



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

**“DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA GLICOPROTEÍNA
ESPECÍFICA DEL EMBARAZO 9 (PSG9) EN LÍNEAS CELULARES DE
CÁNCER CERVICOUTERINO”**

TESIS

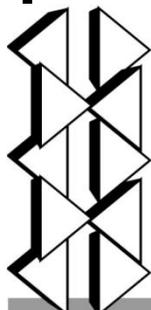
**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO**

PRESENTA

MIRIAM PARRA MELQUIADEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR.MAURICIO SALCEDO VARGAS

ASESSOR INTERNO: DR.EDELMIRO SANTIAGO OSORIO



**FES
ZARAGOZA**

MÉXICO,D.F

2014



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.

ÍNDICE

1.- Resumen	4
2.-Introducción	5
3.-Marco teórico	6
3.1-Cáncer y tipos de cáncer	6
3.2-Características del cáncer	8
3.3-Cáncer Cervicouterino	9
3.4-Cáncer Cervicouterino en México	11
3.5-Transformacion epitelial	12
3.6-Factores de riesgo del Cáncer Cervicouterino	15
3.7-Prevencion y diagnostico	20
3.8-Similitudes entre cáncer y embarazo	23
3.9-Características de las Glicoproteínas específicas de embarazo	25
4- PSG y cáncer	27
4.1-Glicoproteína especifica de embarazo 9	28
5.-Justificación	30
6.-Hipótesis	31
7.-Objetivo general y particular	31
8.-Material y Métodos	32
8.1-Cultivo celular de líneas derivadas de CaCu	33

8.2-Reacción Inmunocitoquímica	35
8.3-Colecta de tejidos	37
8.4-Procesamiento de tejidos	39
8.5-Cortes histológicos	41
8.6-Tinción Hematoxilina & Eosina(H&E)	43
8.7-Evaluación de tejidos	44
8.8-Construcción de microarreglo de tejido	45
8.9-Reacción Inmunohistoquímica	47
9.-Análisis Inmunohistoquímico	49
10.-Resultados	50
11.-Análisis y discusión de resultados	64
12.-Conclusiones	66
13.-Bibliografía	67

1. RESUMEN

El cáncer Cervicouterino (CaCu) es la segunda causa de muerte por neoplasias en mujeres de México y actualmente es aceptado que la infección por virus de papiloma humano de alto poder oncogénico (VPH) es uno de los principales factores asociados al desarrollo de esta neoplasia. A nivel molecular, en el CaCu como en cualquier otra neoplasia, se presenta una complejidad de alteraciones genómicas en pérdidas y ganancias de material genético.

En estudios recientes de nuestro grupo de trabajo, se llevó a cabo la determinación de desbalances cromosómicos usando microarreglos de hibridación genómica comparativa en lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado del cérvix uterino donde se establece que más del 70% de los casos presentaron la amplificación de la región cromosómica 19q13.2 que contiene a un grupo de genes de la familia de las glicoproteínas específicas del embarazo (PSG), miembros de la super familia de las inmunoglobulinas.

El objetivo del presente trabajo fue la determinación de la expresión de la glicoproteína específica del embarazo 9 en muestras de líneas celulares y tejidos de CaCu por medio de la técnica de inmunocitoquímica e inmunohistoquímica respectivamente.

Los resultados obtenidos muestran que la expresión del gen PSG 9 no se expresa en líneas celulares, mientras que tejidos de CaCu lo expresan, se observó que no es exclusiva de placenta, ya que se encuentra en tejido de riñón e hígado.

2. INTRODUCCIÓN:

El cáncer Cervicouterino (CaCu) es la segunda causa de muerte por neoplasias en mujeres de México y actualmente es aceptado que la infección por virus de papiloma humano de alto poder oncogénico (VPH) es uno de los principales factores asociados al desarrollo de esta neoplasia (Torres, 2013). A nivel molecular, en el CaCu como en cualquier otra neoplasia, se presenta una complejidad de alteraciones genómicas en pérdidas y ganancias de material genético, nuestro grupo de trabajo mediante el análisis de alta resolución en microarreglos de hibridación genómica comparativa (CGH), encontró que más del 70% de los casos de CaCu presentaron la amplificación de la región cromosómica 19q13.2 que contiene a un grupo de genes de la familia de las glicoproteínas específicas del embarazo (PSG), miembros de la super familia de las inmunoglobulinas. De manera interesante, este grupo de genes se ha observado que se activan específicamente en el sincitiotrofoblasto asociado al proceso de embarazo, de ahí su nombre (Camalote, 2010).

Es conocido que para el desarrollo normal del embarazo, existen diversos procesos celulares claves para su funcionalidad como la evasión de la respuesta inmune así como el proceso angiogénico. A la fecha, existen escasos reportes en cáncer donde se ha demostrado que en pacientes afectados con cáncer de mama o colo-rectal es posible detectar niveles elevados de las PSG's en el suero, por lo que pueden ser considerados como biomarcador para dichas neoplasias en estos tipos de cáncer (Sima, 2005).

Pese a la gran cantidad de estudios llevados a cabo en el ámbito del CaCu, actualmente no se cuenta con biomarcadores para esta neoplasia, por lo que se hace necesaria la búsqueda de candidatos a marcadores a nivel de ADN, ARN o proteínas. En el presente trabajo con los hallazgos de hibridación genómica comparativa, se pretende demostrar la presencia de la glicoproteína PSG9 en líneas celulares provenientes de cáncer Cervicouterino.

3. MARCO TEORICO

3.1 CÁNCER Y TIPOS DE CÁNCER

Las células crecen y se dividen sólo cuando el cuerpo las necesita, mantienen sus características morfológicas, químicas, bioquímicas y fisiológicas debido a la operación de múltiples vías de regulación sutiles y al mismo tiempo restringido. Cuando los mecanismos de homeostasis se alteran, la célula puede modificar alguna de sus características, cuando los mecanismos de regulación estrictamente controlados fallan, las células comienzan a dividirse de una manera inapropiada (Good R. 1990).

El cáncer es el crecimiento tisular producido por la proliferación continua de células anormales con capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos y puede originarse a partir de cualquier tipo de célula o tejido corporal (Jensen, 1990). Un crecimiento espontáneo de la célula que forma una masa anormal se le conoce como tumor o neoplasia. Un tumor no tiene ninguna función útil y crece a expensas del organismo sano. Los tumores pueden ser clasificados como benignos o malignos, los tumores benignos representan menos riesgo para el paciente, ya que suelen ser de crecimiento lento y una vez extirpados no vuelven a crecer; los tumores malignos pueden invadir el tejido normal circundante además de contener células de muy rápido crecimiento y estas células pueden desprenderse de un tumor primario para la formación de tumores secundarios, es decir, una metástasis (Juliet, 2007). El cáncer inicia con pequeños cambios, tales cambios no importando el tamaño, son llamados "alteraciones genéticas" o "mutaciones" las cuales

ocurren en las secuencias de ADN (Herceg y Hainaut, 2007). Las células cancerígenas acumulan mutaciones en un grado más alto que las células normales, dicha propiedad es referida como "Fenotipo Mutador". Esta propiedad de transformar a las células es esencial para el desarrollo del cáncer, así como para desarrollar una resistencia a los tratamientos contra el cáncer (Loeb *et al*, 2008). El Fenotipo Mutador es la consecuencia de mutaciones en genes que normalmente controlan la integridad y la reparación del ADN. Los mecanismos moleculares que se ven afectados por el Fenotipo Mutador son: defectos en la reparación del ADN, transcripción de los genes, control del ciclo celular y muerte celular (Boyle y Levan, 2008). Detectar las mutaciones en las células de cáncer podría tener grandes implicaciones en las investigaciones y las terapias. Primero, las mutaciones pueden dar información de la evolución del cáncer y proveer pronósticos clínicos interesantes.

Se han descrito seis funciones biológicas adquiridas durante el desarrollo de varios pasos de los tumores humanos. Las características constituyen un principio de organización para la racionalización de la complejidad de la enfermedad neoplásica (Hanahan y Weinberg, 2011).

3.2 *CARACTERÍSTICAS DEL CÁNCER*

Como se mencionó anteriormente, las características del cáncer incluyen seis funciones biológicas adquiridas en el desarrollo de los tumores humanos. Estas incluyen el mantenimiento de la señalización proliferativa, insensibilidad a las señales anticrecimiento, resistencia a la muerte celular, lo que permite la inmortalidad replicativa, la inducción de la angiogénesis, y la metástasis. Además de estos rasgos distintivos son la inestabilidad del genoma, lo que genera la diversidad genética y la inflamación, las cuales aumentan los rasgos distintivos del cáncer (Figura1). Avances conceptuales en la última década ha añadido dos características emergentes de generalidad potencial de esta lista, la reprogramación del metabolismo energético y la destrucción de la respuesta inmune. Con todas estas nuevas características se pretende el desarrollo de nuevos medios para tratar el cáncer (Hanahan y Weinberg, 2011).

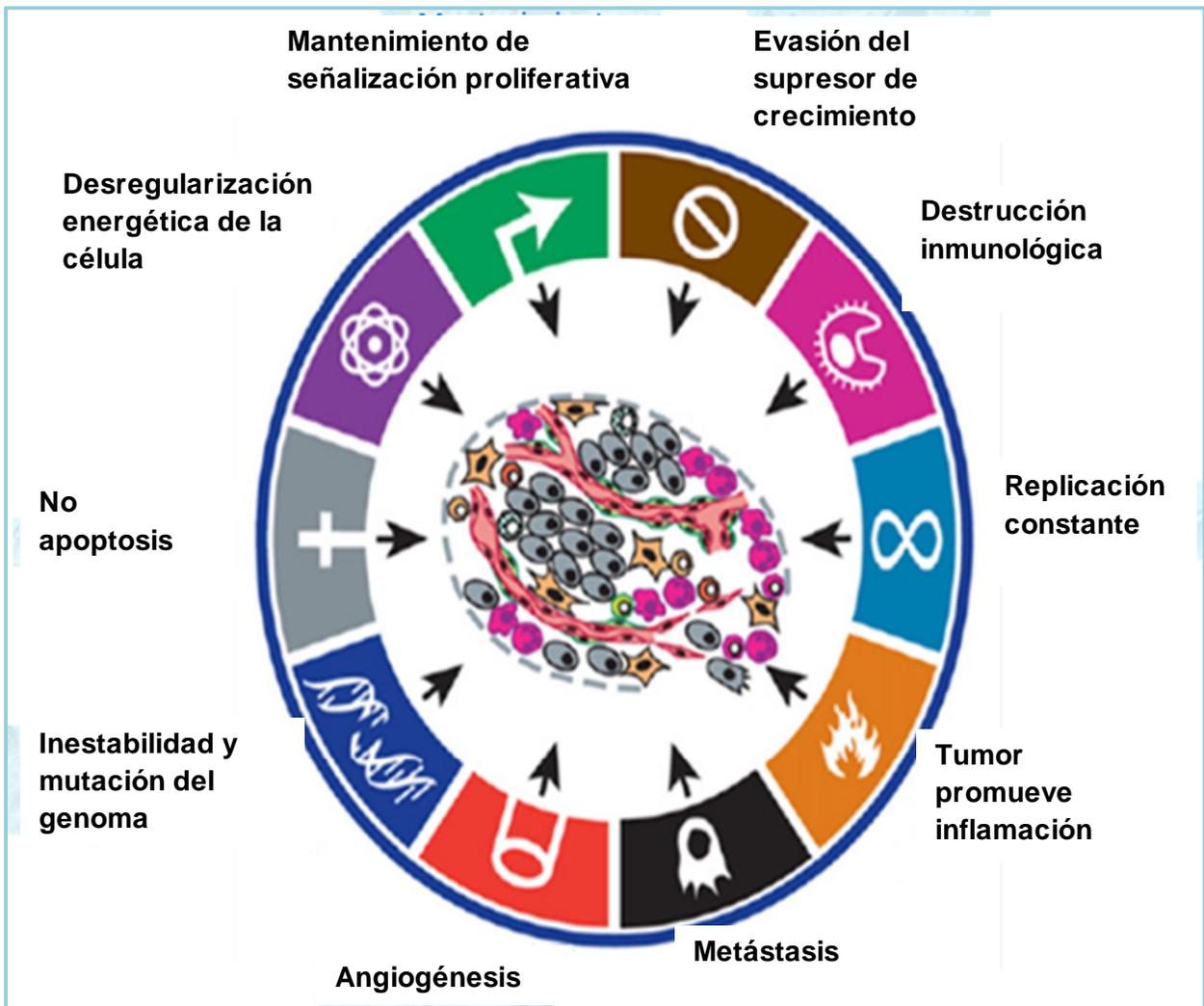


Figura 1. Todas las células poseen una maquinaria que regula la proliferación, diferenciación y muerte. La última década ha sido testigo de notables progresos en la comprensión del fundamento de los mecanismos de cada característica del cáncer (Hanahan y Weinberg, 2011).

3.3 CÁNCER CERVICOUTERINO

El cáncer Cervicouterino (CaCu) es un importante problema de salud pública a nivel mundial, es el segundo cáncer más común en mujeres (Figura 2); representando el 8.8% (530,232) total de los casos nuevos de cáncer y un 8.2% (275,008) de las muertes totales por cáncer entre las mujeres en el 2012 (Globocan 2008).

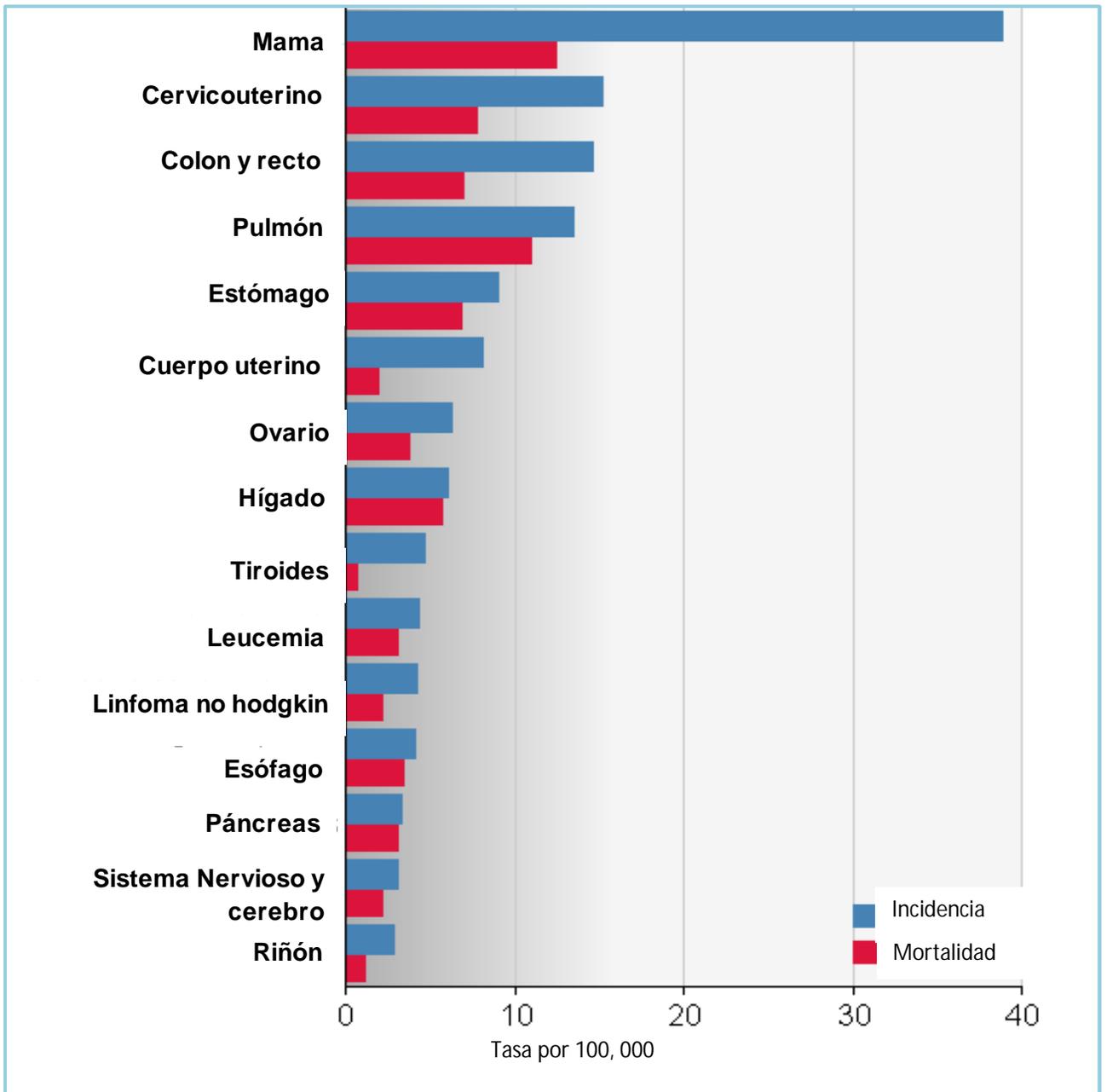


Figura 2. Tipos de cáncer en la población femenina en el mundo, teniendo a cáncer Cervicouterino en segundo lugar a nivel mundial. Tomado y modificado de Globocan 2008.

3.4 EL CÁNCER CERVICOUTERINO EN MÉXICO

En México el cáncer Cervicouterino es la segunda causa de muerte en mujeres de 35 a 59 años, (Figura 3) mueren alrededor de 5, 000 mujeres cada año. La tasa de mortalidad que se atribuye al CaCu en el país se ha mantenido estable durante las últimas 3 décadas, con alrededor de 17 muertes por cada 100, 000 mujeres. En México, se presentaron 12,512 nuevos casos (Gutiérrez, 2009).

