



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE
ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

“DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA GLICOPROTEÍNA ESPECIFICA DEL
EMBARAZO 2 “PSG2” EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER CERVICOUTERINO”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
BIOLOGO

PRESENTA:
NALLELI YETZI MENDOZA PÉREZ

México, D.F.

2013



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

"ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

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

Comunico a usted que la alumna **MENDOZA PÉREZ NALLELI YETZI**, con número de cuenta **303105141**, de la carrera de Biología se le ha fijado el día **12** del mes de **marzo** de 2013 a las **10:00 hrs.** para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE M. en C. CARLOS BAUTISTA REYES

VOCAL Dr MAURICIO SALCEDO VARGAS*

SECRETARIO M. en C. ROSALVA RANGEL CORONA

SUPLENTE M. en C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ

SUPLENTE BIÓL. REYNALDA ROLDÁN PÉREZ

El título de la tesis que presenta es: **"DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA GLICOPROTEÍNA ESPECÍFICA DEL EMBARAZO 2 "PSG2" EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER CÉRVICOUTERINO"**

Opción de titulación: tesis.

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D. F., a 11 de febrero de 2013.

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ

ZARAGOZA
DIRECCIÓN

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
DR. CARLOS CASTILLEJOS CRUZ
JEFE DE CARRERA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, UIMEO, Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS

Director de Tesis:

Dr. Mauricio Salcedo Vargas.

Presidente:

M. en C. Carlos Bautista Reyes.

Asesor Interno:

M. en C. Rosalva Rangel Corona

Suplente:

M. en C. Luis Sánchez García.

Suplente:

Biól. Reynalda Roldán Pérez.

Sustentante:

Nalleli Yetzi Mendoza Pérez

AGRADECIMIENTOS....

A mis padres, por todo su amor, por toda su entrega, por su gran confianza, por todos y cada uno de sus sacrificios, por ser mi soporte y ejemplo de vida a ustedes que no me salen las palabras para expresar mi gratitud por esta oportunidad de vida que me dieron. Gracias muchas gracias que sin ustedes no sería lo que soy y como soy, muchas gracias. Los amoooo!!

A mis hermanos por ser cómplices de travesuras, por enseñarme a defenderme y pelear por lo que se quiere, por su carácter (uno de hulk y otro de princesita) por soportarme y entenderme.

A Carlos por ser mi mejo amigo, por ser quien me escucha y me entiende, por estar siempre en los buenos y malos momentos por hacerme reir, por formar parte de mi vida de hoy en adelante y sobre todo por todo tu amor.

A ustedes:

Biólogo José Luis Guzmán Santiago

Químico Alfonso Luna

Maestra Gisela Nieto

Maestra Itzel de Río

por enseñarme lo maravilloso que es este arte, esta ciencia, por mostrarme hasta dónde puedo llegar, solo puedo decirles Gracias.

Maestra Vane y maestro Sergio, por que sin su ayuda no estaría hoy escribiendo estas líneas y juro que jamás olvidare que los primer 's no son al revés volteados, jajaja. Muchas gracias por todo su tiempo ese tiempo que no tenía y que aun así me dieron... Gracias.

A Miriam, por ser cómplice, compañera, amiga, por ser mi apoyo, por ser PSG9, por ser solo Tú.

A usted doctor Mauricio, por la gran oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por su confianza; esa confianza que siempre me motivó a ser mejor por su tiempo, por su apoyo, por su ayuda, por jamás dudar de mí y mostrarme lo que soy capaz de ser.

A mis asesores de tesis, M en C. Carlos Bautista Reyes, M en C. Rosalva Rangel Corona, M en C. Luis Sánchez Sánchez y a la Bióloga Reynalda Roldán Pérez, por su tiempo y apoyo para la realización de la misma.

Y finalmente, pero no menos importantes, a quienes formaron parte de esta gran aventura, por todos sus consejos, por todas las veces que me jalaban las orejas, por todas las aventuras, por todas las risas, por ser quienes son y por estar en mi vida... Yssel, Brendita, Ceci, Jessi, Olga, Karina, Perlita, Jade, Miri, Miri (Chihuahua), Vane, Adriana, Gaby, Mony, Lucero, Carlos, Luis, Rafa, Fonsor, Julio, Richi, Capi, Sergio, Daniel, Pablo, Cuaco, Rene.

GRACIAS!!!

INDICE

1. RESUMEN	10
2. INTRODUCCION	11
3. MARCO TEORICO	12
3.1 CÁNCER	12- 13
3.2 CARACTERÍSTICAS DEL CANCER	1 3-14
3.3 CANCER CERVICOUTERINO	14-16
3.4 EPIDEMIOLOGÍA DEL CANCER	16-18
3.5 EL CANCER CERVICOUTERINO EN MÉXICO	19
3.6 FACTORES DE RIESGO DE CANCER CERVICOUTERINO	20-21
3.7 PARALELISMO ENTRE CANCER Y EMBARAZO	21-22
3.8 CARACTERÍSTICAS DE LA GLICOPROTEÍNA ESPECIFICA DEL EMBARAZO (PSG2)	22-24
3.9 GLICOPROTEÍNA ESPECÍFICA DEL EMBARAZO2 (PSG2)	24-25
3.10 PSG2 Y CÁNCER	25-26
4. JUSTIFICACIÓN	27
5. OBJETIVOS	28
5.1 OBJETIVOS GENERALES	28
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	28
6. HIPOTESIS	28
7. MÉTODO	29- 46
7.1 DISEÑO DE INICIADORES ESPECÍFICOS PARA EL GEN PSG2.	29

7.2 CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES	30-31
7.3 OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS	31-33
7.4 TINCION CON HEMATOXILINA Y EOSINA (H&E)	33-36
7.5 EVALUACIÓN HISTOPATOLÓGICA DEL TEJIDO	36
7.6 CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO	37
7.7 EXTRACCIÓN DEL RNA TOTAL DE LÍNEAS CELULARES Y MUESTRAS BIOLÓGICAS	37
7.8 CUANTIFICACIÓN DE RNA MENSAJERO	39-40
7.9 TECNICA DE RT	40-41
7.10 TÉCNICA DE AMPLIFIAION EN CADENA DE LA POLIMERASA	41-45
7.11 ELECTROFORESIS	45-46
8. RESULTADOS	46-53
9. ANALISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	53-54
10. CONCLUSIONES	54
11. REFERENCIAS	56-59
12. ANEXOS	60-64

ABREVIATURAS.

ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero.

ARNt: Ácido Ribonucleico de transferencia.

CaCu: cáncer Cervicouterino.

CEA: Antígeno Carcinoembrionario.

CECAM: Moléculas de adhesión.

Células T: Linfocitos T, son los responsables de coordinar la respuesta inmune celular.

CO₂: Bióxido de carbono.

DNA: Ácido Desoxirribonucleico.

HLA: Antígenos Leucocitarios Humanos.

HLA-G: Antígeno Leucocitario Humano G.

IDT: Integrated DNA Technologies.

IFN γ : Interferón inmunitario gamma.

IL-10: Interleucina 10.

IL-12: Interleucina 12.

IL-6: Interleucina 6.

LIABG: Lesión Intraepitelial Escamosa de Alto Grado.

LIEBG: Lesión Intraepitelial Escamosa de Bajo Grado.

NCBI: National Center for Biotechnology Information.

NK: Natural Killer

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

Primer BLAST: Basical Local Alignment Search Tool.

PSG: Glicoproteína Específica del Embarazo.

PSG1: Glicoproteína específica del embarazo 2.

PSG2: Glicoproteína Específica del Embarazo 2.

PUBMED: National Library of Medicine National Institutes of Health.

RNA: Ácido Ribonucleico.

RT: Transcriptasa inversa.

TFG β : Factor de crecimiento transformante beta.

TH1: Linfocitos que inducen respuesta inmune celular.

TH2: Linfocitos que favorecen las respuestas humorales.

VPH: Virus del Papiloma Humano.

1. RESUMEN:

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

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

El objetivo del presente trabajo fue la determinación de la expresión de la glicoproteína específica del embarazo 2 en muestras de líneas celulares. Para llevar a cabo este trabajo se realizó el diseño de los cebadores específicos para dicha proteína, para posteriormente realizar la técnica de RT-PCR para la amplificación de la misma y se comprobó mediante electroforesis la expresión de la glicoproteína. Además se llevo a cabo la comparación de las diferentes expresiones presentadas tanto en muestras de placenta como en muestras de cérvix sano y con lesión.

Los resultados obtenidos muestran que la expresión del gen PSG2 no es exclusiva de placenta, ya que se encuentra en células del cérvix, también se sugiere, dado que no se ve modificada su expresión que pudiera ser considerado como un gen "Housekeeping" indispensable en el funcionamiento de la célula epitelial del cérvix.

2. INTRODUCCIÓN:

El cáncer Cervicouterino (CaCu) es la segunda causa de muerte por neoplasias en mujeres de México y actualmente es aceptado que la infección por virus de papiloma humano de alto poder oncogénico (VPH) es uno de los principales factores asociados al desarrollo de esta neoplasia. A nivel molecular, en el CaCu como en cualquier otra neoplasia, se presenta una complejidad de alteraciones genómicas en pérdidas y ganancias de material genético, siendo las alteraciones clásicas presentes en esta enfermedad la ganancia de las regiones cromosómicas 1, 3q y 5p y las pérdidas del 3p y 4 (Arreola, 2008). En análisis de nuestro grupo mediante el análisis de alta resolución en microarreglos de hibridación genómica comparativa más del 70% de los casos presentaron la amplificación de la región cromosómica 19q13.2 que contiene a un grupo de genes de la familia de las glicoproteínas específicas del embarazo (PSG), miembros de la súper familia de las inmunoglobulinas. De manera interesante, este grupo de genes se ha observado que se activan específicamente en el sincitiotrofoblasto asociado al proceso de embarazo, de ahí su nombre. Es conocido que para el desarrollo normal del embarazo, existen diversos procesos celulares claves para su funcionalidad como la evasión de la respuesta inmune así como el proceso angiogénico. Coincidentemente estos mismos procesos son observados en las células del cáncer. A la fecha, existen escasos reportes en cáncer donde se ha demostrado que en pacientes afectados con cáncer de mama o colo-rectal es posible detectar niveles elevados de las PSG's en el suero, por lo que puede ser considerado como biomarcador para dichas neoplasias en estos tipos de cáncer (Sima, 2005).

Pese a la gran cantidad de estudios llevados a cabo en el ámbito del CaCu, actualmente no se cuenta con biomarcadores para esta neoplasia, por lo que se hace necesaria la búsqueda de candidatos a marcadores a nivel de DNA, RNA o proteínas. En el presente trabajo en seguimiento a nuestros hallazgos de hibridación genómica comparativa, se pretende demostrar la presencia de la glicoproteína PSG-2 en líneas celulares provenientes de cáncer Cervicouterino.

3. MARCO TEORICO.

3.1 CÁNCER

El cáncer es el crecimiento tisular producido por la proliferación continua de células anormales con capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos y puede originarse a partir de cualquier tipo de célula o tejido corporal (Jensen, 1990). El melanoma, leucemia y carcinoma son distintos tipos de cáncer causados por el crecimiento anormal de un tipo particular de células. Las células crecen y se dividen para producir más células sólo cuando el cuerpo las necesita, pero cuando los mecanismos de regulación estrictamente controlados fallan, las células comienzan a dividirse de una manera inapropiada (Juliet, 2007).

Una proliferación celular no controlada de la célula que forma una masa anormal se le conoce como tumor o neoplasia. Un tumor no tiene ninguna función útil y crece a expensas del organismo sano. Los tumores pueden ser clasificados como benignos o malignos. Los tumores benignos representan menos riesgo para el paciente, ya que suelen ser de crecimiento lento y una vez extirpados no vuelven a crecer nuevamente; los tumores malignos pueden invadir el tejido normal circundante además de contener células de muy rápido crecimiento y estas células pueden desprenderse de un tumor primario para la formación de tumores secundarios, es decir, una metástasis. (Juliet, 2007).

El cáncer inicia con pequeños cambios, tales cambios no importando el tamaño, son llamados “alteraciones genéticas” o “mutaciones” las cuales ocurren en la secuencias de ADN. Los cambios genéticos son la piedra angular del cáncer (Herceg y Hainaut, 2007). Las células cancerígenas acumulan mutaciones en un grado significativamente más alto que las células normales, dicha propiedad es referida como “Fenotipo Mutador”. Esta propiedad de transformar a las células es esencial para el desarrollo del cáncer, así como para desarrollar una resistencia a los tratamientos contra el cáncer (Loeb et al, 2008).

El Fenotipo mutador es la consecuencia de mutaciones en genes que normalmente controlan la integridad y la reparación del ADN.

Los mecanismos moleculares que se ven afectados por el Fenotipo Mutador son: defectos en la reparación del ADN, transcripción de los genes, control del ciclo celular y muerte celular (Boyle y Levan, 2008).

Detectar las mutaciones en las células de cáncer podría tener grandes implicaciones en las investigaciones y las terapias. Primero, las mutaciones pueden dar información de la evolución del cáncer y proveer pronósticos clínicos interesantes.

3.2 CARACTERÍSTICAS DEL CÁNCER

Las características del cáncer incluyen seis funciones biológicas adquiridas durante el desarrollo de los tumores humanos. Las características constituyen un principio de organización para la racionalización de la complejidad de la enfermedad neoplásica. Estas incluyen el mantenimiento de la señalización proliferativa, insensibilidad a las señales anti crecimiento, resistencia a la muerte celular, lo que permite la inmortalidad replicativa, la inducción de la angiogénesis, y la metástasis. Además de estos rasgos distintivos son la inestabilidad del genoma, lo que genera la diversidad genética y la inflamación, las cuales aumentan los rasgos distintivos del cáncer (Figura1). Avances conceptuales en la última década han añadido dos características emergentes de generalidad potencial de esta lista, la reprogramación del metabolismo energético y la destrucción de la respuesta inmune. Con todas estas nuevas características se pretende el desarrollo de nuevos medios para tratar el cáncer (Hallmarks, 2011).

El cáncer inicia con pequeños cambios, tales cambios no importando el tamaño son llamados “alteraciones genéticas” o “mutaciones” las cuales ocurren en la secuencias de ADN. Los cambios genéticos son la piedra angular del cáncer (Herceg y Hainaut, 2007).

Las células cancerígenas acumulan mutaciones en un grado significativamente más alto que las células normales, una propiedad referida como “Fenotipo Mutado”.

Esta propiedad de transformar a las células es esencial para el desarrollo del cáncer, así como para desarrollar una resistencia a los tratamientos contra el cáncer (Loeb *et al*, 2008). El Fenotipo mutado es la consecuencia de mutaciones en genes que normalmente controlan la integridad y la reparación del ADN. Los mecanismos moleculares que se ven afectados por el Fenotipo Mutado son: defectos en la reparación del ADN, transcripción de los genes, control del ciclo celular y muerte celular (Boyle y Levan, 2008).

