



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**ANÁLISIS PROTEÓMICO DE SUEROS DE MUJERES INFECTADAS CON EL
VPH16 Ó VPH18 E IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES DE
MALIGNIDAD PARA LA DETECCIÓN TEMPRANA DE CÁNCER CÉRVICO
UTERINO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

NORMA ANGÉLICA GALICIA CANALES

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Julieta Ivone Castro Romero
Facultad de Medicina, UNAM**

**COMITÉ TUTORAL: Dr. Mauricio Salcedo Vargas
Facultad de Medicina, UNAM.
Dr. Alejandro García Carranca
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.**

**TUTOR INVITADO: Dr. Vicente Madrid Marina
Facultad de Medicina, UNAM.**

MÉXICO, D.F., MARZO, 2014.



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.



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 03 de junio de 2013, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **GALICIA CANALES NORMA ANGÉLICA** con número de cuenta 92050619 con la tesis titulada **"ANÁLISIS PROTÉOMICO DE SUEROS DE MUJERES INFECTADAS CON EL VPH16 Ó VPH18 E IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES DE MALIGNIDAD PARA LA DETECCIÓN TEMPRANA DEL CÁNCER CÉRVICO UTERINO"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. JULIETA IVONE CASTRO ROMERO**:

Presidente: DR. GONZALO CASTILLO ROJAS
Vocal: DR. SERGIO MANUEL ENCARNACIÓN GUEVARA
Secretario: DR. ALEJANDRO GARCÍA CARRANCA
Suplente: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
Suplente: DR. MAURICIO SALCEDO VARGAS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 13 de febrero de 2014

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por mi formación académica, por su interés y apoyo para concluir este grado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Julieta Ivone Castro Romero, por su asesoría y por transmitirme sus valiosos conocimientos, con gran estimación y agradecimiento.

Agradezco a los miembros del Comité tutorial el Dr. Mauricio Salcedo Vargas, al Dr. Alejandro García Carranca y al tutor invitado Dr. Vicente Madrid Marina por sus comentarios, recomendaciones y conocimientos brindados durante este proceso de aprendizaje.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda y apoyo contribuyeron a la realización de la presente Tesis Doctoral, tanto en el laboratorio como fuera de él.

Mi agradecimiento a Ivone Castro por su paciencia, dedicación constante en la dirección de esta Tesis, al Dr. Vicente Madrid por mostrar siempre un gran interés por desarrollar este proyecto, por colaborar y realizar la tipificación viral VPH de las pacientes con N1C 3. Así como al Instituto Nacional de Salud Pública por el uso de sus instalaciones.

Nada de lo que se describe en este Tesis Doctoral hubiera sido posible sin el excelente trabajo de muchas personas entre las que quiero destacar al Dr. Guillermo Mendoza (†) por su colaboración y ayuda en todo lo relacionado a espectrometría de masas (ESI/TOF-TOF) e identificación de las proteínas. Al Dr. Jorge Salmerón por confiar en este proyecto y por mostrar siempre un gran interés en el desarrollo de proyectos relacionados con la detección oportuna de cáncer cervical, al Dr. Alfredo Manzanares (ginecólogo) por su experiencia clínica y la obtención de la toma de muestras biológicas de las pacientes y en especial a todas las pacientes del Hospital General regional-IMSS del Estado de Morelos y a las mujeres del Programa de Detección de VPH que participaron en este estudio. Muchas Gracias!!!.

Mi agradecimiento a los Dres. Concepción Gil y Juan Pablo Albar por su apoyo y confianza, por permitirme hacer una estancia en su laboratorio, fue un impulso clave para la tesis, por incluirme como integrante más de su equipo de trabajo, sus enseñanzas

siempre han contribuido a mejorar mi trabajo y han permitido ampliar mis conocimientos científicos. Por permitirme conocer al Dr. Carlos Otín, a la Biólogos Silvia Juárez y Sergio Córdia (espectrometría y bioinformáticos), quienes compartieron sus conocimientos, además de enseñarme que la ciencia es un arte por hacer....

Al Jurado para el examen de grado: Dra. Marcela Lizano, al Dr. Gonzalo Castillo. Al Dr. Sergio Encarnación, al Dr. Mauricio Salcedo y al Dr. Alejandro García Carranca, por la revisión, comentarios y sugerencias de esta tesis.

Y ahora al final, porque son lo más importante, agradezco la ayuda que he recibido de mis Padres y Hermanas, a pesar de no entender muy bien qué es esto de la ciencia y de la Investigación?, siempre me mostraron su atención, me apoyaron en mis decisiones, siempre serán un gran incentivo para ir más allá. GRACIAS!!!!.

*Lo que sabemos es una gota de agua,
lo que ignoramos es el océano.*

Isaac Newton, 1642-1727.

INDICE

<i>INDÍCE</i>	<i>vi</i>
<i>Lista de Figuras y Tablas</i>	<i>viii</i>
<i>Resumen</i>	<i>ix</i>
<i>Abstract</i>	<i>xi</i>
<i>Abreviaturas</i>	<i>xiii</i>
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Epidemiología del Cáncer Cervical	1
1.2 El Virus del papiloma humano y el desarrollo de Cáncer Cervical	2
1.3 Biología molecular del virus del papiloma humano	4
1.4 Genotipos del VPH	5
1.5 Infección del virus del papiloma humano en Lesiones Uterinas	6
1.6 Historia natural del Cáncer Cervical	8
1.7 Clasificación de lesiones de cérvix	10
1.8 Expresión de genes en el desarrollo del Cáncer Cervical	11
1.9 Biomarcadores de Cáncer Cervical	12
1.9.1 Marcadores en suero	13
1.9.2 Marcadores Indicadores de la infección de VPH	13
1.9.3 Marcadores Genéticos	15
1.10 Proteómica	15
1.11 Métodos usados en proteómica	17
2. ANTECEDENTES	18
2.1 La Complejidad del proteoma de plasma y suero humano	18
2.2.1 Análisis del proteoma en líneas celulares	21
2.2.1.1 Células HeLa	21
2.2.1.2 Proteoma de células HaCaT transfectadas con el gen E5 del VPH	16.
2.2.1.3 Líneas celulares transfectadas con el oncogen E6 del VPH	22
2.2.1.4 Células HaCaT transfectadas con el oncogen E7 del VPH	22
2.2.2. Identificación de proteínas diferenciales en tejido uterino	23
2.2.2.1 El Cérvix (biopsias)	23
2.2.2.2 Citología Cervical	26
2.2.3 Identificación de proteínas diferenciales en fluidos biológicos	26
2.2.3.1 Fluído cérvico vaginal	26
2.2.3.2 Orina	27
2.2.3.3 Plasma	28
2.2.3.4 Suero	29
3. OBJETIVO GENERAL	30
3.1 Objetivos específicos	30
4. HIPÓTESIS	30
5. JUSTIFICACIÓN	31
6. METODOLOGÍA	32
6.1 Consentimiento informado	32
6.2 Población de estudio	32
6.2.1 Criterios de inclusión	33
6.2.1.1 Grupo control	33

6.2.1.2 Grupo de casos.....	33
6.2.1.3 Criterios de exclusión.....	33
6.3 Tamaño de la muestra.....	33
6.4 Colección de muestras biológicas.....	33
6.5 Prueba para el VPH-AR.....	34
6.6 Tipificación del VPH en mujeres con NIC 3.....	35
6.6.1 Verificación de la integridad del ADN.....	36
6.6.2 Reacción en cadena de la polimerasa del gen L1 del VPH.....	36
6.7 Estrategia general para el estudio del proteoma.....	37
6.7.1 Procesamiento de la muestra (suero).....	37
6.7.2 Geles de primera dimensión o isoelectroenfoque.....	37
6.7.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE o segunda dimensión	
.....	38
6.7.4. Análisis de geles 2-DE SDS-PAGE.....	38
6.7.5 Identificación de proteínas por Espectrometría de Masas ESI/TOF-MS	
.....	39
6.7.5.1 Corte y destinción de “spots ó manchas”	39
6.7.5.2 Digestión de proteínas con tripsina.....	40
6.7.5.3 Análisis por Espectrometría de Masas (ESI/TOF-MS).....	40
6.8 Validación por ensayos de Western blot.....	41
7. RESULTADOS.....	43
7.1. Características de la muestra.....	43
7.2. Tipificación del VPH en el grupo de mujeres de casos (NIC 3).....	43
7.3 Análisis de los geles 2 DE.....	46
7.4 Validación de C3 y A1BG por ensayos de Western Blot.....	52
8. DISCUSIÓN.....	56
9. CONCLUSIONES.....	64
10. LITERATURA CITADA.....	66
11. APÉNDICE.....	82
APÉNDICE I.....	82
APÉNDICE II.....	83

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

	Págs.
Figura 1. Organización del Genóma del VPH-16.....	5
Figura 2. Infección del VPH en las lesiones uterinas.....	8
Figura 3. Historia Natural del Cáncer Cervical.....	9
Figura 4. Expresión de las proteínas virales (VPH).....	11
Figura 5. Rango Dinámico del proteoma de suero/plasma.....	20
Figura 6. Imagen Representativa con muestras amplificadas para el gen a) G3PDH, b) MY09, c) VPH-16 y d) VPH-18.....	44
Figura 7. Mapa de 2-DE-SDS-PAGE de una muestra de suero NIC 3.....	50
Figura 8. Validación mediante Ensayos de Western Blot para el Complemento C3 y A1BG en suero de un grupo de mujeres con Neoplasia Intraepitelial Cervical de grado 3 y un grupo de mujeres sin la enfermedad.....	55
Tabla 1. Cuadro comparativo de Clasificaciones de las lesiones cervicales.....	10
Tabla 2. Características del grupo de mujeres control y el grupo de mujeres de casos que se incluyeron para la realización de los geles de 2 DE.....	45
Tabla 3. <i>Matches</i> analizados en los 15 geles de cada grupo.....	47
Tabla 4. Matcheo de los spots diferenciales que se encuentren presentes en el Grupo de casos y ausentes en el grupo control.....	48
Tabla 5. Listado de Proteínas. Proteínas analizadas por ESI/TOF-TOF e identificadas por MASCOT.....	51
Tabla 6. . Validación mediante Ensayos de Western Blot para el Complemento C3 y A1BG en suero de un grupo de mujeres con Neoplasia Intraepitelial Cervical de grado 3 y un grupo de mujeres sin la enfermedad.....	53

RESUMEN

El Cáncer cervical es la tercera causa más frecuente de muerte en la población femenina a nivel mundial, siendo la principal causa de mortalidad en países en vías de desarrollo. Esta enfermedad está asociada con la infección del virus del papiloma humano (oncogénicos), aunque sólo una pequeña fracción de las mujeres infectadas desarrollan cáncer, lo que sugiere la contribución de otros factores para la evolución de cáncer cervical, a través de una serie bien establecida de lesiones preinvasoras.

Datos epidemiológicos y evidencias citológicas de cáncer cervical muestran el desarrollo de un proceso displásico a cáncer cervical. El sistema Bethesda reporta en citología cervicales dos tipos de lesiones: lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado y lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado. Las Lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado son referidas como moderadas a severas (NIC II-III). Estas lesiones han sido bien documentadas como precursoras del cáncer cervical. De las lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado persistentes, el 40-100% de los casos evolucionan a *carcinoma in situ*, mientras que las lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado pueden desaparecer espontáneamente. El tratamiento común de las lesiones de bajo grado es una citología de PAP y/o biopsia, mientras que para las lesiones de alto grado (NIC 2-3) es la escisión electroquirúrgica por asa ó conización y biopsia, tanto en entornos con muchos recursos como en los menos favorecidos. Por lo tanto, es necesario el descubrimiento de biomarcadores, como una prueba simple, económica y accesible a los países en vías de desarrollo para la detección en estadios premalignos, lo que ayudaría a mejorar la supervivencia de las pacientes. El suero contiene una alta abundancia de proteínas, producidas por las células circulantes de la sangre y proteínas liberadas al torrente sanguíneo por diferentes tejidos. La presencia de estas proteínas en el suero demuestra que este fluido contiene información sobre el estado de diferentes sistemas del organismo. Además es una muestra apropiada, de fácil obtención y no invasiva, lo que convierte en un fluido útil desde el punto de vista clínico y de monitoreo de la presencia de biomarcadores.

En el presente estudio, el objetivo fue identificar las proteínas diferenciales en suero de mujeres con lesiones escamosas intraepiteliales de cérvix (NIC 3) en relación a un grupo de mujeres sin esta patología como grupo control, para identificar posibles biomarcadores para detectar lesiones con mayor probabilidad de transformación cervical. Se tomaron cinco muestras de suero de pacientes con diagnóstico NIC 3 infectadas con el virus del papiloma humano-16 y cinco muestras de sueros de mujeres sin la enfermedad. Para esto, se separaron por electroforesis bidimensional (2 DE SDS-PAGE) y el análisis en ImageMaster Platinum. Los perfiles resultantes se analizaron por espectrometría de masas LC-ESI/TOF-TOF e identificaron por MASCOT para localizar proteínas diferenciales; algunas se seleccionaron para su posterior identificación por espectrometría de masas. Las proteínas identificadas correspondieron al Complemento C3, A1BG, haptoglobinas y apolipoproteínas. Sólo dos proteínas el Complemento C3 y A1BG fueron validadas por ensayos de Western Blot en suero de un grupo de 25 mujeres con NIC 3 e infectadas (VPH oncogénicos), y en 30 mujeres sin lesión escamosa intraepitelial de cérvix. El análisis densitométrico de las bandas del ensayo de Western Blot de ambas proteínas fue mayor en todas las muestras de suero de mujeres con lesión escamosa intraepitelial de cérvix (NIC 3) en comparación con el grupo control, es decir su expresión proteínica se encontró incrementada con respecto al grupo de mujeres con epitelio sano.

Este estudio, da a conocer algunas proteínas que podrían ser consideradas a futuro en el diseño de biomarcadores, pero antes sería interesante ampliar el estudio a fin de investigar su expresión en los diferentes estadios del cáncer cervical.

ABSTRACT

Cervical cancer is the third most frequent cause of death from cancer among women in the world and the first in female of developing countries. This disease is strongly associated with infection by oncogenic types of human papillomavirus although only a small fraction of those infected develop cancer, suggesting the contribution of other factors to the progression to cervical cancer through a series of well-established pre-invasive lesions process.

Epidemiology and cytology research evidence of cervical cancer showing that the developing process of cervical cancer from dysplasia is a continuous histological event. The Bethesda System for cervical cytology reporting low-grade squamous intraepithelial lesions and high-grade squamous intraepithelial lesions. HSIL referred to moderate to severe stage cervical intraepithelial neoplasia (CIN 2-3) is the one well-documented precursor to cervical cancer. HSIL persists, with approximately 40-100% cases progressing to carcinoma *in situ*, whereas most cases of LSIL may regress spontaneously. Therefore, HSIL is usually treated with the surgery of loop electrocautery excision procedure or cervical conization and biopsy, whereas LSIL is followed closely by Pap smear and/or biopsy. Therefore, the discovery of biomarkers for simple, inexpensive and widespread testing in developing countries is needed for the early detection treatment of cervical cancer.

Serum is the most accessible and minimally invasive and routine sample in clinical practice, reflecting its communication with all cells, tissues and organs. It is essential to find key protein biomarkers associated serum that can be used to classify lesions with respect to organ of benign, inflammatory *versus* aggressive behavior. This may serve as an early diagnostic tool aiding for disease mechanism elucidation and determination of treatment strategy. Proteomics the study of all the proteins serum has the potential to discover promising candidate molecules for early diagnosis and new target therapies. In addition to determining the protein profile of a serum, it can also search for new molecules related to disease.

In the present study, was to identify serum proteins from women with intraepithelial neoplasia grade III and control healthy women to identify potential biomarkers to detect lesions with greater probability of cervical transformations.

Five serum samples from HPV 16(+) and histopathology diagnosis of CIN 3 women and five control healthy female HPV(-) were used for this study. The proteins separations was performed on 2-DE electrophoresis, stained with colloidal Coomassie blue. Quantitative analysis was performed with the ImageMaster 2 Platinum software. Peptide sequence identification of was done in a LC-ESI/TOF-TOF. The proteins with the highest score in MASCOT (Complement C3, A1BG, Haptoglobins and Apolipoproteins). Only Complement C3 and A1BG were validated by Western Blot and the densitometry analysis of the corresponding bands from both groups were compared in 30 sample sera from control and 25 samples for CIN 3 with HPV(+). The relative density of the bands from both proteins was greater in all of the serum samples from the women with cervical intraepithelial neoplasia CIN 3 compared to the control group.

This study allowed us to identify two proteins, whose expression is elevated in women with CIN 3, which opens the possibility that they could serve as biomarker of CIN 3 lesion, but before will be interesting to expand the study in order to investigate its expression to throughout the different premalignant lesions.

ABREVIATURAS

A	Annexin A2, A5, (Anexina A1, A2, A5).
AAT	Alpha(1)-AntiTrypsin Glycoprotein (glicoproteína a-1-antitripsina).
ABG, A1BG	Alpha-1-B-Glycoprotein (A-1-B-glicoproteína).
ACN	Acetonitrile (Acetonitrilo).
ACSS1	Acyl-CoA Synthetase short-chain family member 1 (Acetil CoA sintetasa de cadena corta).
ACT	Alpha-1-AntichymioTrypsin (alfa-1- quimiotripsina).
ADN	Acido DexosirriboNucleico.
AH	Anticonceptivos Hormonales.
AHS	Alpha-2-HS glycoprotein (alfa-2-HS glicoproteína).
ANG	Angiotens (Angiotensina).
APO CIII	Apolipoproteína CIII.
ARN	Acido RiboNucléico.
ARNm	Acido RiboNucléico mensajero.
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool.
BSA	Bovine Serum Albumin (Albúmina de suero bovino).
C3	Complemento C3.
C4 A/B	Complement component 4B Human Protein (Componente 4B Del complemento).
CC	Cáncer Cervical
CBB	Coomassie Blue Brilliant (Azul de Coomassie Brillante).
CDK5	Cyclin-dependent Kinase 5 (quinasa 5 dependiente de ciclinas).
CHAPS	3-[(3-Colamidopropil)dimetilAmonio]-1- PropanoSulfonato.
CH-II	Captura de Híbridos II.

CIN	Cervical Intraepithelial Neoplasia 1, 2 y 3, (Neoplasia intraepitelial cervical 1, 2 y 3).
CISEI	Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas.
CV	Coefficient of Variation (Coeficiente de Variación).
DNTPs	DeoxyriboNucleotide TriPhosphate (Deoxirribonucleótido trifosfato).
2-DE	Two-Dimensional Electrophoresis (Electroforesis Bidimensional).
2D-PAGE	2 Dimensional-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (Electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida).
DO	Densidad Óptica.
DTT	DiTioTreitol.
E	Early proteín (Proteínas tempranas E1, E2, E4, E5, E6 y E7).
EBV	Virus Epstein Barr.
EDTA	Acido EtilenDiaminoTetraAcético (agente quelante).
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor (receptor del factor de crecimiento epidérmico)
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (Ensayo Inmunoabsorbente ligado a una enzima).
ESI	ElectroSpray Ionization (Ionización mediante electronebulización).
ESI-TOF/TOF-MS	ElectroSpray Ionization Time of Flight/Time of flight (espectrometría de masas por electroespray en Tandem).
FDA	Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos).
FHIT	Fragile Histidine Triad gene (gen de la triada de histidina frágil).
GADPH	GlycerAldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (Gliceraldeído 3-fosfato deshidrogenasa).
GO	Genome Ontology (Ontología de genomas).

HaCaT	Human immortalized keratinocyte HaCaT cells (Línea celular de keratinocitos inmortalizados).
HAP	Haptoglobin beta-chain (cadena-beta-glicoproteína).
HeLa	Human Epithelial Carcinoma Cell Line (Línea celular de cancer cervical).
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía Líquida de alto rendimiento).
HPX	Hemopepsin (Hemopepsina).
HSIL	High grade Squamous Intraepithelial lesion (Lesión intraepitelial escamosa de alto grado).
HSP	Heat Shock Protein (Proteínas de choque térmico, puede ser 27, 60, 70, etc...)
hTERT	the Telomerase Reverse Transcriptase (la telomerasa reversa transcriptasa).
hTR	The humana Telomerase RNA Component (componente de RNA de la telomerasa).
IEF	Isoelectroenfoque.
IL-12Rβ 1	Interleukin 12 Receptor, beta 1 subunit (Receptor de Interleucina 12, subunidad beta 1).
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social.
INSP	Instituto Nacional de Salud Pública.
IPG	Immobilized PH Gradient (Gradiente de pH inmovilizado).
iTRAQ	Isobaric tags for relative and absolute quantification.
kDa	KiloDaltons.
Ki-67	Antigen Ki-67 (pKi-67), (antígeno Ki-67 ó MK167).
KNG	Kininogen light chain (kininógeno de cadena ligera).
L	Late protein (proteínas tardías L1 y L2).
LCM	Laser Capture Microdissection (microdisección por captura de laser).
LC-MS/MS	Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem).

LCR	Región Larga de Control.
LRG	Leucine-rich glycoprotein (Glicoproteína rica en leucina).
LSIL	Low grade Squamous Intraepithelial Lesion (Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado).
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (desorción/ionización mediante láser asistida por matriz).
MALDI-TOF/TOF-MS	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight/Time of flight (espectrometría de masas en Tandem ó de doble tiempo de vuelo).
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight (espectrometría de masas de un solo tiempo de vuelo).
MASCOT	Matrix Science (Motor de búsqueda para la identificación de proteínas).
MHC	Major Histocompatibility Complex, (Complejo principal de histocompatibilidad).
MMP	Matriz Metaloproteinasas (metaloproteasas).
MS/MS	Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry (Espectrometría de masas en tándem).
MS	Mass Spectrometry (Espectrometría de Masas).
MUC	Mucin, cell surface associated or polymorphic epithelial mucin, 1, 5, 6, etc.. (Mucina 1, 5, 6, etc.).
p53	Proteína supresora de tumores.
PAP	Prueba de Papanicolaou.
pb	pares de bases.
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen (El antígeno nuclear de células en proliferación).
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa).
pI	Punto Isoeléctrico.
pRb	The Retinoblastoma Protein (Proteína del retinoblastoma).
PSA	Prostate-Specific-Antigen (Antígeno prostático).
PVDF	Polyvinylidene Fluoride (Fluoruro de polivinilideno).

QTRAP	Quadrupole- linear Trap (espectrômetro de masas híbrido triple cuadropolo trampa de iones lineal).
RKO	<i>Homo sapiens</i> Colón Carcinoma (Línea celular de carcinoma de colón).
S100A9	S100 calcium binding protein A9 (proteína S100 unida a cálcio S100A9).
SCCa	Squamous Cell Cervical Carcinoma (Carcinoma cervical de células escamosas).
SCX	Strong Cation Exchange (Intercambio de fuerza catiónico).
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (dodecilsulfato sódico).
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (Electroforesis en gel de poliacrilamida com dodecilsulfato sódico).
SELDI	Surface Enhanced Laser Desorption Ionization (Superficie de ionización/ desorción inducida por láser).
Spot	spot ó punto a cada una de las manchas que aparece en el gel de poliacrilamida.
SSA	Secretaría de Salud.
TA	Temperatura Ambiente.
TAE	Tris-Acetate-EDTA Buffer (buffer de tris-acetato-EDTA).
TBP	TATA-Binding Protein (proteína de unión a TATA ó factor de transcripción).
TBS	Tris-buffered saline (Buffer de Tris-salino).
TFA	TriFluoroacetic Acid (ácido trifluoacético).
TIMP	Tissue Inhibitor of MetalloProteinases (Inhibidor de metaloproteasas en tejido).
TMB	TetraMetilBenzidina.

TOF/TOF	Time of Flight (Tiempo de vuelo en Tándem).
TRAF-1	Tumor Necrosis Factor Receptor-associated factor 1 (receptor del factor de necrosis tumoral asociado al factor 1).
TRAP	Tartrate-Resistant Acid Phosphatase (Fosfatasa ácida resistente a tartarato).
Tyk2	Tyrosine Kinase 2 (tirosina quinasa 2).
UI	Unidades Internacionales.
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography (Cromatografía Líquida ultra rendimiento).
UR	Unidades Relativas.
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (Factor de crecimiento endotelial-vascular).
VPH	Virus del Papiloma Humano.
VPH-AR	Virus del Papiloma Humano de Alto Riesgo.
WHO	World Health Organization (Organización Mundial de la Salud).
ZAG	Zinc-Alpha-2-Glycoprotein (zinc-2-alfa-Glicoproteína).
ZNF217	Zinc Finger protein 217 (proteína dedos de zinc 217).

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Epidemiología del Cáncer Cervical

El cáncer cervical (CC), es un problema mundial de salud, ocupa el tercer lugar en frecuencia entre los tumores malignos en la población femenina a nivel mundial, después del cáncer de mama (1.38 millones) y el cáncer colorectal (0.57 millones), también se considera el séptimo cáncer a nivel global. Datos epidemiológicos en el 2008 señalan 530,000 casos de cáncer cervical, mientras que la mortalidad debido a esta enfermedad fue de 275 000 y más del 80% de los casos ocurren en países en vías de desarrollo donde la prevención y el control de programas es inefectivo ó inexistente (Arbyn et al., 2011; Weiderpass E y Labréche F, 2012).

El cáncer cérvicouterino es la principal causa de muerte entre las mujeres en Oriente, Africa Occidental y Oriental, América Central, Asia del Sur y Melanesia (Arbyn et al., 2011).

En América Central, una zona geográfica que se caracteriza por países en vías de desarrollo, se disgnóstican anualmente 15,606 nuevos casos de los cuales en nuestro país se presentan 10,186 casos nuevos de cáncer cervical y 5,051 de ellas mueren por esta neoplasia (IARC, 2008).

México no es la excepción y el CC ocupa la segunda causa de muerte por neoplasia en mujeres. México posee una población de 37.45 millones de mujeres mayores de 15 años ó más, que están en riesgo de desarrollar CC Las estimaciones actuales indican que cada año 10,186 mujeres son diagnosticadas con cáncer cervical y 5,061 mujeres mueren por dicha enfermedad (IARC, 2008). Se estima que de seguir constante el crecimiento de la población y asumiendo que la mortalidad por CC sea invariable, del 2008 al 2025 el número de decesos por cáncer cervical podría aumentar hasta un 50% (Arbyn et al., 2011).

En resumen, el cáncer cervical afecta, en los países de alto riesgo a un número sustancial de mujeres en etapas reproductivas y laboralmente activas con acceso limitado a actividades de detección, diagnóstico precoz ó tratamiento.

En contraste, en los países desarrollados y en periodos recientes, apenas se producen casos antes de los 30 años de edad, ya que la práctica de detección oportuna de lesiones preneoplásicas a entrado a formar parte de las rutinas

ginecológicas y la terapéutica de las lesiones precoces a mejorado sensiblemente el pronóstico de las mujeres con este diagnóstico.

1.2 El Virus del papiloma humano y el desarrollo de Cáncer Cervical

Zur Hausen planteó la hipótesis en la cuál proponía al virus del papiloma humano (VPH) como el agente sexualmente transmitido responsable de la transformación neoplásica en el cuello uterino. Dicho planteamiento a sido validado, tanto por múltiples estudios epidemiológicos como por evidencia molecular de que el VPH esta integrado en las células neoplásicas en 99.7% de los carcinomas cervicales, con lo que se puede concluir, el papel causal del VPH que posee en el desarrollo del Cáncer cervical (Muñoz et al., 1992; Bosch et al., 1995; Walboomers et al., 1999), y de una importante proporción de neoplasias anogenitales (cáncer de pene, anal, vaginal y vulvar)(Trottier y Franco, 2006).

Se han identificado 150 genotipos diferentes de VPH que han sido secuenciados completamente (Doobar et al., 2012), de los cuales 13 genotipos del género alfa (VPH-16,-18, -30, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59 y -68) pueden infectar el epitelio cervical y han sido asociados con el riesgo a desarrollar cáncer cérvicouterino, por lo que los han definido como tipos virales oncogénicos ó carcinogénicos, (Muñoz et al., 2003; Muñoz et al., 2006; Bouvard et al., 2009; Doobar et al., 2012).

Dado que ahora hay disponible una vacuna que protege contra los tipos más frecuentes de papiloma humano VPH-16 y VPH-18, implicados en el CC, probablemente sea menos frecuente en el futuro.

Para la aparición de este cáncer es necesaria una infección persistente de VPH de alto riesgo (VPH oncogénicos), especialmente los tipos VPH-16 y VPH-18, que son los más habituales en los casos de CC. Sin embargo, esto no es suficiente, ya que la aparición de las lesiones precancerosas y del cáncer cervical tarda varios años (décadas) en producirse, es decir, para que surja también se necesitan otros factores, que se relacionan con el riesgo de infección por el VPH ó con el riesgo de aparición de cáncer una vez establecida la infección por el VPH. Entre los factores de riesgo asociados para la evolución de CC esta la promiscuidad -hay una fuerte asociación

entre el número de parejas que han tenido tanto la mujer como su compañero a lo largo de su vida y la adquisición de la infección del VPH (Parkin et al., 1997); actividad sexual a temprana edad, tener un historial de otras enfermedades transmitidas sexualmente, verrugas genitales, pruebas de Papanicolaou con resultados anormales; pareja sexual con cáncer cérvix ó pene; La edad, la infección es más común en mujeres jóvenes sexualmente activas, de 18 a 30 años de edad (Adam et al., 2000). El CC es más común después de los 35 años, lo que sugiere la infección a temprana edad y la progresión lenta a cáncer (Burk et al., 1996); persistencia viral es común entre los tipos virales de alto riesgo es un factor determinante en el desarrollo a cáncer. La persistencia puede inducir cambios genéticos secundarios dado que las proteínas virales interfieren con los puntos de control del ciclo celular e inducen la inmortalización de los queratinocitos (Burk et al., 1996); el uso prolongado de anticonceptivos orales-la región larga de control (LCR) en el genoma viral, la cual contiene elementos de respuesta a glucocorticoides, que son inducidos por hormonas esteroides como la progesterona componente de los anticonceptivos orales (Negrini et al., 1990); la coinfección con otros tipos virales, como el virus del herpes simple (HSV-2) tipo 2, citomegalovirus (CMV), herpes virus humano tipo 6 y 7 (HHV-6, -7), detectados todos en el cérvix (Magnusson et al., 2000); la carga viral se correlaciona con la severidad de la enfermedad, por ejemplo la carga viral del VPH 16 puede alcanzar una carga viral 3 veces más alta que otros tipos virales (Guo et al., 2007); la predisposición genética representa el 27% del efecto de los factores subyacentes para el desarrollo del tumor. La herencia afecta la susceptibilidad a la infección por VPH, la capacidad para resolverla y el tiempo de su desarrollo de la enfermedad (Magnusson et al., 2000).

Debe mencionarse que hay factores de riesgo que pueden no producir aumento del riesgo por si mismos, sino que sencillamente se asocian con los verdaderos factores de riesgo. Por ejemplo, la anticoncepción hormonal es más frecuente en las mujeres con inicio temprano de la actividad sexual, mientras que la pobreza y la residencia en un país en desarrollo constituyen un factor de riesgo definido por no someterse a revisiones y revisiones ginecológicas periódicas debido a la mayor dificultad de acceso a los servicios médicos.