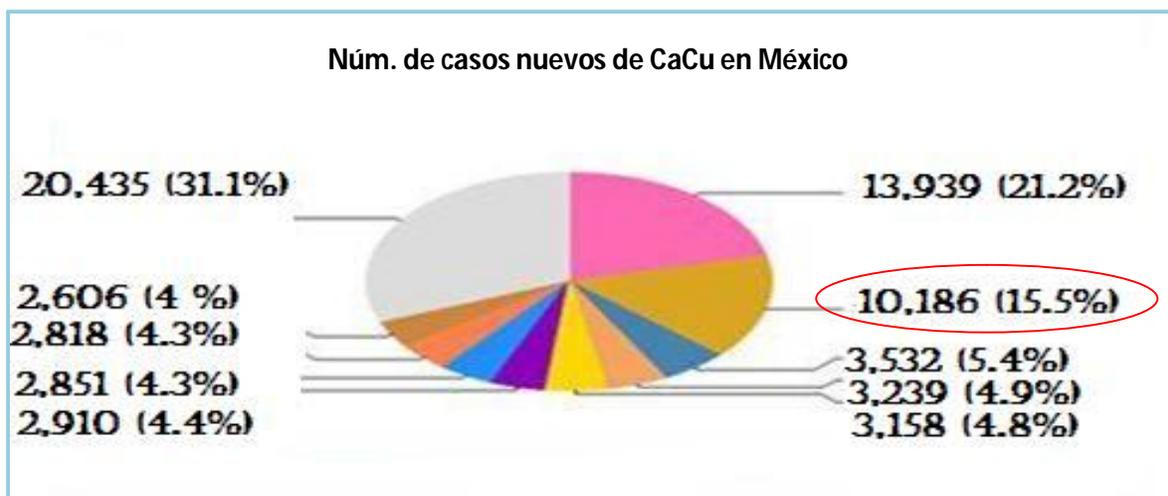
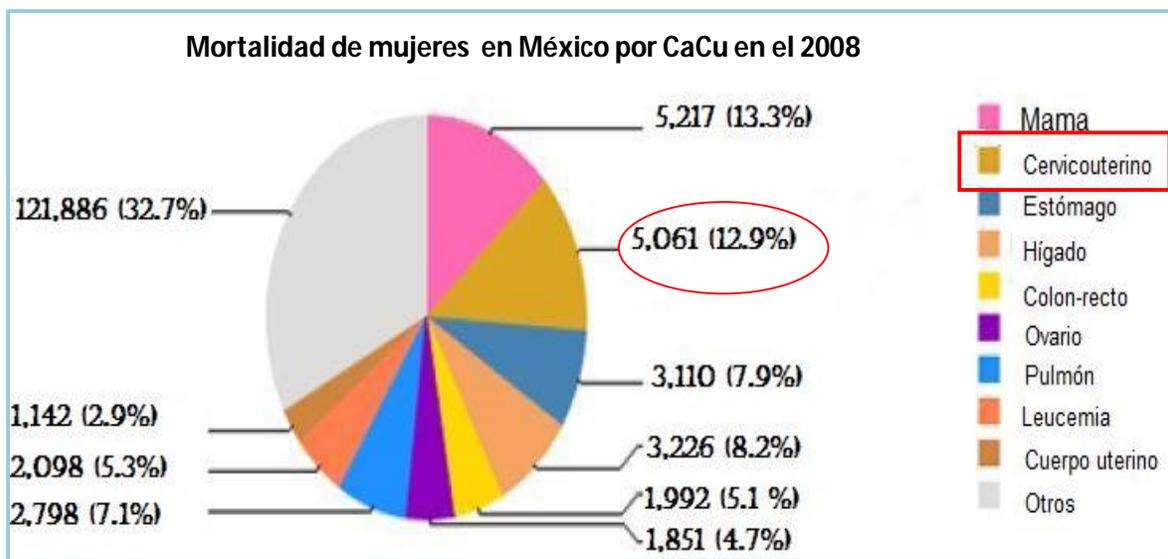


Figura 3. En la imagen A tasa de incidencia, B tasa de mortalidad de los diferentes tipos de cáncer en México, el cáncer Cervicouterino ocupa el segundo lugar. Tomado y modificado de Globocan 2008.

3.5 TRANSFORMACIÓN EPITELIAL

El CaCu es una alteración celular que se origina en el epitelio del cuello del útero, el establecimiento de la neoplasia cervical es el resultado de una serie de lesiones epiteliales, que se desarrollan en etapas de displasia leve, moderada y severa, que evolucionan a cáncer *in situ*, en grado variable cuando ésta se coloca en la superficie epitelial y luego a cáncer invasor cuando se ha traspasado la membrana basal (Wright, 2003); un estadio conlleva al otro de una manera imperceptible y que finalmente se desencadenará en la transformación epitelial (Leyva, 2006).

La región epitelial en la cual normalmente se desarrolla el cáncer de cérvix es denominada zona de transformación o la escamo-columnar (Figura 4), la cual se define como el sitio de unión entre el epitelio cilíndrico simple que recubre el canal endocervical y el epitelio plano estratificado que recubre el exocérvix (Darwiche, 1993). La zona escamo-columnar es una región de cambios continuos en la mujer, los cuales se inician durante la pubertad ya que las células columnares de esta región se transforman lentamente en células escamosas, por lo que se dice que el exocérvix se mueve hacia el orificio cervical, siendo esto un cambio fisiológico normal que deja el tejido expuesto en ectopia cervical predisponiendo esta región a cualquier infección o daño (Arends, 1998).

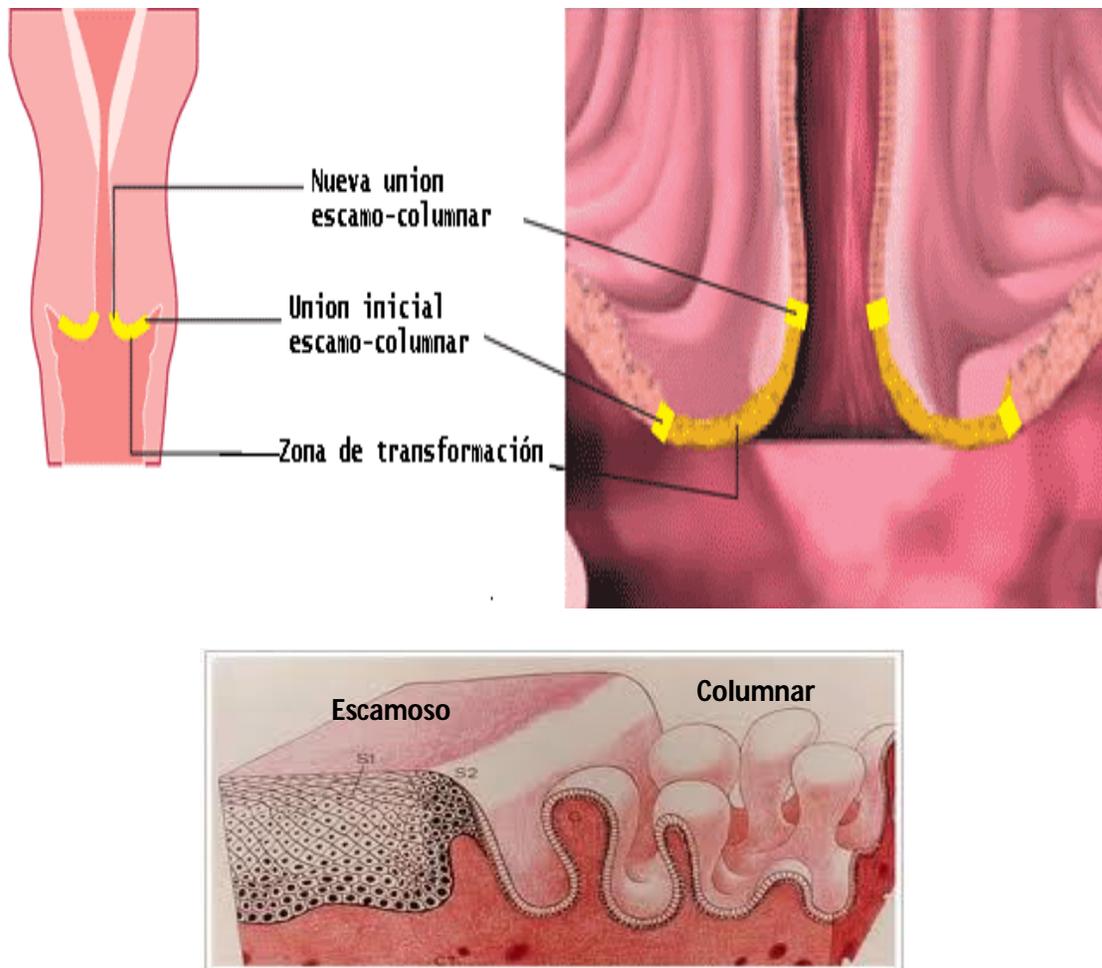


Figura 4. Unión escamo-columnar cervical (SCJ siglas en inglés) y zona de transformación. Tomado y modificado de www.prn.org: *The PRN Notebook*.

El tejido que cubre la región escamo-columnar es la zona donde existe una alta probabilidad de daño por acción de los agentes carcinogénicos y donde se registra con mayor frecuencia las metaplasias atípicas, presentándose lesiones precursoras (Figura 5), que van desde lesiones intraepiteliales de bajo grado (LIEBG), de alto grado (LIEAG) hasta el cáncer invasor que se genera una vez que el tumor rompe la membrana basal del epitelio (Moscicki, 2001).

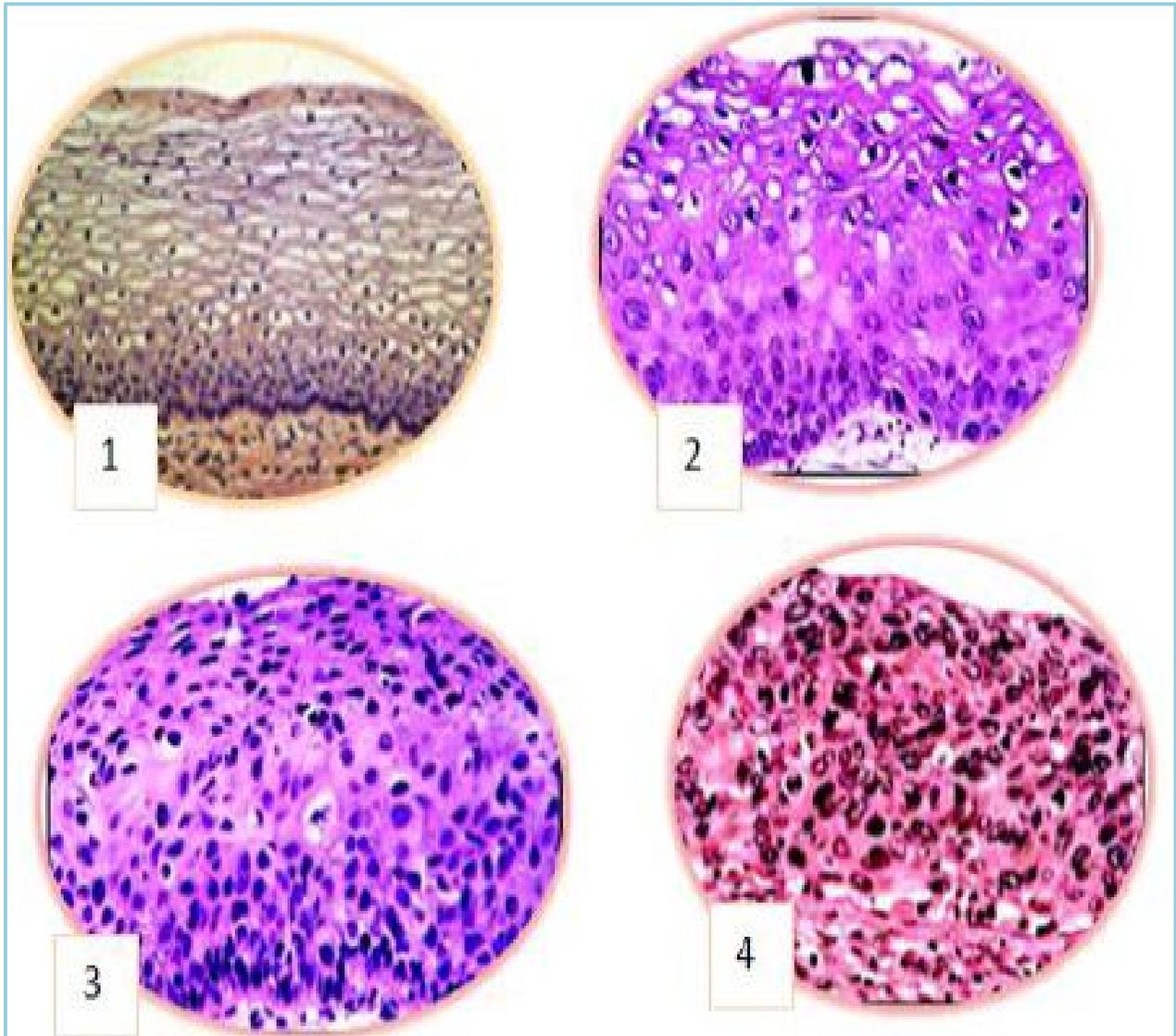


Figura. 5. Corte histológico de epitelio escamoso de cérvix, en diferentes grados de lesión: 1: epitelio escamoso estratificado de cérvix sano; 2: epitelio escamoso estratificado de cérvix con lesión intraepitelial de bajo grado (LIBG); 3: epitelio escamoso estratificado con lesión de alto grado (LIEAG); 4: epitelio escamoso estratificado con cáncer invasor (Doorbar, 2006).

3.6 FACTORES DE RIESGO DEL CÁNCER CERVICOUTERINO

El agente etiológico que se ha involucrado en la génesis del CaCu es el virus del papiloma humano (VPH) donde utilizando técnicas de biología molecular, han confirmado una positividad a VPH en el 98.8% de los casos de CaCu (Juárez, 2010).

Estudios epidemiológicos han demostrado que solo una pequeña fracción de mujeres con infección de VPH de alto riesgo progresa a una LIEAG y CaCu. Esto se debe a que la infección por VPH es necesaria pero no suficiente para causar cáncer, se ha asumido que otros factores en conjunto con VPH, modulan el riesgo de transición de infección por VPH en cérvix a lesión cervical o CaCu (Castellsagué, 2002).

Por otro lado la inmunosupresión representa un factor de riesgo para la persistencia y progresión de lesiones, pero el factor que determina la persistencia viral en las mujeres no está completamente definido (Zur Hausen, 2002). Por ello se sugiere que otros factores afectan en la persistencia viral:

- Alto número de parejas sexuales:

A mayor número de parejas sexuales, mayor es el riesgo de adquirir infecciones de transmisión sexual incluyendo VPH factor etiológico del cáncer (López, 2006).

- Multiparidad:

Estudios corroboran la relación encontrada entre la paridad elevada y el cáncer Cervicouterino. El motivo fisiológico de esta asociación está poco

claro; las posibilidades incluyen factores hormonales vinculados al embarazo o traumatismo cervical asociado con el parto, así sugieren que las mujeres con tres o cuatro embarazos de término tienen un riesgo 2.6 veces más alto de aparición de cáncer Cervicouterino que aquellas que nunca habían dado a luz; las mujeres con siete partos o más, presentaron un riesgo 3.8 veces mayor (Brinton, 1989).

- Alcoholismo:

La ingestión crónica de alcohol produce alteraciones del sistema de oxidoreducción y modificaciones bioquímicas (López, 2004). Al respecto se ha planteado que el alcohol actúa como disolvente de cancerígenos que se encuentran en el tabaco facilitando su penetración a las células del cuerpo (León, 2004).

- Tabaquismo:

Los carcinógenos procedentes del consumo del tabaco (la nicotina, el monóxido de carbono) y otros irritantes que entran al organismo, producen diversos efectos nocivos. La nicotina, es un alcaloide muy tóxico, que actúa sobre el sistema nervioso central , mientras que el CO es un gas incoloro de elevado poder tóxico, sus efectos nocivos se producen a nivel de los glóbulos rojos, al ser transportados por el sistema circulatorio y llegar al epitelio cervical, pueden iniciar o actuar como carcinógenos en las células ya infectadas por VPH. Así como la inducción indirecta de inmunosupresión y la reducción de antioxidantes provenientes de la dieta (Cruz, 2004).

- Anticonceptivos hormonales:

El cuello uterino es regulado por hormonas que poseen receptores específicos para estrógenos y progesterona, por lo que la existencia de dichas

proteínas en el epitelio escamoso, dependiendo de la fase del ciclo menstrual en que se encuentre, pudieran promover la proliferación celular e integración del ADN viral al genoma celular (Tirado, 2005), o sobreexpresión de sus oncogenes (E6/E7 o E5).

- Alteraciones genéticas:

Las principales alteraciones genéticas asociadas al desarrollo de CaCu son: Translocaciones, mutaciones puntuales, amplificaciones, y alteraciones cromosómicas con desbalances específicos; ya sean en ganancia o pérdida del material genético, las cuales son importantes para el inicio y progresión del tumor (Puhvel, 1984).

Han sido aislados, secuenciados y clonados al menos 100 tipos de VPH (Figura 6) y, de ellos 50 están asociados al tracto genital femenino. Este virus ha sido clasificado en cepas de "alto riesgo" y/o de "bajo riesgo," según el grado de transformación maligna que ocasiona en la célula infectada. Entre los más comunes, los que representan al grupo de bajo riesgo incluyen a los tipos VPH-6 y VPH-11 que usualmente causan verrugas benignas y que, ocasionalmente, se asocian lesiones invasivas; mientras que los tipos VPH-16 y VPH-18, corresponden a los de "alto riesgo" por su gran potencial carcinogénico. El VPH-16 es el tipo que aparece, fundamentalmente, en los tumores invasivos y en los de alto grado de malignidad; el VPH-18 se relaciona con el carcinoma pobremente diferenciado y con un mayor compromiso de los ganglios linfáticos, lo cual puede variar en dependencia de la localización geográfica. Los tumores VPH-18 positivos progresan más rápidamente que los relacionados al VPH-16. Tanto el VPH-18 como el VPH-

16 pueden encontrarse como viriones, integrados en el ADN celular o de forma episomal (Jastreboff, 2002).