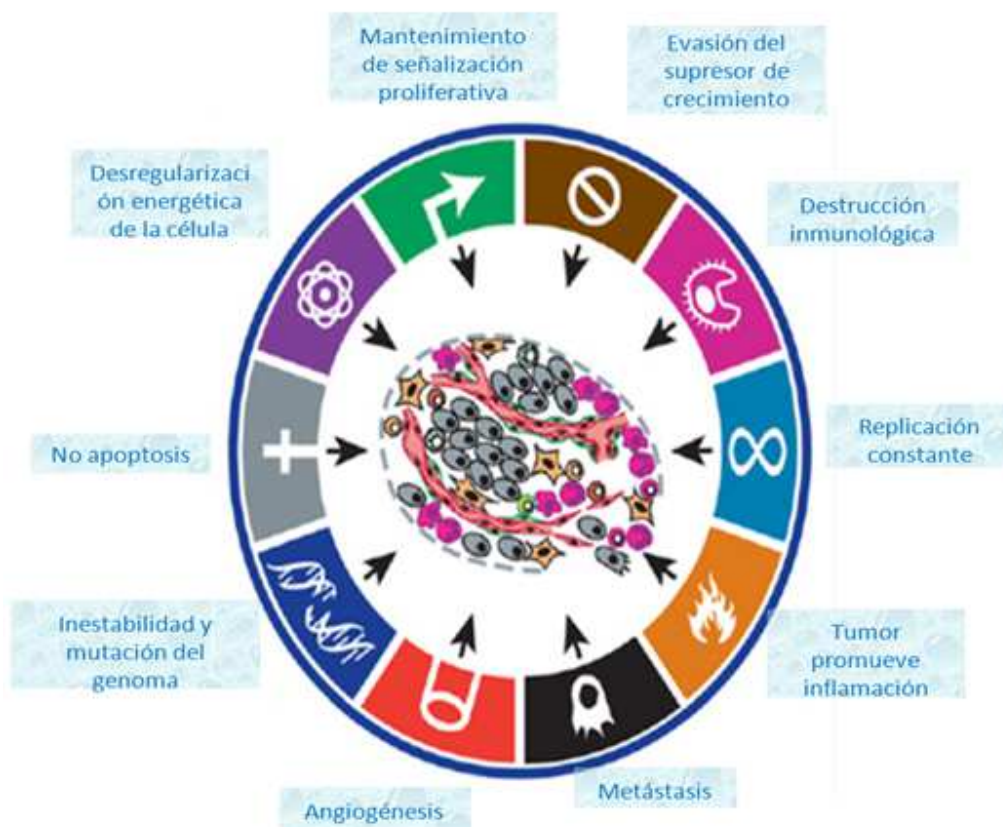


Figura1. Todas las células poseen una maquinaria que regula la proliferación, diferenciación y muerte, la figura muestra las diez características del cáncer (Hallmarks, 2011).

3.3 CÁNCER CERVICOUTERINO.

Abarcando los aspectos generales, encontramos que el cérvix normal está dividido en dos zonas epiteliales: exocérvis cubierto por epitelio escamoso y el endocérvis cubierto por epitelio glandular (Hilario, 2008). Como resultado de los cambios hormonales durante la adolescencia y la edad adulta se origina un cambio en la diferenciación del epitelio escamoso llevándolo a epitelio escamoso metaplásico y regenerativo que posteriormente es remplazado por epitelio escamoso maduro. A esta diferenciación celular del epitelio endocervical se le denomina zona de transformación (Figura 2) en donde se desarrollan lesiones cervicales que pueden llegar a progresar a cáncer de cérvix (Jenkins, 2007).

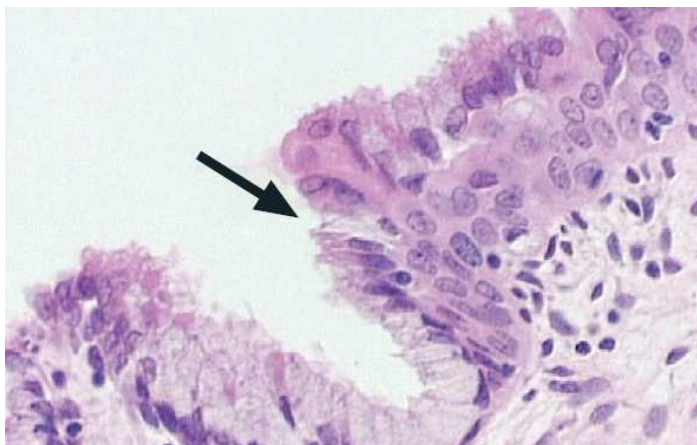


Figura 2. La Zona de Transformación del cérvix es un área metaplásica escamosa donde el epitelio escamoso estratificado del exocérvis progresa profundizando y reemplazando al epitelio glandular del endocérvis. El tejido metaplásico es especialmente susceptible al potencial carcinogénico del VPH (Schiffman, 2007).

En las Lesiones Escamosas Intraepiteliales de Bajo Grado (LIEBG) existe maduración, con mínimas anomalías nucleares y pocas figuras mitóticas (Figura 3A). Se caracterizan por coilocitosis atípica, alargamiento nuclear, hiperchromasia y aclaramiento del citoplasma. En las Lesiones escamosas de alto grado se caracteriza por cambios celulares displásicos restringidos sobre todo a la mitad o los dos tercios inferiores del epitelio, con anomalías nucleares más marcadas que en la lesión de bajo grado (Figura 2B). Igualmente la diferenciación y la estratificación pueden faltar por completo o existir solo en el cuarto

superficial del epitelio, con abundantes figuras mitóticas. Las anomalías nucleares aparecen en todo el espesor del epitelio (OMS,2012).

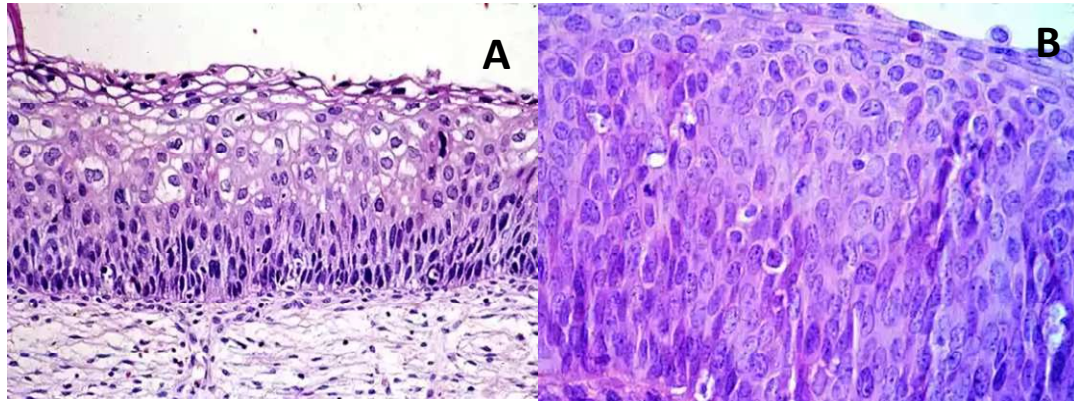


Figura 3 A: Lesión Escamosa Intraepitelial de Bajo Grado (LIEBG), con coilocitosis atípica, hiperchromasia, proliferación parabasal. **B:** Lesión Escamosa Intraepitelial de Alto Grado (LIEAG), proliferación de células inmaduras, hiperchromasia, núcleo alargado (Patología del cuello uterino).

El Cáncer Cervicouterino (CaCu) es una alteración celular que se origina en el epitelio del cuello del útero y que se manifiesta inicialmente a través de lesiones precursoras, de lenta y progresiva evolución, que se desarrollan en etapas de displasia leve, moderada y severa, que evolucionan a Cáncer in situ, en grado variable cuando esta se coloca en la superficie epitelial y luego a Cáncer invasor cuando se ha traspasado la membrana basal (Figura 3B) (Wright, 2009).

El cáncer de cérvix se identifica por una serie de lesiones premalignas bien definidas. Como ya se vio antes, estos cambios premalignos presentan un espectro de anormalidades histológicas que van de LEIBG a LEIAG y finalmente a carcinoma invasor (Ciaran, 2007). (Figura 4).

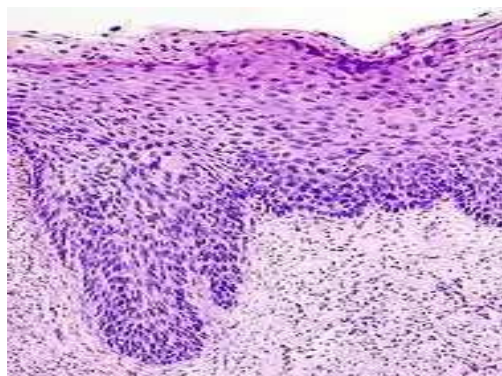


Figura 4. *Cáncer cervical invasor. (Cáncer cervical)*

3.3.1 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER CERVICOUTERINO.

A nivel mundial el cáncer cervicouterino es la tercera causa de muerte por neoplasias malignas en la mujer y la cuarta causa principal de muerte por cáncer en las mujeres en todo el mundo, representando el 9% (529,800) total de los casos nuevos de cáncer y un 8% (275,100) de las muertes totales por cáncer entre las mujeres en el 2008 (Figura 5) (Ahmedin, 2011).

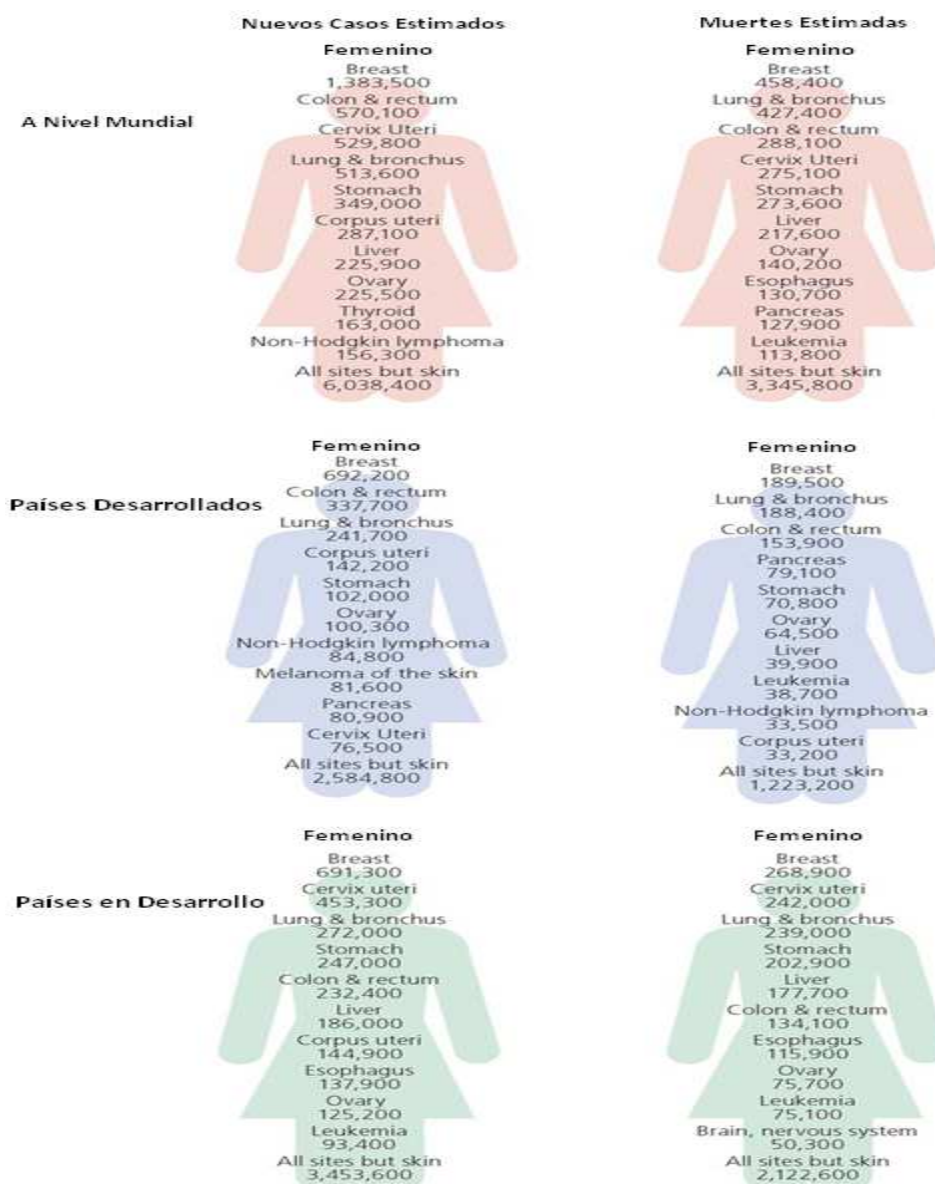


Figura 5. Estimado de nuevos casos de cáncer y muertes a nivel mundial para los tipos de cáncer más importantes por nivel de desarrollo económico, 2008. GLOBOCAN 2008.

Más del 85% de estos nuevos casos y muertes ocurrieron en países en desarrollo.

La India es el segundo país con mayor número de casos en el mundo, con un 27% (77, 100) del total de muertes por cáncer cérvicouterino. A nivel mundial el más alto nivel de incidencias es en el este, oeste y sur de África, así como el centro y sur de Asia y sur de América. Los valores más bajo son en el oeste de Asia, Australia / Nueva Zelanda, y América del Norte (Figura 6) (Ahmedin, 2011).

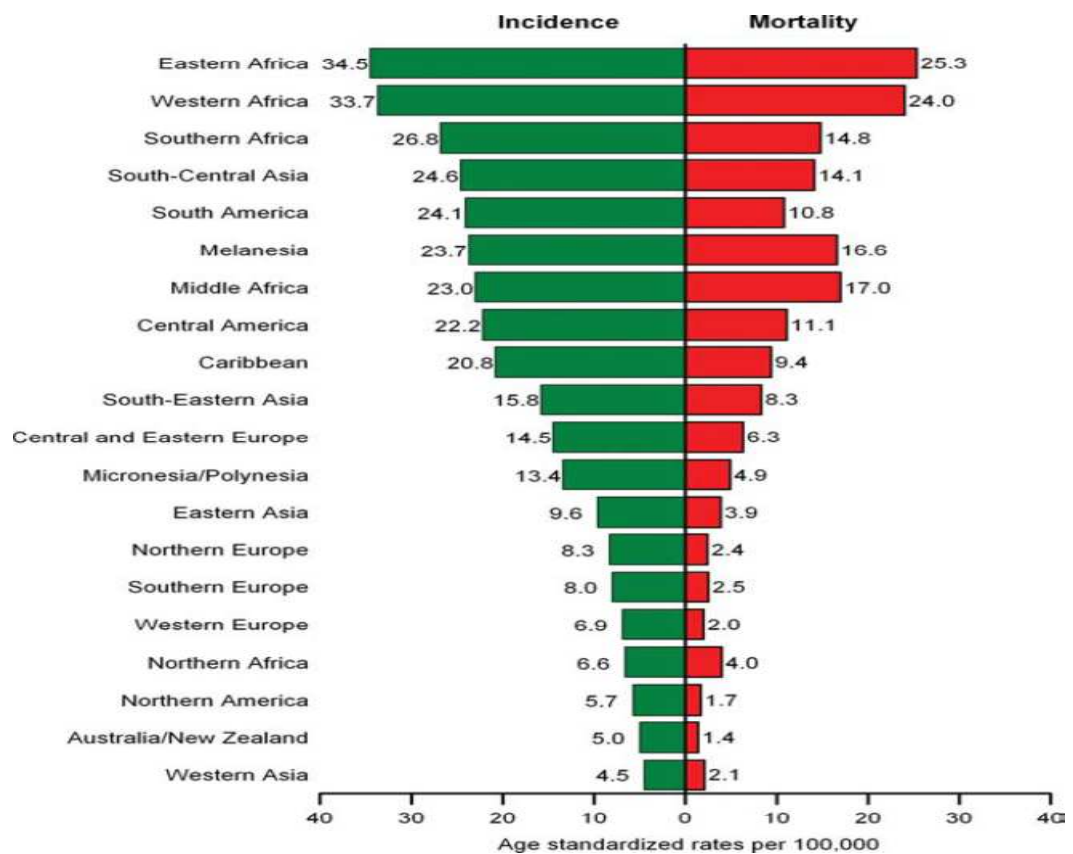


Figura 6. Edad estandarizada de incidencia y mortalidad para cáncer cervicouterino. GLOBOCAN 2008.

