior, el endocérvix formando parte de un canal entre la cavidad uterina y la vagina, y en el exterior una región que se denomina exocérvix que está orientada hacia la vagina. El endocérvix tiene un aspecto fusiforme y es la parte que une a la cavidad uterina con la vagina, tiene una forma ligeramente cilíndrica y corresponde a dos tercios de la parte superior del cérvix, en el interior se forma un canal estrecho. El endocérvix está recubierto por un epitelio cilíndrico simple, con células epiteliales mucosecretoras y algunas ciliadas, interpuestas en la parte superior del cérvix, cuya responsabilidad está relacionada con la movilización del moco, cubriendo la superficie de la mucosa y revistiendo sus pliegues, hendiduras y túbulos ⁽¹⁾. El exocérvix es la sección que va desde el orificio cervical externo y continua hasta llegar a la vagina, lo reviste un epitelio plano estratificado no queratinizado, es la continuación del epitelio vaginal que termina por unirse con el epitelio columnar en la unión escamo-columnar ⁽¹⁾. La zona de transformación (ZT) está ubicada entre los restos del epitelio mucoso endocervical y el inmaduro epitelio escamoso exocervical (Figura 1

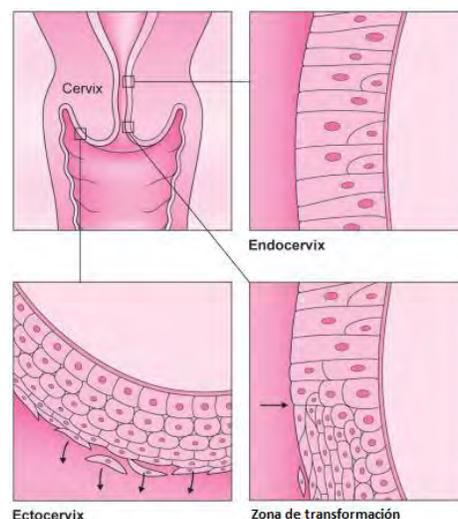


Figura 1. Esquema del cérvix. Ubicación de cérvix: el endocérvix, endocérvix y la (ZT) ⁽²⁾.



1.1 Lesiones precursoras del cérvix

Las lesiones displásicas cervicales (premalignas) y lesiones carcinomatosas en su mayoría tienen origen en la ZT. En las mujeres premenarquicas y postmenopáusicas la ZT en ocasiones se aleja del canal cervical debido a cambios físicos y hormonales, dificultando su visualización en los exámenes cérvico-vaginales. Por otra parte en la ZT y la porción vaginal circundante puede haber displasia (considerada clínicamente como maligna) debido a la infección por el virus del papiloma humano (VPH), que puede provocar modificaciones en la arquitectura del tejido normal derivándose las lesiones de bajo y alto grado (Figura 2).

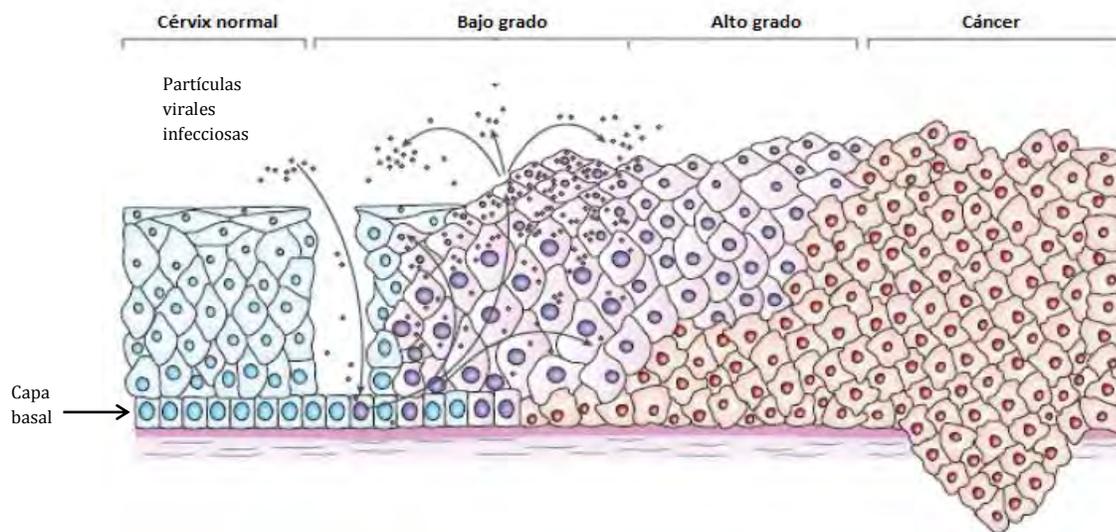


Figura 2. Lesiones precursoras del cérvix. Una infección por el VPH puede tener acceso por las células de la capa basal a través de microabrasiones del epitelio cervical; tras la infección, se expresan algunos de los genes tempranos (E) y el DNA viral se replica a partir del DNA episomal (núcleos purpura). En las capas superficiales el genoma viral también se reproduce, entonces los genes tardíos (L) junto con E4 se expresan. Las lesiones intraepiteliales de bajo grado apoyan la replicación viral reproductiva. La progresión de las lesiones a cáncer microinvasivo o invasivo está asociada con la integración del genoma viral a los cromosomas del huésped (núcleos rojos). (Adaptada de Woodman, *et al.* 2007) ⁽³⁾.



1.1.1 Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado

Este tipo de lesiones muestran pequeñas atipias en la maduración y diferenciación celular, citológicamente las células escamosas superficiales que se encuentran aisladas, exhiben citoplasmas claros de bordes definidos, núcleos hipertróficos con una cromatina ligeramente granular con distribución homogénea. Las células epiteliales generan una perspectiva multinucleada debido a las anomalías en las estructuras cromosómicas asociadas en la mitosis creando este aspecto multinuclear (Figura 3). Es el tipo de menor riesgo, representa solo una displasia leve o crecimiento celular anormal, y se caracteriza por estar confinado a 1/3 de la capa basal del epitelio cervical ⁽⁴⁾.

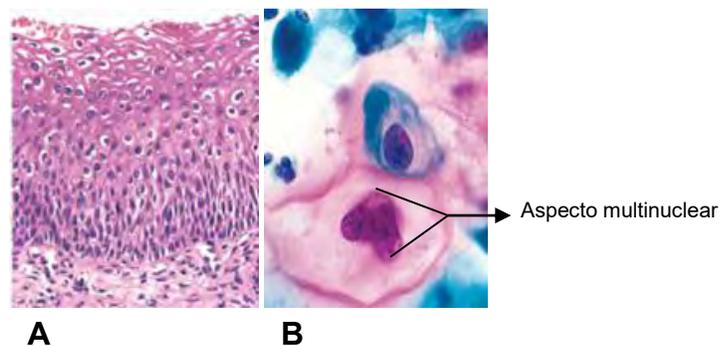


Figura 3. Lesión de bajo grado del cérvix. (A) Histología de una lesión de bajo grado; **(B)** Citología de células de cérvix que están pasando por una lesión de bajo grado.

1.1.2 Lesión intraepitelial escamosa de alto grado/ Carcinoma *in situ*

En las lesiones de alto grado se observa la presencia de células basaloides inmaduras en el tercio superior de la capa epitelial cervical. Los múltiples cambios en las células intermedias y parabasales ponen en riesgo el núcleo y el citoplasma, estos cambios afectan desde la zona basal hasta la intermedia (Figura 4) ⁽⁵⁾. En este tipo de lesión, la displasia es severa y cubre más de los 2/3 de todo el epitelio cervical, en algunos casos incluyendo todo el grosor del revestimiento cervical considerándose cáncer *in situ* ⁽⁴⁾. El cáncer *in situ* es aquel que aún no se ha propagado a tejidos más profundos, pero presenta la capacidad para progresar a cáncer invasor ⁽⁶⁾.

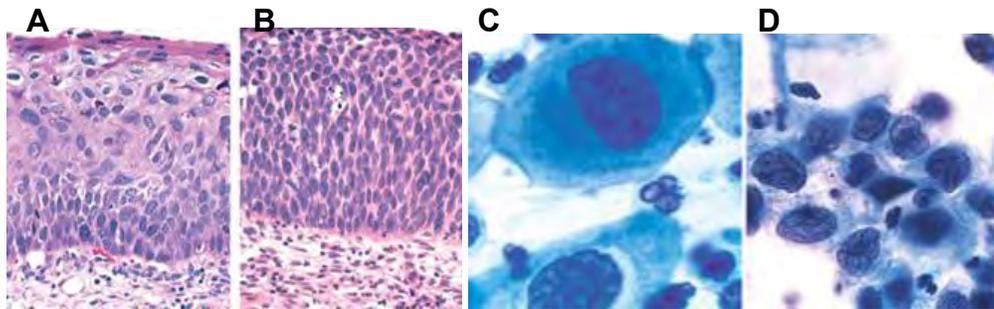


Figura 4. Lesión de alto grado del cérvix y carcinoma *in situ* (A) y (B) Histología de una lesión de alto grado y cáncer *in situ*; (C) y (D) Citología de células de cérvix que están pasando por una lesión de alto grado y cáncer *in situ*.

1.2 Cáncer de cérvix

El cáncer cérvicouterino ocupa el cuarto lugar entre las mujeres a nivel mundial y séptimo en la lista de tipos de cáncer en general en mortalidad. Es el más frecuente entre las mujeres en 45 países en todo el mundo, su tasa de mortalidad es mucho más alta que cualquier otro tipo de cáncer entre las mujeres en 55 países, dentro de los que se encuentran países de África, muchos otros de Asia (incluida India) y algunos otros pocos sudamericanos y centroamericanos (Figura 5) ^(7,8). Alrededor de 9 de cada 10 muertes (87%) por cáncer cérvicouterino se producen en regiones menos desarrolladas ⁽⁷⁾. En Latinoamérica las mujeres son consideradas como una población de alto riesgo a desarrollar cáncer cérvicouterino (CaCU). En el año 2008, CaCU ocupó el segundo puesto en incidencia y mortalidad con un total de 68,620 casos diagnosticados, la tasa de incidencia fue de 23.5 y la de mortalidad de 10.8 por cada 100,000 mujeres. En México se reporta que anualmente mueren 4,000 mujeres víctimas del cáncer cérvicouterino y se les proporciona atención médica a cerca de 9,000 pacientes con CaCU invasor. Las tasas de incidencia y mortalidad fueron de 19.2 y 9.7 por cada 100,000 mujeres en el año 2012 (Figura 5) ⁽⁹⁾.

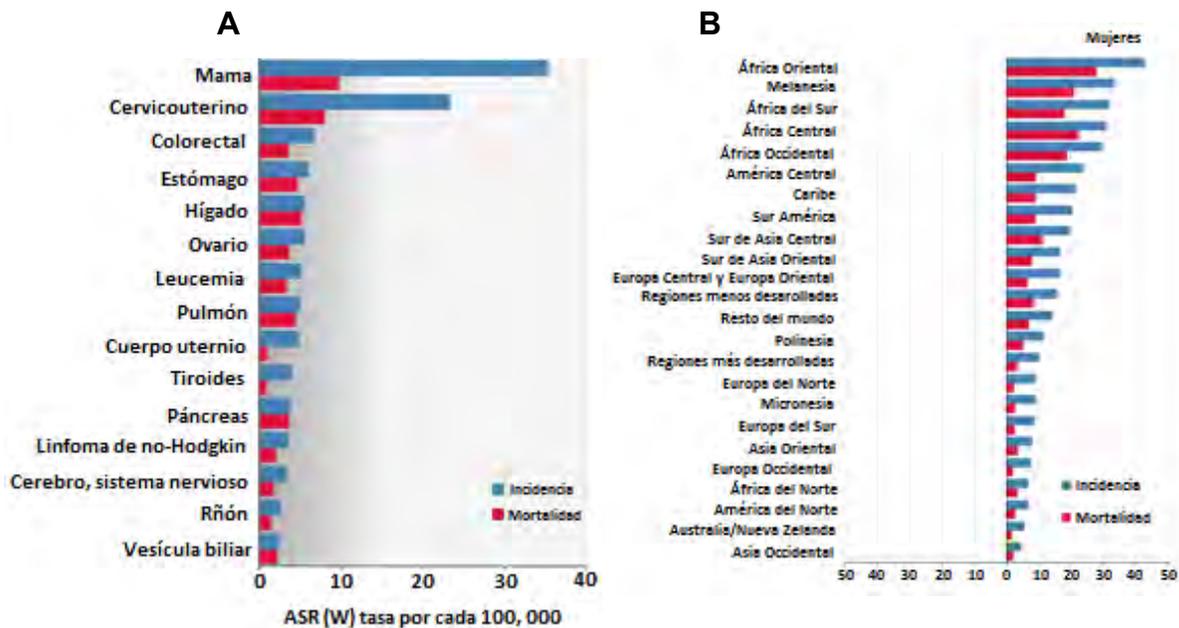


Figura 5. Gráfica de incidencia y mortalidad de cáncer cervicouterino. (A) A nivel mundial; (B) En México. (Modificada de Globocan 2012) (7).