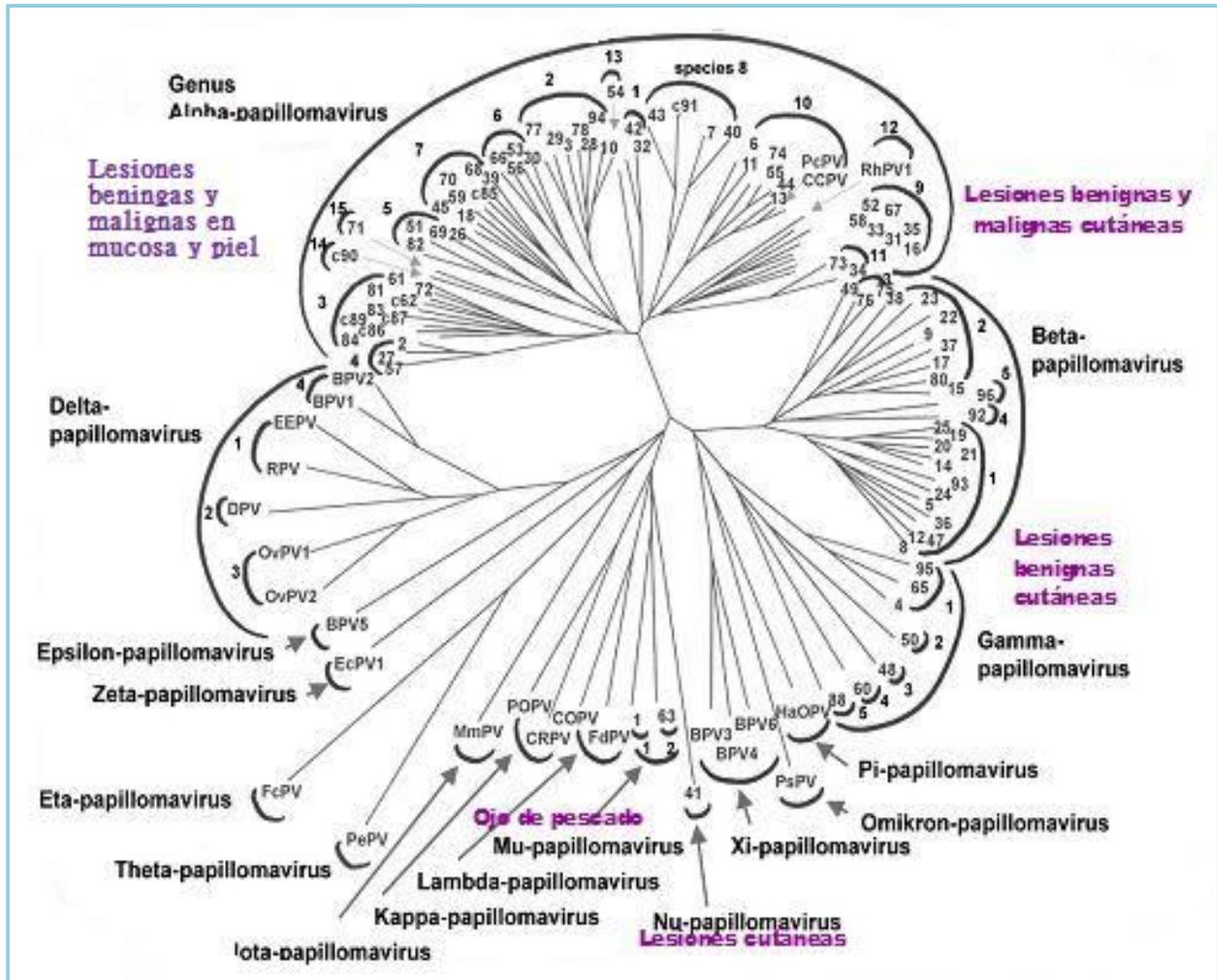


Figura 6 Existen 200 tipos virales aproximadamente; 100 están secuenciados, 30 infectan las mucosas del humano. Familia: Papillomaviridae. Tomado y modificado de Villiers, 2003.

Se ha demostrado que la presencia de los tipos virales 16 y 18 en pacientes con lesiones premalignas aumentan el riesgo de producir cáncer invasor en un 16.9% (Figura 7). Sin embargo, hay estudios que indican que no todos los pacientes infectados con VPH de alto riesgo desarrollan cáncer invasor. Por

otro lado, también se ha demostrado que las pacientes con lesión intraepitelial de alto grado (LIEAG) a quienes no se administra tratamiento desarrollan cáncer invasor sólo entre un 30 y 70%. Lo anterior indica que la presencia de LIEAG y la infección por VPH alto riesgo son importantes pero no suficientes para desarrollar una lesión invasora y que podrían participar otros mecanismos moleculares (Jastreboff, 2002).

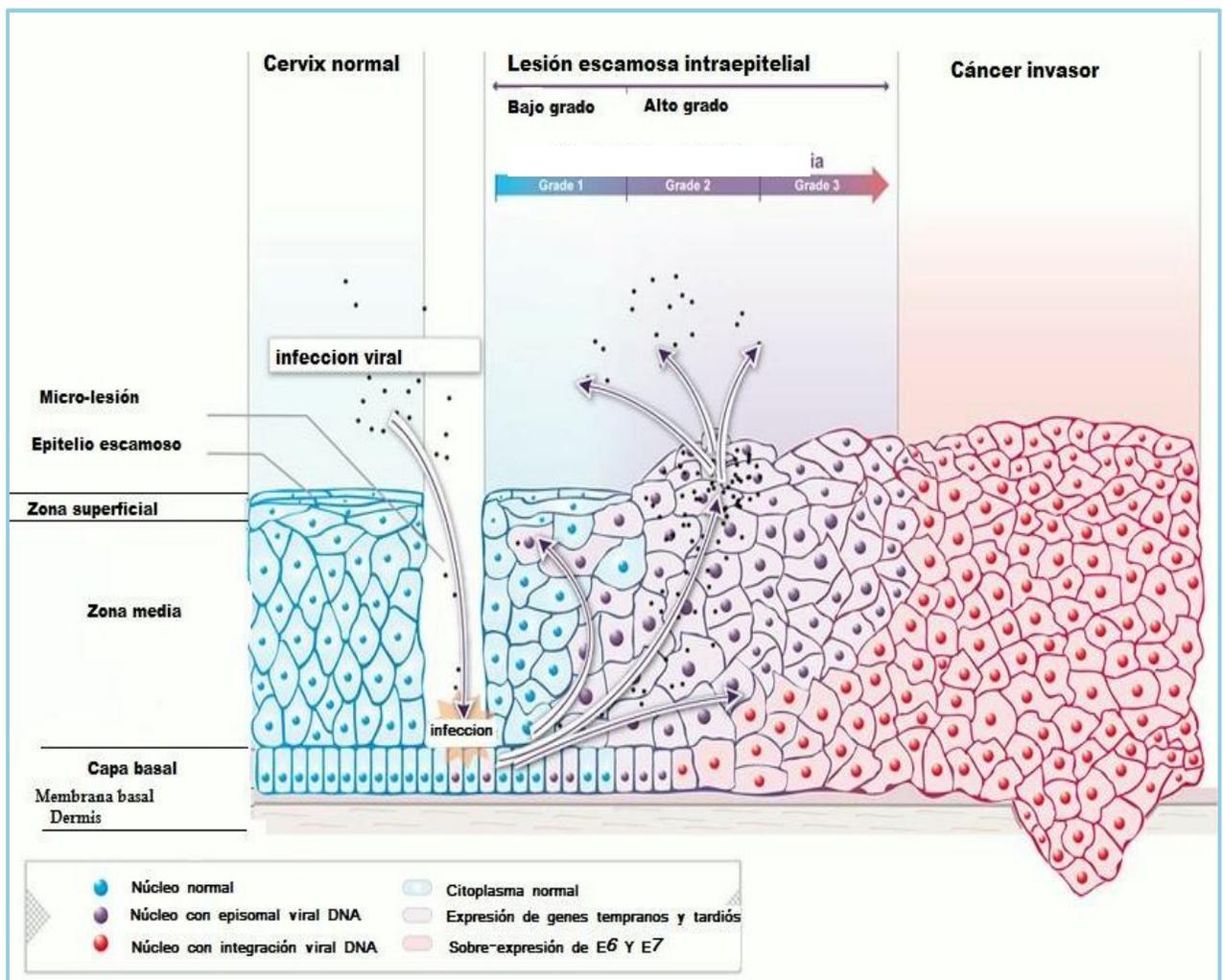


Figura 7. Se considera una lesión de bajo grado cuando el virus afecta a una tercera parte del cérvix. Una lesión de alto grado abarca dos terceras partes del epitelio, cuando el virus alcanza la totalidad de éste se considera un CaCu in situ, y una vez rebasando las capa basal es CaCu invasor (Doorbar, 2006)

Para que el CaCu se desarrolle se requiere de varios años, se estima que son un poco más de 10 años, es por ello que se busca nuevas opciones de diagnóstico y tratamiento para poder combatir esta enfermedad antes de que evolucione.

3.7 PREVENCIÓN Y DIAGNÓSTICO

Actualmente, los esfuerzos de prevención del CaCu se han enfocado en la aplicación de pruebas de tamizaje en mujeres sexualmente activas, mediante la citología y el tratamiento de las lesiones precancerosas, siendo el tamizaje citológico el más aceptado por su sensibilidad para detectar lesiones en el cuello uterino, pero principalmente por el costo-beneficio; pese a su efectividad la citología tiene limitaciones ya que desafortunadamente no está exenta de inconvenientes y uno de estos es la alta tasa de falsos negativos que puede alcanzar cifras de hasta un 40%, gran parte de ello se atribuye a errores en su interpretación, toma de la muestra y preparación de ellas (McCrorry , 1999), aunado a esto en muchos de los casos la detección no se realiza de manera adecuada y oportuna, realizándose la detección cuando la lesión ya avanzó a un cáncer invasor, siendo por ello una gran necesidad de identificar las lesiones de la manera oportuna para evitar que se desarrolle la enfermedad, ya que este tipo de cáncer es absolutamente prevenible y su tratamiento es relativamente fácil cuando el diagnóstico es oportuno (Dragnev, 2000).

La identificación de alteraciones en genes y proteínas que se encuentran envueltas en el proceso de la evolución de las lesiones, es una alternativa viable y confiable que se puede utilizar para tener un mejor diagnóstico temprano. Las técnicas de biología molecular han sido la alternativa para la identificación de dichas alteraciones genéticas en células del cáncer (Testa, 1990).

Los métodos principales de diagnóstico han sido la histopatología y métodos citológicos como el Papanicolaou, que buscan cambios en las células de la zona de transformación; sin embargo, actualmente se han introducido métodos moleculares para la detección de VPH y con fines de investigación en muestras clínicas, como lo son la genotipificación de VPH, arreglos de ADN complementario e hibridación genómica comparativa, en donde esta última puede ser empleada en los diferentes estadios tumorales para detectar desbalances cromosómicos específicos durante el desarrollo del CaCu. A nivel molecular, la ganancia y pérdida de material genético es característico de las células transformadas, y estas alteraciones se presentan desde los estadios tempranos y se establecen definitivamente en las etapas invasoras, por lo que la caracterización de dichas alteraciones a nivel génico, potencialmente nos arrojará el punto de partida para su detección diferencial en el torrente sanguíneo, dado que a partir de estas alteraciones de material genético, es posible encontrar biomarcadores, que son proteínas derivadas de los tumores y que son producidas solo o en mayor cantidad en la neoplasia en comparación con pacientes sanos. Tal es el caso del antígeno prostático específico (PSA), que se detecta en altas concentraciones en el suero de

pacientes con cáncer de próstata y que actualmente es una de las pruebas más utilizadas para la detección de esta neoplasia (Hidalgo, 2005).

Desde la época de los años 80, mediante la citogenética clásica, se comenzaron a realizar estudios para evidenciar las alteraciones a nivel genómico; estos cariotipos mostraron que en las células de diversas líneas celulares existían alteraciones tales como inversiones, inserciones, deleciones, poliploidias, etc. Sin embargo, debido a lo limitado de la tecnología del momento, no se podía saber que genes estaban alterados. Con el avance de la tecnología, se han podido detectar de manera más precisa los desbalances cromosómicos, y es mediante el análisis de alta resolución en microarreglos de hibridación genómica comparativa (CGH) se han identificado las regiones con mayor ganancia en el cromosoma 19q13.2, un grupo (cluster) de genes de la familia de las proteínas específicas del embarazo (PSG1, 2, 3, 7, 9 y 11), las cuales están directamente relacionadas con el proceso del embarazo.

Es de especial interés que entre la célula transformada (cáncer) y el embarazo existe una gran similitud en muchos de los mecanismos de proliferación, invasión, tolerancia inmunológica e incluso angiogénesis (Shernan, 2009).

3.8 SIMILITUDES ENTRE CÁNCER Y EMBARAZO

Un posible modelo de estudio, que representa, cómo un tumor podría proliferar y producir una metástasis no detectable en la célula huésped, es el embarazo, en este la placenta desarrollada invade el útero y un feto semialogénico escapa del rechazo del sistema inmune maternal. Una gran cantidad de propiedades inmunomoduladoras de la interfase feto maternal-placenta se ha desarrollado para permitir la sobrevivencia del feto con distintos sistemas inmunológicos hasta el parto, sin un ataque por parte del sistema inmune maternal. La placenta actúa como una barrera inmunológica activa, que permite que 2 organismos antigénicamente diferentes se toleren el uno al otro. La tolerancia hacia el feto se lleva a cabo por la interacción de las células NK, las moléculas HLA G, el balance de citocinas Th1 y Th2, mecanismos de apoptosis y la síntesis de factores reguladores como citocinas y hormonas (Sherman, 2009). Las similitudes entre los mecanismos implicados del feto materno y la tolerancia inmunológica de tumores, poseen un patrón común.

Diversos estudios han sido realizados para definir el papel de las Glicoproteínas Específicas de Embarazo (PSG) durante el embarazo, uno de los trabajos que muestran su papel inmunomodulador es el de Snyder S. y cols., donde demostraron que las PSG pueden inducir la producción de citocinas antiinflamatorias como IL-10, IL-6, TGF- β sugiriendo una modulación de la respuesta inmune innata (Snyder, 2001).

Por otro lado, el papel del sistema inmune en la eliminación de la infección por el VPH no es claro aún, pero hay evidencias que muestran que la respuesta mediada por células es importante en el control de la infección viral. Así, se ha demostrado que la supresión de la respuesta inmune en los tumores es principalmente mediada por la IL-10 (Vinuselvi, 2008).

El papel de IL-10 en la desregulación de la respuesta inmune específica para tumores puede presentarse en los siguientes mecanismos: 1) suprimiendo directamente la producción de IFN- γ e IL-12 evitando la activación de los linfocitos T citotóxicos y por las células NK; 2) reduciendo la expresión de moléculas del sistema HLA sobre la superficie de las células tumorales y 3) inhibición de la presentación de antígenos tumorales por las células profesionales presentadoras de antígeno (Vinuselvi,2008).

3.9. CARACTERÍSTICAS DE LAS GLICOPROTEÍNAS ESPECÍFICAS DEL EMBARAZO

La glicoproteína específica del embarazo es una molécula que es sintetizada en la placenta (Figura 8), preferencialmente en el sincitiotrofoblasto (Zhou, 1997). Ya sintetizada, la proteína es liberada al torrente sanguíneo de la madre (Ismail, 1992).

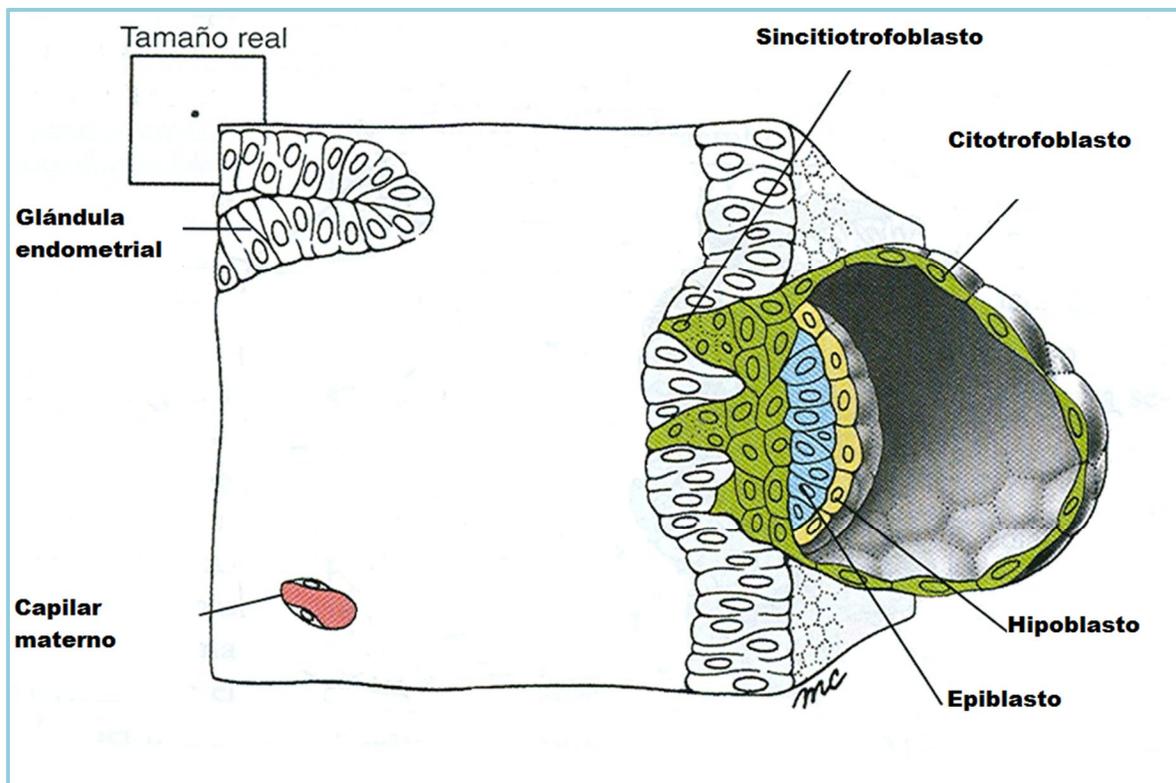


Figura 8. El sincitiotrofoblasto invade y se expande en el epitelio endometrial y el tejido conjuntivo subyacente, donde diferentes PSG son sintetizadas para el buen desarrollo del producto.

Esta familia de genes se encuentra formando un *cluster* y se agrupan con los antígenos carcinoembriogénicos (CEA) y las moléculas de adhesión (CECAM) debido a que presentan una estructura como los demás integrantes de las CECAM y en conjunto estos genes forman parte de la superfamilia de las Inmunoglobulinas (Brummendorf, 1994). La familia se compone de 11 genes muy similares agrupadas dentro de 700 kb en el cromosoma 19q 13.2 y cada una de ellas puede presentar hasta cinco isoformas mediante el proceso de *splicing* alternativo.

A la fecha la función de estas proteínas, aún es poco conocida, aunque se ha sugerido que se encuentran participando de forma activa como inmunomoduladores, de tal forma que suprime ciertos genes del sistema inmune de la madre, permitiendo la implantación del embrión, invasión del endometrio y formación de la placenta de manera controlada (HaTC, 2010), además de funcionar también como inductor de factores de crecimiento pro-angiogénicos (Lie, 1992). Sin embargo, cuando estas proteínas se presentan en niveles bajos de concentración dentro del organismo de la madre, son asociados al retraso del crecimiento uterino, preeclampsia y abortos (Camolotto, 2010).

Es importante e interesante observar qué funciones de las glicoproteínas específicas de embarazo caracterizan a las células tumorales para poder proliferar y pasar desapercibidas del sistema inmunológico de la madre.

4. PSG Y CÁNCER

Hace más de una década, había sido descrito que la expresión de las PSG era específica del sincitiotrofoblasto; sin embargo, ahora se sabe que puede existir una expresión ectópica en pacientes de cáncer de mama (Bohn, 1971), al igual que se ha demostrado en un perfil de expresión la regulación de PSG9 durante los inicios de la carcinogénesis colo-rectal (Sima, 2005), sugiriendo un papel en ciertos tipos de cáncer.

Tiempo después nuestro grupo de trabajo encontró una ganancia de la clona 19q13 donde mapean los genes PSG (Figura 9 y 10), mediante la técnica de hibridación genómica comparativa, teniendo los datos que se presentan en los siguientes gráficos.

