

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

**ESTUDIO DEL FENOTIPO BIOENERGÉTICO CELULAR DE
NEOPLASIAS INTRAEPITELIALES CERVICALES DE BAJO
GRADO, ALTO GRADO Y CARCINOMA INVASOR**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS
P R E S E N T A
BIÓL. CARLA MARAYENARIH OROZCO SUÁREZ

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MAVIL LÓPEZ CASAMICHANA

ASESORES:

DRA. GUADALUPE DE DIOS BRAVO
DR. MARIO CÉSAR LÓPEZ CAMARILLO
DR. ISRAEL LÓPEZ REYES
DR. JOSÉ DE JESÚS OLIVARES TREJO

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

*“Estoy satisfecho con el misterio de la eternidad de la vida
y con el conocimiento, el sentido de la maravillosa
estructura de la existencia. Con el humilde intento de
comprender aunque más no sea que una porción diminuta
de la razón que se manifiesta en la naturaleza.”*

Albert Einstein

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTORA

Dra. Mavil López Casamichana
Profesora Investigadora. Laboratorio de Análisis y Diagnóstico Molecular de ADN
Posgrado de Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

ASESORES

Dra. Ma. Guadalupe de Dios Bravo
Profesora Investigadora. Laboratorio de Investigación en Ciencias Químicas
y Biología Molecular
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dr. Mario César López Camarillo
Profesor Investigador. Laboratorio de Oncogenómica y Proteómica del Cáncer
Posgrado de Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dr. José de Jesús Olivares Trejo
Posgrado de Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dr. Israel López Reyes
Subdirector Centro de Diagnóstico y Vigilancia Epidemiológica del Distrito Federal
Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal

LECTORES DE TESIS

Dra. Mavil López Casamichana
Profesora Investigadora. Laboratorio de Análisis y Diagnóstico Molecular de ADN
Posgrado de Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dr. Mario César López Camarillo
Profesor Investigador. Laboratorio de Oncogenómica y Proteómica del Cáncer
Posgrado de Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dra. Ma. Guadalupe de Dios Bravo
Profesora Investigadora. Laboratorio de Investigación en Ciencias Químicas
y Biología Molecular
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dr. Israel López Reyes
Subdirector del Centro de Diagnóstico y Vigilancia Epidemiológica del Distrito Federal
Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal

Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga
Profesora Investigadora
Posgrado de Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, al Posgrado de Ciencias Genómicas y en particular al Laboratorio de Análisis y Diagnóstico Molecular de ADN en donde se realizó la mayor parte de este trabajo.

Gracias también a CONACyT porque este trabajo se llevó a cabo con recursos del proyecto # 176983.

Mi más profundo agradecimiento a la Dra. Mavil López Casamichana por integrarme en su grupo de trabajo, por todo el tiempo dedicado a este también su proyecto, por sus ocurrencias, pero muchas gracias también por su valiosa amistad, que ha ido más allá de lo académico.

Gracias a la Dra. Ma. Guadalupe de Dios Bravo porque ha sido parte imprescindible de este trabajo, por su tiempo, su confianza y su amistad.

Gracias al Dr. Máximo Martínez Benítez por su interminable paciencia, por su confianza y por todas las facilidades brindadas para que yo pudiera llegar hasta aquí.

Al Dr. Israel López Reyes por su apoyo, asesoría y por toda la paciencia que me ha tenido.

Gracias al Dr. Cesar López Camarillo y al laboratorio de Oncogenómica y Proteómica del Cáncer, en especial a Alí por su tiempo y paciencia.

Al Dr. José de Jesús Olivares Trejo por las facilidades brindadas en su laboratorio.

Gracias a la Dra. Elizabeth Álvarez por su apoyo permanente, a Laura Vázquez Carrillo por la asesoría técnica.

Gracias a la Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga por su disposición de apoyarme

Agradezco también la colaboración del Dr. Samuel O. Peñalva Rosales y su equipo de colposcopistas del Servicio de Ginecología y Obstetricia del Centro Médico Nacional La Raza.

Gracias al laboratorio 114 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM particularmente a la M. en C. Sara M. Garza Aguilar por su entusiasta asesoría en las técnicas.

Gracias a la Dra. Angélica Rueda y Sánchez de la Vega, Profesora titular del Laboratorio 3. Departamento de Bioquímica, CINVESTAV, IPN y a la Q. B. P. Martha Mercado Morales

Gracias a mis compañeras de laboratorio: a Mariana, a Lucy, a Alma por sus sugerencias, al M. en C. Eduardo Carrillo Tapia por su participación y apoyo en los ensayos.

Gracias también gracias al CDE-DF: a Coko y Berenice.

Gracias a mis compañeras de generación: Fernanda, Rubí, Lidia, Ma. Elena, Alin, y Zelene.

Gracias a Lulú, a Caty y a Viviana

DEDICATORIAS

A Ivonne, mi madre, por su ejemplo y su obstinado deseo de vernos crecer, indudablemente a ella le debo cada uno de mis logros y este no es la excepción.

A Miguel, mi padre, por su gran ejemplo, por sus consejos, pero sobre todo por su apoyo absolutamente incondicional.

A Luis, mi esposo, por todo su amor y paciencia, porque estoy segura que sin su apoyo no estaría aquí, porque este logro también es suyo.

A Pablo, mi hermano, porque su ejemplo y su gran cariño también me han traído hasta aquí.

A Esther, por el gran cariño que me ha dado, porque en todo momento está cerca de mí.

A Esther Orozco, porque fue ella quien me trajo hasta aquí, por el cariño que desde niña me ha tenido y porque lo ha reflejado en su apoyo constante a lo largo de toda mi vida, sin duda le debo mucho.

.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	I
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABLAS	IV
RESUMEN	V
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes generales	1
1.1.1. El cáncer de cérvix y su estudio	1
1.1.2. Etiopatogenia del cáncer cervical	4
1.1.3. Tratamiento y pronóstico del cáncer de cérvix	6
1.1.4. Las Neoplasias Intraepiteliales Cervicales (NIC)	8
1.1.5. Pruebas diagnósticas para determinar el grado de NIC	10
1.1.6. Metabolismo bioenergético celular	11
1.2 Antecedentes directos y estado del arte	18
1.2.1 Paster y el efecto Warburg	18
1.2.2 Hipoxia y simbiosis energética	23
1.2.3 Marcadores de metabolismo	26
1.2.4 Estudio de los niveles de proteína como marcadores en cáncer	27
1.2.5 El índice bioenergético celular	28
2. JUSTIFICACIÓN	30
3. HIPÓTESIS	31
4. OBJETIVOS	32
4.1 Objetivo general	32
4.2 Objetivos particulares	32
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	33
6. METODOLOGÍA	35
6.1 Cultivo celular	35
6.2 Obtención de muestras	35
6.3 Obtención de extractos protéicos	36
6.4 Cuantificación de extractos protéicos	36
6.5 Electroforesis de proteínas SDS PAGE	37
6.6 Western blot	37
6.7 Análisis densitométrico y estadístico	38
	40

7. RESULTADOS	
7.1 Toma de muestras	40
7.2 Cultivo celular	41
7.3 Extracción de proteínas e integridad de los extractos	42
7.4 Niveles de proteína en NIC de bajo grado	43
7.5 Niveles de proteína en NIC de alto grado	44
7.6 Niveles de proteína en carcinoma invasor	45
7.7 Cálculo del Índice Bioenergético	46
7.8 Cambios en los niveles de proteína para cada fase neoplásica	47
8. DISCUSIÓN	49
9. CONCLUSIONES	55
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
11. ANEXO	60
11.1 Hoja de captación de datos	61
11.2 Cálculo de densitometría	62

ABREVIATURAS

NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
β F1ATPasa	Proteína Subunidad β F1 del complejo sintetizador de ATP
Gapdh	Proteína Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa
Hsp60	Proteína de choque térmico 60
VPH	Virus de Papiloma Humano
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
Pap	Test de Papanicolaou
ATP	Adenosin Trifosfato
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
Pi	Fosfato inorgánico
F0	Complejo F0 del complejo sintetizador de ATP
F1	Complejo F1 del complejo sintetizador de ATP
ATP5B	Gen codificador de la proteína β F1ATPasa
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleotido
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotido reducido
ARN	Ácido Ribonucleico
PCNA	Antígeno Nuclear de Proliferación Celular
BRCA	Proteína de cáncer de mama
RB	Proteína de Retinoblastoma

ARNm	Mensajero de Ácido Ribonucléico
HeLa	Línea celular de cáncer de cérvix
SiHa	Línea celular de cáncer de útero
CasKi	Línea celular de cáncer de cérvix
HIF	Factor Inducible por Hipoxia
HRE	Elemento de Respuesta a Hipoxia
GLUT	Proteína transportadora de glucosa
MCT	Proteína transportadora de lactato
LDH	Proteína Lactato Deshidrogenasa
BEC	Índice Bioenergético Celular
SDS	Detergente Dodecilsulfato Sódico
ACTB	Gen codificante de la proteína actina
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Amortiguador de fosfato salino
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
BSA	Suero de Albúmina Bovina
μg	Microgramo
μl	Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mortalidad del cáncer de cérvix en el mundo
Figura 2	Representación esquemática de los diferentes estadios de carcinoma invasor de cérvix
Figura 3	Histopatología de las Neoplasias intraepiteliales de cérvix
Figura 4	Estructura del complejo H^+ ATPsintasa
Figura 5	Modelo tridimensional de la subunidad catalítica β -F1 ATPasa
Figura 6	Modelo tridimensional de la proteína GADPH
Figura 7	Modelo tridimensional de la Hsp60
Figura 8	Diferencias metabólicas entre células normales y tumorales
Figura 9	Modelo de la transcripción de HIF
Figura10	Simbiosis metabólica entre células tumorales del tejido hipóxico y células tumorales del tejido normóxico
Figura 11	Expresión de β -F1 ATPasa y β -mRNA en tumores y tejido normal
Figura 12	Clasificación de las muestras
Figura 13	Cultivo de células HeLa
Figura 14	Extractos proteicos para mostrar integridad.
Figura 15	Niveles de expresión de proteínas en el grupo de pacientes con NIC de bajo grado
Figura 16	Niveles de expresión de proteínas en el grupo de pacientes con NIC de alto grado
Figura 17	Niveles de expresión de proteínas en el grupo de pacientes con carcinoma invasor
Figura 18	Estimación del índice bioenergético (β F1ATPasa/Hsp60/Gapdh)
Figura 19	Hoja de captación de datos

LISTA DE TABLAS

Tabla1	Correlación entre las diversas clasificaciones que han existido para determinar el grado de neoplasias cervicales
Tabla 2	Características de los anticuerpos utilizados en la inmunodetección por Western blot
Tabla 3	Niveles de proteína en biopsias cervicales evaluados por el número de pixeles arrojado por el análisis densitométrico
Tabla 4	Datos crudos del análisis densitométrico

RESUMEN

En la actualidad existen diversas alteraciones celulares que inciden en la tasa de consumo de glucosa; estos cambios metabólicos obedecen a conductas aberrantes que modifican el metabolismo energético celular, como el que presentan algunas células tumorales. Una evidencia importante de ello es el efecto Warburg, que establece un incremento en la tasa glucolítica aunada a una importante disminución de la fosforilación oxidativa en los tejidos neoplásicos. Este efecto ha sido reportado en carcinomas de mama, esófago, estómago y pulmón, a través del monitoreo de los marcadores: GAPDH, β -F1ATPasa y Hsp60, componentes esenciales del metabolismo energético celular. Sin embargo, siendo de una de las primeras causas de muerte en el mundo, poco se sabe del cáncer de cérvix. En este sentido resulta de gran relevancia el estudio de dichos marcadores no sólo en carcinomas cervicales, sino también y quizá con más premura en lesiones preinvasoras de células escamosas o Neoplasias Intraepiteliales Cervicales (NIC), como una manera de evaluar el fenotipo bioenergético ligado a la progresión a cáncer.

Por ello, el objetivo de este trabajo es determinar los niveles proteicos de subunidad β -F1ATPasa, GAPDH y Hsp60 mitocondrial en pacientes diagnosticadas con NIC de bajo grado, alto grado y carcinoma invasor respecto a tejido cervical sano a la toma colposcópica. Para ello se tomaron biopsias cervicales a 30 pacientes del Hospital Centro Médico Nacional la Raza de la Ciudad de México. Se obtuvieron dos muestras de tejido, una de la lesión y otra en una región sana del cérvix de la misma paciente y se evaluaron los niveles de las proteínas de interés por la técnica de Western Blot y cuantificando por densitometría. De acuerdo con los resultados obtenidos no existen diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los niveles de proteínas β F1ATPasa, GAPDH y HSP60 de las biopsias tomadas en la región sana y la región de lesión de pacientes que en etapas preinvasoras, no obstante en el grupo de NIC de alto grado es posible observar una tendencia a la disminución en los niveles de β F1ATPasa. Interesantemente, se evidenciaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los niveles de proteínas β F1 ATPasa y GAPDH en las tejidos de la región sana y la lesión de pacientes con carcinoma invasor, mientras que no se observan variaciones en los niveles de Hsp60. Se concluyó que en lesiones preinvasoras no hubo cambios en los niveles de las proteínas estudiadas. Por el contrario, la subunidad β F1ATPasa disminuyó significativamente en las lesiones del grupo de pacientes con carcinoma invasor de cérvix con respecto a sus regiones sanas, a la vez que GAPDH aumentó. Nuestros resultados apuntan una relación inversa coordinada entre la fosforilación oxidativa y la glucólisis en el grupo de pacientes con carcinoma invasor de cérvix, lo cual, por vez primera, definiría la existencia de un efecto Warburg en carcinoma invasor de cérvix.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes generales

1.1.1 El cáncer de cérvix y su estudio

El cáncer de cérvix es la afección causante de muerte más común en mujeres en muchas partes del mundo y la segunda en mujeres jóvenes (Bravo-Cuellar, 2010). Se ha documentado que se presentan cerca de 500 mil nuevos casos y 274 mil muertes cada año (Figura 1). Además se sabe que ocurre con mayor prevalencia en mujeres de estatus socioeconómico bajo y de países en desarrollo (Subhash y colaboradores, 2011).