3.3.2 EL CÁNCER CERVICOUTERINO EN MÉXICO.

En México el Cáncer Cérvicouterino (CaCu) es la segunda causa de muerte en mujeres de 35 a 59 años, (Figura7) mueren alrededor de 5, 000 mujeres cada año. La tasa de mortalidad que se atribuye al Cáncer Cervicouterino en el país se ha mantenido estable durante las últimas 3 décadas, con alrededor de 17 muertes por cada 100, 000 mujeres. En México, se presentaron 12,512 nuevos casos (Gutiérrez, 2009).

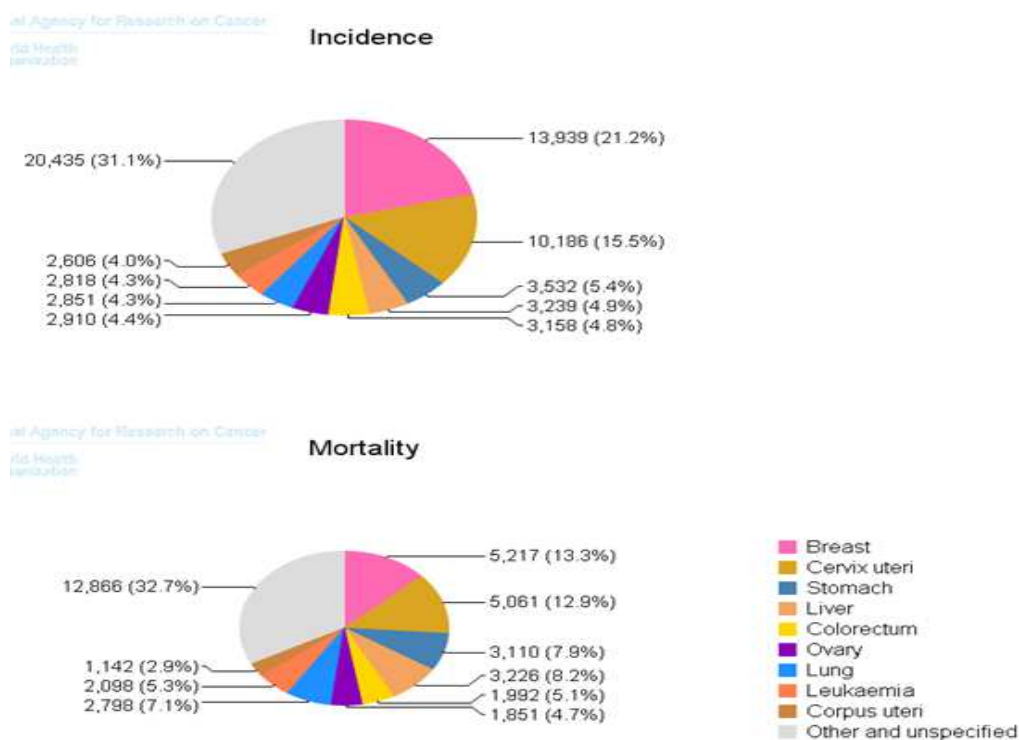


Figura7. Muestra la estadística de incidencia y mortalidad en México del CaCu (Globocan, 2008).

3.3.3 FACTORES DE RIESGO DEL CÁNCER CERVICOUTERINO.

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

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



Alto número de parejas sexuales: existe una asociación entre el número de parejas sexuales que ha tenido tanto la mujer como su compañero a lo largo de su vida y la infección por VPH.



Uso de Anticonceptivos Orales: Una región del genoma viral (la región ORF), se activa por las hormonas esteroidales (componentes de los anticonceptivos orales).



Edad: Ya que la infección es más común en mujeres sexualmente activas, de 18 a 30 años de edad, después de los 30 años decrece la prevalencia, el CaCu es más común después de los 35 años, lo que sugiere infección a temprana edad y progresión lenta a cáncer.



Alto número de embarazos y partos: Se ha demostrado que mujeres con más de 7 embarazos completos (partos) incrementa el riesgo de desarrollar CaCu (López, 2004).



Tabaquismo: Los carcinógenos procedentes del consumo del tabaco (nicotina y cotina), al ser transportados por el sistema circulatorio y llegar al epitelio cervical, puedan iniciar o actuar como carcinógenos en las células ya infectadas por VPH. Así

como la inducción indirecta de inmunosupresión y la reducción de antioxidantes provenientes de la dieta (Cruz, 2004).

-  Alcoholismo: La ingestión crónica de alcohol produce alteraciones del sistema de oxido-reducción y modificaciones bioquímicas (López, 2004).
-  Actividad sexual a temprana edad.
-  Inicio de la menarca a temprana edad.
-  Predisposición genética.

3.4 SIMILITUDES ENTRE CÁNCER Y EMBARAZO.

Es de especial interés que entre la célula transformada (cáncer) y el embarazo exista una gran similitud en muchos de los mecanismos de proliferación, invasión y tolerancia inmunológica que apoyan al ser humano durante un embarazo normal; también son usados por los tumores malignos, para establecer una fuente de nutrientes e invadir o modificar la respuesta inmune del huésped. Además de poder crear un microambiente favorable y la angiogénesis. Un posible modelo de cómo las células proliferan hasta una metástasis es un embarazo, en el que la placenta en desarrollo invade el útero hasta formar el feto (Shernan, 2009).

El feto es un trasplante semialogénico y por lo tanto, sigue las leyes de aceptación y rechazo inmunológico. La placenta actúa como una barrera inmunológica activa, que permite que 2 organismos antigénicamente diferentes se toleren el uno al otro.

La tolerancia hacia el feto se lleva a cabo por la interacción de las células NK, las moléculas HLA G, el balance de citocinas Th1 y Th2, mecanismos de apoptosis y la síntesis de factores reguladores como citocinas y hormonas (Shernan, 2009).

Las similitudes entre los mecanismos implicados del feto materno y la tolerancia inmunológica de tumores, poseen un patrón común. Además son detectables alteraciones sistémicas en la inmunidad especialmente en relación con células T y cánceres avanzados en relación al primer trimestre del embarazo (Holtan, 2009).

Diversos estudios han sido realizados para definir el papel de las PSG's durante el embarazo. Quizá uno de los trabajos que muestran el papel de inmunomodulador es el de Snyder S. y cols., donde demostraron que las PSG's pueden inducir la producción de citocinas anti-inflamatorias como IL10, IL6, TGFB sugiriendo una modulación de la respuesta inmune innata (Snyder, 2001).

Por otro lado, el papel del sistema inmune en la eliminación de la infección por el VPH no es claro aún, pero hay evidencias que muestran que la respuesta mediada por células es importante en el control de la infección viral. Así, se ha demostrado que la supresión de la respuesta inmune en los tumores es principalmente mediada por la IL10. El papel de IL10 en la desregulación de la respuesta inmune específica para tumores puede presentarse en los siguientes mecanismos: 1) suprimiendo directamente la producción de IFN- γ e IL12 evitando la activación de los linfocitos T citotóxicos y por las células NK; 2) reduciendo la expresión de moléculas del sistema HLA sobre la superficie de las células tumorales y 3) inhibición de la presentación de antígenos tumorales por las células profesionales presentadoras de antígeno (Vinuselvi, 2008).

3.4.1 CARACTERÍSTICAS DE LAS GLICOPROTEÍNAS ESPECÍFICAS DEL EMBARAZO

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

Por otra parte, esta familia de genes se encuentra formando un *clúster* y se agrupan con los antígenos carcinoembriogénicos (CEA) y las moléculas de adhesión (CECAM) debido a que presentan una estructura como los demás integrantes de las CECAM y en conjunto estos genes forman parte de la superfamilia de las Inmunoglobulinas (Brummendorf, 1994). La familia se compone de 11 genes muy similares agrupadas dentro de 700 kilobases en el cromosoma 19q 13.2 (Figura 8) y cada una de ellas puede presentar hasta cinco isoformas mediante el proceso de *splicing* alternativo.

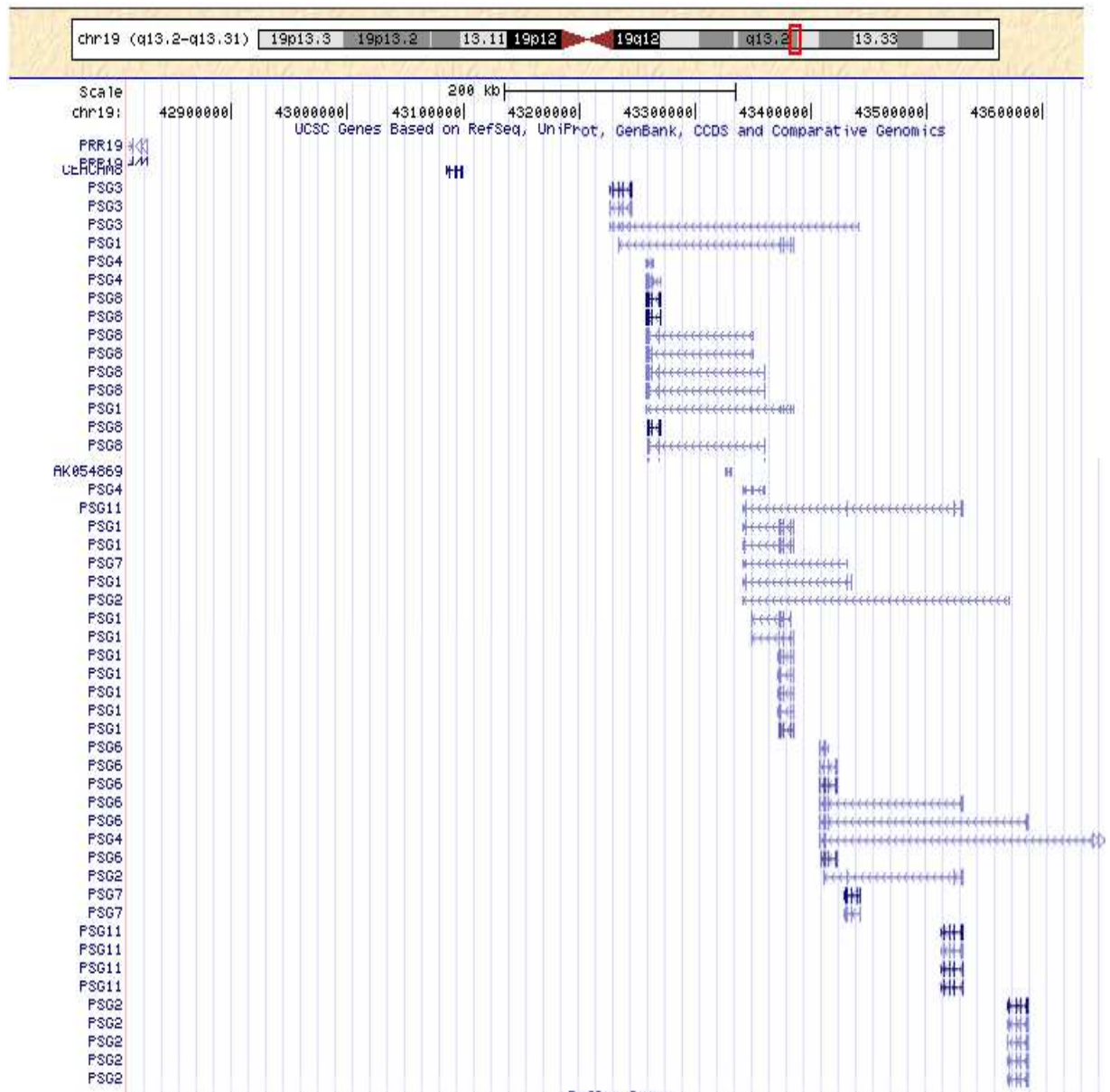


Figura 8. Análisis *in silico* de la clona 19q 13 mediante la base de datos del Genome Browser, donde se observa el grupo de genes PSG's.

A la fecha la función de estas proteínas, aún es poco conocida, aunque se ha sugerido que se encuentran participando de forma activa como inmunomoduladores, de tal forma que suprime ciertos genes del sistema inmune de la madre, permitiendo la implantación del embrión, invasión del endometrio y formación de la placenta de manera controlada

(Ha TC, 2010), además de funcionar también como inductor de factores de crecimiento pro-angiogénicos (Lie, 1992).

Pero cuando estas proteínas se presentan en niveles bajos de concentración en la madre, son asociados al retraso del crecimiento uterino, preeclampsia y abortos (Camolotto, 2010).

Es interesante observar que varias de estas funciones de las PSG's caracterizan a las células tumorales.

3.4.2 GLICOPROTEINA ESPECÍFICA DEL EMBARAZO 2.

El gen de la glicoproteína específica del embarazo 2 (PSG2) se encuentra localizado en el cromosoma 19 en la región citogenética q13.2-13.3 (Tynan, 1992). Los genes PSG's se encuentran conformando una familia de 11 genes y se ha visto que éstos se expresan preferencialmente en el sincitiotrofoblasto de la placenta (Tatarinov, 1992).

La glicoproteína específica del embarazo es una molécula que es sintetizada en la placenta preferencialmente en el sincitiotrofoblasto (Zhou, 1997). Ya sintetizada, la proteína es liberada al torrente sanguíneo (Ismail, 1992), sin embargo a la fecha su función aún es poco conocida, no obstante un miembro de esta familia, el gen PSG6 se le ha asociado con la mola hidatiforme (Leslie, 1990) y se ha sugerido que la proteína PSG2 se encuentra participando de forma activa como un inmunomodulador, de tal forma que suprime ciertos genes del sistema inmune de la madre, permitiendo la implantación del embrión, invasión del endometrio y formación de la placenta de manera controlada (Motran, 2002). Por otro lado, ha sido reportado que la deficiencia de esta glicoproteína durante el periodo de gestación, provoca diversas patologías asociadas al embarazo, dentro de ellas se encuentran: preeclampsia, aborto espontáneo y desarrollo retardado, entre otras (Lei, 1992), cabe mencionar que esta glicoproteína es una de las más abundantes en la sangre durante el embarazo y es detectada a la segunda y tercera

semana de gestación (Khan, 1992) a concentraciones de 200 a 400 µg/ml (Lin, 1974) y conforme el embarazo progresa, los niveles de la molécula aumentan (Khan, 1992).

3.4.3 PSG Y CÁNCER.

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

Por otro lado, ha sido reportado que la deficiencia de esta glicoproteína durante el periodo de gestación, provoca diversas patologías asociadas al embarazo como son la pre-eclampsia, abortos espontáneos y desarrollo retardado, entre otras (Ismail, 1992), sugiriendo un papel importante de las PSG's en patologías de índole ginecológico.