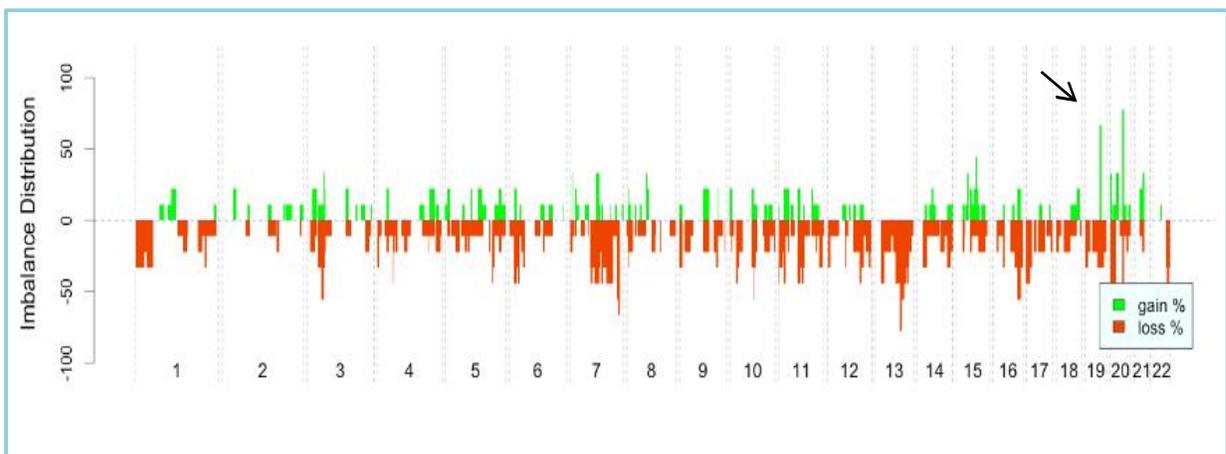


Figura 9. Mapa de desbalances cromosómicos presentes en lesiones precursoras del cérvix. La flecha señala la ganancia de la clona 19q13 donde mapean los genes PSG (Arreola, 2008).

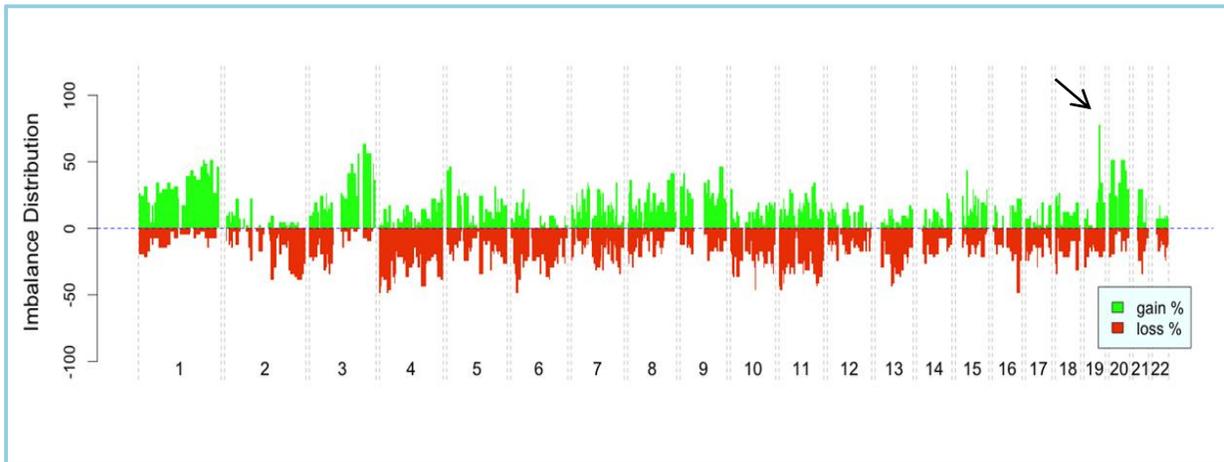


Figura 10. Mapa de desbalances cromosómicos presentes en lesiones invasoras del cérvix. La flecha señala la ganancia de la clona 19q13 donde mapean los genes PSG (Arreola, 2008).

4.1 GLICOPROTEINA ESPECÍFICA DE EMBARAZO 9

El gen de la glicoproteína específica del embarazo 9 (PSG9) se encuentra localizado en el cromosoma 19 en la región citogenética q13.2-13.3 (Tynan, 1992). Los genes PSG se encuentran conformando una familia de 11 genes y se ha visto que éstos se expresan preferencialmente en el sincitiotrofoblasto de la placenta (Tatarinov, 1992).

La glicoproteína específica del embarazo ya sintetizada, es liberada al torrente sanguíneo (Ismail, 1992); sin embargo, a la fecha su función aún es poco conocida, no obstante un miembro de esta familia, el gen PSG6 se le ha asociado con la mola hidatiforme (Leslie, 1990) y se ha sugerido que la proteína PSG9 se encuentra participando de forma activa como un inmunomodulador, de tal forma que suprime ciertos genes del sistema inmune de la madre, permitiendo la implantación del embrión, invasión del endometrio y formación de la placenta de manera controlada (Motran, 2002), otro hallazgo donde se ve implicado como potencial marcador a las

PSG en cáncer es en el cáncer colon y recto (PSG9). Por otro lado, ha sido reportado que la deficiencia de esta glicoproteína durante el periodo de gestación, provoca diversas patologías asociadas al embarazo, dentro de ellas se encuentran: preclampsia, aborto espontáneo y desarrollo retardado, entre otras (Lei, 1992).

Esto es soportado por las siguientes observaciones: la primera evidencia de esta asociación está basada en un reporte de la década de los 80, donde se detectaron altas concentraciones de la PSG1 en el suero de pacientes con cáncer de mama. Es importante mencionar que la PSG1, es de la PSG más abundantes en suero durante el embarazo y es detectada a partir de la segunda y tercera semana de gestación a concentraciones de 200 a 400 µg/ml (Lin, 1974) y conforme el embarazo progresa, los niveles de esta molécula aumentan. Este mismo aumento de concentración se observa en el suero de pacientes de cáncer de mama. Estos datos evidencian la factibilidad de detección de al menos PSG1 en suero y sugiere su posibilidad de detección en otros fluidos como orina, saliva, lavados vaginales, etc. (Monteiro, 1982).

La regulación positiva de PSG9 podría favorecer el desarrollo del tumor, el papel exacto de PSG9 sigue siendo la carcinogénesis por determinar. Sin embargo la sobre expresión de PSG9 en diferentes tipos de cáncer sugiere que este gen puede ser considerado como un valioso biomarcador (Sima, 2005).

En nuestro caso, será el primer reporte en el cual es posible asociar a algunos miembros de la familia PSG en CaCu, con esta información es posible sugerir una clara asociación de los PSG con el desarrollo de las neoplasias y en tal caso su detección diferencial en biopsias, raspados, suero o fluidos corporales y que pudieran considerarse como posibles marcadores tumorales. Recientes trabajos de expresión en CaCu mediante microarreglos, se ha observado que unos de los genes sobreexpresados en las lesiones invasoras con respecto al cérvix sano o normal es el PSG9 (comunicación personal Arreola H, manuscrito en preparación). Esto indicaría que la PSG9 podría ser una molécula marcadora de esta neoplasia.

5. JUSTIFICACIÓN

El cáncer Cervicouterino actualmente es la segunda causa de muerte entre las mujeres adultas mayores de 30 años en México (Torres, 2013).

La incidencia de esta neoplasia en mujeres jóvenes es cada vez más común, al igual que la infección por VPH. Por otro lado, a nivel molecular, la ganancia y pérdida de material genético es característico de las células transformadas; estas alteraciones se presentan desde los estadios tempranos y se establecen definitivamente en las etapas invasoras, lo cual hace importante la caracterización de dichas alteraciones genéticas, dado que a partir de estas alteraciones de material genético, es posible encontrar biomarcadores. Dado que en la actualidad no se cuenta con potenciales marcadores moleculares para el pronóstico, diagnóstico y posible tratamiento de cáncer Cervicouterino.

Recientemente se reportó una ganancia en la región citogenética 19q13.2q13.3, del cromosoma 19, por medio de hibridación genómica comparativa (CGH) en microarreglos; donde se encuentra un grupo de las PSG's, esta alteración podría provocar la expresión de las PSG's en cáncer Cervicouterino. Este tipo de estudios permitirá abrir nuevos caminos en el entendimiento de las bases moleculares del cáncer Cervicouterino.

A la fecha no ha sido reportada la participación de PSG 9 en cáncer Cervicouterino.

6. HIPÓTESIS

Se sabe que existe una expresión ectópica de PSG 9 en procesos neoplásicos, por lo que se espera que líneas celulares y tejidos de cáncer Cervicouterino expresen esta proteína.

7. OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión de la Glicoproteína específica del embarazo 9 (PSG9) en el cáncer Cervicouterino.

7.1 OBJETIVOS PARTICULARES

Detectar la proteína PSG9 en líneas celulares (CaLo, INBL, HeLa, CaSki, C33A, SiHa, ViPa, HaCaT, Rova, C41, MS751 y ViBo) derivadas de cáncer Cervicouterino.

Detectar la expresión de la proteína PSG9 en tejidos de CaCu y en cervix sin lesión.

8. MATERIALES Y METODOS

- *MATERIAL BIOLÓGICO*

Consiste en:

Líneas celulares de carcinoma de cérvix (CaLo, INBL, HeLa, CaSki, C33A, SiHa, ViPa, HaCaT, Rova, C41, MS751 y ViBo)

Línea celular Hek293T

Muestra de Placenta

Muestras de cérvix normal, lesión intraepitelial de alto grado y CaCu.

CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER CERVICOUTERINO

Las líneas celulares se cultivaron en DMEM suplementado con 10% de SFB (Suero Fetal Bovino), son: CaLo, INBL, HeLa, CaSki, C33-A, SiHa, ViPa, Hacat, Rova, C-41, MS751 y ViBo. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura constante de 37°C con 5% de CO₂ y una atmósfera húmeda a saturación en una incubadora.

La densidad y viabilidad de las células tumorales en cultivo fueron contadas en cámara de Neubauer y evaluadas por exclusión con azul de tripano, para que pudieran ser fijadas (Figura 11).

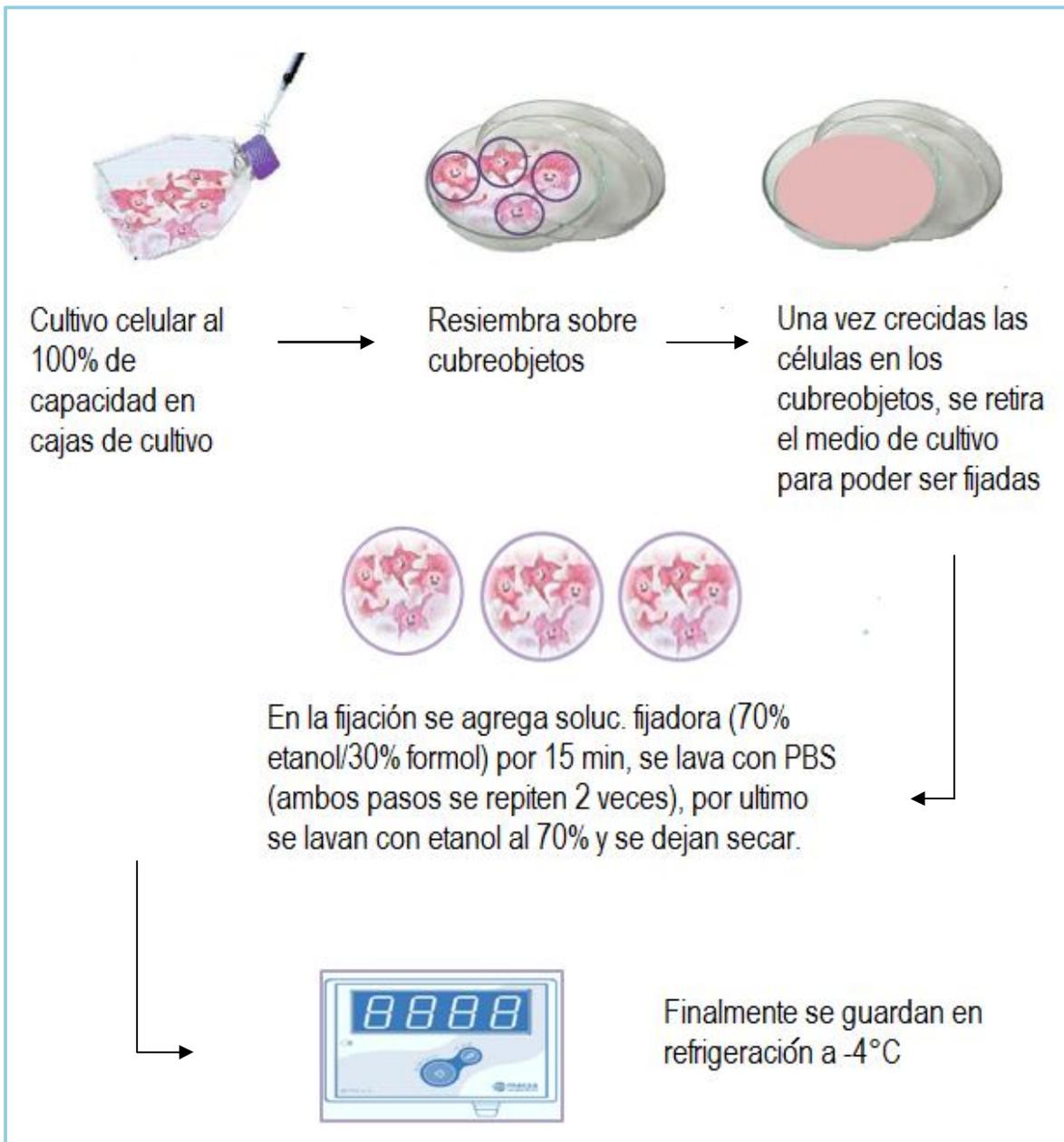


Figura 11. Esquema de la preparación de muestras para realizar la inmunocitoquímica.

8.2 REACCIONES DE INMUNOCITOQUIMICA

Una vez fijadas las células en cubreobjetos de las 13 líneas celulares de cérvix, se hizo la inmunocitoquímica. Para hacer las reacciones se utilizó el *kit* de inmunodetección Ratón/Conejo con el sistema de Biotina-Estreptavidina-Peroxidasa (Mouse/Rabbit HRP/DAB, Bio SB).

Se colocaron los cubreobjetos en cajas Petri con PBS 1X durante una hora para hidratar las células, posteriormente se colocan los cubreobjetos en una solución (Trilogy 1X, Cell Marque) para la exposición de antígenos, previamente calentada a 90°C y se mantuvieron a esa temperatura durante 20 min, una vez pasado este tiempo se hicieron 2 lavados con PBS 1X, colocándolas en cámaras húmedas.

Posteriormente, se les colocó el bloqueador de peroxidasa endógena (ImmunoDetector Peroxidase Protein Blocker), durante 15 minutos a temperatura ambiente (TA). Al término se lavaron 3 veces con PBS 1X, y se incubaron los cubreobjetos con el anticuerpo primario (PSG 9 ab 64425, dilución 1:100), en cámara húmeda se dejó toda la noche a -4°C; se dejó un cubreobjetos de la línea celular ViBo (la elección fue al azar) sin anticuerpo para tener un control negativo y como control negativo de reacción a la línea Hek293T, para así corroborar la efectividad de la reacción, obteniendo una tinción azul.

Al terminar el tiempo de incubación con el anticuerpo primario se lavaron las células 3 veces en PBS 1X, para colocar el anticuerpo secundario conjugado con Biotina (InmunoDetector Biotin Link) durante 15 minutos a TA. Se realizaron 2 lavados con PBS 1X al término del tiempo se les colocó Estreptavidina conjugada con peroxidasa para amplificar la señal de la reacción (InmunoDetector HRP Label) también durante 15 minutos.

Al finalizar el tiempo de incubación se lavaron los cubreobjetos con PBS 1X y se realizó el revelado de la reacción utilizando Diamino Bencidina (InmunoDetector DAB Chromogen/InmunoDetector DAB Buffer), durante 10 segundos, se tiñó con Hematoxilina de Harris y se viró la reacción con agua amoniacal, se hizo un lavado con etanol absoluto y xilol para poder ser montado con resina en los portaobjetos.

8.3 COLECTA DE TEJIDOS

Durante los meses de Enero a Mayo del 2012 se colectaron muestras de cáncer Cervicouterino aprobado por el Comité de ética de la Coordinación de Investigación en Salud (CNCI) así como por los Servicios de ginecología y Clínica de displasia del Hospital General de México. Todas las muestras (biopsias) fueron tomadas bajo el consentimiento informado de las pacientes (Figura 12) ; el propósito y procedimiento del estudio fue explicado a las pacientes con el fin de evitar problemas o malos entendidos hacia la institución o con la paciente, tomando en cuenta que estas muestras serán utilizadas para diversos proyectos.

Cabe mencionar que muestras control de cérvix sin alteraciones fueron colectadas en cirugías de pacientes con miomatosis, ovario poliquístico, es decir enfermedades que no tuvieran alguna neoplasia relacionada al cérvix.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA	
DE PACIENTES CON DIAGNOSTICO IDENTIFICADO	
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.	
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 identificar la presencia o ausencia del Virus del Papiloma Humana, así como estudios 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 seguridad 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:	
56276900 Extensión 22706	

Figura. 12 carta de consentimiento de pacientes a las que se toma la biopsia

Criterios de inclusión de tejidos con CaCu:

- Pacientes con diagnóstico definitivo de diferentes lesiones precursoras o cáncer Cervicouterino
- Pacientes con cáncer Cervicouterino como cáncer primario

Criterios de exclusión:

- Pacientes que hayan recibido tratamiento de quimioterapia y /o radioterapia
- Pacientes que no hayan firmado carta de consentimiento.

8.4 PROCESAMIENTO DE LOS TEJIDOS

Dos biopsias fueron colectadas de cada una de las pacientes, de las cuales una se destinó para la conservación o extracción de ácidos nucleicos (utilizados en técnicas de biología molecular avanzada) y la otra muestra se dispuso para su inclusión en parafina, en dicha inclusión se deshidrata la muestra, una vez incluida en parafina la muestra es evaluada por un patólogo para así confirmar el diagnóstico de la paciente.

La biopsia que era destinada para inclusión en parafina antes de ser procesada, se dejaba de 2 a 3 días en solución fijadora (etanol 70%-formol 4%) para que ésta penetrara bien en el tejido, una vez transcurrido el tiempo en la solución fijadora se deshidrato el tejido. La deshidratación consiste en

pasar el tejido por un tren, de alcoholes: etanol 96%, etanol absoluto (2 veces por tejido), etanol - xilol 1:1, xilol (2 veces por tejido) y parafina líquida (2 veces por tejido); esto se llevó a cabo en periodos de 45 minutos para cada solución en agitación (Figura 13), con lo cual logramos que las soluciones penetraran en el tejido y así eliminar el agua alcanzando la deshidratación deseada (Técnicas Histológicas).