1.3 Biología molecular del virus del papiloma humano

El VPH pertenece a la familia *Papillomaviridae*, son partículas pequeñas que miden de 45-55 nm de diámetro, compuestos de ADN y proteínas. Su genoma es de DNA de doble cadena circular de aproximadamente 8,000 pares de bases (pb), compactado y encapsulado en viriones icosaédricos de 72 capsómeros (Howley, 1995; de Villiers et al., 2004; Doobar et al., 2012; Mighty y Laimins, 2014).

El genoma se divide en tres regiones: región larga de control (LCR), región de expresión temprana (E) y tardía (L). La LCR regula la replicación y la transcripción viral. La región E codifica proteínas de expresión temprana involucradas en la replicación E1, en la transcripción E2 y en la transformación celular (E5, E6 y E7). La región L codifica proteínas estructurales del virus (L1 y L2) que conforman la cápside viral (ver **Figura 1**) (Pfister et al., 1977; Broker, 1987; Doorbar, 2007; Doobar et al., 2012; Stanley, 2012; Mighty y Laimins, 2014).

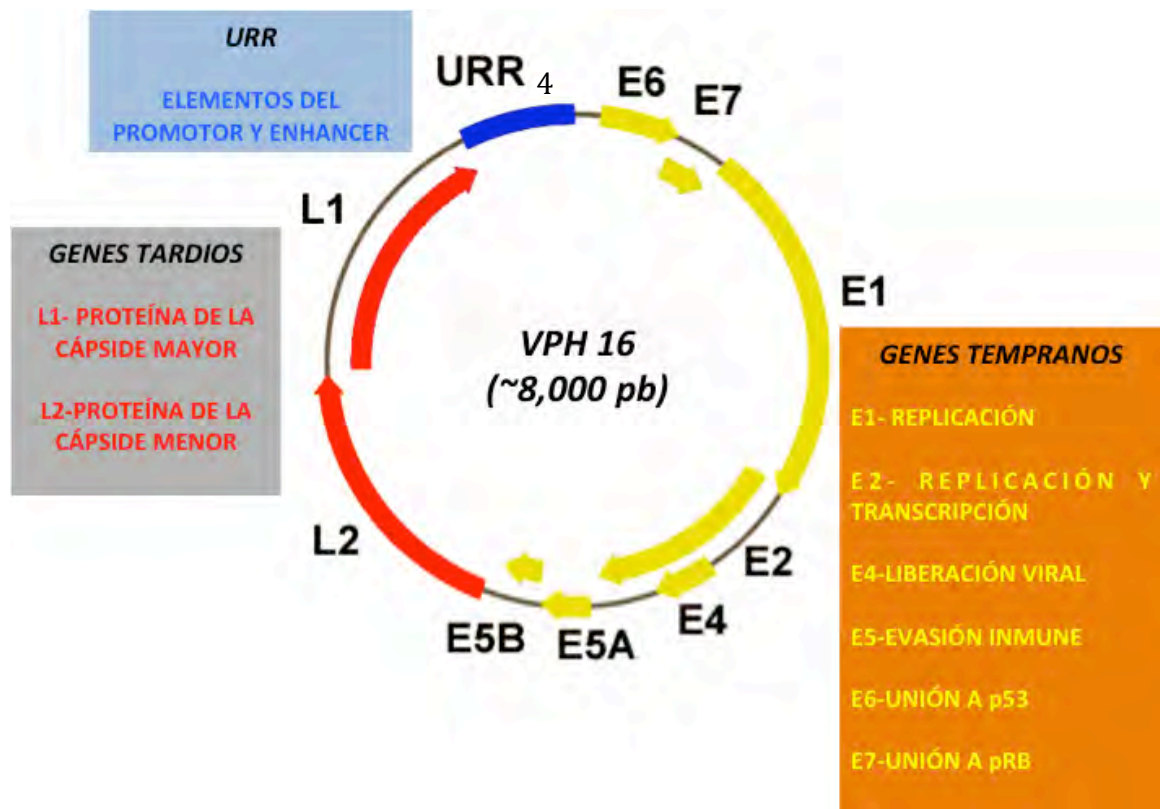


Figura 1. Organización del Genoma del VPH-16. En color amarillo se representa la región temprana compuesta de los genes E1-E7, encargada de la replicación y la transcripción viral. En rojo, la región tardía que codifica a proteínas estructurales L1 y L2, siendo la L1 la proteína principal de la cápside y L2 de la cápside menor. En color azul, la región reguladora (URR=LCR), que contiene el promotor y el origen de la replicación viral.

1.4 Genotipos del VPH

Los papilomavirus causan una gran variedad de lesiones de tipo proliferativo en piel, mucosa cervical, oral, laringe y región anogenital, con un rango de severidad desde verrugas benignas hasta cáncer invasivo. Según su tropismo en el epitelio, los papilomavirus se pueden clasificar en genitales (mucosas) y cutáneos (Stoler, 2000; Lowy y Howley, 2001, Peh et al., 2002; Forman et al., 2012).

Los virus del papiloma virus que tienen tropismos por las mucosas se clasifican como de alto riesgo (oncogénicos) y de bajo riesgo (no oncogénicos) dependiendo de sus características de transformación celular. Los genotipos de VPH -16, -18, -31, -33, -45, -51, -52, -56, -67 y -68 son considerados de alto riesgo y se encuentran en lesiones intraepiteliales de alto grado e invasoras, tanto en el epitelio escamoso como en el glandular (Muñoz et al., 2003). A su vez, los virus de bajo riesgo son los genotipos de VPH-6, -11, -13, -42, -43 y -44 los cuales se asocian con condilomas y LSIL y raras veces con HSIL y desarrollo de cáncer (Stoler, 2000; Lowy y Howley, 2001, Peh et al., 2002; Feichter y Meisels, 2002; Doobar et al., 2012; Mighty y Laimins, 2014).

1.5 Infección del virus del papiloma humano en Lesiones Uterinas

El VPH infecta las etapas basales del epitelio cervical, por lo tanto, se requiere de microtraumas que le permitan al virus llegar al fondo del epitelio donde se encuentran estas células e infectadas (zur Hausen, 2000). La infección transitoria con el VPH no genera anomalías microscópicas en el epitelio y el 80 % de las mujeres eliminan la infección en un periodo de 8 a 12 meses (Robboy et al., 2002). El 20 % de mujeres restantes infectadas con el VPH de alto riesgo establecen una infección persistente que puede llevar a la formación de lesiones LSIL, HSIL hasta CC (Hildesheim et al., 1994; Jenkins et al., 2007; Doobar et al., 2012).

Esta infección persistente puede ser latente o productiva. En la infección latente el ADN viral permanece en el núcleo de la célula de forma episomal y no hay replicación viral ni cambios observables, sin embargo, con ayuda de factores de riesgo el virus puede inducir su replicación. En la infección productiva algunas células son capaces de replicar el genoma viral en forma episomal, sintetizar proteínas virales y formar viriones (Alonso et al., 2005; zur Hausen, 2000; Doobar et al., 2012; Mighty y Laimins, 2014).

En la infección productiva del VPH las proteínas E6 y E7 se expresan en las capas basales del epitelio cervical, aún no sea determinado si estas proteínas sólo se expresan en las células de la capa basal o en células de las capas parabasales e intermedias. Las proteínas virales E1 y E2 se expresan en las células de la capa intermedia y superficial del epitelio y la expresión de la proteína mayor de la

cápside L1 se lleva a cabo en la capa superficial del epitelio sin importar el genotipo del VPH (Middleton et al., 2003; Doobar et al., 2012; Mighty y Laimins, 2014).

El genoma de los genotipos VPH-16 y VPH-18 en estadios de NIC 1 y 2 se encuentran en forma episomal; sin embargo, en lesiones NIC 3 y CC se encuentra integrado en el genoma del hospedero. No se conoce con exactitud el estado físico en el que se encuentran los genotipos del VPH -31, -33, -52 y -58 durante la progresión del cáncer, pero se sugiere que ocurre lo mismo que a los genotipos del VPH-16 y -18 (Hudelist et al., 2004). Por lo tanto, la transformación celular deriva de una infección viral productiva, seguida de la integración del ADN viral en el genoma celular del hospedero (Klaes et al., 1999). La integración del genoma viral a la célula huésped da como resultado la ruptura del marco abierto de los genes E1 y E2, cabe mencionar que E2 actúa como un regulador de la transcripción viral de los genes E6 y E7. De esta manera, la proteína E2 deja de expresarse favoreciendo el incremento de expresión de E6 y E7 de los genotipos oncogénicos, las cuales descontrolan el ciclo celular interactuando con varias proteínas, por ejemplo: p53 y pRb e inducen el crecimiento, la transformación e inmortalización de las células infectadas por el VPH (Steenbergen et al., 2005; Jean et al., 1995; Lazo, 1999; von Knebel, 2002; Lazarczyk et al., 2009; Doobar et al., 2012; Mighty y Laimins, 2014).

En la **Figura 2**, se esquematiza la infección del virus del papiloma humano en el cervix hasta su evolución a un carcinoma invasor.

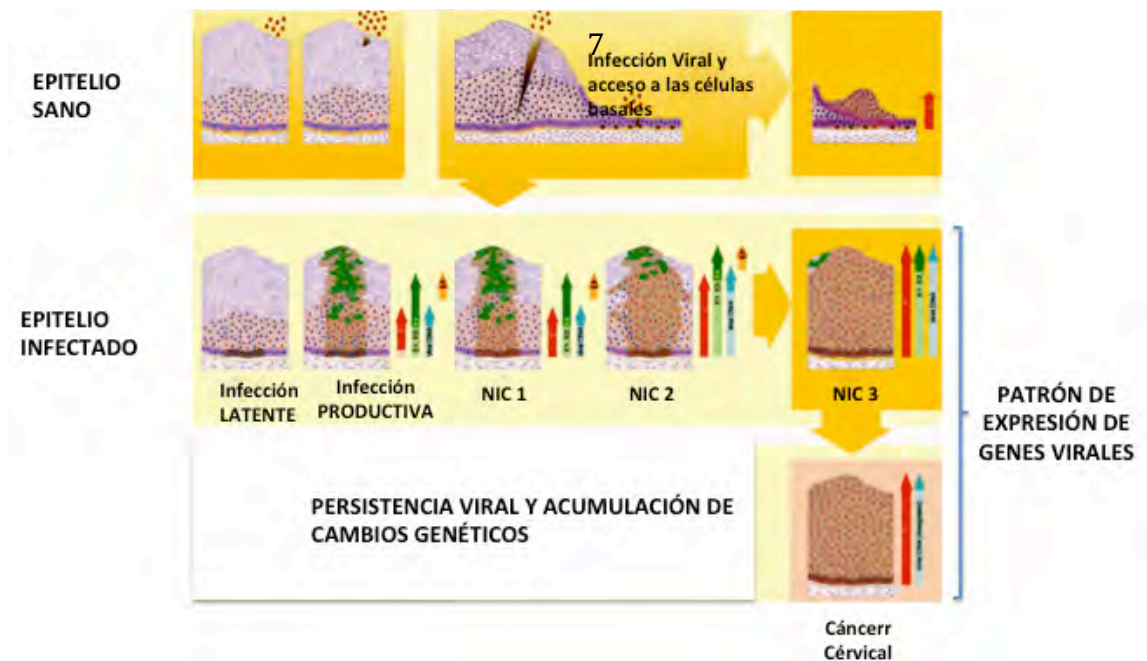


Figura 2. Infección del VPH en las lesiones uterinas. En el epitelio, las partículas virales entran a la célula basales a través de una abertura en el epitelio estratificado, puede ocurrir en donde haya una lesión o un microtrauma. La internalización del virus ocurre por endocitosis, después de la infección y desensamblaje en las células basales, se expresan E1 y E2 que facilitan la división celular correcta. La infección inicial es seguida por una fase proliferativa que conduce a un incremento de células basales que contienen el genoma viral, lo que requiere la expresión de E6 y E7 que estimulan el progreso de la fase del ciclo celular G1 a S (Imagen tomada y modificada de Doobar et al., 2012).

1.6 Historia natural del Cáncer Cervical

El CC es una alteración celular que se manifiesta inicialmente a través de lesiones precursoras de lenta y progresiva evolución, que pueden suceder en etapas de displasia leve, moderada ó severa. Si la displasia esta confinada al tercio inferior del epitelio se denomina *Lesión Intraepitelial Escamosa de Bajo Grado (LSIL)*, este tipo de lesión se caracteriza por la presencia de koilocitos, células que muestran un aumento de tamaño nuclear, hipercromasia, una membrana nuclear irregular, un halo citoplásmico y posiblemente multinucleación (ver **Figura 2 y 3**). Si las

anomalías nucleares se caracterizan por el aumento en la actividad mitótica, hay aumento en la cantidad núcleo/citoplasma, además se extienden a dos tercios ó más en todo el espesor del epitelio se denominan *Lesión Intraepitelial Escamosa de Alto Grado* (HSIL) (ver **figura 2 y 3**) (National Cancer Institute Workshop, 1989; Nucci y Crum, 2007).

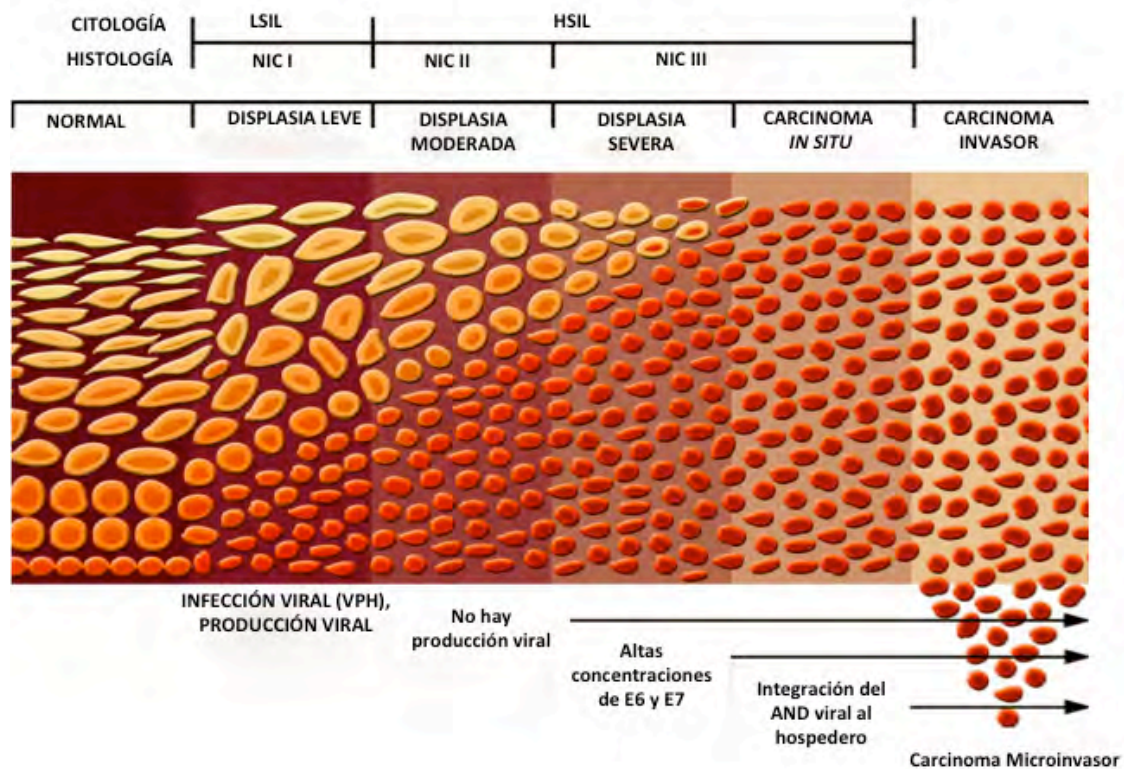


Figura 3. Historia Natural del Cáncer Cervical. Los VPH oncogénicos pueden originar alteraciones en el cérvix, mismas que se evolucionan a cáncer (Imagen Tomada de Lowy y Schiller, 2006).

Sin embargo, en HSIL se ha asociado con el VPH de alto riesgo en donde los más prevalentes son VPH-16 (45 %), VPH-18 (7.1 %), VPH-31 (8.8 %), VPH-35 (4.4%), VPH-45 (2.3 %), VPH-52 (2.5 %) y VPH-58 (6.9 %). En el caso de CC la prevalencia reportada es: VPH-16 (54.3 %), VPH-18 (12.6 %), VPH-31 (4.2 %), VPH-33 (4.3 %), VPH-35 (1.0 %), VPH-45 (4.2 %), VPH-52 (2.5 %) y VPH-58 (3.0 %); observándose que los genotipos del VPH-16, -18 y -45 son los más frecuentes en las lesiones de alto grado y CC, sugiriendo que están implicados en la progresión de la lesión hacia

cáncer (Clifford et al., 2003; Aguirre et al., 2007; Bosch y de Sanjosé, 2007; Canul-Canche et al., 2010; Iwasaki A, 2010).

1.7 Clasificación de lesiones de cérvix

Existen tres clasificaciones para evaluar las anomalías del epitelio cervical, de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), Clasificación de Richard (1973) y el Sistema de Bethesda (**Tabla 1**) (Alonso et al., 2005).

<i>Sistema de la OMS</i>	<i>RICHART</i>	<i>Sistema BETHESDA</i>
Displasia Leve	NIC 1 (I)	LSIL
Displasia Moderada	NIC 2 (II)	HSIL
Displasia Severa	NIC 3 (III)	
Carcinoma <i>in situ</i>		

Tabla 1. Cuadro comparativo de clasificación de lesiones de cérvix. En la tabla, se muestran las tres clasificaciones propuestas para evaluar las anomalías del epitelio cervical. (NIC=neoplasia intraepitelial cervical, LSIL=lesión intraepitelial escamosa de bajo grado y HSIL=lesión intraepitelial escamosa de alto grado).

Cuando los cambios estructurales de las células se encuentran confinados a un tercio bajo del epitelio la lesión esta se clasifica como LSIL (displasia leve o NIC 1). En este estadio hay una expresión alta de proteínas virales E1, E2, E4, E5, L1 y L2, baja expresión de E6 y E7, y formación de viriones (**Figura 2a**). Si las células anormales se extienden a dos tercios del epitelio, las lesiones se denominan NIC 2 o displasia moderada, en donde incrementan E7 y E6, y disminuyen E1, E2 y E4 (Figura 2b). Por último, si los cambios son uniformes y se extienden en las células de todo el epitelio, las lesiones se denominan como NIC 3 (displasia severa y carcinoma *in situ*), siendo la expresión de E6 y E7 predominante en casi todo el tejido (**Figura 2c**). Además, en conjunto a NIC 2 y 3 se les ha designado como HSIL, hasta llegar a la etapa final del cáncer invasor el cual se expande a otros tejidos donde predomina la expresión de las oncoproteínas E6 y E7 (**Figura 2d**) (Middleton et al., 2003; Doobar et al., 2012).

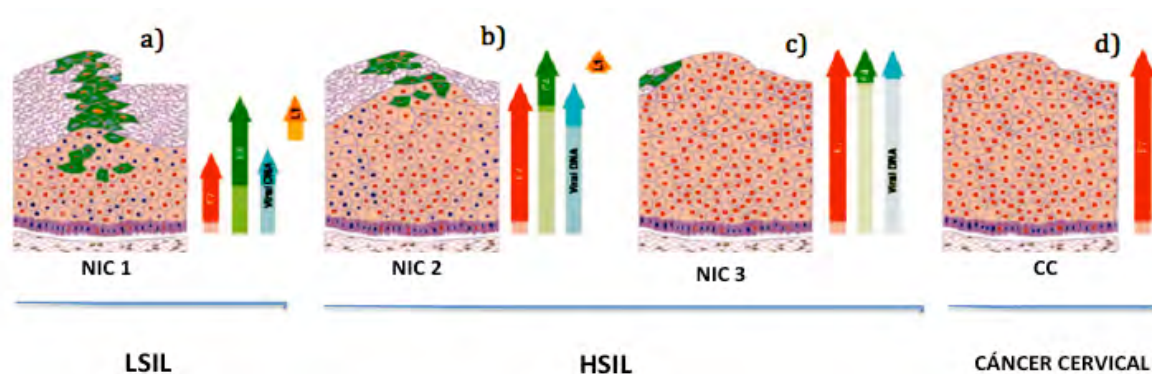


Figura 4. Expresión de las proteínas virales del VPH, durante la evolución del cáncer cervical. La flecha en rojo señala el aumento de la proteína E7 de forma gradual desde una lesión de bajo grado hasta aumentar su expresión en cáncer. a) NIC 1 , b) NIC 2, c) NIC 3 y d) CC (Middleton et al., 2003).

1.8 Expresión de genes en el desarrollo del Cáncer Cervical

La infección del VPH y la integración del genoma viral cooperan con los cambios que se generan a nivel del genoma, transcriptoma y proteoma de la célula del hospedero en múltiples procesos a lo largo del desarrollo del CC (Schiffman et al., 1993; Lizano et al., 2009; Doobar et al., 2012; Mighty y Laimins, 2014).

Se han evaluado cambios en la expresión génica de queratinocitos cervicales que tienen integrado el VPH 16 y los genotipos más comúnmente encontrados en CC, observándose un patrón diferencial cuando se comparan con queratinocitos normales (Woodworth y Simpson, 1993; Arends et al., 1998). Con técnicas de microarreglos, se ha observado la sobreexpresión de algunos genes en biopsias de estadios tempranos de CC como: el inhibidor de ciclina dependiente de cinasa 2a, transcrito mesodermo específico, ciclina B1, sintetasa prostaglandina E, topoisomerasa I-alfa, factor de transcripción E2F, entre otros. Por otra parte, se ha observado la disminución del factor de crecimiento transformante alfa y beta 1, inhibidores de serina proteasas, cadherina 13, inhibidor de proteasa 3, queratina 16,

entre otros (Santin et al., 2005). Aunado a una sobreexpresión y disminución de la transcripción, también se ha observado que este perfil de expresión se modifica conforme evoluciona el proceso de transformación (Chen et al., 2003).

El antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) es una ciclina que participa en la fase S del ciclo celular, en el metabolismo de los ácidos nucleicos como maquinaria de la replicación y reparación del DNA, se ha reportado la asociación de esta proteína con la presencia de VPH de alto riesgo, y se ha encontrado sobreexpresada en tejido cervical de mujeres con LSIL y HSIL (63.2%) y CC (100%), no así en tejido cervical normal o con signos de inflamación (Wang et al., 2004; Yim y Park, 2006). Además se ha visto que la oncoproteína E7 del VPH de alto riesgo induce la sobreexpresión de PCNA en mujeres con LSIL, HSIL y CC generado por VPH de alto riesgo (Branca et al., 2007; Doobar, 2007).

Duensing y cols, demostraron que las lesiones premalignas son causadas por disturbios del aparato mitótico provocado por la expresión de los oncogenes de HPV, resultando de aneuploidias. Como consecuencia, la aneuploidia es una característica de este tipo de lesión (Doobar, 2007; Espinosa et al., 2013).

1.9 Biomarcadores de Cáncer Cervical

Los biomarcadores son una serie de características biológicas que pueden ser evaluadas y medidas de manera objetiva y que proporcionan información sobre procesos biológicos normales ó patológicos, permitiendo discernir entre ambos procesos o bien definir el punto de la enfermedad o cuantificar su respuesta frente a una posible terapia (Bethesda, 2001).

El diagnóstico molecular permite identificar los genes ó proteínas involucrados en el desarrollo de una enfermedad, así como factores de riesgo de desarrollo de la patología, por lo que el proceso de transformación de una célula normal hacia una célula cancerosa va acompañado de alteraciones en la expresión de genes y proteínas. Algunos de los hallazgos de genes o proteínas como posibles biomarcadores de la enfermedad se describen a continuación:

1.9.1 Marcadores en suero

El suero es la muestra tradicional para el estudio de marcadores tumorales, es una fuente accesible de biomarcadores. Sin embargo, existen pocos estudios realizados para CC y aún menos en los cuales se incluyan lesiones premalignas (Koutroukides et al., 2013). Entre los marcadores identificados por ELISA se encuentran: el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), donde se observó elevado en el 93% de los casos con NIC 3 y cáncer; angiotensina (ANG), no se encuentra elevada en las lesiones premalignas solamente en el 81% de los caso con cáncer; el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), al igual que el anterior solamente se encuentra elevado en el 75% de los casos con CC (Oh M et al., 2000; Bodner et al., 2001; Lebrecht et al., 2002).

1.9.2 Marcadores Indicadores de la infección de VPH

Las proteínas involucradas en la regulación del **ciclo celular, proliferación y apoptosis**, han sido propuestas como **marcadores de infección por el VPH**, algunas de ellas se citan a continuación:

p16^{INK4A}, esta proteína pertenece al grupo de inhibidores de cinasa Cdk4/6-dependiente de ciclina y esta codificada por el gen supresor de tumores INK4A. Este gene funciona como un factor regulador de la cascada Cdk-Rb-E2F. El producto de este gene p16^{INK4A}, previene la fosforilación de pRb, por inactivación de Cdk4/6. Es una de las proteínas propuestas como biomarcador de CC y lesiones de alto grado. En muestras de biopsias es positiva en 4% de tejido normal, 80% en lesiones NIC 1, 90% en NIC 2 y 3, y 100% en cáncer (Saqi et al., 2002; Gupta et al., 2010).

Varios reportes han sugerido que la sobreexpresión de p16 esta asociado con lesiones precancerosas y carcinomas cervicales, también se ha demostrado por inmunohistoquímica que p16 puede utilizarse como un biomarcador para identificar lesiones de bajo grado causadas por virus de VPH de alto riesgo (Rosamilia et al., 2012).

Actualmente p16 se considera un marcador específico y sensible para displasias glandulares y escamosas de cérvix, así como un marcador subrogado de VPH-AR,

se ha sugerido como una prueba coadyuvante a los ya existentes (Gustinucci et al., 2012).

Ki-67 (MIB-1): El antígeno nuclear Ki-67 es una proteína no histona detectada en todas las partes activas del ciclo celular. Esta proteína se incrementa conforme evoluciona la enfermedad; por lo tanto, se relaciona con la malignidad de la enfermedad y con el proceso de inflamación (Gerdes et al., 1984; Longatto et al., 2005).

Longatto y cols., en 2005 estudiaron la presencia de Ki-67 en citologías. Así como en combinación con p16, obteniendo buenos resultados. La combinación puede emplearse como un implemento en el manejo de mujeres con papanicolaou erróneos (Longatto et al., 2005; Rosamilia et al., 2012)..

FHIT: La expresión de proteínas de *fragile histidine triad protein* (FHIT) se ha asociado a la progresión de lesiones precancerosas a cáncer. Se ha observado que la expresión de la proteína FHIT es menor en lesiones cervicales de alto grado y aumenta en cáncer (Connolly et al., 2000).

Por lo que, FHIT puede funcionar como un posible candidato para diagnosticar lesiones de alto grado.

Telomerasas (hTR, TRAP, hTERT): El uso de telomerasas como marcadores de displasia cervical y carcinoma se ha sugerido recientemente. La medición de la actividad de telomerasa (TRAP) es el estándar de oro para la expresión de telomerasas, el inconveniente es las condiciones que se requieren de la muestra (frescas ó poco tiempo de congelación) para la preservación de la enzima. En muestras citológicas de cérvix, TRAP fue detectada en 0% en células normales, 69 % en lesiones epiteliales NIC y 97 % en CC. Otro estudio, detecto 17 % en células normales, 41 % en NIC 1, 40 % en NIC 2 y 60 % en NIC 3 (Reddy et al., 2001; Herbsleb et al., 2001).

1.9.3 Marcadores Genéticos

Los marcadores relacionados con cambios genéticos en la célula durante la transformación hacia una célula neoplásica que se han identificado son: el gen supresor de tumor FHIT localizado en la posición 3p14.2 se encuentra reducido en el 50 % en NIC 3 y 78 % en cáncer; los hallazgos sugieren una asociación entre la infección del VPH y el gen FHIT debido a que induce la proliferación. La hipermetilación del promotor de cadherina E se encontró en el 40 % de mujeres con CC y ausente en mujeres sanas; con ello se concluye que la metilación impide la expresión de este gen, lo que genera una alteración en la adhesión célula-célula característica en la proliferación del tumor (Chen et al., 2003; Mäbert et al., 2014).

1.10 Proteómica

La Proteómica tiene por objeto el estudio del conjunto de proteínas que se expresan en un momento determinado y bajo condiciones concretas en células, tejidos u órganos. En todas las células que constituyen un organismo completo no se expresan los mismos genes continuamente, sino que estos lo hacen de manera diferencial, dando lugar a los distintos tipos de proteínas que forman los diferentes tejidos y órganos, y a las distintas funciones que llevan a cabo las proteínas en cada momento de la vida de un organismo. A este conjunto de proteínas que se expresan en la célula en unas condiciones dadas es a lo que se le denomina Proteoma (Wilkins et al., 1996).

El **proteoma es dinámico** existiendo un enorme número de proteínas y **subproteomas** que coexisten en un mismo individuo, fruto de los cambios que se producen en el entorno del genoma (Wilkins et al., 1996). Una aportación del genoma humano es que los genes codifican para más de una proteína (20,000-25,000 genes 500 000-1000 000 proteínas). La diferencia entre el número de genes y el de las proteínas se debe al "*splicing*" alternativo y modificaciones post-traduccionales (Jensen, 2006).

El estudio del proteoma se presenta como un reto con mayor complejidad que el estudio del genoma. Las principales causas contribuyen a la complejidad son:

- a) A partir de un solo gen pueden sintetizarse entre 4 y 6 proteínas (Kolch, W, 1995), por este motivo el número de proteínas es mucho más elevado que el de genes.
- b) Las proteínas muestran un rango de concentraciones en sangre y tejidos muy dispar,, es decir, algunas proteínas aparecen en concentraciones muy elevadas mientras que otras lo hacen en concentraciones muy pequeñas, siendo precisamente estas proteínas menos abundantes las que suelen tener mayor utilidad como biomarcadores. Algunas proteínas como la albúmina y las inmunoglobulinas suponen por si solas el 99% del contenido total de proteínas en suero (Simpson et al., 2008). Por otra parte, las proteínas, a diferencia de los genes, no se pueden amplificar, lo que reduce aún más el tamaño de las muestras.
- c) Las proteínas presentan una gran heterogeneidad estructural. Existen proteínas compuestas por pocos aminoácidos y otras, como la proteína nesprina 1, que puede contener 10 000 aminoácidos (Vivanco F, 2008). Por otra parte, tras ser sintetizadas, las proteínas sufren muchas modificaciones postraduccionales fundamentales para que la proteína realice correctamente su función biológica pero que supone una diversidad estructural que complica técnicamente su estudio.

En la naturaleza, las proteínas no suelen aparecer de forma aislada sino formando complejos proteicos. Estas interacciones entre proteínas pueden producir modificaciones estructurales, por lo que nuevamente se ve aumentada la diversidad estructural de las proteínas en su contexto biológico (Boeckmann et al., 2005).