A pesar de que las tasas de incidencia y mortalidad han disminuido en los últimos años, no ha tenido el alcance suficiente en todas las regiones, solo en países desarrollados o donde se ha observado una mejora en la situación económica y social, consecuencia de la suma de esfuerzos en actividades como, prevención, diagnóstico precoz y el oportuno tratamiento de precáncer y del cáncer en sus etapas iniciales (8). Específicamente en México, hay una elevada morbilidad y mortalidad que se relaciona con las disparidades sociales, por ejemplo, el lugar de residencia, grupo étnico, nivel socioeconómico y el acceso a la seguridad social, entre algunos otros factores que tienen una asociación con las mujeres que padecen CaCU (10). El cáncer cérvicouterino se puede prevenir, si se diagnostica a tiempo, mediante exámenes de detección que tienen como propósito detectar lesiones precancerosas y combatirlas para evitar que el cáncer se desarrolle. El tratamiento puede ser aún más exitoso si se detecta en etapas iniciales (11).



1.3 Factores de riesgo

La etiología de CaCU es compleja y multifactorial, entre los factores de riesgo que juegan un papel importante en la aparición de lesiones precancerosas aumentando las probabilidades de desarrollar CaCu, se encuentran, el tabaquismo, el mal estado nutricional, la multiparidad, edad de inicio de la vida sexual, el número de parejas sexuales y antecedentes de infecciones de transmisión sexual. Sin embargo, el principal factor etiológico es la infección por VPH, no obstante, los factores de riesgo ya mencionados no tienen relación alguna con la progresión a CaCU a causa de una infección por VPH ⁽¹²⁾.

1.3.1 Virus del papiloma humano (VPH)

El VPH es un virus pequeño (55nm de diámetro) de doble cadena de DNA circular perteneciente a la familia *Papillomaviridae*, aproximadamente contiene alrededor de 8,000 pb y codifica en ocho o nueve marcos abiertos de lectura que se transcriben como mARN policistrónicos ⁽¹³⁾. Entre los genes de VPH, se incluyen los genes de expresión temprana o también conocidos como genes E (E1 a E7), cuya función es tener el control en la replicación y expresión génica viral; los genes de expresión tardía o genes L (L1 y L2), de los cuales sus productos estructuran la cubierta proteica del virus, y por último está la región genética no codificante (LCR o NCR), que se encarga de la regulación de la expresión de los genes virales, en esta región se unen distintos tipos de factores de transcripción y factores esteroidales (Figura 6) ⁽¹⁴⁾. Su cubierta proteica (cápside) es icosaédrica, resguarda al ADN viral y está conformada por una proteína que contiene una región altamente antigénica que comparten varios tipos de VPH.

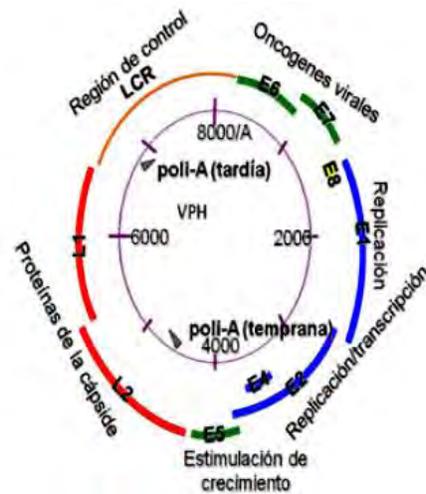


Figura 6. Genoma del VPH. Esquema de los genes que conforman el genoma del VPH. Genes tempranos o genes E y genes tardíos o genes L. Las proteínas de los genes E6 y E7 son consideradas oncoproteínas virales. E1 y E2 están implicados en la replicación y transcripción del genoma viral. E4 es responsable del ensamblaje y la liberación viral. (Modificada de Zaldívar, *et al.* 2012) ⁽¹⁵⁾.

La cápside del virus está formada por dos proteínas (L1 y L2); de la totalidad de la partícula viral, la proteína L1(57 kD) representa el 80%, es la principal proteína con 360 copias en los viriones infectantes, organizada en 72 capsómeros, cada capsómero es un pentámero de esta proteína; la otra proteína que conforma al virión es la L2 (43-53 kD), entre sus muchas funciones, se encuentra la intervención en la entrada del virus a las células, la localización de los componentes virales en el núcleo, la unión al DNA, la formación de su cápside y en su estabilidad ⁽¹⁶⁾.

2. ANTECEDENTES

2.1 Relación embarazo-cáncer

Resulta interesante las semejanzas que existen entre dos procesos que prácticamente pueden ser considerados como contra partes, pues uno da origen a la vida y el otro aunque no es su principal objetivo, termina con la vida de la mayoría de la población que desarrollan la enfermedad, hablamos de la embriogénesis y la carcinogénesis ⁽¹⁷⁾. En un ámbito celular, la embriogénesis al poseer similitudes en diferentes procesos con la carcinogénesis, puede resultar ser un buen modelo de estudio. Si se analiza como una sola célula maligna puede proliferar y hacer metástasis dentro de un huésped, esto tiene cierta analogía a lo que ocurre en un embarazo normal humano, donde la placenta en desarrollo invade el útero y el feto logra escapar del rechazo del sistema inmunológico (SI) de la madre.

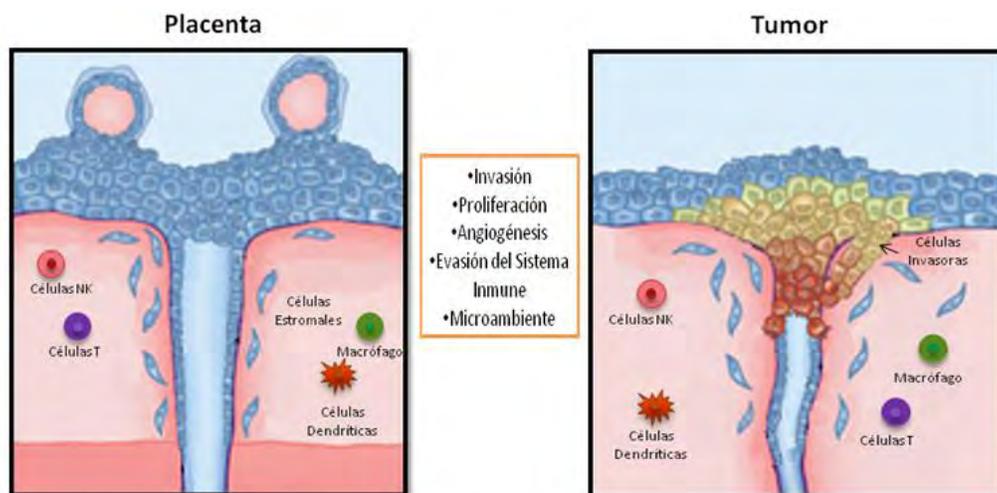


Figura 7. Comparación entre la placenta y el microambiente tumoral. La embriogénesis y la carcinogénesis tienen cierto grado de similitud compartiendo algunos procesos (invasión, proliferación, angiogénesis y evasión del sistema inmunológico) al igual que microambientes celulares donde se desarrollan los mismos. (Adaptada de Holtan, et al. 2009) ⁽¹⁷⁾.



Porque si bien se conocen algunos de los mecanismos moleculares involucrados en la carcinogénesis, no se tiene conocimiento acerca de cómo se interconectan ni de cómo trabajan en conjunto para el desarrollo y el mantenimiento de la enfermedad ⁽¹⁷⁾. La vigilancia inmunológica del SI en los mecanismos de los dos procesos carcinogénico y embrionario son evadidos, pues los dos procesos son exitosos, lo que sugiere que puede existir un patrón en común. El camino por el cual el feto consigue cierto privilegio inmunológico puede ser similar al de las células cancerosas, pasando desapercibidas ante el SI ⁽¹⁷⁾.

2.1.1 Células del trofoblasto y células tumorales

Las células del trofoblasto conforman la capa externa del blastocito, tienen una tasa de proliferación muy alta e invaden rápidamente la decidua materna cerca del día 7. El disco embrionario está rodeado por una monocapa de células citotrofoblásticas cuando el embrión se incustra por debajo de la decidua uterina. Para el día 9 las células citotrofoblásticas se han diferenciado, este tipo de células se puede diferenciar en dos tipos, células sincitiotrofoblásticas y las células trofoblásticas extravelosas (EVT). Las células sincitiotrofoblásticas forman una capa externa y se diferencian terminalmente. Por otra parte, las células EVT poseen un fenotipo proliferativo e invasivo, migran a través de sincitiotrofoblasto en la pared uterina, anclando la placenta, tras la implantación aproximadamente en el día 14. La semejanza entre este tipo celular y las células cancerosas es muy estrecha, las células cancerosas con la habilidad de suministrarse nutrientes y oxígeno (angiogénesis) y su capacidad proliferativa, se pueden comparar con el fenotipo de las células EVT. Los trofoblastos son el linaje más importante en la placenta, son las primeras células en diferenciarse dando origen a tres capas de tejido bien definidas, los trofoblastos determinan la arquitectura y la función placentaria. De las tres capas que se forman, la capa laberíntica de la placenta es



la capa interna que se forma cuando el corion se fusiona con alantoides derivados del mesodermo extraembrionario; el corion está conformado por células madre de trofoblasto ⁽¹⁷⁾. La capa intermedia es la espongiotrofoblastica que se deriva del cono ectoplacentario, al exterior se encuentra la última capa constituida por trofoblastos gigantes que presentan alta invasividad cuando entran en contacto directo con la decidua materna ⁽¹⁸⁾.

2.1.1.1 Proliferación

Las células trofoblásticas como las células cancerosas tienen altos índices proliferativos, además de compartir algunos rasgos moleculares que son características de células que se dividen rápidamente ⁽¹⁹⁾. En aproximadamente el 85% de los cánceres humanos la actividad de la telomerasa está alterada, generalmente un aumento de la actividad de la telomerasa en células somáticas normales es poco común. La capacidad proliferativa está exponencialmente relacionada con la concentración intracelular de la telomerasa; razón por la cual en el primer trimestre del embarazo la actividad es más alta y va disminuyendo conforme la placenta va madurando ⁽²⁰⁾.

En células citotrofoblásticas, la proliferación se puede inducir a través de factor de crecimiento insulínico (IGF) mediante su receptor IGF1R que señala en la vía MAP cinasas MAPK (MAP cinasas), por otra parte la estimulación de la vía PI3K (Fosfatidilinositol-3-cinasa) promueve la supervivencia. Los niveles de IGF se encuentran estrictamente regulados por unas proteínas de unión a IGF (proteasas) y por una proteína plasmática que está asociada al embarazo, la cual también es una proteína de unión; cuando las proteínas de unión pierden el control sobre los IGF se puede generar un fenotipo maligno ⁽¹⁸⁾.



2.1.1.2 Angiogénesis

Existe una probabilidad de que las células EVT y las células tumorales tengan las mismas vías moleculares en el proceso neoangiogénico, que es independiente del mimetismo vasculogénico. Factores de gran relevancia (angiopoyectinas y miembros de la familia VEGF) en el remodelado de la arteria espiral en la placentación también son importantes en una gran diversidad de tumores ^(21 y 22).

Integrantes de la familia del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), como el factor de crecimiento placentario (PGF) al ser inhibidos, afecta la neoangiogénesis reduciéndola al igual que la lfangiogénesis, además obstruye el reclutamiento de macrófagos asociados al tumor. Cuando VEGF se inhabilita PGF en cierta forma lo cubre, el bloqueo de VEGF es en respuesta a situaciones patológicas como: heridas, isquemia, inflamación o cáncer. Los niveles de expresión de ambos factores son altos en células del trofoblasto ⁽¹⁸⁾.