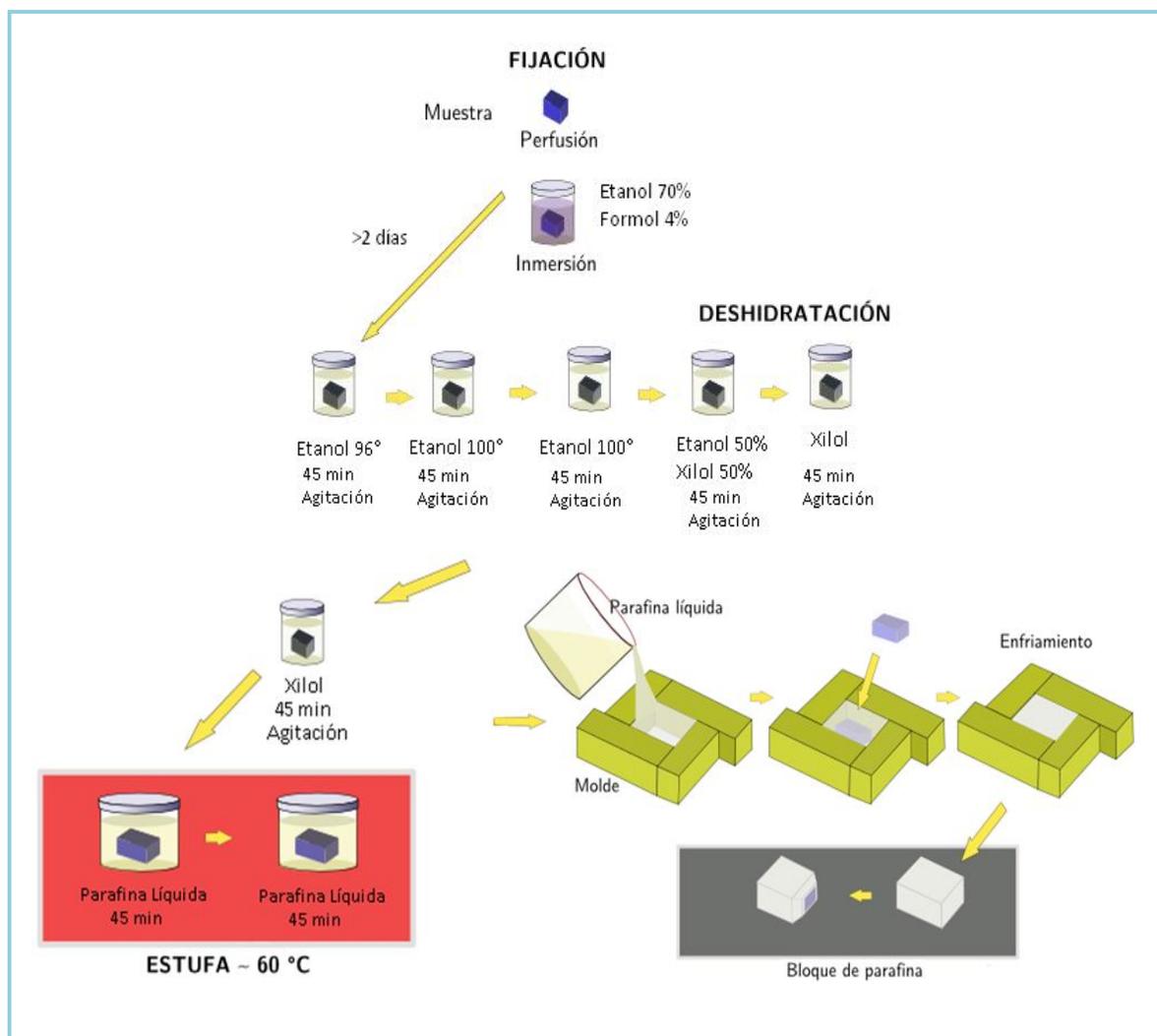


Figura 13. Esquema del proceso de deshidratación de una muestra de tejido para su inclusión en parafina.

8.5 CORTES HISTOLÓGICOS

Una vez que el tejido ha sido incluido en parafina, se prosiguió hacer los cortes histológicos para realizar la tinción respectiva. Los cortes histológicos se hicieron con un Micrótopo LEICA RM2125, con rotación de accionamiento manual; los cortes para la tinción son de un grosor de 4 μm .

La técnica que se siguió para este tipo de corte consiste: enfriar los bloques de parafina 30 minutos antes de ser cortados (para esto el micrótopo tiene que estar completamente limpio, en especial la navaja), colocar el bloque en el micrótopo, ajustarlo y orientarlo de tal modo que el corte a realizar sea parejo, ya habiendo hecho las consideraciones anteriores, proseguimos a cortar el bloque hasta obtener tiras de tejido, estas tiras se manipularon con pinceles y antes de su fijación definitiva en la superficie de un portaobjetos, se estiraron para que el tejido quede perfectamente extendido. Aprovechando la hidrofobicidad de la parafina se extendieron las secciones inicialmente en el portaobjetos con etanol, luego se colocaron sobre agua caliente a unos 35°C a 40°C y el calor las hace extenderse sin llegar a su punto de fusión (Figura 14), que está en torno a los 60°C; se recogieron las tiras de tejido con el portaobjetos (este punto es de suma importancia ya que dependerá del tejido sirva o no para su revisión por el patólogo, el tejido debe estar completamente extendido, sin dobleces ni faltantes) y finalmente se dejó secar una noche para continuar con la tinción de H&E.

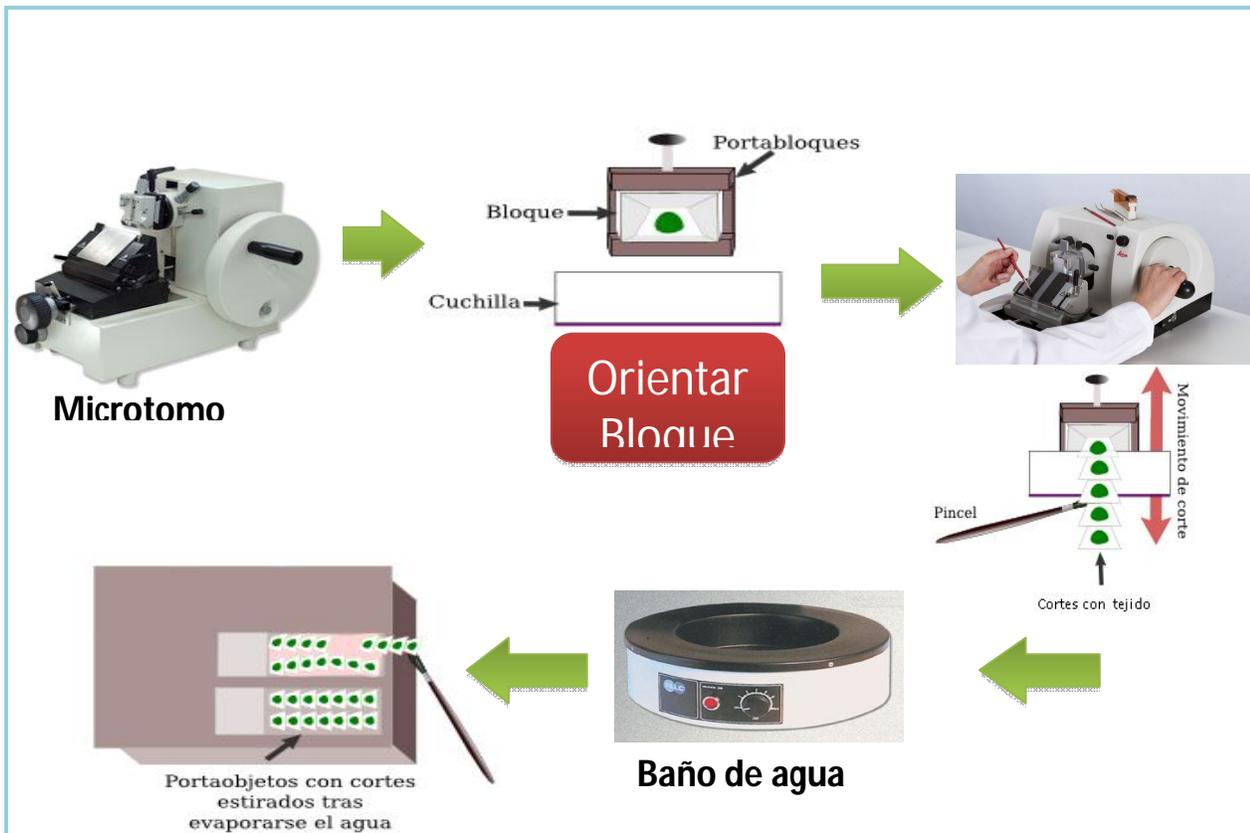


Figura 14. Proceso generalizado para obtener cortes histológico de tejidos incluidos en parafina.

8.6 TINCIÓN CON HEMATOXILINA Y EOSINA (H&E)

Con las secciones de tejidos adheridas al portaobjetos el paso que se siguió fue la tinción histológica, la cual consistió en la aplicación de la tinción de hematoxilina, que por ser catiónica o básica, tiñe estructuras ácidas en tonos Azul y Púrpura y eosina que tiñe componentes básicos, en tonos de color rosa, gracias a su naturaleza aniónica o ácida.

El proceso para realizar la tinción hematoxilina-eosina consistió en una serie de pasos que van desde el desparafinado, hidratación, tinción, deshidratación y montado.

El desparafinado permitió eliminar el medio de inclusión, la parafina del tejido; esto se realizó de forma inversa a la deshidratación (que se mencionó en la inclusión del tejido en parafina). La rehidratación es necesaria puesto que los colorantes utilizados son hidrosolubles. La deshidratación final es necesaria porque el medio de montaje no suele ser hidrosoluble. Tras el montado y secado (evaporación del xilol), las secciones se observaron en el microscopio óptico (figura 15).

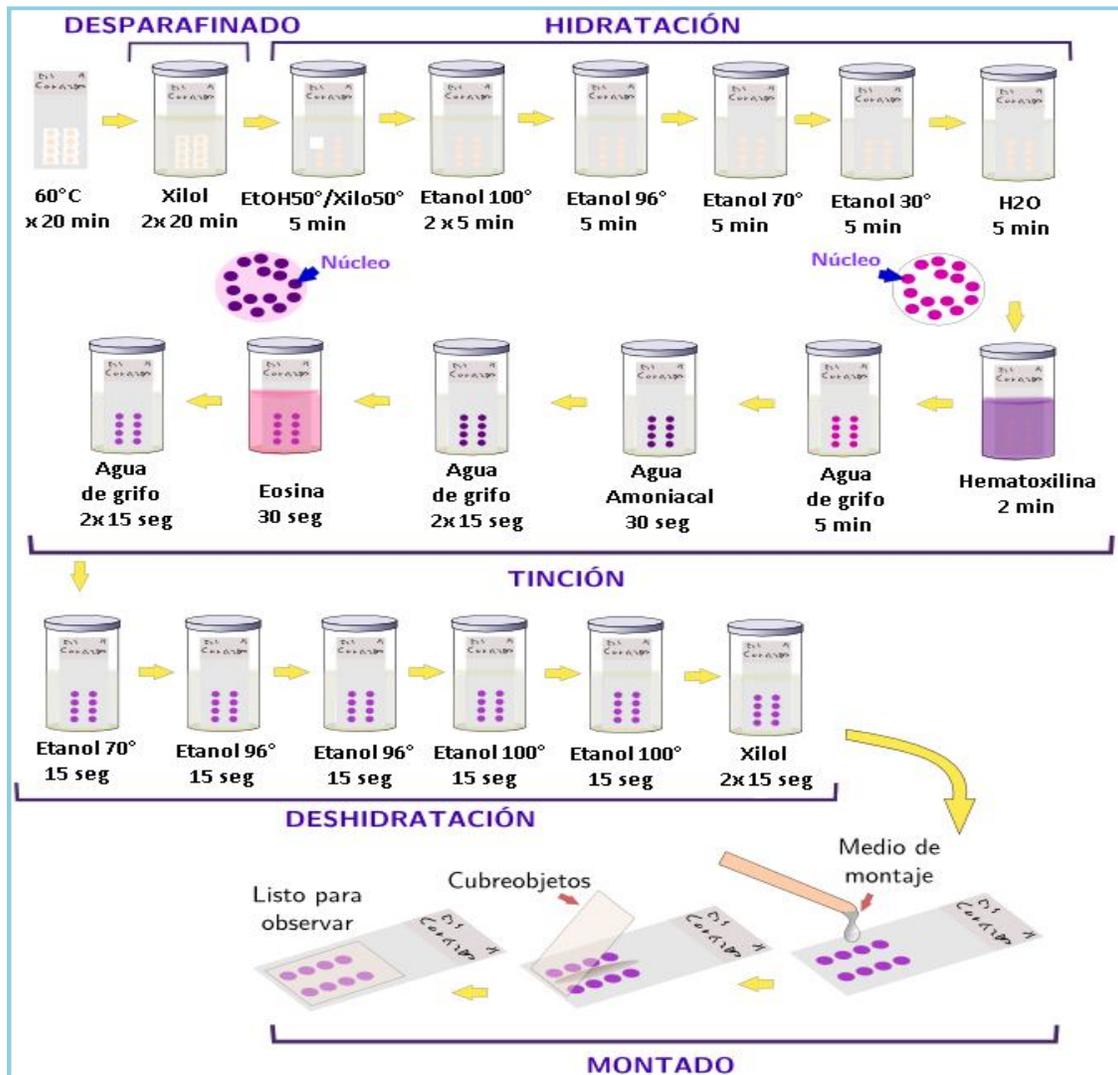


Figura 15. Proceso de tinción con hematoxilina & eosina

8.7 EVALUACIÓN HISTOPATOLÓGICA DEL TEJIDO

Cada una de las lamillas obtenidas se revisó detalladamente con ayuda de un patólogo para corroborar el tipo de lesión que se reportaba y así hacer la clasificación adecuada del tejido dentro del Banco.

8.8 CONSTRUCCION DE MICROARREGLOS DE TEJIDOS (MAT)

El microarreglo de tejido (o micromatriz tisular) se construyo adquiriendo muestras cilíndricas de cientos de tumores o zonas de interés a partir de los bloques de parafina (figura 16). Todos los cilindros así obtenidos se incorporaron en un bloque de parafina receptor que puede contener hasta 500 muestras en un solo portaobjetos. Una vez agregados todos los tejidos de interés, se sellan con parafina en la superficie, posteriormente se hacen los cortes del bloque del microarreglo a 4 μm de grosor, para poder continuar con la inmunohistoquímica.

Cabe mencionar que antes de empezar a hacer el microarreglo debe hacerse un boceto de como quedaría el orden de los tejidos, los cuales son cérvix sin alteraciones y cáncer invasor como muestras problemas.

También se recolectaron otros tejidos como: placenta para tener un control positivo a PSG 9, así mismo riñón, hígado y colon como controles negativo a PSG 9, estos tejidos no fueron incluidos en el microarreglo de tejidos.



Figura 16. Resumen del proceso que se siguió para hacer un microarreglo de tejidos

8.9 REACCION DE INMOHISTOQUIMICA

Las laminillas obtenidas de los cortes del microarreglo de tejidos y tejidos controles se utilizaron para realizar las reacciones de inmunohistoquímica, para hacer las reacciones se utilizó el *kit* de inmunodetección Ratón/Conejo con el sistema de Biotina-Estreptavidina-Peroxidasa (Mouse/Rabbit HRP/DAB, Bio SB).

Se desparafinaron las laminillas a 60°C durante 30 min, se incubaron en xilol absoluto por 20 min, posteriormente se rehidrataron los tejidos con alcoholes graduales (100, 96, 70, 30 %) por 5 minutos en cada uno y por último se colocaron en H₂O destilada. Una vez hidratados los tejidos, se colocaron en una solución de (Trilogy 1X, Cell Marque) para la exposición de antígenos, previamente calentada a 90°C y se mantuvieron a esa temperatura durante 20 min, terminado este tiempo se hicieron 2 lavados con PBS 1X, y se colocaron en cámaras húmedas.

Después se les colocó el bloqueador de peroxidasa endógena (ImmunoDetector Peroxidase Protein Blocker), durante 15 minutos a temperatura ambiente (TA). Al término se lavaron 3 veces con PBS 1X, después incubaron las laminillas con el anticuerpo primario (PSG9 ab 64425, dilución 1:250), en cámaras húmedas se dejó toda la noche a -4°C, cabe mencionar que a los tejidos controles se hicieron 2 laminillas por cada una, la

primer laminilla con anticuerpo, y la segunda sin anticuerpo, para poder estar seguros del resultado, sin falsos positivos.

Al terminar el tiempo de incubación con el anticuerpo primario se lavaron las laminillas 3 veces en PBS 1X, (las laminillas sin anticuerpo se lavaron por separado para evitar una contaminación y evitar un falso positivo), posteriormente se colocó el anticuerpo secundario conjugado con Biotina (ImmunoDetector Biotin Link) durante 15 minutos a TA. Se realizaron 2 lavados con PBS 1X al término del tiempo y se les colocó Estreptavidina conjugada con peroxidasa para amplificar la señal de la reacción (ImmunoDetector HRP Label) también durante 15 minutos.

Al finalizar el tiempo de incubación se lavaron los tejidos con PBS 1X y se realizó el revelado de la reacción utilizando Diamino Bencidina (ImmunoDetector DAB Chromogen/ImmunoDetector DAB Buffer), durante 10 segundos, se tiñó con Hematoxilina de Harris y se viró la reacción con agua amoniacal. Se deshidrataron los tejidos con alcoholes graduales (30, 70, 96 y 100 %) un minuto por cada uno, posteriormente colocándolos en xilol absoluto, por último, se montaron las laminillas con resina para poder ser observadas al microscopio.

9. ANALISIS INMUNOHISTOQUIMICO

El análisis de los MAT se realizó por microscopia confocal (Olympus Microscope) a un objetivo de 40X, las muestras fueron calificadas por cuatro observadores, y fueron analizadas por el HSCORE, el cual se obtuvo mediante la multiplicación de la intensidad de la reacción por el porcentaje de células teñidas (tabla 1). La intensidad de la reacción se calificó en una escala de 4 puntos: 0, negativo; 1, débilmente positivo; 2, moderadamente positivo; 3, fuertemente positivo. También se realizó la evaluación para determinar el porcentaje de células que presentaba cada reacción (0-100%). Con los datos obtenidos de cada evaluador se obtuvo la moda para obtener un solo valor para cada muestra, se utilizó la escala citada por (Simon, 2010).

Tabla 1. Escala de intensidades utilizadas para el análisis de las muestras problema.