El cáncer de cérvix en mujeres menores de 19 años es raro, se presenta con mayor frecuencia en mujeres mayores de 50 años de países con poca tendencia a hacerse revisiones periódicas (Saslow y colaboradores, 2011). En el caso particular de México es la segunda causa de muerte y a pesar de que existen programas para su detección desde 1974, como es la prueba del Papanicolau (Pap) o citología vaginal, el decremento de casos ha sido mínimo. No obstante, en la actualidad se realizan estudios para promover estrategias y métodos de detección más efectivos que los existentes (Flores y colaboradores, 2011).

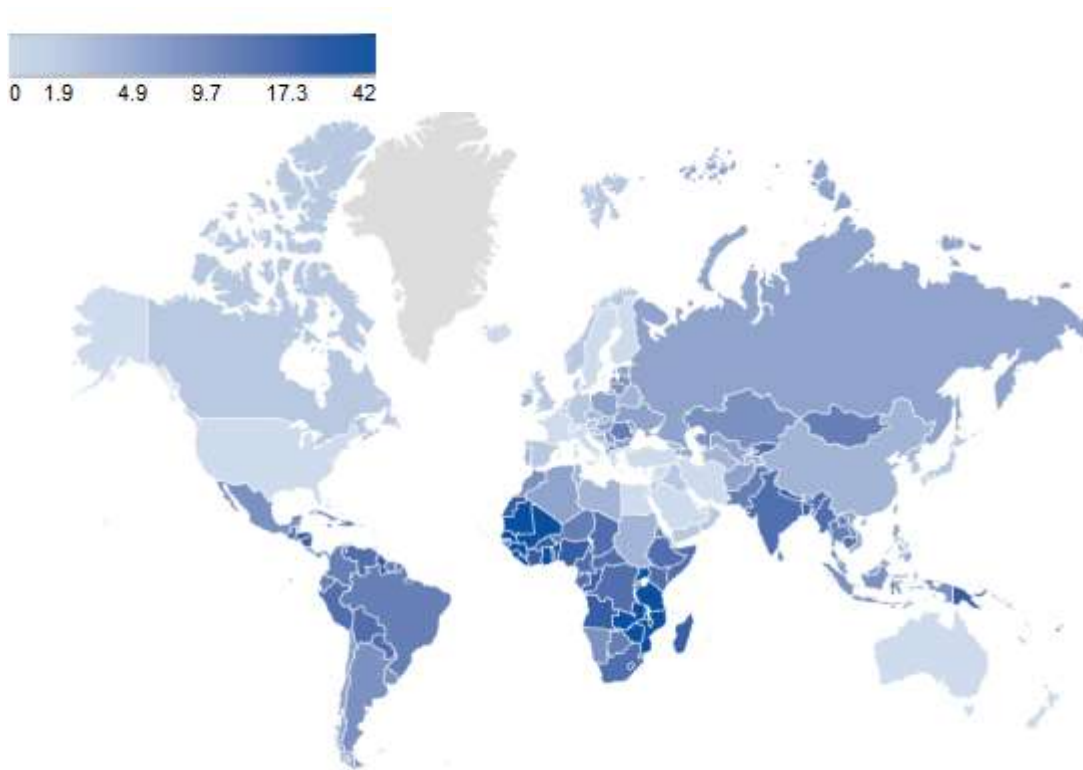


Figura 1. Mortalidad del cáncer de cérvix en el mundo. Tasa de mortalidad por edad, por cada 100,000. Tomado de International Agency for Research on Cancer 2008.

El sistema de clasificación más empleado para el cáncer invasor del cuello uterino, elaborado por la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO), toma como parámetros el tamaño del tumor y la propagación de la enfermedad a la vagina, el parametrio, la vejiga urinaria, el recto y los órganos distantes. En base a lo anterior, el grado de crecimiento del cáncer se evalúa tanto clínicamente como a través de diversos estudios para determinar el estadio de la enfermedad, del I al IV (Figura 2). El estadio I representa un tumor limitado al cuello uterino, donde no se ha invadido más allá de 5 mm de profundidad y 7 mm de ancho hacia el estroma cervical subyacente, por lo que se le reconoce histológicamente como carcinoma microinvasor. En tanto que el estadio IV corresponde a la fase de crecimiento en la cual el cáncer se ha diseminado por metástasis a

los órganos distantes. En las etapas avanzadas de la enfermedad se llega a presentar metástasis a distancia, que suele afectar a los nódulos paraaórticos, los pulmones, el hígado, los huesos y otro tipo de estructuras.

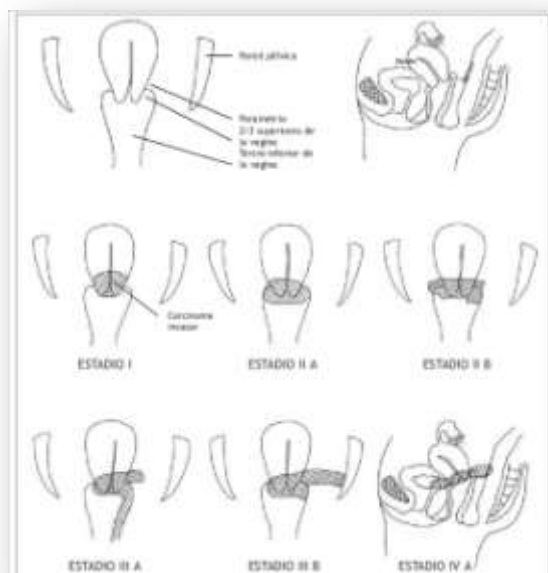


Figura 2. Representación esquemática de los diferentes estadios de carcinoma invasor de cérvix

Los cánceres más avanzados pueden ser exofíticos, endofíticos o una combinación de ambos. Los carcinomas exofíticos por lo general invaden superficialmente, y la mayor parte de su masa se proyecta hacia la luz vaginal como un hongo o una protuberancia proliferativa similar a una coliflor, con excrecencias polipoideas o papilares. Los cánceres endofíticos pueden infiltrar ampliamente el estroma, distorsionando el cuello uterino, con poco crecimiento visible en la superficie. Tales cánceres pueden mantenerse asintomáticos durante mucho tiempo. Los tumores que son a la vez exofíticos y endofíticos generalmente están ulcerados, con infiltración profunda del estroma subyacente. En todos los tipos, la hemorragia al tacto y la necrosis son las características clínicas predominantes. También es

común el flujo maloliente, debido a la infección agregada del tejido necrótico por anaerobios.

1.1.2 Etiopatogenia del cáncer cervical

Numerosos estudios han confirmado la presencia y relación de los virus con diferentes cánceres considerándose factores por ejemplo en cáncer de cérvix, nasofaringe, gástrico, esófago, laringe, linfoma, enfermedad de Hodgkin, etc. De hecho, se cree que los virus pueden estar involucrados en el 20 % de los cánceres humanos (Gravitt y Jamshidi, 2005).

La causa principal de las neoplasias cervicales intraepiteliales es una previa infección de transmisión sexual, en particular con el virus del papiloma humano (VPH). Varios estudios de cohorte establecen una fuerte asociación en el desarrollo de las NIC y carcinomas cervicales con la infección por VPH; y son al menos 30 los tipos de VPH que se sabe tienen una elevada predilección por la región anogenital (Modcicki y colaboradores, 2001; Woodman y colaboradores, 2001).

Algunos tipos específicos como VPH-6 y VPH-11, producen lesiones benignas, entre ellas el condiloma acuminado y se consideran tipos de bajo riesgo. Actualmente se reconoce que en más del 90% de los casos de carcinoma epidermoide cervical se encuentra el ADN del VPH, lo que indica que la infección por dicho virus participa en la causalidad del carcinoma cervical. Es decir que prácticamente todos los cánceres cervicales, tanto de tipo escamoso como glandular, están causados por infecciones cervicales persistentes por alguno de los 14 tipos de VPH oncogénicos (VPH 16, 18, 31, 33,35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, y 68) (Gravitt y colaboradores, 2007).

Se cree que la infección por VPH comienza en las células basales o parabasales del epitelio metaplásico. Si la infección persiste, puede suceder que el genoma vírico se incorpore al de

la célula anfitriona. La diferenciación normal y la evolución de epitelio escamoso metaplásico inmaduro a maduro puede interrumpirse como resultado de la expresión de oncoproteínas E6/E7 y de la pérdida del control del crecimiento normal. Esto puede conducir, ulteriormente, a la aparición de epitelio displásico anormal. Si el proceso neoplásico no se interrumpe, las lesiones tempranas de bajo grado pueden llegar a abarcar todo el espesor del epitelio. Después, la enfermedad puede atravesar la membrana basal y convertirse en cáncer invasor, extendiéndose a los tejidos y órganos circundantes. La invasión puede luego alcanzar la sangre y los vasos linfáticos, con lo cual la enfermedad puede diseminarse a los ganglios linfáticos y a órganos distantes (Gravitt, 2011).

Los subtipos de VPH se clasifican en de bajo y alto riesgo, de acuerdo a su asociación con lesiones premalignas y malignas. Considerando que diferentes subtipos de VPH varían en su afinidad por los tejidos y su patogenicidad, la determinación del genotipo de VPH es un indicador de riesgo para el desarrollo de cáncer de cérvix invasivo (Velazquez-Márquez y colaboradores, 2009). Con respecto a lo anterior, el VPH-16 está involucrado en aproximadamente el 54% de los casos de cáncer de cérvix invasivo en todo el mundo, mientras que el VPH-18 causa alrededor del 11%. Otros tipos de VPH están menos frecuentemente asociados con cáncer. El riesgo de contraer un VPH genital está relacionado a la actividad sexual, por lo que el CC sigue un patrón típico de enfermedades transmitidas sexualmente. Entre los factores de riesgo asociados al desarrollo de esta neoplasia maligna se encuentran: promiscuidad, actividad sexual a temprana edad, historial de otras enfermedades transmitidas sexualmente, verrugas genitales, pareja sexual con cáncer de cérvix o de pene, persistencia y carga viral alta, coinfección con otros virus como el Herpes simple (HSV) tipo 2, Citomegalovirus (CMV) y Herpesvirus humano tipos 6 y 7 (Negrini y colaboradores, 1990). Conjuntamente, diversos estudios han relacionado el uso

prolongado de anticonceptivos orales con la alta positividad al DNA viral; y se sabe que la región larga de control (LCR por las siglas en inglés) en el genoma viral contiene elementos de respuesta a glucocorticoides inducibles por hormonas esteroides como la progesterona y la dexametasona (Magnusson y Gyllensten, 2000). Por otra parte, la infección es más común en mujeres jóvenes sexualmente activas de 18 a 30 años de edad, y después de los 30 años decrece la prevalencia. Mientras tanto, el carcinoma cervical es más común después de los 35 años, lo que sugiere infección a temprana edad y progresión lenta a cáncer. Aunado a esto, 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 desarrollo de la enfermedad (Magnusson y colaboradores, 2000).

Resulta claro que el diagnóstico del VPH constituye un factor significativo en la predicción de la supervivencia y pronóstico de la paciente con cáncer invasor del cuello uterino. El desarrollo de técnicas moleculares simples que permiten su utilización clínica ha planteado la posibilidad de emplearlas para mejorar la detección de tanto de las neoplasias preinvasoras como del cáncer cervical.

1.1.3. Tratamiento y pronóstico del cáncer de cérvix

El tratamiento convencional del carcinoma cervicouterino puede incluir cirugía, radioterapia o una combinación de ambas. Los carcinomas cervicouterinos tempranos pueden tratarse con alguna de las dos opciones. La radioterapia es el tratamiento preferido una vez que la enfermedad se ha extendido más allá de los límites del cuello uterino y los fondos de sacos vaginales, cuando la cirugía no es eficaz. El tratamiento del carcinoma cervicouterino con radioterapia a menudo puede incluir una combinación de radioterapia

externa (para toda la pelvis) y radiación intracavitaria (para la parte central de la enfermedad). En caso de neoplasias localmente avanzadas, combinar la radiación intracavitaria y la externa ofrece un mejor control de la enfermedad y mejora la supervivencia, en comparación con la radioterapia externa por sí sola (Botella, 1997).

Las mujeres con cáncer microinvasor pueden ser tratadas mediante conización, histerectomía o histerectomía ampliada. En casos específicos de carcinoma pequeño (<2 cm) en estadio, puede realizarse cervicectomía radical combinada con linfadenectomía laparoscópica, para conservar la función reproductora de la paciente. La radioterapia y la cirugía ofrecen resultados similares en el cáncer invasor en los estadios iniciales. En las mujeres con neoplasias en estadios avanzados se da tratamiento paliativo con radioterapia externa, quimioterapia o ambas (Jaramillo, 1991; Botella, 1997).

La quimioterapia coadyuvante con cisplatino ha mejorado los resultados de la radioterapia en el carcinoma cervicouterino avanzado. Los ensayos clínicos aleatorizados han demostrado una mejoría significativa en la supervivencia global y en la supervivencia libre de enfermedad con el tratamiento a base de cisplatino administrado en forma concomitante con la radioterapia. Se ha observado un beneficio significativo al combinar quimioterapia con radiación para disminuir la recurrencia, tanto local como distante. El estadio clínico de la enfermedad en el momento del diagnóstico es el factor aislado más importante de predicción de la supervivencia a largo plazo; las tasas de supervivencia también disminuyen a mayor edad (Jaramillo, 1991). Otros factores que influyen en la supervivencia son las condiciones generales de salud y el estado nutricional. Las pacientes anémicas tienen una mala respuesta al tratamiento, lo mismo que aquellas seropositivas al VIH. Los estadios clínicos avanzados se relacionan con una frecuencia mayor de invasión vascular, con

diseminación a los ganglios linfáticos pélvicos y paraaórticos y metástasis a distancia (Fagundes y colaboradores, 1992).

Un buen conocimiento de la etiología, la fisiopatología y la evolución natural de las neoplasias proporciona una buena base para la inspección visual y el diagnóstico colposcópico, y para comprender los principios del tratamiento de estas lesiones (Jaramillo 1991; Botella, 1997).