Para conseguir identificar nuevos biomarcadores, la proteómica sigue tres estrategias principales: 1) análisis comparativo de la expresión de proteínas en condiciones normales y enfermos con el objetivo de identificar aquellas proteínas aberrantes ó erróneas que puedan constituir nuevos marcadores de enfermedad, ii) análisis de proteínas secretadas por líneas celulares y cultivos primarios de tejidos enfermos y iii) determinación del perfil en biofluidos biológicos (suero, lágrimas, saliva, orina, fluido cervical, sinovial, bilis) (Hanash, 2008).

Una vez separadas las distintas proteínas presentes en la muestra, estas son analizadas mediante espectrometría de masas donde es posible obtener información

de la masa molecular del compuesto analizado, así como obtener información estructural del mismo. Por este motivo, la espectrometría de masas es una de las técnicas más utilizadas en la identificación de proteínas tanto para análisis cuantitativos como para los análisis cualitativos (Walther and Mathias Mann, 2010).

1.11 Métodos usados en proteómica

Hay una gran diversidad de métodos, reactivos, instrumentación y herramientas bioinformáticas disponibles para el diseño, la realización y el análisis de datos de experimentos proteómicos (Lisitsa et al., 2014). En general, dichos experimentos suelen consistir en cuatro etapas: 1) preparación de la muestra, 2) fraccionamiento de la muestra, 3) análisis por MS y 4) análisis informático de los datos. En la proteómica cuantitativa las proteínas son normalmente marcadas durante su preparación de la muestra y cuantificadas durante el fraccionamiento de la misma en la aproximación que se conoce como proteómica basada en la electroforesis bidimensional (*gel-based proteomics*). En otra alternativa que ha ido adquiriendo mayor popularidad, las proteínas también pueden ser cuantificadas durante el análisis de MS en lo que se denomina como proteómica basada en la espectrometría de masas (*gel-free or MS-based proteomics*) (Abdallah et al., 2012).

Todos los métodos usados en las distintas etapas están estrechamente relacionadas entre si, por lo que el camino seguido durante la preparación de la muestra debe estar unido al posterior método de fraccionamiento y, de la misma manera, el análisis MS debe ser en base al método de fraccionamiento usado.

2. ANTECEDENTES

2.1 *La Complejidad del proteoma de plasma y suero humano*

La sangre comprende varios tipos diferentes de células y compuestos como las sales y proteínas que sirven para el diagnóstico clínico de varias enfermedades. La sangre transporta oxígeno, nutrientes, dióxido de carbono y productos de desecho que se excretan de las células (Isaaq et al., 2007; Koutroukides et al., 2013).

Más de la mitad de la sangre en el organismo se compone de líquido de plasma ó suero. Estas sustancias son similares y se obtienen utilizando el mismo método, pero las especímenes se separan utilizando tubos especialmente diseñados que sólo extraen suero ó plasma.

El suero se obtiene sin la presencia de ningún anticoagulante, la sangre se coagula y se somete a un proceso mecánico como la centrifugación y se separa la parte líquida, en este paso se elimina la fibrina. El proceso de coagulación hace la diferencia entre suero y plasma. En el proceso de coagulación se elimina fibrina, plaquetas, eritrocitos y leucocitos. El plasma es la porción líquida de la sangre sin coagularse y la eliminación de varios tipos celulares. Para obtener el plasma, la sangre se le adiciona un anticoagulante (heparina, EDTA o citrato de sodio), la heparina evita la coagulación por activación de la anti-trombina y el EDTA y citrato de sodio por la quelación de los iones de calcio.

Varios estudios de proteómica se han desarrollado para identificar el espectro de proteínas que se encuentran en un estado normal, para posteriormente buscar en patologías y poder encontrar proteínas diferenciales que sirvan como biomarcadores de detección de enfermedad (Anderson and Anderson, 2003).

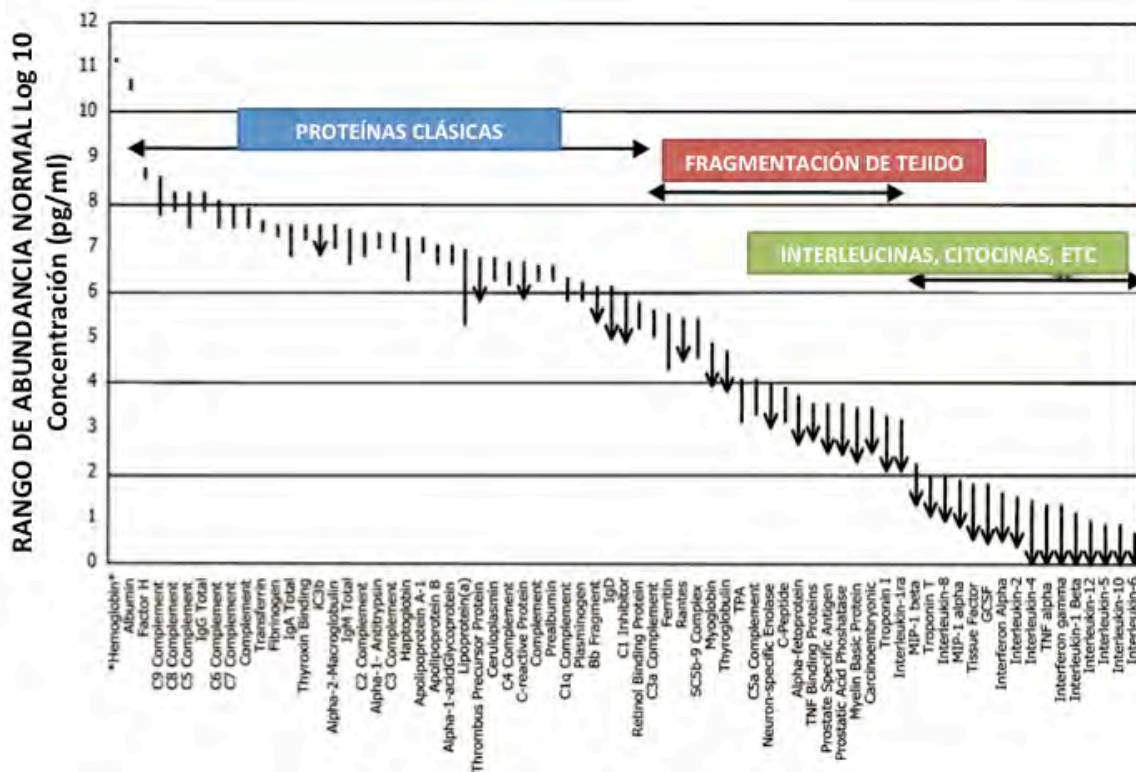
El Putnam (*The Plasma Proteins*), ha definido a las proteínas del plasma y suero como aquellas que funcionan en la circulación y excluye a proteínas que sirven como mensajeros entre tejidos (péptidos, hormonas), ha elaborado una clasificación del contenido de proteínas en el plasma-suero. Este consiste en proteínas que son secretadas por tejidos sólidos y que actúan en el plasma (hígado y riñón), inmunoglobulinas, ligandos de receptores que actúan a larga distancia (insulina, eritropoyetina), ligandos de receptores locales (citocinas), pasajeros temporales (proteínas lisosomales), proteínas de rompimiento de tejidos (troponinas cardíacas, cinasas-creatinina o mioglobina), secreciones aberrantes (proteínas liberadas de

tumores) y proteínas extrañas (proteínas de parásitos que son liberadas o expuestas a la circulación) (Anderson y Anderson, 2003). Las proteínas que contiene el suero es similar al plasma, la diferencia es la eliminación de células por efecto de la coagulación.

El suero/plasma contiene una alta abundancia de proteínas. Sus proteínas se clasifican en proteínas mayoritarias como inmunoglobulinas, haptoglobulinas y transferrinas; proteínas producidas por las células circulantes de la sangre y proteínas liberadas al torrente sanguíneo por diferentes tejidos (Adkins et al., 2002). La presencia de estas proteínas en el plasma/suero demuestra que este fluido contiene información sobre el estado de diferentes sistemas del organismo. Además es una muestra apropiada, de fácil obtención y no invasiva, lo que convierte en un fluido útil desde el punto de vista clínico y de monitoreo de la presencia de biomarcadores.

La presencia de aquellas proteínas abundantes del suero que representan aproximadamente el 70% del contenido proteico total, podría dificultar la detección de proteínas minoritarias. Ante esta dificultad metodológica se han desarrollado diversos procedimientos, que van desde compuestos que favorecen la precipitación de las proteínas abundantes hasta métodos de cromatografía de afinidad para retirar proteínas específicas, que faciliten el análisis de proteínas del plasma como herramienta para la búsqueda de biomarcadores (Jiang et al., 2004; Tu, 2010).

No obstante, se han realizado diversos estudios en enfermedades neoplásicas, con el objetivo de encontrar proteínas que puedan servir como biomarcadores y/o blancos terapéuticos para el diseño de fármaco. Igualmente, se ha determinado que además de las proteínas abundantes del plasma/suero, estos fluidos contienen proteínas liberadas por los tejidos, citocinas, diversos péptidos y proteínas pequeñas. En general, el 50% de proteínas en el plasma/suero presentan pesos aproximados de 45 kDa. La figura 5 muestra 70 proteínas identificadas en el plasma y sus abundancia relativa (Anderson et al., 2002; Crosley et al., 2009; Zolla, 2008; Kullolli et al., 2010; Leth-Larsen et al., 2010).



En la **Figura 5. Rango dinámico del plasma**, que se ha obtenido a largo de varios estudios de proteómica y que sirve como referencia en relación a la abundancia de proteínas que constituyen al plasma y suero. (Tabla tomada de Anderson y Anderson, 2003).

Actualmente, las proteínas son un atractivo molecular para el estudio del cáncer, debido a que las células cancerosas secretan proteínas tejido-específico al medio extracelular y son liberadas a través del torrente sanguíneo (Kumar et al., 2006). Estas pueden ser estudiadas a través de diversas metodologías de proteómica, en varios fluidos (saliva, orina, suero, plasma, secreciones), tejidos y células en un momento determinado en diferentes estadios de la lesión premaligna a maligna (Gygi y Aebersold, 2000; Principe et al., 2012).

Diversos grupos de investigación están enfocados en utilizar las herramientas de la proteómica para determinar el perfil de proteínas y con ello conocer la evolución de

la enfermedad, buscar biomarcadores o tratamientos. Algunos de los reportes publicados a la fecha se describen a continuación:

2.2.1 Análisis del proteoma en líneas celulares

2.2.1.1 Células HeLa

El objetivo de este estudio fue buscar proteínas relacionadas con el cáncer cervical. Para esto, se utilizó la línea celular derivada de CC (HeLa), las cuales se crecieron en un medio libre de suero, para evitar generar resultados falsos positivos. El resultado fue 160 proteínas entre las más relevantes se encontraron: chaperonina 10, 2, cistatina B y C, TIMP-2 y precursor de osteopontina. Las demás proteínas se clasificaron de acuerdo a su localización subcelular, encontrándose un 30% de proteínas de citoplasma, 5% de citoesqueleto, 7% de retículo endoplásmico, 9% de matriz extracelular, 12% de membrana, 17% de núcleo, 14% secretadas y 6% de proteínas que no pudieron clasificar. El 86% de las proteínas identificadas presentaron un peso molecular <80 kDa y punto isoeléctrico (3.35-11.96). Este primer ensayo in vitro sugiere que estas proteínas identificadas pueden servir como candidatas a biomarcadores de la neoplasia cervical (Li et al, 2007).

2.2.1.2 Proteoma de células HaCaT transfectadas con el gen E5 del VPH 16

El gen E5 VPH-AR se le atribuye una actividad oncogénica además de sinergizar las propiedades oncogénicas de E7 (Bouvard et al., 1994). Muchos de los efectos de E5 son mediados por proteínas de membrana. Para conocer el patrón de expresión de los efectos producidos por E5 en la fisiología celular, se analizó el proteoma de células HaCaT que expresan establemente E5 de VPH-16 identificando las proteínas de membrana y asociadas a ella. Se identificaron en total 24 proteínas y se dividieron en tres grupos: 1) proteínas relacionadas a la estructura celular unidas a la membrana y citoqueratinas, 2) proteínas de procesamiento relacionadas a MHC clase I, y 3) proteínas con actividades proteosomales/chaperona (Leykauf et al., 2004). Entre las diversas proteínas se observó una expresión diferencial en las células HaCaT con el vector vacío, ya que mientras una proteína disminuye otra incrementa como la calreticulina inversamente proporcional a la HSP70, ambas involucradas en maduración y transporte del complejo MHC clase I. Este artículo

identifica proteínas del sistema inmune que disminuyen su expresión debido a la infección viral y su participación de la proteína estructural E5 como un posible mecanismo de evasión inmunológica (Leykauf et al., 2004;Ritz et al., 2001).

2.2.1.3 Líneas celulares transfectadas con el oncogen E6 del VPH

Los virus del papiloma humano de alto riesgo codifican para dos oncoproteínas E6 y E7 (Hawley et al., 1989). La proteína E6 promueve la proliferación celular y estimulan la degradación de p53, esto genera la progresión del ciclo celular e incrementa el crecimiento celular del tumor. Las líneas celulares de adenocarcinoma de colon (RKO) y de pulmón (A549) fueron transfectadas establemente con el oncogen E6 del VPH-16 para analizar el patrón de expresión génica y el proteoma comparado con la línea celular sin transfectar. En la línea celular RKO transfectada con E6 se detectaron 50 genes sobreexpresados y 35 de baja expresión. Por otro lado, en la línea celular A549 transfectada con este oncogen se observaron 27 genes y 12 proteínas sobreexpresadas, y 43 genes y 14 proteínas de baja expresión (Yim et al., 2004).

Los genes y las proteínas se clasificaron de acuerdo a su función subcelular. Se observó una disminución de la expresión de proteínas involucradas en estructura celular, plegamiento de proteínas, metabolismo y una sobreexpresión de proteínas que intervienen en el procesamiento de RNA, chaperonas, proteasas y transducción de señales. Este artículo señala la presencia de tres proteínas CDK5, Bak y TRAF-I, identificadas tanto en ensayos de microarreglos como de proteómica, el papel de dichas proteínas están involucradas en la carcinogénesis, ya que unas promueven la proliferación celular y otras la apoptosis interactuando con la proteína E7 del VPH-AR (Yim et al 2004).

2.2.1.4 Células HaCaT transfectadas con el oncogen E7 del VPH

De acuerdo a la información y hallazgos reportados se sabe que los VPH-AR son el factor etiológico del CC, y la proteína E7 interactúa con pRb para permitir la liberación del factor de transcripción E2F de pRb, favoreciendo la expresión de genes involucrados en el control del ciclo celular y la mitosis. Con el fin de estudiar el efecto del oncogen E7 del VPH-16 y su implicación en la carcinogénesis se analizo

el proteoma de la línea celular HaCaT que expresa este oncogen de manera estable. En este estudio se identificaron 28 proteínas en total; dos de baja expresión (actina e inhibidor de elastasa de leucocitos) y 26 sobreexpresadas por E7 (catalasa, peroxi-redoxina 2, CD45, proteína de unión A Ku 70, RaL-A, RAB-11, etc). Mediante un ensayo de "pull down" se corroboró, que el inhibidor de elastasa de leucocitos y la proteína de unión Ku 70 se unen a la oncoproteína E7; con la utilización de columnas de afinidad para E7 y geles de 2-DE con el análisis de MALDI-TOF lograron identificar 22 proteínas de interacción con E7 (proteína de unión a CD2, ciclina E1, TBP, etc). Con estos resultados se demostró que E7 puede influir en el estado celular a través de la modulación de algunos factores relacionados con la señalización celular, apoptosis, y regulación del ciclo celular (Lee et al., 2004).

2.2.2 Identificación de proteínas diferenciales en tejido

2.2.2.1 El Cérnix (biopsias)

Se ha corroborado que hay cambios en la expresión de proteínas durante el desarrollo del CC. Por lo que en este estudio se evaluó el perfil de expresión de proteínas en tejido cervical normal (n=17) y con cáncer cérvico uterino (n=33). Se reportaron 17 proteínas sobreexpresadas (keratina 1, 9, 16, 19 y 20, aflatoxina B1, aldehído reductasa, anexina A2 y A5, Hsp27, tropomiosina 3, inhibidor de proteasa serina o cisteína, glutatión S-transferasa P, etc), y 18 proteínas con baja expresión (\square -enolasa, anexina 1, tropomiosina 1 y 2, etc), comparadas con el tejido normal. De estas cinco proteínas (SCCA-1, SCCA-2, HSP-22, A1, Tropomiosina) se validaron por ensayos de western blot en tejido sano y con cáncer siendo las dos primeras que presentaron un incremento en su expresión proteína en las muestras con cáncer cervical, por lo que se corroborará su presencia y su papel como marcadores tumoral de CC, así como se sugiere que otras proteínas también podrán participar en la carcinogénesis y funcionar como biomarcadores de diagnóstico (Bae et al., 2005).

Otro estudio, con el objetivo de caracterizar proteínas relacionadas con la proliferación celular, se utilizaron muestras de tejido cervical de mujeres con CC infectadas con el VPH 16 (n=3) y VPH18 (n=3), de las cuales se separaron las proteínas de la fracción nuclear y citoplasmática, y se compararon con la línea celular de queratinocitos (HaCaT). A través del uso de 2-DE y MALDI-TOF, se

identificaron proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular, estabilidad genómica, activación de telomerasas e inmortalización y transformación celular (oncogenes). Este estudio, señala que no hay diferencias en el perfil de expresión proteico de la muestra de tejido con CC y que son independientes del genotipo de VPH-16 o VPH-18 (Choi et al., 2005).

Varias publicaciones se han dado a buscar proteínas que puedan ser como biomarcadores, el grupo de Wong y cols, analizaron 35 biopsias de CC invasivo en diferentes etapas (I, II y IV) y 27 controles. El perfil diferencial de proteínas se obtuvo mediante la tecnología SELDI-TOF. Se identificaron siete picos de baja expresión en CC, cada pico corresponde a un péptido o proteína; sin embargo, se desconoce a que proteínas corresponden y mucho menos su función (Wong et al., 2004).

Este trabajo, se aproxima a siete posibles proteínas diferenciales, una limitante de este trabajo es el tipo de tecnología que se empleo como herramienta de proteómica, pues no identifica a que proteínas corresponden, simplemente nos da un listado de las masas moleculares que pueden enmascarar a otras proteínas creando falsos positivos.

El grupo de Robinson-Bennett trato de identificar fosfoproteínas y elucidar el mecanismo que se ve afectado en las diferentes etapas de la neoplasia, para esto utilizo biopsias de cáncer cervical invasor obtenidas de pacientes con diagnóstico de cáncer cervical invasor en etapa I (n=6), etapa II (n=69) y etapa III (n=5), se incluyeron lesiones precancerosas (n=10) y muestras control (n=10), obtenidas de pacientes que requerían histerectomía por enfermedades benignas (fibroide o miomatosis), a traves de este estudio se identificaron dos proteínas diferencialmente expresadas Anexina A1 y ADN PKcs. La anexina A1 se encuentra sobreexpresada en las etapas de la neoplasia en comparación a las pacientes sin cáncer.

Esto sugiere que la fosforilación de estas dos proteínas en los residuos de tirosina pueden participar en la carcinógenesis y poseer un efecto sinérgico, así las lesiones precancerosas pueden evolucionar a cáncer (Robinson-Bennett et al., 2008).

Con este reporte se señala por primera vez la presencia de proteínas fosforiladas en los residuos de tirosina, que son importantes en la regulación de señalización

celular, y se ven alteradas desde las etapas precancerosas hasta progresar a cáncer invasor, pero proporcionan poca información, ya que pueden estar involucrados otros blancos fosforilados.

Un estudio más publicado en el 2008, identifican proteínas diferenciales de mujeres con cáncer cervical escamoso tratando de establecer el posible mecanismo molecular de la patogénesis de esta neoplasia (Zhu et al., 2009). Para este estudio se reclutaron 30 pacientes con cáncer cervical invasor confirmado (24 en etapa I y 6 en etapa II a), 10 pacientes se utilizaron para geles 2 DE e identificadas por MALDI-TOF/TOF y 20 mujeres con neoplasia para su validación con ensayos de western blot. Se identificaron un total de 32 proteínas, entre las que aumentaron su expresión se encuentran tirosina cinasa 2, proteína de unión a calcio S100A9, prolina 4-hidroxilasa, ACSS1, queratina 1 y la proteína de dedo de zinc 217 (ZNF217), mientras que otras proteínas presentan una disminución en su expresión como el receptor de las células T, mitocondrial ribosomal S15, vimentina, proteasa 60 del retículo endoplásmico y lamin A/C. Al validar los resultados de espectrometría de masas por Western Blot en las 20 pacientes, se encontró que la expresión de la proteína Tyk2 fue detectada en tejido cervical (presencia de esta proteína en 18/20 mujeres con cáncer y en 2 /20 mujeres sin cáncer), al mismo tiempo la presencia de la expresión de la proteína S100A9; esta fue encontrada en las 20/20 mujeres con cáncer cervical y en 4/20 mujeres sin cáncer. Mientras la proteína ZNF-217 se encontró en ambas mujeres con y sin cáncer cervical. Un estudio más para corroborar su presencia en el tejido cervical de estas proteínas, se hicieron ensayos de inmunohistoquímica en muestras de tejido, que confirmo la la presencia de estas tres proteínas (Tyk2, S100A9 y ZNF 217) en mujeres enfermas y en las mujeres control.

Por lo que sugiere que estas proteínas pueden estar involucradas en la carcinogénesis, y posiblemente puedan funcionar como biomarcadores de malignidad cervical, aunque es necesario analizar mayor número de muestras (Zhu et al., 2009).

Actualmente Escobar-Hoyos y colaboradores han publicado una aproximación de un biomarcador de pronóstico para lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado

y carcinoma de células escamosas, para ello emplearon tejido embebido en parafina e hicieron cortes con microdissección a láser, obteniendo el extracto proteico de las células epiteliales, y empleando una herramienta de proteómica como shotgun. De esto resulto la identificación de dos proteínas queratina 4 y 17, al validarse en varios grupos de mujeres sin cancer, con lesiones de bajo grado, alto grado y cancer se encontró que la queratina 17 se incrementaba de acuerdo al grado de lesión y evolución del cáncer por lo que se propone como una molécula blanco para la detección de cáncer in situ, ya que su mayor incremento de expresión proteico se presentaba en esta etapa, reconociendose como una molécula de pobre pronóstico de sobrevivida en mujeres con CC (Escobar-Hoyos et al., 2013).

Pero aún falta evaluar esta proteína en mayor números de muestras biológicas provenientes de mujeres sin lesión, con lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado, lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado, y cáncer. Además de confirmar, establecer el papel y mecanismo de la citoqueratina-17 en la evolución de lesiones intraepiteliales a cáncer, ya que es una proteína que se ha identificado en otros tipos de cáncer como el de ovario (Wang et al., 2013).

2.2.2.2 Citología cervical

Gu y cols., en 2007 determinara el análisis proteómico de las células obtenidas por citologías cervicales displásicas de alto grado, comparado con mujeres sanas, con el empleo de la tecnología de microdissección por captura de láser para aislar células asociadas a LSIL. Este grupo logro identificar más de 200 proteínas diferenciales de este estadio. Este grupo encontró que hay una sobre-regulación de proteínas nucleares y mitocondriales que podrían estar participando en daño celular y apoptosis, estas proteínas identificadas diferencialmente pueden servir para validar un biomarcador de enfermedad (Gu et al., 2007).

2.2.3 Identificación de proteínas diferenciales en fluidos biológicos.

2.2.3.1 Fluído cérvico vaginal

Un estudio con este tipo de muestra fue identificar y caracterizar la glicosilación de mucinas cervicales durante el ciclo menstrual se analizaron muestras de moco cervical (n=12) tomadas antes, durante y después de la ovulación de mujeres sanas.

Se identificaron un total de 194 proteínas, de las cuales las principales bandas correspondieron al receptor Poly Ig y albúmina. Las mucinas se analizaron por separado y se identificaron tres mucinas formadoras de gel, MUC5B la más abundante; MUC5AC es similar a MUC5B en tamaño pero menos abundante; y MUC6 solo se identificó en muestras tomadas antes de la ovulación. Las dos mucinas de membrana, MUC1 y 16 sólo se identificaron antes y durante la ovulación (Andersch et al., 2007).

2.2.3.2 Orina

La orina es un fluido accesible que contiene marcadores biológicos útiles, la cuantificación de proteínas en la orina ha sido utilizada desde hace muchos años para el diagnóstico y monitorización de muchas enfermedades como las renales. La orina se ha considerado el “fluido biopsia” del riñón y tracto urogenital, así muchos de los cambios anatómicos y funcionales que experimenta el tracto urogenital y el riñón pueden ser detectados en el proteoma urinario. Además, como filtrado de la sangre, contiene componentes proteicos que son similares a los encontrados en plasma y suero. Así, cambios patológicos que aparecen en otros órganos pueden detectarse en el plasma sanguíneo y por lo tanto, pueden ser detectados en el proteoma urinario.

Recientemente el grupo de Aobchey y cols., en (2013), buscaron marcadores de cáncer cervical en muestras de orina de tres grupos de pacientes: cáncer cervical, cáncer adenoescamoso y adenocarcinoma (IAI, IIB) comparados con orina de mujeres sanas, mediante geles de 2 DE y espectrometría se identificaron cuatro proteínas: Protocaderina-8, el receptor nuclear translocador tipo 2 de aril hidrocarburos, albúmina sérica y endorepentina; se validaron las cuatro proteínas por ensayos de Western Blot, pero sólo la endorepentina se validó en ensayos de Western Blot y nano LC-MS/MS en un grupo de mujeres con cáncer cervical y mujeres sin la enfermedad. Los resultados mostraron un incremento de su expresión proteica de endorepentina en mujeres con cáncer cervical en relación a las mujeres sanas (Aobchey et al., 2013); esta proteína posee propiedades antiangiogénicas, es decir, esta proteína protege contra el establecimiento del tumor, inhibiendo la angiogénesis, por lo que sería interesante continuar explorando este tipo de fluido

biológico, aún con el inconveniente de la alta concentración de sales, que interfieren con el análisis proteómico, también la falta de estandarización de protocolos de purificación de orina es otro inconveniente, ya que debe tenerse en cuenta la cantidad de proteína, calidad y depleción de proteínas abundantes.

Esta primera aproximación en orina, nos señala que se pueden encontrar moléculas para diagnóstico, tratamiento ó seguimiento de un fármaco de una patología, aunque es necesario ampliar el número de muestras para el análisis proteómico y validación, así como evaluar en otras etapas de la enfermedad.

2.2.3.3 Plasma

El plasma es una fuente rica de proteínas que proporciona información del estado de un individuo, por lo que resulta interesante explorar el proteoma de mujeres sin neoplasia y mujeres con neoplasia. Al comparar el proteoma, las proteínas diferenciales pueden ser funcionar como biomarcadores.

Utilizando SELDI-TOF se compararon muestras de plasma de mujeres control (n=37) con muestras de mujeres con carcinoma *in situ* (n=32) o con CC etapa I (n=46) y etapa II (n=14). Se encontraron dos picos diferentes que corresponden a dos proteínas presentes en carcinoma *in situ* y con CC, logrando diferenciar los grupos de mujeres sanas, con carcinoma *in situ* y cáncer invasor. Estos resultados permiten visualizar que en efecto hay proteínas diferenciales en la evolución de la enfermedad, pero el problema radica en la dificultad metodológica para identificar dichas proteínas (Lin et al., 2006).

Looi y cols., en 2009 publicaron un artículo del análisis del proteoma de plasma de mujeres NIC 3 y en mujeres con carcinoma cervical de células escamosas, encontrando tres proteínas que se encuentran desreguladas citoqueratina 19, clusterina y tetranectina. La primera se encuentra sobreexpresada en mujeres con carcinoma cervical de células escamosas, la clusterina esta sobreexpresada en pacientes con NIC 3 y baja la expresión en SCC, finalmente la tetranectina disminuye su expresión en mujeres con SCC, por sus características biológicas y asociación con la remodelación del tejido al estar en una etapa de cáncer ya a sido degradado el tejido por lo que se abate su expresión proteíca (Looi et al., 2009).

2.2.3.4 Suero

En un estudio de proteómica se estudiaron las proteínas más abundantes presentes en el suero de mujeres con carcinoma cervical escamoso (n=10), adenocarcinoma cervical (n=7) y mujeres sanas (n=13). En estos grupos de pacientes se encontraron proteínas alteradas en su expresión como: alfa-1-antitripsina, 1-B glicoproteína y antitrombina III. Además, hubo sobreexpresión de ABG, ATR y ZAG; y la expresión de AAT y KING fue significativamente baja. Con ensayos de ELISA competitiva se confirmó la expresión abundante de estas proteínas; con niveles altos de ABG y ATR a diferencia de AAT con niveles mínimos, ABG y ATT son proteínas secretoras pero se desconoce su función y ATR es un inhibidor de serin-proteasas por lo que se sugiere investigar su posible papel en CC (Abdul et al., 2007).

Un intento por buscar biomarcadores de detección de lesiones cervicales se realizó en el 2008, este estudio buscó caracterizar el perfil de proteínas en suero de mujeres con diferentes grados de lesión cervical a través de geles 2-DE, ellos encontraron que tres proteínas (haptoglobina, apolipoproteínas y transtiretina) que se encuentran en suero en grandes concentraciones se encontraron sobreexpresadas y aumentan conforme el grado de lesión hasta cáncer (Barba de la Rosa et al., 2008).

La publicación de Barba de la Rosa y cols., es el primer intento en buscar blancos moleculares en una muestra biológica como el **SUERO**, pues varios intentos se han hecho en muestras como tejido fresco ó embebido en parafina, fluidos cervicales, y una aproximación más cercana al plasma siendo el suero un fluido más que puede proporcionar información del estado de los diferentes sistemas del organismo.

3. OBJETIVO GENERAL

Establecer el perfil de expresión diferencial de proteínas presentes en el suero de mujeres sin infección cervical ó con neoplasia intraepitelial cervical (NIC 3), como una aproximación a la determinación de biomarcadores de malignidad cervical.

3.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- I. Determinar el patrón de proteínas en suero de mujeres sin infección.
- II. Determinar el patrón de proteínas en suero de mujeres con infección VPH-16 ó VPH-18 y con neoplasia intraepitelial cervical de grado 3.
- III. Realizar el análisis comparativo de los patrones de proteínas de cada grupo.
- IV. Analizar e identificar por espectrometría de masas las proteínas con mayor significancia estadística.
- V. Validar con ensayos de Western Blot las proteínas identificadas por espectrometría de masas.

4. HIPÓTESIS

El suero de las mujeres con infección (VPH-AR) y con lesión (NIC 3) presentan diferencias en el patrón de expresión de algunas proteínas cuando se les compara con los sueros de las mujeres sin infección.

5. JUSTIFICACIÓN

La importancia del suero como un medio valioso en el conocimiento del estado de los diferentes sistemas, sumado a la resolución efectiva y rápida de miles de proteínas por medio de la proteómica, constituyen una herramienta útil en el desarrollo de nuevos marcadores de diagnóstico y pronóstico en diversas enfermedades humanas.