Example of IHC scoring in cancer samples based on the staining intensity (0 = no staining, 3+ = strongest intensity) and the fraction of stained tumor cells	
Score	Definition
Negative	Intensity 0
Weak positivity	Intensity 1 in $\leq 70\%$ of tumor cells or Intensity 2 in $\leq 30\%$ of tumor cells
Moderate positivity	Intensity 1 in $> 70\%$ of tumor cells or Intensity 2 in $> 30\%$ but $\leq 70\%$ of tumor cells or Intensity 3 in $\leq 30\%$ of tumor cells
Strong positivity	Intensity 2 in $> 70\%$ of tumor cells Intensity 3 in $> 30\%$ of tumor cells

10. RESULTADOS

DESCRIPCION DE LÍNEAS CELULARES ANALIZADAS

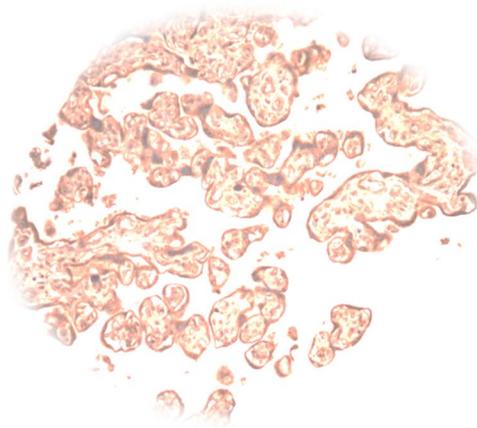
Todas las líneas cultivadas son derivadas del epitelio cervical a excepción de la línea HaCaT la cual es derivada de queratinocitos, la mayoría de las líneas celulares son positivas a VPH 16 o VPH 18 (Tabla 2), algunas de las líneas celulares negativas a VPH.

Tabla 2. Características de líneas celulares cultivadas con DEMEN suplementado con 10 % de SFB.

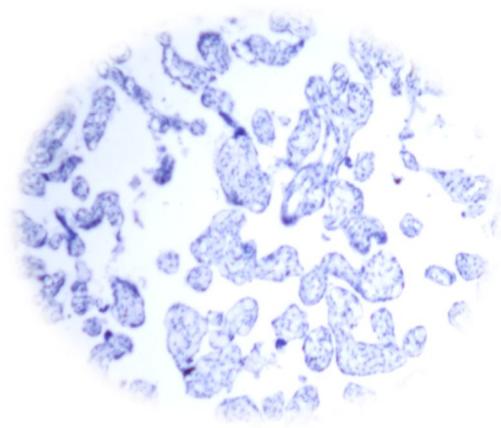
Línea celular	VPH 16	VPH 18	VPH -	Enfermedad
CaLo		✓		<i>Carcinoma epidermoide</i>
INBL		✓		<i>Adenocarcinoma</i>
HeLa		✓		<i>Adenocarcinoma</i>
CaSki	✓			<i>Carcinoma epidermoide</i>
SiHa	✓			<i>Adenocarcinoma</i>
ViPa		✓		<i>Adenocarcinoma</i>
Rova		✓		<i>Carcinoma Epidermoide</i>
C-41		✓		<i>Carcinoma</i>
MS751		✓		<i>Carcinoma epidermoide</i>
HaCaT			✓	<i>Queratinocitos de prepucio</i>
Vibo			✓	<i>Adenocarcinoma</i>
C33-A			✓	<i>Adenocarcinoma</i>

REACCION INMUNOCITOQUIMICA DE MUESTRAS CONTROL

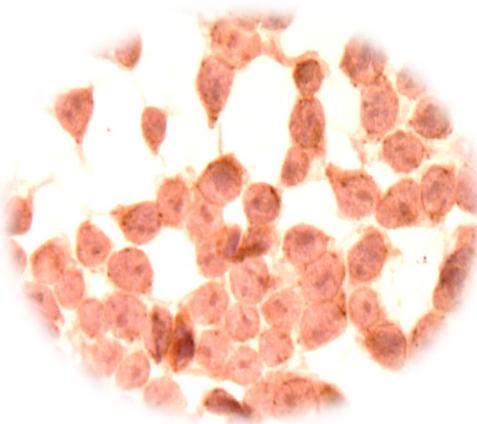
Debido a que PSG9 es sintetizada solo en placenta, también se colectó una muestra de ella para poder utilizarla como un control positivo (Figura 17), la placenta fue de término, es decir que se tomó de un parto. Por otro lado se tomó a la línea celular Hek293T como un control negativo a la reacción de PSG 9, esta línea celular es derivada de células renales embrionarias humanas.



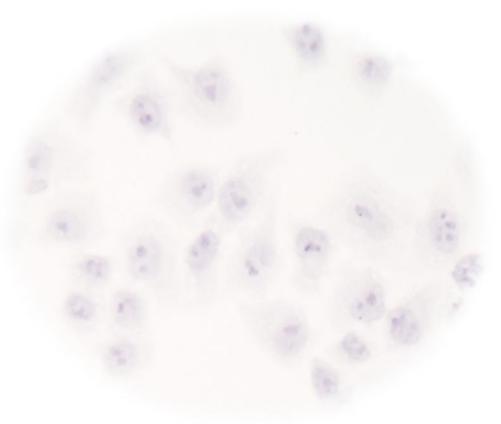
Placenta como control positivo



Placenta sin anti-PSG9



Hek293T como control negativo



Hek293T sin anti-PSG9

Figura 17. Controles de reacción de PSG9 por inmunocitoquímica. Para ambos controles se hicieron 2 laminillas, la primera con anticuerpo anti-PSG9 y la segunda sin agregar anticuerpo, y observamos que ambas muestras con anticuerpo fueron positivas a PSG9 (amplificación original 40X).

Como se puede observar en la figura anterior, en la muestra de placenta hay una reacción positiva a PSG9 como la literatura nos menciona (Figura 18), por otro lado en Hek293T, también hubo una reacción positiva, lo cual nos hace referencia a que PSG 9 no es específicamente sintetizada por placenta.

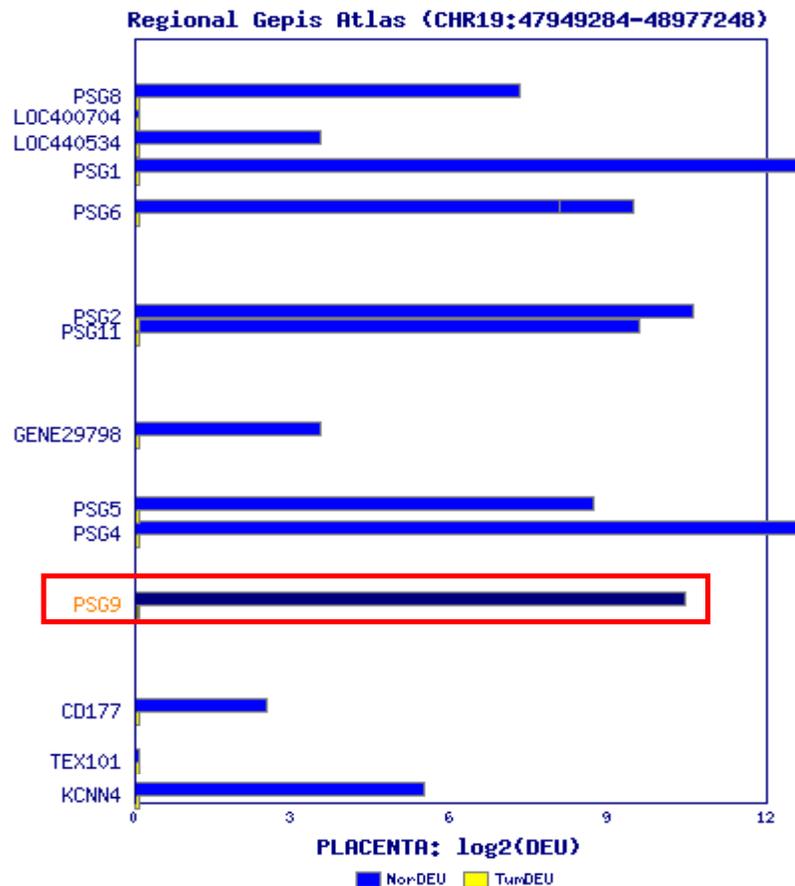


Figura 18. En esta imagen se observa la expresión de las PSG en placenta donde muestra que PSG9 es una de las más expresadas durante el embarazo (tomado de Genome Browser).

Por otro lado, encontramos que todas las líneas celulares de cáncer Cervicouterino fueron negativas a la reacción de PSG9 (Figura 19,20 y 21).

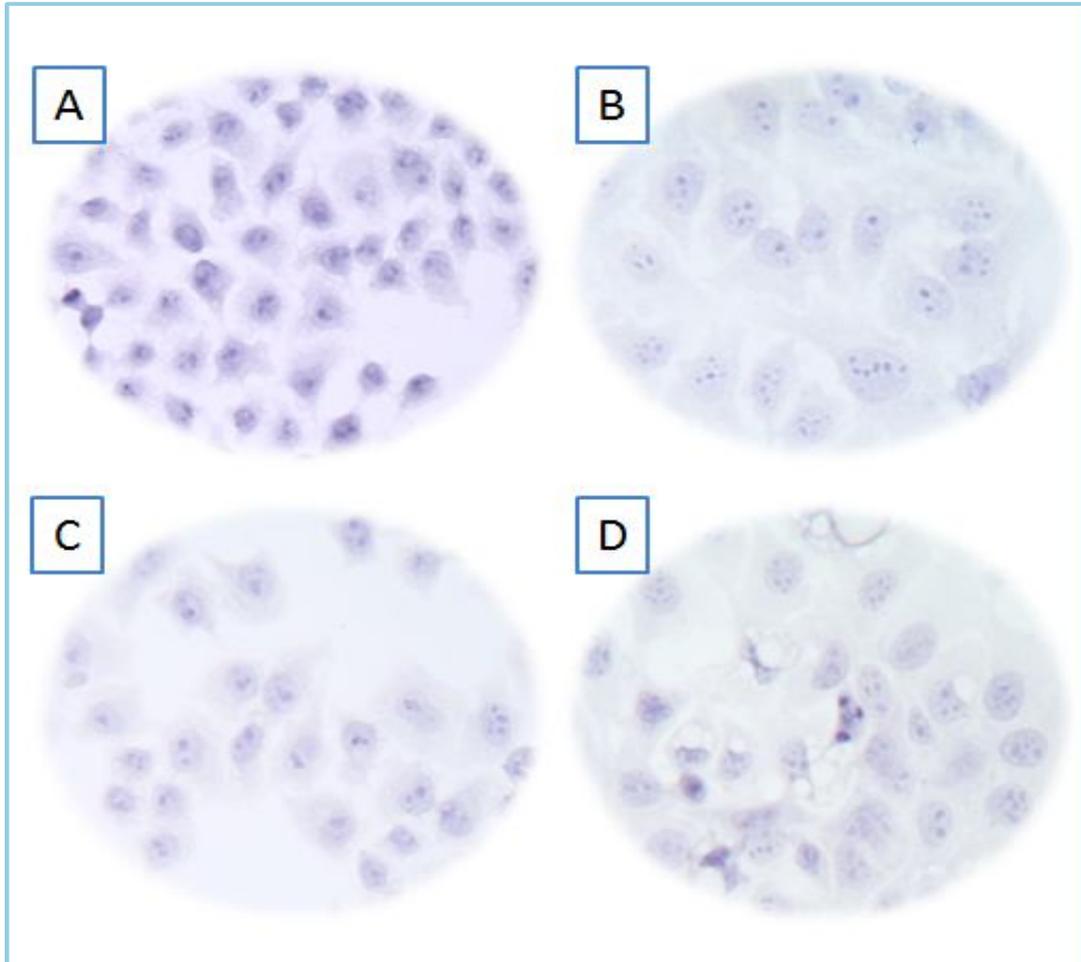


Figura 19. Inmunodetección de PSG9 en líneas celulares derivadas de cáncer cervico uterino. Observamos la fotografía a 40X de 4 líneas celulares de cérvix en la letra A: HeLa; B: CaLo; C: Rova y Por ultimo D: ViPa, todas con una tinción azulada, lo que nos indica que no hay reacción positiva a PSG 9.

Todas las líneas celulares fueron cultivadas en las mismas condiciones, se esperaba encontrar la expresión de PSG9 en estas líneas, sin embargo, no fue así, como se sabe toda línea celular va cambiando en cada resiembra, es decir

hay una inestabilidad de la línea celular lo que podría llevarla a mutaciones y falta de diferenciación.

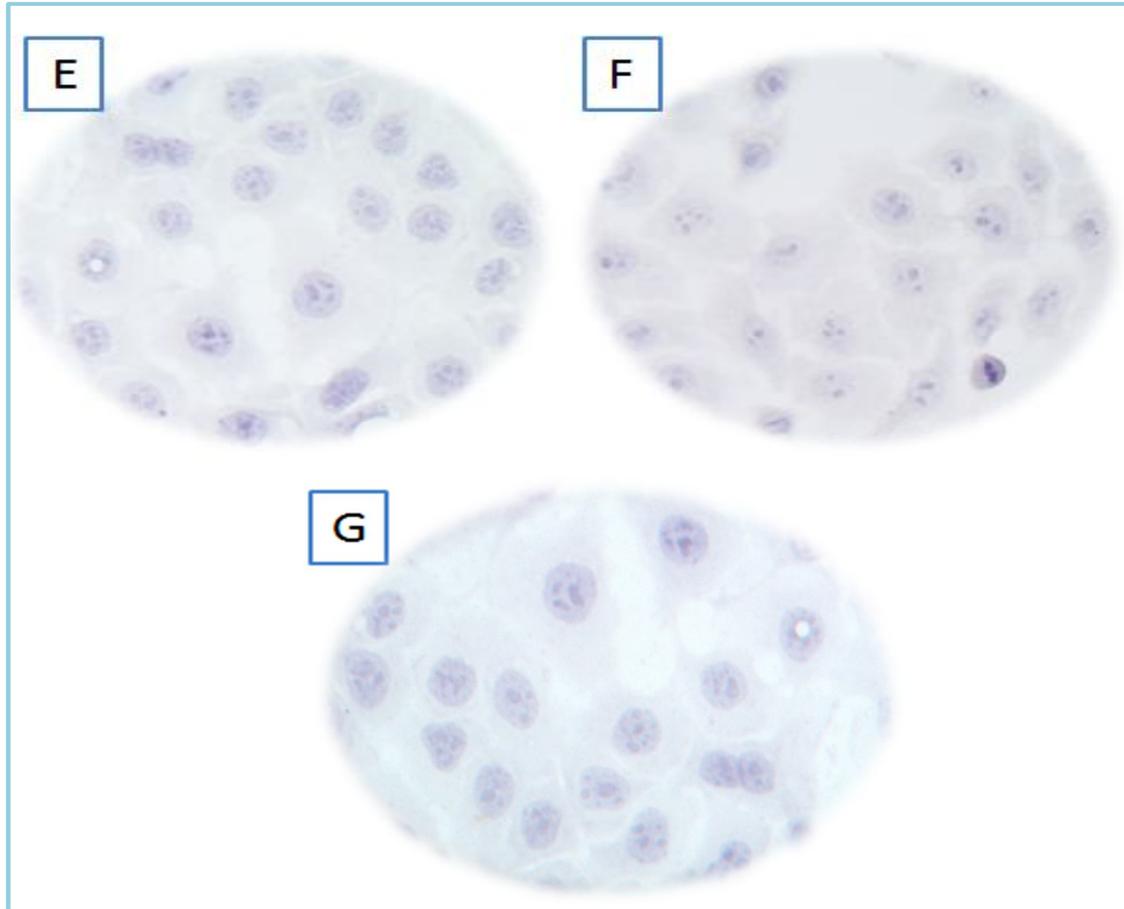


Figura 20. Continuación de figura 19. Fotografías a 40X de las siguientes líneas celulares; E: C-41, F: MS751, G: INBL, también se observa una tinción negativa a PSG9.

Como se observa en las diferentes imágenes las 13 líneas celulares derivadas del CaCu están totalmente teñidas de azul, lo que nos indica la negatividad de reacción, en ninguna de ellas no hubo alguna diferencia.

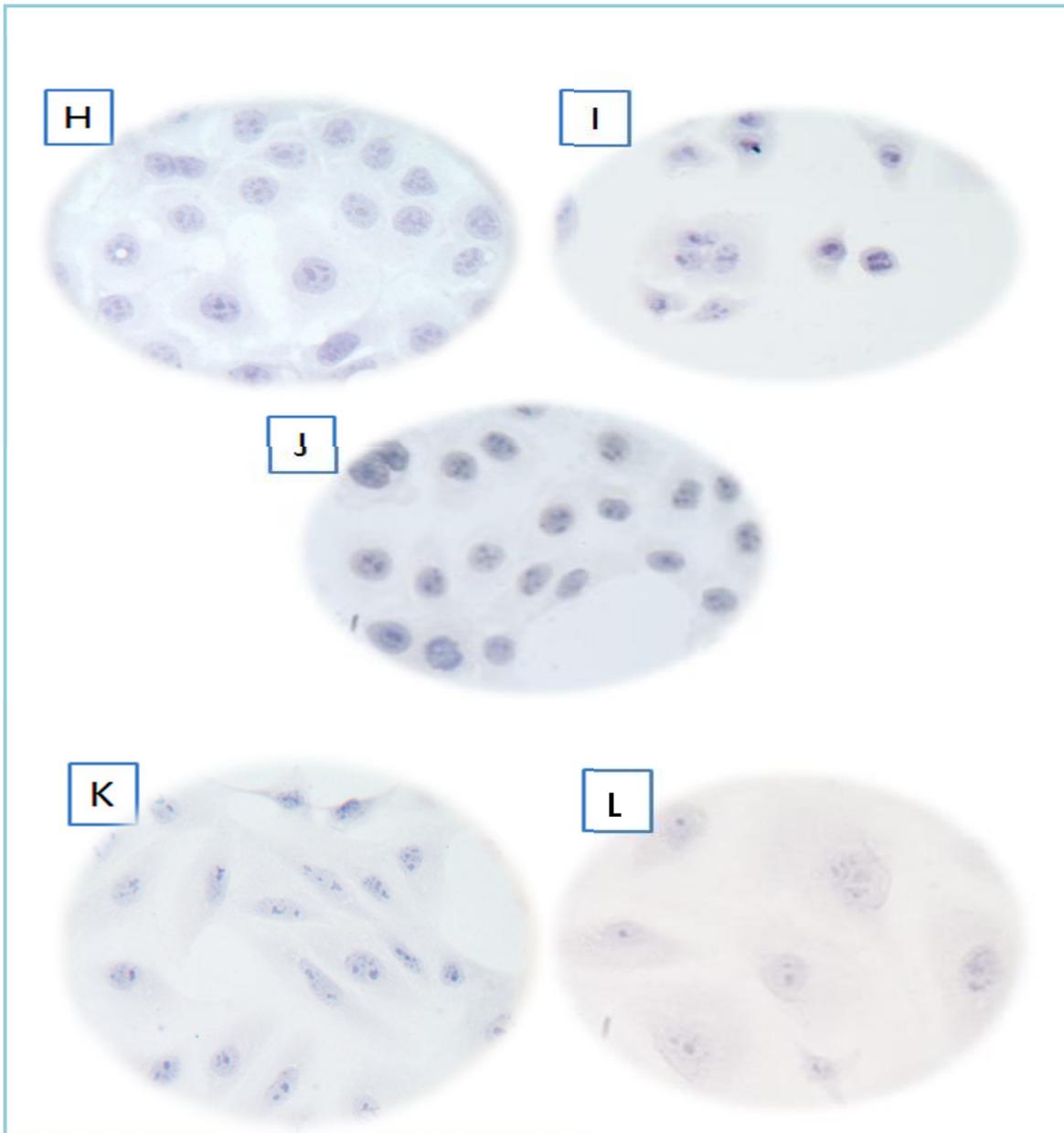


Figura 21. Continuación de la figura 19 y 20, fotografías a 40X. Observamos en la letra K: SiHa, J: CaSki, ambas positivas a VPH 16, también observamos a líneas celulares que son negativas a VPH, las cuales son las siguientes, H: Vibo, I: C 33, L: HaCaT, todos ellas negativas a la expresión de PSG9.