Dentro de la angiogénesis tenemos vías de señalización, como la vía MTOR sensible al oxígeno. Cuando las células del trofoblasto están bajo condiciones ideales, es decir, cuando la célula cuenta con ciertos tipos de factores de crecimiento y la suficiente cantidad de nutrientes, la vía MTOR (objetivo de rapamicina) induce la proliferación al ser una vía reguladora de este proceso ⁽²³⁾. MTOR es una proteína río abajo de la vía PI3K/AKT, se expresa en el epitelio de la placenta humana, desempeña un papel importante en el control de la progresión del ciclo celular, está asociado en la angiogénesis mediante la estimulación de distintas vías de señalización (VEGF, IGF y HIF-1 α) y se encuentra constitutivamente activo en varias malignidades.



2.1.1.3 Invasión

El suministro de nutrientes, así como de sangre es esencial en el embarazo y en el desarrollo del cáncer, como tal una invasión a través de los tejidos es fundamental para este proceso. La diferencia entre las células cancerosas y los trofoblastos, es la difusión de las células cancerosas por todo el huésped para posteriormente proliferar localmente, en cambio, los trofoblastos se diferencian organizadamente hasta invadir localmente sin presencia de metástasis ⁽²⁴⁾.

La transición epitelio-mesenquimal (TEM) es un proceso que ocupan tanto los trofoblastos como las células cancerosas en la invasión celular ⁽²⁵⁾. En la invasión celular es necesario cumplir con varios requerimientos cambios en las moléculas de adhesión, así como la secreción de proteasas y la presencia de algunos factores de crecimiento; al activarse la TEM se elimina la inhibición por contacto célula-célula. El programa celular en la invasión incluye modificaciones, como lo son la expresión de integrinas y la caída de la E-cadherina, disminuyendo la polaridad y facilitando la motilidad. Las células trofoblásticas y las cancerosas, ambas secretan proteasas que degradan la matriz extracelular que es un requisito para la expansión celular a través de los tejidos ⁽¹⁸⁾.

En la mayoría de los cánceres hay una estimulación anómala de la vía Wnt, que conduce a una acumulación de β -catenina, al evitar la degradación proteosomal. La translocación de β -catenina al núcleo inducirá la expresión de sus genes blanco. β -catenina no repercute la motilidad de las células EVT, sin embargo, la inhibición de la vía Wnt- β -catenina interfiere con la implantación del blastocito ⁽²⁶⁾. La estimulación de PAR1 (receptor de trombina) en células EVT puede estabilizar a β -catenina, lo cual está asociado con el aumento de la proliferación y la invasividad. La expresión de PAR1 tiene lugar durante la séptima y la décima semana y se detiene en la semana doce. Al igual que en los trofoblastos, en las células cancerosas PAR1 es altamente expresada, específicamente en células que presentan irregularidades en la actividad de p53.



2.1.1.4 Propiedades inmunológicas de la interfase fetomaternal y el microambiente tumoral

Considerando que el útero es un órgano no linfoide, una gran porción de células deciduales son células del sistema inmunitario innato, dentro de las que destacan, células asesinas naturales (NK), macrófagos y células dendríticas (CD) (Figura 7)⁽²⁷⁾. En la interfase fetomaternal, la célula uterina principal es la NK (uNK), que representa alrededor del 70% de todas las células inmunológicas en ese tejido. Las células del estroma endometrial secretan Interleucina 15 (IL-15) atrayendo células NK de la sangre periférica. Las células uNK se diferencian de las Nk de la sangre por no expresar cluster de diferenciación (CD16), el cual es necesario para la citotoxicidad que ocurre a través de células dependientes de anticuerpos ⁽²⁷⁾. Las uNK se caracterizan por ser más inmunomoduladoras que citotóxicas. En una gran variedad de tumores se observa el reclutamiento de células NK por la secreción de IL-15 ⁽²⁸⁾. En comparación con las células uNK, las células NK que se infiltran en el tumor se comportan de manera similar, con una actividad citotóxica reducida y la producción de citocinas ⁽²⁹⁾.

Entre las células de infiltración en la decidua se incluyen los macrófagos, aunque en menor cantidad que las células NK. Los macrófagos secretan interleucina 10 (IL-10) e indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) al fagocitar a las células EVT apoptóticas favoreciendo un medio de tolerancia tipo TH2. Los macrófagos deciduales adoptan un fenotipo inmunosupresor/antiinflamatorio con una alta expresión de ciertos genes (CCL18, IGF1, IDO y neuropilina 1) que están involucrados en la polarización de macrófagos tipo 2 (M2). En el tumor, los macrófagos pueden cumplir ambas funciones, ser inmunosupresores y antiinflamatorios, la polarización tipo TH1 o TH2 depende en gran medida de la activación de NF- κ B (también conocida como NFKB1) ⁽³⁰⁾.



Las células T reguladoras tienen participación en el embarazo así como en el cáncer (Figura 7), son células importantes moduladoras de la tolerancia, se localizan en la decidua al igual que en la sangre periférica en los embarazos normales. Los linfocitos T en el cáncer agotan la respuesta inmunológica antitumoral, restringen la proliferación de los linfocitos T efectores y también están involucrados en el incremento de la densidad de los vasos sanguíneos del tumor, por lo tanto, hay una conexión entre la inmunidad y la angiogénesis ⁽¹⁸⁾.

Existe un vínculo entre la inmunidad y la angiogénesis mediante la secreción de FLT1 y TGF- β 1 (Factor de crecimiento transformante- beta) por parte de las CDs, FLT1 es soluble y también es conocida como VEGFR1 (Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 1), ambas moléculas son necesarias para la supervivencia de las células endoteliales y la maduración vascular, la deficiencia de CDs perjudica sustancialmente la angiogénesis. Como un efecto inmunoregulador, las células cancerígenas pueden secretar factores (VEGF, TGF- β , factor de crecimiento de hepatocitos, osteopontina) que interrumpen la maduración de las CDs, por lo tanto, se tendrá un fenotipo inmaduro de las CDs y un ambiente proangiogénico ⁽¹⁸⁾.

2.2 Minería de datos del análisis serial de expresión de genes (SAGE)

La minería de datos realizada por el grupo de trabajo (Laboratorio de Oncología genómica, Hospital de Oncología) utilizando SAGE, el cual es un sistema abierto donde se pueden obtener los ARNm presentes en un tejido (sistema cuantitativo). Se llevó a cabo el análisis utilizando 2 librerías de placenta (primer trimestre y termino), 3 de cérvix normal y 2 librerías de cérvix con neoplasia intraepitelial cervical de tercer grado (NIC III) de la base de datos del proyecto de anatomía genómica de cáncer del Instituto Nacional de Cáncer (CGAP-NCI por sus siglas en inglés) y de SAGEmap de EMBL-EBI. El objetivo de esta minería de datos fue la búsqueda de genes específicos de placenta que estuvieran involucrados en modulación de la respuesta inmunológica, para ello se evaluó el primer trimestre



de desarrollo de la placenta y el término del desarrollo, posteriormente se hizo una comparación entre librerías de cérvix normal en busca de posibles genes que se expresen en placenta y que posiblemente sean candidatos para estudiarse en el cáncer. La familia Plac fue un grupo de genes específicos de placenta que sobresalió debido a que ésta familia está asociada a un proceso inmunomodulador, criterio de selección que se utilizó en la búsqueda (Figura 8).

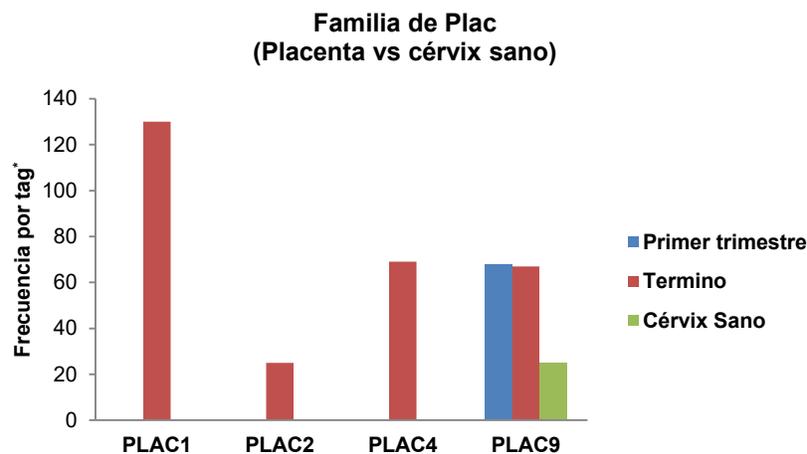


Figura 8. Minería de datos de la familia Plac en librerías de placenta y cérvix sano. Se puede observar la expresión de 4 miembros de la familia de Plac, dónde el único miembro Plac9 se expresa en cérvix sano. (Taniguchi, et al. en proceso), *tag: secuencias de ARNm específicas para un gen.

De esta forma se hizo una búsqueda de los genes de la familia Plac utilizando librerías de cérvix con NIC III y dos genes fueron los que resaltaron (Plac8 y Plac9). Para Plac9 se observa una expresión en cérvix sano y no en la lesión de alto grado, en cambio para Plac8 se expresa tanto en cérvix sano como en cérvix con lesión de alto grado (Figura 9).

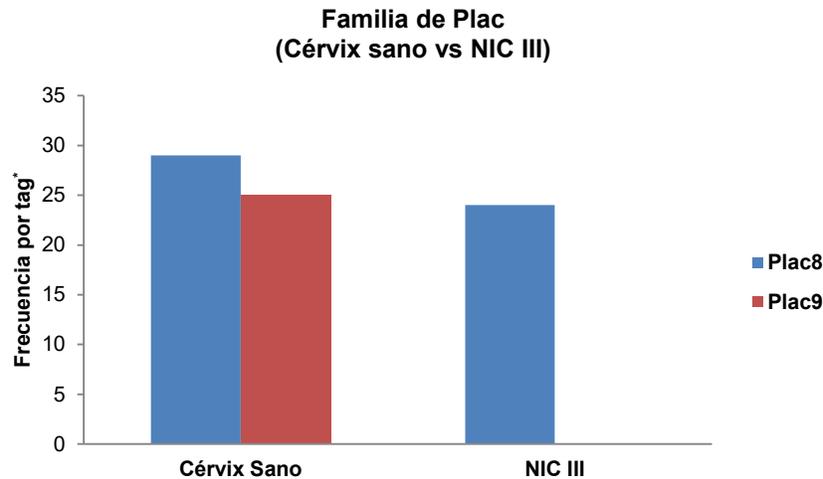


Figura 9. Familia Plac en cérvix sano y lesión de alto grado. Gráfica representativa de la expresión de Plac8 en cérvix de alto grado y no en cérvix sano. Por otro lado, Plac9 se expresa en cérvix sano y no en una lesión de alto grado. (Taniguchi, et al. en proceso), *tag: secuencias de ARNm específicas para un gen.

En este trabajo se seleccionaron estos dos genes candidatos para su correspondiente análisis por microarreglos, así como para su validación.

2.3 Plac8

El gen de placenta específico 8 (Plac8) también conocido como Onzin, codifica para una proteína pequeña (16kDa), altamente conservada de 115 aminoácidos, rica en cisteína, que se encuentra bajo la regulación negativa del gen Myc-c. Esta proteína fue identificada originalmente en el útero de ratón donde los niveles eran altos. Tiempo después se describió en células mieloides y linfoides al igual que en células pulmonares e intestinales ^(18, 31). Alteraciones en este gen, en ratones pueden resultar en aberraciones en la inmunidad innata, cambios en la diferenciación de grasa marrón y blanca, obesidad tardía ^(32, 33) e hipersensibilidad por contacto ⁽³⁴⁾. A pesar de ser una proteína altamente conservada, no existe ningún tipo de relación con algún dominio funcional, es decir, la función molecular de la proteína Plac8 aún se desconoce. La participación de Plac8 en los procesos celulares es influenciada por condiciones que dependen del tipo de célula en el



que se exprese y el contexto, de esta forma Plac8 puede desempeñar distintas actividades. En fibroblastos, Plac8 desempeña un papel importante al inducir una pérdida del control del ciclo celular y la tumorigénesis, además de conferir protección en contra de la apoptosis ⁽³⁵⁾ pero la inducción de la misma en linfocitos humanos ⁽³⁶⁾. Entre otras de sus actividades controversiales, se encuentra la inhibición de la diferenciación celular en células primarias de leucemia mieloide aguda ⁽³⁷⁾, (donde sus niveles son muy altos al igual que en el cáncer de páncreas) y por otro lado la promoción de la transición epitelial a mesénquima en células de cáncer de colon ⁽³⁷⁾. También se ha asociado en la eliminación bacteriana cuando los neutrófilos las fagocitan, en estas células, Plac8 enriquece a una parte de los lisosomas (fracción granular) que es esencial para el efecto anti-microbiano ⁽³²⁾. Estas actividades reflejan la importancia del contexto en el que se presente Plac8. De igual modo se sabe que Plac8 es un gen que se encuentra regulado por un factor de inhibición de los leucocitos en el útero de ratón y que su abatimiento a lo largo del tiempo provoca un aumento de la adiposidad en ratones, lo que sugiere que puede estar asociado con la diferenciación de la grasa marrón, posiblemente por la estimulación de la expresión de la proteína-potenciadora del enlace beta (CEBPB).