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

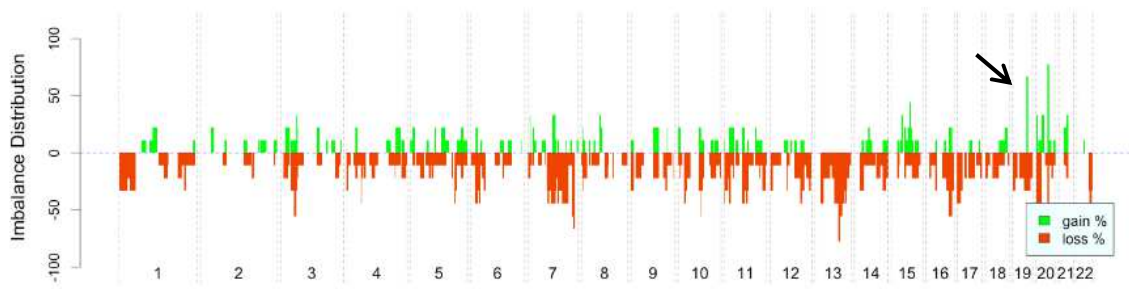


Figura 9. Mapa de desbalances cromosómicos presentes en lesiones precursoras del cérvix. La flecha señala la ganancia de la clona 19q13 donde mapean los genes PSGs (Arreola ,2008).

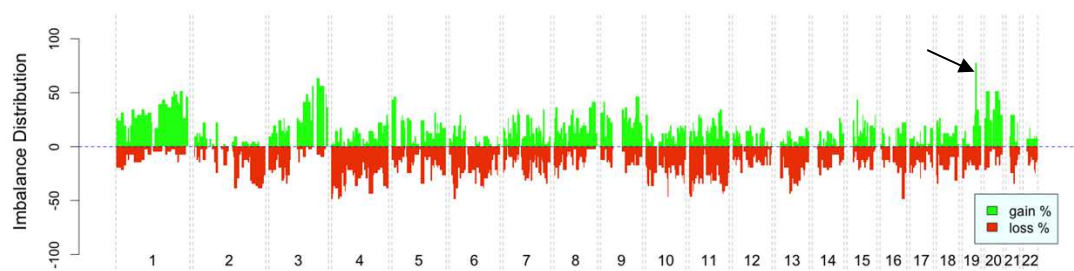


Figura 10. Mapa de desbalances cromosómicos presentes en lesiones invasoras del cérvix. La flecha señala la ganancia de la clona 19q13 donde mapean los genes PSG's (Juarez, 2007).

4. JUSTIFICACIÓN

El Carcinoma de cérvix, es una de las principales causas de muerte por neoplasias malignas entre las mujeres mexicanas registrándose alrededor de 4000 muertes al año. Recientemente se reportó una ganancia en la región citogenética 19q13.2q13.3, del cromosoma 19, por medio de hibridación genómica comparativa (CGH) en microarreglos; donde se encuentra un grupo de las PSG's, esta alteración podría provocar la expresión de las PSG's en cáncer Cervicouterino, a la fecha no se ha encontrado información con respecto a la expresión de PSG2 en ningún tipo de displasia. Este tipo de estudios permitirá abrir nuevos caminos en el entendimiento de las bases moleculares del cáncer Cervicouterino.



5. OBJETIVOS:

5.1 Objetivo General:

- Determinar la expresión del gen de la Glicoproteína específica del embarazo 2 en líneas celulares derivadas del cáncer Cervicouterino al igual que en muestras de cérvix sin lesión y con diferente grado de lesión.

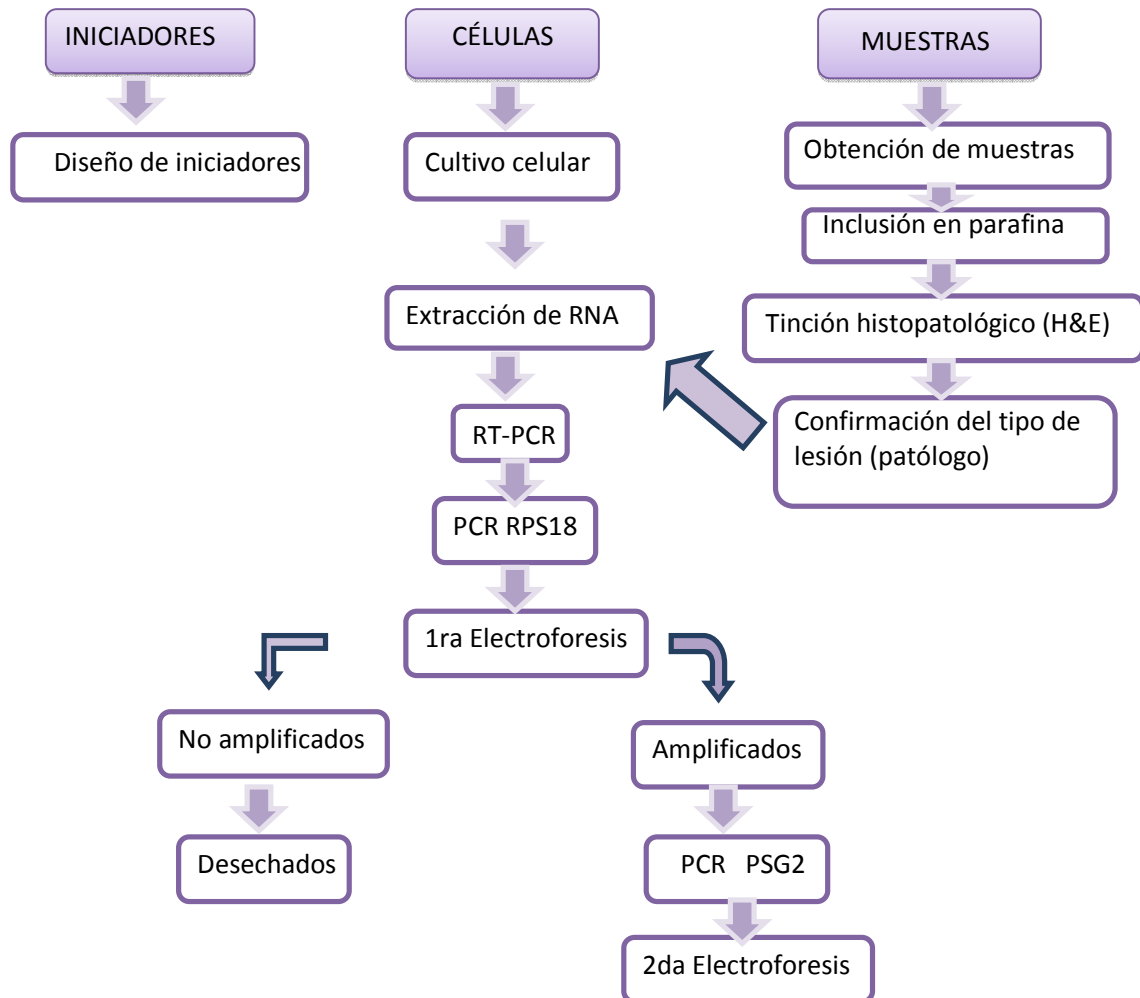
5.2 Objetivos Particulares:

- Diseñar los iniciadores específicos para determinar la expresión del gen de la glicoproteína específica del embarazo 2 en líneas celulares de cáncer Cervicouterino al igual que en muestras de cérvix sin lesión y con diferente grado de lesión.

6. HIPOTESIS:

Existen grandes similitudes entre el cáncer y el embarazo, observándose que las PSG's son proteínas que se expresan en el proceso de embarazo, por lo que es posible y dadas las similitudes entre estos procesos que las PSG's en especial la 2, también se exprese en células de cáncer Cervicouterino.

7. MATERIAL Y MÉTODO.



7.1 Diseño de los iniciadores específicos para el gen PSG2. (Bioinformática)

Para el diseño de los iniciadores específicos del gen de la glicoproteína específica del embarazo, se usaron diferentes bases de datos y herramientas bioinformáticas tales como NCBI, Primer BLAST, IDT, PrimerQuest y PubMed. Se realizó una búsqueda del gen de la glicoproteína específica del embarazo (PSG2) en el NCBI, para así obtener la secuencia del mismo.

Además, se obtuvieron los exones de interés; esto mediante un alineamiento de las secuencias de PSG2 contra las demás PSG's, es decir, la realización de un "clustal" con las PSG's presentes en la misma familia de nuestro gen de interés; para finalmente utilizar el programa de IDT para la realización del primer. Para la confirmación de la especificidad de se llevó a cabo un análisis tipo Blast.

Para la determinación de la expresión se usaron y se realizaron los pasos mencionados a continuación.

Material Biológico.

El material biológico consiste en:

Líneas celulares de carcinoma de cérvix (CALO, INBL, Hela, Caski, C33A, SiHa, ViPa, Hacat, Rova, C41, MS751 y Vibo)

Muestra de Placenta

Muestras de cérvix normal.

Muestra de cérvix con lesión de bajo grado.

Muestra de cérvix con lesión de alto grado.

Muestra de cérvix con CaCu.

7.2 Cultivo de células tumorales.

Las células CALO, INBL, Hela, Caski, C33A, SiHa, ViPa, Hacat, Rova, C41, MS751 y Vibo, se cultivaron en RPMI, suplementado con 10% de SFB (Suero Fetal Bovino).

Los cultivos se mantuvieron a una temperatura constante de 37°C, 5% de CO₂ y una atmósfera húmeda a saturación en una incubadora.

La densidad y viabilidad de las células tumorales en cultivo fueron contadas en cámara de Neubauer y evaluadas por exclusión con azul de tripano, para que puedan ser utilizadas en la extracción del RNA total de dichas células.

linea celular	Organismo	Morfologia	Provenientes	Enfermedad	Tipo VPH
CALO	Homo Sapiens	Epitelial	de Cérvix	carcinoma epidermoide	VPH 18
INBL	Homo Sapiens	Epitelial	de Cérvix	adenocarcinoma	VPH 18
HeLa	Homo Sapiens	Epitelial	de Cérvix	adenocarcinoma	VPH 18
Casky	Homo Sapiens	Epitelial	de Cérvix	carcinoma epidermoide	VPH 16
C33A	Homo Sapiens	Epitelial	de Cérvix	adenocarcinoma	Sin VPH
SiHa	Homo Sapiens	Epitelial	de Cérvix	Adenocarcinoma	VPH 16
ViPa	Homo Sapiens	Epitelial	de Cérvix	Adenocarcinoma	VPH 18
Hacat	Homo Sapiens	Epitelial	queratinocitos	Adenocarcinoma	
Rova	Homo Sapiens	Epitelial	de Cérvix	Adenocarcinoma	
Vibo	Homo Sapiens	Epitelial	de Cérvix	adenocarcinoma	Sin VPH
C41	Homo Sapiens	Epitelial	de Cérvix	carcinoma	VPH 18
MS751	Homo Sapiens	Epitelial	de Cérvix	Carcinoma epidermoide	VPH 18

La tabla muestra las diferentes características de las líneas usadas para el trabajo experimental.

7.3 OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS.

Las muestra de placenta y de cérvix normal fueron obtenidas del Hospital General de México en la clínica de displasias, bajo consentimiento de la paciente (ver anexos), dos biopsias fueron colectadas de cada una de las pacientes, de las cuales una se destinó para la conservación o extracción de ácidos nucleicos (utilizados en técnicas de biología molecular avanzada) y la otra muestra se dispuso para su inclusión en parafina, en dicha inclusión se deshidrata la muestra, una vez incluida en parafina la muestra es evaluada por un patólogo para así determinar el tipo de lesión, hacer la clasificación y corroborar el diagnóstico correspondiente de cada muestra para continuar con la extracción de RNA (Figura 11).

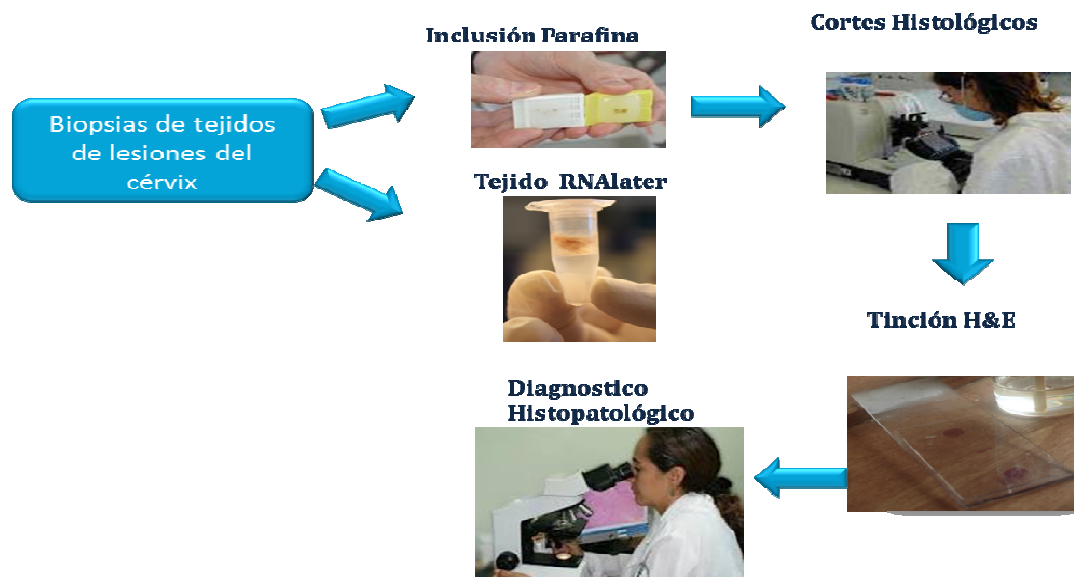


Figura 11. Esquematzación del procesamiento general de la muestra posterior a su colección.

Una vez que se obtenían las muestras como ya se ha mencionado estas se procesan por separado según el objetivo para el que estén dispuestas. La biopsia que era destinadas a inclusión en parafina antes de ser incluidas, se les dejaba de 2 a 3 días en solución fijadora para que esta penetrara en el tejido, una vez transcurrido el tiempo en la solución fijadora se prosigue a deshidratar el tejido.

La deshidratación consiste en pasar el tejido por un tren de deshidratación: etanol 70% - formol 4% (solución fijadora), etanol 96%, etanol absoluto (2 veces por tejido) etanol 50% - xilol 50%, xilol y parafina líquida (2 veces por tejido); esto se efectúa en periodos de tiempo de 45 minutos para cada solución en agitación con lo cual logramos que las soluciones penetren en el tejido y así eliminar el agua alcanzando la deshidratación deseada (Figura 12).