1.1.4 Las Neoplasias Intraepiteliales Cervicales (NIC)

Los cánceres cervicales vienen precedidos generalmente por una fase de enfermedades preinvasoras. Esto se caracteriza microscópicamente por una serie de manifestaciones que van desde la atipia celular a diversos grados de displasia o neoplasia intraepitelial cervical (NIC) antes de progresar a carcinoma invasor (Figura 3), no obstante en la mayoría de los casos estas lesiones suelen retroceder por acción del sistema inmune sin llegar a generar lesiones importantes (Sellors y Sankaranarayanan, 2003; Baak y colaboradores, 2006).

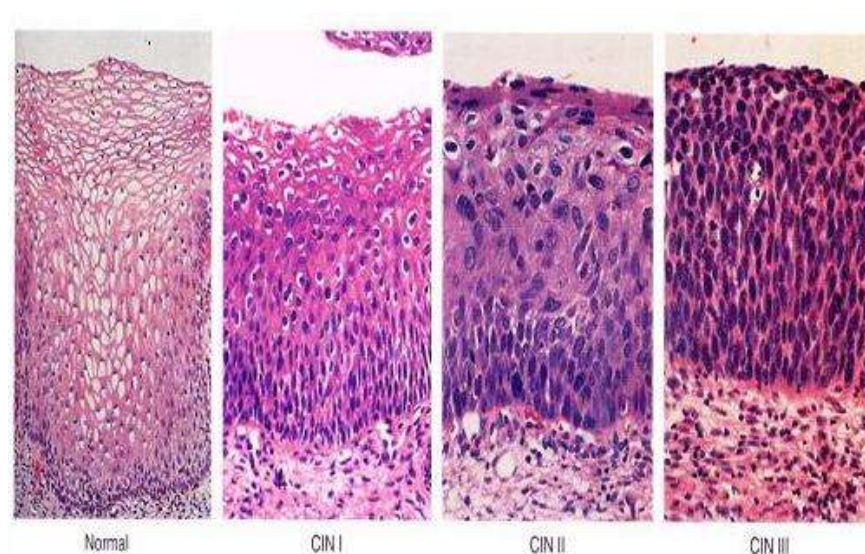


Figura 3. Histopatología de las Neoplasias intraepiteliales de cérvix. (Tomada y modificada de Talaat S. Tadros MD, Emory University School of Medicine).

Las Neoplasias Intraepiteliales Cervicales se han venido clasificando de diversas maneras a lo largo del tiempo, su terminología original clasificaba las lesiones en NIC I que incluían lesiones que ocupaban solo una tercera parte del epitelio, NIC II para lesiones que ocupaban dos terceras partes del epitelio y NIC III para lesiones que ocupaban más de dos tercios del epitelio y siendo esta última donde se incluía carcinoma *in situ*, el estadio previo a un carcinoma invasor. Sin embargo en la actualidad la clasificación ha sido modificada y hoy se reconocen únicamente NIC de bajo grado (donde se incluye NIC I), NIC de alto grado (donde se incluyen NIC II, NIC III y carcinomas *in situ*) y la fase de carcinoma invasor. El término de carcinoma *in situ* se introdujo en 1932 para denotar lesiones en las cuales las células carcinomatosas indiferenciadas abarcaban todo el espesor del epitelio, sin interrumpir la membrana basal (Sellors y Sankaranarayanan, 2003) ver Tabla1.

TERMOLOGÍA DE DISPLASIA	TERMINOLOGÍA ORIGINAL	NIC	TERMINOLOGÍA NIC MODIFICADA	SISTEMA BETHESDA-LIE (1991) (LESION INTRAEPITELIAL)
Normal	Normal		Normal	Dentro de los límites normales, cambios celulares benignos
Atipia	Atipia coilocítica, condiloma plano, sin cambios epiteliales		NIC de bajo grado	L-LIE
Displasia o discariosis leve	NIC I		NIC de bajo grado	L-LIE
Displasia o discariosis moderada	NIC II		NIC de alto grado	H-LIE
Displasia o discariosis grave	NIC III			
Carcinoma <i>in situ</i>	NIC III			
Carcinoma invasor	Carcinoma invasor		Carcinoma invasor	Carcinoma invasor

Tabla 1. Correlación entre las diversas clasificaciones que han existido para determinar el grado de neoplasias cervicales.Tomado de Sellors y Sankaranarayanan, 2003

1.1.5 Pruebas diagnósticas para determinar grados de NIC

El grado de NIC se determina observando la proporción del espesor epitelial que presenta células maduras diferenciadas (Sellors y Sankaranarayanan, 2003; Baak y colaboradores, 2006). En NIC I existe buena maduración, mínimas anomalías nucleares y pocas figuras mitóticas; en NIC II cambios celulares displásicos restringidos sobre todo a la mitad o los dos tercios inferiores del epitelio, con anomalías nucleares marcadas; en NIC III la diferenciación y estratificación pueden faltar por completo o existir solo en el cuarto superficial del epitelio, con abundantes figuras mitóticas (Sellors y Sankaranarayanan, 2003; Sarduy y colaboradores, 2008).

Si bien el Pap ha resultado hasta ahora una de las pruebas más recomendadas y de uso más generalizado, posee algunas limitaciones, como la baja sensibilidad que presenta (55% a 87%) lo que se traduce en una alta tasa de falsos negativos. No obstante para detectar cáncer de cérvix existen procedimientos histológicos más específicos pero más invasivos que no se utilizan sino hasta una segunda etapa como es la toma de biopsias y la colposcopia, siendo esta última una extensión para la vista del colposcopista que comúnmente forma su propio juicio respecto de lo que considera esencial en el examen y desecha gran parte de lo que considera inútil. Parecería que la práctica de la colposcopia es bastante flexible en su contenido, y que el orden en que se realizan los diferentes pasos puede variar en los distintos medios, ya que las circunstancias cambian según el entorno cultural y contextual en el que se lleva a cabo la colposcopia en todo el mundo (Sellors y Sankaranarayanan, 2003; Lazcano, 2005).

En este sentido aportar conocimiento relativo a la prevención, detección o tratamiento del cáncer de cérvix resulta elemental, y la implementación de métodos alternativos para su diagnóstico podría coadyuvar de manera importante a esta tarea. En este trabajo

presentaremos un análisis de expresión de genes involucrados en el metabolismo bioenergético, que si bien no está de ningún modo relacionado con los métodos de detección mencionados podría abrir la posibilidad al inicio de desarrollo de técnicas alternativas o complementarias a las existentes. Uno de los intereses de este trabajo es enfatizar la importancia del estudio del fenotipo mitocondrial en células precancerosas y cancerosas, y para ello ha resultado necesaria la designación de marcadores del metabolismo bioenergético.

1.1.6 Metabolismo bioenergético celular

En términos generales, parece que el cáncer está asociado de alguna manera con la existencia de mutaciones en el genoma nuclear y en el mitocondrial, que codifican los componentes implicados en las funciones bioenergéticas de la célula, quedando pendiente de demostrar el hecho de si estas mutaciones son una causa o una consecuencia del cáncer, así como la implicación de las mismas en la progresión tumoral (Cuezva, 2005).

Generalmente, las células cancerosas se caracterizan por presentar un metabolismo energético alterado; en algunos tumores el fenotipo glucolítico se ha visto aumentado y esto se ve acompañado por el decremento de la actividad bioenergética de la mitocondria, ambos hechos pueden ser estimados a través de algunos marcadores de rutas metabólicas (Acebo y colaboradores, 2009; Sánchez-Aragó y Cuezva, 2011).

Es bien sabido que el ATP es la molécula de alta energía más común en la naturaleza, es utilizada para proveer energía a una gran variedad de reacciones químicas. Además actúa como molécula reguladora de varias actividades enzimáticas y es sustrato para la síntesis

del ADN, el 95% de este ATP es sintetizado por el complejo F₀F₁ ATP sintasa en condiciones aerobias mediante la transformación de la energía del gradiente de H⁺ en energía química de enlace de ADP y el Pi, proceso conocido como transducción, y la F₀F₁ ATP sintasa la realiza mediante la acción sucesiva de dos motores: el primero, el complejo F₀ transporta los protones, que al rotar transmite la energía a los sitios catalíticos del segundo, el complejo F₁ (Domínguez-Ramírez y Tuena de Gómez-Puyou, 2003).

El nombre del complejo localizado en la membrana interna mitocondrial, refleja la distribución en dos ambientes (Figura 4): el hidrofóbico (complejo F₀) que esta embebido en la membrana interna de la mitocondria y el hidrofílico (complejo F₁ compuesto por 5 subunidades: α , β , γ , δ , ϵ) que sobresale a la matriz mitocondrial. Estos elementos en conjunto, aprovechan el potencial electroquímico generado por la cadena respiratoria para sintetizar ATP en el proceso de fosforilación oxidativa (Domínguez-Ramírez y Tuena de Gómez-Puyou, 2003).

Es fundamental el papel que juega el complejo ATPasa en la generación de energía en forma de ATP, no obstante un elemento clave es la subunidad β (β -F₁-ATPasa), que funciona como una maquinaria que trabaja en la membrana mitocondrial para dirigir el gradiente electroquímico de protones generados en la cadena respiratoria (Isidoro y colaboradores, 2004; Willers y colaboradores, 2010); además juega un rol fundamental en la muerte celular programada y se ha visto que la regulación de su expresión se lleva a cabo a niveles postranscripcionales durante el desarrollo del hígado y la carcinogénesis (Ricart y colaboradores, 2002; Martínez-Diez y colaboradores 2006).

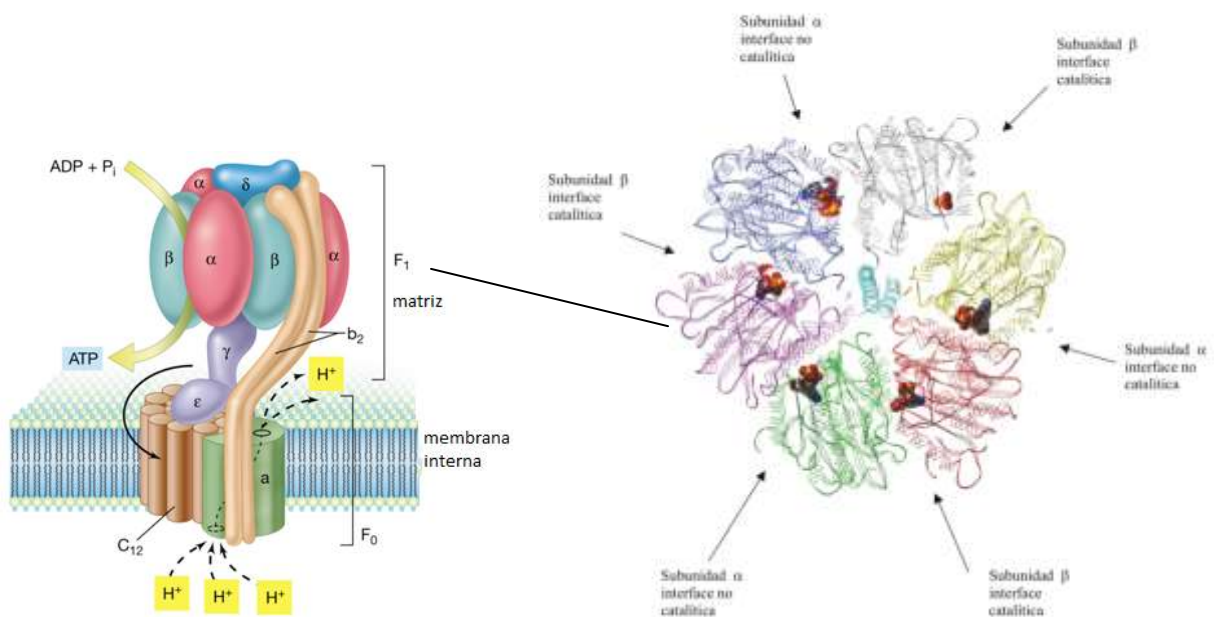


Figura 4. Estructura del complejo H^+ ATPsintasa y estructura tridimensional del dominio F1 de bovino (*Bos taurus*), resuelta por cristalografía de rayos X. Tomado de Domínguez-Ramírez y Tuena de Gómez-Puyou 2003

En eucariontes los genes que codifican para las diferentes subunidades del complejo se encuentran localizados tanto en el genoma nuclear como en el mitocondrial (Domínguez-Ramírez y Tuena de Gómez-Puyou 2003). Para fines de este trabajo nos enfocaremos en la subunidad β (β -F1 ATPasa) entre otras (Figura 5), que es una proteína mitocondrial de 529 aminoácidos en su condición de precursor (GenBank NP_001677.2), sin embargo una vez que la proteína madura consta de 482 aminoácidos (GenBank NP_001677.2). Tiene un peso molecular de 56 y 49 kDa, es usada como marcador bioenergético en estudios oncológicos (Cuezva 2005 y Willers y colaboradores 2010) y es codificada por el gen ATP5B localizado en el brazo largo del cromosoma 12 (12q13.13) (UniProt P06576, 529aa y Q0QEN7, 445aa).

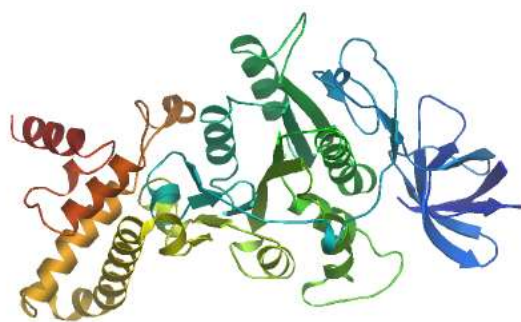


Figura 5. Modelo tridimensional de la subunidad catalítica β -F1 ATPasa (UniProt P06576, 529aa y Q0QEN7, 445aa)

La regulación de la expresión de β -F1-ATPasa está relacionada con la estabilidad y la eficiencia traduccional del transcrito (Ricart y colaboradores, 2002). Estudios recientes han demostrado la disminución en la expresión de la subunidad catalítica β -F1 ATPasa en carcinoma colorectal (Sánchez-Aragó y Cuezva, 2011), gástrico, de esófago, próstata (Isidoro y colaboradores, 2004), de colon (Willers y colaboradores, 2010) mama y pulmón (Isidoro y colaboradores, 2004; Willers y colaboradores, 2010), todo ello aporta evidencias de alteraciones en las funciones bioenergéticas de la célula.