Debido a estos resultados el proyecto da un pequeño giro para determinar la participación de PSG9 en CaCu y se comienza la colecta de tejidos con cáncer y tejido sin lesiones del cérvix.

TEJIDOS

Se obtuvieron 21 biopsias de cáncer Cervicouterino invasor y 18 biopsias de cérvix sin alteraciones, se hizo un microarreglo con los tejidos con cáncer, y otro con tejido de cérvix sin lesiones (Figura 22).

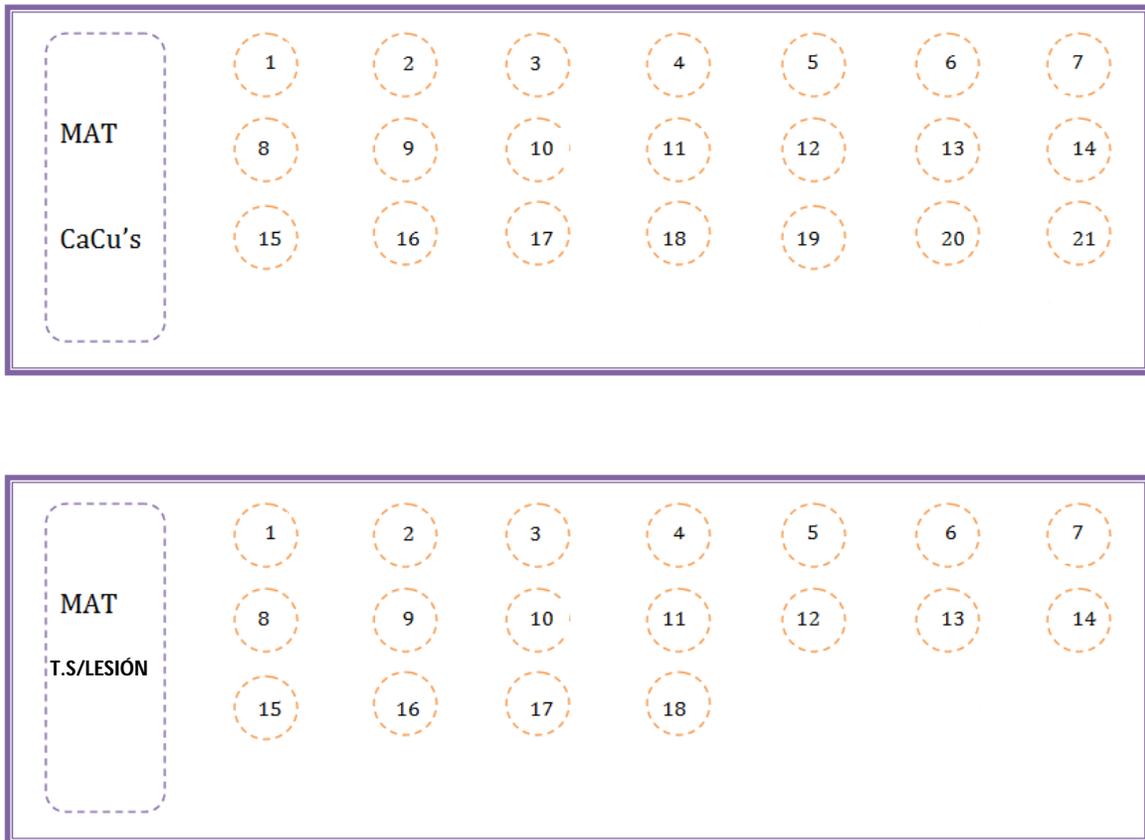


Figura 22. Boceto de muestras: Arriba, Diseño del microarreglo de tejidos (CaCu) con 28 muestras; debajo diseño de las muestras de cérvix sin lesión.

Todos los tejidos fueron revisados por un patólogo para corroborar el diagnóstico recibido en el momento de la toma de muestras, de las 21 biopsias solo una fue diagnosticada como adenocarcinoma y el resto como carcinoma epidermoide invasor.

DETECCIÓN DE PSG9 EN TEJIDOS DE CaCu

La evaluación de la expresión de la Glicoproteína PSG9, se realizó mediante la técnica de inmunohistoquímica sobre los cortes de los arreglos de tejidos. La técnica se hizo de acuerdo al protocolo de tinción de *DAKO Envision*. La intensidad de la reacción de Biotina/Estreptavidona amplificada (BSA), fue evaluada por cuatro observadores independientes, para determinar los casos positivos y negativos a la expresión de PSG9. Los resultados obtenidos para las muestras tumorales se describen a continuación (Figura 25).

En el control positivo (placenta) observamos una clara tinción en las vellosidades coriónicas y el sincitiotrofoblasto, y como controles negativos se analizaron tejidos de riñón e hígado, sin embargo, en riñón vemos claramente una fuerte tinción en los túbulos y en el caso de tejido de hígado se observa una intensa tinción de localización citoplasmática en las células hepáticas (Figura 23), la reacción que se observa es citoplasmática en las células.

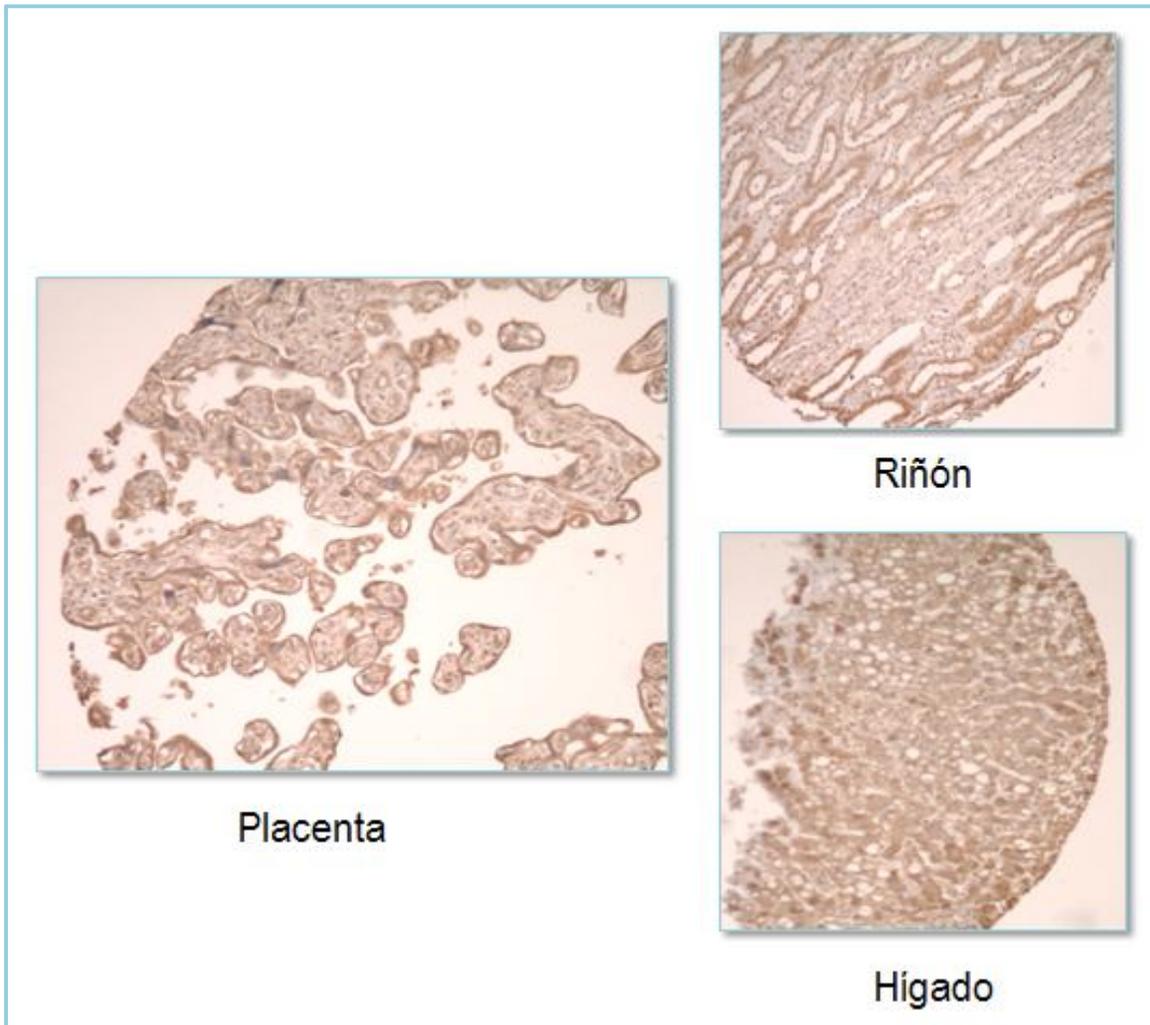


Figura 23. Detección de PSG9 en tejidos de placenta, riñón e hígado. Los diferentes tejidos fueron positivos a PSG9, en riñón se buscó corroborar resultados con la línea celular Hek293T, sin embargo se esperaba encontrar una reacción negativa en hígado, ya que aún no ha sido reportada la expresión de PSG9 en otros tejidos, fotografías a 10X.

Con el resultado positivo en tejido de riñón se corrobora el dato obtenido en la línea celular Hek293T .

La reacción positiva a PSG9 en otros tejidos que serían utilizados como controles negativos fue un resultado inesperado, por lo que este resultado nos indica que PSG9 no es exclusivamente específica de placenta.

Por otro lado, en el trabajo de Sima 2005, cita que tejido de colon sin alteraciones es negativo a la reacción de PSG9, por ello se tomó a colon como un control negativo a nuestra reacción (Figura 24).

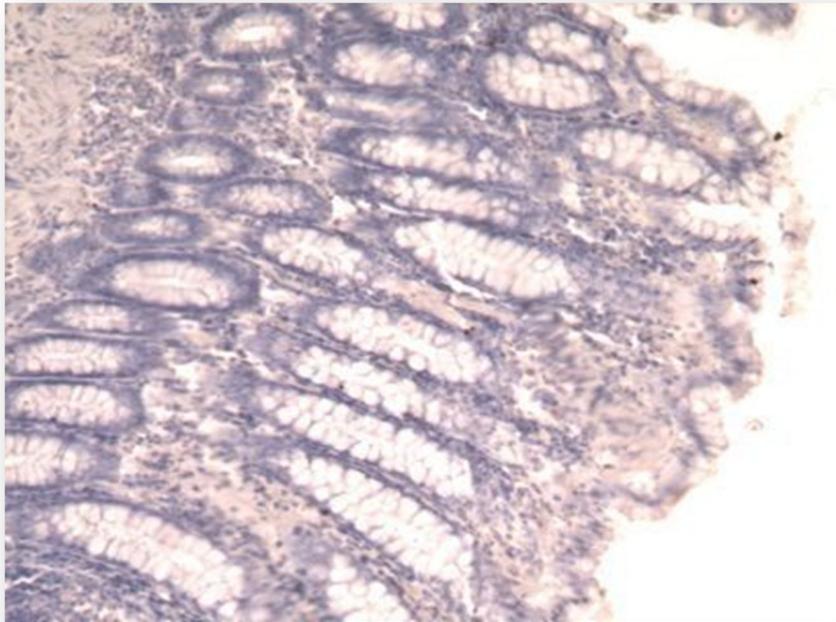
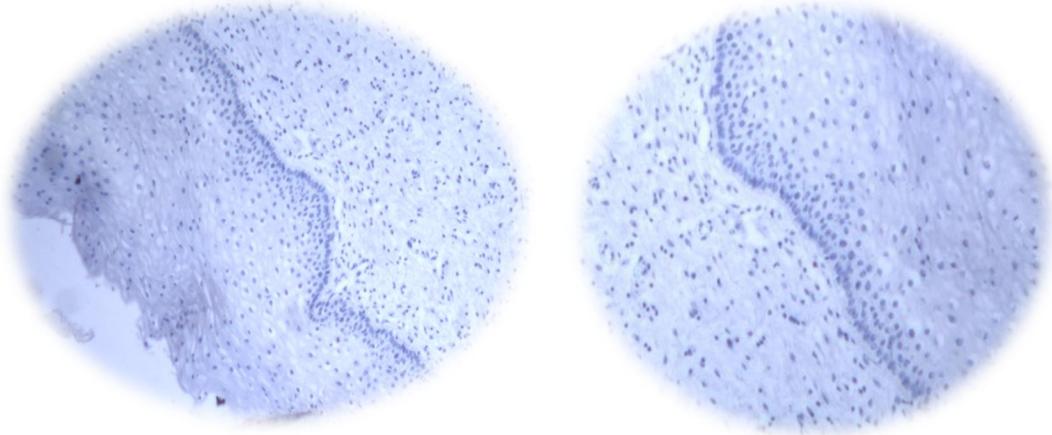


Figura 24. Tejido de colon negativo a PSG9 ya que se observa claramente una coloración azul, foto a 10x, esto concuerda con el trabajo de Sima 2005.

En cuanto al tejido de cérvix sin alteraciones observamos a las células sin alguna deformación en su estructura y de un tamaño similar entre células, de las 18 muestras, 5 de estas son de pacientes nulíparas y las 13 restantes de pacientes con gestas, se hace esta distinción debido a nuestro resultado, en 5 muestras se observó un tono azul, lo que nos indica una reacción negativa para PSG9, las cuales coincidieron con las pacientes nulíparas, mientras que las demás muestras presentan una reacción positiva, lo que nos pudiera decir que al ser activado el gen de PSG9 durante el embarazo, la expresión del gen

queda activa aun cuando el embarazo llega a su término, lo que haría que el tejido sea más sensible ante cualquier patógeno, o en dado caso la reacción positiva nos indicaría que comienza un proceso neoplásico.(Figura 25).

Cérvix sin lesion de pacientes nulíparas



Cérvix sin lesion de pacientes con gestas

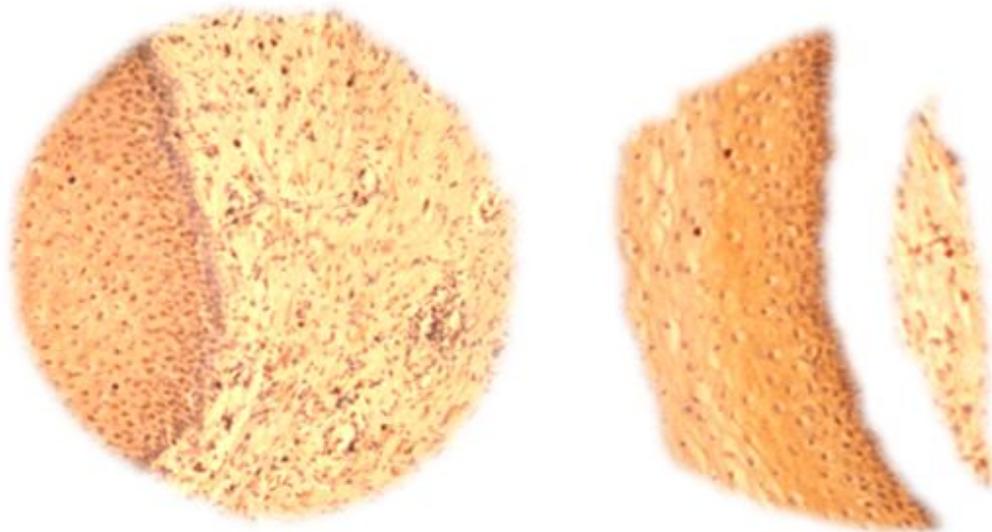


Figura 25. Tejidos de cérvix sin alteraciones a 10X, negativos a PSG 9 en color azul, por otro lado la reacción positiva a PSG 9 en color café.

En las muestras con CaCu observamos la reacción positiva en el citoplasma de las células, y en algunos casos una reacción nuclear, en la siguiente imagen (Figura 26), se muestra dos fotografías a diferentes lentes (10X y 40x) de 4 muestras representativas, en ellas se distingue que las células son amorfas con núcleos grandes.