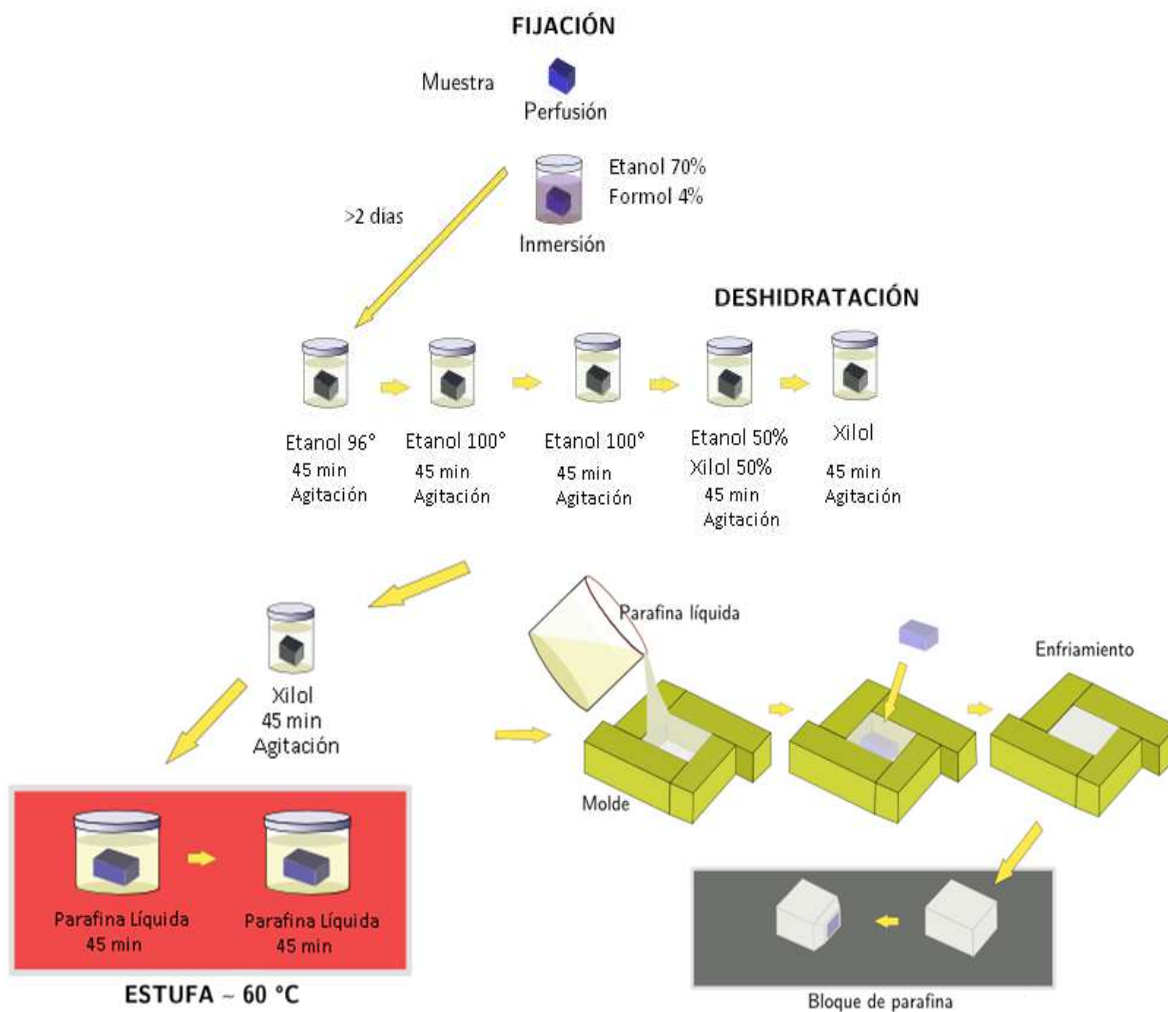


Figura 12. Esquema del proceso de deshidratación de una muestra de tejido para su inclusión en parafina.

7.4 Tinción con Hematoxilina y Eosina (H&E).

Una vez que el tejido fue incluido en parafina, se realizaron los cortes histológicos para realizar la tinción respectiva. Los cortes histológicos se hacen con un Microtomo LEICA RM2125 el cual es un microtomo de rotación de accionamiento manual; los cortes para la tinción fueron de un grosor de 4 μm .

La técnica que se manejó para este tipo de corte fue la siguiente: enfriar los bloques de parafina 30 minutos antes de ser cortados (para esto el microtomo tiene que estar completamente limpio, en especial la navaja), colocar el bloque en el microtomo, ajustarlo y orientarlo de tal modo que el corte a realizar sea parejo y no nos llevemos más

tejido de un lado que del otro; otro aspecto que hemos de tener en cuenta antes de empezar a cortar, es la orientación de la cuchilla respecto a la superficie de corte del bloque, lo normal es orientar la cuchilla con un ángulo de uno 10° respecto a la superficie de corte, aunque se puede modificar según nuestras necesidades. Ya habiendo hecho las consideraciones anteriores, proseguimos a cortar el bloque hasta obtener unas tiras de tejido, estas tiras se suelen manipular con pinceles y antes de su fijación definitiva en la superficie de un portaobjetos, han de estirarse para que nuestro tejido quede perfectamente extendido. Aprovechando la hidrofobicidad de la parafina se extendieron las secciones inicialmente en el portaobjetos con etanol, luego se colocaron sobre agua caliente a unos 35°C a 40°C y el calor las hace extenderse sin llegar a su punto de fusión, que está en torno a los 60°C ; se recogieron las tiras de tejido con el portaobjetos (este punto es de suma importancia ya que dependerá de esto que sirva o no para su revisión por el patólogo, el tejido debe estar completamente extendido, sin dobleces ni faltantes) y finalmente se dejaron secar una noche para continuar con la tinción de H&E. Una vez secos, los portaobjetos con las secciones de tejido están listos para el procesamiento posterior (Figura 13).

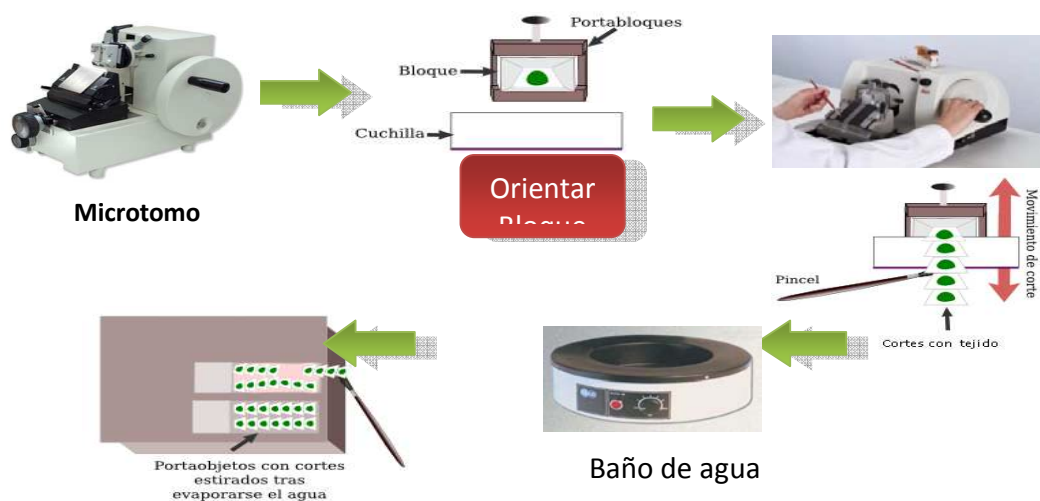


Figura 13. Proceso generalizado para obtener cortes histológico de tejidos incluidos en parafina.

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

El proceso para realizar la tinción hematoxilina-eosina consistió en una serie de pasos que fueron desde el desparafinado, hidratación, tinción, deshidratación y montado. El desparafinado permitió eliminar el medio de inclusión, la parafina del tejido; esta se realizó de forma inversa a la deshidratación (que se mencionó en la inclusión del tejido en parafina). La rehidratación es necesaria puesto que los colorantes utilizados son hidrosolubles. La deshidratación final es necesaria porque el medio de montaje no suele ser hidrosoluble. Tras el montado y secado (evaporación del xilol), las secciones se puede observar con el microscopio óptico. Figura 14.

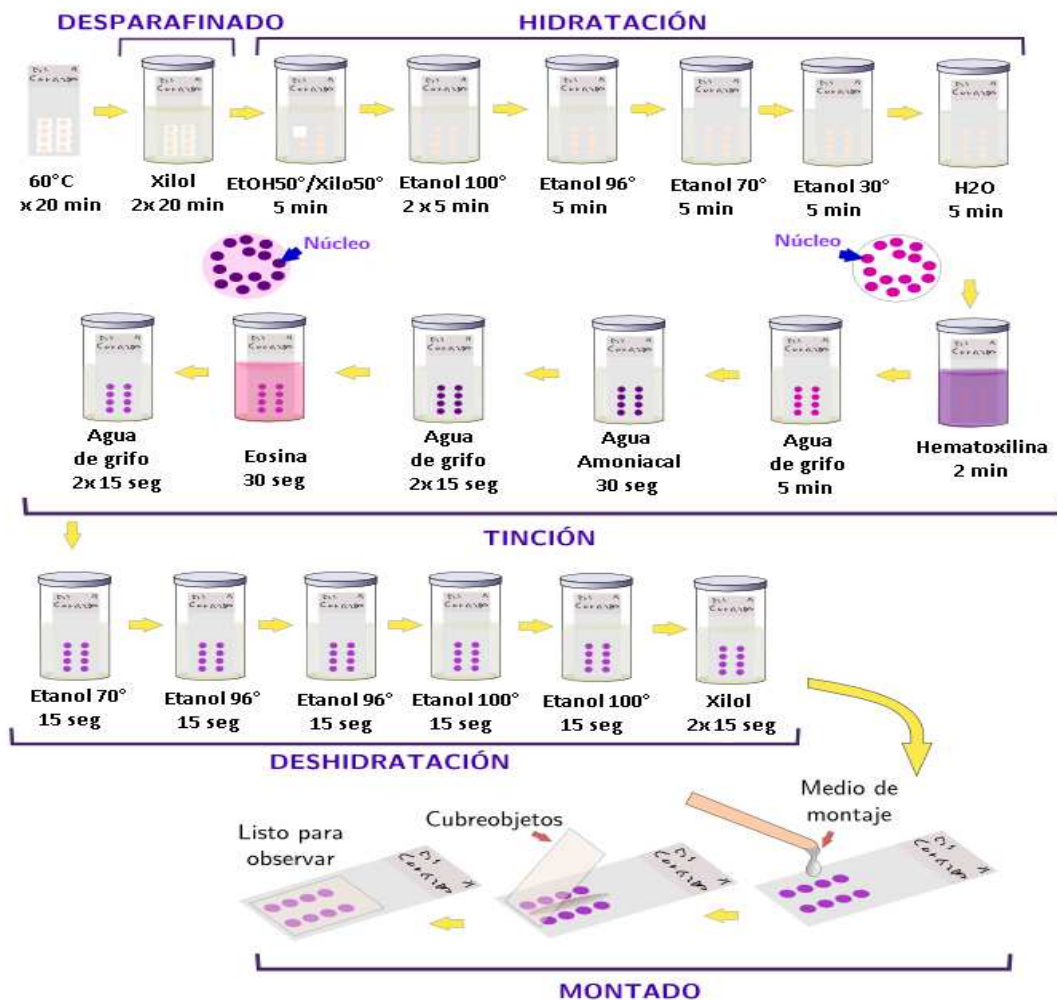


Figura 14. Pasos que durante una tinción general de hematoxilina-eosina.

7.5 Evaluación Histopatológica del Tejido.

Cada una de las laminillas obtenidas se revisó detalladamente con ayuda de un patólogo para corroborar que las muestras fueran de cérvix para así poder tener la certeza de las muestras a trabajar.

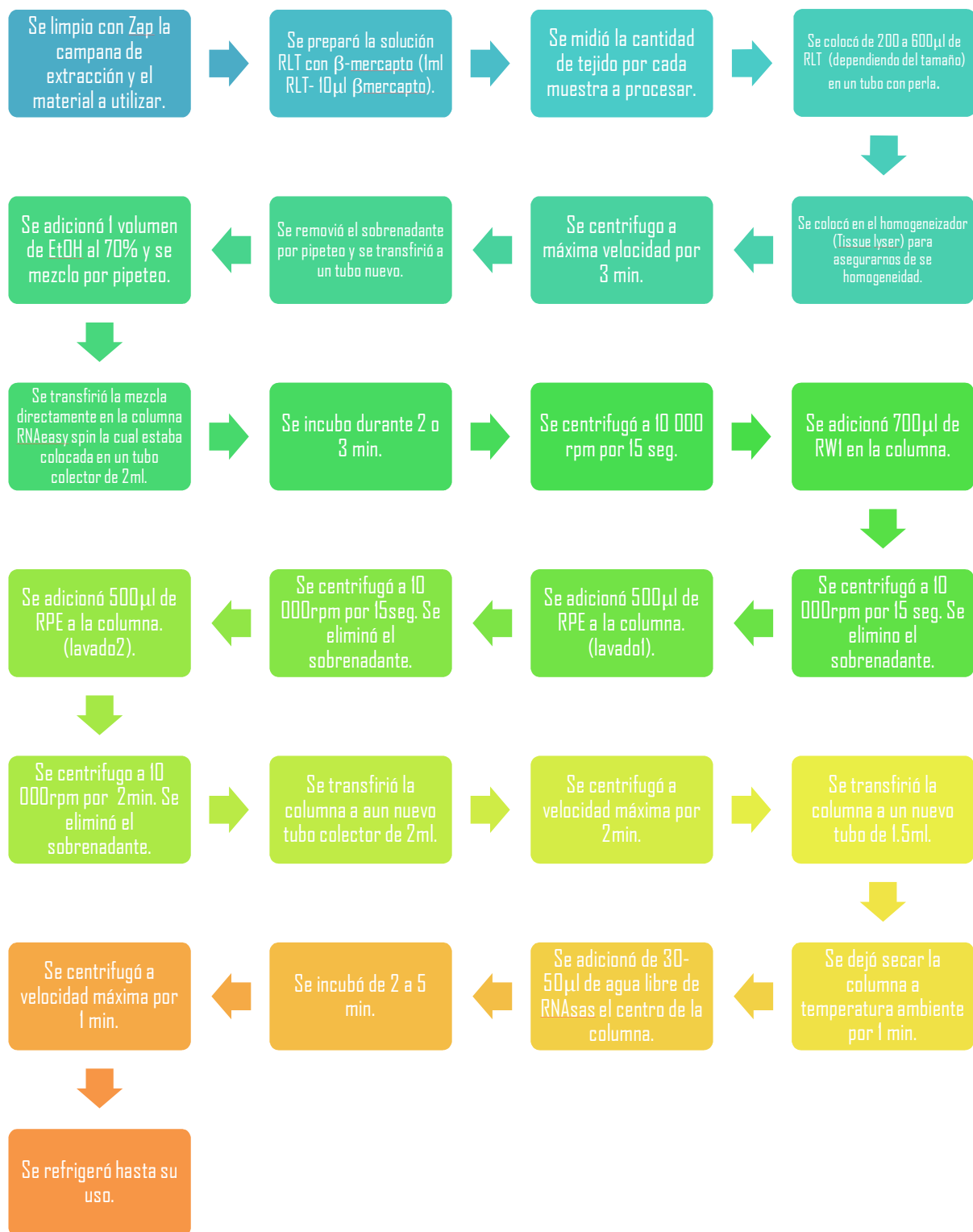
7.6 Carta de consentimiento informado.

Todo el procedimiento descrito fue anteriormente aprobado por el comité de ética de la coordinación de investigación en salud (CNCI) así como por los servicios de ginecología y clínica de displasia del Hospital General de México, y todas la muestra (biopsias) fueron tomadas bajo el consentimiento informado de las pacientes; el propósito y procedimiento del estudio fue explicado a las pacientes con el fin de evitar problemas o malos entendidos hacia la institución o con la paciente, reiterando a la paciente que en el momento que desea abandonar el estudio o revocar su consentimiento es libre de hacerlo y sin ningún tipo de problema o repercusión.