Otra proteína involucrada en este estudio es la Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (Figura 6). Está localizada en el citosol, región perinuclear, membrana y núcleo. Es codificada por el gen GAPDH en el brazo corto del cromosoma 12 (12p13.31), consta de 335 aa, pesa 35 kDa y juega un rol clave en la glucólisis cuando sus moléculas se oxidan y el NAD^+ se reduce a NADH, produciéndose fosfoglicerato como producto de esta reacción que se unirá a un fosforo inorgánico (P_i) para formar 1, 3 difosfoglicerato; por lo que resulta un buen marcador de esta ruta. Participa en eventos nucleares que incluyen transcripción, transporte de RNA, replicación de DNA y apoptosis (UniProt P04406).

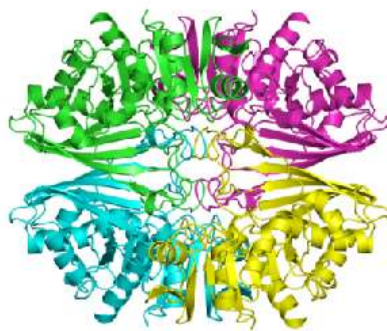


Figura 6. Modelo tridimensional de la proteína GAPDH (PDB 1u8f)

Por lo anterior ambas proteínas han sido designadas como marcadores de las rutas metabólicas en las que participan y han sido integradas al índice denominado “huella bioenergética” (β -F1-ATPasa/GAPDH), que es una relación entre la expresión de la β -F1-ATPasa, componente clave en la síntesis de energía, y la expresión de la proteína glucolítica GAPDH. Este índice provee una estimación del metabolismo de la glucosa (Sánchez-Aragó y Cuezva, 2011) y permite cuantificar la variabilidad de la demanda energética de tejidos humanos (Acebo y colaboradores, 2009).

Esta “huella bioenergética” ha permitido distinguir una regulación negativa en diferentes tumores humanos en comparación con tejido normal; además la también representa el índice funcional de la actividad metabólica, ya que correlaciona directamente (*in vitro e in vivo*) con la tasa de utilización de glucosa en células tumorales e inversamente con la tasa de glucólisis aerobia (Sánchez-Aragó y Cuezva, 2011).

Por otro lado, es importante resaltar que la regulación negativa de la β -F1-ATPasa ha sido asociada con la resistencia de células cancerosas a terapias anticancer (Sánchez-Aragó y Cuezva, 2011).

No obstante, para la normalización de la expresión no-dimensional del valor de β -F1-ATPasa resulta necesario incluir una proteína estructural mitocondrial dando lugar al índice

β -F1-ATPasa/Hsp60, así el cociente de la expresión resulta un índice proteómico de la competencia bioenergética en ese tejido y por ende un indicador de afectación por neoplasia (Cuezva, 2005; Acebo y colaboradores, 2009).

La Hsp60 (Figura 7) o Chaperonina 60, es una proteína de choque térmico localizada en la matriz mitocondrial, con un peso molecular de 61 kDa, es codificada por el gen HSPD1 localizado en el brazo largo del cromosoma 2 (2q33.1), tiene 573 aminoácidos y está implicada la biogénesis de la mayoría de las proteínas mitocondriales, en el importe y en su plegamiento (UniProt P10809), por lo que los cambios en su expresión pueden aportar información acerca de cómo la carcinogénesis está afectando la biogénesis mitocondrial en el tejido tumoral (Cuezva, 2005).

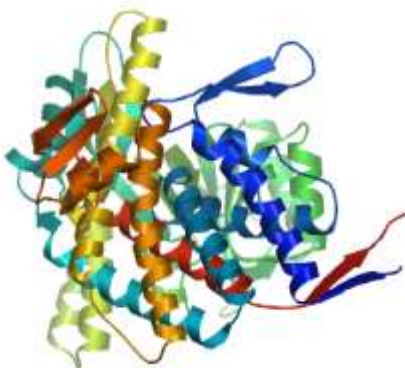


Figura 7. Modelo tridimensional de la Hsp60 (UniProt P10809)

Los cambios genéticos representan marcadores potencialmente valiosos en la detección y evaluación de la etapa de evolución de tumores. Los tipos de mutaciones asociadas con el desarrollo o evolución de la neoplasia son muy variados, e incluyen alguna(s) de las siguientes formas:

- Amplificación de una región del cromosoma que produce múltiples copias del gen
- Deleción o pérdida de material genético
- Translocaciones o rearrreglos cromosómicos
- Mutaciones puntuales que implican la sustitución de un aminoácido (mutación de sentido equivocado) o la terminación prematura de la traducción (proteína truncada)
- Inserción de DNA exógeno, generalmente viral
- Expansión de secuencias repetitivas de nucleótidos debidas a deslizamientos de la polimerasa en el proceso de duplicación de DNA o por defectos en los mecanismos de reparación (Barrera y colaboradores, 2003)

Por otro lado el uso de marcadores moleculares ha jugado un papel crucial en la investigación y diagnóstico de cáncer. Estos se definen como proteínas mediadoras en una o varias etapas de la tumorigénesis. Pueden estar involucrados en el origen o desarrollo del tumor alterando la promoción y progresión de las células tumorales; como lo hacen la mayoría de los oncogenes y genes supresores de tumores, que afectan numerosos eventos fisiológicos celulares. Ejemplo de ello es la proteína PCNA (Antígeno Nuclear de Proliferación Celular) que es una de las proteínas que forman la maquinaria de replicación en la fase S del ciclo celular, o algunas ciclinas que participan en la desregulación del ciclo celular, o genes que participan en la adquisición de resistencia a algunas drogas antitumorales (Bertino y colaboradores, 1996).

Los marcadores moleculares nos permiten predeterminedar riesgo, por ejemplo BRCA, Proteína de Cáncer de Mama y pRB, Proteína de Retinoblastoma. Además de posibilitar un diagnóstico precoz, confirmar un diagnóstico, así como asignar variedades en algunas clases de tumores, establecer un pronóstico, guiar la terapia en algunos canceres, y

determinar resistencia a drogas, por ejemplo por amplificación del gen DHFR para el caso del metotrexato (Knudson, 1971).

En este contexto el estudio de marcadores del fenotipo metabólico resulta trascendental en el abordaje de cáncer y podría proveer una valiosa herramienta para el diagnóstico de pacientes con esta enfermedad o incluso en etapas preinvasoras.

1.2 Antecedentes directos y estado del arte

1.2.1 Paster y el efecto Warburg

Una de las primeras observaciones que se realizó en el ámbito del cáncer es que la célula tumoral en condiciones de aerobiosis tiene una tasa glucolítica anormalmente alta. Otto Warburg propuso en 1926 y teniendo en consideración el principio de regulación metabólica que conocemos como efecto Pasteur que sostiene básicamente que la glucólisis depende del suministro de ATP proveniente de la fosforilación oxidativa, la hipótesis de que la mitocondria de la célula tumoral tenía que tener su función bioenergética alterada (Cuezva, 2005).

Las células tumorales necesitan más energía que las células normales para sobrevivir y crecer. Para muchas de sus necesidades energéticas las células normales llevan a cabo el proceso llamado respiración, el cual consume oxígeno y glucosa para sintetizar ATP, pero el cáncer es comúnmente más dependiente de glucólisis y de la disminución de ATP (Hui, 2009).

Hace más de 80 años Warburg identificó una ruta metabólica particular de carcinomas caracterizada por la degradación anaeróbica de la glucosa, incluso en presencia de oxígeno.

No obstante las bases moleculares no han sido identificadas aún (Warburg y colaboradores, 1927; Hui, 2009).

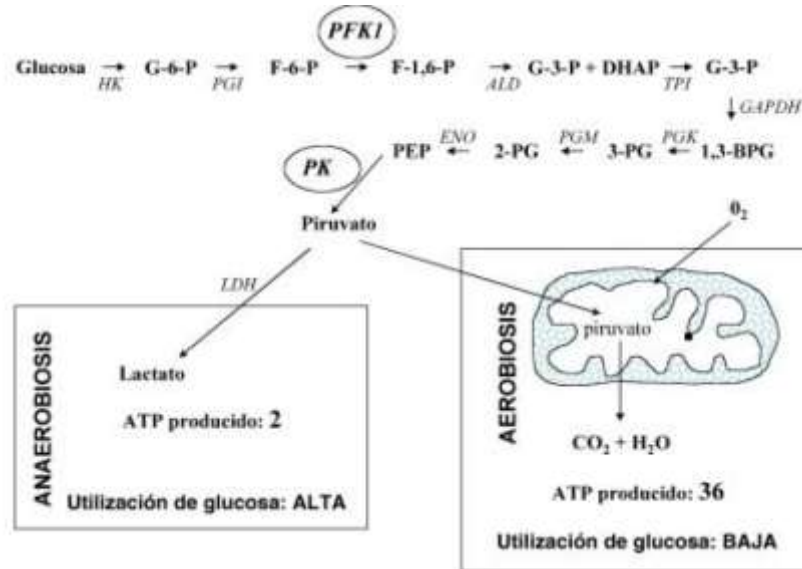
Una de las principales preocupaciones de Warburg era la posible relación entre el origen de los tumores y el suministro de energía. Normalmente, las células obtienen su energía (ATP) a través de un proceso relativamente lento, denominado respiración aerobia, en el que el oxígeno oxida totalmente, hasta dióxido de carbono, los hidratos de carbono y las grasas. El efecto Warburg, consiste en que el crecimiento de muchos tumores cancerosos se asocia a la existencia de un intenso y rápido proceso de glicólisis anaerobia, en el que la glucosa se rompe hasta lactato aun en presencia de oxígeno (Warburg y colaboradores, 1927).

Con la demostración de que la mayoría de los tumores humanos presentan un fenotipo glucolítico incrementado cuando se compara con el fenotipo de la célula normal (Figura 8A), se ha despertado cierto interés en el tema. Posiblemente, porque se ha abierto la posibilidad a la utilización de estos marcadores para el pronóstico de pacientes oncológicos y eventualmente, como posibles blancos terapéuticos del cáncer (Cuezva, 2005).

El efecto Pasteur, que sustenta las ideas de Warburg, propone que el flujo de la glucólisis en células aerobias, que se estima a partir del consumo de glucosa y/o por aumento de la producción de lactato (Figura 8B), depende del ATP que aporta la fosforilación oxidativa mitocondrial. Por lo tanto si este se ve limitado, posiblemente por la disponibilidad de oxígeno o por la presencia de alguna mutación, la glucólisis se verá incrementada sustancialmente con el objeto de reponer la carencia energética y hacer frente a la demanda celular de ATP. En algunos casos, dependiendo del tipo de desorden que se presente y su duración, el aumento del flujo glucolítico mediante regulación alostérica de algunas de las

enzimas clave de la vía glucolítica puede compensar el déficit energético que se produzca. Sin embargo, si esto no es suficiente, es de prever que el fenotipo bioenergético de la célula se tendrá que ajustar a un nuevo estado estacionario en la expresión de enzimas involucradas en las vías de producción de energía (Cuezva, 2005).

A)



B)

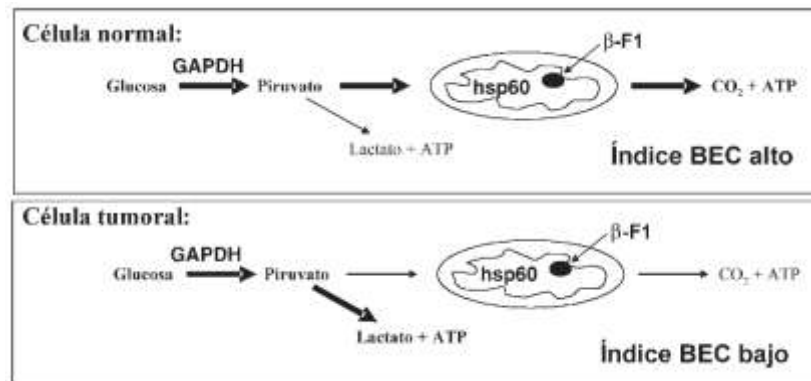


Figura 8. Diferencias metabólicas entre células normales y tumorales. A) Metabolismo de la glucosa en células normales y tumorales. B) Efecto Pasteur: la producción mitocondrial de ATP por fosforilación oxidativa define el consumo de la célula. Tomado de Cuezva 2005

Las evidencias de la relación inversa entre glucólisis y fosforilación se ven fortalecidas con el estudio de patologías mitocondriales que resultan de mutaciones muy diversas sobre el material genético que está implicado en funciones metabólicas, en estas patologías las células afectadas compensan el déficit energético que la alteración mitocondrial impone mediante un aumento en el flujo de la glucólisis (Cuezva, 2005; Sánchez-Aragó y Cuezva, 2011).

Aprovechándose de estos conocimientos y basándose en la hipótesis de Warburg, Cuezva decidió junto con sus colaboradores explorar con una aproximación inmunológica la posible existencia de una alteración de la función bioenergética de la mitocondria en cáncer, mediante el análisis de marcadores del proteoma mitocondrial para aportar una explicación al fenotipo glucolítico de células tumorales. Estudiaron en biopsias normales y tumorales la expresión de una proteína que es el cuello de botella de la fosforilación oxidativa, esperando que si el fenotipo esta alterado en cáncer, se tiene que manifestar en una disminución en la expresión de la subunidad catalítica β de la H^+ ATP sintasa (β -F1-ATPasa), además de combinar con el estudio de otro marcador mitocondrial implicado en la biogénesis de la mayoría de las proteínas mitocondriales, Heat shock protein 60 (Hsp60); y como la fosforilación oxidativa también depende del número de orgánulos que la célula contenga se incluyo para normalizar un marcador celular de la expresión de la proteína glucolítica gliceraldehido-3fosfato deshidrogenasa (GAPDH) dando lugar al índice bioenergético β -F1-ATPasa/Hsp60/GAPDH.

Por otro lado, en una revisión publicada en el 2011, Willers y Cuezva reafirman que otra alternativa para el estudio del fenotipo bioenergético mitocondrial el análisis a nivel de mRNA, citando su publicación del 2010 (Willers y colaboradores, 2010), donde se resaltan algunas evidencias de que β -F1-ATPasa en rata y levadura está involucrada en la reducción

de la síntesis de ATP y disfunciones en la respiración entre otras deficiencias mostrando que existen evidencias para proponer modificaciones postranscripcionales en la β -F1-ATPasa.