Es por ello, que este trabajo de investigación pretende mediante herramientas proteómicas como electroforesis bidimensional (2D PAGE) y análisis bioinformático, determinar la expresión diferencial de proteínas en las pacientes con Neoplasia Intraepitelial Cervical de grado III, como una aproximación en la determinación de biomarcadores específicos, que podrían aportar al conocimiento de los procesos fisiológicos implicados en este tipo de patología.

6. METODOLOGÍA

Este protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Investigación, Ética y Bioseguridad del Instituto Nacional de Salud Pública en el que se llevo a cabo la parte experimental, así mismo fue aprobado por los Comités de Ética pertenecen al Instituto Mexicano del Seguro Social.

El grupo de mujeres Sanas o el grupo Control, que participaron fueron del Programa de Detección de VPH en el Estado de Morelos, y el grupo de mujeres con NIC III fueron reclutadas del servicio de Atención Oncológica del Hospital General Regional del Estado de Morelos del Instituto Mexicano del Seguro Social. Las mujeres que aceptaron participar firmaron una carta de consentimiento informado previamente revisado y autorizado por los diferentes comités de Ética (Anexo 1).

6.1 Consentimiento informado

De manera previa a la entrevista y a la toma de muestras, a cada mujer del grupo control o de casos se le daba por escrito y de manera verbal una explicación clara y detallada de su participación en el estudio (entrevista, toma de sangre, exudado vaginal para las pruebas de Pap y VPH). Posteriormente, se les solicitó su firma ó su huella dactilar para el consentimiento informado.

La toma de muestras biológicas, parte importante para el desarrollo de este proyecto se realizo en colaboración con un equipo multidisciplinario (especializado en cada área), Ginecólogos certificados en Colposcopia se encargaron del diagnóstico y toma de muestra biológica (tejido y células cervicales para análisis histopatológico, captura de híbridos y citología líquida),el Patólogo se encargo de revisar y analizar las biopsias para confirmar el diagnóstico de NIC 3, finalmente con ayuda de enfermeras se tomo la muestra de sangre para la obtención de suero y posteriormente fue procesada en el laboratorio del CISEI-INSP.

6.2 Población de Estudio

Mujeres entre 28 y 67 años, que aceptaron participar en el estudio mediante la firma de consentimiento informado y que cumplieron con los siguientes criterios de selección:

6.2.1 Criterios de inclusión

6.2.1.1 Grupo control

Mujeres de 28-67 años de edad, prueba de Papanicolaou negativa y VPH negativa, sin consumo de anticonceptivos hormonales (AH) en los últimos 6 meses, no haber recibido ningún tipo de vacuna contra VPH y que aceptaron participar libremente.

6.2.1.2 Grupo de casos

Mujeres entre 28 y 67 años de edad, con prueba de VPH positiva por Captura de Híbridos a cualquier tipo de virus oncogénico, con diagnóstico de neoplasia intraepitelial cervical NIC 3 realizado por el colposcopista, sin consumo de anticonceptivos hormonales (AH) en los últimos 6 meses y que aceptaron participar libremente. El tipo viral específico de cada paciente fue realizado por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), procedimiento que describe detalladamente en el apartado 6.7; y el grado de lesión fue confirmado por un Patólogo. Para el análisis del perfil de expresión de proteínas en los geles 2 DE se incluyeron solo muestras de suero de las mujeres que presentaron el genotipo VPH-16 y con diagnóstico confirmado de Lesión intraepitelial escamosa de alto grado por el servicio de Patología.

6.2.1.3 Criterios de exclusión

Las pacientes que no cumplieron con los criterios de inclusión.

6.3 Tamaño de la muestra

Este estudio fue de carácter exploratorio en muestras de suero de 5 mujeres del grupo control y 5 mujeres del grupo de Casos. Para el análisis del perfil de expresión de proteínas en los geles 2-DE se corrieron 3 geles por cada sujeto.

6.4 Colección de muestras biológicas

Sangre: La toma de sangre del grupo de mujeres control se realizó en el Servicio de Detección de VPH del IMSS, que llevan a cabo los Programas de Autotoma Vaginal en casa para la detección de VPH del Estado de Morelos y el **Grupo de Casos**, se tomó previos a la intervención para la conización en el Servicio de Ginecología. En

ambos casos se tomaron 3 ml de sangre por venopunción en tubos Vacutainer con gel separador SST™ específicos para obtención de suero. La sangre se dejó a temperatura ambiente una hora y posteriormente se centrifugó a 1300 x g, durante 15 minutos. Por último, se hicieron alícuotas de 100µl y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Células cervicales:

Para el **Grupo de mujeres control**, no se recolectaron células cervicales ya que ellas formaban parte del Programa de Autotoma Vaginal en casa para la detección de VPH del Estado de Morelos.

Estas células sólo fueron recolectadas para el **Grupo de mujeres de casos** y se colectó al inicio del procedimiento de conización por el Médico Colposcopista y se usaron para la detección por VPH-AR mediante la prueba diagnóstica *Hybrid Capture 2 (CH-II)* y para el análisis de citología líquida. Las muestras se obtuvieron mediante el cepillado del endocervix y fueron colocados para su transporte al Instituto Nacional de Salud Pública en un medio especial de conservación.

Tejido/biopsia : La toma de las biopsias se hicieron en dos tiempos: una al momento de la colposcopia para el diagnóstico histopatológico. La segunda toma se realizó al momento de la conización. Una sección se envió al servicio de Patología para confirmar el diagnóstico histopatológico de NIC 3. La otra sección se colocó en un criovial y se transportó en hielo seco al INSP para la tipificación del virus.

Es importante mencionar que el diagnóstico histológico de las muestras del grupo de casos fueron interpretadas por un sólo Patólogo certificado, del Hospital General Regional del IMSS del Estado de Morelos.

6.5 Prueba para el VPH-AR

Se tomó una muestra de células del canal endocervical para identificar el VPH-AR, empleando para ello el cepillo proporcionado con las instrucciones específicas del proveedor (Digene Cervical Sampler, Digene Corp., Gaithersburg, MD, EUA) (Digene Corporation, 1998); las muestras se conservaron a -4°C hasta su procesamiento, una semana después.

La técnica empleada para la identificación de VPH-AR fue CH-II (permite la detección cuantitativa y cualitativa de 13 tipos de ADN de VPH-AR (-16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59, -68).

La bióloga encargada de la realización de la Captura de Híbridos desconocía si la muestra procedía de casos o de controles.

Las muestras fueron desnaturalizadas y, posteriormente, la mezcla de las 13 se hibridizó con un cocktail específico de ácido ribonucleico (ARN) de VPH-AR. Se colocó cada muestra conteniendo el híbrido en una microplaca y posteriormente se agregaron anticuerpos antihíbridos conjugados con fosfatasa alcalina. Los anticuerpos específicos se detectaron con la adición de un sustrato quimioluminiscente (CDP-Star with Emerald II).

El sustrato reacciona con la fosfatasa alcalina unida a los híbridos emitiendo luz, la cual es medida como unidades relativas de luz (URL) en un luminómetro (DML 2000, Digene Corp.). La intensidad de la luz emitida denota la presencia o ausencia de ADN de VPH en las muestras. El control positivo es una solución con 1pg/ml de una construcción de ADN que contiene VPH-AR.

El punto de corte empleado para identificar presencia de DNA de VPH-AR fue 1.0 pg/ml=1 URL; es decir, las muestras <1.0 pg/ml fueron consideradas como negativas para DNA de VPH-AR, mientras que las ≥ 1.0 pg/ml se consideraron como positivas.

6.6 Tipificación del VPH en mujeres con NIC 3

La extracción y purificación del ADN genómico se realizó con el estuche comercial Gemonic DNA Purification Kit (Thermo Scientific), el cual se basa en la precipitación de ADN con detergentes.

Las muestras de tejido de cervix (~25 a 30 mg) se pulverizaron con nitrógeno líquido y se colocaron en tubos de 1.5 ml con 400 μ l de solución de lisis, se incubaron a 65°C durante 10 min., se les adicionó 600 μ l de cloroformo, mezclando suavemente por inversión de 3 a 5 veces, se centrifugaron a 9400 x g por 2 min.

Se transfirió la parte superior acuosa que contiene el ADN a un tubo nuevo, se adicionó 800 μ l de solución precipitante, y se mezcló por inversión a temperatura ambiente durante 2 min, y se centrifugó 9400 x g por 2 min.

Al obtener el pellet, se resuspendió con 300 µl de etanol absoluto frío, se incubó la mezcla durante 10 min a -20°C, posteriormente se centrifugó a 9400 x g por 4 min., y se eliminó el sobrenadante. Para lavar el ADN se utilizó etanol frío al 70%. El ADN se resuspendió en 100 µl de H₂O desionizada estéril y se almacenó a -20°C para su análisis posterior.

6.6.1 Verificación de la integridad del ADN

Para verificar la integridad del ADN de las muestras, se realizó una PCR que amplificó un fragmento de 450 pb del gen constitutivo G₃PDH. La mezcla de reacción fue preparada de la siguiente manera: solución amortiguadora de PCR 1X, MgCl₂ 1.5 mM, mezcla de dNTPs 0.2 mM, 15 pmoles del oligonucleótido sentido (5' ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC 3'), 5 U/µL de Taq ADN polimerasa, 100 ng de ADN genómico y se ajustó a un volumen final de 25 µL por reacción.

La PCR se realizó en un termociclador (Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400) bajo las siguientes condiciones: un paso de desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, 25 ciclos con un período de desnaturalización a 94°C por 1 min, una fase de alineamiento a 57°C por 1 min, un período de extensión a 72°C por 1 min, y un paso final de extensión a 72°C por 5 min. Los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa al 1%. Con buffer TAE 1X el gel se tiñó en solución de TAE IX, bromuro de etidio, el producto de PCR fue visualizado, en un transiluminador con luz ultravioleta.

6.6.2 Reacción en cadena de la polimerasa del gen L1 del VPH

Para verificar los resultados positivos al VPH, se realizó la amplificación por PCR de un fragmento del gen L1 del VPH (450 pb aproximadamente). La mezcla de reacción fue preparada de la siguiente manera: buffer de PCR 1X, MgCl₂ 2mM, mezcla de dNTPs 0.2 mM, 20 picomoles del oligonucleótido MY11 (5' GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG 3') y 20 picomoles MY09 (5' CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC 3'), 5 U/µL de Taq polimerasa, 500 ng de ADN genómico y se ajustó a un volumen final de 25 µl por reacción.

La PCR se realizó en un termociclador (Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400) bajo las siguientes condiciones: un paso de desnaturalización inicial a 94°C por 5

min, 35 ciclos con un período de desnaturalización a 94°C por 45 seg, una fase de alineamiento a 55°C por 1 min, un período de extensión a 72°C por 1.30 min, y un paso final de extensión a 72°C por 10 min. Los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa al 1.5 % con buffer TAE 1X. El gel se tiñó en solución de TAE IX con bromuro de etidio y el producto de PCR fue visualizado en un traniluminador con luz ultravioleta.

Para determinar el tipo de VPH, se realizó la técnica de secuenciación de los productos de PCR. El producto amplificado se corrió electroforéticamente en geles de agarosa al 2%, se purificó con el kit comercial de QIAGEN. El fragmento purificado se envió al Servicio de Secuenciación del INSP, empleando el secuenciador *Genetic Analyzer 3100*). Para el análisis de las secuencias se utilizó el programa de *Chromas 144-95* y la secuencia obtenida se incorporó a un banco de datos (BLAST) para su comparación con las secuencias del ADN existentes del VPH.

6.7 Estrategia general para el estudio del proteoma

6.7.1. Procesamiento de la muestra (suero).

Primeramente se eliminó la albúmina e inmunoglobulina G (IgG) de las muestras de suero, se utilizó el kit comercial ProteoSeek™ Albumin/IgG removal Kit (Pierce). Este kit consiste en la eliminación del 80% de proteínas de gran abundancia en suero como albúmina e IgG a través de una columna de alta afinidad a este tipo de proteínas. Posteriormente se eliminaron sustancias interferentes como detergentes, sales, lípidos, ácidos nucleicos, ácidos fenólicos, etc., utilizando el kit comercial *2-D Clean Up (Amersham Biosciences)*. La cuantificación de las proteínas se realizó con el kit comercial *2-D Quant (Amersham Biosciences)*.

6.7.2 Geles de primera dimensión o isoelectroenfoque

Una alícuota de 200 µg de proteína se mezcló con buffer de rehidratación (Urea 8M, CHAPs 2%, solución amortiguadora IPG-2D 0.5% pH 3-10, azul de bromofenol 0.002%, DTT 0.56 M) para completar un volumen final de 250-300 µl. A cada alícuota se le agregó 1 µl de solución IPG y 0.00056 g de DTT. Una vez hecha la mezcla, esta se depositó a todo lo largo del sarcófago ó contenedor de porcelana y se cubre con el gel de separación (Immobiline Dry Strip pH 3-10 NL y de 4-7, de

13cm de acuerdo a las indicaciones del proveedor (*Manual de 2 D Electrophoresis, General Electric*), y aceite mineral (*Drystrip Cover Fluid*) con la finalidad de evitar la evaporación de la muestra. Por último, los sarcófagos se colocaron en el equipo de Isoelectroenfoque Ettan IPGphor. El tiempo de rehidratación fue de 14 hrs., a una corriente constante de 50 μ A por tira. Los voltajes utilizados para el isoelectroenfoque (IEF) fueron de 500, 1000, 8000 y 8000 Voltaje/h. Transcurrido el tiempo de isoelectroenfoque, los geles se equilibraron en un buffer de equilibrio (Tris-HCl 50 mM pH 8.8, urea 6M, Glicerol 30%, SDS 2%, azul de bromofenol 0.002%, agua miliQ c.b.p 15 ml) suplementado con DTT (50mg/5ml) durante 15 minutos y posteriormente con iodoacetamida (125 mg/5 ml) durante el mismo tiempo.

6.7.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE o segunda dimensión

Después de equilibrar los geles de primera dimensión, se realizó la separación de proteínas en geles de poliacrilamida SDS-PAGE según la técnica descrita por La, en geles de gradiente 7.5-20%, con un gel concentrador al 4%. La separación de las proteínas se realizó a un voltaje constante de 150V, utilizando la solución de corrida Tris-glicina IX (Tris-Base 25 mM, SDS 0.1%, glicina 192 mM, agua destilada), durante ~5.30 hrs. Después de la electroforesis, las proteínas contenidas en los geles se tiñen con Azul de Coomassie Coloidal G-250, de acuerdo a la técnica descrita por *Anderson et al, 1991*.

6.7.4. Análisis de los Geles 2-DE-SDS-PAGE

Los geles teñidos con Coomassie fueron escaneados en el Scanner LabScan™_5.0 (*General Electric*) y el análisis de los “spots ó manchas” se realizó en el programa específico para geles de doble dimensión (*ImageMaster 2D Platinum 6.0. General Electric*). Cada imagen y sus replicas fueron utilizadas para construir un gel maestro (imagen sintética), en el que se incluyeron todos los “spots ó manchas” que hicieron solapamiento (match) en experimentos independientes. Los geles maestros obtenidos de cada condición (grupo control *vs* grupo de casos) fueron comparados entre sí para buscar “spots ó manchas” comunes y puntos únicos de cada uno.

A lo largo del análisis de los geles 2-DE con el programa ImageMaster (<http://www.genebio.com/products/melanie>) se realizó una inspección con ayuda de los geles originales.

Para determinar si una proteína se expresaba de manera diferencial, se considero que el cambio relativo de expresión era estadísticamente significativo si el análisis de varianza (ANOVA) arrojaba un valor de $p < 0,05$ y el valor de proporcionalidad era igual o superior a 1,5.

De acuerdo a esta condición, se seleccionaron algunos “spots ó manchas” para su análisis por espectrometría de masas la identificación de las proteínas se realizó a través del programa MASCOT (<http://www.matrixscience.com>).

6.7.5 Identificación de proteínas por Espectrometría de Masas ESI/TOF-TOF

El análisis de los “spots ó manchas” por espectrometría de masas ESI/TOF-TOF y la Identificación de proteínas se realizó en el laboratorio de Péptidos y Proteínas, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM.

A continuación se mencionan los protocolos que se siguieron:

6.7.5.1 Corte y destinción de “spots ó manchas”

Los “spots ó manchas” seleccionados se cortaron manualmente del gel 2-DE teñido con Coomassie Coloidal G-250, en fragmentos de $0.5-1\text{mm}^3$ y se colocaron en tubos de 1.5 ml (tubos lavados previamente con metanol 10%, para evitar queratinas (proteínas contaminantes)). El colorante y el SDS residual se eliminaron mediante dos lavados de 12 horas y 4 h, respectivamente, con solución de metanol al 50% (v/v) y ácido acético 5% (v/v).

Los fragmentos (“spots ó manchas”) se deshidrataron con acetonitrilo al 100%, se secaron completamente por centrifugación con vacío. Las proteínas se redujeron mediante la hidratación de los fragmentos de gel con una solución DTT 10 mM en bicarbonato de amonio (NH_4HCO_3) 100 mM pH 8.0. Los fragmentos se incubaron en esta solución a 56°C durante 1 h. Posteriormente, se retiró la solución de DTT y se añadió una solución de iodoacetamida 100 mM en el mismo amortiguador incubando durante 45 minutos en obscuridad a TA. A continuación, la solución de iodoacetamida se retiró y los fragmentos del gel se deshidrataron con acetonitrilo

100% y se rehidrataron con NH_4HCO_3 100 mM incubando 10 min a TA. Este proceso se repitió dos veces.

6.7.5.2 Digestión de proteínas con tripsina

La digestión de las proteínas se realizó mediante la rehidratación de los fragmentos en una solución de tripsina modificada grado secuenciación en NH_4HCO_3 50 mM para obtener una concentración final de tripsina de 20 ng/mL.

La rehidratación se llevó a cabo en hielo durante 45 min con agitación ocasional. Los fragmentos del gel, se concentraron en el fondo del tubo mediante centrifugación durante 60 s descartando el exceso de la solución de tripsina y se añadieron 10 mL de amortiguador para su incubación a 37°C durante 12-16 h.

Los péptidos obtenidos a partir de la digestión se extrajeron colectando los sobrenadantes de una incubación con NH_4HCO_3 20 mM y de tres incubaciones de 30 min cada una con sonicación y agitación en la solución de extracción de acetonitrilo 50% (v/v) y ácido fórmico 5% (v/v). El volumen del extracto se redujo a un volumen menor a 20 μL por evaporación centrifugando con vacío a TA.

Las sales que pudieron interferir con la ionización por electrospray (ESI), se quitaron empleando puntas Zip Tip C18 (puntas con medio de cromatografía en fase reversa C18 (Zip Tip)) se siguió el protocolo de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Millipore, Bedford, MA, USA).

6.7.5.3 Análisis por Espectrometría de Masas (LC-ESI/TOF-MS)

Se tomó un volumen de 8 μL de cada muestra, fue introducida a una columna Zorbax C18 (75 μm de diámetro x 15 cm de largo) y los péptidos se separaron con un gradiente de elusión de 2% acetonitrilo, 0.1% ácido fórmico, 60% de acetonitrilo, 0.1% ácido fórmico a una velocidad de flujo de 0.3 $\mu\text{L}/\text{min}$ durante de 60 min.

El análisis de la secuencia de los péptidos se llevó a cabo en un espectrómetro de masas híbrido triple cuádrupolo-trampa de iones lineal (3200 Q TRAP, Applied Biosystems) acoplado en línea a un automuestreador (Agilent 1100 Series) con un sistema de cromatografía líquida de alta precisión (UPLC). En este sistema, se adquirió un espectro de resolución incrementada (MS) para determinar la intensidad y relación m/z de los péptidos eluidos. Los péptidos que mostraron una

mayor intensidad se sometieron a un análisis de espectro de resolución incrementado para la determinación de su carga. Los péptidos con cargas entre +2 y +4 seleccionados se fragmentaron con voltaje y colisión con N₂. La energía de colisión fue seleccionada de acuerdo con la masa y carga de cada péptido.

Los iones producto fueron concentrados y su masa fue analizada en Q3.

Las proteínas fueron identificadas a partir de los espectros MS/MS empleando el motor de búsqueda Mascot (Versión 1.6b9, Matrix Science, London, UK), se consultó la base de datos para la identificación de las proteínas ([NCBI Inr 20080229, _6.5 _ 106 entries, National Center for Biotechnology Information, Bethesda US](#)) (Perkins et al., 1999).

6.8 Validación por Western Blot

Las muestras de suero utilizadas para este ensayo fueron tomadas de un grupo de 25 controles y 30 casos (NIC 3) que fueron reclutadas a lo largo del estudio y a las cuales se les realizaron las pruebas de captura de híbridos, citología líquida, colposcopia (solo el grupo de casos) y un estudio histopatológico (solo el grupo de casos). Los sueros de las mujeres que fueron usados para el estudio del proteoma quedaron incluidos dentro de este ensayo.

Para el análisis de la expresión de las proteínas C3 y A1BG por Western Blot se usó una alícuota de 20 µg de proteína total de suero las cuales fueron separadas en geles unidimensionales SDS-PAGE al 10% y posteriormente transferidas a membranas PVDF (Hybond, Amersham Biosciences). Las membranas PVDF fueron bloqueadas por 1 h en 0.1% Tween 20, 5% leche semidescremada en TBS, a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios A1BG (mouse monoclonal Ig-G anti-A1BG) y C3 (mouse monoclonal Ig-G anti-human Complement C3), fueron diluidos en 0.1% Tween 20, 5% leche semidescremada en TBS y las membranas se incubaron a 4°C durante toda la noche. La concentración del anticuerpo utilizado en cada caso fue de 1:2000 (mouse monoclonal Ig-G anti-A1BG) y 1:1000 (mouse monoclonal Ig-G anti-human Complement C3). Ambos anticuerpos fueron comprados a la compañía Santa Cruz, CA, USA.

Transcurrido este tiempo las membranas fueron lavadas con 0.1% Tween 20 en TBS y se incubaron (1 h) en presencia del segundo anticuerpo (Goat-anti-mouse IgG-

HRP; Santa Cruz, USA) a una dilución 1:2000. La actividad de la peroxidasa fue visualizado por colorimetría usando TMB (3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine; Invitrogen, CA, USA).

Posterior a la inmunodetección, las membranas fueron lavadas dos veces con TBS y teñidas con 0.1% de Azul de Coomassie R-350 (General Electric, 2012), de acuerdo al método descrito por Welinder y Ekblad (2011), se emplearon como control de carga para la normalización de proteínas (Welinder y Ekblad, 2011).

La cuantificación densitométrica de las bandas se determino mediante el uso del programa Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Las unidades relativas (UR) de expresión de las proteínas para C3 y A1BG, fueron calculadas dividiendo los valores de densidad óptica (DO) de las bandas problema entre los valores de las DO bandas teñidas con azul brillante de Coomassie. Las diferencias entre grupos fueron calculadas con la prueba de t-Student, tomado un valor de significancia de $p \leq 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 Características de la Muestra

Las características de la población a partir de las cuales se tomaron las muestras de tejido y sangre, para el análisis del proteoma en geles 2D, se pueden observar en la **Tabla 2**. En general, todas las mujeres del grupo control tenían un resultado de PAP normal y fueron negativas para virus oncogénicos, en tanto que las pertenecientes al grupo de casos presentaron un resultado de PAP anormal, fueron positivas para los virus oncogénicos, tipo viral VPH-16 y VPH-18 confirmado por secuenciación y con un diagnóstico de lesión intraepitelial escamoso de alto grado (NIC 3) confirmado por el servicio de histopatología del Hospital. El promedio de edad de las mujeres del grupo control fue de 40.8 ± 3.7 y en los casos de 46.5 ± 15.48 , encontrándose una mediana muy similar para ambos grupos (41 vs 42) respectivamente. Para el análisis del proteoma del grupo de mujeres con NIC 3, se incluyeron neoplasias cervicales (NIC 3) con infecciones virales VPH-16 o VPH-18, genotipos más frecuentes en la población de muestras que se colectaron en el Hospital Regional del IMSS, del estado de Morelos.

7.2 Tipificación del VPH en el Grupo de mujeres de Casos (NIC 3)

De las muestras recolectadas de las mujeres con NIC 3, se obtuvo tejido de la lesión, de estas muestras, se realizó la extracción y purificación del ADN genómico con el Kit Genomic DNA Purification (Fermentas LIFE SCIENCES) de acuerdo al protocolo especificado en la hoja técnica.

Para verificar la integridad del ADN de las muestras, se realizó una PCR que amplificó un fragmento de 450 pb del gen constitutivo G₃PDH (**ver figura 6A**). Estas mujeres con diagnóstico NIC 3, al formar parte de este grupo y como criterio de inclusión, en primera instancia se les realizó captura de Híbridos que detectó a VPH oncogénicos y fueron positivas, se les realizó una segunda prueba que consistió en realizar una PCR para amplificar un fragmento del gen L1 del VPH (450 pb aproximadamente). Para rectificar algunas muestras que no se visualizaron claramente se procedió a realizar una nueva amplificación con otros oligonucleótidos (MY09-MY11) que amplifican para otro sitio de la región L1 (ver

figura 6B). Para la amplificación de los tipos específicos de VPH se amplificó el gen E6 de VPH-16 y VPH-18 (**figura C-D**). Posteriormente para confirmar los tipos virales amplificados (VPH-16 y -18), el producto de la PCR amplificado, se purificó, cuantificó y fueron directamente secuenciadas con BigDye Terminator v3-1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem), de acuerdo al protocolo que establece la casa comercial. Las secuencias fueron alineadas usando el programa BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/html>).

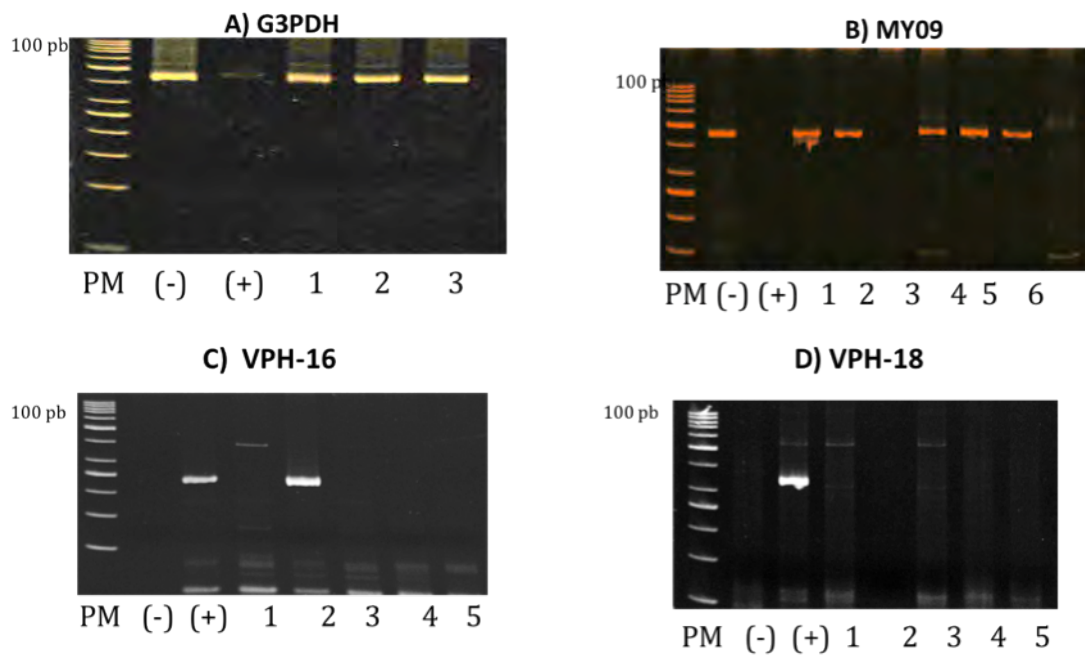


Figura 6. Imagen Representativa con muestras amplificadas para el gen a) G3PDH, b) MY09, c) VPH-16 y d) VPH-18.

En la tabla 2, se muestran el tipo viral que detecto en cada paciente del grupo de casos que se incluyo para realizar lo geles bidimensionales.

MUESTRA (N)	Código	Edad (años)	Prueba de PAP	Prueba de CH-II	COLPOSCOPIA	DX. HISTOPATOLÓGICO	GENOTIPO VPH
GRUPO DE MUJERES CONTROL							
1	C1-IMSS	38	Citología Normal	(-)	NA	NA	NA
2	C2-IMSS	41	Citología Normal	(-)	NA	NA	NA
3	C3-IMSS	47	Citología Normal	(-)	NA	NA	NA
4	C4-IMSS	47	Citología Normal	(-)	NA	NA	NA
5	C7-IMSS	40	Citología Normal	(-)	NA	NA	NA
GRUPO DE MUJERES DE CASOS							
1	T1-IMSS	65	Citología Anormal	(+)	HSIL	NIC III	16
2	T3-IMSS	60	Citología Anormal	(+)	HSIL	NIC III	18
3	T7-IMSS	42	Citología Anormal	(+)	HSIL	NIC III	18
4	T8-IMSS	32	Citología Anormal	(+)	HSIL	NIC III	16
5	T10-IMSS	28	Citología Anormal	(+)	HSIL	NIC III	16

Tabla 2. Características del grupo de mujeres control y el grupo de mujeres de casos que se incluyeron para la realización de los geles de 2 DE. Al final de la tabla, se muestra el genotipo viral de las pacientes del grupo de Casos, incluidas en los geles 2 DE. Abreviaciones en la tabla. NA (no aplica debido a consideraciones Éticas y carencia de indicaciones médicas); (-) NEGATIVO y (+) POSITIVO a VPH-AR.

7.3 Análisis de los Geles 2-DE

Posterior a la tinción, los geles fueron escaneados en el equipo LabScan TM 5.0 (Amersam Biosciences). Las imágenes digitales fueron utilizadas para la detección y el análisis con el programa "ImageMaster 2 D Platinum 6.0" (General Electric, 2005), los cuales se guardaron en un formato **tiff** y en formato **mel**. La resolución de las imágenes fue de 200 dpi (*dot per inch*) recomendada por el manual y todas las imágenes se manejaron a escala 1:1.

La calibración de la intensidad de las imágenes se realizó con valores crudos en píxeles (unidad básica de las imágenes representada por las coordenadas X y Y) en escala de grises fue 12 bit/imagen, recomendado por el manual. Se ajustó el contraste de las imágenes del parámetro Bending-1, usando como unidades *Value y Porcentual (%)*.

Para el análisis se utilizaron 30 imágenes en formato mel, 15 imágenes correspondientes a mujeres del Grupo Control y 15 imágenes a mujeres del Grupo de Casos, con la finalidad de obtener el análisis cuantitativo de la expresión de las proteínas, se llevó la medición de parámetros intrínsecos: a) intensidad, b) volumen, c) área, d) % de intensidad y e) % de volumen.

Al hacer el análisis en ambos grupos, el programa emite un reporte de spots, el cual proporciona una lista total de spots reales de cada uno de los geles que incluye: nombre de identificación ID y el número de ID (asignado por el programa), las coordenadas X y Y, los valores de pI, peso molecular, intensidad, % de intensidad, volumen, % de volumen, área y *saliency* de cada spot.