En la caracterización del gen Plac8, se aisló a partir de una biblioteca de cADN que se generó de tejido extraembrionario E7.5 de ratón, el cADN de Plac8 ⁽⁴³⁾. La transcripción está conformada por un 5' (UTR), que a su vez está constituido por dos exones en comparación con la secuencia genómica. El polipéptido de 112 aminoácidos tiene una secuencia de iniciación ⁽³⁸⁾ y al final un codón de terminación. El polipéptido resultante es citoplasmático en un 47,8% ⁽³⁹⁾. La proteína tiene una alta proporción de cisteína (15 aminoácidos en ratón y 16 en el ortólogo humano), lo que indica que probablemente se formarían una serie de puentes disulfuro en el dominio extracelular.



Búsquedas en BLAST del cADN de Plac8 en la base de datos de ADN genómico humano reveló la ubicación ortóloga en el cromosoma 4q21. El ortólogo humano al igual que en el de ratón contiene cinco exones que codifican una especie de ARNm de 829 pb y una ORF de 115 aminoácidos, con un alto grado de conservación (83%) entre las proteínas putativas de ratón y de humano. La expresión de Plac8 en la placenta en la porción extraembrionaria es alta, de manera contraria, en el embrión la expresión es muy baja. Se observa que Plac8 se expresa en cierto grado en diferentes tipos de tejidos diferentes a la placenta ⁽⁴³⁾. El gen Plac8 se expresa durante el desarrollo de la placenta, es enriquecido y predominante, este gen también se expresa en células gigantes de trofoblasto y en la capa espongiotrofoblastica.

2.3.1 Plac8 en cáncer

Aunque la función molecular de la proteína del gen Plac8 aún se desconoce, su actividad está implicada en la regulación de la diferenciación de los adipocitos, en la respuesta inmunológica innata, proliferación, supervivencia celular y en la tumorigénesis, en procesos como proliferación, supervivencia, autofagia y transición epitelial ^(32, 33).

En la literatura se encuentra reportado, que en el epitelio de colon Plac8 se localiza en el dominio apical en células completamente diferenciadas. La localización de Plac8 es similar en los adenocarcinomas colorrectales moderadamente diferenciados; sin embargo, algunos datos revelan que Plac8 se localiza en las criptas neoplásicas.

La sobreexpresión de Plac8 puede conducir a la activación poco convencional del interruptor de caderina, lo que induce a una estimulación en la transcripción de la caderina 3 (CDH3) y una disminución de la caderina 1 (CDH1) en la superficie de la célula, así como la promoción de la transcripción de VIM y ZEB1, que son marcas distintivas de TEM. La regulación de CDH1 por Plac8 es post-traducciona. La cantidad excesiva de Plac8 tiene como consecuencia cambios que son



morfológicos y bioquímicamente característicos de TEM, a pesar de ello estos rasgos no son propios de una TEM clásica, como lo es la regulación transcripcional de CDH2, en su lugar tenemos una regulación positiva de la transcripción de CDH3, esto indica, que Plac8 es un regulador de gran relevancia en el fenotipo no convencional de TEM. La sobreexpresión de CDH3 está asociada con la progresión del carcinoma colorrectal, en células cancerosas se ha observado que CDH3 promueve la motilidad celular, la migración y la invasión ^(40, 41).

Mas evidencia del papel de Plac8 en el cáncer, se observa en el adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) donde se demuestra que la inhibición de Plac8 en líneas celulares restringe la formación de tumores al bloquear la autofagia, un proceso que es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis metabólica. La localización del compartimiento lisosomal permite la fusión lisosoma-autofagosoma que es mediada por Plac8. La reprogramación metabólica en PDAC tiene un factor en común por el que se conectan las mutaciones oncogénicas primarias y la inducción de la autofagia, ese factor es Plac8 ⁽⁴³⁾.

En PDA, mutaciones de p53 en conjunto con RAS regulan a Plac8, lo cual es muy importante para el crecimiento de tumores pues al haber mutaciones en RAS/p53 ocasionan que la autofagia se mantenga, facilitándola a través de la fusión autofagosoma-lisosoma. Así Plac8 es un elemento que sinergiza dos mutaciones que provocan cáncer de páncreas (KRAS y p53), además de proporcionar altas tasas de autofagia críticas para el crecimiento del tumor. Así mismo, se demuestra que la expresión ectópica de Plac8 en células epiteliales cancerígenas, es una marca distintiva de gran parte de los tumores PDAC en humanos. La deficiencia de Plac8 en las lesiones tempranas neoplasia intraepitelial pancreática (PanIN) y un incremento significativo de Plac8 en la neoplasia intraepitelial pancreática de tercer grado (PanINIII) hasta lesiones invasivas de PDAC, pone en evidencia que la regulación positiva de Plac8 tiene lugar en etapas posteriores en la transformación de células epiteliales pancreáticas ⁽⁴⁷⁾.

La proteína Plac8 está localizada en el interior de la membrana plasmática, es una proteína con una cara en la parte interna de la membrana plasmática en



condiciones fisiológicas. En este contexto, se sugiere que las vesículas positivas de Plac8 tienen origen en un proceso endocítico en la membrana plasmática más que derivarse del sistema Retículo endoplásmico/Golgi. Todo indica que Plac8 se relaciona estrechamente con estructuras de la membrana que son estables y ciertamente inmóviles. Sin embargo a pesar de que Plac8 está en la membrana plasmática, no posee una distribución uniforme en la superficie celular, más bien se encuentra situada en estructuras que están muy bien definidas y que son muy estables al paso del tiempo ⁽⁴⁷⁾.

El silenciamiento de Plac8 tiene consecuencias prometedoras, afecta el crecimiento de las células pancreáticas, atenuando la progresión del ciclo celular, induce modificaciones transcripcionales y postrcripcionales de algunos factores que son críticos (p21, RB1 y la ciclina D1) dentro del ciclo celular. Así mismo la supresión de Plac8, en participación conjunta con siARN (pequeño ARN interferente) que induce la inhibición en el crecimiento celular, da como resultado una detención del ciclo celular en la transición G1-S. La pérdida de Plac8 no tiene impacto sobre la formación de tumores dependientes de Kras pero si en tumores que son dependientes Kras/Trp53 ⁽⁴⁷⁾.

2.4 Plac9

Plac9 es uno de los genes involucrados en el desarrollo placentario, se expresa en blastocitos fertilizados, en contraste con los blastocitos partenogenéticos en la preimplantación donde disminuye significativamente su expresión. Plac9 es un gen específico de la placenta del cual no se tiene conocimiento de cuál sea su función ⁽⁴²⁾. Es un gen que se encuentra regulado por el fenómeno de impronta genómica, interviene en la función placentaria, por lo que su actividad es crítica para el crecimiento fetal. Irregularidades en la expresión de éste gen, así como de otros genes, en los blastocitos partenogénicos, pueden ser las causantes de un desarrollo placentario anormal.



En la caracterización de Plac9 se obtuvo un cADN (543 pb) original de Plac9, de una biblioteca de cADN a partir de la mórula de 16 células de un ratón ⁽⁵¹⁾, al final del extremo 3' se encuentra una secuencia de poli (A); la relación de la expresión placenta/embrión es de 10. La secuencia de cADN se encuentra en un sitio único de 15 kb y está localizado en el cromosoma 14, el inicio de esta secuencia es una isla CpG, consistente con una posición que se localiza muy cerca del sitio de inicio de la transcripción ⁽⁴³⁾.

La secuencia de proteínas para Plac9 mensajero se reporta, tiene una alta homología con cADNs humanos. Un ortólogo humano se encuentra en el cromosoma 10q22.3, que es idéntico en un 73%, tiene 98 residuos en común, con espacio de 12 aminoácidos y una inserción de 2 aminoácidos en la secuencia humana pero no en la de ratón. Existe un segundo locus que está ubicado en el cromosoma dos, la porción putativa N terminal se conserva en cierto grado, comparándolo con el ortólogo, sin embargo, se expande otros 73 aminoácidos que no muestran homología con los de ratón ni con los ortólogos humanos de Plac9. La expresión de este gen también predomina en la placenta ⁽⁴³⁾.

El perfil de expresión genera genes marcadores que son conocidos y algunos que son novedosos en el proceso de desarrollo. Plac9 se identificó mediante una colección de cADNs y muestra niveles de expresión 10 veces mayores en la placenta que en embriones de etapa media. El gen Plac9, es un gen que se enriquece en la placenta ⁽⁴³⁾.

2.4.1 Plac9 en cáncer

Para este gen se conoce muy poco acerca de su función en cáncer ya que hay muy poca información, pero existen evidencias de que el gen Plac9 está relacionado en procesos carcinogénicos que identifican la desregulación de bucles feed forward (FFL) en 13 tipos distintos de tumores ⁽⁴³⁾. Las uniones Feedforward,



a través de los factores de transcripción (FTs) pueden regular a los miARNs o viceversa, para el control transcripcional de genes blanco ⁽⁴⁴⁾. Los FFLs se clasifican en tres grupos: El primer grupo lo integran los FTs que son los reguladores principales, el cual regula al miARN y al gen blanco; el segundo grupo, donde los miARNs son los reguladores maestros, controlando a FTs y a genes blanco; y por último el grupo donde FTs y miARNs se regulan el uno al otro. La asociación de un FFL con un tipo de tumor; se identifica como de FFI pan-cáncer. Plac9 en particular está regulado negativamente en varios tipos de tumores. Hay una fuerte asociación entre los FFLs y algunas vías de señalización implicadas en cáncer, tales como, p53, Wnt, PI3K-Akt, al igual que ciertos procesos celulares, como, adhesión focal y ciclo celular. Estos datos en conjunto indican que los FFLs no solo forman redes densas e interconexiones, sino que además están relacionados con el diagnóstico, el pronóstico y el tratamiento en cáncer.



3. JUSTIFICACIÓN

El CaCU representa un problema de gran magnitud en el sector salud pues sus altos índices de incidencia y mortalidad lo colocan entre uno de los principales tipos de cáncer que afecta a la población femenina a nivel mundial y en México. Se sabe que el proceso carcinogénico y el embarazo tienen en común una gran variedad de características; ambas células ocupan mecanismos y vías de señalización muy similares, desempeñando funciones muy parecidas en cada uno de los procesos celulares que tienen en común (proliferación, invasión, angiogénesis y respuesta inmunológica). La relación que existe entre la carcinogénesis y la embriogénesis nos permite trabajar con algunos elementos que tienen en común, como lo son, ciertos genes o moléculas, que aun cuando se desconozca su función biológica, podemos aprovechar la expresión o supresión de algún gen o par de genes en específico, para el diagnóstico oportuno del cáncer, utilizándolos como marcadores de prevención o de progresión en el cáncer. Tal es el caso de los genes Plac8 y Plac9, genes específicos de la placenta, que aunque se desconoce su función biológica, se encuentra reportado en la literatura la importancia que tienen para el desarrollo placentario y del embrión. Para ambos genes se les ha encontrado algún tipo de asociación en varios tipos de cáncer, sin embargo, en CaCU no se tiene ninguna información, por lo que en este trabajo se analizará el patrón de expresión de Plac8 y Plac9 para evaluar su potencial como posibles marcadores moleculares en esta neoplasia.



4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1 Hipótesis

El gen Plac8 se expresará en el tejido de cérvix sano y habrá una desregulación en su expresión en lesiones precursoras de alto grado y con CaCU, mientras que el gen Plac9 únicamente se expresará en el tejido de cérvix sano.

4.2 Objetivo general

Realizar un análisis *in silico* de microarreglos de expresión y posteriormente evaluar la expresión de los genes Plac8 y Plac9 en células del cérvix uterino.