El estudio de cáncer se ha realizado mayoritariamente usando modelos de cáncer humano para comprender mejor la biología, formación y progreso del tumor, esto ha sido suficiente para desarrollar agentes terapéuticos para el tratamiento de la enfermedad; sin embargo, las líneas celulares proliferan en un ambiente *in vitro*, esto lleva a una deriva genética y a la pérdida de interacción célula-célula. Actualmente, los estudios *in vitro* involucran el cultivo de líneas celulares cervicales inmortalizadas como HeLa, SiHa y Caski aunque existen muchas líneas celulares comerciales utilizadas en la investigación. Se ha visto que al comparar los perfiles de expresión y transcripción de diferentes líneas celulares con biopsias de células tumorales que éstas pueden responder de distinta manera lo que implica una expresión y transcripción diferencial en un mismo ambiente (Carlson y colaboradores, 2007).

1.2.2 Hipoxia y simbiosis energética

De acuerdo con Porporato, 2011 la mayoría de los tumores son hipóxicos, con muchas adecuaciones a ambientes con poca disponibilidad de oxígeno. Probablemente la forma más comprensible de hipoxia es también llamada difusión limitada de hipoxia que encontramos cuando las células se encuentran a grandes distancias de los vasos sanguíneos que abastecen del oxígeno necesario para llevar a cabo un óptimo metabolismo oxidativo a las células cercanas, en consecuencia el oxígeno que logra llegar a estas células es mínimo.

Las células normales, es decir que no se encuentran en tejidos malignos están también expuestas a distintas cantidades de oxígeno dependiendo de su cercanía a irrigación sanguínea. La evolución ha permitido la existencia de un efecto Pasteur en función de la presencia local de oxígeno acelerando el flujo glucolítico cuando la tasa de fosforilación oxidativa disminuye y viceversa (Porporato, 2011 y Said, 2009).

En tumores nacientes las células tumorales que se encuentran a grandes distancias del gradiente de oxígeno tienen dos posibles caminos: muerte o adaptación metabólica. La muerte por hipoxia es lo más común en este tipo de células sin embargo, algunas de ellas logran tomar el otro camino (Porporato, 2011).

Aunque esta adaptación metabólica es precedida de la inhibición del efecto Pasteur, la producción de suficiente ATP para sostener a la célula tumoral requiere fuertes adaptaciones que aceleren el flujo glucolítico. Un elemento clave en estas adaptaciones es el factor inducible por hipoxia (HIF-1), un heterodímero conformado por las subunidades α y β . La subunidad HIF-1 α es una proteína constitutiva nuclear, mientras que la subunidad HIF-1 β es inducible por hipoxia (Figura 9) (Porporato, 2011; Alexios-Fotios y Kararizou 2010; Said, 2009).

Ambas proteínas se transcriben de manera constitutiva pero solo la subunidad HIF-1 β es establemente expresada dentro del núcleo. La actividad de HIF-1 depende de la estabilidad de la subunidad HIF-1 α (Muñoz-Pinedo y colaboradores, 2012). En condiciones normales o de normoxia HIF-1 α es hidroxilada y luego ubiquitinada para su posterior degradación en el proteosoma. Evidentemente el oxígeno es el sustrato de la reacción de hidroxilación, cuando no está presente, es decir en hipoxia, HIF-1 α migra al núcleo y ahí se une a HIF-1 β en el elemento de respuesta a hipoxia (HRE) de regiones promotoras de genes blanco como

promotores de glucólisis, angiogénesis, etc (Porporato, 2011; Alexios-Fotios y Kararizou, 2010).

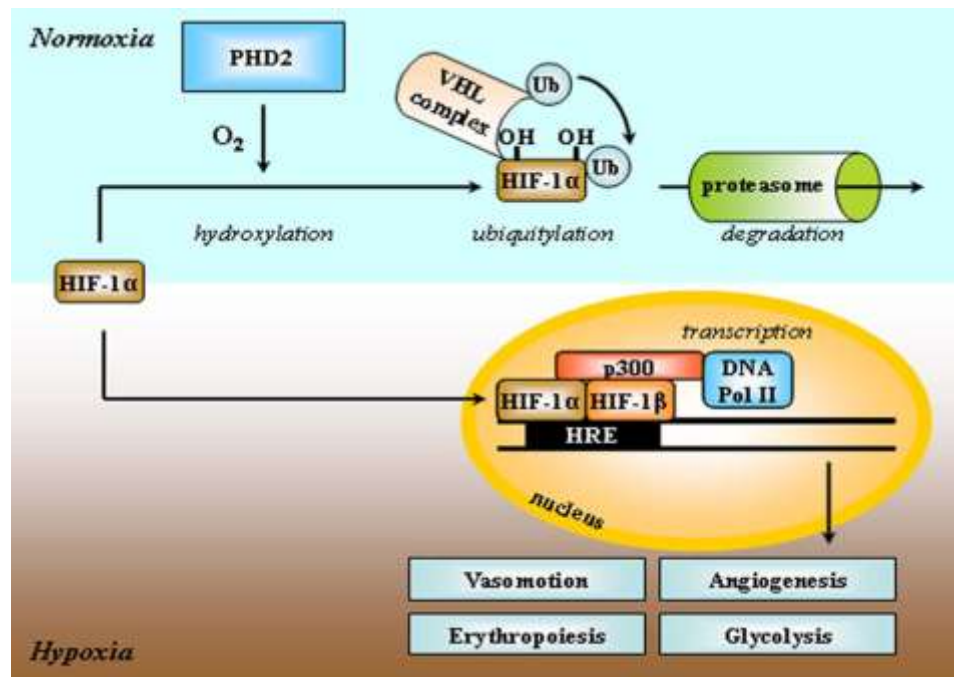


Figura 9. Modelo de la transcripción de HIF. Las dos subunidades se transcriben de manera constitutiva pero sólo en condiciones de hipoxia se unen al HRE de regiones promotoras de genes blanco claves. Tomado de Porporato, 2011.

En este sentido genes blanco de esta ruta estarían determinando el comportamiento de distintas regiones tumorales, es decir hipóxicas y normóxicas. Se ha dicho que existe un gradiente de hipoxia cuyos niveles dependen de la cercanía a regiones oxigenadas, también se ha dicho que las células que se encuentran en hipoxia pueden morir o modificar su metabolismo mediante proteínas y complejos proteicos como HIF-1 que coadyuvará en la expresión de genes que permitirán a la célula que no muera, más aún que se inmortalice.

Pero la complejidad radica en cómo la célula logra sobrevivir en un ambiente carente del oxígeno necesario para llevar a cabo el proceso de respiración celular y es que esta por sí misma es incapaz de lograrlo, por lo tanto requiere establecer una simbiosis con células aledañas que si estén siendo abastecidas de oxígeno (Alexios-Fotios y Kararizou, 2010).

Existe la propuesta de una simbiosis metabólica que abastece de lo necesario a las células tumorales hipóxicas. La simbiosis está basada en el intercambio de lactato; las células hipóxicas producen mediante el proceso de glucólisis lactato y las células normóxicas lo consumen (Porporato, 2011).

Esta simbiosis se puede explicar a partir de la actividad de HIF-1(Figura 10), cuando las subunidades HIF-1 α y HIF-1 β se unen al HRE de genes como ya se ha dicho participantes en los procesos tumorales como transportadores de glucosa la célula hipóxica puede responder de manera distinta a las carencias de oxígeno en el medio, entonces las células hipóxicas son capaces de sobreexpresar GLUT1 y GLUT3 que permiten una mayor incorporación de glucosa de la célula hipóxica en relación a la célula normóxica; esta glucosa será metabolizada en el proceso de glucólisis con lo que se incrementará la tasa glucolítica pero como explica el efecto Pasteur la glucosa producirá grandes cantidades de lactato pero no de ATP, pues no se llevó a cabo el proceso de fosforilación oxidativa. Posteriormente este lactato será sacado de la célula hipóxica por transportadores como MCT4 y después incorporado a la célula normóxica por MCT1. Una vez dentro el lactato será convertido a piruvato por acción inversa de la enzima LDH1 y así este se pueda incorporar al ciclo de Krebs en el proceso de respiración celular lográndose una sobreproducción de ATP de la célula normóxica (Porporato, 2011).

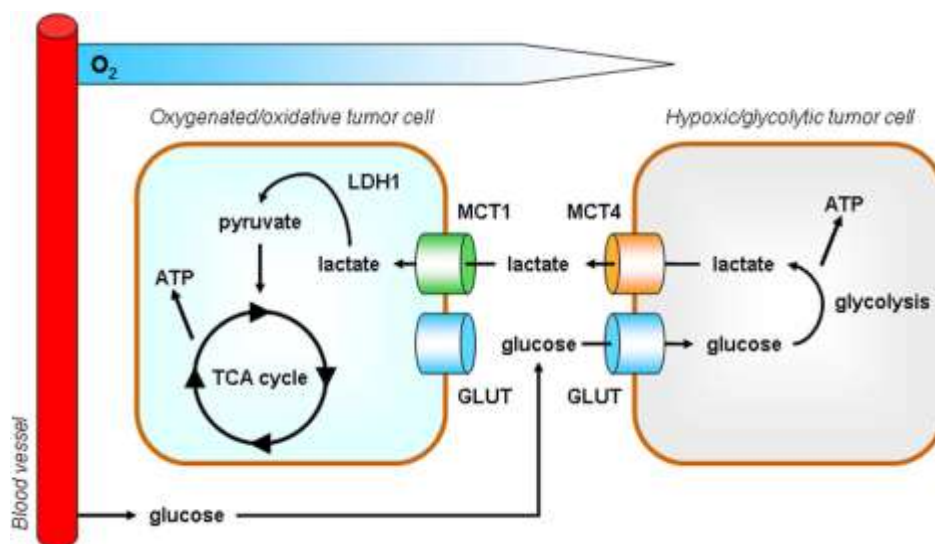


Figura 10. Simbiosis metabólica entre células tumorales del tejido hipóxico y células tumorales del tejido normóxico. Tomado de Porporato, 2011

1.2.3 Marcadores de metabolismo

En los últimos años se han llevado a cabo estudios de la disminución en la expresión de la subunidad β de la F1 ATPasa que aunada a otros marcadores como GAPDH y Hsp60, se ha demostrado funcionan como indicadores del comportamiento bioenergético de la mitocondria que resulta diferencial en celular sanas y células tumorales de distintos tipos de neoplasias como carcinoma colorectal (Sánchez-Aragó y Cuezva, 2011) gástrico, de esófago, próstata (Isidoro y colaboradores, 2004), de colon (Willers y colaboradores, 2010) mama, pulmón, (Isidoro y colaboradores, 2004; Willers y colaboradores, 2010) hígado y riñón (Cuezva, 2005); únicamente en cáncer de próstata no se han observado cambios significativos en la expresión de β -F1 ATPasa en relación a células sanas (Isidoro y colaboradores, 2004).

1.2.4 Estudio de los niveles de proteína como marcadores en cáncer

Sin embargo resulta importante enfatizar las diferencias en la expresión de la subunidad β -F1 ATPasa a nivel de proteína y de mensajero, Willers y colaboradores en 2010 realizaron algunos ensayos para comparar ambos perfiles de expresión por medio de Western blot y RT-PCR.

Ellos encontraron un decremento en la expresión de la proteína β -F1 ATPasa y un aumento en la GAPDH en varios carcinomas (Figura 11), es decir, una correlación inversa entre estos dos marcadores en adenocarcinomas de mama, colon y pulmón en comparación con tejido normal de los mismos pacientes. En contraste, al hacer el análisis de expresión a nivel mRNA encontraron que la expresión de la β -F1 ATPasa varió significativamente dependiendo del tejido analizado. La expresión en adenocarcinomas de mama y pulmón no presentó diferencias importantes con respecto al tejido normal, mientras que en adenocarcinoma de colon y carcinoma escamoso de pulmón se vio muy incrementada. Estos hallazgos sugirieron a los autores el silenciamiento traduccional del mRNA como se documentó previamente en hepatocitos de rata (Willers y Cuezva, 2011).

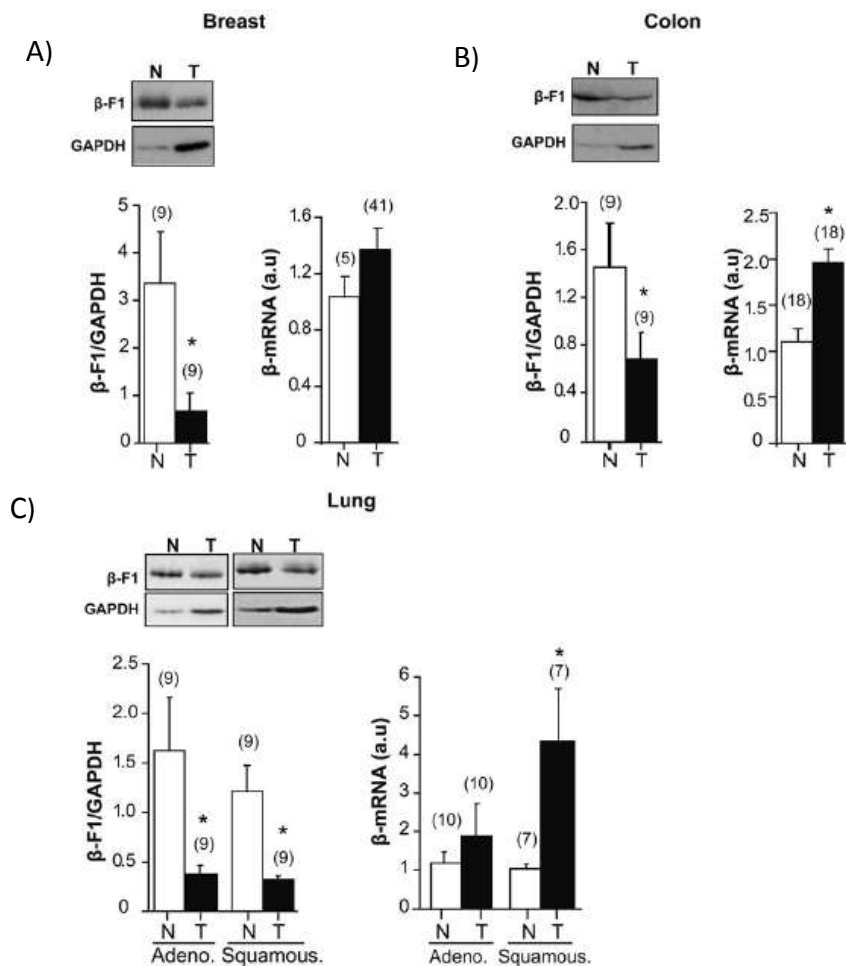


Figura 11. Expresión de β -F1 ATPasa y β -mRNA en tumores y tejido normal. La huella bioenergética (β -F1 ATPasa /GAPDH) (grafico de la izquierda) fué determinada por Western blot en adenocarcinomas humanos de mama (A), colon (B) y adenocarcinomas y carcinomas escamosos de pulmón (C). La expresión de β -mRNA (grafico de la derecha) se realizó por RT-PCR. El número de pacientes se muestra entre paréntesis. * $P < 0.05$

1.2.5 El índice bioenergético celular

Como se ha mencionado, los trabajos que abordan el metabolismo celular han venido cobrando importancia en los últimos años, resultado de esto, y como una manera cuantificable de manejar estos aspectos, se ha generado el Índice Bioenergético Celular (BEC) (Willers y Cuezva, 2011), que no es más que la relación de β F1ATPasa y Gapdh, normalizando con la cantidad de proteína mitocondrial Hsp60 para controlar la variación de

β F1ATPasa por el número de mitocondrias presentes en cada célula, fue así como este grupo de investigación propone el índice β F1ATPasa/Hsp60/Gapdh para cuantificar y monitorear el metabolismo celular aplicado a tejidos tumorales tomando relevancia en el área de cáncer en donde ha sido aplicado a diversos tipos de tejidos y diversos tipos de carcinomas (Domínguez-Ramírez y Tuena de Gómez-Puyou, 2003).