Para detectar la expresión diferencial de proteínas de ambos grupos de estudio, se realizó un proceso llamado "*matching* ó solapamiento". Las imágenes de los geles del mismo grupo fueron agrupadas en un "Match set", primero por triplicado de cada mujer y luego por grupo, del cual se obtuvo un gel de referencia ó gel "Master" que representa los spots presentes en dicha condición, obteniéndose así un segundo gel "Master" del grupo de mujeres sanas (Control) y un segundo gel "Master" del grupo de mujeres con Neoplasia Intraepitelial de grado III. Los datos se presentaron en el reporte "Matching" que contiene: nombre ID y número ID de los spots "Match", coordenadas X y Y, valores de pI, peso molecular y % de volumen para cada grupo.

Una vez que se integraron los datos se eligieron los siguientes Parámetros:

1. Analizar y seleccionar spots **presentes sólo en el Grupo de Casos y ausentes en el Grupo Control**.

2. Analizar y seleccionar spots **presentes en el grupo Control y ausentes en el Grupo de Casos**.

3. Analizar y seleccionar spots en ambos Grupos en relación a su expresión proteica. Además se estableció un criterio de selección para cortar el spot, que estuviese **presente en 8 geles de 15 geles de cada grupo**, es decir que se encuentre el spot en la mayoría de los de los geles que conforman cada grupo.

El número de “spots” o manchas que hicieron “match” o empalme entre los geles del grupo de mujeres Control fue de (337); en tanto que en el grupo de mujeres NIC III se registraron (516). El match de ambos grupos de este estudio dio como resultado la generación de (189) matches comunes.

Estos últimos (189) que hicieron matches fueron utilizadas para analizar los tres parámetros, los resultados se señalan en la **tabla 3**.

CONDICIÓN	CONTROL	CASOS
PRESENCIA	(13)	0
AUSENCIA	0	(9)
AMBOS GRUPOS	42	42

Tabla 3. Matches analizados en los 15 geles de cada grupo. En color rojo aparecen los nueve spots diferenciales, es decir presentes sólo en el grupo de casos. En color negro, los spots presentes en el grupo control y los spots que aparecen en ambos grupos, de acuerdo a los parámetros del software ImageMaster 6.0v Platinum.

Para el primer parámetro, se encontraron 9 *matches* del Grupo de casos, el programa le asignó un número de identidad a cada *spot* (valores que se muestran en la **tabla 3 y 4**) por lo tanto, se observa la presencia del *spot* a lo largo de los quince geles que comprenden el grupo de casos.

NUM. DE MATCH	"SPOTS" CONTENIDOS EN EL MATCH																
74	-	-	-	5947	6482	6314	10932	11514	10209	8751	-	-	11869	111	109	115	11/15
78	81	76	65	5962	6507	6340	10936	11554	10214	-	-	-	-	-	-	-	9/15
131	104	94	88	6000	6548	6379	10998	11605	-	-	-	-	-	153	145	150	11/15
151	125	110	-	6012	6566	6397	11026	11646	10282	-	-	-	-	-	-	-	8/15
157	122	111	111	-	-	-	11033	11652	10287	8796	11478	11907	-	-	-	-	9/15
160	131	-	114	6021	6575	-	11037	11657	10295	8784	-	-	-	186	167	168	11/15
167	140	114	133	-	-	-	11075	11689	10308	8819	11510	11942	205	-	-	-	10/15
169	-	-	-	6027	6591	6406	11124	-	10318	8823	11547	11967	-	-	-	-	8/15

Tabla 4. Matcheo de los spots diferenciales que se encuentren presentes en el Grupo de casos y ausentes en el grupo control. Este análisis se procesó en el software ImageMaster Platinum versión 6.0 (*General Electric*).

Estos nueve spots, se eligieron cortar para identificarse porque estaban presentes en 8 de 11 geles, es decir, estas proteínas son propias de la lesión y no debido a artefactos de la técnica de 2 DE, tinción ó variabilidad biológica..

Para el segundo parámetro, se localizaron 13 matches (ver **tabla 3**), es decir 13 puntos ó proteínas sólo **presentes en el grupo de mujeres Control** y **ausentes** en el grupo de mujeres que comprendían los **Casos**, es decir proteínas que se expresan de manera normal en el organismo, pero la presencia de una lesión precancerosa inhibe estas moléculas, de tal forma que hay ausencia de ellas en el grupo de casos.

En el último parámetro, se encuentran la mayoría de las proteínas que están presentes en ambos grupos (42:42 spots (**ver tabla 3**)), es decir, proteínas que posiblemente están siendo desreguladas en su expresión pudiendo incrementar ó

disminuir la concentración de proteína dependientes de la lesión.; las proteínas faltantes no se agruparon en ninguno de estos parámetros, su localización era dudosa, establecidos es común encontrar artefactos como spots siendo una limitante del software.

De los tres grupos de la **tabla 3**, sólo se enfocó analizar el grupo de spots **presentes en el grupo de casos y ausentes en el grupo control**, proteínas propias de la lesión cervical y podrían funcionar como moléculas de malignidad cervical.

Con el objetivo de identificar las proteínas que cumplieran con el primer parámetro, los nueve spots diferenciales se observa en **la figura 7**, la posición de los spots en un gel de 2 DE SDS-PAGE en gradiente (20-7.5%, tiras de pI 4-7 de 13 cm), teñido con Coomassie G-250., de la muestra de suero depletado de Alb e IgG. Estos spots presentan un número de identificación otorgados por el software Image Master; se cortaron, digirieron y se identificaron por espectrometría de masas en tándem (ESI/MS-MS).

El rango del peso molecular de los spots a identificar, oscila entre 12-500 kDa, encontrando proteínas de bajo y alto peso molecular que se separan a lo largo del pI de 4-7.

Para su ionización en el equipo ESI/MS-MS e identificación se tomó como parámetro el pico de la masa del péptido para ser comparado con la base de datos NCBIInr. En la **tabla 5** se muestra el listado de proteínas, de los nueve spots enviados a secuenciar e identificar sólo se identificaron ocho proteínas una de ellas no se identificó la proteína (15) posiblemente no se detectaron los iones en el equipo de masas que no alcanzó a obtener su espectro de ionización ó debido a que la base de datos NCBIInr con la que se comparó aún no está.

Los spots identificados corresponden a cuatro proteínas A1BG, complemento C3, apolipoproteínas y haptoglobina expresadas en el suero de mujeres con neoplasia cervical intraepitelal 3. Las proteínas al migrar a través de la malla de acrilamida se rompen por proteasas propias de la muestra, por lo que su separación por peso molecular y punto isoeléctrico se ve modificado y aparece la misma proteína en posición diferente, sólo la base de datos con su patrón de ionización y regiones de la

proteína altamente conservadas permite reconocerla e identificarla como la misma proteína.

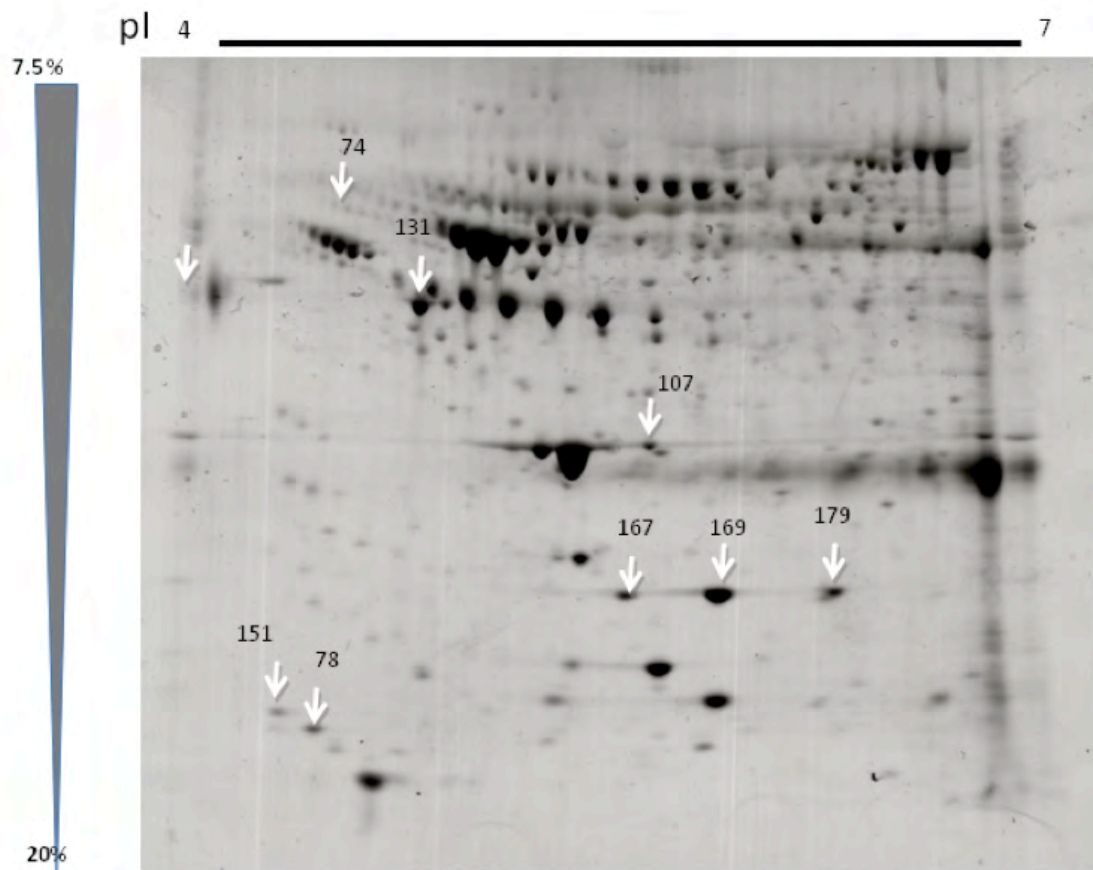


Figura 7. Mapa de 2-DE-SDS-PAGE de una muestra de suero NIC 3. Las flechas indican los “puntos ó manchas” que se seleccionaron para el análisis por espectrometría de masas y su identificación. El fue número asignado de acuerdo al Software de análisis ImageMater (<http://www.genebio.com/products/melanie/>).

Número de Spot en el gel	Número de Acceso	Descripción	Función	Score	Número de Péptidos Matcheados	Cobertura (%)	MW (kDa)	pI Calculado
74	gi69990	<i>Alfa-1-B-glicoproteína</i>	Desconocida	96	6(2)	5(2)	51908	6.23
78	gi78101271	<i>complement component C3</i>	Sistema Inmune	128	18(3)	13(5)	39463	6.23
107	gi178775	Proalipoproteína	Componentes de Triglicéridos y Lipoproteínas de Alta densidad	474	36(12)	13(9)	28944	6.23
131	gi52120	Apolipoproteína	Componentes de Triglicéridos y Lipoproteínas de Alta densidad	474	36(12)	13(9)	28944	5.23
15	gi521205	Apolipoproteína CIII	Componentes de Triglicéridos y Lipoproteínas de Alta densidad	57	5(1)	3(1)	10815	5.65
167	gi22397	Haptoglobina H2	Antioxidante, angiogenesis, efectos inflamatorios	142	13(3)	8(4)	41717	5.45
169	gi223976	Haptoglobina H2	Antioxidante, angiogenesis, efectos inflamatorios	204	21(4)	100	41717	5.45
179	gi296653	Haptoglobina H2	Antioxidante, angiogenesis, efectos inflamatori	142	13(3)	100	41499	5.

TABLA 5. Listado de Proteínas. Proteínas analizadas por ESI/TOF-TOF e identificadas por MASCOT. En rojo se muestran una de las posibles proteínas candidatas para NIC III.

7.4 Validación de C3 y A1BG por ensayos de Western Blot

Para confirmar algunos de los datos obtenidos tras el análisis de electroforesis bidimensional (2 DE) de suero depletado de pacientes con NIC 3 y pacientes sin la enfermedad, se utilizó la técnica de Western Blot. Al aplicar este método, se corroboró la presencia y la expresión de dos proteínas de cuatro identificadas. Se eligió validar A1BG y el complemento C3, dos proteínas abundantes en suero. Estas proteínas no se habían reportado en mujeres con lesiones intraepiteliales de alto grado y además ambas proteínas pertenecían al sistema inmune que podría haber sido alterado por el grado de lesión.

La población que se incluyó para este estudio, se tomó del servicio de Detección de VPH del Hospital Regional del IMSS, del estado de Morelos, los criterios de inclusión fueron los mismos que se tomaron para el perfil de expresión proteico por geles bidimensionales, a excepción de la tipificación del VPH de las mujeres, se incluyeron a mujeres con NIC 3 infectadas con VHP oncogénicos, es decir mujeres que presentaban una lesión NIC 3 sin importar tipo viral que ocasionó la infección, para este estudio también se incluyeron el suero de las pacientes que se utilizaron para el perfil proteico. En la **tabla 6**, se describen las características de las participantes cuyos sueros fueron incluidos para este ensayo y los criterios de inclusión se encuentran en la sección de metodología, este grupo de 25 mujeres conformaba el grupo de Casos, para el grupo control se tomaron 30 sueros de mujeres del programa de autotoma vaginal y detección de VPH del estado de Morelos, los criterios de inclusión se encuentran en la sección de metodología.

Individuos (n)	ID	PRUEBA DE CAPTURA DE HÍBRIDOS (CH-II)	GENOTIPO VPH	ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO (BIOPSIA CONFIRMATORIA)
1	N002	POSITIVO	16	NIC III
2	N003	POSITIVO	16	NIC III
3	N004	POSITIVO	16	NIC III
4	N005	POSITIVO	16	NIC III
5	N007	POSITIVO	16	NIC III
6	N009	POSITIVO	16	NIC III
7	N012	POSITIVO	16	NIC III
8	N014	POSITIVO	16	NIC III
9	N016	POSITIVO	16	NIC III
10	N017	POSITIVO	16	NIC III
11	N020	POSITIVO	16	NIC III
12	N021	POSITIVO	16	NIC III
13	N023	POSITIVO	16	NIC III
14	N025	POSITIVO	18	NIC III
15	N006	POSITIVO	56	NIC III
16	N010	POSITIVO	58	NIC III
17	N015	POSITIVO	33	NIC III
18	N018	POSITIVO	33	NIC III
19	N013	POSITIVO	18	NIC III
20	N008	POSITIVO	NI	NIC III
21	N011	POSITIVO	NI	NIC III
22	N019	POSITIVO	NI	NIC III
23	N022	POSITIVO	NI	NIC III
24	N024	POSITIVO	NI	NIC III
25	N001	POSITIVO	NI	NIC III

Tabla 6. Características de la Población para los ensayos de validación. Mujeres incluidas para validar por ensayos de Western Blot las proteínas C3 y A1BG. En color naranja se muestra la columna de los diferentes genotipos VPH de las pacientes. La abreviatura NI (No se pudo identificar el genotipo viral).

En la **figura 8A)** se muestra una imagen representativa del Western Blot correspondiente a la expresión de A1BG y C3 en el suero de mujeres con diagnóstico de lesión NIC 3 (n=25) y en un grupo control sano (n=30) en donde se puede observar que las muestras de suero de las mujeres con NIC 3 presentan un incremento de su expresión de ambas proteínas en relación con el grupo control. **7B)** La figura muestra la densidad relativa de las bandas en los diferentes grupos que fue normalizada con un control de carga interno (CBB). Las diferencias estadísticas de las densidades relativas entre grupo fueron calculadas mediante la t-student (**Figura B**).

Se observó que la densidad relativa de las bandas de ambas proteínas es mayor en las muestras de suero de las mujeres con neoplasia intraepitelial cervical (NIC 3), en comparación con el grupo de control. En el caso de la **proteína C3** el análisis estadístico mostro de $3,1 \pm 0,85$ vs $8,0 \pm 1,17$ (t-student = 5,7, $p \leq 0,05$) del grupo control vs grupo de casos. Para la **proteína A1BG** los valores fueron de $2,8 \pm 0,40$ vs $4,5 \pm 0,68$ (t-student = 4.3, $p \leq 0,05$).

Ambas proteínas confirman los datos obtenidos por el análisis proteómico, la técnica de 2 DE posee un limite de detección en relación a la concentración de proteína, ambas proteínas están presentes en el organismo, el análisis de geles 2D del grupo control no identifico estas proteínas, aunque ambas están presentes en el organismo la concentración es mínima que no se detecta en los geles, en cambio cuando esta presente la lesión hay un incremento de la proteína que se refleja en los geles de 2 DE, estos datos se confirmaron por los resultados de los ensayos de Western Blot.

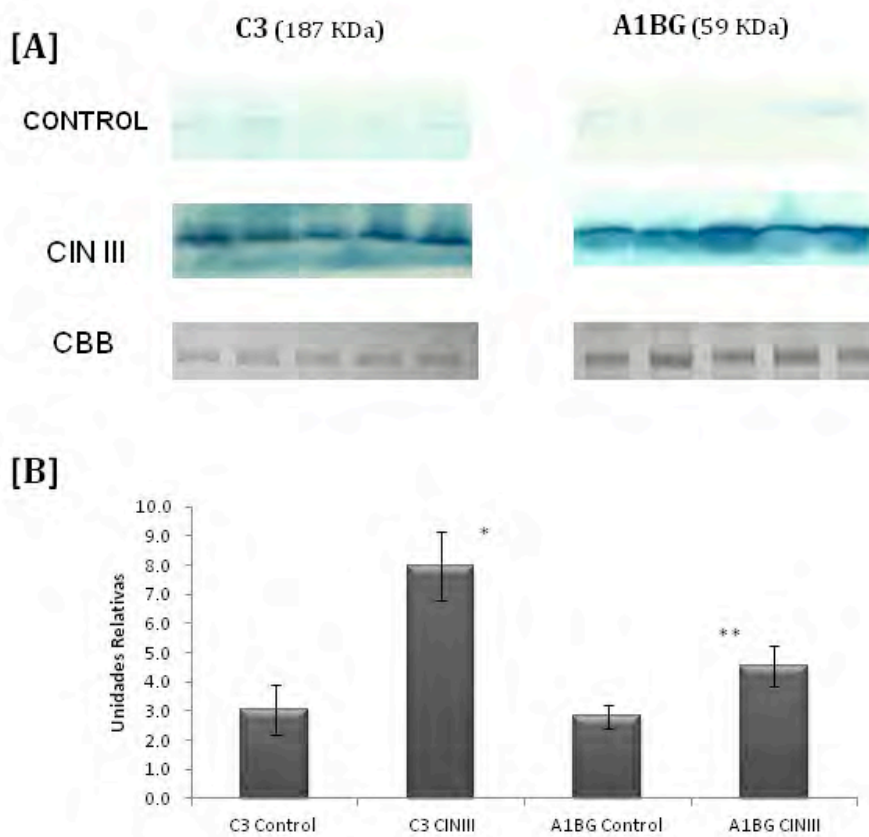


Figura 8. Validación mediante Ensayos de Western Blot para el Complemento C3 y A1BG en suero de un grupo de mujeres con Neoplasia Intraepitelial Cervical de grado III y un grupo de mujeres sin la enfermedad. 8A) Imagen del ensayo de Western Blot de cinco mujeres del grupo control y cinco mujeres del grupo de casos, 8B) Histograma de las dos proteínas validadas en el grupo de mujeres sin la enfermedad (Control n=30) y en el grupo de mujeres NIC 3 (n=25). Los datos fueron normalizados con Azul de Coomassie Brillante (CBB). Los datos se expresan con el promedio \pm desviación estándar. Significancia de ($p \leq 0,05$).

8. DISCUSIÓN

Las proteínas son codificadas por los genes que conforman el genoma humano y son las responsables directas de la regulación de las funciones celulares a través de la activación ó inactivación de diferentes rutas de señalización relacionadas con la proliferación, muerte y metabolismo celular (Rainer et al., 2013). Actualmente se sabe que el número de proteínas codificadas en una célula en un momento específico, no corresponde al total de genes activados, por lo que se ha hecho necesario conocer los perfiles de proteínas presentes en momentos y condiciones específicas, tanto en sujetos sanos, como con una patología determinada (Wasinger et al., 1995; Drissi et al., 2013). Así mismo, se ha visto que el perfil de proteínas en suero, plasma, tejido, orina y otros fluidos humanos y otros seres vivos se ven modificados por la presencia de enfermedades agudas ó crónicas producidas por agentes infecciosos (virus, bacterias, hongos) ó alteraciones a nivel génico (Rainer et a., 2013). El estudio comparativo del proteoma en diferentes situaciones biológicas permite identificar aquellas proteínas cuya presencia, ausencia ó alteración se correlaciona con determinados estados fisiológicos y/o patológicos (Merchant y Weinberg., 2000).

Es a partir de la identificación de estos perfiles de proteínas, que actualmente contamos con algunos biomarcadores que han servido para prevención, diagnóstico y seguimiento de algunas patologías (Mishra A y Verma M, 2010), algunos de ellos aprobados por la FDA para el cáncer (Gutman S y Kessler LG, 2006; Füzéry et al., 2013.).

El cáncer cervical es una patología cuyo agente causal es un virus (VPH), que se caracteriza por modificar la biología intracelular del huésped durante la fase de infección y su integración al genoma (zur Hausen, 1977; zur Hausen, 2006). Así mismo, desencadena una respuesta inmune a nivel local y sistémico (Luevano et al., 2010). Algunos de estos cambios se pueden ver reflejados en los perfiles de expresión de algunas proteínas a nivel del tejido (Zhu et al., 2009) plasma (Jeon et al., 2008), suero (Barba de la Rosa et al., 2008), moco cervical (Dasari et al., 2007; Pereira et al., 2007; Tang et al., 2007; Panicker et a., 2010). Es por lo que, se decidió buscar proteínas diferenciales en un estado premaligno cervical que pudiera dar la pauta para identificar proteínas que se están expresando y considerarlas moléculas para un fácil diagnóstico, tratamiento, manejo de la evolución de la enfermedad ó para uso terapéutico.

En este estudio se identificaron cuatro proteínas A1BG, complemento C3, apolipoproteínas y haptoglobina expresadas en el suero de mujeres con neoplasia cervical intraepitelial de grado 3. Se eligió validar A1BG y el complemento C3, dos proteínas abundantes en suero. Estas proteínas no se habían reportado en mujeres con lesiones intraepiteliales de alto grado y además ambas proteínas pertenecían al sistema inmune que podría haber sido alterado por el grado de lesión.

Las proteínas: apolipoproteína y haptoglobina no se confirmaron su presencia y expresión proteica mediante ensayos de Western Blot, ambas proteínas ya han sido relacionadas con lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado y cáncer *in situ* en muestras biológicas de suero (Barba de la Rosa et al., 2008), y plasma (Guo et al., 2012).

Por lo que, en este trabajo resulta interesante destacar dos proteínas del sistema inmune (complemento C3 y A1BG), incrementan su expresión proteica en respuesta a la presencia de una lesión cervical de alto grado (NIC 3), en el atlas de las proteínas humanas [<http://proteinatlas.org/>] que muestra la expresión y localización de las proteínas en una gran variedad de tejidos, tanto sanos como en cáncer, señala que el complemento C3 a sido detectado en otros tipos de cáncer (endometrial, testicular, próstata, ovárico, hígado, renal y de vejiga), no es la excepción el cervical siendo su expresión en tejido con CC bajo y alto en tejido normal (<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000125730/cancer>), no hay reportes en lesiones premalignas; En relación a la proteína AIBG el atlas de proteínas humana no hace ningún reporte que haya detectado en algún tipo de cáncer, a excepción de próstata que hay una expresión disminuida de esta proteína (<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000121410/cancer>).

En 2008 el grupo de Jeong y cols, hicieron un análisis proteómico en plasma de mujeres con carcinoma de células escamosas en el cual mostraron que las proteínas presentaban una expresión diferencial entre ellas, el complemento C3 y la glicoproteína A1BG; ambas proteínas fueron validadas en 24 mujeres sin la enfermedad, 26 mujeres con carcinoma *in situ* y 27 con carcinoma de células escamosas, el hallazgo fue un incremento significativo de la expresión proteica en el carcinoma de células escamosas, sugiriendo que podría ser un marcador de carcinogénesis (Jeong et al., 2008).

El complemento C3 y A1BG se detectaron en lesiones premalignas, pero no son específicas de esta patología ya que se comparten con otras lesiones premalignas

(Rajendral et al., 1990; Simpson et al., 1997), son moléculas que se activan en respuesta al daño del tejido, inflamación, para promover la angiogénesis, la modulación pro y anti-inflamatoria y cáncer (Dowling et al., 2011; Dempsey y Rudd, 2012).

El Complemento C3, es una proteína central en la cascada del complemento, su expresión es esencial para la activación de las tres rutas del complemento (Lambris, 1988; de Visser KE et al., 2004; Koley et al., 2011; Pio et al., 2013), forma parte la parte central del sistema inmune, es parte esencial para destruir microorganismos invasivos, además se encarga de la limpieza de células muertas y apoptóticas.

El sistema del complemento es uno de los más antiguos y se encuentra altamente conservado a nivel evolutivo (Pio, 2006). Las proteínas del complemento pueden ser zimógenos que se convierten en enzimas y activan al complemento, a proteínas ó a diferentes receptores. Concentraciones elevadas de esta proteína se han encontrado en suero de pacientes con cáncer de ovario (Björge et al., 2005), carcinoma hepatocelular relacionada a la hepatitis C (Lee et al., 2006; Malik et al., 2013), cáncer de páncreas (Hanas et al., 2008; Chen et al., 2013), cáncer colorectal (Habermann et al., 2006), carcinoma de células pequeñas renales (Xu et al., 2010), incluyendo carcinoma de células escamosas (SCC) (Jeong et al., 2008). Previo a estos hallazgos, el 1980 se había demostrado mediante técnicas de inmunodifusión simple que los niveles promedio de C3 incrementan de una forma simultánea al progreso de las lesiones de cáncer cervical hasta el estadio III, para después disminuir en el estadio IV (Pulay AT, 1980). Contrario a estos hallazgos, recientemente se reportó que fragmentos del complemento C3 y C4 A/B mostraron una disminución en el plasma de los pacientes con carcinoma de células escamosas de pene, la cual fue más evidente conforme la enfermedad fue progresando, sugiriendo que estos fragmentos podrían ser buenos candidatos como herramienta de pronóstico. (Ornellas et al, 2012; Pio et al., 2013). Las causas de esta disminución no se conocen; pero se ha especulado que esta disminución podría ser causada por la infección con el virus de VPH ó el virus de Epstein Barr (EBV), los cuales son prevalentes en este tipo de cáncer en el varón (Alfonso, 2012), y cuyas proteínas estarían atacando en sistema inmune (Campos, 2010), sin embargo, esto no ha sido demostrado. Este último hallazgo resulta contradictorio a lo reportado, hace suponer que la expresión de las proteínas del complemento podría estar reguladas de diferente

manera, dependiendo del tipo y origen del cáncer, por lo que será interesante en el futuro realizar más investigaciones al respecto. De hecho, recientemente, un grupo de investigadores sugirió que si bien existen proteínas con una alta variabilidad en condiciones normales como la haptoglobina (0.40 mg/ml); lisozima (0.01-0,1 mg/ml); proteína C-reactiva (0.01-0,3 mg/ml); existen otras con dispersiones menores con un coeficiente de variación (CV) de albúmina 9%; transferrina (CV 14%); complemento C3c (CV 17%), alfa-1-glicoproteína ácida (CV 21%), alfa2-macroglobulina (CV 20%); fragmento de transtiretina (CV 28.3%) y cadena beta-alfa-2-HS-glicoproteína (CV 29.7%) (Pakharukova, 2012), que podrían aportar información relacionada con el estado de salud de un sujeto, por lo que será importante en un futuro conocer si los cambios en la expresión de las proteínas C3 y A1BG identificadas en este proyecto pueden aportar información relevante asociada a los cambios que se presentan a lo largo de las lesiones previas a la transformación en cáncer del cérvix.

Recientemente Rutkowsky y cols., en 2010 y Pio, 2013, sugieren que alteraciones en el sistema del complemento pueden contribuir al desarrollo de tumores debido a su influencia en los procesos de proliferación celular, la angiogénesis, señalización celular, apoptosis, invasión y la migración, así como la inmunosupervivencia (Rutkowsky et al., 2010; Ricklin et al., 2010; Pio, 2013; Pio et al., 2014). Por lo tanto, es posible que en el Cáncer cervical, estas proteínas que componen al sistema del complemento como la C3, podría contribuir como un coadyuvante para el desarrollo de lesiones a lo largo de la enfermedad. Sin embargo, se requieren realizar más estudios para dilucidar los mecanismos implicados en la carcinogénesis y determinar si estas proteínas están asociadas a este tipo de cáncer

La alfa-1-B-glicoproteína (A1BG), es una proteína que se encuentra en jugo pancreático, en orina, en suero y plasma, no se conoce su función. Por su duplicación y su secuencia de ácidos nucleicos presenta homología a la familia de inmunoglobulinas (Ishioka y Takanashi, 1986; Udby et al., 2004). Esta proteína está presente en plasma, en adultos normales su concentración es de 22 mg/dL (Ishioka y Takanashi, 1986). Sin embargo, no hay una función biológica que haya sido propuesta para esta proteína y se ha encontrado elevada en algunos cánceres. Abdul-Rahman et al., 2007, reportó que la A1BG se encuentra elevada en suero de pacientes con cáncer endometrial y en pacientes

con cáncer cervical (Adbul-Rahman et al., 2007), también se reportado un aumento en la expresión en pacientes con carcinoma cervical de células escamosas (Jeong et al., 2008; Piyaphanee et al., 2011), y actualmente se ha reportado en cáncer de vejiga, cáncer de mama y en cáncer de pulmón de células no pequeñas (Liu et al., 2012).

Nuestros hallazgos sugieren que esta glicoproteína pudiera estar involucrada en la carcinogénesis del cérvix, por lo que será necesario primero conocer cuál es su función.

El grupo de Catanese y Kress, en 1992, encontró una proteína homóloga A1BG, como un inhibidor de metaloproteasas, esta función es similar al inhibidor de metaloproteasas en tejido (TIMP) (Catanese and Kress 1992; Kreunin *et al.* 2007). En las lesiones NIC 3 se requiere de la producción de proteasas específicamente para degradar la matriz extracelular, como las metaloproteasas (MMP), su papel principal es la invasión y metástasis, aunque también están implicadas en diversos procesos como la remodelación de tejidos (Brummer et al., 2002). Las TIMP son proteínas encargadas de inhibir la actividad de las metaloproteasas y restringir la invasión (Bischof et al., 2000).

Se han reportado en lesiones premalignas (NIC 2 y NIC 3), la presencia de varias metaloproteasas tales como MMP-2, 9, 7, sugiriendo un aumento gradual de su expresión es decir, proporcional a la lesión y con actividad enzimática (Schröer et al., 2011; Kaewprag et al 2013). Es por lo que se sugiere que el incremento de la expresión proteica de A1BG (similar a la función TIMP) en NIC 3 sería proporcional al aumento de las metaloproteasas (Branca et al., 2006), posiblemente para reducir el nivel de expresión de metaloproteasa y evitar la evolución de la lesión. Sin embargo, este papel tiene ser ampliamente demostrada la relación metaloproteasas y A1BG.