4.2.1 Objetivos específicos

- ❖ Analizar librerías de microarreglos de expresión y buscar la posible expresión diferencial de Plac8 y Plac9.
- ❖ Determinar la expresión de Plac8 y Plac9 en líneas celulares provenientes de cáncer cérvicouterino.
- ❖ Determinar la expresión de Plac8 y Plac9 en tejido sano, tejido con lesiones precursoras y CaCU.
- ❖ Identificar la presencia de VPH en cada una de las muestras y realizar su correspondiente genotipificación.



5. MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio

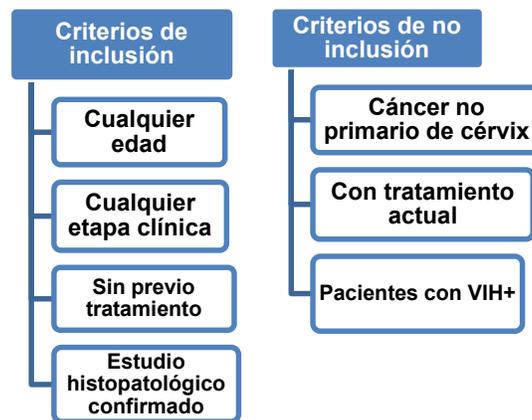
Descriptivo y experimental

5.1 Análisis in silico de microarreglos de expresión

Se seleccionaron 65 archivos *.cel*, los cuales contienen los datos crudos de los experimentos de microarreglos del *Human Genome U133 plus 2.0 Gene chip*, que se encuentran en las librerías de EMBL-EBI /GEO. De los 65 archivos, 57 archivos correspondieron a muestras de CaCU y 8 archivos a cérvix normal. Posteriormente se utilizó el programa *Expression console* de Affymetrix y se analizaron los archivos *.cel*, esto como un control de calidad de los microarreglos para verificar si estos eran adecuados para el análisis *in silico*. Posterior al análisis previo de los datos en el software *Expression console*, se procedió a utilizar el software de PARTEK (versión 6.2) el cual permite realizar varios análisis de microarreglos. Se generaron unas listas de expresión diferencial, las cuales se utilizaron para analizar y buscar la expresión específica de los genes *Plac8* y *Plac9* en CaCU.

5.2 Toma de muestra

Las muestras se obtuvieron del Hospital General de México en la clínica de displasias, donde se les invito a las pacientes a participar en el proyecto y firmar la carta de consentimiento informado si aceptaban (Anexo 1). Se prosiguió a la revisión colposcópica si la paciente lo requería y finalmente se recolectaban las muestras (biopsias).



5.3 Extracción de ácidos nucleicos

Para la extracción de los ácidos nucleicos se utilizó el método de Chomczynsky y Sacchi, 1987. La muestra almacenada en ARNlater se pasó a un tubo de 2 mL con seguro en la tapa, al cual previamente se le adicionó una perla de acero inoxidable para su homogenización. Se le agregó 1 mL de Trisure (Bioline) y posteriormente se homogenizó con ayuda del TissueLyser/Qiagen (Las condiciones varían dependiendo del tejido que se trabaje). Una vez que el tejido está homogéneo, se pasó a un nuevo tubo y se dejó reposar de 2-3 min en hielo, se agregó 200 μ L de cloroformo frío. Se agitó vigorosamente en el vortex y se dejó reposar de 2-3 min. Se centrifugó (Thermo Scientific) a 8,000 x g durante 10 min a 4 °C. En este paso se van a formar las dos fases donde están presentes el ADN y ARN.

5.3.1 Extracción de ARN

La fase acuosa se pasó a un nuevo tubo de 1.5 mL con mucho cuidado y se le adicionó 600 μ L de etanol al 70%. Se mezcla por inversión y se prepararon las columnas (RNeasy Qiagen) para la extracción de ARN. Se agregaron 500 μ l de la muestra en las columnas y se centrifugó 15 seg a 8,000 x g, se repitió el proceso hasta que se pasó toda la muestra por la columna. Se le adicionó 700 μ L del regulador RW1 en las columnas y se centrifugó a 8,000 g, 15 seg. Posteriormente



se le adicionó 500 μ L del regulador RPE y se centrifugó 15 seg a 8,000 g. Por último, se volvió a adicionar 500 μ L del regulador RPE y se centrifugó a 8,000 x g durante 2 min. Se cambió de tubo colector, se puso un tubo nuevo el cual se etiquetó previamente, ahí mismo se adicionó 30 μ L de agua libre de nucleasas y se centrifugó durante 1 min a 8,000 x g. La muestra se almacenó a -70 °C

5.3.2 Extracción de ADN

A la fase orgánica se le adicionó 300 μ L de etanol absoluto y se mezcló por inversión. Se dejó incubando en agitación durante 30 min y se centrifugó a 12,000 x g durante 5 min. Se decantó el sobrenadante, y se adicionó 1 mL del regulador de citratos, posteriormente se incubó en agitación a temperatura ambiente durante 30 min, se centrifugó a 12,000 x g durante 30 min y se decantó el sobrenadante. Este paso se repitió mínimo tres veces o hasta que el botón quedo casi blanquecino. Después de los lavados, se adicionó etanol al 75% frío y se incubó en agitación durante 15 min a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó a 12,000 x g durante 5 min. Se decantó el sobrenadante, se adicionó 300 μ L de regulador de lisis nuclear y 20 μ L de proteinasa K (10 mg/mL) de Invitrogen. Esto se dejó incubando a 56 °C en un termblock durante una noche o hasta que la solución quedó homogénea. Después de la incubación, se le adicionó 300 μ L de acetato de amonio 5M y se dejó incubando a -20 °C durante 30 min. Se centrifugó la muestra a 12,000 x g durante 30 min, se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo donde se le adicionó 600 μ L de isopropanol. Se dejó incubando durante una noche a -20 °C. La muestra se centrifugó a 12,000 x g durante 15 min, se descartó el sobrenadante, se adicionó etanol al 70% frío y se resuspendió el botón. Se centrifugó a 6,000 x g durante 5 min y se decantó el sobrenadante. Se dejó secar la muestra de 2-3 min, una vez seca la muestra se le adicionó 30 μ L de agua libre de nucleasas y se resuspendió el ADN. Se almacenó a -20 °C.



5.3.2.1 Genotipificación de VPH

En la Genotipificación de VPH se utilizó CLART® *Papillomavirus humano 2* (Clinical Array Technology). Para la reacción de amplificación, por cada muestra que se empleó, se utilizó un tubo de reacción, el tubo de reacción (contiene un par de nucleótidos que amplifican un fragmento del gen CFRT humano, un par de nucleótidos que amplifican un plásmido y oligonucleótidos específicos de VPH) previamente se descongeló y se centrifugó unos segundos. Se les añadió a los tubos de reacción 5 µL de ADN extraído de las muestras y se resuspendió varias veces. Las condiciones de la PCR para esta reacción fueron 95°C, 5 min; 94°C, 30 seg; 55°C, 60 seg; 72°C, 90 seg y 72°C, 8 min. Para la visualización por CLART® Strip CS (sondas específicas) del producto amplificado, se desnaturalizó en el termociclador los productos de PCR, se incubaron los tubos de reacción en el termociclador a 95°C durante 10 min y se almacenaron en hielo. Se lavaron los pocillos del CS añadiéndoles 200 µL de solución TL diluida (tampón de lavado con agua destilada 1:9), se resuspendió de 10 a 15 veces sin tocar la superficie del arreglo se desechó la solución TL diluida con una pipeta. Para la hibridación se les agregó 100 µL de solución SH (solución de hibridación) a cada pocillo, a cada uno se le adicionó 5 µL del producto de PCR desnaturalizado y se resuspendió varias veces para la homogeneización de las soluciones. Se incubó la tira CS tapada 1 hora a 65°C con una agitación de 550 rpm. Se secó la placa y se desechó la solución SH con una pipeta. Se hicieron dos lavados, añadiendo a cada pocillo 200 µL de solución TL diluida, se resuspendió de 10 a 15 veces y se desechó la solución TL diluida con una pipeta. En el bloqueo y la conjugación a cada pocillo se le añadió 100 µL de solución CJ diluida (por cada pocillo 1mL de solución conjugado diluyente y 7.5 µL de solución conjugado), se incubó durante 15 minutos a 30°C con una agitación de 550 rpm. Se secó la placa y se desechó rápidamente la solución con una pipeta. Se realizaron tres lavados, agregando 200 µL de solución TL diluida a cada uno de los pocillos, se resuspendió de 10 a 15



veces y se desechó la solución con una pipeta. Para el revelado de la reacción, se adicionó 100 μ L de la solución RE (solución de revelado) a cada pocillo del CS, se incubó 10 minutos durante 25 minutos sin agitación, se desechó la solución hasta que el arreglo quedó completamente seco. Para el análisis automático, se colocó un adaptador especial sobre la bandeja del CAR, donde se colocó la placa y se tomaron las imágenes de todos los pocillos.

5.4 Síntesis de cADN

Para cada una de las reacciones, se utilizó 4 μ L de SuperScript VILO™ master mix Life Technologies (CA, USA), el cual consta de, random primers, proteína coopeadora, inhibidor recombinante de ribonucleasas, $MgCl_2$, dNTP's, RNaseOUT™ y el SuperScript III RT. A la reacción de le adiciono un 1 μ g de ARN a retrotranscribir y se agregó agua libre de ARNsas hasta completar un volumen final de 20 μ L. Las condiciones que se utilizaron en el termociclador fueron: 25 °C, 10 min; 42 °C, 60 min; 85 °C, 5 min.

5.5 Condiciones de PCR

Para la realización de la PCR se utilizó 10 μ L de Go Taq Green Master Mix Promega™ (WI, USA), que es una mezcla constituida por, 2X Buffer de reacción Green Go Taq (pH 8.5), 3 mM de $MgCl_2$, 400 μ M de dATP, 400 μ M de dGTP, 400 μ M de dCTP y 400 μ M de dTTP, también se le agrego 1 μ L de primer forward (20 pM), 1 μ L de primer reverse (20 pM) (Anexo 2), 7 μ L de agua libre de ARNsas y 1 μ g de cADN. Las condiciones de estas reacciones fueron de 95 °C, 5 min; (95 °C, 45 seg; 60 °C, 45 seg; 72 °C, 45 seg) x 30ciclos; 72 °C, 5 min; 4 °C α . Se utilizaron las mismas condiciones para RPS18 el cual nos sirvió como gen constitutivo de las muestras, Plac8 y Plac9. Para la determinación de infección por VPH se utilizaron los General Primers (GP: GP5+ y GP6+) bajo las



siguientes condiciones, 94°C, 5 min; (95°C, 30 seg; 44°C, 1 min; 72°C 1 min 30 seg) x 40 ciclos; 72 °C, 10 min; 4 °C α.

5.6 Electroforesis en gel de agarosa

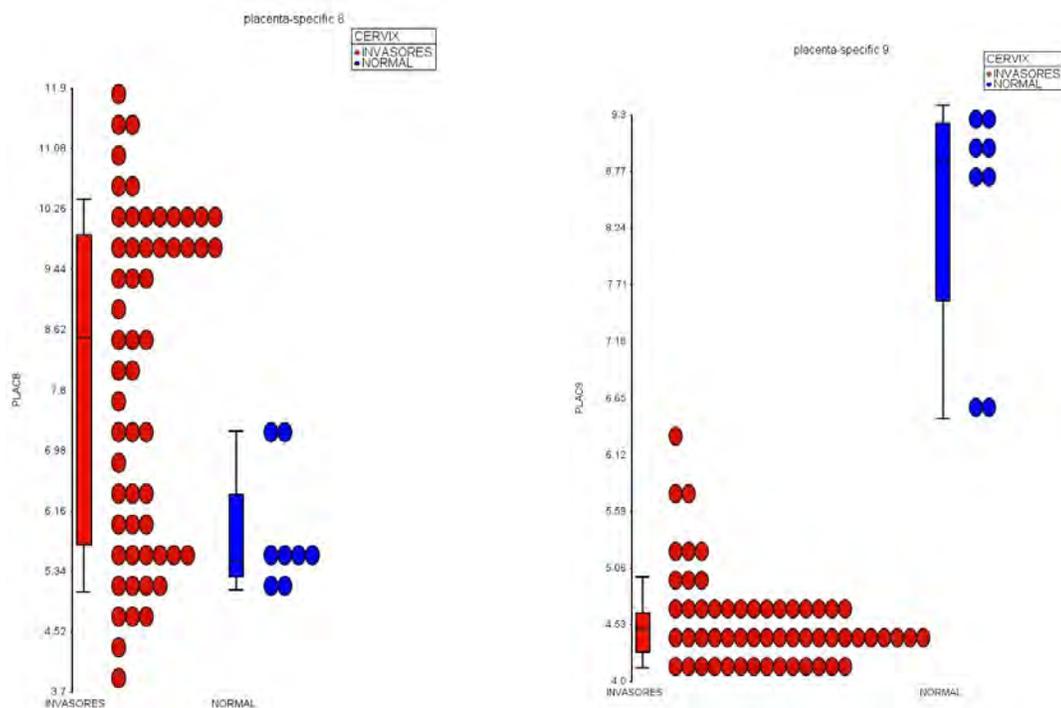
Para visualizar el producto de PCR, se realizó una electroforesis. Se utilizó un gel de agarosa al 2% y se corrió el gel a 70V durante una hora. Se observaron los resultados en un fotodocumentador.