En este contexto la neoplasia cervical intraepitelial (NIC) define a un crecimiento anormal y pre-canceroso de las células escamosas en el cérvix. La mayoría de los casos de NIC permanecen estables o son eliminados por el sistema inmune del individuo sin intervención médica. Sin embargo un pequeño porcentaje de casos progresa a cáncer cervical.

2. JUSTIFICACIÓN

La célula cervical neoplásica puede tener un fenotipo metabólico alterado regulado por el estado energético celular. La subunidad β -F1 ATPasa, GAPDH y Hsp60 son componentes esenciales en el metabolismo energético celular y cuya expresión está muy regulada por el estado energético celular en otras neoplasias, por lo que resulta importante evaluar cómo se expresa en neoplasias intraepiteliales cervicales de bajo grado, alto grado y carcinoma invasor.

3. HIPÓTESIS

La célula cervical neoplásica puede manifestar un fenotipo metabólico alterado determinado por el estado energético celular, por lo que la regulación de la obtención de energía puede reflejarse como cambios en la expresión de la subunidad β -F1 ATPasa, GAPDH y Hsp60 con respecto al tejido normal.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar el fenotipo bioenergético y los niveles proteicos de la subunidad β -F1 ATPasa, GAPDH y Hsp60 en neoplasias intraepiteliales cervicales de bajo grado, alto grado y carcinoma invasor.

4.2 Objetivos particulares

1. Analizar los niveles de las proteínas β -F1-ATPasa, GAPDH y Hsp60 en células en tejido cervical normal, en NICs de bajo y alto grado y en carcinoma invasor.
2. Determinar si existe correlación entre el Índice Bioenergético y la fase neoplásica.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

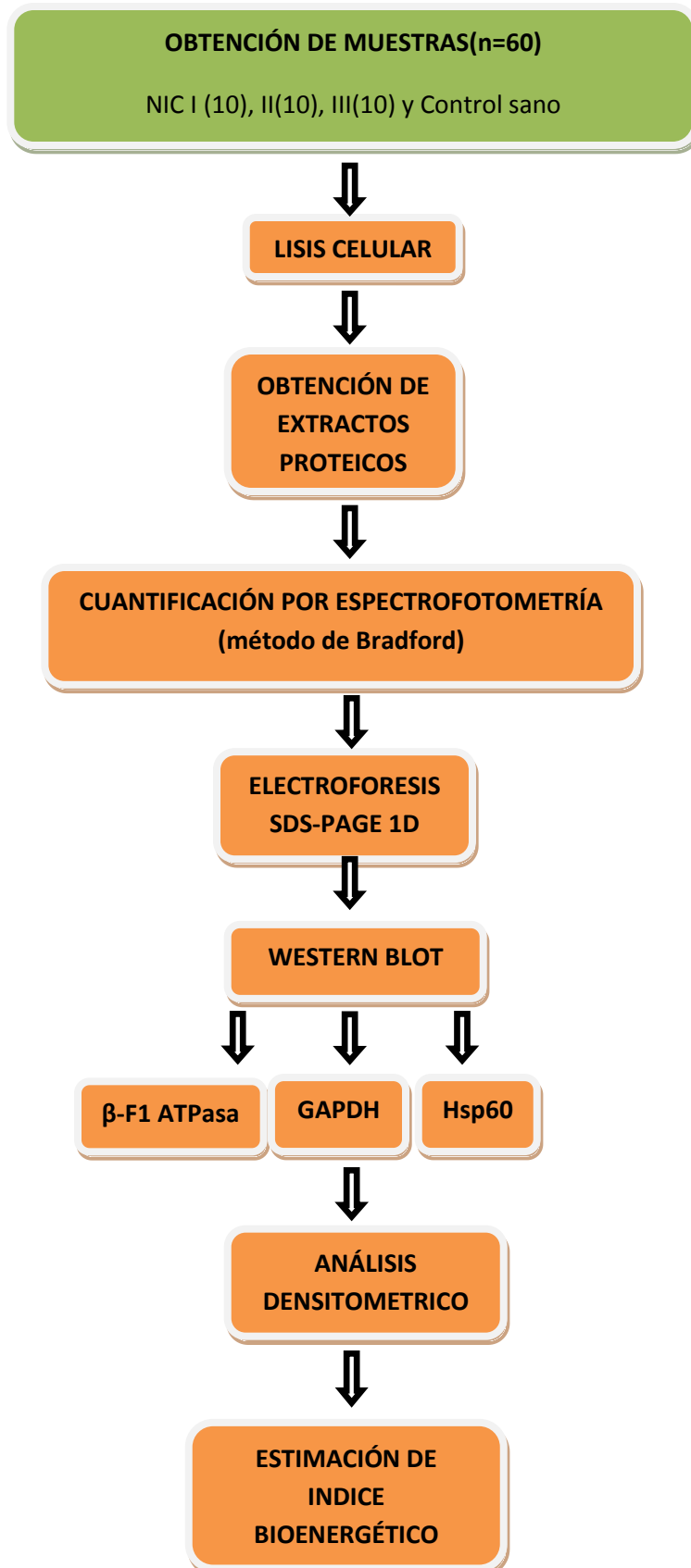
Las biopsias cervicales fueron tomadas a pacientes de 16 a 60 años en el Centro Médico Nacional La Raza de la Ciudad de México. Se realizaron dos tomas de tejido, una en la parte de la lesión cervical intraepitelial y la otra en una región sana del cérvix de la misma paciente. Estas muestras serán clasificadas histológicamente de acuerdo al grado de NIC que presente cada paciente (NIC de bajo grado, NIC de alto grado, Carcinoma invasor o Sano). Se tomó registro de datos epidemiológicos.

A todas las muestras de tejido cervical se les realizó una lisis celular para romper las células con el fin de facilitar la obtención de extractos proteicosl.

La cuantificación de extractos proteicos se hizo por el método de Bradford.

Una vez estimada la concentración de extractos proteicos, la integridad se evaluó mediante la técnica de electroforesis en gel SDS de poliacrilamida.

Tras confirmar la integridad de los extractos proteicos mediante electroforesis, por medio de la técnica de Western blot., en una muestra representativa de biopsias se analizaron los niveles de las proteínas β -F1 ATPasa, Gapdh, Hsp60 y actina, esta última como proteína constitutiva. Dichos niveles proteicos se cuantificaron por densitometría y se normalizaron contra el valor de la actina, posteriormente se calculó el Índice Bioenergético β -F1 ATPasa/Hsp60.



6. METODOLOGÍA

6.1 Cultivo celular

Se cultivaron células HeLa para utilizarlas en la estandarización de los procedimientos y como control positivo de carcinoma invasor. Las células fueron cultivadas en medio de cultivo celular Dulbecco's Modified Eagle Medium con cambios de medio cada 48 horas durante una semana antes de ser cosechadas.

La línea celular HeLa fue immortalizada a partir de tejido cervical canceroso de una mujer estadounidense infectada con el virus del papiloma tipo 18 (VPH 18) y que murió de cáncer de cérvix en 1951.

6.2 Obtención de muestras

Las muestras procesadas fueron biopsias cervicales tomadas a 30 pacientes del Centro Médico Nacional La Raza de la Ciudad de México. Se tomaron dos biopsias por paciente, una en la región donde se localiza la lesión y otra en una región del cérvix de la misma paciente que no presente lesión alguna. Las muestras de lesión fueron clasificadas en el hospital por histología en NIC de bajo grado, NIC de alto grado y Carcinoma Invasor considerando la proporción del espesor epitelial que presenta células maduras diferenciadas. Del total de las muestras obtenidas solo se incluyeron 6 pacientes del grupo con NIC de bajo grado, 5 pacientes del grupo con NIC de alto grado y 6 pacientes del grupo con carcinoma invasor.

Todas las biopsias fueron colocadas en medio Tissue Tek de Sakura Finetek, Inc. a -80°C para ser criopreservadas. Se tomó registro de datos epidemiológicos como: historia

familiar, historia clínica, edad, último estudio realizado, sin o con histerectomía, presencia de miomatosis uterina, hábitos, etc. Ver anexo 1

6.3 Obtención de extractos proteicos

Para la obtención de extractos proteicos totales las biopsias fueron retiradas del Tissue Tek asegurando eliminar los residuos del medio en el que están embebidas (Tissue Tek de Sakura Finetek), posteriormente se incubaron con buffer de lisis TNTE frío (50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 1 mM EDTA) más una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete Protease Inhibitor Cocktail de Roche) para ser homogenizadas con el equipo Tissue Ruptor de QiaGen.

La mezcla fue agitada durante 15 minutos a 4°C. Después se centrifugó durante 15 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante.

Para obtener los extractos, se centrifugaron las células a 1200 rpm durante 5 min y se eliminó el sobrenadante. Después se resuspendió la pastilla recuperada en 1 ml de PBS y se pasó a un tubo de 1.5 ml.

Cabe mencionar que todos los procedimientos fueron realizados previamente con células HeLa para estandarizar condiciones (Figura 13).

6.4 Cuantificación de extractos proteicos

La concentración de extractos proteicos se determinó por el método de Bradford (Bradford 1976). La curva patrón se construyó utilizando una solución de BSA (suero de albumina bovina) a una concentración de 120 µg/µl. Posteriormente las muestras fueron leídas con un lector de placas de ELISA a una longitud de onda de 595 nm.

Se sustituyeron los valores de absorbancia de las muestras en la recta elaborada a partir de los valores de la curva estándar. Se utilizó la ecuación $y = m x + b$, donde “y” es la absorbancia de 595 nm, “m” es la pendiente, “x” es la concentración de proteínas y “b” es la ordenada al origen.

6.5 Electroforesis de proteínas SDS PAGE

La resolución de las proteínas se realizó por SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico). El gel de poliacrilamida con SDS se preparó a una concentración del 12% de acrilamida en gel separador y 5% en gel concentrador. El gel se corrió en una solución amortiguadora de Tris 0.25 M, glicina 1.92 M, 0.1% de SDS a pH 8.3, con un voltaje constante de 100 V durante 3 horas aproximadamente.

6.6 Western blot

Las proteínas separadas obtenidas del gel SDS-PAGE fueron transferidas a una membrana de PVDF. Los geles, membranas y papel Whatman se incubaron 15 minutos en solución de transferencia de proteínas (Tris 0.025 M, glicina 0.192 M y, 20% metanol) antes de llevar a cabo la misma.

Finalmente, se confirmó la transferencia de proteínas por tinción con rojo Ponceu de la membrana y por tinción con azul de coomassie del gel, una vez garantizada la transferencia se realizaron los ensayos de inmunodetección incubando la membrana en solución bloqueadora (5% de leche descremada en PBS Tween pH 7.4) durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se lavó la membrana con PBS-Tween por 10 minutos tres veces y se agregó el anticuerpo primario diluido en solución bloqueadora (Tabla 1) para dejarlo incubando durante toda la noche a 4°C en agitación.

Las membranas se lavaron tres veces en PBS Tween y se añadió el anticuerpo secundario (Tabla 2) acoplado a peroxidasa diluido en PBS Tween incubándolo durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación.

PROTEÍNA	PM	ANTICUERPO PRIMARIO	CARACTERÍSTICAS	ANTICUERPO SECUNDARIO
β-F1 ATPasa	51 kDa	ATP5B (H-300): sc-33618 Santa Cruz Dilución 1:1000	Del aa 230-529 del C-terminal, policlonal de conejo, origen humano	anti-rabbit IgG-HRP: sc-2005 Santa Cruz Dilución 1:20000
GADPH	37 kDa	GAPDH (L-18): sc-48167 Santa Cruz Dilución 1:1000	Producido cerca del N terminal de un péptido, policlonal de cabra, de origen humano	anti-goat IgG-HRP: sc-2020 Santa Cruz Dilución 1:25000
Hsp60	61 kDa	HSP 60 (B-9): sc-271215 Santa Cruz Dilución 1:1000	Del aa 274-573 monoclonal de ratón, de origen humano	anti-mouse IgG-HRP: sc-2004 Santa Cruz Dilución 1: 30000
β-actina	42 kDa	β-actina (H-300) sc-130301 Santa Cruz Dilución 1:1000	Origen humano	anti-mouse IgG-HRP: sc-2004 Santa Cruz Dilución 1:25000

Tabla 2. Características de los anticuerpos utilizados en la inmunodetección por Western blot.