Asimismo, se encontraron otras proteínas que también pueden estar involucradas en la energía y transporte de nutrientes para el mantenimiento de la lesión como: las haptoglobinas y las alipoproteínas CIII.

Las Haptoglobinas, son glicoproteínas con capacidad de unión a la hemoglobina, que son secretadas por las células hepáticas en respuesta a diferentes estímulos, las cuales funcionan como transportadoras y recicladoras de hierro, y cuya concentración depende de los niveles de hemoglobina; es decir que a mayor concentración de hemoglobina, menor concentración de haptoglobinas (Huang et al., 2006). En estudios

recientes se ha demostrado que el hierro favorece el crecimiento de células neoplásicas y que éste se acumula mayormente en las células cancerosas comparado con lo que sucede en las células normales (Weinberg, 1996); sugiriendo que los pacientes con alta concentración de hierro tienen un mayor riesgo de desarrollar cáncer (Weinberg, 1996); posiblemente esta proteína podría funcionar como un marcador es en los pacientes con cáncer ovárico, de pulmón (Thadikkaran et al., 2005) y colon (Dowling et al 2011). Existe escasa información del papel que pudieran tener estas proteínas en el caso particular del cáncer cervicouterino; ya que la diferencia en la expresión de ésta en mujeres con diferentes grados de lesión (bajo, alto grado y cáncer) es muy discreta conforme avanzan las lesiones (Barba de la Rosa et al., 2008), por lo que no pueden ser buenos candidatos como marcadores para este tipo de patología.

En este trabajo, no se identificaron por espectrometría de masas la isoforma ó isoformas que posiblemente esten presentes en el suero de mujeres con lesiones intraepiteliales de alto grado (Mahmud et al., 2007; Quaye et al., 2009), la limitante del equipo de espectrometría de masas (MALDI-TOF-TOF) no puede determinar el subtipo de haptoglobina, por lo que es necesario identificar con un equipo de masas de alta resolución como el Orbitrap que consta de una celda de colisión que permite la generación de alta energía de disociación inducida por colisión ó HCD (higher energy collision-induced dissociation) pudiendo variar la energía de colisión para generar fragmentos iónicos de masa alta ó baja, es decir identificar la modificación postraduciconal de la proteína.

Por lo que es necesario, estudiar más a fondo el papel de las haptoglobinas en la carcinogenesis de esta enfermedad, ya que estas proteínas están asociadas con la modulación de la angiogénesis (Sadrzadeh y Bozorgmehr, 2004), procesos inflamatorios (Sadrzadeh y Bozorgmehr, 2004; Quaye, 2008), nutrición de las células cancerosas (Weinberg, 1996), supresión de la inmunidad (Huang, 2003), dichos eventos favorecen la invasión celular a un estado de cáncer.

Las Apolipoproteínas CIII (APO CIII), son moléculas transportadores de lipoproteínas de alta densidad y regulan diferentes funciones celulares como la oxidación, apoptosis reconocimiento celular y transporte de lípidos a todo el organismo (Mahley et al., 1984; Gangabadage et al., 2008).

Existen reportes que describen la asociación de estas proteínas con carcinoma hepatocelular (Steel et al., 2003) y de mama (Huang et al., 2006). Por ejemplo ApoC-I se ha visto que incrementa su expresión en cáncer de colon, próstata e hígado; en tanto que ApoC-III se asocia a cáncer pancreático, de mama y colon (Cohen et al, 2011); sin embargo no hay información con referencia al cáncer cervical.

La presencia de apolipoproteínas en lesiones intraepiteliales de alto grado de cérvix contribuye a la proliferación de células malignas, ya que la célula en transformación requiere gran cantidad de lípidos para la formación de membranas y energía para el mantenimiento celular.

Estas cuatro proteínas de gran abundancia en el suero humano por su concentración, no se habían tomado en cuenta, siempre se han tratado de depletar en suero ó plasma pues se piensa que los marcadores moleculares residen en el 1% de proteínas que se expresan en bajas concentraciones. Actualmente, se esta tomado mayor interés ya que proteínas como la albúmina presenta en suero más del 60% de las proteínas, es un transportador de pequeños peptidos y hormonas, y es aquí donde pueden residir marcadores, no haciendo aún lado las proteínas de baja abundancia (<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000163631/cancer>). Como se ha señalado anteriormente, la sangre humana es una de las muestras clínicas más accesibles y se supone la fuente de información más importante en investigación de diferentes enfermedades y los efectos de diversos fármacos. Sin embargo el suero no se ha utilizado a menudo en proteómica clínica, ya que la metodología más común que se utiliza en proteómica para la identificación de biomarcadores (2 DE e identificación de las proteínas mediante espectrometría de masas) a tenido más éxito en tejidos. El enorme rango dinámico que separa las proteínas más abundantes en suero (albúmina e inmunoglobulinas) y las más escasas en unos 10^9 ordenes de magnitud, junto con la aglomeración de spots en los geles bidimensionales y el rango de punto isoeléctrico hacen que el análisis del suero sea una tarea muy complicada.

Por otra parte, durante el desarrollo de esta tesis se publicaron estudios basados en electroforesis bidimensional diferencial (2D DIGE). Esta tecnología supone un gran avance en proteómica diferencial y comparativa, ya que presenta grandes ventajas respecto a la 2 DE convencional, permitiendo una mejora en la linealidad en el rango dinámico de detección, así como una mayor reproducibilidad y un método de cuantificación.

Por lo que, se propone realizar a futuro un diseño experimental empleando esta metodología.

9. CONCLUSIONES

1. En este estudio se identificaron cuatro proteínas A1BG, complemento C3, apolipoproteínas y haptoglobina expresadas en el suero de mujeres con neoplasia cervical intraepitelial de grado 3., proteínas que posiblemente alteran su expresión proteica por la presencia de la lesión premaligna en el cérvix.
2. Se confirmaron los resultados de proteómica mediante los ensayos de Western Blot, la presencia y el incremento de su expresión proteica de C3 y ABG en suero de mujeres infectadas con VPH oncogénicos y con lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado en comparación a sueros de mujeres sanas.
3. La expresión proteica del Complemento C3 y A1BG en el grupo de mujeres con neoplasia intraepitelial de grado III e infectadas con VPH-AR, no es dependiente del tipo de infección viral de acuerdo a los ensayos de Western Blot.
4. El incremento en la expresión proteica del Complemento C3 se asocia a proliferación celular, angiogénesis, señalización celular, invasión y migración de células malignas, eventos que son necesarios en lesiones premalignas para evolucionar a cáncer.
5. La proteína A1BG, por homología en su secuencia de aminoácidos posee una función similar a los inhibidores de metaloproteasa de tejido, por lo que se sugiere que el aumento en la expresión proteica de esta proteína en lesiones premalignas favorece la inhibición de la actividad de las metaloproteasas y restringe la invasión celular.
6. Se confirma la presencia de haptoglobina en lesiones premalignas de cérvix, estas proteínas están asociadas a la modulación de la angiogenesis y procesos inflamatorios favoreciendo la invasión celular.
7. La presencia de apolipoproteínas en lesiones intraepiteliales de alto grado de cérvix contribuye a la proliferación de células malignas, ya que la célula en transformación

requiere gran cantidad de lipidos para la formación de membranas y energía para el mantenimiento celular.

8. El análisis proteómico de suero permitió detectar un número importante de proteínas diferencialmente expresadas entre epitelio sano y enfermo.

9. Las cuatro proteínas identificadas C3, A1BG, APO CIII y Haptoglobina en mujeres con la lesión intraepitelial cervical son proteínas abundantes en suero, proteínas que posiblemente puedan ser consideradas como biomarcadores de malignidad.

En conjunto, los datos presentados en esta Tesis muestran que el análisis proteómico de suero de pacientes con NIC 3, permitió identificar proteínas con alteraciones en sus niveles de expresión que las convierten en candidatas a biomarcadores de la enfermedad.

Además estos resultados permiten plantear nuevas líneas de investigación para dilucidar los mecanismos en la carcinogénesis y determinar si estas proteínas están asociadas a este tipo de cáncer.

Así como validar la expresión proteica en mayor número de mujeres con este grado de neoplasia e incluir diferentes grupos de mujeres con diversos grados de evolución de la enfermedad, y a mujeres con infección VPH-AR sin presentar lesión epitelial, para determinar la influencia de estas proteínas en la evolución de la neoplasia cervical.

10. LITERATURA CITADA

Abdallah C, Dumas-Gaudot E, Renaut J, Sergeant K. Gel-based and gel-free quantitative proteomics approaches at a glance. *Int J Plant Genomics*. 2012. 494572.

Abdul-Rahman PS, Lim BK, Hashim OH. Expression of high-abundance proteins in sera of patients with endometrial and cervical cancers: analysis using 2-DE with silver staining and lectin detection methods. *Electrophoresis*. 2007. 28: 1989-1996.

Adam E, Berkova Z, Daxnerova Z. Papillomavirus detection: demographic and behavioral characteristics influencing the identification of cervical disease. *Am J Obstet Gynecol*. 2000. 182:257-264.

Adkins JN, Varnum SM, Auberry KJ, Moore RJ, Angell NH, Smith RD, Springer DL, Pounds JG. Toward a human blood serum proteome: analysis by multidimensional separational coupled with mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 2002. 1:947-955.

Aguirre HR, Medina CL, Montoya FH, Sandoval LJ, Padilla RM, García SV, Jáuregui MA. Factores relacionados con el cancer cervicouterino en el estado de Nayarit, México. *Ginecol Obstet Mex*. 2007. 75: 311-316.

Alfonso LA, Moyses N, Alves G, Ornellas AA, Passos MR Oliveira Ldo H, Cavalcanti SM. Prevalence of human papillomavirus and Epstein-Barr virus DNA in penile cancer cases from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012. 107: 18-23.

Alonso DP, Lazcano PE, Hernández AM. 2005. *Cáncer cervicouterino, Diagnóstico, prevención y control*. Panamericana, 2ed.

Andersh-Björkman Y, Thomsson KA, Holmén Larsson JM, Ekerhovd E, Hansson GC. Large scale identification of proteins, mucins, and their O-glycosylation in the endocervical mucus during the menstrual cycle. *Mol Cell Proteomics*. 2007. 6:708-716.

Anderson NL, Esquer-Blasco R, Hofmann JP, Anderson NG. A two-dimensional gel database of rat liver proteins useful in gene regulation and drug effects studies. *Electrophoresis*. 1991. 12: 907-930.

Anderson NL and Anderson NG. The human plasma proteome: history, character and diagnostic prospects. 2003. 1:845-867. erratum

Anderson NL, and Anderson NG. The human plasma proteome: history, character and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics*. 2002. 1:845-867.

Aobchey P, Niamsup H, Siriaree S, Sookkheo B, Boonyapranai K, Chen ST. Proteomic Analysis of candidates prognostic urinary marker cervical. *J Proteomics Bioinform*. 2013. 6:245-251.

Arbyn M, Castellsagué X, de Sanjosé S, Bruni L, Saraiya M, Bray F, Ferlay J. Worldwide burden of cervical cancer in 2008. *Ann Oncol*. 2011. 22: 2675-86.

Arends MJ, Buckley CH and Wells M. An etiology, pathogenesis and pathology of cervical neoplasia. *J Clin Pathol*. 1998. 51:96-103.

Bae SM, Lee CH, Cho YL, Nam KH, Kim YW, Kim CK, Han BY, Lee YJ, Chun HJ and Ahn WS. Two-dimensional gel analysis of protein expression profile in squamous cervical cancer patients. *Gynecol Oncol*. 2005. 99:26-35,

Barba de la Rosa AP, Lugo-Melchor OY, Briones-Cerecero EP, Chagolla-López A, de León-Rodríguez A, Santos L, Vázquez-Ortiz G and Salcedo M. Analysis of human serum from women effected by cervical lesions. *J Exp Ther Oncol*. 2008. 7:65-72.

Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol*. 2005. 32: (Suppl. 1), S1-S6.

Bethesda, Md. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 69: 89-95.

Bischof P, Meisser A, Campana A. Mechanism of endometrial control of trophoblast invasion. *J Reprod Fertil Suppl*. 2000. 55: 65-71.

Björge L, Hakulinen J, Vintermyr OK, Jarva H, Jensen TS, Iversen OE, Meri S. Ascitic complement system in ovarian cancer. *Br J Cancer*. 2005. 92: 895-905.

Bodner AB, Hefler L, Bodner K, Leodolter S, Frischmuth K, Kainz C and Mayerhofer. Serum levels of angiotensin in invasive cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia (CIN). *Anticancer Res*. 2001. 21:809-812.

Boeckmann B, Blatter MC, Famiglietti L, Hinz U, Lane L, Roehert B, Bairoch A. Protein variety and functional diversity: Swiss-Prot annotation in its biological context. *C R Biol*. 328:882-899.

Bosch FX, Manos M, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R and Shah KV. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst*. 1995. 87:796-802.

Bosch JX and de Sanjosé S. The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Disease Markers*. 2007.23:213-227.

Bouvard V, Matlashewski G, Gu ZM, Storey A and Banks L. The human papillomavirus type 16 E5 gene cooperate with the E7 gene to stimulate proliferation of primary cells and increase viral gene expression. *Virology*. 1994. 203:73-80.

Branca M, Ciotti M, Giorgi C, Santini D, Di Bonito L, Costa S, Benedetto A, Bonifacio D, Di Bonito P, Paba P, Accardi L, Syrjänen S, Favalli C, Syrjänen K. HPV-Pathogen

ISS Study Group. Up-regulation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is closely associated with high-risk human papillomavirus (HPV) and progression of cervical intraepithelial neoplasia (CIN), but does not predict disease outcome in cervical cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2007.130:223-231.

Branca M, Ciotti M, Giorgi C, Santini D, Di Bonito L, Costa S, Benedetto A, Bonifacio D, Di Bonito P, Paba P, Accardi L, Syrjänen S, Favalli C, Syrjänen K; HPV-PathogenISS Study Group. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and its tissue inhibitor (TIMP-2) are prognostic factors in cervical cancer, related to invasive disease but not to high-risk human papillomavirus (HPV) or virus persistence after treatment of CIN. *Anticancer Res.* 2006. 26(2B). 1543-1556.

Broker TR. Structure and genetic expression of papillomavirus. *Obstet Gynecol North Am.* 1987. 14:329-348.

Brummer O, Böhmer G, Hollwitz B, Flemming P, Petry KU, Kühnle H. MMP-1 and MMP-2 in the cervix uteri in different steps of malignant transformation-an immunohistochemical study. *Gynecol Oncol.* 2012. 84:222-227.

Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev.* 2003. 16: 1-17.

Burk RD, Ho GY, Beardsley L, Lempa M, Peters M, Bierman R. Sexual behavior and partner characteristics are the predominant risk factors for genital human papillomavirus infection in young women. *J Infect Dis.* 1996. 174:679-689.

Campo MS, Graham SV, Cortese MS, Ashrafi GH, Araibi EH, Dornan ES, Miners K, Nunes C, Man S. HPV-16 E5 down-regulates expression of surface HLA class I and reduces recognition by CD8 T cells. *Virology.* 2010. 407: 137-42.

Canul-Canche J, Rosado I, Suárez N, Colli G, Conde-Ferrárez L, Canto T, González MR. High prevalence and low E6 genetic variability of human papillomavirus 58 in women with cervical cancer and precursor lesions in Southeast Mexico. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010. 105: 144-148.

Catanese JJ, Kress LF. Isolation from opossum serum of a metalloproteinase inhibitor homologous to human alpha 1B-glycoprotein. *Biochemistry.* 1992. 31: 410-418.

Chen J, Wu W, Zhen CH, Zhou H, Yang R, Chen L, Hu L. Expression and clinical significance of complement C3, complement C4b1 and lipoprotein E in pancreatic cancer. *Oncology Letters.* 2013. 6:43-48.

Chen Y, Millar C, Mosher R, Zhao X, Deeds J, Morrissey M, Bryant B, Yang D, Meyer R, Cronin F, Gostout S, Smith MK and Schlegel R. Identification cervical cancer by cDNA and tissue microarrays. *Cancer Res.* 2003. 63:1927-1935.

Cho WC. Proteomics technologies and challenges. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2007. 5: 77-85.

Choi YP, Kang S, Hong S, Xie X and Cho NH. Proteomics analysis of progression factors in uterine cervical cancer. *Proteomics*. 2005. 5:1481-1493.

Clifford GM, Smith JS and Franceschi S. Comparison of HPV types distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2003. 89:101-105.

Cohen M, Yossef R, Erez T, Kugel A, Welt M, Karpasas MM, Bones J, Rudd PM, Taieb J, Boissin H, Harats D, Noy K, Tekoah Y, Lichtenstein RG, Rubin E, Porgador A. Serum apolipoproteins C-1 and C-III are reduced in stomach cancer patients: results from MALDI-based peptidome and immuno-based clinical assays. *Plos One*. 6: e14540.

Connolly DC, Greenspan DL, Rong Wu. Loss of Fhit expression in invasive cervical carcinomas and intraepithelial lesions associated with invasive disease. *Clin Cancer Res*. 2000. 6: 3505-3510.

Correa P. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res*. 48:3554-3560.
Crow JM. 2012. HPV: The global burden. *Nature*. 1988. 488: S2-S3.

Crosley LK, Duthie SJ, Polley AC, Bouwman FG, Heim C, Mulholland F, Horgan G, Jhonson IT, Mariman EC, Elliot RM, Daniel H, de Roos B. Variation in protein levels obtained from human blood cells and biofluids for platelet, peripheral blood mononuclear cell, plasma, urine and saliva proteomics. *Genes Nutr*. 2009. 4:95-102.

Dasari S, Pereira L, Reddy AP, Michaels JEA, Lu X, Jacob T, Thomas A, Rodland C, Roberts T, Gravett MG and Nagalla SR. Comprehensive proteomic analysis of human cervical-vaginal fluid. *J Proteome Res*. 2007. 6:1258-1268.

De Villers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU and zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*, 2004. 324:17-27.

De Visser KE, Korets LV, Coussens LM. Early neoplastic progression is complement independent. *Neoplasia*. 2004. 6: 768-776.

Dempsey E, Rudd PM. Acute phase glycoproteins; bystanders or participants in carcinogenesis?. *Ann N Y Acad Sci*. 2012. 1253:122-132.

Drissi R, Dubois ML, Boisvert FM. Proteomics methods for subcellular proteome analysis. *FEBS J*. 2013. 280: 5625-5634.

Doobar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, Stanley MA. The biology and life Cycle of human Papillomaviruses. *Vaccine*. 2012. 30S: F55-F70.

Doobar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci*. 2006. 110:525-541.

Doobar J. Papillomavirus life cycle organization and biomarker selection. *Disease Markers*. 2007. 23:297-313.

Dowling P, Clarke C, Hennessy K, Torralbo-Lopez B, Ballot J, Crown J, Kiernan I, O'Byrne KJ, Kennedy MJ, Lynch V, Clynes M. Analysis of acute-phase proteins, AHSG, C3, CLI, HP and SAA, reveals distinctive expression patterns associated with breath, colorectal and lung cancer. *Int J Cancer*. 2012. 131:911-923.

Escobar-Hoyos LF, Yang J, Zhu J, Cavallo JA, Zhai H, Burke S, Koller A, Chen EI, Shroyen KR. Keratin 17 in premalignant and malignant squamous lesions of the cervix: proteomic discovery and immunohistochemical validation as a diagnostic and prognostic biomarker. *Nature Modern Pathology*. 2013. 1-10.

Espinosa AM, Alfaro A, Roman-Basaure E, Guardado-Estrada M, Palma I, Serralde C, Medina I, Juárez E, Bermúdez M, Márquez E, Borges-Ibáñez M, Muñoz-Cortez S, Alcántara-Vázquez A, Alonso P, Curiel-Valdez J, Kofman S, Villegas N, Berumen J. Mitosis is a source and therapeutic targets in cervical cancer. *Plos One*. 2013. 8: e55975.

Fleighter G and Meisels A. Task force report on HPV-related changes of the lower female genital tract. *Acta Cytol*. 2002. 46: 630-632.

Forman D, de Martel C, Lacey CHJ, Soerjomataram I, Lortet-Tieulent J, Bruni L, Vignat J, Ferlay J, Bray F, Plummer M, Franceschi. Global burden of human papillomavirus and related diseases. *Vaccine*. 2012. 30S: F12-F23.

Füzéry AK, Levin J, Chan MM, Chan DW. Translation of proteomic biomarkers into FDA approved cancer diagnostics: issues and changes. *Cin Proteomics*. 2013. 10: 13. GLOBOCAN, 2008. <http://globocan.iarc.fr/>

Gangabadage CS, Zdunek J, Tessari M, Nilsson S, Olivecrona G, Wijmenga SS. Structure and dynamics of human apolipoprotein CIII. *J Biol Chem*. 2008. 283:17416-17427.

Manual 2 D Electrophoresis, General Electric,
http://www.med.unc.edu/pharm/sondeklab/Lab%20Resources/protein_purification_handbooks/2D%20electrophoresis.pdf

Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*. 1984. 133:1710-1715.

Gu Y, Wu SL, Meyer JL, Hancock WS, Burg LJ, Linder J, Hanlon DW and Karger BL. Proteomic analysis of high-grade dysplastic cervical cells obtained from ThinPrep slides using laser capture microdissection and mass spectrometry. *J Proteome Res*. 2007. 6:4256-68.

Guo M, Sneige N, Silva EG, Jan YJ, Cogdell DE, Lin E, Luthra R, Zhang W. Distribution and viral load of eight oncogenic types of human papillomavirus (HPV) and HPV 16 integration status in cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Mod Pathol*. 2007. 20:256-266.

Guo X, Abliz G, Reyimu H, Zhao F, Kadeer N, Matsidik R, Wu G, Abudula A. The association of a distinct plasma proteomic profile with the cervical high-grade squamous intraepithelial lesion of Uyghur women: a 2D liquid-phase chromatography/mass spectrometry study. *Biomarkers*. 2012. 17: 352-361.

Gupta N, Srinivasan R, Rajwanshi A. Functional Biomarkers in Cervical Precancer: An Overview. *Diagnostic Cytopathology*, 2010. 38: 618-23.

Gutman S, y Kessler LG.. The US Food and drug administration perspective on cancer biomarker development. *Nat Rev Cancer*. 2006. 6:565-571.

Gygi SP and Aebersold R. Mass spectrometry and proteomics. *Curr Opin Chem Biol*. 2000. 4: 489-494.

Habermann JK, Roblick UJ, Luke BT, Prieto DR, Finlay WJ, Podust V, Roman JM, Oevermann E, Schiedeck T, Homann N, Duchrow M, Conrads TP, Veenstra TD, Burt SK, Bruch HP, Auen G, Ried T. Increased serum levels of complement C3A anaphylotoxin indicate the presence of colorectal tumors. *Gastroenterology*. 2006. 131:1020-1237.

Hanas JS, Hocker JR, Cheung JY, Larabee JL, Lerner MR, Lightfoot SA, Morgan DL, Denson KD, Prejeant KC, Gusev Y, Smith BJ, Hanas RJ, Postier RG, Brackett DJ. Biomarker identification in human pancreatic cancer sera. *Pancreas*. 2008.36: 61-69.

Hanash S, Pitteri S, S. J. Faca VM. Mining the plasma proteome for cancer biomarkers. *Nature*. 2008. 452: 571-579.

Hawley NP, Vrusden KH, Hubbert NL, Lowy DR and Schiller JT. HPV 16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J*. 1989. 8:3905-3910.

Herbslb M, Knudsen UB, Ornotoft A, Bichel P, Norrild B, Knudsen A and Mogensen O. Telomerase activity, MIB-1, PCNA, HPV 16, p53 as diagnostic markers for cervical intraepithelial neoplasia. *APMIS*. 2001. 109: 607-617. *checar ortografia*

Hildesheim A, Shiffman MH, Gravitt PE, Glass AG, Greer CE, Zhang T, Scott DR, Rush BB, Lawer P, Sherman ME. Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *J Infect Dis*. 1994. 169: 235-240.

Howley PM. Papillomavirus and their replication. Pp. 947-979. En field BM, Knipe DM. *Field's virology*, 3 ed. 1995. New York: Raven Press.

Huang HL, Stasyk T, Morandell S, Dieplinger H, Falkensammer G, Griesmacher A, Mogg M, Schreiber M, Feuerstein I, Huck CW, Stechner G, Bonn GK, Huber LA. Biomarker discovery in breast cancer serum using 2-D differential gel electrophoresis/MALDI-TOF/TOF and data validation by routine clinical assays. *Electrophoresis*. 2006. 27: 1641-1650.

Huang X. Iron overload and its association with cancer risk in humans: evidence for iron as a carcinogenic metal. *Mutat Res*. 2003. 533:153-171.

Hudelist G, Manavi M, Pischinger KID, Watkins RT, Singer CF, Cubista E and Czerwenka KF. Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. *Gynecol Oncol*. 2004. 92: 873-880.

IARC: International Agency for Research and Cancer.
<http://www.iarc.fr/en/media-centre/iarcnews/2010/globocan2008.php>

Isaaq H, Xiao Z and Veenstra TD. Serum and Proteomics. *Chem Rev*. 2007. 107:3601-3620.

Ishioka N, Takahashi N, Putnam FW. Amino acid sequence of human plasma alpha 1B-glycoprotein: homology to the immunoglobulin supergene family. *Proc Natl Acad Sci. USA*.1986. 83:2363-2367.

Iwasaki A. Antiviral immune responses in the genital tract: clues for vaccines. *Nature Rev. Immunology*. 2010. 10: 699-710.

Jean S, Allen HBL and Lambert PF. Integration of human papillomavirus type16 into the human genome correlate with a selective growth advantage of cells. *J Virol*, 1995. 69: 2989-2997.

Jenkins D. Histopathology and cytopathology of cervical cancer. *Disease Markers*.2007. 23: 199-212.

Jensen ON. Interpreting the protein language using proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006. 7:391-403.

Jeong DH D, Kim HK, Prince AE, Lee DS, Kim YN, Han J, Kim KT. Plasma proteomic analysis of patients with squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *J Gynecol Oncol*. 2008. 19:173-180.

Jernal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA. Cancer J Clin*. 2011. 61:69-90.

Jiang L, He L, Fountoulakis M. Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. *J Chrom*. 2004. 1023:317-320.

- Kaewprag J, Umnajvijt W, Ngamkham J, Ponglikitmongkol M. HPV 16 oncoproteins promote cervical cancer invasiveness by upregulating specific matrix metalloproteases. *Plos One*. 2013. 8: e71611.
- Klaes R, Woerner SM, Ridder R, Wentzensen N, Duerst M, Schneider A, Lotz B, Melsheimer P and von Knebel Doeberitz M. Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res*. 1999. 59:6132-6136.
- Kolch W. The molecular make-up of a tumor: proteomics in cancer research. *Clinical Sciences*. 108: 369-383.
- Koley M, Towner L, Donev R. Complement in cancer and Cancer Immunotherapy. 2011. *Arch Immunol Ther Exp*. 59:407-449.
- Koutroukides TA, Jaros JA, Amess B, Martins-de-Souza D, Guest PC, Rahmoune H, Levin Y, Deery M, Charles PD, Hester S, Groen A, Christoforou A, Howard J, Bond N, Bahn S, Lilley KS. Identification of protein biomarkers in human serum using iTRAQ and Shotgun mass spectrometry. *Methods Mol Biol*. 2013. 1061:291-307.
- Kreunin P, Zhao J, Rosser C, Urquidi V, Lubman DM, Goodson S. Bladder cancer associated glycoprotein signatures revealed by urinary proteomic profiling. *J Proteome Res*. 2007. 6: 2631-9.
- Kumar S, Mohan A and Guleria R. Biomarkers in cancer screening, research and detection; present and future: a review. *Biomarkers*. 2006. 11:385-405.
- Kullolli M, Hancock WS, Hincapie M. Automated platform for fractionation of human plasma glycoproteome in clinical proteomics. *Anal Chem*. 2010. 82:115-120.
- Lambris D. 1988. The multifunctional role of C3, the third component of complement. *Immunol Today*. 1988. 9: 387-393.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970.227: 680-685.
- Lazo PA. The molecular genetics of cervical carcinoma. *Br J Cancer*. 1999. 80: 2008-2018.
- Lebrecht A, Ludwig E, Huber A, Klein M, Schneeberg C, Tempfer C, Koelb H and Hefler L. Serum vascular endothelial growth factor and serum leptin in patients with cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2002. 85:32-35.
- Lee IN, Chen CH, Sheu JC, Lee HS, Huang GT, Chen DS, Yu CY, Wen CL, Lu FJ, Chow LP. Identification of complement C3a as a candidate biomarker in human chronic hepatitis C and HCV-related hepatocellular carcinoma using a proteomics approach. *Proteomics*. 2006. 6: 2865-2873.

Lee KA, Shim JH, Kho CW, Park SG, Park BC, Kim JW, Lim JS, Choe YK, Paik SG, Yoon DY. Protein profiling and identification of modulators regulated by the E7 oncogene in the C33A cell line by proteomics and genomics. *Proteomics*. 2004. 4:839-848.

Leth-Larsen R, Lund RR, Ditzel HJ. Plasma membrane proteomics and its application in clinical cancer biomarker discovery. *Mol Cell Proteomics*. 2010. 9:1369-1382.

Leykauf K, Salek M, Shluter H, Lehmann WD and Alonso A. Identification of membrane proteins differentially expressed in human papillomavirus type 16 E5-transfected human keratinocytes by nano-electrospray ionization mass spectrometry. *J Gen Virol*. 2004. 85:1427-1431.

Li H, DeSouza LV, Ghanny S, Li W, Romaschin AD, Colgan TJ and Siu KWM. Identification of candidate biomarker proteins released by human endometrial and cervical cancer cells using two-dimensional liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Proteome Res*. 2007. 6:2615-2632.

Lin YW, Lai HC, Lin CY, Chiou JY, Shui HA, Chang CC, Yu MH and Chu. Plasma proteomic profiling for detecting and differentiating in situ and invasive carcinomas of the uterine cervix. *Int J Gynecol Cancer*. 2006. 16:1216-1224.

Lisitsa A, Moshkovskii S, Chemobrovkin A, Ponomarenko E, Archakov A. Profiling proteoforms: promising follow-up of proteomics for biomarker discovery. *Expert Rev Proteomics*. 2014. 11:121-129.

Liu Y, Luo X, Hu H, Wang R, Sun Y, Zeng R, Chen H. Integrative proteomics and tissue microarray profiling indicative the association between overexpressed serum proteins and non-small cell lung cancer. *Plos One*. 2012. 12:e51748.

Lizano M, Berumen J, García-Carranca A. HPV-related carcinogenesis: basic concepts, viral types and variants. *Arc Med Res*. 40:428-434.

Longatto Filho A, Uttagawa ML, Shirata NK, Pereira SM, Namiyama GM, Kanamura CT, Santos Gda C, de Oliveira MA, Wakamatsu A, Nonogaki S, Roteli-Martins C, di Loreto C, Matosinho de Castro Ferraz Mda G, Maeda MY, Alves VA, Syrjänen K. Immunocytochemical expression of p16INK4A and Ki-67 in cytologically negative and equivocal pap smears positive for oncogenic human papillomavirus. *Int J Gynecol Pathol*. 2005. 24: 118-124.