6. RESULTADOS

Análisis in silico de microarreglos de expresión

Tras realizar una minería de datos como antecedente, donde el equipo de trabajo obtuvo datos interesantes de las librerías de SAGE, en placenta, en cérvix sano y en cérvix con una lesión de alto grado, se seleccionaron dos genes, Plac8 y Plac9. En este trabajo de tesis se buscaron librerías de microarreglos de expresión y se realizó un análisis *in silico* de cérvix sano contra cáncer de cérvix, donde se hizo una búsqueda de los genes seleccionados Plac8 y Plac9, ya que en librerías de SAGE no hay información acerca del cáncer de cérvix. Para este análisis *in silico* se utilizaron 65 muestras (57 CaCU y 8 Cérvix sano) las cuales generaron una lista de genes sobre y sub-expresados. En la búsqueda de los genes seleccionados (Figura 10), se observa cómo están expresados cada uno de los genes en las muestras analizadas.





Determinación de la expresión de Plac8 y 9 por PCR punto final

El análisis *in silico* no es suficiente para afirmar que el patrón de expresión de los genes Plac8 y Plac9 tendrá el mismo comportamiento en las células del tejido cervical. De este modo se realizó una PCR en líneas celulares de CaCU (SiHa, Hela y Caski), para tener un panorama general del comportamiento en la expresión de los genes Plac8 y Plac9 en un modelo de CaCU. Se estandarizó la técnica utilizada (PCR punto final) para verificar el tamaño de nuestros amplicones para ambos genes (Anexo 3), y como control de calidad se examinó la integridad del RNA con el que se trabajó (Anexo 3). En la figura 11A se muestra el producto de PCR de Plac8 (121 pb) en las tres líneas celulares, en la figura 11B no se observó el amplicón del gen Plac9 (145 pb), así mismo, en la figura 11C se puede observar las bandas de los amplicones correspondientes a Plac8 y 9 en un una muestra de tejido de cérvix sano (N).

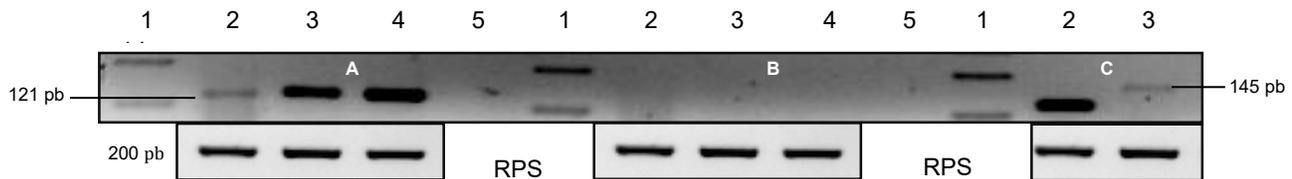


Figura 11. PCR de Plac8 y 9 en líneas celulares de cáncer de cérvix y cérvix sano. (A) Expresión de Plac8. Carril 1: marcador de pares de bases, carril 2-4: líneas celulares (HeLa, SiHa, Caski), carril 5: negativo; **(B)** Expresión de Plac9. Carril 1: marcador de pares de bases, carril 2-4: líneas celulares, carril 5: negativo; **(C)** Expresión de Plac8 y 9 en cérvix sano. Carril 1: Marcador de pares de bases, carril 2-3: Cérvix sano

Para ver el comportamiento de estos genes desde lesiones precursoras de cérvix, se trabajaron con 10 muestras de lesiones de bajo grado (B), 10 muestras de lesiones de alto grado (A) y 10 muestras más con CaCU, como se muestran en las figuras 12-14, las cuales son representativas de los resultados obtenidos.

En la figura 12 se muestra el producto de PCR del gen Plac8 de algunas de las muestras de tejido de cérvix con lesiones de bajo grado, no obstante, el producto de PCR del gen Plac9 no se observó. En la figura 13, se muestran las



bandas de los amplicones del gen Plac8 en 4 de las muestras de lesiones de alto grado, en cambio el producto de PCR del gen Plac9 no se observó. En la figura 14 se puede observar el producto de PCR del gen Plac8 en tres de las muestras, pero no se observa ninguna de las bandas de los amplicones del gen Plac9.

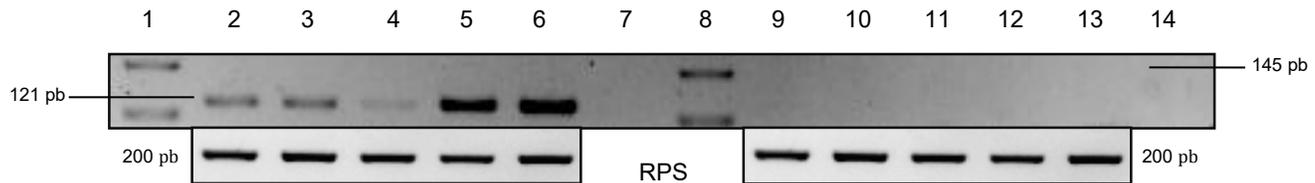


Figura 12. PCR de Plac8 y 9 en lesiones de bajo grado.

Carril 1: marcador de pares de bases, carril 2-6: lesiones de bajo grado en CaCU para Plac8, carril 7: negativo, carril 8: marcador de pares de bases, carril 9-13: lesiones de bajo grado en CaCU para Plac9, carril 14: negativo (todos los reactivos excepto la muestra), control positivo (gen RPS).

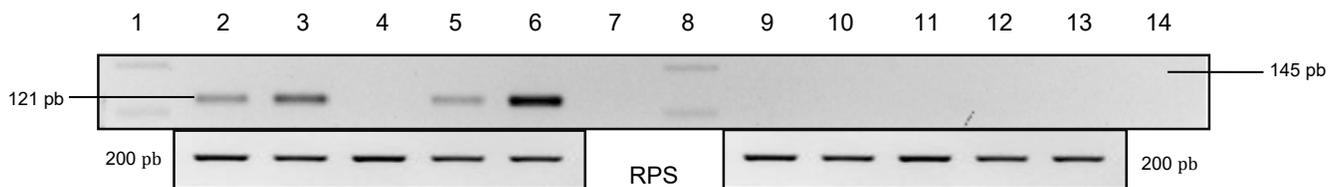


Figura 13. PCR de Plac8 y 9 en lesiones de alto grado.

Carril 1: marcador de pares de bases, carril 2-6: lesiones de alto grado en CaCU para Plac8, carril 7: negativo, carril 8: marcador de pares de bases, carril 9-13: lesiones de alto grado en CaCU para Plac9, carril 14: negativo (todos los reactivos excepto la muestra), control positivo



Figura 14. PCR de Plac8 y 9 en CaCu.

Carril 1: marcador de pares de bases, carril 2-6: tejido de cérvix con CaCU para Plac8, carril 7: negativo, carril 8: marcador de pares de bases, carril 9-13: tejido de cérvix con CaCU para Plac9, carril 14: negativo (todos los reactivos excepto la muestra), control positivo (gen RPS).



Plac8 se expresó en todas las muestras de lesión de bajo grado, con una intensidad de bandas heterogénea, entre cada una de las muestras. Sin embargo, no todas las muestras de alto grado expresaron Plac8 (90%) y en las muestras de CaCU solo el 80% lo expresaron, en comparación con las muestras de lesiones de bajo grado, siendo más homogénea la intensidad de las bandas en las muestras con CaCU. Estos resultados confirman lo que arrojó el análisis *in silico* de SAGE y microarreglos, donde hubo una expresión diferencial entre cada muestra de CaCU.

Siguiendo con el mismo procedimiento, se analizó Plac9, examinando el mismo tipo y número de muestras que para Plac8, los resultados fueron totalmente diferentes, hubo una excepción en el grupo de las muestras normales, donde Plac9 se expresó en todas las muestras en comparación con las lesiones de bajo y alto grado e incluso en las muestras del grupo de CaCU, donde la expresión de Plac9 se suprimió, esto era de esperarse, pues al evaluar las líneas celulares, Plac9 no se expresó. Como resumen, en la tabla 1 se muestran los resultados de la PCR y el porcentaje de muestras que expresaron los genes en cada uno de los grupos.

Tabla 1. Resultados de la PCR punto final para observar la expresión de Plac8 y 9 en células de cérvix

	Cérvix Sano	Lesión de bajo grado	Lesión de alto grado	CaCU
Plac8	3/3 (100%)	10/10 (100%)	9/10 (90%)	8/10 (80%)
Plac9	3/3 (100%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)



Detección de VPH por PCR punto final

Al ser el VPH el principal agente etiológico de CaCU, se determinó si las muestras de los cuatro grupos (Normales, lesiones de alto y bajo grado y CaCU) presentaban infección por el virus. En la figura 15 se puede observar el producto de PCR del gen L1 en 4 muestras de lesiones de bajo grado. En la figura 16 se muestra las bandas de los amplicones del gen L1 en 3 de las 5 muestras de lesiones de alto grado. En la figura 17 se puede observar el producto de PCR del gen L1 en cuatro de las muestras. En estas imágenes se muestran resultados que son representativos del total de las muestras que se analizaron.

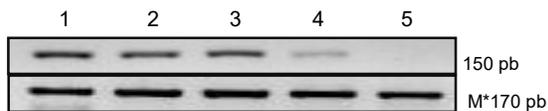


Figura 15. PCR de L1 en lesiones de bajo grado.

Carril 1-5: lesiones de bajo grado para L1, M*: control de carga y de amplificación (gen mitocondrial).

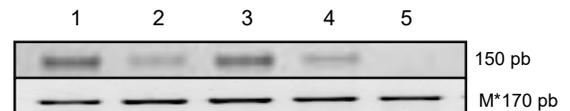


Figura 16. PCR de L1 en lesiones de alto grado.

Carril 1-5: lesiones de alto grado para L1, M*: control de carga y de amplificación (gen mitocondrial).

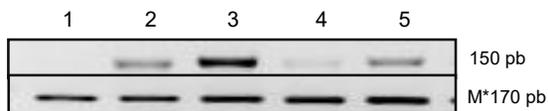


Figura 17. PCR de L1 en CaCU.

Carril 1-5: tejido de cérvix con CaCU para L1, M*: control de carga y de amplificación (gen mitocondrial).

A partir de los resultados obtenidos se generó la siguiente tabla (tabla 2).



Tabla 2. Resultados de la PCR punto final para observar la presencia de VPH en células del cérvix

	Cérvix Sano	Lesión de bajo grado	Lesión de alto grado	CaCU
VPH	0/3 (0%)	8/10 (80%)	9/10 (90%)	8/10 (80%)
		Simple: 20% Múltiple: 50% NI: 10%	Simple: 30% Múltiple: 40% NI: 20%	Simple: 60% Múltiple: 20%

Las tres muestras normales fueron negativas para VPH, para el grupo con lesiones precursoras de bajo grado el 80% de las muestras resultó positivo y de éstas el 20% correspondía a una infección simple y 50% a una infección múltiple. La mayoría de las muestras de alto grado presentó una infección por VPH (90%), teniendo un 40% de infecciones múltiples y 30% de infecciones simples. En el grupo de CaCU en el 80% de las muestras estuvo presente VPH, que en su mayoría fueron infecciones simples (60%), a diferencia de los grupos con lesiones de bajo y alto grado. Para verificar si había una asociación entre la presencia de VPH y la expresión de Plac8 y 9, se realizó una prueba estadística, chi-cuadrada (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados de la prueba estadística Chi-cuadrada para observar la asociación entre la expresión de Plac8 y 9 con la presencia de VPH en células del cérvix

	Plac8	Plac9
Normal vs CaCu, BG y AG	p=0.432	p=0.00000032*
Normal vs CaCu	p=0.19	p=0.00000032*
Normal vs BG	p=0.25	p=0.00000032*
Normal vs AG	p=0.58	p=0.00000032*
VPH	p=0.70	p=0.0132*
Tipo de infección	p=0.34	p=0.02*



Los resultados de esta prueba estadística fueron considerados estadísticamente significativos únicamente para Plac9. Para Plac8, en los tres grupos (lesiones de bajo y alto grado, CaCU) con los que se trabajó, no hubo diferencia estadísticamente significativa, descartando la asociación entre la expresión de Plac8 y la presencia de VPH, a diferencia de los grupos de muestras (lesiones de bajo y alto grado y CaCU) donde se analizó Plac9, donde sí se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.00000032$), la cual afirmaba que si hubo una relación entre la presencia de VPH y el silenciamiento del gen Plac9 ($p=0.0132$). De manera interesante, también se observa que hay una asociación entre el tipo de infección (simple o múltiple) y la expresión de Plac9.



7. DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Actualmente se sabe que existe una similitud entre el proceso embrionario y carcinogénico, lo que nos permite trabajar con algunos genes específicos de placenta o genes que participan en este proceso y así poder dilucidar su participación en el cáncer. Para esto, las herramientas bioinformáticas desempeñan un papel sumamente importante para la búsqueda de genes por medio de una minería de datos, genes cuya participación en ambos procesos (embriogénesis y carcinogénesis) los posicionan como posibles candidatos para marcadores moleculares en el desarrollo de cáncer. Tal es el caso de los genes seleccionados para este proyecto, Plac8 y Plac9. La participación de estos genes en el proceso de cáncer es poco estudiada, en especial para Plac9, del cual se tiene muy poca información. No obstante, en la literatura encontramos, que existe una asociación entre Plac8 y los procesos carcinogénicos, a través de la inducción de la pérdida del control del ciclo celular, resistencia a la apoptosis y la tumorogénesis ⁽⁴⁵⁾, aunque de manera controversial hay algunos reportes que indican que en linfocitos, este gen induce apoptosis.

El gen Plac8 se expresa en células gigantes de trofoblasto y en la capa espongiotrofoblastica al igual que durante el desarrollo de la placenta, donde es enriquecido y predominante, ⁽⁴²⁾. Si consideramos al embarazo como modelo de estudio, las expectativas indican que Plac9 podría expresarse en varios tipos de cáncer, incluido CaCU. En general, la actividad del gen Plac8 está implicada en la regulación de la diferenciación de los adipocitos, en la respuesta inmunológica innata, la proliferación, la supervivencia celular; y en la tumorogénesis, en procesos como, proliferación, supervivencia, autofagia y transición epitelial ⁽³⁴⁾. Así nuestros datos son consistentes con esta información pues se encontró una expresión en las células de tejido sano del cérvix, expresión que puede ser considerada como basal y que corrobora la participación en alguno de los procesos en el funcionamiento normal de la célula. En el grupo de muestras con



lesiones de bajo grado no se observa diferencia alguna en comparación con el grupo de muestras sanas, pues molecularmente hay cierta similitud entre estos dos grupos, esto se refleja en la intensidad de las bandas, siendo heterogéneas entre las muestras para ambos grupos. Del mismo modo para el grupo de lesiones de alto grado se observa un comportamiento similar teniendo una intensidad de bandas muy heterogénea entre las muestras e incluso el abatimiento de la expresión de Plac8 en una de las muestras, lo que nos conduce a la idea, de que probablemente el gen, ante irregularidades que se van sucediendo a medida que aumenta el grado de lesión, su expresión se encuentre regulada a través de un mecanismo epigenético, como está reportado en la literatura, donde en células formadoras de colonias endoteliales expuestas a diabetes mellitus gestacional (GDM), Plac8 se ve regulado a través de la metilación ⁽⁴⁶⁾, en este trabajo también señalan que una sobre expresión de este gen promueve una pérdida del control del ciclo celular, además de aumentar la proliferación y una resistencia a la apoptosis ⁽⁴⁷⁾, esto indica que ante una anomalía como lo es la diabetes gestacional la sobreexpresión de Plac8 induce la proliferación, protección contra la senescencia, que en comparación con nuestros resultados en muestras con CaCU, donde se observó un expresión del gen en más de la mitad de las muestras, con una intensidad de banda más homogénea entre cada una de ellas, sugiere que quizá Plac8 se esté sobre expresando coincidiendo con los antecedentes antes mencionados, pues aunque no es comparable la enfermedad, hay una respuesta ante un daño o daños que sufre la célula, presentes en el cáncer. La evidente regulación de la expresión de Plac8 que se presenta en dos de las muestras con CaCU, indica que probablemente hay otras alternativas para que se activen las vías de señalización que participan en CaCU, lo que nos sugiere que posiblemente Plac8 se pueda utilizar como blanco terapéutico. Hay evidencia de que en el adenocarcinoma ductual pancreático (PDCA), el silenciamiento de Plac8 afecta el crecimiento de las células pancreáticas atenuando la progresión del ciclo celular, demostrando que Plac8 activamente puede promover el desarrollo y la progresión de PDCA, desempeñando actividades que son relevantes en la regulación de moléculas importantes en vías de señalización a través de las cuales se puede inducir la tumorigénesis,



afectando directamente la progresión de las células a cáncer pancreático ya sea *in vivo* o *in vitro* ⁽⁴⁵⁾. Otros autores señalan que la inhibición de Plac8 en líneas celulares restringe la formación de tumores al bloquear la autofagia, un proceso que es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis metabólica en el adenocarcinoma ductal pancreático (PDCA) ⁽⁴⁸⁾.

A diferencia de Plac8, la información que se tiene en la literatura respecto a Plac9 es muy escasa. En algunos trabajos se dedicaron a realizar la caracterización de Plac9, obteniendo un cADN original del gen, que tuvo un tamaño de 543 pb. El inicio de esta secuencia es una isla CpG, consistente con una posición que se localiza muy cerca del sitio de inicio de la transcripción ⁽⁴²⁾, lo que nos indica la probabilidad de que el gen se encuentre regulado epigenéticamente, así, tanto la ausencia de Plac9 en lesiones precursoras y en CaCU como la presencia de Plac9 en muestras de tejido normal tendrían una explicación, basada en una posible regulación epigenética de la expresión. Resultados que se encuentran reportados en otro trabajo, donde la expresión de Plac9 se suprime en más de 10 tipos de tumores diferentes, coinciden con los obtenidos en este trabajo ⁽⁴³⁾. Otros autores señalan que Plac9 se encuentra dentro de un grupo de genes que se caracterizaron como marcadores de la transformación espontánea de las MSC, donde Plac9 se encuentra desregulado negativamente ^(49, 50). Considerando estos antecedentes, y los resultados obtenidos, donde se observa una supresión de la expresión de Plac9, en los grupos de lesiones de bajo y alto grado, sugiere que Plac9 pueda utilizarse como marcador preventivo en el desarrollo de cáncer cérvicouterino. El abatimiento de este gen puede estar asociado a una regulación en las vías de señalización que están implicadas en la proliferación, invasión, angiogénesis e inmunomodulación, estos mecanismos moleculares tienen lugar tanto en la embriogénesis como en la carcinogénesis, teniendo características en común. La expresión de este gen podría interferir en cualquiera de estos mecanismos moleculares, entorpeciendo el desarrollo del cáncer cérvicouterino.

Tras realizarse la prueba estadística, se encontró que hay diferencia significativa entre el silenciamiento del gen Plac9 y la presencia de VPH en los diferentes grupos de muestras. En el grupo de tejido sano de cérvix, las muestras fueron



negativas para VPH, sin embargo en los grupos de muestras con lesiones precursoras y con CaCU un alto porcentaje de muestras resultaron positivas, no obstante el abatimiento de Plac9 puede no tener relación directa con la presencia de VPH, más bien puede deberse a causa de irregularidades que desencadena el VPH, de este modo, el silenciamiento del gen en los tres grupos (lesiones precursoras y CaCU), puede deberse a anomalías que el VPH propicio previamente al desarrollo de CaCU (lesiones precursoras) teniendo como consecuencia la supresión del gen Plac9.



8. CONCLUSIONES

El gen Plac9 podría considerarse como un posible marcador molecular de lesiones precursoras y de CaCU, en tanto que el gen Plac8 puede tener utilidad como un posible blanco terapéutico de CaCU. La presencia de VPH podría estar modificando la expresión de Plac9.

9. PERSPECTIVAS

Se sugiere realizar pruebas funcionales para comprobar la utilidad de Plac8 como blanco terapéutico. En tanto que, para el gen Plac9 se deberá evaluar qué tipo de regulación suprime su expresión y realizar las correspondientes pruebas funcionales para evaluar su utilidad como marcador molecular de progresión. Para conocer con certeza el papel de estos genes en CaCU, se deberá dilucidar la función molecular y biológica de cada uno.



ANEXO 1

Carta de consentimiento informado para la participación en protocolos de investigación clínica

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DE PACIENTES CON CÉRVIX NORMAL	
Lugar y Fecha	México DF a _____ de _____
Por medio de la presente acepto participar en el protocolo de investigación titulado: Una huella genética para determinar la susceptibilidad al desarrollo del cáncer cervicouterino	
Registrado ante la CNIC con el número:	FIS – 7114 – IMSS
El objetivo del estudio es:	Identificar y caracterizar el grupo de genes que se asocian con el cáncer cervicouterino
Se me ha explicado que mi participación consistirá en:	La obtención de un fragmento de mi tejido del cérvix durante la realización de la histerectomía, la cual no será diferente de lo habitual, en la fecha _____, cuyo tejido sea utilizado para realizar estudios de investigación importantes para saber más acerca de este tipo de lesiones.
Declaro que se me ha informado que por mi participación en el estudio no voy a presentar ningún riesgo, molestias ni beneficios adicionales.	
El Investigador Responsable me ha informado que el hecho de que se utilice un fragmento de mi cérvix no implica que tenga una malignidad en el mismo. Entiendo que conservo el derecho de retirarme o retirar mi muestra biológica del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el Instituto. Entiendo que una parte de la muestra biológica será utilizada para realizar identificar la presencia o ausencia del Virus del Papiloma Humana, así como estudio de investigación siguiendo los lineamientos aquí estipulados. Esta muestra además será almacenada a 4°C durante un periodo de 8 años a partir de la toma de la muestra y pasado este tiempo será desechada. El Investigador Responsable me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esta pudiera cambiar de parecer respecto a mi permanencia en el mismo.	
_____ Nombre y firma del paciente	
_____ Mauricio Salcedo, Número de matrícula 10231803	
Números telefónicos a los cuales puede comunicarse en caso de emergencia, dudas o preguntas relacionadas con el estudio: 56278900 Extensión 22706	
Testigos _____	



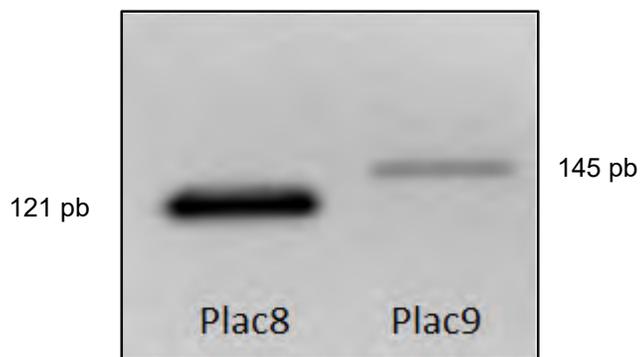
ANEXO 2

Secuencia de los primers para los genes Plac8 y Plac9

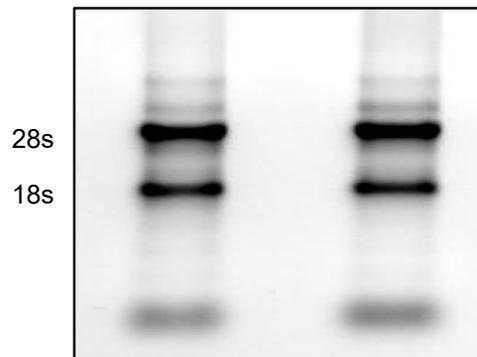
Plac8	Plac9
F-GTGACTGTTTCAGCGACTGC	F-GGCTCGAACTGAGTGCATT
R-CTCATTGCGACGCTTGTTCC	R- CATCTAGACGGCGTTGCACA

ANEXO 3

Estandarización de PCR
punto final



Integridad del RNA





10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Coltran, Kumar y Robbins, ***Patología funcional y estructural***, 7ª edición. Elsevier, 2004.
2. Dunleavy R, ***Cervical Cancer: a guide for nurses***. Wiley-Blackwell, 2009, UK.
3. Woodman B. J. Ciaran, Collins I. Stuart and Young Lawrence S. ***The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues***. Nature reviews 2007; 7:11-22.
4. Okechukwu A. Ibeanu ***Molecular pathogenesis of cervical cancer***. Cancer Biology & Therapy 2011, 11:3, 295-306, DOI: 10.4161/cbt.11.3.14686.
5. Fu Y., Braun L., Shah K., Lawrence W.D., Robboy S.J. ***Histologic, nuclear DNA and human papillomavirus studies of cervical condylomas***. Cancer 1983; 52:1705-11.
6. Yugawa T., Kiyono T. ***Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins***. Rev Med Virol 2009; 19:97-113.
7. GLOBOCAN, 2012. ***Cervical Cancer Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012*** (en línea). Disponible en: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>
8. OMS, 2017. ***Organización Mundial de la Salud*** (en línea). Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
9. Ferlay J., Shin H.R., Bray F., Forman D., Mathers C., Parkin DM. ***GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer- Base No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer***; 2010. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr>. Gorey KM, Holowaty EJ, Fehringer G. ***An international comparison of cancer survival: Toronto, Ontario, and Detroit, Michigan, metropolitan areas***. Am J Public Health. 1997;87:1156-63.