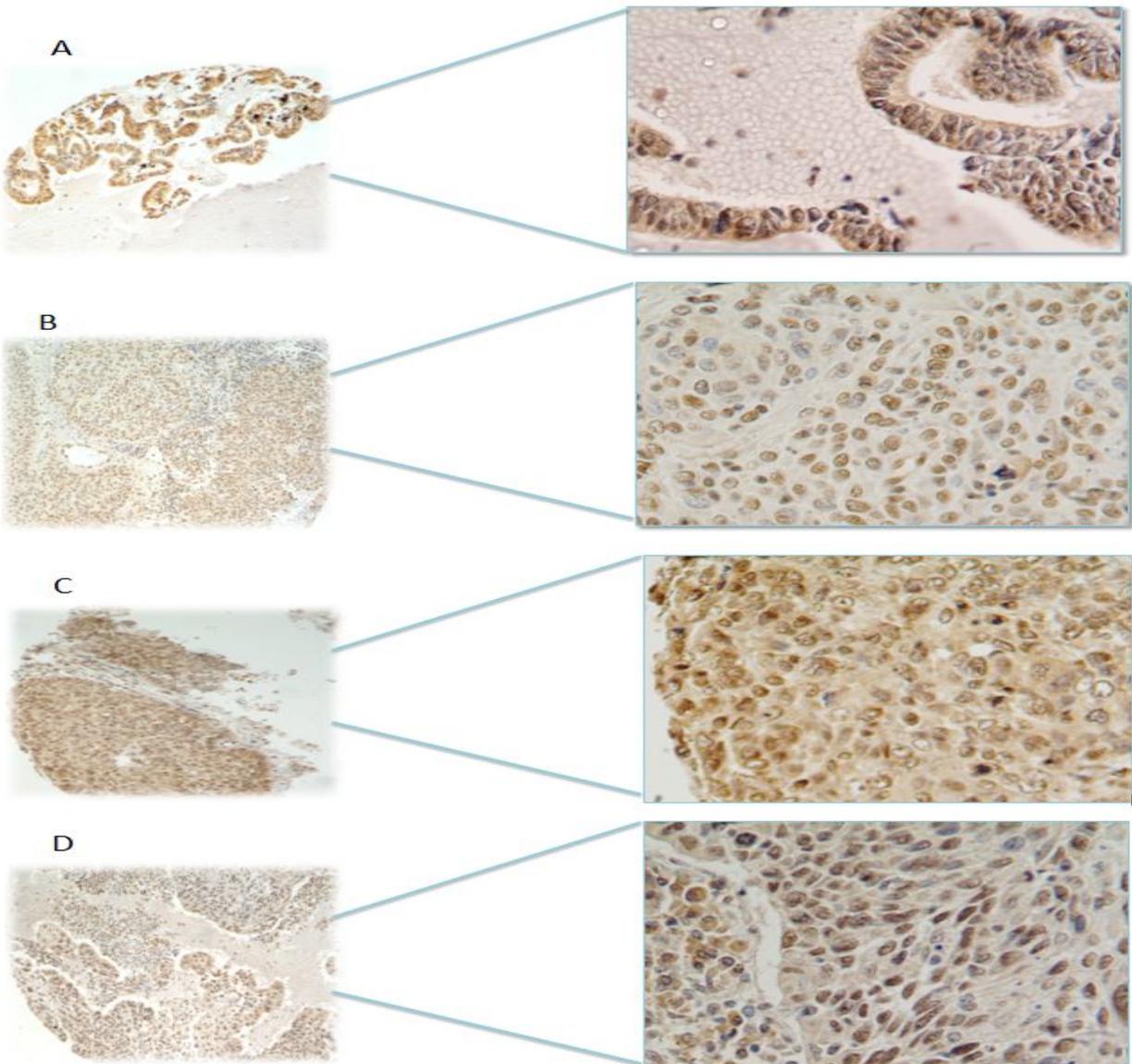


Figura 26. Reacción inmunohistoquímica de muestras de cáncer Cervicouterino a 10x y 40x, con color marrón en las células lo que nos indica una reacción positiva a PSG 9.

CORRELACIÓN DE LA INTENSIDAD DE REACCIÓN CON DATOS CLÍNICOS

La asociación de la intensidad de reacción del gen PSG9, con datos clínicos de los pacientes se realizó mediante un análisis de χ^2 , comparando la intensidad de reacción con los diferentes parámetros clínicos (Tabla 3); edad, número de embarazos y infección por VPH.

Tabla 3. Descripción de datos clínico patológicos de las muestras analizadas.

Datos clínicos		N	Porcentaje
Total de casos		39	100
Edad:			
< = 45	28		71.80
> 45	11		28.20
Número de embarazos:			
< = 2	13		33.33
> 2	26		66.66
VPH:			
+	16		41.02
-	23		58.97

Observamos que al menos 28 de las pacientes presentaron edades por debajo de los 45 años (71.80%) y 11 de ellos por encima de los 45 (28.20%), por otro lado tenemos que 13 de las pacientes tenían menos de 2 gestas (33.33%) y 26 de ellas con más de 2 gestas (66.66%), con respecto a la infección por VPH, cerca del 60% resultó negativa a VPH.

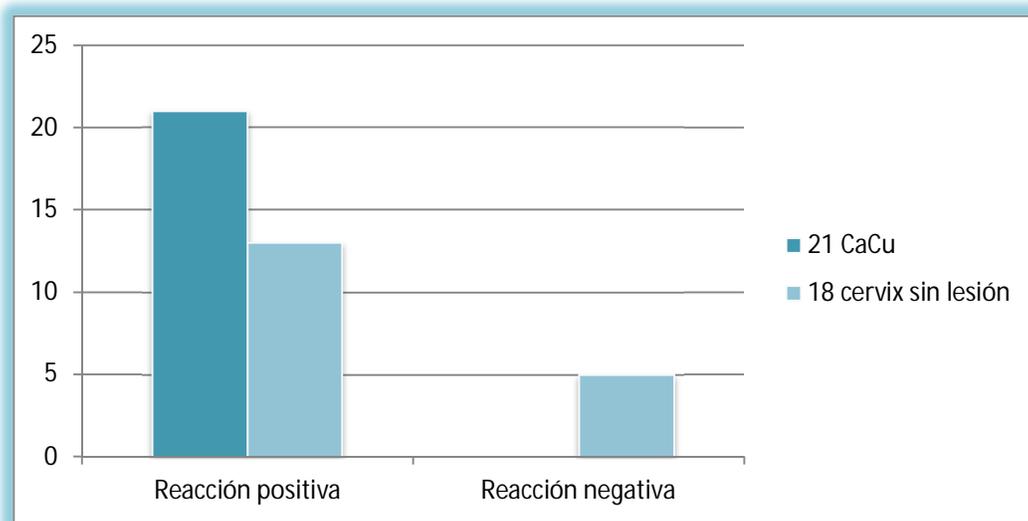


Figura 25 Se observa que 21 muestras de CaCu (100%) presentaron una reacción positiva a PSG9, de la misma manera en el 78% de muestras de cérvix sin lesión son positivas a PSG9, sin embargo 5 muestras de cérvix sin lesión presentaron una reacción negativa a PSG9.

Los resultados del análisis de χ^2 muestran que la intensidad de reacción del gen PSG9 mostró asociación estadística con los datos clínicos, obteniendo en ambos datos clínicos el valor $P = <0,05$ (tabla 4).

Tabla 4. Correlación entre la intensidad de reacción y las variables clínicas en cáncer cérvicouterino

Variable clínico	Valor P
Edad: < = 45 > 45	0.018
Número de embarazos: < = 2 > 2	0.000
VPH: + -	0.001

11. ANALISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los mecanismos genéticos involucrados en el desarrollo de CaCu resultan ser un factor altamente relacionado en este proceso; los desequilibrios cromosómicos, como la amplificación génica juegan un papel importante en el desarrollo de diversos tumores sólidos incluyendo el CaCu (Muñoz, 2003).

El cáncer Cervicouterino esta siendo muy estudiado y las glicoproteínas específicas del embarazo, se relacionan a PSG1 y PSG9 con procesos neoplásicos como son: cáncer de mama y cáncer de colon respectivamente, siendo el cérvix parte del sistema reproductor de la mujer aún no se han reportado ni estudiado la glicoproteína específica del embarazo 9 en células de cáncer cérvix.

Los resultados obtenidos muestran que la expresión de PSG9 no es exclusiva de placenta, dado que tejidos de riñón, hígado (tejidos de mujer) y la línea celular HEK293T también expresan PSG9, estos datos sugieren que la expresión ectópica de PSG9 tiene un papel importante aún fuera de un embarazo.

Por otro lado todas las líneas celulares de cérvix no presentaron la expresión de PSG9; sin embargo, en tejidos de cáncer Cervicouterino si presentan la expresión del gen. Esto pudiera sugerir que en el cultivo de células no existe un factor que active la expresión de PSG9; dado que en CaCu hay expresión debe de haber un factor aportado por las células del tejido conjuntivo que

permite una probable transactivación (o efecto del tipo paracrino); debido a la falta de una estimulación del sistema inmune ya no es necesario su expresión tal como sucede en el tumor.

Uno de los aspectos mas revelantes de este trabajo fue encontrar que un cérvix sin lesión de una mujer nulípara no expresan el gen PSG9; sin embargo, un cérvix con gestas expresa PSG9 , lo que nos indica que el gen se activa durante el embarazo y su expresión no se abate con el término de éste. Dado este resultado, se realizó la correlación de Pearson para determinar la relación de los datos clínicos con la expresión de la proteína. La obtención de los datos clínicos y su asociación con el desarrollo de la neoplasia, resulta ser de gran importancia para conocer qué factores son los que están participando en el desarrollo del cáncer.

La infección por el Virus del papiloma humano es ampliamente reconocida como el principal factor de riesgo para el desarrollo de esta neoplasia, generando alteraciones celulares que pueden llevar al desarrollo del cáncer; sin embargo, siendo PSG9 una proteína de embarazo el número de gestas y la edad son factores importantes para el desarrollo de cáncer Cervicouterino.

El principal factor clínico es la multiparidad, donde observamos que más del 60% han tenido más de dos embarazos, también se observó que un 72% son pacientes menores de 45 años, lo que nos pudiera decir que es debido a la actividad sexual a temprana edad (otro factor); sin embargo VPH es un factor secundario para la expresión de PSG9.

12.CONCLUSIONES

Las líneas celulares derivadas de Cáncer cervicouterino no presenta la expresión de PSG9.

La expresión de PSG9 en tejidos de Cáncer cervicouterino podría ser considerado como un posible marcador tumorigénico en el cérvix uterino, dado que en un cérvix sin lesión sin infección su expresión es nula.

PERSPECTIVAS

Demostrar el probable papel de PSG9 como marcador, es necesario incrementar el número de muestras, así como demostrar altos niveles séricos en CaCu.

13. BIBLIOGRAFIA

Arends M J, Buckley C H, Wells M. 1998. Etiology, pathogenesis and pathology of cervical neoplásicas. *J Clin Pathol*, 51:96–103.

Arreola H. 2008. Determinacion de desbalances cromosomicos usando microarreglos de hibridacion genomica comparativa en lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado del cervix uterino. *Fac. Medicina, UNAM*.

Bohn H. 1971. Detection and characterization of pregnancy proteins in the human placental and their quantitative immunochemical determination in sera from pregnant women. *Gynek*, 210:440.

Boyle P, Levan B. 2008. "World cáncer report 2008" International Agency for Research on Cancer, Scientific Publications.

Brinton LA, Reeves WC, Brenes MM. 1989. Parity as a risk factor for cervical cancer. *Am J Epidemiology*, 130:486–496.

Brummendorf T, Rathjen F G. 1994. Cell adhesion molecules: Immunoglobulin superfamily. *Prot. Prof. Rew.* 1(9):951-1058.

Castellsagué X. 2002. Enviromental co-factor in HPV carcinogenesis. *Virus Research*, 89:191-199.

Camolotto S, Racca A, Rena V, Nores L. 2010. Expression and Transcriptional fregalation of individual Pregnancy specific Glycoprotein Genes in Differentiation trophoblast Cell. Elsevier; *Placenta* 31: 313-319.

Cruz L. 2004. Mecanismos moleculares de los cofactores asociados con el cáncer de cuello uterino, *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología* 30; 0-3.

Darwiche N, Celli G, Sly L, Lancillotti F, De Luca LM. 1993. Retinoid status controls the appearance of reserve cells and keratin expression in mouse cervical epithelium. *Cancer Res*, 53: 2287–2299.

Dragnev K H, Rigas J R , Dmitrovsky E. 2000. The retinoids and cancer prevention mechanisms. *Oncologist*. 5:361-368.

Doorbar Jhon. 2006 .Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science* 110: 525–541.

Hanahan D, Weinberg Robert A. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation, *Revista Cell*,144(5):646-74.

Jastreboff AM, Cymet T. 2002. Role of the human papillomavirus in the development of cervical intraepithelial neoplasia and malignancy. *Postgrad Med J* 2002; 225-8.

Good Deborah J, Peter J, Farzan R, Michelle M, Beaus LE, Richard S, Lemons, WA. 1990. A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin (neovascularization/human chromosome 15/adhesive glycoproteins). *Medical Sciences*, Vol. 87: 6624-6628.

Genome Browser. <http://main.genome-browser.bx.psu.edu/cgi-bin/hgGateway>

Globocan 2008/ Cancer cervicouterino

Organización Mundial de la salud. 2005. Acción mundial contra el cáncer Versión rev. ISBN 92 4 359314 5 (OMS)

Gutiérrez. 2009. Molecular Diagnosis of Human Papillomavirus in the Development of Cervical Cancer, *Salud Pública de México*, 51: S479-S488.

Herceg and Hainaut P . 2007. Genetic and epigenetic alterations as biomarkers for cancer detection, diagnosis and prognosis. *Molecular Oncology*, 1: 26-41.

Hidalgo A, Baudis M, Petersen I, Arreola H, Piña P, Vázquez Ortiz G, Hernández D, González J L, Lazos M, López R, Pérez C, García J, Vázquez K, Alatorre B y Salcedo M. 2005. Microarray comparative genomic hybridization detection of chromosomal imbalances in uterine cervix carcinoma. *BMC Cancer*, 5:77-81.

Ismail A, Fahmy E. 1992. Pregnancy-specific beta 1-glycoprotein (SP) and its relation to fetal birth weigh at term pregnancy. *Obstet. Gynecol, Reprod. Biol* :13-17.

Jensen AB, Lancaster WD.1990. Papillomavirus and human cancer. Boca Raton: CRC Press.

Juarez y Marian. 2010. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-selection worldwide study. *Lancelot oncol*, 11:1048-56.

Juliet V, Spencer. 2007. Cervical Cancer deadly diseases and epidemics, InfoBase Publishing: 128.

Lie K J, Sartwell A D, Pan C J, Chou J Y. 1992. Cloning and expression of genes encoding human pregnancy-specific glycoproteins. *J. Biol. Chem*: 16371-16378.

León Grettell y Faxes M E. 2004. Cáncer de cuello uterino: aspectos inmunológicos y genéticos de mayor relevancia. *Rev Cubana Med* 2004.

Leyva M, Byrd T, Tarwater P .2006. Attitudes towards cervical cancer screening: A study of beliefs among women in Mexico. *Californian J Health Promot*, 4:13-24.

Leslie K K, Watanabe S, Lei K L, Chou D Y, Plouzek C A, Deng H C, Torres J, Chou J Y.1990. Linkage of two human pregnancy-specific beta 1-glycoprotein genes: one is associated whit hyaditiform mole. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 87(15):5822-5826.

Lin T M, Galbert S P, Kiefer D, Spellacy W N, Gall S. 1974. Characterization of tour human pregnancy-associated plasma protein. *Am. J. Obstet. Gynecol*: 223-236.

Loeb LA, Bielas JH, Beckman RA .2008. Cancers exhibit a mutator phenotype: clinical implications. *Cancer Res*,68:3551-3557.

López-Saavedra y Lizano-Soberon. 2006. Cáncer cervicouterino y el Virus del Papiloma Humano: La historia que no termina. *Cancerología* 1: 31-55.

McCrary D., C., Matchar D., B., Bastian L, et al. (1999): Evaluation of Cervical Cytology. Rockville, Md: Agency for Health Care Policy and Research; Evidence Report/Technology Assessment 5. AHCPR publication 99-E010.

Motran C C, Díaz F L, Gruppi A, Slavin D, Chatton B, Bocco J L. 2002. Human pregnancy specific glycoprotein 1 (PSG 1) induce alternative activation in human and mouse monocytes and suppresses the accessory cell-dependent T cell proliferation. *J. Leukoc. Biol*: 512-521.

Monteiro S, Biswas M A, AL-Awqatidw P, Greening J A, McKinney and A. M. Neville. 1982. Serum levels of human placental lactogenic and pregnancy-specific f1-glycoprotein in breast cancer. *J. Cancer*.

Moscicki A B, Hills N, Shiboski S, Powell K, Jay N, Hanson E. 2001. Risks for incident human papillomavirus infection and low-grade squamous intraepithelial lesion development in young females. *Med. Assoc*, 285: 2995-3002.

Muñoz N, Bosch F X, De Sanjose S, Herrero R. 2003. Epidemiological classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *Journal Med*, 348: 518– 527.

Puhvel S M, Sakamoto M. 1984. Cellular retinoic acid-binding proteins in human epidermis and sebaceous follicles. *J Invest Dermatol*,82: 79–84.

Sherman G, Holtan M D, Creedon D J, Haluska P, Markovic S. 2009. Cancer and pregnancy: Parallels in Growth, Invasion, and Immune Modulation and Implications for Cancer Therapeutic Agents. *Mayo Clin Proc*,84(11):985-1000.

Snyder SK, Wessner DH, Wessells JL, Waterhouse RM, Wahl LM, Zimmermann W, Dveksler GS. 2001. Pregnancy-specific glycoproteins function as immunomodulators by inducing secretion of IL-10, IL-6 and TGF-beta1 by human monocytes. *J Reprod Immunol*,45:205-216.

Sorensen S, Andersen J .1984. Pregnancy-specific β I glycoprotein (SP1) in serum and tissue from patients with benign and malignant breast tumour. *Br. J. Cancer*: 663-667.

Sima S, Goncalves J, Chetty R, Gallinger S, Woodgett J R. 2005. Differential gene expression profile reveals deregulation of pregnancy specific -1 glycoprotein 9 early during colorectal carcinogenesis.*BMC Cancer* 2005:66-69.

Simon R, Mirlacher M, Sauter G. 2005. Immunohistochemical Analysis of Tissue Microarrays. Chapter 12.

Tatarinov I, Tagirova A K, Pugachev K K, Shimbireva I B, Teren'ev A A. 1992. Cellular localization of human secretory beta globin in normal and tumor tissue. *Eksp. Biol. Med*:79-82.

The PRN notebook. <http://main.genome-browser.bx.psu.edu/cgi-bin/hgGateway>.

Testa S. 1990. Chromosome translocations in human cancer. *Cell Growth Diff* 1: 97-101.

Tirado Gómez L, Betancourt M, López Cervantes A, García Carrancá M, Franco Marina A, Borges F. 2005. Factores de riesgo de cáncer cervicouterino invasor en mujeres mexicanas. *Salud Pública de México*, 47(5):342-350.

Torres Lobatón A, Bustamante JI, Torres Rojo A, Oliva JC, Morales MA, Román E.2013. Cáncer cervicouterino. Perfil epidemiológico en 1,217 pacientes. *Seguro Popular. Ginecol Obstet Mex* 2013,81:71-76.

Tynan K, Olsen A, Trask B, Jong P, Wolfgang T, Zimmermann J, Carrano A, Mohrenweiser H. 1992. Assembly and analysis of cosmid contigs in the CEA-gene family region of human chromosome 19. *Nucleic Acids Res*, 20(7):1629-1639

Villiers E M. 2003. Relationship between steroid hormone contraceptives and HPV, cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma. *International Journal of Cancer*, 103: 705–708.

Vinuselvi P, Abirami R, Vani V, Sanjay P. Ying Yang effect of IL10 in the incidence of cervical cancer. *Advanced Biotech* 2008; 8:26-28.

Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Pathol J*:12-19.

Wright C, 2003, Cervical squamous and glandular intraepithelial neoplastic identification and current management approaches. Department of obstetrics and gynecology the University of Western Ontario, Canada.

Zhou Y, Ficher S J, Janatpuor M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M, Damsky C H. 1997. Human cytotrophoblast adopt a vascular phenotype as the differentiate. A strategy for successful endovascular invasion. *J. Clin. Invest*, 99(9):2139-2151.

Zur Hausen. 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *May*,2(5):342-50.