Looi ML, Karsani SA, Rahman MA, Dali AZ, Ali SA, Ngah WZ, Yusof YA. Plasma proteome analysis of cervical intraepithelial neoplasia and cervical squamous cell carcinoma. *J Biosci*. 2009. 34:917-925.

Lowy DR, Schiller JT. Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J Clin Invest*. 2006. 116:1167-73.

Lowy DR and Howley PM. Papillomavirus. P. 2231-2264. In Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martín MA, Roizman B and Straus SE. (Ed.). Field's virology, 4th ED. 2001. Lippincott Williams & Wilkind. Philadelphia, Pa.

Luevano M, Bernard HU, Barrera-Saldaña HA, Trevino V, García-Carranca A, Villa LL, Monk BJ, Tan X, Davies DH, Felgner PL, Kalantari M. High-throughput profiling of the humoral immune responses against thirteen human papillomavirus types by proteome microarrays. *Virology*. 2010. 405: 31-40.

Mäbert K, Cojoc M, Peitzsch C, Kurth I, Souchelnytskyi S, Dubrovskaja A. Cancer Biomarker discovery: current status and future perspectives. *Int J Radiat Biol*. 2014.

Magnusson PK, Lichtenstein P, Gyllenstein UB. Heritability of cervical tumours. *Int J Cancer*. 2000. 88: 698-701.

Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC Jr, Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res*. 1984. 25:1277-1294.

Mahmud SM, Koushik A, Duarte-Franco E, Costa J, Fontes G, Bicho M, Coutlée F, Franco EL. Haptoglobin phenotype and risk of cervical neoplasia: a case-control study. *Clin Chim Acta*. 2007. 385: 67-72.

Malik S, Bhatnager S, Chaudhary N, Katare DP, Jain SK. Elevated expression of complement C3 protein in chemically induced hepatotumorogenesis in Wistar rats: a correlative proteomics and histomorphopathological study. 2013. *Exp Toxicol Pathol*. 65:767-73.

Martin CM, O'Leary JJ, Phil D. Histology of cervical intraepithelial neoplasia and the role of biomarkers. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2011. 25: 605-615.

Mascot software. http://www.matrixscience.com/search_form_select.html

Merchant M, Weinberg SR. Recent advancements in surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry. *Electrophoresis*. 21:1164-1177.

Middleton K, PehW, Southern S, Griffin H, Sotlar K, Ankara T, El-Sherif A, Morris L, Seth R, Hibma M, Jenkis D, Lambert P, Coleman N and Doobar J. Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *J Virol*. 2003. 77:10186-10201.

Mighty KK and Laimins L. The role human Papillomaviruses in Oncogenesis. *Recent Results in Cancer Research*. 2014. 193: 135-148.

Mishra A, Verma M. Cancer Biomarkers: are we ready for the prime time?. *Cancers*. 2010. 2: 190-208.

Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003. 348:518-527.

Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 2006. 24 Suppl 3: S3/1-10.

NCBIInr, <http://www.ncbi.nih.gov>.

National Cancer Institute Workshop. The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses. *JAMA*, 262: 931. 1989.

Negrini BP, Schiffman MH, Kurgan RJ. Oral contraceptive use, human papillomavirus infection, and risk of early cytological abnormalities of the cervix. *Cancer Res*. 50:4670-4675.

Nucci MR, Crum CP. Redefining early cervical neoplasia: recent progress. *Adv Anat Pathol*. 2007. 14: 1-10.

Oh MJ, Choi JH, Kim IH, Lee YH, Huh JY, Park YK, Lee KW, Chough SY, Joo KS, Ku BS and Saw HS. Detection of epidermal growth factor receptor in the serum patients with cervical carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2000. 6:4760-4763.

Ornellas P, Ornellas AA, Chinello C, Gianazza E, Mainini V, Cazzaniga M, Pereira DA, Sandim V, Cypriano AS, Koifman L, da Silva PC, Alves G, Magni F. Downregulation of C3 and C4A/B complement factor fragments in plasma from patients with squamous cell carcinoma of the penis. *Int Braz J Urol*. 2012. 38: 739-749.

Pakharukova NA, Pastushkova LKh, Moshkovskii SA, Larina IM. Variability of healthy human proteome. *Biomed Khim*, 2012. 58:514-29. [Abstract on line]: [http://www.unboundmedicine.com/medline/citation/23289293/\[Variability_of_healthy_human_proteome\]](http://www.unboundmedicine.com/medline/citation/23289293/[Variability_of_healthy_human_proteome])

Panicker G, Ye Y, Wang D, Unger ER. Characterization of the human cervical mucous proteome. *Clin Proteomics*. 2010. 6:18-28.

Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J. Cancer incidence in five continents, vol VII. International Agency for Research of Cancer. Scientific Publications number 143, Lyon: IARC. 1997.

Peh WL, Middleton K, Christensen N, Nicholls P, Egawa K, Sotlar K, Brandsma J, Percival A, Lewis J, Liu WJ and Doobar J. Life cycle heterogeneity in animal models of human papillomavirus-associated disease. *J Virol*. 2002. 76:10401-10416.

Pereira L, Reddy AP, Jacob T, Thomas A, Schneider KA, Dasari S, Lapidus JA, Lu X, Rodland M, Roberts CT jr, Gravett MG, Nagalia SR. Identification of novel protein biomarkers of preterm birth in human cervical-vaginal fluid. *J Proteome Res*. 2007. 6:1269-1276.

Pfister H, Gissmann L and zur Hausen H. Partial characterization of the proteins of human papilloma virus (HPV) 1-3. *Virology*. 1977. 83:131.

Piersma JS. Immunosuppressive Tumor microenvironment in cervical cancer patients. *Cancer Microenviron*. 2011. 4:361-375.

Pio R, Ajona D, Lambris JD. Complement inhibition in cancer therapy. *Seminars in Immunology*. 2013. 1-10.

Pio R, Corrales L, Lambris JD. The role of complement in tumor growth. *Adv Exp Med Biol*. 2014. 772: 229-262.

Pio R. Revisión: Control of complement activation by cancer cells and its implications in antibody-mediated cancer immunotherapy. *Inmunología*. 2006. 25:173-187.

Piyaphanee N, Ma Q, Kremen O, Czech K, Greis K, Mitsnefes M, Devarajan P, Bennett MR. Discovery and initial validation of α 1-B glycoprotein fragmentation as a differential urinary biomarker in pediatric steroid-resistant nephrotic syndrome. *Proteomics Clin Appl*. 5: 2011. 5: 334-342.

Principe S, Kim Y, Fontana S, Ignatchenko V, Nyalwidhe JO, Lance RS, Troyer DA, Alessandro R, Semmes OJ, Kislinger T, Drake RR, Medin JA. Identification of prostate-enriched proteins by in-depth proteomic analyses prostatic secretions in urine. *J Proteome Res*. 2012. 11:2386-2396.

Pulay AT, Füst G, Csömör A. Serum complement levels in patients with cancer of the uterine cervix before and after radiation therapy. *Neoplasma*. 1980. 27:211-6. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Pulay%20AT%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=7393359

Quaye K, Agbolosu K, Ibrahim M, Bannerman-Williams P. Haptoglobin phenotypes in cervical cancer: decreased risk for Hp2-2 individuals. *Clin Chin Acta*. 2009. 403 :267-268.

Rainer M, Sajdik C, Bonn GK. Mass spectrometric profiling of low-molecular-weight proteins. *Methods Mol Biol*. 2013. 1023: 83-95.

Rajendran R, Remain P, Vijayakumar T, Vasdevan DM. Total hemolytic complement (CH50) and its fractions (C3 and C4) in the sera of patients with premalignant and malignant lesions of the oral cavity. *Ann Dent*. 1990. 49: 36-38.

Reddy VG, Khanna N, Jain SK, Das BC, Singh N. Telomerase-A, molecular marker for cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2001. 11:100-106.

Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol*. 2010. 11: 785-796.

- Robinson-Bennett BJ, Deford J, Diaz-Arrastia C, Levine L, Wang H-Q, Hannigan ED and Papaconstantinou. Implications of tyrosine phosphoproteomics in cervical carcinogenesis. *J Carcinogenesis*. 2008. 7:1-10.
- Rosamilia C, Feichter G, Tzankov A, Obermann EC. Diagnosis and grading of cervical intraepithelial neoplasias. *Pathologe*. 2012. 33: 118-123.
- Rutkowski MJ, Sughure ME, Kane AJ, Mills SA, Parsa AT. Cancer and the complement cascade. *Mol Cancer Res*. 2010. 8: 1453-1465.
- Sadrzadeh SM, Bozorgmehr J. Haptoglobin phenotypes in health and disorders. *Am J Clin Pathol*. 2004. 121 Suppl: S97-S104.
- Santin AD, Zhan F, Bignotti E, Siegel ER, Cané S, Bellone S, Palmieri M, Anfossi S, Thomas M, Burnett A, Kay HH, Roman JJ, O'Brien TJ, Tian E, Cannon MJ,
- Saqi A, Pasha TL, McGrath CM, Yu GH, Zhang P and Gupta P. Overexpression of p16INK4A in liquid-based specimens (surePath) as marker of cervical dysplasia and neoplasia. *Diagn Cytopathol*. 2002. 27:365-370.
- Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, Glass AG, Cadell DM, Rush BB, Scott DR, Sherman ME, Kumar RJ, Walcholder S. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst*. 1993. 85:958-964.
- Schröer N, Pahne J, Walch B, Wickenhauser C, Smola S. Molecular pathobiology of human cervical high-grade lesions: paracrine STAT3 activation in tumor-instructed myeloid cells drives local MMP-9 expression. *Cancer Res*. 71:87-97.
- Simpson KL, Jones A, Norman S, Holes CH. Expression of the complement regulatory proteins decay accelerating factor (DAF, CD55), membrane cofactor protein (MCP, CD46) and CD59 in the normal human uterine cervix and in premalignant and malignant cervical disease. *Am J Pathol*. 1997. 151: 1455-1467.
- Simpson RJ. Proteomics-driven cancer biomarker discovery: looking to the future. *Curr Opin in Chemical Biology*. 2008. 12:72-77.
- Stanley M. 2012. Epithelial cell responses to infection with Human Papillomavirus. *Clin Microbiol Rev*. 2012. 25: 215-222.
- Steel LF, Shumpert D, Trotter M, Seeholzer SH, Evans AA, London WT, Dwek R, Block TM. A strategy for the comparative analysis of serum proteomes for the discovery of biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Proteomics*. 2003. 3:601-609.
- Steenbergen RD, de Wilde J, Wilting SM, Brink AA, Snijders PJ, Meijer CJ. HPV-mediated transformation of the anogenital tract. *J Clin Virol*. 2005. 32S:S25-S33.

Stoler MH. Human papillomaviruses and cervical neoplasia: a model for carcinogenesis. *Int J Gynecol Pathol*, 2000. 19: 16-28.

Tang LJ, De Seta F, Odreman F, Venge P, Piva C, Guaschino S and García RC. Proteomic analysis of human cervical-vaginal fluids. *J Proteome Res*. 2007. 7:2874-2883.

Thadikkaran L, Siegenthaler MA, Cretaz D, Queloz PA, Schneider P, Tissot JD. Recent advances in blood-related proteomics. *Proteomics*. 2005. 5: 3019-3034.

The software Image J. <http://rsbweb.nih.gov/ij/>.

Trottier H, Franco EL. Human papillomavirus and cervical cancer: burden of illness and basis for prevention. *Am J Manag Care*. 2006. 12. 17 Suppl.: S462-S472.

Tu C, Rudnick PA, Martinez MY, Cheek KL, Stein SE, Slebos RJ, Liebler DC. Depletion of abundant plasma proteins and limitations of plasma proteomics. *J Proteome Res*. 2010. 9:4982-4991

Udby L, Sorensen OE, Pass J, Johnsen AH, Behrendt N, Borregaard N, Kielsen L. Cysteine-rich secretory protein 3 is a ligand of alpha 1B-glycoprotein in human plasma. *Biochemistry*. 2004. 43: 12877-86.

Vivanco, F. (2008). *Proteómica y Medicina. Curso de Biotecnología Aplicada a la Salud Humana*. CIEMAT -Amgen.

Von Knebel DM. New markers for cervical dysplasia to visualize the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infection. *Eur J Cancer*. 2002. 38:2229-2242.

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 1999.189:12-19.

Walther TC, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. *J Cell Biol*. 2010. 190:491-500.

Wang JL, Zheng BY, Li XD, Angstrom T, Lindstrom MS and Wallin KL. Predictive significance of the alterations p16INK4A, p14ARF, p53 and proliferating cell nuclear antigen expression in the progression of cervical cancer. *Clin Cancer Res*. 2004. 10: 2407-2414.

Wang YF, Lang HY, Yuan J, Wang J, Wang R, Zhang XH, Zhang J, Zhao T, Li YR, Liu JY, Zeng LH, Guo GZ. Overexpression of keratin 17 is associated with poor prognosis in epithelial ovarian cancer. *Tumour Biol*. 2013. 34:1685-9.

Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL, Humphery-Smith I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*. 16:1090-1094.

Weiderpass E, Labr che F. Tumors of the female reproductive system. *Saf Health Work*. 2012. 3:166-180.

Weinberg, ED. Iron with holding: a defense against viral infections. *Biometals*. 1996. 9:393-399.

Welinder C, Ekblad L. Coomassie staining as loading control in Western Blot analysis. *J Proteome Res*. 2011. 10: 1416-19.

Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, Yan JX, Gooley AA, Hughes G, Humphery-Smith I, Williams KL, Hochstrasser DF. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology*. 1996. 14: 61-65.

Wong YF, Cheung TH, Lo KW, Wang VW, Chan CS, Ng TB, Cheng TK, Mok SC. Protein profiling of cervical cancer by protein-biochips: proteomic scoring to discriminate cervical cancer from normal cervix. *Cancer Lett*. 2004. 211:227-234.

Woodworth CD and Simpson S. Comparative lymphokine secretion by cultured normal human cervical keratinocytes, papillomavirus-immortalized and carcinoma cell lines. *Am J Pathol*. 1993. 142:1544-1555.

World Health Organization, WHO Mortality Databank. Web: http://www.dep_iarc.fr/datava/infodata.htm.

World Health Organization. 2010. Human Papillomavirus and related cancers WHO/ICO HPV information center. WHO. 3th ed. 54pp.

Xu G, Hou CR, Jiang HW, Xiang CQ, Yuan HC, Ding Q, Zhang YF. Serum protein profiling to identify biomarkers for small renal cell carcinoma. *Indian J Biochem Biophys*. 2010. 47:211-218.

Yim EK, Lee KH, Bae JS, Namkoong SE, Um SJ, Park JS. Proteomic analysis of antiproliferative effects by treatment of 5-fluorouracil in cervical cancer cells. *DNA Cell Biol*. 2004. 23:769-776.

Yim EK, Park JS. Role of proteomics in translational research in cervical cancer. *Expert Rev Proteomics*. 2006. 3:21-36.

Zolla L. Proteomics studies reveal important information on small molecule therapeutics: a case study on plasma proteins. *Drug Discov Today*. 2008. 13:1042-1051.

Zhu X, Lv J, Yu L, Zhu X, Wu J, Zou S, Jiang S. Proteomic identification of differentially-expressed proteins in squamous cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2009. 112: 248-256.

zur Hausen H. Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinoma. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1977. 78:1-30.

zur Hausen H. Papillomavirus causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2000. 92:690-698.

zur Hausen H. Perspectives of contemporary papillomavirus research. *Vaccine.* 2006. 24. Suppl 3:S3/iii-iv.

APÉNDICE

APÉNDICE I.

Documento: Aprobación del Comité de Ética del INSP.



INSTITUTO NACIONAL
DE SALUD PÚBLICA

Avenida Universidad 855,
Colonia Santa María Ahuacatitlán
62508 Cuernavaca, Morelos,
México

Comisión de Ética
Dra. Lynnette Neufeld
Presidenta de la Comisión

Cuernavaca, Mor., 1 de marzo, 2007.
CI: 578, No. 298

Julieta Ivone Castro Romero
Investigador Responsable
Presente

En relación al proyecto " Análisis proteómico de sueros y secreción vaginal de mujeres infectadas con el VPH16 y 18 y la identificación de biomarcadores de malignidad para la detección temprana del cáncer cervicouterino " le informo atentamente que los miembros de la Comisión de Ética revisaron las correcciones incorporadas adecuadamente por Usted y dado que responden a los requisitos solicitados, me complace informarle que le han otorgado el dictamen de:

Aprobado

Le recuerdo que cualquier cambio o actualización en los procedimientos de este estudio deberá ser enviado a esta Comisión, previo a su implementación, utilizando el sistema de *Modificaciones a Proyectos en Desarrollo* que se encuentra dentro del sistema SIID. Si Usted tiene dudas sobre el registro de modificaciones menores, favor de comunicarse con esta Comisión para su consideración.

Atentamente

C.c.p. Dr. Eduardo Lazcano Ponce.- Presidente de la Comisión de Investigación.
Dr. Salvador Villalpando.- Presidente de la Comisión de Bioseguridad

Commutador: +52 (777) 329-3018
Tel y Fax: +52 (777) 329-3018
e-mail: neufeld@correo.insp.mx
web: www.insp.mx



APÉNDICE II. CARTA DE ACEPTACIÓN DE LA PUBLICACIÓN

De: Oncology Letters-Spandidos Publications [mailto:ol@spandidos-publications.com]
Enviado el: Jueves, 19 de Diciembre de 2013 05:20 a.m.
Para: Julieta Ivone Castro
Asunto: Spandidos Publications

<http://www.spandidos-publications.com> ♦ ol@spandidos-publications.com

Oncology Letters
Mimet House, 5a Praed Street, London W2 1NJ, United Kingdom

December 19, 2013

MS No.: OL-4002-E10061

Title: Glycoprotein A1BG and Complement C3 are over-expressed in Cervical Intraepithelial Neoplasia III

By: Galicia-Canales et al.

Dr Castro J

Thank you for your email. **Your manuscript has been accepted for publication in Oncology Letters. The current average processing time for articles in Oncology Letters is 3-4 months. Proofs will be sent shortly.**

Yours sincerely,

The Secretariat
for D.A. Spandidos

Spandidos Publications UK Ltd
Mimet House, 5a Praed Street
London W2 1NJ
United Kingdom
Tel: +44 (0)20 7262 8050
Fax: +44 (0)20 7262 9825
E-mail: ol@spandidos-publications.com
Website: www.spandidos-publications.com

Title

Glycoprotein A1BG and Complement C3 are over-expressed in Cervical Intraepithelial Neoplasia III

Authors

Norma Angélica Galicia Canales¹, Vicente Madrid Marina¹, Jorge Salmerón Castro², Alfredo Antúnez Jiménez², Guillermo Mendoza-Hernández³ (†), Elizabeth Langley McCarron⁴, Margarita Bahena Roman¹ and **Julieta Ivone Castro-Romero**¹

Affiliation

¹Research Center on Infection Diseases. National Institute of Public Health. Av. Universidad 655, Col. Santa María Ahuacatlán, Cuernavaca, Morelos. C.P. 62100.

²Epidemiology and Health Services Research Unit. National Institute of Social Security. Av. Plan de Ayala Esq. Central s/n, Cuernavaca, Morelos. C.P. 62450.

³ Peptides and Proteins Laboratory. Biochemistry Department. Medicine Faculty. National Autonomous University of Mexico (UNAM), Av. Universidad 3000, Coyoacán, México, D.F. C.P. 04510.

⁴ Biomedical Cancer Research Unit. Basic Research Subdirection. National Institute of Cancer. San Fernando 22, Col. Sección XVI, México D.F. C.P. 14080

Correspondence author

¹ Julieta Ivone Castro Romero, MD, PhD. Research Center on Infection Diseases. National Institute of Public Health. Av. Universidad 655, Col. Santa María Ahuacatlán, Cuernavaca, Morelos. C.P. 62100. Telephone. 52 (777)3293023. E-Mail: jcastro@insp.mx

Key words: Cervical cancer, HPV, CINIII, complement C3, A1BG.

Running title: Complement C3 an A1BG expression in CINIII

Abstract

The main objective was to analyze sera proteins from women with intraepithelial neoplasia III (CINIII) and control healthy women to identify a potential biomarker to detect lesions with greater probability of cervical transformation. Five sera samples from HPV16⁺ and histopathology diagnosis of CINIII women and five control healthy female (HPV-) were used for this study. The proteins separation was performed on 2-dimensional electrophoresis, stained with colloidal Commassie blue. Quantitative analysis was performed with the "Image Master 2D Platinum 6.0" software. Peptide sequence identification of was done in a nano- LC_ESI_MS/MS. The proteins with the highest score in Mascot (A1BG and C3), were validated by Western blot in an additional 55 sample sera from control and CINIII group. We identified 8 highest score spots that were over expressed in the CINIII sera group, which correspond to A1B-glycoprotein, complement C3, proapolipoprotein, apolipoproteins and haptoglobins. Only A1BG and C3 were validated by Western blot and the densitometry analysis of the corresponding bands from both groups were compared. We observed that the relative density of the bands from both proteins was greater in all of the serum samples from the women with cervical intraepithelial neoplasia (CIN III), compared to the control group. This study allowed us to identify two proteins, whose expression is elevated in women with CINIII, which opens the possibility that they could be used as biomarker of CINIII lesion, but before will be interesting to expand the study in order to investigate its expression to throughout the different premalignant lesions.

Introduction

Cervical cancer is the third most common cancer in the female population, worldwide. Globally, it is considered to be the seventh cancer, with 530,232 reported cases in 2008. More than 85% of these cases occur in developing countries [1]. Latin America and the Caribbean are regions with very high incidence of cervical cancer. The World Health Organization reports 33,000 new cases, per year [2, 3]. Currently, in Mexico it is the second cause of death by cancer in women, and there is a population of 37.45 million women, 15 years of age, that are at risk for developing cervical cancer. It is estimated that each year, 10,186 women are diagnosed with cervical cancer and that 5051 of them die due to this disease [4]. Cervical cancer develops from a persistent infection with an oncogenic Human Papilloma Virus (HPV), which progresses into an intraepithelial lesion and from there to invasive cervical cancer.

The majority of patients are diagnosed in 84 very advanced stages of cervical cancer, thus losing the most important window for treatment. This cancer is preceded by precursor lesions which are classified, according to Richart into three progressive degrees (CIN I-III) [5, 6], while the Bethesda classification divides them into low grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) and high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL). HSIL are considered to be the true precursors to squamous cell cervical carcinoma. There are a number of reports in the literature that point out that persistent high-grade intraepithelial lesions evolve into carcinoma in 40-100% of cases, while low-grade lesions show spontaneous regression [7, 5].

The most common diagnostic method to detect these lesions has been based on cytology and histopathology of cervical tissue and cells. The Pap smear or Papanicolau test is a low cost method that is easily accessible, with a 50% sensitivity and high susceptibility to intra and inter-individual variability [8-9]. This technique has many limitations, since false negative results are often reported (20- 30%) due to manipulation and contamination of the samples [10]. The introduction of liquid cytology has contributed to the reduction of the efficiency problem in sample processing; however, validation in terms of sensitivity and specificity still presents deficiencies [8, 9, and 11]. This procedure makes it possible to detect low and high-grade dysplasia. Even though it is not considered a definitive diagnostic method, it does permit verification of the presence of a lesion, determines its topography, extension, and severity as well as allowing the taking of directed biopsies for further histopathological analysis [12].

In the last few years, there has been a trend toward finding novel molecular biomarkers by using proteomic tools that would permit the identification of which types of early lesions present a greater risk of malignant transformation. These types of tools allow the screening of proteins on a larger scale, from different biological samples such as serum, plasma, cells, and tissues, as well as the identification of molecules expressed at very low concentrations (fentomoles) with high sensitivity and specificity [13,14]. Biofluids, such as serum and plasma, are the main source of biomarkers due to their low cost and easy collection and processing, since they are considered to be non invasive biological samples [15, 16].

A number of studies have been published which focus on the search for new biomarkers from serum [17-20], plasma [21-23], and tissue [24-29], from patients with early cervical lesions and/or cervical cancer, using proteomic tools. However, although a large number of proteins have been identified that show differential expression between samples from healthy women and those with different types of intraepithelial lesions or cervical cancer, none of these comply with the characteristics required for a specific marker, according to international requirements, that would be useful for the detection of lesions that have a greater probability of being transformed into cancer. Currently the markers under validation are Ki67, pINK4A, MIB-1, and ProExC [30-32]. In this project we proposed using this tool to search for a marker in serum from women infected with the Human Papilloma Virus and with a histopathological diagnosis of advanced intraepithelial cervical lesion (CIN III).

Material and Methods

Patients and biological samples

This is descriptive and transversal pilot study in serum samples from a population of Mexican women. For this study we used 10 samples (5 controls and 5 cases) of blood from women (ages ranging from 28-65 years) recruited from the Hospital General Regional del Estado de Morelos Del IMSS), who fulfilled the inclusion criteria and accepted to donate a blood sample under informed consent. This study was reviewed and approved by the Ethics Committee of the Hospital General Regional del Estado de Morelos (IMSS) and the IRB from the Instituto Nacional de Salud Pública (INSP). The inclusion criteria for cases were: positive Hybrid Capture test, abnormal PAP, CIN III lesion diagnosis confirmed by colposcopy and

histopathology using the Bethesda criterion; both were made by two specialists from the Colposcopy Unit of the IMSS and two pathologist form the Pathology Unit of the IMSS. Additionally the positive for HPV 16 was confirmed by PCR (Table1). Only the samples serum from women with confirmed CINIII diagnostic were included. The inclusion criteria for control group were: negative hybrid capture test, normal PAP and without apparent injury by gynecological physical examination. For both groups, inclusion criteria also included not having had a HPV vaccine, not having taken oral contraceptives in the 6 months previous to the sampling and without chemotherapy treatment.

Blood sample processing

Blood samples (3 ml), were taken by venipuncture in Vacutainer tubes with separator gel SSTTM and left at room temperature for 1h. Samples were then spun at 1300 x g for 15 min. Serum was stored at -80°C in 100 µl aliquots until processed. Ten µl aliquots of serum (in triplicate) from each patient were passed through a high affinity column to eliminate albumin and immunoglobulin G (IgG), using a commercial kit (ProteoSeek™ 162 Albumin/IgG removal Kit. Pierce). Other interfering substances, such as detergents, salts, lipids, nucleic acids, phenolic acids were eliminated using the 2- D Clean Up kit (General Electric). Protein quantification in serum was carried out with 2-D Quant (General Electric).

Two dimensional gel electrophoresis (2-DE)

200 µg of protein (in triplicate) were mixed with rehydration buffer (Urea 8M, CHAPS 2%, buffer IPG2 0.5% pH 4-7, bromophenol blue 0.002%, DTT 0.56 M) in a final volume of 250 µl. To each tube, 1µl of buffer IPG2 and 0.00056 g of DTT were added. Isoelectric focusing was carried out in an Ettan IPGphor Unit using pI 4-7 of 13 cm strips (General Electric). Rehydration time was 14 hours at a constant current of 50 mA per strip. The voltages used for isoelectric focusing were 500, 1000, 8000 y 8000 Volt/h. Afterwards, the strips were equilibrated in buffer (Tris-HCl pH 8.8 50 mM, Urea 6 M, Glycerol 30%, SDS 2%, bromophenol blue 0.002%, milliQ water) supplemented with DTT (50mg/5ml) for 15 minutes and after with iodoacetamide (125 mg/5 ml) for the same amount of time. Protein separation was carried out on polyacrylamide gels (SDS-PAGE) in two dimensions on gradient gels of 7.5-20% at a constant voltage of 150V, for 5:30 hrs. Gels were stained with Colloidal Coomassie Blue G-250, according to the technique described by [33]. After staining, gels were scanned using the LabScan TM 5.0 (General Electric). Digital images were used for detection and analysis using "ImageMaster 2 D Platinum 6.0" software (General Electric, 2005). The selected spots were identified by ESI-TOF-MS (*Electrospray system of ionization/ time-of flight/mass*), according the following protocol: protein spots were excised from the Coomassie stained 2D gels, destained with 50% (v/v) methanol 5% (v/v) acetic acid for 12 h. The destained gels were washed with deionized water, soaked for 10 min in 100 mM ammonium bicarbonate, cut into small pieces, completely dehydrated with 100% acetonitrile and vacuum-dried. In-gel digestion was performed by adding 30 µL of modified porcine trypsin solution (20 ng/mL) (Promega, Madison, WI, USA) in 50 mM ammonium bicarbonate followed by overnight incubation at room temperature. Peptides were extracted with 50% acetonitrile (v/v) 5% formic acid (v/v) twice for 30 min with sonication. The volume of the extracts was reduced by evaporation in a vacuum centrifuge and the adjusted to 20 µL with 1% (v/v) formic acid.

LC/MS-MS

Mass spectrometric analysis of tryptic peptides was carried out using an integrated nano-LC_ESI_MS/MS system (Quadrupole/time-of-flight, Synapt G2 High Definition mass spectrometer, Waters Corporation), equipped with a NanoLockSpray ion source. The instrument was coupled on line to a NanoAcquity Ultra Performance liquid chromatograph (UPLC), (Waters Corporation). The binary solvent system used was 2% acetonitrile in Milli Q water with 0.1% formic acid (mobile phase A) and 98% acetonitrile in Milli Q water with 0.1% formic acid (mobile phase B). Samples were concentrated and desalted by injection into a Symmetry C18 UPLC trapping column (5 mm, 180 mm x 20 mm, Waters Corporation) and washed with 100% mobile phase A at a flow rate of 15 µL/min. After 3 min, the trap column was switched in line with the analytical column. Peptides were separated on a BEH, C18 UPLC column (1.7µ m, 75 µm x 100 mm, Waters Corporation) using a linear gradient to 40% B over a 30 min period, at a flow rate of 0.3 L/µmin. followed by a 10 min rinse of 98% mobile phase B.

The mass spectrometer was calibrated with a NaCl solution and operated in ESI positive V-mode at a resolution of 10000 full with at half height (fwhh). Spectra were acquired in automated

mode using data-dependent acquisition (DDA). [Glu 1214] fibrin peptide B solution (100 fmol/ μ L) was infused through the reference sprayer of the NanoLockSpray source at a flow rate of 500 nL/min and was sampled at 30 s intervals during the acquisition. MS survey scans of 1 s over the m/z range 300 to 1600 were used for peptide detection followed by two MS/MS scans of 2 s each (m/z 50 to 2000) of detected precursors. Collision energies were automatically adjusted based on the ion charge state and the mass. The five most intensive precursor ions were interrogated per MS/MS switching event. Dynamic exclusion for 60 s was used to minimize multiple MS/MS events for the same precursor

Data Processing and Protein Identification

DDA raw data files were processed and converted to pkl files using ProteinLynx Global Server version 2.4 (PLGS) software (Waters Corporation). Pkl files were subsequently database searched using the MASCOT search algorithm (Version 1.6b9, Matrix Science, London, UK) available at <http://www.matrixscience.com>). Since the specific genome was not available, searches were conducted using the *human* subset of the National Center for Biotechnology Information non-redundant database (NCBI nr, <http://www.ncbi.nih.gov>). Trypsin was used as specific protease, one missed cleavage was allowed with mass tolerances of 50 ppm and 0.05 Da for the precursor and fragment ion, respectively. Variable modifications included methionine oxidation and glutamine-asparagine deamination. Peptide matches with Mascot scores exceeding the 95 % level of confidence were accepted as correct matches. The threshold score was 48 for $p < 0.05$.