Ver Anexo I donde se muestra las Cartas de Consentimiento informado que son presentadas a la paciente antes de tomar la biopsia, según el tipo de muestra es la carta a presentar, una es para muestras de pacientes con un diagnostico identificado y la otra es para muestras pacientes sanas.

7.7 Extracción del RNA Total de líneas celulares y de las muestras biológicas.

Para la extracción del RNA total se utilizó el kit *RNeasy Mini kit* – células; con la metodología según el protocolo de dicho kit; el cual se muestra a continuación:



7.8 Cuantificación del RNA mensajero.

Las concentraciones de los RNA se determinaron mediante el uso del espectrofotómetro, Nanodrop, usando como blanco agua inyectable.

Se tomaron 1µl del stock de RNA de cada una de las líneas celulares y de las muestras para ser colocadas dichas muestras en el nanodrop para determinar las concentraciones de RNA (µl/ml) las cuales fueron utilizadas para la realización de los cálculos para llevar a cabo la RT, de la misma manera se tomaron en cuenta los parámetros de 260/280 nm y 260/230 nm, para determinar la integridad de dicho RNA.

Línea	µg/ml	260/280nm	260/230nm
CALO	536.9	2.17	1.45
INBL	619.5	2.24	1.96
Hela	829.7	2.42	1.18
Caski	755.7	2.11	0.44
C33A	509.1	2.18	0.64
SiHa	707.7	2.21	0.56
ViPa	705.4	2.27	1.3
Hacat	841.2	2.22	1.16
Rova	535.5	2.08	1.46
Vibo	913.2	2.56	0.41
C41	633.1	2.35	0.4
MS751	605.7	2.22	1.19

MUESTRA	µg/ml	260/280nm	260/230nm
Normal (N1)	87.2	2.17	1.45
Normal (N2)	75.1	2.24	1.96
Normal (N3)	211.7	2.11	.44
Normal (N4)	50.1	2.18	.64
Lesión Bajo Grado (B5)	77.7	2.21	.56
Lesión Bajo Grado (B6)	70.4	2.22	1.30
Lesión Bajo Grado (B7)	41.2	2.27	1.16

Lesión Bajo Grado (B8)	535.5	2.08	1.46
Lesión Alto Grado (A9)	33.1	2.5	.40
Lesión Alto Grado (A10)	65.7	2.22	1.19
Lesión Alto Grado (A11)	99.1	2.14	1.87
Lesión Alto Grado (A12)	72.9	2.14	.91
CaCu (C13)	102.6	2.12	.89
CaCu (C14)	53.7	2.22	1.17
CaCu (C15)	49.9	2.24	1.55
CaCu (C16)	119.3	2.13	1.10

Mediante estos datos se determinaron las cantidades de RNA necesarias para la técnica de RT-PCR.

7.9 TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT)

Esta técnica permite la amplificación de una cantidad pequeña de moléculas diana de ARN (tanto ARNm como ARN total) con gran especificidad, mediante la transcripción reversa del RNA a cDNA y posterior amplificación, durante la PCR.

Fase RT

1.- Tratamiento con DNAsa

RNA	1µl (esto depende de la concentración del RNA)
10X Buffer DNAsa	1µl
DNAsa	1µl
H2O libre de RNAsa	vol. necesario

Vol. Total de 10 µl. A 37°C por 30 min en el termociclador.

2.- Se adicionó 1microlitro de EDTA 65°C por 10 min en el termociclador.

3.- Se adicionó 1microlitro de Randon Primer 65°C por 5 min en el termociclador.

4.- Se realizó el mix

5x Buffer M-MULV	4μl	
Ribolock400	1μl	
dntp's 10mM	2μl	
M-MULV 200	2 μl	Vol. 9ml x tubo

Ciclaje:

25° C por 5 min	}	Solo un ciclo.
37° C por 60 min		
70° C por 5min		

 7.10 Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Los cDNAs obtenidos durante la RT fueron sometidos a una primera PCR usando los cebadores del gen constitutivo de la proteína ribosomal S18 (RPS18) esto como control interno de la reacción, las condiciones bajo las cuales fue realizada son:

Buffer 10x	2.5μl	
MgCl2 10mM	2μl	
DNTP's	1μl	
RPS18 f [25pm]	.5μl	
RPS18 r [25pm]	.5μl	
Taq	0.25μl	
H2O	17.25μl	
	24μl	24μl + 1μl c DNA = 25μl volumen total.

Esto fue por cada reacción y se multiplicó por el número de muestras, es decir, por 12 líneas 1 muestras de placenta y la muestra negativa de reacción de la PCR, quedando las siguientes cantidades.

	1x		14x
Buffer 10x	2.5µl		35µl
MgCl ₂ 10mM	2µl		28µl
DNTP's	1µl		14µl
RPS18 f [25pm]	.5µl		7µl
RPS18 r [25pm]	.5µl		7µl
Taq	0.25µl	3.5µl	
H ₂ O	17.25µl		241.5µl
	24µl		

24µl + 1µl c DNA = 25µl volumen total

Para el caso de las muestras se realizó la misma técnica tomando en cuenta el número de muestras que se procesaron.

Para poder llevar a cabo la Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa, de nuestros cebadores, se realizó la estandarización de los mismos al igual que la cantidad de Cloruro de Magnesio (MgCl₂) a utilizar para que estos fueran los óptimos para dicha técnica.

La cantidad necesaria al igual que la concentración de Cloruro de Magnesio fue establecida mediante una curva de magnesio bajo las siguientes condiciones:

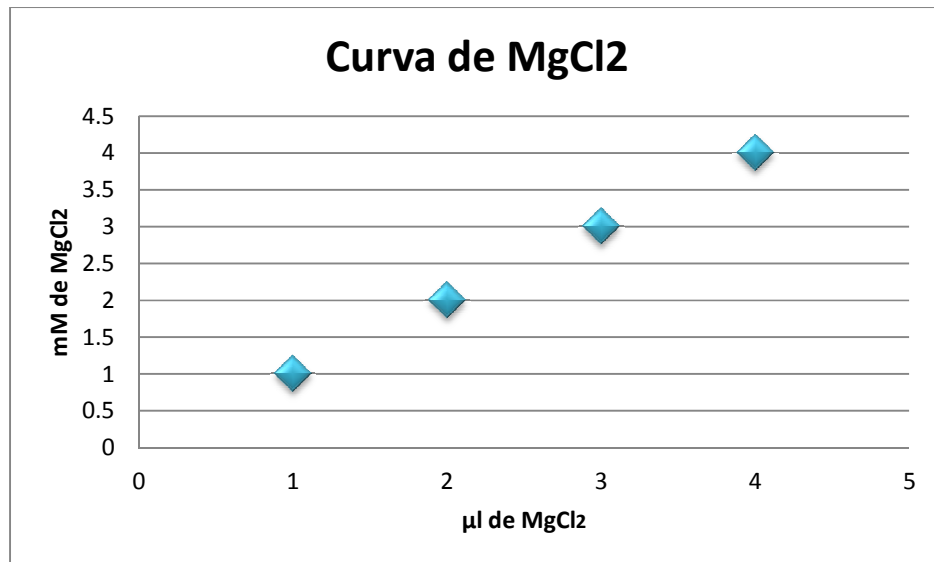
MgCl₂ [25mM] V_{total}=25ml

$$\frac{25mM \ (1mL)}{25mM} = 1mM$$

$$\frac{25mM \ (2mL)}{25mM} = 2mM$$

$$\frac{25mM \ (3mL)}{25mM} = 3mM$$

$$\frac{25mM (4mL)}{25mM} = 4mM$$



Curva de cloruro de magnesio para la estandarización de la reacción para la PCR de los cebadores PSG2.

Con respecto a los cebadores, se necesitó primero realizar los cálculos para la cantidad de agua al cebador diofilizado:

PSG2 Forward de 83.1nmol

$$83.1nm \times \frac{1000pm}{1nmol} = 83\ 100pmol$$

$$[500pmol] \ 83\ 100pmol \frac{1ml}{500pm} = 166.2\ ml\ agua$$

$$[50pmol] \ \frac{50pmol (50ml)}{500pm} = 5ml\ PSG2f$$

$$[25pmol] \ \frac{25pmol (50ml)}{50pmol} = 25ml\ PSG2f$$

PSG2 Reverse de 88.6 nmol

$$886.1\mu\text{m} \times \frac{1000\text{pm}}{1\mu\text{mol}} = 88\,600\text{pmol}$$

$$[500\text{pmol}] \quad 88\,600\text{pmol} \frac{1\text{ml}}{500\text{pm}} = 177.2\text{ ml agua}$$

$$[50\text{pmol}] \quad \frac{50\text{pmol} (50\text{ml})}{500\text{pm}} = 5\text{ml PSG2r}$$

$$[25\text{pmol}] \quad \frac{25\text{pmol} (50\text{ml})}{50\text{pmol}} = 25\text{ml PSG2r}$$

Una vez obtenidos estos parámetros se llevó a cabo una PCR ya que esta técnica nos permitió la comprobación de la especificidad de nuestros cebadores, esta vez ya con los parámetros y condiciones establecidas.

	1x	14x
Buffer 10x	2.5 µl	35µl
MgCl2	1µl	14µl
dNTP's	.5µl	7µl
PSG2 f[25pm]	.5µl	7µl
PSG2r [25pm]	.5µl	7µl
Taq	.25µl	3.5µl
H ₂ O DEPC	18.75µl	262.5 µl
	25µl	

24µl de mix + 1µl de muestra=25µl volumen total.

Estas reacciones se colocaron en el termociclador que se programó para que efectuaran los siguientes pasos:

94°C 5 minutos

94°C 60 segundos

55°C 60 segundos

72°C 1.15 minutos

72°C 10 minutos

Este ciclo se realizó 35 veces.

7.11 ELECTROFORESIS.

Se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa para observar la expresión (PSG2) de cada uno de los amplificados por el PCR para cada tipo de muestra.

En la electroforesis hay un movimiento de partículas cargadas en un campo eléctrico, los ácidos nucleicos están cargados de forma negativa debido a su composición de grupos fosfato, por lo tanto migraran hacia el polo positivo, es decir el ánodo. De tal manera la electroforesis de ácidos nucleídos es el método habitual para separar, identificar y purificar moléculas o fragmentos de ADN y ARN.

El gel de agarosa fue realizado al 2% es decir que se colocó 1.6 de agarosa en 80 ml de TBE y bromuro de etidio una vez que el gel solidificó se colocaron las muestras y se procedió a su corrimiento del gel en una cámara de electroforesis, cubierto de TBE al 0.5 % a 90 volts durante 60 min.

Para la visualización de los ácidos nucleídos se utilizó un colorante fluorescente, el bromuro de etidio. Este colorante tiene la propiedad de intercalarse entre las bases nitrogenadas del ADN y aumentar en esas condiciones su fluorescencia, de modo que emite luz visible (color naranja) cuando es excitado por radiación ultravioleta (300nm) de un transluminador. De este modo permitió la visualización del ADN y la identificación del transcrito de la glicoproteína específica del embarazo (PSG2) por sus pares de bases en relación al recorrido de cada banda con el marcador de peso molecular.

8. RESULTADOS

8.1 Diseño de los iniciadores específicos para el gen PSG2.

En la parte de bioinformática se contó con el apoyo de diferentes programas de diseño de iniciadores, al igual que con bases de datos los cuales nos permitieron realizar el siguiente trabajo.

- a) Para el diseño de los iniciadores específicos de la glicoproteína específica del embarazo 2, se llevó a cabo una búsqueda de las 11 secuencias de las glicoproteínas pertenecientes a esta familia.
- b) Se tomó en cuenta el splicing que presentan dichas proteínas, para posteriormente hacer el alineamiento (Figura 15) de las diferentes PSG's contra PSG2, esto fue realizado en la página de NCBI/BLAST/blastin suite-2sequences.
- c) Una vez realizado lo anterior fue como se encontraron nuestros exones de interés los cuales se pueden observar en la figura 16, en la que se observa la región específica de nuestra glicoproteína de interés, marcando de donde a donde se debió tomar la región específica para esta glicoproteína para su mayor especificidad.
- d) Finalmente se utilizó el programa de IDT para la realización del primer. Para la confirmación de la especificidad se llevó a cabo un análisis tipo Blast (Figura17).

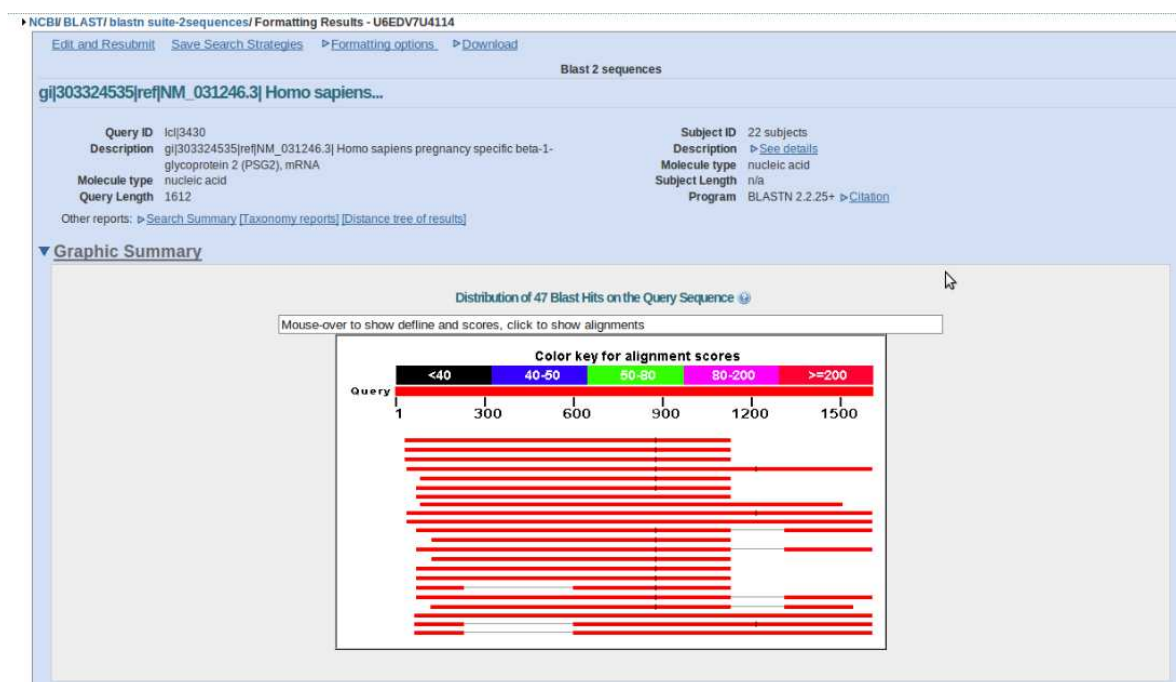


FIGURA 15. Alineamiento de las secuencias de las diferentes PSG's en el National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool. NCBI BLAST/blastn suite2sequences.