10. American Cancer Society, 2017. **Datos y estadísticas sobre el cáncer entre los Hispanos/Latinos.** Disponible en: <https://www.cancer.org/es/investigacion/datos-y-estadisticas-sobre-el-cancer-entre-los-hispanos.html>
11. Lourenco A.V., Fregnani C.M., Silva P.C., Latorre M.R., et.al. **Why are women with cervical cancer not being diagnosed in preinvasive phase? An analysis of risk factors using a hierarchical model.** *Int J Gynecol Cancer.* 2012; 22(4): 645-53.
12. Mayrand M., Duarte-Franco E., Rodrigues I., Walter S.D., Hanley J., Ferenczy A. **Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer.** *N Engl J Med* 2007;357:1579-88.
13. Flores E. R., Allen-Hoffman B. L., Lee D., Sattler C. A., and Lambert P. F. **Establishment of the human papillomavirus type 16 (HPV-16) life cycle in an immortalized human foreskin keratinocyte cell line.** *Virology* 1999 262:344–354.
14. Zaldívar Lelo de Larrea Guadalupe, Martín Molina Francisco, Sosa Ferreyra Carlos Francisco, Ávila Morales Javier, Lloret Rivas Miguel, Román Lara Monserrat, Vega Malagón Genaro. **Cáncer cérvicouterino y virus del papiloma humano.** *REV CHIL OBSTET GINECOL* 2012; 77(4): 315 – 321.
15. Hebner C., Laimins A. **Human papillomaviruses: basis mechanisms of pathogenesis and oncogenicity.** *Rev Med Virol* 2006;16:83-97.
16. Holtan G Shernan, Creedon J Douglas, Haluska Paul and Markovic N Svetomir. **Cancer and Pregnancy: Parallels in Growth, Invasion, and Immune Modulation and Implications for Cancer Therapeutic Agents.** *Mayo Clin Proc.* 2009;84(11):985-100.
17. Rinkenberger J., Werb Z., 2000. **The labyrinthine placenta.** *Nat. Genet.* 25, 248–250.
18. JN B., L M., PM J. **Expression of the proliferation markers Ki67 and transferrin receptor by human trophoblast populations.** *J Reprod Immunol.* 1988; 14(3):291-302.



19. Kyo S., Takakura M., Tanaka M. **Expression of telomerase activity in human chorion.** *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 241(2):498-503.
20. Schiessl B., Innes B.A., Bulmer J.N. **Localization of angiogenic growth factors and their receptors in the human placental bed throughout normal human pregnancy.** *Placenta.* 2009 Jan; 30(1):79-87. Epub 2008 Nov 17.
21. Cao Y., Liu Q. **Therapeutic targets of multiple angiogenic factors for the treatment of cancer and metastasis.** *Adv Cancer Res.* 2007;97:203-224.
22. Wen H.Y., Abbasi S., Kellems R.E., Xia Y. **mTOR: a placental growth signaling sensor.** *Placenta.* 2005;26(suppl A):S63-S69.
23. Marco D.E., Cannas S.A., Montemurro M.A., Hu B., Cheng S.Y. **Comparable ecological dynamics underlie early cancer invasion and species dispersal, involving self-organizing processes.** *J Theor Biol.* 2009 Jan 7; 256(1):65-75.
24. Yang J., Weinberg R.A. **Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis.** *Dev Cell.* 2008;14(6): 818-829.
25. Xie H., Tranguch S., Jia X. **Inactivation of nuclear Wnt- β -catenin signaling limits blastocyst competency for implantation.** *Development.* 2008 Feb;135(4):717-727.
26. Moffett-King A. **Natural killer cells and pregnancy [published correction appears in *Nat Rev Immunol.* 2002;2(12):975].** *Nat Rev Immunol.* 2002;2(9): 656-663.
27. Wald O., Weiss I.D., Wald H. **IFN- γ acts on T cells to induce NK cell mobilization and accumulation in target organs.** *J Immunol.* 2006;176(8): 4716-4729.
28. Carrega P., Morandi B., Costa R. **Natural killer cells infiltrating human nonsmall-cell lung cancer are enriched in CD56 bright CD16(-) cells and display an impaired capability to kill tumor cells.** *Cancer.* 2008; 112(4):863-875.



29. Hagemann T., Biswas S.K., Lawrence T., Sica A., Lewis C.E.. **Regulation of macrophage function in tumors: the multifaceted role of NF- κ B.** Blood. 2009 Apr 2;113(14):3139-3146. Epub 2009 Jan 26.
30. Tanaka T.S., Jaradat S.A., Lim M.K., Kargul G.J., Wang X., Grahovac M.J. **Genome-wide expression profiling of mid-gestation placenta and embryo using a 15,000 mouse developmental cDNA microarray.** Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97:9127–32.
31. Ledford J.G., Kovarova M., Koller B.H. **Impaired host defense in mice lacking ONZIN.** J Immunol 2007;178:513243.
32. Jimenez-Preitner M., Berney X., Uldry M, Vitali A., Cinti S., Ledford J.G. **Plac8 is an inducer of C/EBPbeta required for brown fat differentiation, thermoregulation, and control of body weight.** Cell Metab 2011;14: 658–70.
33. Jimenez-Preitner M., Berney X., Thorens B. et al. **Plac8 is required for white adipocyte differentiation in vitro and cell number control in vivo.** PLoS One 2012; 7:e48767.
34. Mourtada-Maarabouni M., Watson D., Munir M., Farzaneh F., Williams G.T. **Apoptosis suppression by candidate oncogene PLAC8 is reversed in other cell types.** Curr Cancer Drug Targets 2013; 13:80–91. PLAC8
35. Wu S.F., Huang Y., Hou J.K., Yuan T.T., Zhou C.X., Zhang J. **The downregulation of onzin expression by PKCepsilon-ERK2 signaling and its potential role in AML cell differentiation.** Leukemia 2010;24: 544–51.
36. Li C., Ma H., Wang Y., Cao Z., Graves-Deal R., Powell A.E. **Excess PLAC8 promotes an unconventional ERK2-dependent EMT in colon cancer.** J Clin Invest 2014; 124: 2172–87.
37. Kozak, M. **Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes.** Gene 1999; 234: 187–208.
38. Salamov A.A., Solovyev V.V. **Prediction of protein secondary structure by combining nearest-neighbor algorithms and multiply sequence alignments.** J. Mol. Biol 1995; 247:11–15.



39. J P. ***Epithelial E- and P-cadherins: role and clinical significance in cancer.*** Biochim Biophys Acta. 2012; 1826(2):297–311.
40. JA M. ***P-cadherin as a prognostic indicator and a modulator of migratory behavior in bladder carcinoma cells.*** BJU Int 2008; 102(11):1707–1714.
41. Rogulski K., Li Y., Rothermund K., Pu L., Watkins S., Yi F. ***Onzin, a c-Myc-repressed target, promotes survival and transformation by modulating the Akt-Mdm2-p53 pathway.*** Oncogene 2005;24:7524–41.
42. Galaviz-Hernandez, C., Stagg, C., de Ridder, G., Tanaka, T.S., Ko, M.S., Schlessinger, D., and Nagaraja R. ***Plac8 and Plac9, novel placental-enriched genes identified through microarray analysis.*** Gene 2003; 309, 81–89.
43. Jiang Wei, Mitra Ramkrishna, Lin Chen-Ching, Wang Quan, Cheng Feixiong and Zhao Zhongming. ***Systematic dissection of dysregulated transcription factor-miRNA feed-forward loops across tumor types.*** . Briefings in Bioinformatics 2015; 1-13.
44. Guo A.Y., Sun J., Jia P. ***A novel microRNA and transcription factor mediated regulatory network in schizophrenia.*** BMC Syst Biol 2010; 4:10.
45. Mourtada-Maarabouni M., Watson D., Munir M., Farzaneh F., Williams G.T. ***Apoptosis suppression by candidate oncogene PLAC8 is reversed in other cell types.*** Curr Cancer Drug Targets 2013;13:80–91.
46. Kaistha P. Brajesh., Lorenz Ho, Schmidt Harald, Sipos Bence, Pawlak Michael, Gierke Berthold, Kreider Ramona, Lankat-Buttgereit Brigitte, Sauer Melanie, Fiedler Lisa, Krattenmacher Anja, Geisel Bettina, Kraus M. Johann, Frese K. Kristopher, Kelkenberg Sabine, Giese A. Nathalia, Kestler A. Hans, Gress M. Thomas, and Buchholz Malte. ***Plac8 Localizes to the Inner Plasma Membrane of Pancreatic Cancer Cells and Regulates Cell Growth and Disease Progression through Critical Cell- Cycle Regulatory Pathways.*** Cancer Research 2016; 76(1): 96-107.



47. Blue K. Emily, Sheehan M. BreAnn, Nuss V. Zia, Boyle A. Frances, Hocutt M. Caleb, Gohn R. Cassandra, Varberg M. Kaela, McClintick N. Jeanette, and Haneline S. Laura. ***Epigenetic Regulation of Placenta-Specific 8 Contributes to Altered Function of Endothelial Colony-Forming Cells Exposed to Intrauterine Gestational Diabetes Mellitus.*** Blue and Associates, Diabetes 2015; 64: 2664-2665.
48. Rogulski K., Li Y., Rothermund K., et al. ***Onzin, a c-Myc-repressed target, promotes survival and transformation by modulating the Akt-Mdm2-p53 pathway.*** Oncogene 2005;24:7524–7541.
49. Kinsey Conan, Balakrishnan Vijaya, O'Dell R. Michael, Huang Jing Li, Newman Laurel, Whitney-Miller Christa L., Hezel F. Aram, and Land Hartmut. ***Plac8 links oncogenic mutations to regulation of autophagy and is critical to pancreatic cancer progression.*** Cell Rep. 2014; 7(4): 1143–1155. doi:10.1016/j.celrep.2014.03.061.
50. Ko M.S.H., Kitchen, J.R., Wang, X., Threat, T.A., Wang, X., Hasegawa, A., Sun, T., Grahovac, M.J., Kargul, G.J., Lim, M.K., Cui, Y., Sano, Y., Tanaka, T., Liang, Y., Mason, S., Paonessa, P.D., Sauls, A.D., DePalma, G.E., Sharara, R., Rowe, L.B., Eppig, J., Morrell, C., Doi, H. ***Large-scale cDNA analysis reveals phased gene expression patterns during preimplantation mouse development.*** Development 2000; 127: 1737–1749.
51. Wirths, S., Malenke, E., Kluba, T., et al. ***Shared cell surface marker expression in mesenchymal stem cells and adult sarcomas, Stem Cells Transl. Med*** 2013, vol. 2, no. 1, pp. 53–60.
52. Omelchenko D. O., Rzhaniyeva A. A., and Goldshtein D. V. ***Comparative Transcriptome Pairwise Analysis of Spontaneously Transformed Multipotent Stromal Cells from Human Adipose Tissue.*** Russian Journal of Genetics 2014; 50 (1):96-104.