Western blot for A1BG and C3

The serum samples used for these assays were taken from a group of 55 women participating in the HPV Detection Service of the IMSS of the state of Morelos. This group of women underwent a Pap smear and a hybrid capture. If the Pap smear showed any alterations, they also underwent a colposcopy and histopathological study. For the Western Blot analysis, control group ($n=30$) included women with normal Pap smear and negative hybrid capture; while the case group ($n=25$) included women with an abnormal Pap smear, positive hybrid capture and diagnosis of CIN III by colposcopy and histopathology. Additionally in the case group, the HPV serotype was identified by PCR [56% (HPV 16); 8% (HPV 58) ; 8% (HPV 33), 4% (HPV 18) and 24% Unidentified]. Twenty micrograms of total protein from serum were separated on unidimensional 10% SDS-PAGE gels and transferred to PVDF membranes (Hybond, *Amersham Biosciences*). The membranes were blocked for 1 h in 0.1% Tween 20, 5% non-fat dry milk in TBS, at room temperature. Primary antibodies against A1BG and 251 C3 (Santa Cruz, CA, USA) were diluted 1:2000 and 1:1000, respectively in 0.1% Tween 20, 5% non-fat dry milk in TBS and incubated on the membranes overnight at 4°C. Membranes were washed with 0.1% Tween 20 in TBS and incubated with secondary antibody (Goat-anti-mouse IgG-HRP; Santa Cruz, USA) for 1h at a dilution of 1:2000. Peroxidase activity was visualized by colorimetry with TMB (3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine), (Invitrogen, CA, USA). After immunodetection the membrane was washed twice with TTBS and stained with 0.1% Coomassie R-350, according with the method described by Welinder & Ekblad [59] and used as loading control. Densitometric quantification of the western blots was determined using The J Image software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Detection and typification of viral DNA

Cervical cells were taken by endocervical curettage and collected in transport medium (hc2 DNA Collection Device; Digene, Gaithersburg, MD, USA). Samples were transported and stored at -20°C until use. The presence of infection with oncogenic serotypes was determined by hybrid capture according to manufacturer's specifications using the Hybrid Capture II Kit (Digene, Corp), which detects the following HPV oncogenic serotypes: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, and 68 [34]. Finally, positive samples were used for viral typification using PCR. Briefly, extraction and purification of DNA was carried out using the Genomic DNA Purification Kit (Fermentas, Life Sciences), following the manufacturer's instructions. DNA integrity was determined by amplifying a 450 bp fragment of the constitutive G6PDH gene using oligonucleotide 5'ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC 3'. Verification of the presence of the HPV L1 gene was carried out by PCR amplification of a 450 fragment using the MY11 (5'GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG 3') and MY09 (5'CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC 3') oligonucleotides. DNA samples which amplified the HPV L1 fragment were analyzed by RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) to typify the HPV [35]. The samples were

digested with four restriction endonucleases (279 *Rsa*1, *Acc* I, *Dde* I, and *Xba*I), and incubated at 30°C for two hours. The band profile was visualized on 6% polyacrylamide gels. DNA positive control came from SiHa and CasKi cells, while water was used as a negative control. Viral type confirmation was determined by sequencing using specific oligonucleotides for each viral type.

Results

Sample Characteristics

The analysis of the serum protein profiles in this study included two groups of samples from women in the control group (n=5) and a group from women with a diagnosis of CIN III by histopathology (n=5). Both groups fulfill the inclusion criteria detailed in the Methods section. The range of ages, diagnosed oncogenic HPV infection, viral genotype and both histological and cytological diagnosis can be found in **table 1**, which shows the homogeneity of the analyzed samples. In general, all of the women in the control group had a normal PAP result and were negative for oncogenic viruses while the women in the case group had an abnormal PAP, were positive for oncogenic virus HPV 16 and had a confirmed diagnosis for a Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN III). The average age for women in each group was 42.6 (control) and 45.4 (cases), with a very similar median age for both groups (41 vs 42), respectively.

2-DE Gels

Serum from cases (5 patients diagnosed with CIN III), and control group (n=5) described before were analyzed in triplicate by 2D-SDS-PAGE and the differential expression was evaluated by using Image Master Platinum 6.0 software (General Electric). The program detected 337 spots belonging to the healthy group and 516 spots belonging to cases diagnosed with CIN III. Matching between the groups resulted in 189 matches common to both groups. We selected 8 spots for further identification (**Figure 1**). The parameters used for the selection of these spots were that the spots were present in 8-11 gels and that they were only present in the case group and not in the control group, indicating a constant presence of the spot. These spots were cut out of the gels, digested and sent for identification by Mass Spectrometry.

LC-ESI/MS-MS Analysis

The eight spots selected from the 2-DE gels were identified using ESI-TOF-MS. The peak of mass of the peptide was compared to the data base found in NCBI. Table 2 shows the list of proteins sequenced from the eight spots, which correspond to A1B319 glycoprotein, complement C3, proapolipoprotein, apolipoproteins and haptoglobins.

Western Blot

Figure 2(A) shows a representative image of a western blot corresponding to the expression of A1BG and C3 in serum of women with a diagnosis of CIN III (n=25) and in a healthy control group (n=30). Figure 2b shows the densitometry analysis of the corresponding bands from both groups. We observed that the relative density of the bands from both proteins is greater in the serum samples from the women with cervical intraepithelial neoplasia (CIN III), compared to the control group. In the case of C3 the statistic analysis showed values for control of 3.1 ± 0.85 vs 8.0 ± 1.17 (t-test =5.7, $P \leq 0.05$) in CINIII. For A1BG the values were 2.8 ± 0.40 vs 4.5 ± 0.68 (t-test =4.3, $P \leq 0.05$).

Discussion

Proteins are encoded by the genes that make up the human genome and they are directly responsible for regulating cellular function by activation or inactivation of different signaling pathways related to proliferation, death and cellular metabolism. Currently, we know that the number of proteins expressed in a cell at a particular time, does not correspond to the total number of activated genes. Thus, it is necessary to detect the profile of the proteins expressed at specific times and under particular conditions in both healthy subjects and those with particular pathologies. Furthermore, these protein profiles in serum, plasma, tissue, urine and other human fluids are modified as a result of acute or chronic diseases produced by infectious agents (virus, bacteria, and fungi) or by alterations at the genetic level. Through the identification of these protein profiles we now have biomarkers for some pathologies that can be used for prevention, diagnosis and follow-up [36], some of which have been approved by the FDA for certain cancers [37].

Cervical cancer is a pathology whose causal agent is a virus (HPV), which is characterized for modifying the intracellular biology of the host during the infection phase and its integration into

the genome. Additionally, it unleashes an immune response on the local and systemic levels. Some of these changes are reflected on the expression profiles of some proteins in tissue, plasma, serum, and cervical mucus. Our group has been interested in studying these profiles in serum, plasma and cervical mucus of women with different premalignant lesions and cervical cancer. Here we show the results obtained from comparing serum proteins from a group of Mexican women with a proven CIN III diagnosis to a healthy group using proteomic tools.

In this study we were able to identify eight proteins with increased expression in serum of patients with cervical intraepithelial grade III lesions, which correspond to A1B-glycoprotein, C3 complement, 1 proapolipoprotein, 2 apolipoproteins and 3 haptoglobins, compared to healthy women. For two of these proteins, A1B glycoprotein and C3 complement, we confirmed their expression in serum using western blot in another group of women (25 CIN III and 30 Controls). The rest of these proteins were not analyzed in this manner since other research groups have already demonstrated their over-expression in serum [18] and plasma [20] from women with different degrees of intraepithelial lesions and cervical cancer. The results from the western blots show that both A1B-glycoprotein and C3 complement were over-expressed in all of the women in the intraepithelial CIN III lesion group compared to the group with healthy women, suggesting that these two proteins may be participating in regulating the immune response triggered by the presence of the premalignant lesion or may be involved with the carcinogenesis. However, this must be demonstrated in future studies using other types of methodologies. A similar result was reported by Jeong in 2008, in six plasma samples from healthy Korean women compared to six women with squamous cell carcinoma (SCC) where both proteins were over-expressed in the two dimensional gels.

However, only the C3 Complement was validated in a separate group of women with cancer in situ and invasive cancer, when the cervical tissue is already transformed. In our study, we were able to demonstrate that C3 over-expression is present in earlier disease stages. Thus, it will be important to elucidate the precise moment in which expression of this protein is initiated to determine whether this increase is associated with the presence of the human papilloma virus during the infection stage and whether it may be useful as a biological marker.

C3 complement is a central protein in the complement cascade and its expression is essential for activation of all three complement pathways [38]. It is part of the immune system, playing an essential role in destroying invasive microorganisms and cleaning up dead and apoptotic cells. The complement system is one of the most ancient and is highly conserved on the evolutionary scale [39]. Complement proteins can be zymogens that are transformed into enzymes and activate complement, proteins or different receptors. Elevated concentrations of this protein have been found in serum from patients with ovarian cancer [40]; hepatitis C related hepatocellular cancer [41], pancreatic cancer [42], small cell renal carcinoma [43], and squamous cell carcinoma (SCC) [22]. Previous to these findings, in 1980 it had been demonstrated, through simple immunodiffusion assays that the average levels of C3 increase simultaneously with the progression of cervical cancer lesions up to stage III, to later diminish at stage IV [44]. However, we were unable to access the original article, making it difficult to determine how this study was designed in order to compare it with our results. In contrast to these results, it has recently been reported that fragments of complement C3 and C4 A/B were reduced in plasma from patients with squamous cell carcinoma of the penis, and this reduction became more evident as the disease progressed, suggesting that these fragments could be good candidates as a prognostic tool [45]. The causes for this reduction are unknown, but it is speculated that it could be the result of infection with HPV or the Epstein Barr (EBV) virus, which are prevalent in this type of cancer in males [46], and whose proteins could be attacking the immune system [47, 48]; however, this has not been demonstrated.

These contradictory findings suggest that the complement proteins may be regulated differentially, depending on the type and origin of the cancer, making it interesting to carry out further research into this matter. Recently, a group of researchers suggested that not only are there proteins with high variability under normal conditions, such as haptoglobin (0-40 mg/ml); lysozyme (0,01-0,1 mg/ml); or C reactive protein (0,01-0,3 mg/ml); but also those that show a minor dispersion such as albumin – with a coefficient of variation (CV) of 9%; transferrin 410 – CV 14%; C3c complement - CV 17%), alpha-1 acid glycoprotein (CV 21%), alpha2-macroglobulin (CV 20%); transthyretin fragment (CV 28,3%) and beta-chain alpha2-HS-glycoprotein (CV 29,7%) [49], which could be important to provide information related to the state of health of a person. It will be important to determine whether the changes in expression of C3 and A1B-glycoprotein, identified in this project, can provide relevant information

associated to changes that occur throughout the progression of cervical lesions before transformation into cervical cancer.

The alpha-1-beta-glycoprotein (A1BG) is a protein found in serum and plasma whose function is unknown. By its duplication and its nucleic acid sequence it shows homology to the immunoglobulin family [50]. This protein is present in normal adult plasma at a concentration of 22 mg/dL [50]. However, there has never been a biological function attributed to this protein, and it has been found elevated in some cancers. [17] reported that A1BG is elevated in serum of patients with endometrial cancer and with cervical cancer [17], and a more recent article shows an increase in patients with cervical squamous cell carcinoma [22, 51]. These findings suggest that this glycoprotein could be involved in cervical carcinogenesis, making it imperative to determine its function.

Haptoglobins are glycoproteins capable of binding hemoglobin, which are secreted by hepatic cells in response to different stimuli, and function as iron transporters and recyclers. Their concentration depends on the levels of hemoglobin, that is, the greater the hemoglobin concentration, the lower the concentration of haptoglobins [52]. Recent studies have demonstrated that iron favors the growth of cancer cells and that it preferentially accumulates in cancer cells compared to normal cells [53].

Thus, it has been suggested that these proteins could be used as possible markers in patients with ovarian and lung cancers [54] and colon cancer [55]. There is little information about the role that these proteins could play in cervical cancer, in particular, since the difference in expression of these proteins in women with different degrees of lesions (low grade, high grade, and cancer) is very discreet as the lesions progress [18], suggesting that they may not be good candidates as biomarkers for this pathology. In our study we found that three isoforms of these glycoproteins are expressed in both the healthy control group and the NIC III cases, and there was not a significant difference. The Apolipoprotein CIII (APO CIII) is a transporter molecule for high density lipoproteins and regulates different cellular proteins involved in oxidation, apoptosis, cellular recognition, and transport [56]. There are reports that describe the association of these proteins with different types of cancer, such as hepatocellular cancer [57] and breast cancer [52]. For example, ApoC-I has been found increased in colon, prostate and liver cancers, while ApoC-III is associated with pancreatic, breast and colon cancers [58]. However, there is no information with reference to cervical cancer.

In conclusion, serum constitutes an alternative source that is useful to explore differential protein profiles between healthy women and those with high grade intraepithelial lesions (CIN III) secondary to Papilloma virus infection. A number of studies, summarized in a recent article by Rutkowsky in 2010 [48] and by Pio, 2013 [60] that suggest that modifications in the complement system can contribute to tumor development due to their influence on processes involving proliferation, angiogenesis, invasion and migration, as well as survival. Thus, it is possible that in the case of cervical cancer, these proteins that make up the complement system, such as Protein C3, could contribute as a co adjuvant to the development of lesions throughout the disease. However, more studies are required to elucidate the mechanisms involved and determine if other proteins from the same family are associated to this type of cancer.

Acknowledgements

This work is dedicated to Dr. Guillermo Mendoza-Hernández from the laboratory of Peptides and Proteins, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, National Autonomous University of Mexico (UNAM) who passed away in 2011 and who carried out the mass spectrometry analysis for the identification of the proteins. This project was supported by the National Institute of Public Health and the Biology Science Graduate Program, UNAM.

Conflict of interest: none to declare

References

- [1] Weiderpass E & Labrèche F. Tumors of the female reproductive system. *Saf Health Work* 2012; 3:166-80.
- [2] Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers CD, Parkin D. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010; 127: 2893-2917.
- [3] Jernal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61:69-90.
- [4] Human Papillomavirus and related cancers. WHO/ICO HPV information center. Summary Report Update. [On line]:

http://hvp2010.org/main/images/stories/docs/HPVInformationCentre_SummaryReportWorld_Feb2010.pdf

[5] Syrjänen K. Histology, classification and natural history of cervical intraepithelial neoplasia (CIN). *CME J Gynecol Oncol* 2009; 14: 4-21.

[6] Martin C, O'Leary J. Histology of cervical intraepithelial neoplasia and the role of biomarkers. *Best Pract Res Clin Obstet Gynecol* 2011; 25:605-15.

[7] Correa P. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res* 1988; 48:3554-60.

[8] Lie A, Risberg B, Borge B, Sandstad B, Delabie J, Rimala R, et al. DNA-versus RNA-based methods for human papillomavirus detection in cervical neoplasia. *Gynecol Oncol* 2005; 97: 908-15.

[9] Wright C Jr. Cervical cancer screening in the 21st century: is it time to retire the Pap smear? *Clin Obstet Gynecol* 2007; 50: 313-23.

[10] Burd E. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev.* 2003; 16:1-17.

[11] Snijders P, Heideman D, Meijer C. Methods for HPV detection in exfoliated cell and tissue specimens. *APMIS* 2010; 118: 520-28.

[12] Grubisic G, Klaric P, Jokanovic L, Soljagic Vranes H, Grbavac I, Bolanca I. Diagnostic approach for precancerous and early invasive cancerous lesions of the uterine cervix. *Coll Antropol* 2009; 33: 1431-36.

[13] Cho W. Proteomics technologies and challenges. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2007; 5: 77-85.

[14] Breuer E, Murph M. The role of proteomics in the diagnosis and treatment of women's cancers: current trends in technology and future opportunities. *Int J Proteomics* 2011; 1-17.

[15] Veenstra T, Conrads T, Hood B, Avellino A, Ellenbogen R, Morrison R. Biomarkers: mining the biofluid proteome. *Mol Cell Proteomics* 2005; 4: 409-18.

[16] Xu X, Veenstra T. Analysis of biofluids for 530 biomarker research. *Proteomics Clin. Appl.* 2008; 2:1403-12.

[17] Abdul- Rahman P, Kjong-Lim B, Hashim O. Expression of high abundance proteins in sera of patients with endometrial and cervical cancers: Analysis using 2- DE with silver staining and lectin detection methods. *Electrophoresis* 2007; 28: 1989- 96.

[18] Barba de la Rosa A, Lugo-Melchor O, Briones-Cerecero E, Chagolla-López A, de León-Rodríguez A, Santos L, et al. Analysis of human serum from women affected by cervical lesions. *J Exp Ther Oncol* 2008; 7: 65-72.

[19] Matthews R, Azuero A, Asmellash S, Brewster E, Partridge E, Piyathilake C. Usefulness of serum mass spectrometry to identify women diagnosed with higher grades of cervical intraepithelial neoplasia may differ by race. *Inter J Womens Health.* 2011; 3:185-92.

[20] Guo X, Abliz G, Reyimu H, Zhao F, Kadeer N, Matsidik R, et al. The association of a distinct plasma proteomic profile with the cervical high-grade squamous intraepithelial lesion of Uyghur women: a 2D liquid-phase chromatography/mass spectrometry study. *Biomarkers* 2012; 17: 352-61.

[21] Piyathilake C, Oelschlager D, Meleth S, Partridge E, Grizzle W. Plasma protein profiles differ between women diagnosed with cervical intraepithelial neoplasia (CIN) 1 and 3. *Cancer Inform* 2007; 2: 345-49.

[22] Jeong D, Kim H, Prince A, Lee D, Kim Y, Han J, et al. Plasma proteomic analysis of patients with squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *J Gynecol Oncol* 2008; 19: 173-80.

[23] Looj M, Karsani SA, Rahman M, Dali A, Ali S, Ngah W, Yusof Y. Plasma proteome analysis of cervical intraepithelial neoplasia and cervical squamous cell carcinoma. *J Biosci* 2009; 34: 917-25.

[24] Ono A, Kumai T, Koizumi H, Nishikawa H, Kobayashi S, Tadokoro M. Overexpression of heat shock protein 27 in squamous cell carcinoma of the uterine cervix: a proteomic analysis using archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Hum Pathol* 2009; 40: 41-49.

[25] Zhu X, Lv J, Yu L, Zhu X, Wu J, Zou S, Jiang S. Proteomic identification of differentially-expressed proteins in squamous cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2009; 112: 248-56.

[26] Liu C, Pan C, Shen J, Wang H, Yong L, Zhang R. Discrimination analysis of mass spectrometry proteomics for cervical detection. *Med Oncol* 2011; Suppl. 1: S553-59.

[27] Fukushima C, Murakami A, Yoshitomi K, Sueoka K, Nawata S, Nakamura K, et al. Comparative proteomic profiling in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Proteomics Clin Appl* 2011; 5: 133-40.

- [28] Uleberg K, Munk A, Skaland I, Furlan C, van Diermen B, Gudlaugsson E, et al. A protein profile study to discriminate CIN lesions from normal cervical epithelium. *Cell Oncol* 2011; 34: 443-50.
- [29] Uleberg K, Munk A, Brede C, Gudlaugsson E, van Diermen B, Skaland I, et al. Discrimination of grade 2 and 3 cervical intraepithelial neoplasia by means of analysis of water soluble proteins recovered from cervical biopsies. *Proteome Sci* 2011; 9: 1-36.
- [30] Pinto A, Crum C, Hirsch M. Molecular markers of early cervical neoplasia. *Diagn Histopathology* 2010; 16: 445-54.
- [31] Galgano M, Castle P, Atkins K, Brix W, Nassau S, Stoler M. Using biomarkers as objective standards in the diagnosis of cervical biopsies. *Am J Surg Pathol* 2010; 34: 1077-87.
- [32] Martin C, O'Leary J, Phil D. Histology of cervical intraepithelial neoplasia and the role of biomarkers. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2011; 25: 605-15.
- [33] Anderson N, Esquer-Blasco R, Hofmann J, Anderson N. A two-dimensional gel database of rat liver proteins useful in gene regulation and drug effects studies. *Electrophoresis* 1991; 12: 907-30.
- [34] Lórinicz A. Hybrid capture method for detection of human papillomavirus DNA in clinical specimens: a tool management of equivocal Pap smears and for population screening. *J Obstet Gynaecol Res* 1996; 22: 629-36.
- [35] Yoshikawa H, Kawana K, Kitagawa K, Mizuno M, Yoshikura H, Iwamoto A. Detection and typing of multiple genital human papillomaviruses by DNA amplification with consensus primers. *Jpn J Cancer Res* 1991; 82:524-31.
- [36] Mishra A, Verma M. Cancer Biomarkers: are we ready for the prime time?. *Cancers* 2010; 2: 190-208.
- [37] Gutman S, y Kessler L. The US Food and drug administration perspective on cancer biomarker development. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 565-71.
- [38] de Visser K, Korets L, Coussens L. Early neoplastic progression is complement independent. *Neoplasia* 2004; 6: 768-76.
- [39] Pio R. Control of complement activation by cancer cells and its implications in antibody-mediated cancer immunotherapy. *Revisión Inmunología* 2006; 25: 173-87. [On line]: <http://revista.inmunologia.org/Upload/Articles/6/8/687.pdf>
- [40] Bjorge L, Hakulinen J, Vintermyr O, Jarva H, Jensen T, Iversen O, et al. Ascitic complement system in ovarian cancer. *Br J Cancer* 2005; 92: 895-905.
- [41] Lee I, Chen C, Sheu J, Lee H, Huang G, Chen D, et al. Identification of complement C3a as a candidate biomarker in human chronic hepatitis C and HCV631 related hepatocellular carcinoma using a proteomics approach. *Proteomics* 2006; 6: 2865-73.
- [42] Hanas J, Hocker J, Cheung J, Larabee J, Lerner M, Lightfoot S, et al. (Biomarker identification in human pancreatic cancer sera. *Pancreas* 2008; 36: 61-9.
- [43] Xu G, Hou C, Jiang H, Xiang C, Yuan H, Ding Q et al. Serum protein profiling to identify biomarkers for small renal cell carcinoma. *Indian J Biochem Biophys* 2010; 47: 211-18.
- [44] Pulay A, Füst G, Csömör A. Serum complement levels in patients with cancer of the uterine cervix before and after radiation therapy. *Neoplasma* 1980; 27: 211-6 [Abstract on line]:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Pulay%20AT%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=7393359.
- [45] Ornellas P, Ornellas A, Chinello C, Gianazza E, Mainini V, Cazzaniga M, et al. Down regulation of C3 and C4A/B complement factor fragments in plasma from patients with squamous cell carcinoma of the penis. *Int Braz J Urol* 2012; 38: 739-49.
- [46] Alfonso L, Moyses N, Alves G, Ornellas A, Passos M, Oliveira Ldo H, et al. Prevalence of human papillomavirus and Epstein-Barr virus DNA in penile cancer cases from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012; 107: 18-23.
- [47] Campo M, Graham S, Cortese M, Ashrafi G, Araibi E, Dornan E, et al. HPV-16 E5 down-regulates expression of surface HLA class I and reduces recognition by CD8 T cells. *Virology* 2010; 407: 137-42.
- [48] Rutkowski M, Sughurue M, Kane A, Mills S, Parsa A. Cancer and the complement cascade. *Mol Cancer Res* 2010; 8: 1453-65.
- [49] Pakharukova N, Pastushkova L, Moshkovskii S. Variability of healthy human proteome. *Biomed Khim* 2012; 58:514-29. [Abstract on line]: [http://www.unboundmedicine.com/medline/citation/23289293/\[Variability_of_healthy_human_proteome\]](http://www.unboundmedicine.com/medline/citation/23289293/[Variability_of_healthy_human_proteome])

- [50] Ishioka N, Takahashi N, Putnam F. Amino acid sequence of human plasma alpha 1B-glycoprotein: homology to the immunoglobulin supergene family. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1986; 83: 2363-67.
- [51] Piyaphanee N, Ma Q, Kremen O, Czech K, Greis K, Mitsnefes M, et al. Discovery and initial validation of a 1-B glycoprotein fragmentation as a differential urinary biomarker in pediatric steroid-resistant nephrotic syndrome. *Proteomics Clin Appl* 2011; 5: 334-42.
- [52] Huang H, Stasyk T, Morandell S, Dieplinger H, Falkensammer G, Griesmacher et al. Biomarker discovery in breast cancer serum using 2-D differential gel electrophoresis/MALDI-TOF/TOF and date validation by routine clinical assays. *Electrophoresis* 2006; 27: 1641-50.
- [53] Weinberg E. The role of iron in cancer. *Eur J Cancer Prev* 1996; 5:19-36.
- [54] Thadikkaran L, Siegenthaler M, Crettaz D, Queloiz P, Schneider P, Tissot J. Recent advances in blood-related proteomics. *Proteomics* 2005; 5: 3019-34.
- [55] Dowling P, Clarke C, Hennessy K, Torralbo-Lopez B, Ballot J, Crown J, et al. Analysis of acute-phase proteins, AHSG, C3, CLI, HP and SAA, reveals distinctive expression patterns associated with breast, colorectal and lung cancer. *Int J Cancer* 2012; 131: 911-23.
- [56] Jiang J, Xu N, Zhang X, Wu C. Lipids changes in liver cancer. *J Zhejiang Univ Sci B* 2007; 8: 398-409.
- [57] Steel L, Shumpert D, Trotter M, Seeholzer S, Evans A, London W, et al. A strategy for the comparative analysis of serum proteomes for the discovery of biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Proteomics* 2003; 3: 601-9.
- [58] Cohen M, Yossef R, Erez T, Kugel A, Welt M, Karpasas M et al. Serum Apolipoproteins C-I and C-III are reduced in stomach cancer patients: results from MALDI-based peptidome and immuno-based clinical assays. *Plos One* 2011. 6: e14540.
- [59] Welinder CH, Ekblad Lars. Coomassie staining as loading control in Western Blot. *Journal of Proteomic Research* 2011, 10:1416-1419.
- [60] Pio R, Ajona D, Lambris JD. Complement inhibition in cancer therapy. *Seminars in Immunology*. 2013.

TABLES

TABLE 1. Characteristics of the case and control groups that was included for the 2D-gel.

TABLE 2. Proteins analyzed by ESI-TOF-MS and identified using MASCOT. The possible candidate proteins specific for CIN III are shown in red. Protein access number from Swiss-protein database (Gi).

FIGURES

FIGURE 1. Representative two dimensional gel electrophoresis map from a CINIII serum sample stained with Colloidal Coomassie Blue G-250. White arrows indicate the position of differentially expressed “spots” between control and case groups. Numbers indicate the “spot” number assigned by Image Master Software (General Electric, GE).

FIGURE 2. (A) Representative image of Western Blots detecting proteins C3 and A1BG in twenty micrograms of total protein from serum taken from women in the control group (n=30) and those with CIN III (n=25). Specific antibodies were used for each protein at a concentration of 1:2000 for A1BG and 1:1000 for C3. (B) Densitometry analysis using Image J 1.45. We use a Coomassie Brilliant Blue (CBB) staining as a loading control [59]. Data are expressed as mean \pm standard deviation. $P \leq 0.05$ was considered to indicate statistically significant differences.

FIGURE 1.

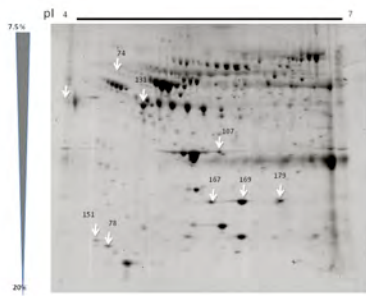


FIGURE 2.

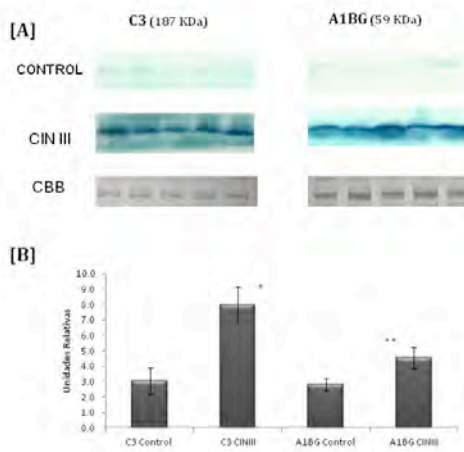


TABLE 1

SAMPLE (Number)	NUMBER	AGE (YEARS)	PAP TEST	HYBRID CAPTURE TEST	COLPOSCOPY	HISTOPATHOLOGY	GENOTYPE
CONTROL GROUP							
1	C1-IMSS	38	Normal cytology	(-)	Nd*	Nd*	Nd
2	C2-IMSS	41	Normal cytology	(-)	Nd*	Nd*	Nd
3	C3-IMSS	47	Normal cytology	(-)	Nd*	Nd*	Nd
4	C4-IMSS	47	Normal cytology	(-)	Nd*	Nd*	Nd
5	C7-IMSS	40	Normal cytology	(-)	Nd*	Nd*	Nd
CASE GROUP							
1	T1-IMSS	65	Abnormal cytology	(+)	HSIL	CIN III	16
2	T3-IMSS	60	Abnormal cytology	(+)	HSIL	CIN III	16
3	T7-IMSS	42	Abnormal cytology	(+)	HSIL	CIN III	16
4	T8-IMSS	32	Abnormal cytology	(+)	HSIL	CIN III	16
5	T10-IMSS	28	Abnormal cytology	(+)	HSIL	CIN III	16

Nd* (not done due to ethical considerations and lack of medical indication).

TABLE 2.

Spot number in gel	Access number	Description	Function	Score	Peptide matched	Coverage (%)	MW (KDa)	pI Calculado
74	gi69990	<i>Alpha-1-B-glycoprotein</i>	Unknown	96	6(2)	5(2)	51908	6.23
78	gi78101271	<i>Complement component C3</i>	Immune system	128	18(3)	13(5)	39463	6.23
107	gi178775	Proapolipoprotein	Trygliceride components and high lipoproteins	474	36(12)	13(9)	28944	6.23
131	gi52120	Apolipoprotein	Trygliceride components and high lipoproteins	474	36(12)	13(9)	28944	5.23
151	gi521205	Apolipoprotein CIII	Trygliceride components and high lipoproteins	57	5(1)	3(1)	10815	5.65
167	gi22397	Haptoglobin H2	Antioxidant, angiogenesis inductor, antiinflammatory effect	142	13(3)	8(4)	41717	5.45
169	gi223976	Haptoglobin H2	Antioxidant, angiogenesis inductor, antiinflammatory effect	204	21(4)	100	41717	5.45
179	gi296653	Haptoglobin H2	Antioxidant, angiogenesis inductor, antiinflammatory effect	142	13(3)	100	41499	5.