→

```

1  gacagagagg tgtcctgggc ctgacccac ccatgagcct gggaattgct gctgccccag
   61 gaagaggctc agtcagaag gaggaaggac agcacagctg acagccgtgc
tcaggaagtt ←
   121 tctggatcct aggtcatct ccacagagga gaacacacag gcagcagaga
ccatggggcc
   181 cctctcagcc cctccctgca cagagcacat caaatggaag gggctcctgg
tcacagcatc
   241 acttttaaac ttctggaacc tgcccaccac tgcccaagtc acgattgaag
cccagccacc
   301 aaaagtttcc gaggggaagg atgttcttct acttgtccac aatttgcccc
agaatcttac
   361 tggctacatc tggtacaaag ggcaaatacag ggacctctac cattacatta
catcatatgt
   421 agtagacggt caaataatta tatatgggcc tgcatatagt ggacgagaaa
cagcatattc
   481 caatgcatcc ctgctgatcc agaatgtcac ccgggaggac gcaggatcct
acaccttaca
   541 catcataaag cgagggtgatg ggactagagg agtaactgga tatttcacct
tcaccttata
   601 cctggagact cccaagccct ccatctccag cagcaactta aaccccaggg
aggccatgga

```

```

661 aactgtgatc ttaacctgtg atcctgagac tccggacaca agctaccagt
ggtggatgaa
721 tggtcagagc ctccctatga ctcatagggt tcagctgtcc gaaaccaaca
ggaccctctt
781 tctatttggg gtcacaaagt atactgcagg accctatgaa tgtgaaatac
ggaactcagg
841 gagtgccagc cgcagtgacc cagtcaccct gaatctcctc catgggtccag
acctccccag
901 aattcaccct tcatacacca attaccgttc aggagataac ctctacttgt
cttgcttcgc
961 gaactctaac ccaccggcac agtattcttg gacaattaat gggaagtttc
agcaatcagg
1021 acaaaatctg tttatcccc aaattactac aaagcatagc gggctctatg
tttgctctgt
1081 tcgtaactca gccactggcg aggaaagctc cacatcgttg acagtcaaag
tctctgcttc
1141 tacaagaata ggacttcttc ctctccttaa tccaacatag cagctgtgat
gtcatttctg
1201 tatttcagga agactggcag gagatttatg gaaaggcttc ttacaaggac
tcttgaatac
1261 aagctcctga taacttcaag atcataccac tggactaaga actttcaaaa
ttttaatgaa
1321 caggctgata ccttcatgaa attcaagaca aagaagaaaa atactcaatg
ttattggact
1381 aaataatcaa aaggataatg atttcataat tttctatttg aaaatgtgct
gattcttggg
1441 atgtttcatt ctccagattt atgaacattt tttcttgagc aattggtaaa
gtatactttt
1501 gtaaacaaaa attgaaacat ttccttttgc tctctatctg agtgccccag
aattgggaat
1561 ctattcatga gtattcatat gtttatggta ataaagctat ttgcacaagt tc
FEATURES
    source          1..1612
                     /organism="Homo sapiens"
                     /mol_type="mRNA"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /chromosome="19"
                     /map="19q13.1-q13.2"
    gene            1..1612
                     /gene="PSG2"
                     /gene_synonym="CEA; PSBG2; PSG1; PSGGB"
                     /note="pregnancy specific beta-1-glycoprotein 2"
                     /db_xref="GeneID:5670"
                     /db_xref="HGNC:9519"
                     /db_xref="HPRD:08891"
                     /db_xref="MIM:176391"
    exon            1..236
                     /gene="PSG2"
                     /gene_synonym="CEA; PSBG2; PSG1; PSGGB"
                     /inference="alignment:Splign:1.39.8"
                     /number=1

```

Figura 16. Exones de interés para obtener el primer específico de PSG2, obtenidos de la base de datos de National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Primer-BLAST

Primer designing tool

BI/Primer-BLAST : results: Job id=JSID_01_276852_130.14.24.201_9000
[more...](#)

Input PCR template
Specificity of primers
Other reports

none
Target templates were found in selected database: NCBI Transcript Reference Sequences (Organism limited to Homo sapiens)
[Search Summary](#)

▼ Detailed primer reports

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%
Forward primer	GACAGAGAGGTGTCCTGGG	19	52.91	63.16%
Reverse primer	CTGTGGAGATGAGCCTAGG	19	50.54	57.89%

Products on target templates
>[NM_031246.3](#) Homo sapiens pregnancy specific beta-1-glycoprotein 2 (PSG2), mRNA
product length = 146
Forward primer 1 GACAGAGAGGTGTCCTGGG 19
Template 1 19
Reverse primer 1 CTGTGGAGATGAGCCTAGG 19
Template 146 128

FIGURA 17. Esta figura muestra la especificidad obtenida para los iniciadores, llevada a cabo en el programa de Primer Designing tool en el NCBI.

Los iniciadores obtenidos después de los pasos mencionados son los siguientes:

Iniciadores	Secuencia	Tamaño de amplicon
PSG2 F	GACAGAGAGGTGTCCTGGG	146
PSG2 R	CTGTGGAGATGAGCCTAGG	146

Denotando que se obtuvo una especificidad del 100% para PSG2, tomando en cuenta que entre las 11 glicoproteínas poseen una similitud de un 95%, de aquí el grado de complejidad e importancia para la realización de estos cebadores.

Una vez identificados los oligonucleótidos, estos fueron utilizados para amplificar las regiones de interés del transcrito del gen PSG2. Previamente las muestras en estudio fueron sujetas a la amplificación para el transcrito del gen RPS18. Como se muestra en la

figura 18, algunos tejidos en estudio expresan a RPS18. Datos similares fueron observados para todas las muestras en estudio

 Gel para RPS18 (control interno de reacción)

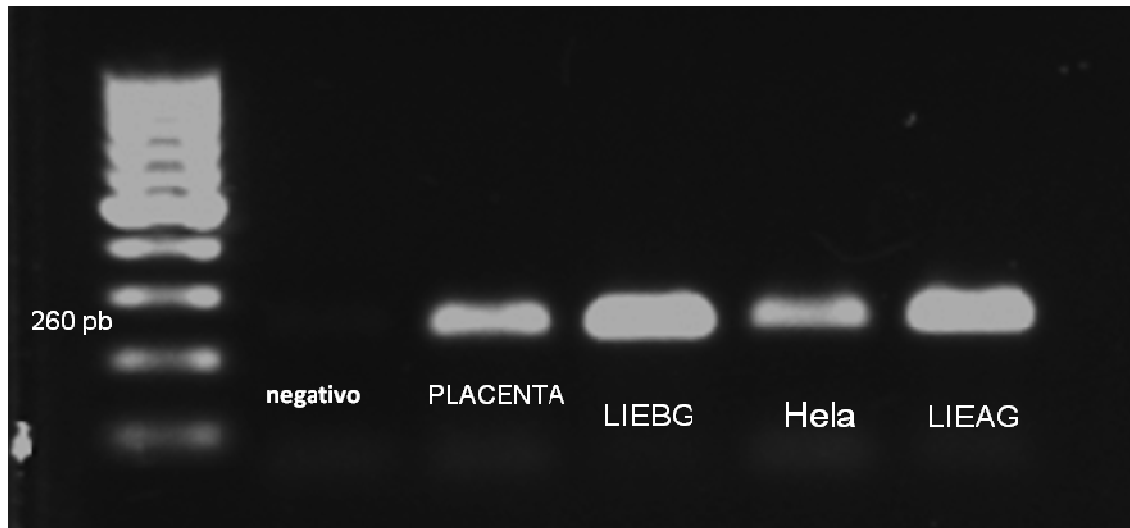


Figura 18

Gel demostrativo que muestra que el RNA de las células de CaCu, muestras con diferente grado de lesión y Hela es amplificable (control interno de la reacción).

Una vez que las muestras fueron sujetas a control interno, se procedieron a la detección del RNA de PSG2. Para ello, RNA de las células de placenta fueron sujetas a la RT-PCR a distintas concentraciones del ion magnesio. Los datos muestran que la concentración óptima de magnesio es de 1 μ M

CURVA DE MAGNESIO PSG2

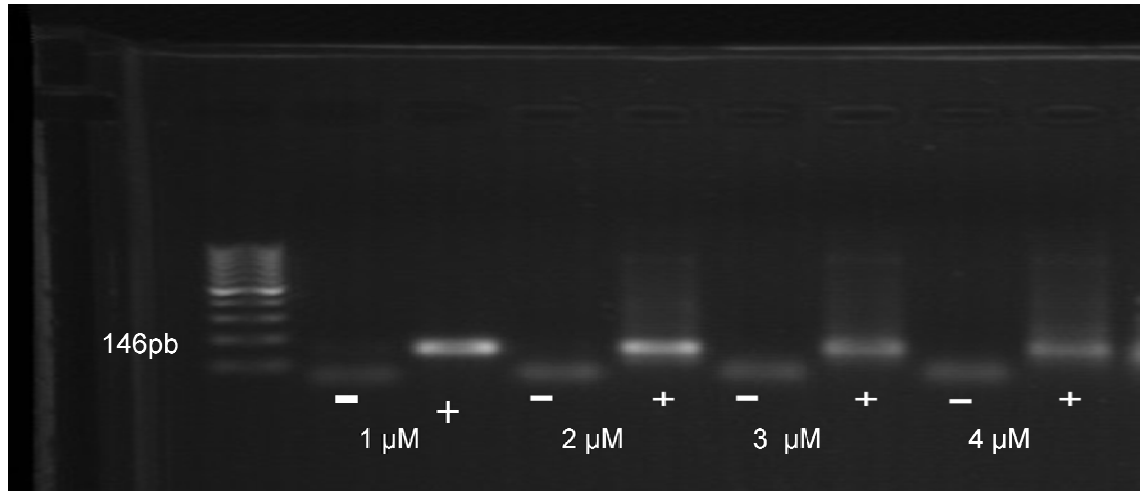


Figura 19. Gel obtenido de RNA de placenta que fue sometida a diferentes concentraciones de Cloruro de Magnesio, para así obtener las condiciones adecuadas para la amplificación del gen PSG2, donde las muestras negativas (-) son controles de reacción pues se les colocó agua en lugar de cDNA a amplificar y las muestras positivas (+) son la amplificación del cDNA de placenta.

Una vez que nuestro control (placenta) mostró que las condiciones estaban óptimas para detectar al transcrito de PSG2, la reacción se llevo a cabo en diferentes líneas celulares derivadas de cáncer cervical así como de cérvix sin lesión. Como se observa en la figura 20, PSG 2 se encuentra expresada prácticamente en todos los tejidos sanos. De manera interesante la expresión es muy semejante tanto en las líneas celulares como en las muestras de cérvix sano. Con respecto a nuestro control que es la placenta, se puede ver claramente que es mayor la expresión en las líneas que en la placenta.

PSG2 LINEAS V/S NORMALES

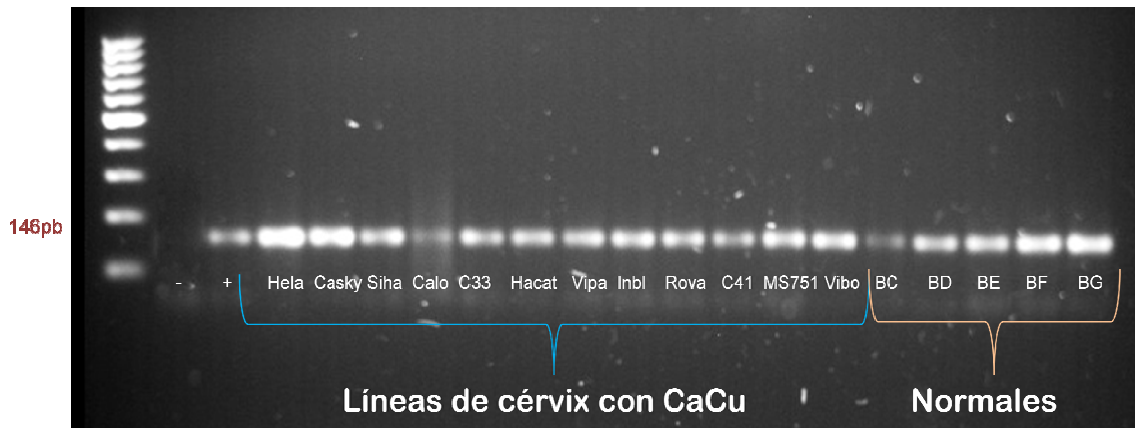


Figura 20. Expresión del gen PSG2 en líneas celulares de cáncer Cervicouterino y en cérvix sin lesión. Teniendo como negativo (-) la reacción donde no se lo colocó cDNA para amplificar, como positivo (+) el cDNA de placenta, para las líneas celulares y para las muestras de cérvix sin lesión se les colocó el cDNA correspondiente; cabe mencionar que la nomenclatura usada para las muestras de cérvix sin lesión es de BC, BD, BE, BF Y BG las cuales corresponden a la nomenclatura usada en la base de datos del banco de tejidos cervicales del hospital de oncología.

PSG2 V/S MUESTRAS DE CERVIX CON DIFERENTES GRADOS DE LESION.

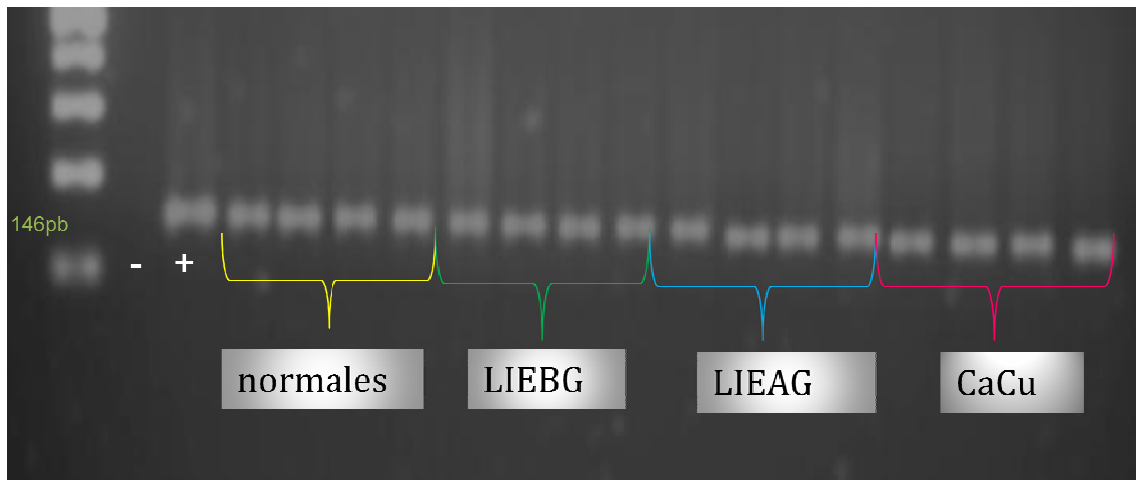


Figura 21 Expresión de PSG2 en tejido cervical,

Una vez que se observó que las líneas celulares y el cérvix sin lesión expresaba a PSG2, se procedió a determinar la expresión de PSG2 en distintas lesiones del cérvix. Como se observa en la figura 21, el gen PSG2 se expresa en todas las muestras con y sin lesión derivadas del cérvix. Además, no existe variabilidad en la expresión entre tejido sin lesión como con distintas lesiones del cérvix uterino

9. ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS.

El cáncer Cervicouterino (CaCu) es la segunda causa de muerte por neoplasias en mujeres mexicanas y actualmente es aceptado que la infección por virus de papiloma humano de alto poder oncogénico (VPH) y es uno de los principales factores asociados al desarrollo de esta neoplasia. A nivel molecular, en el CaCu como en cualquier otra neoplasia, se presenta una complejidad de alteraciones genómicas en pérdidas y ganancias de material genético, siendo las alteraciones clásicas presentes en esta enfermedad la ganancia de las regiones cromosómicas 1, 3q y 5p y las pérdidas del 3p y 4.