Finalmente las membranas se lavaron tres veces con PBS Tween y se revelaron por quimioluminiscencia incubando durante 1 minuto con el reactivo Pierce ECL. Para visualizar las proteínas, las membranas fueron expuestas a placas autoradiográficas y la señal se evidenció al revelar la placa con solución reveladora y fijadora de Kodak.

6.7 Análisis densitométrico y estadístico

El análisis densitométrico se llevó a cabo utilizando el programa UN-SCAN IT v.6.1 (Silk Scientific). La densitometría final se obtuvo descontando la señal obtenida para los fondos y normalizando con la proteína constitutiva actina.

La significancia estadística de los cambios en los niveles de proteínas entre los tejidos de biopsias de región sana y de lesión para cada grupo de pacientes se determinó a través de una t de Student para muestras pareadas.

7. RESULTADOS

7.1 Toma de muestras

Se colectaron 60 biopsias de 30 pacientes con lesión cervical (Figura 12), estas lesiones fueron evaluadas y las biopsias clasificadas en NIC de bajo grado, NIC de alto grado y Carcinoma invasor, de cada grupo se colectaron 10 biopsias de la región de la lesión y 10 de una región sana de la misma paciente.

Las biopsias se almacenaron a -80°C embebidas en el criopreservador Tissue Tek.

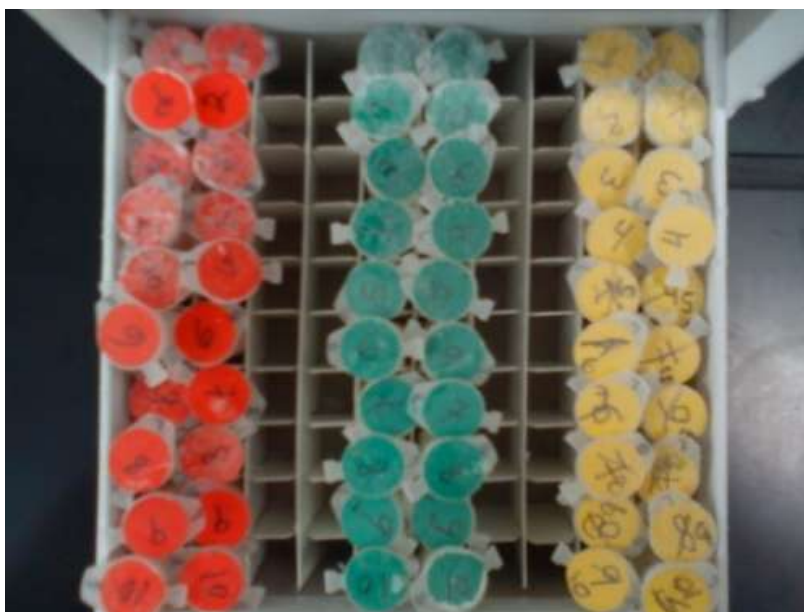


Figura 12. Clasificación de las muestras. Las muestras se clasificaron por grado de NIC de acuerdo al siguiente código de colores: Amarillo = NIC bajo grado, Verde = NIC alto grado y Rojo = Carcinoma invasor y se almacenaron a -80°C

7.2 Cultivo celular

Se cultivaron células HeLa para llevar a cabo la estandarización de todos los procedimientos (Figura 13).

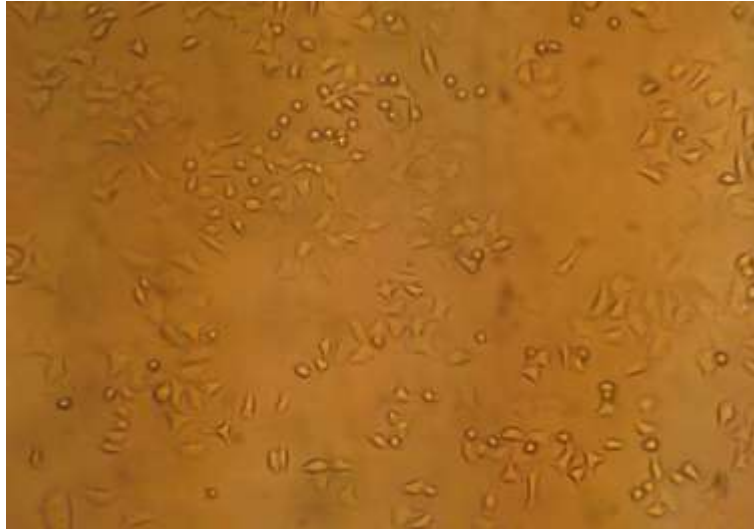


Figura 13. Cultivo de células HeLa. Tomada con Microscopio de campo claro. Iroscope SI-PH 4X.

7.3 Extracción de proteínas e integridad de los extractos

Se realizó la extracción de proteínas primero en células HeLa y una vez estandarizado el procedimiento se llevó a cabo en una mitad de las biopsias cervicales (Figura 14) dejando la otra mitad para la extracción de ácidos nucleicos. La lisis celular fue llevada a cabo en buffer TNTE, tal y como se describe en la metodología.

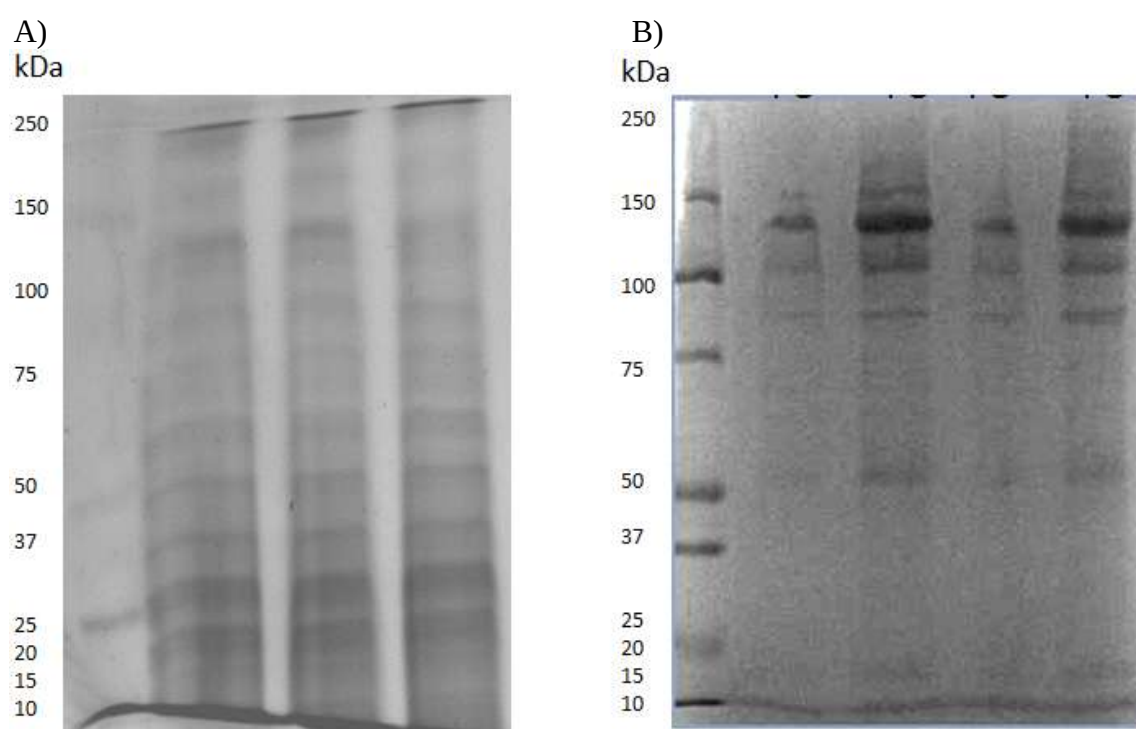


Figura 14. Extractos proteicos para probar integridad. A) Extractos de células HeLa. carril 1: marcador de peso molecular, carril 2, 3 y 4: 40 µg de extracto de células HeLa. B) Extracto de biopsias cervicales. carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: 6 µg de extracto de la muestra 2sc carril 3: 18 µg de extracto de la muestra 2sc, carril 4: 6 µg de extracto de la muestra 2lc carril 5: 18 µg de extracto de la muestra 2lc.

7.4 Niveles de proteína en NIC de bajo grado

La expresión de proteínas en las muestras pertenecientes a pacientes que presentaron NIC de bajo grado no presentó cambios estadísticamente significativos entre regiones de lesión y regiones aparentemente sanas (Figura 15).

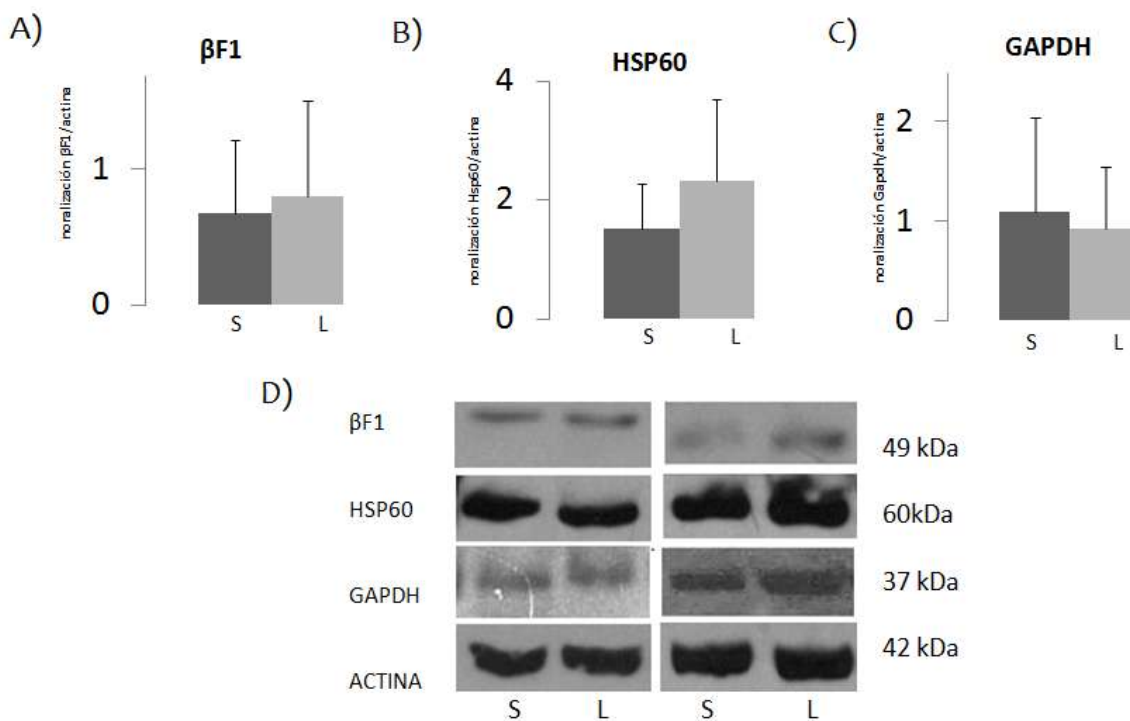


Figura 15. Niveles de expresión de proteínas en el grupo de pacientes con NIC de bajo grado. A) Expresión de la subunidad β F1 ATPasa normalizada con actina en biopsias de pacientes con NIC de bajo grado, la S corresponde a la región sana de las pacientes mientras que la L corresponde a las región de lesión. En el eje de las Y la expresión normalizada en unidades arbitrarias B) Expresión de la proteína Hsp60 normalizada con actina en biopsias de pacientes con NIC de bajo grado C) Expresión de la proteína Gapdh normalizada con actina en biopsias de pacientes con NIC de bajo grado D) Western blot representativo de las biopsias de pacientes con NIC de bajo grado.

7.5 Niveles de proteína en NIC de alto grado

En el análisis de expresión de proteínas correspondientes a pacientes con NIC de alto grado reveló diferencias estadísticamente no significativas respecto a la región control sana, sin embargo fue notable la tendencia de la subunidad β F1 de la ATPasa a la disminución en la región de lesión (Figura 16).

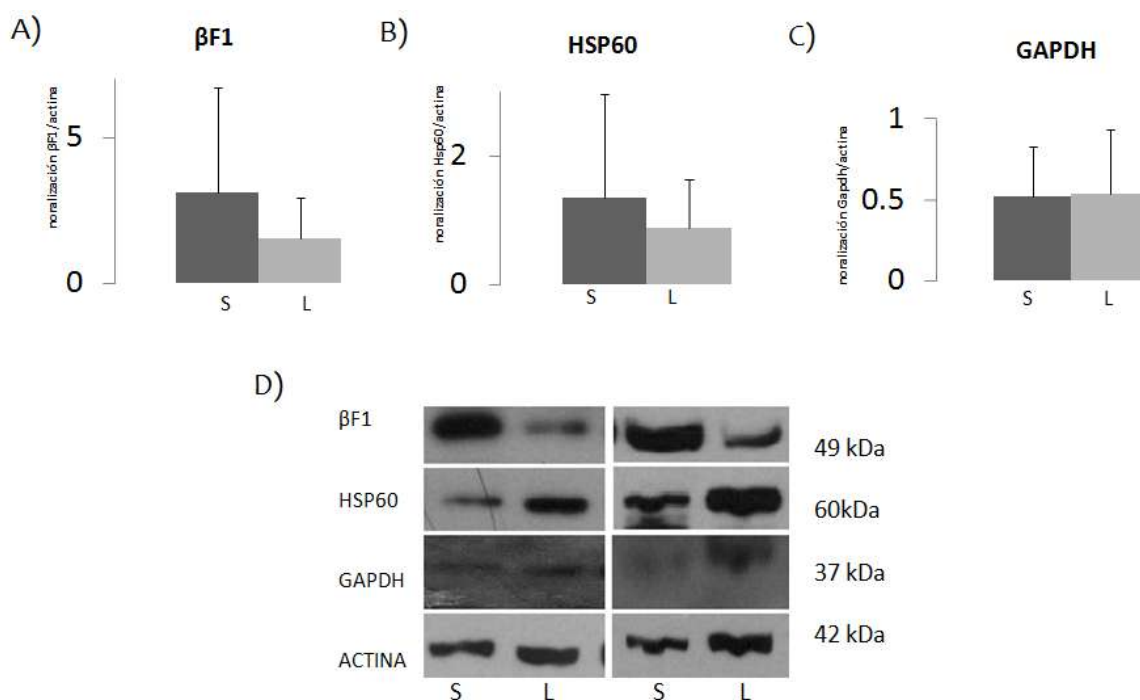


Figura 16. Niveles de expresión de proteínas en el grupo de pacientes con NIC de alto grado A) Expresión de la subunidad β F1 ATPasa normalizada con actina en biopsias de pacientes con NIC de alto grado, la S corresponde a la región sana de las pacientes mientras que la L corresponde a las región de lesión. En el eje de las Y la expresión normalizada en unidades arbitrarias B) Expresión de la proteína Hsp60 normalizada con actina en biopsias de pacientes con NIC de alto grado C) Expresión de la proteína Gapdh normalizada con actina en biopsias de pacientes con NIC de alto grado D) Western blot representativo de las biopsias de pacientes con NIC de alto grado.