El cáncer Cervicouterino a nivel mundial y en nuestro país hasta la fecha se ha estudiado mucho, con resultados satisfactorios.

El cáncer Cervicouterino y las glicoproteínas específicas del embarazo, han sido poco estudiadas, y los resultados que se obtienen de las PSG's 1 y 9 son de gran interés (estudios en progreso de nuestro grupo), sin embargo, de la glicoproteína específica del embarazo 2, no se ha reportado ni estudiado en células de cérvix.

Primeramente se logró obtener el diseño de un par de oligonucleótidos para detectar el transcrito del gen PSG2. Pese a la alta similitud entre las secuencias de ADN entre los distintas PSGs, fue posible obtener un par de oligonucleótidos que pudieran amplificar exclusivamente al transcrito del gen PSG2.

Los resultados obtenidos en general muestran que la expresión de PSG2 no es exclusiva de placenta, por lo que en células de cérvix también se expresan, estos datos sugieren que la expresión ectópica de PSG2 tiene un papel importante en las células del cérvix y se puede sugerir que este gen, no es exclusivo de placenta y menos aún de embarazo.

De esta manera, sería interesante conocer cuál es el papel de PSG2 en el cáncer Cervicouterino. Sin embargo, los datos sugieren que potencialmente PSG2 no se ve afectado en su expresión aun en líneas celulares derivadas de cáncer de cérvix. Dado que se expresan de igual manera en muestras con diferente VPH e incluso sin él, sugiere que la expresión de PSG2 es independiente del tipo viral presente. También se puede sugerir dado que no se ve modificada su expresión que pudiera ser considerado como un gen tipo "Housekeeping" indispensable en el funcionamiento de la célula sana o afectada por el cáncer Cervicouterino.

Dentro de este trabajo se tiene expectativas tales como llevar a cabo una secuenciación y determinar la función que desempeña dicha proteína, saber si se traduce de forma completa para así tener un mayor conocimiento y encontrar la importancia o no de la misma.

10. CONCLUSIONES

La Glicoproteína Específica del Embarazo 2 es un gen que se expresa en células del cérvix y no es exclusivo de placenta por lo tanto, se demuestra que PSG2 se expresa de manera ectópica en las células epiteliales del cérvix. Además, la expresión de PSG2 en tejido cervical con o sin lesión, con VPH o sin él, no se ve modificada, por lo que se sugiere que la expresión de PSG2 debe estar presente en las células del cérvix uterino humano. De esta manera poder considerarlo como un gen "housekeeping cervical".

11. REFERENCIAS

Ahmedin J., et al, 2011, Global Cancer Statistics, *CA: A Cancer Journal*_for Clinicians, 187: 000-280.

Arreola H. Determinación de desbalances cromosómicos usando microarreglos de hibridación genómica comparativa en lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado del cérvix uterino. Fac. Medicina, UNAM tutor 2008.

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

Bosch FX, de SanJose S, 2008, Chapter 1; Human papillomavirus and cervical cancer – burden and assessment of causality. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr*, 3–13

Boyle P and Levan B (2008)“World cáncer report 2008” International Agency for Research on Cancer, Scientific Publications.

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

Camolotto S, Racca A, Rena V, Nores L, et al; 2010 Expression and Transcriptional Regulation of individual Pregnancy specific Glycoprotein Genes in Differentiation Trophoblast Cell; Elsevier; Placenta 31, 313 319.

Cáncer cervical. http://e-ciencia.com/recursos/enciclopedia/Cáncer_cervical

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

Ciaran BJ, et al, 2007, The Natural History of cervical HPV infection: unresolved issues. *Natures Reviews Cancer*, 7: 11-22.

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

Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM: GLOBOCAN 2008; cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, IARC cancer base no. 5. Version 2.0, IARCPress, Lyon. (<http://www-dep.iarc.fr/>)

Globocan, 2008, International Agency for Research on Cancer; Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on day/month/year. Lyon, France.

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

Hakan H, Kasap b, 2011, Cofactors in human papillomavirus infection and carcinogenesis, Aug 10.

Harald H., 2002, Papillomaviruses and Cancer: From basic studies to clinical application, *Nature*, 2: 342-350.

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

Hernández T.,1996, Alteraciones metabólicas en el alcoholismo, *Revista Cubana Alimentación y Nutrición*, 10: 1.

Hilario E., 2008, Morfología del Cérvix Uterino, Departamento de Biología Celular e Histología. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea. España.

Holtan SG, Creedon DJ, Haluska P, Markovic SN. 2009, Cancer and pregnancy: parallels in growth, invasion, and immune modulation and implications for cancer therapeutic agents. *Mayo Clin Proc.* Nov; 84(11):985-1000.

IARC, 2010, Working Group on the evaluation of the carcinogenic risks to humans. Human Papillomavirus. Vol 64 of IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to humans. Lyon: International Agency for Research on Cancer, World Health Organization.

Ismail A. A., Fahmy E. I. 1992. Pregnancy-specific beta 1-glycoprotein (SP) and its relation to fetal birth weigh at term pregnancy. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 16:45(1):13-17.

Jenkins D., 2007; Histopathology and Cytopathology of Cervical Cancer, *Diseases Markers*; 23: 199-212.

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

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

Juárez S. Detección del PSG 1 en cáncer cervical. Fac. Ciencias, UNAM, tutor 2007.

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

Khan W. N., Frangmyr L., Teglund S., Israelsson A., Bremer K., Hammarstrom S. 1992 Identification of three new genes and estimation of the size of the carcinoembryonic antigen family. *Genomics*. 14(2):384-390

Lei K. J., Sartwell A. D., Pan C. J., Chou J. Y. 1992. Cloning and expression of genes encoding human pregnancy-specific glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 15;267(23):16371-16378.

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

Lin T. M., Galbert S. P., Kiefer D., Spellacy W. N., Gall S. 1974. Characterization of tour human pregnancy-associated plasma protein. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 118(2):223-236.

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

Lorincz AT, Reid R, Jenson AB y cols, 1992: Human Papillomavirus Infection of the cervix: relative risks association of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* ; 79: 328-37.

Monteiro J. C. M. P., Biswas S., Al-Awqati M. A., Greening W. P., McKinna J. A. y Neville A. M.1982, Serum levels of human placental lactogen and pregnancy-specific Beta-1-Glycoprotein in breast cancer. *Br. J. Cancer.* ;46,279

Motran C. C., Díaz F. L., Gruppi A., Slavin D., Chatton B., Bocco J. L. 2002. Human pregnancy specific glycoprotein 1 (PSG 1) induce alternative activation in human and mause monocytes and suppresses the accessory cell-dependent T cell proliferation. *J. Leukoc. Biol.* 72(3):512-521.96

Organización Mundial de la Salud (OMS).

<http://screening.iarc.fr/colpochap.php?lang=3&chap=2>

Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, 2008: Cancer incidence in five continents, vol VII. International Agency for Research on Cancer, Scientific Publications number 143. Lyon; IARC.

Patología del Cuello Uterino.

http://escuela.med.puc.cl/paginas/cursos/tercero/anatomiapatologica/imagenes_ap/patologia1028-1036.html

Schiffman M., et al, 2007; Human Papillomavirus and Cervical Cancer, Lancet, 370: 890–907.

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

Shlegel R: Papillomaviruses and human cancer. Seminars Virology 1990; 297-306.

Sima S, Jason G, Runjan C, Steven G and Jmanes RW, 2005, Differential gene expression profile reveals deregulation of pregnancy specific β 1 glycoprotein 9 early during colorectal, BMC cancer, Toronto, Canada.

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

Tatarinov I., Tagirova A. K., Pugachev K. K., Shimbireva I. B., Teren'ev A. A. 1992. Cellular localization of human secretory beta globin in normal and tumor tissue. Biull. Eksp. Biol. Med. 113(1):79-82.

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

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

Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM. 1999:Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. Pathol J, 189: 12-19.

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

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

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA				
DE PACIENTES CON CÉRVIX NORMAL				
Lugar y Fecha		México DF a _____ de _____		
Por medio de la presente acepto participar en el protocolo de investigación titulado:				
Una huella genética para determinar la susceptibilidad al desarrollo del cáncer cervicouterino				
Registrado ante la CNIC con el número:				
FIS – 7114 – IMSS				
El objetivo del estudio es:				
Identificar y caracterizar el grupo de genes que se asocian con el cáncer cervicouterino				
Se me ha explicado que mi participación consistirá en:		La obtención de un fragmento de mi tejido del cérvix		
durante la realización de la histerectomía, la cual no será diferente de lo habitual, en la fecha _____, cuyo tejido sea utilizado para realizar estudios de investigación importantes para saber más acerca de este tipo de lesiones.				
Declaro que se me ha informado que por mi participación en el estudio no voy a presentar ningún riesgo, molestias ni beneficios adicionales.				
El Investigador Responsable me ha informado que el hecho de que se utilice un fragmento de mi cérvix no implica que tenga una malignidad en el mismo. Entiendo que conservo el derecho de retirarme o retirar mi muestra biológica del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el Instituto. Entiendo que una parte de la muestra biológica será utilizada para realizar identificar la presencia o ausencia del Virus del Papiloma Humana, así como estudio de investigación siguiendo los lineamientos aquí estipulados. Esta muestra además será almacenada a 4°C durante un periodo de 8 años a partir de la toma de la muestra y pasado este tiempo será desechada. El Investigador Responsable me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esta pudiera cambiar de parecer respecto a mi permanencia en el mismo.				
		8 Nombre y firma del paciente		
		Mauricio Salcedo, Número de matrícula 10231803		
Números telefónicos a los cuales puede comunicarse en caso de emergencia, dudas o preguntas relacionadas con el estudio:				
56276900 Extensión 22706				
Testigos				

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA				
DE PACIENTES CON CÉRVIX NORMAL				
Lugar y Fecha		México DF a _____ de _____		
Por medio de la presente acepto participar en el protocolo de investigación titulado:				
Una huella genética para determinar la susceptibilidad al desarrollo del cáncer cervicouterino				
Registrado ante la CNIC con el número:				
FIS – 7114 – IMSS				
El objetivo del estudio es:				
Identificar y caracterizar el grupo de genes que se asocian con el cáncer cervicouterino				
Se me ha explicado que mi participación consistirá en:				La obtención de un fragmento de mi tejido del cérvix
durante la realización de la histerectomía, la cual no será diferente de lo habitual, en la fecha _____, cuyo tejido sea utilizado para realizar estudios de investigación importantes para saber más acerca de este tipo de lesiones.				
Declaro que se me ha informado que por mi participación en el estudio no voy a presentar ningún riesgo, molestias ni beneficios adicionales.				
El Investigador Responsable me ha informado que el hecho de que se utilice un fragmento de mi cérvix no implica que tenga una malignidad en el mismo. Entiendo que conservo el derecho de retirarme o retirar mi muestra biológica del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el Instituto. Entiendo que una parte de la muestra biológica será utilizada para realizar identificar la presencia o ausencia del Virus del Papiloma Humana, así como estudio de investigación siguiendo los lineamientos aquí estipulados. Esta muestra además será almacenada a 4°C durante un periodo de 8 años a partir de la toma de la muestra y pasado este tiempo será desechada. El Investigador Responsable me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esta pudiera cambiar de parecer respecto a mi permanencia en el mismo.				
		8		
		Nombre y firma del paciente		
		Mauricio Salcedo, Número de matrícula 10231803		
Números telefónicos a los cuales puede comunicarse en caso de emergencia, dudas o preguntas relacionadas con el estudio:				
56276900 Extensión 22706				
Testigos				

HISTORIA CLÍNICA

NO/CLAVE DE MUESTRA: _____ No. Expediente (afiliación) _____

Nombre: _____ Edad: _____ años Teléfono: _____

Lugar de nacimiento _____

Lugar donde vive actualmente _____

Escolaridad máxima:

___ no estudio ___ primaria ___ secundaria ___ bachillerato ___ licenciatura

Gestas: _____ No. de partos _____ Cesáreas _____ Abortos _____

Edad de la menarca _____ años Edad de la menopausia _____ años

Inicio de la vida sexual _____ años No. parejas sexuales _____

Métodos anticonceptivos:

___ tabletas ___ inyectables ___ dispositivo _____ otros (esp.) Uso _____ meses/años

Tabaquismo ___ no ___ si _____ frec. Alcoholismo ___ no ___ si _____ frec

Ant. familiares ___ no ___ si Parentesco _____ tipo de cáncer _____
desconocido _____

Edad del 1er PAP _____ años _____ Frecuencia

Tiempo del último PAP _____ días _____ meses _____ años

FEUM (Fecha de la Última Menstruación) _____

Resultado del Pap:

_____ normal _____ infección bact/hong. _____ HPV _____ cáncer

_____ otra causa (especificar) _____ no sabe

Diagnóstico clínico: _____

Etapas clínicas: _____

Tratamiento indicado: _____



INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES

OLIGONUCLEOTIDE SPECIFICATION SHEET

WWW.IDTDNA.COM

03-Jun-2011

Order No. **7000084**

Ref. No. **59513400**

Sequence = P3G2 α

100 nmole DNA oligo, 19 bases

5'- GAC AGA GAG GTG TCC TGG G -3'

Properties

T_m (50mM NaCl): 56.9 °C
GC Content: 63.1%
Molecular Weight: 5,933.9
nmol/OD260: 5.2
µg/OD260: 31.0
Ext. Coefficient: 191,400 L/(mole·cm)

Amount Of Oligo

15.9 = 83.1 = 0.49
OD 260 nMoles mg

Shipped To

ANITA GARCIA
UNIPARTS, S.A. DE C.V.
GALILEO 92 COLONIA POLANCO DELEG
MEXICO, 11550
MEXICO
525552814718
Customer No. 140318 PO No. 12910

Secondary Structure Calculations

Lowest folding free energy (kcal/mole): -0.84 at 25 °C
Strongest Folding T_m : 33.9 °C

Oligo Base Types

Quantity

DNA Bases 19

Disclaimer

See on reverse page notes (I) (II) & (III) for usage,
label license, and product warranties

Modifications And Services

Quantity

Standard Desalting 1



INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES

OLIGONUCLEOTIDE SPECIFICATION SHEET

WWW.IDTDNA.COM

11-Aug-2011

Order No. **7111446**

Ref. No. **79013635**

Sequence - PSQ2 a

100 nmole DNA oligo, 19 bases

3'. CTG TGG AGA TGA GCC TAG G -3'

Properties

Tm (50mM NaCl): 54.3 °C

GC Content: 57.8%

Molecular Weight: 5,908.9

nmol/OD260: 3.3

ug/OD260: 31.4

Ext. Coefficient: 197,900 L/(mole-cm)

Amount Of Oligo

16.6	=	88.6	=	0.52
OD 260		nmol		mg

Shipped To

ANITA GARCIA
LINIPARTS, S.A. DE C.V.
CALLE PO 92 COLONIA POLANCO DELEG
MEXICO, 11550
MEXICO
525552014710
Customer No. 140318 PO No. 13125

Secondary Structure Calculations

Lowest folding free energy (kcal/mole): 9.22 at 25 °C

Strongest Folding Tm: 20.4 °C

Oligo Base Types

Quantity

DNA Bases

19

Disclaimer

See on reverse page notes (I) (II) & (III) for usage,
label claims, and product warranties

Modifications And Services

Quantity

Standard Desalting

1