7.6 Niveles de proteína en carcinoma invasor

Los resultados de la expresión proteica en las biopsias de pacientes con carcinoma invasor difieren de los observados en las lesiones pre-invasoras. En este grupo sí se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas (indicadas con asterisco) entre las regiones sanas del cérvix de las pacientes y las regiones de lesión, con excepción de la expresión de la proteína Hsp60 que no mostró cambios significativos entre ambas regiones. La subunidad β F1 de la ATPasa disminuyó sus niveles en las biopsias correspondientes a la región de lesión, mientras que para Gapdh se evidenció un incremento significativo en la región de lesión (Figura 17).

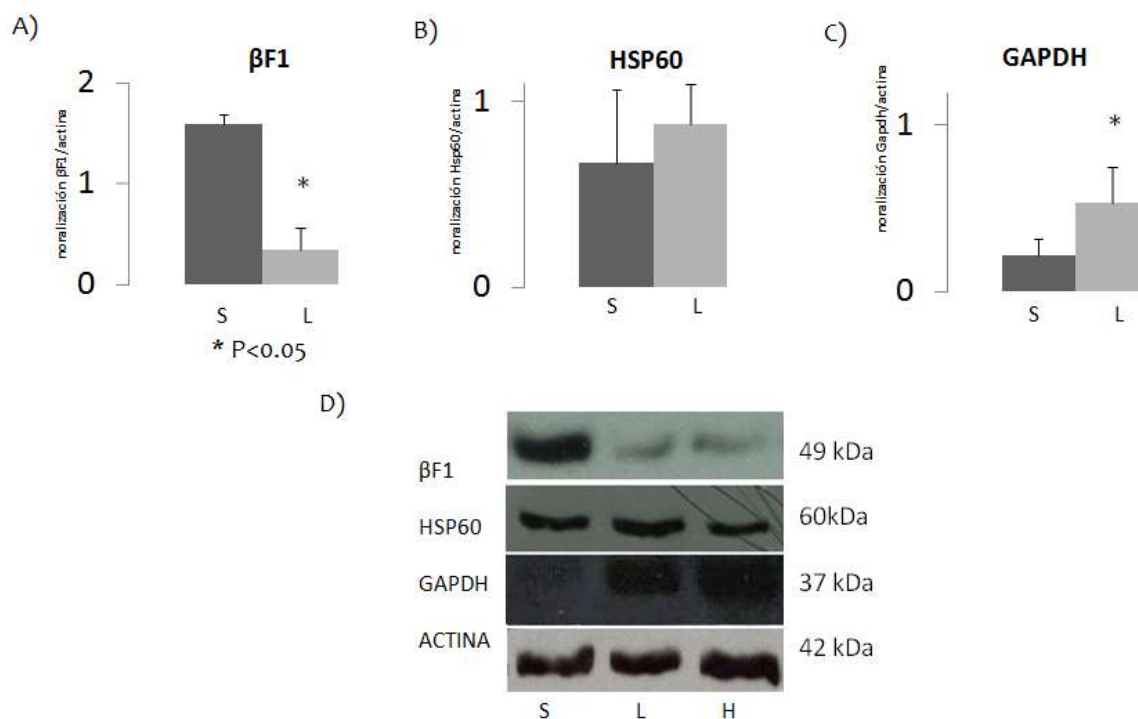


Figura 17. Niveles de expresión de proteínas en el grupo de pacientes con carcinoma invasor A) Expresión de la subunidad β F1 ATPasa normalizada con actina en biopsias de pacientes con carcinoma invasor, la S corresponde a la región sana de las pacientes, la L corresponde a las región de lesión y la H corresponde al extracto de células HeLa que fue incluido en esta imagen porque es lo más cercano a las biopsias con carcinoma invasor. En el eje de las Y la expresión normalizada en unidades arbitrarias B) Expresión de la proteína Hsp60 normalizada con actina en biopsias de pacientes con carcinoma invasor C) Expresión de la proteína Gapdh normalizada con actina en biopsias de pacientes con carcinoma invasor D) Western blot representativo de las biopsias de pacientes con carcinoma invasor.

7.7 Cálculo del Índice Bioenergético

Con la estimación de la expresión de las proteínas β F1 ATPasa, Hsp60 y Gapdh se calculó en Índice Bioenergético (β F1ATPasa/Hsp60/Gapdh) para cada uno de los grupos de pacientes incluidos en este estudio. Una vez más los resultados mostraron que no existen diferencias significativas entre el Índice Bioenergético de las regiones sanas y de las regiones de lesión de las pacientes con lesiones pre-invasoras, no obstante se vuelven a observar diferencias significativas en el grupo de carcinoma invasor. Además de ello, es notable la tendencia al incremento del índice de las regiones sanas conforme se extiende el grado de lesión a cáncer invasor (Figura 18).

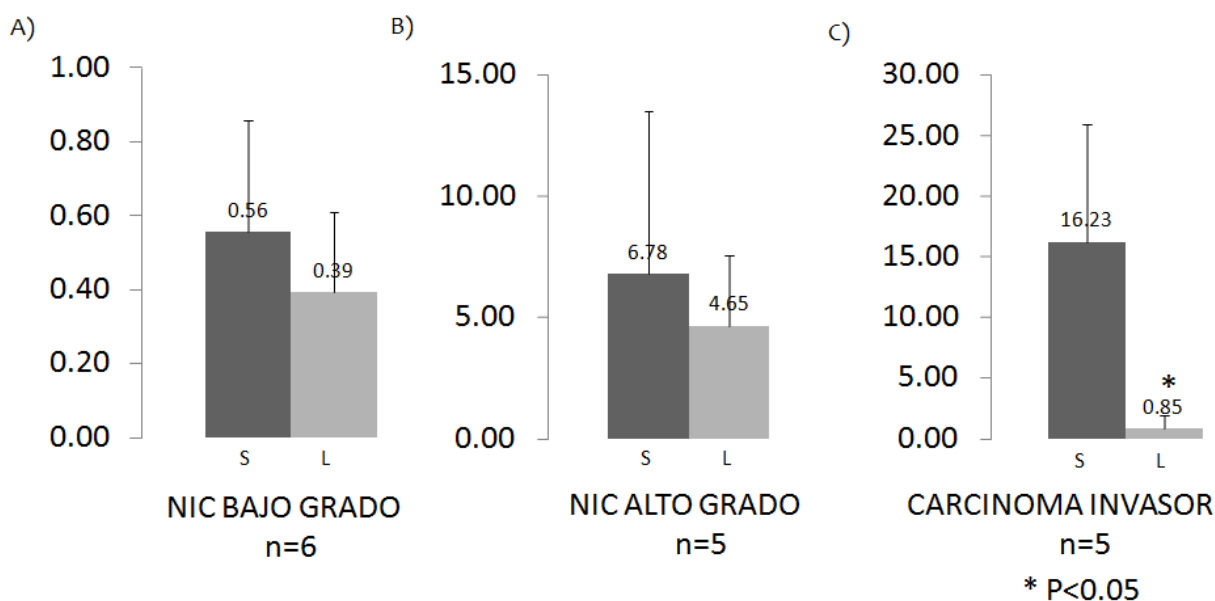


Figura 18 Estimación del índice bioenergético (β F1ATPasa/Hsp60/Gapdh). A) Comparación de los índices de la región sana S y la región de lesión L en pacientes con NIC de bajo grado. B) Comparación de los índices de la región sana y la región de lesión en pacientes con NIC de alto grado. C) Comparación de los índices de la región sana y la región de lesión en pacientes con carcinoma invasor.

7.8 Cambios en los niveles de proteína para cada fase neoplásica

Se observaron algunas diferencias importantes en los niveles de las proteínas estudiadas de las neoplasias (L=lesión) con relación a su muestra control (S=sana). El cálculo del Índice Bioenergético resalta (Figura 18) esas diferencias que son significativas como se muestra en las figuras 16 y 17 en los casos de β F1ATPasa y Gapdh para el grupo de carcinoma invasor y consecuentemente en el Índice Bioenergético calculado para el mismo grupo (Tabla 3).

Tipo Paciente	Biopsia	n	Hsp60	Hsp60 Desv. Est	βF1ATPasa	βF1ATPasa Desv. Est.	Gapdh	Gapdh Desv. Est	Índice Boienergético
NIC BG	S	6	1.5110	0.7509	0.6737	0.5435	1.0941	0.9471	0.5572
NIC BG	L	6	2.3165	1.3705	0.8010	0.7153	0.9313	0.6256	0.3930
NIC AG	S	5	1.3637	1.6075	3.1015	3.5821	0.5209	1.6075	6.7847
NIC AG	L	5	0.8911	0.7459	1.5273	1.3941	0.5361	0.7459	4.6509
CARC	S	6	0.6729	0.3905	1.5880	0.7726	0.2189	0.0980	16.2317
CARC	L	6	0.8761	0.2175	0.3408	0.4185	0.5324	0.2200	0.8466

Tabla 3. Niveles de proteína en biopsias cervicales evaluados por el número de pixeles arrojado por el análisis densitométrico. NIC=Neoplasia Intraepitelial Cervical CARC= carcinoma BG= bajo grado AG= alto grado S=biopsia tomada de la región sana L=biopsia tomada de la región de lesión. Desv. Est. = Desviación Estandar

8. DISCUSIÓN

Como ya fue descrito en la metodología, la extracción de proteínas se llevó a cabo utilizando buffer TNTE, sin embargo la cantidad a utilizar de dicha solución debe cuidarse, pues la dilución de las proteínas debe ser exacta y la misma desde la extracción a partir de los tejidos. Las muestras proteicas obtenidas en este trabajo no se pueden someter a técnicas de concentración de extractos, como la precipitación con TCA (ácido tricloroacético), pues después de ello resulta muy difícil resuspenderlas. Una vez logrado ésto fue posible visualizar los niveles de proteína por la técnica de Western blot, en la que se buscaron, con anticuerpos comerciales específicos, las proteínas Hsp60, Gapdh, β F1ATPasa y actina como control de carga.

Los niveles de las proteínas evaluadas variaron en las diferentes fases neoplásicas. En NIC de bajo grado, los niveles de las proteínas utilizadas como marcadores de metabolismo celular no presentaron cambios significativos, lo que sugiere que cuando la lesión comienza el metabolismo celular no se ve alterado aún, pues ni la glucólisis monitoreada con el marcador Gapdh, ni la tasa de fosforilación oxidativa evaluada con β F1ATPasa mostraron alteraciones en sus niveles comparado con los de la región sana de cada paciente. En las NIC de alto grado ocurrió una situación distinta, pero muy congruente con lo esperado; al igual que en bajo grado no se presentaron diferencias significativas en los niveles de proteína de las muestras de lesión en relación a las muestras control, no obstante, aunque estadísticamente no significativa, se evidenció una tendencia a la disminución de la fosforilación oxidativa, evaluada por el marcador β F1ATPasa, lo que podría sugerir la presencia del efecto Warburg en estas células neoplásicas. Cabe señalar que no ha sido

posible comparar estos resultados con otros reportes en la literatura, porque como ya se mencionó anteriormente, este trabajo es el primero en realizar un estudio de esta índole en etapas preinvasoras.

En cuanto al análisis de las biopsias con carcinoma invasor ocurrió algo muy interesante, las diferencias en los niveles de expresión se volvieron estadísticamente significativos para el marcador de glucólisis Gapdh y para el marcador de fosforilación oxidativa β F1ATPasa, lo que nos permite suponer que finalmente se establece el efecto Warburg en un mayor número de células de la lesión lo que concuerda con lo propuesto por varios autores (Isidoro y colaboradores, 2004, Isidoro y colaboradores, 2005; Willers y colaboradores, 2010, Willers y Cuezva, 2011). Retomando la explicación de la simbiosis que se presenta en tejidos tumorales (Porporato, 2011) se podría especular que en las biopsias con carcinoma invasor analizadas en este trabajo, las células en condiciones de hipoxia estarían más representadas que en etapas preinvasoras, y que éstas podrían estar sobreexpresando transportadores GLUT, facilitándose así la internalización de una mayor cantidad de glucosa que las células aledañas y por ende un incremento en el metabolismo glucolítico. Este fenómeno también se podría ver reflejado en una importante disminución en el proceso de fosforilación oxidativa, de tal modo que entonces se estaría presentando en este tipo de lesiones una simbiosis entre células hipóxicas y células normóxicas y que muy probablemente se comience a gestar en menor proporción en las NIC de alto grado, pero con una mayor número de células en condiciones de hipoxia en las lesiones de carcinoma invasor.

Para garantizar el óptimo análisis de las variaciones en los niveles de estos marcadores del metabolismo energético y la adecuada interpretación de los resultados, se calcularon los

Índices Bioenergéticos de las diferentes fases neoplásicas. En este análisis, al igual que en los anteriores, se confirmó la significancia estadística a través de un test de t-student pareado ($P < 0.05$) de este parámetro para pacientes con carcinoma invasor respecto a los controles sanos. Este índice permite entender con mayor claridad los cambios en el metabolismo celular, pues se obtiene del cociente de los niveles de $\beta F1$ ATPasa normalizados con Hsp60 y el nivel de Gapdh. Ésto cuantificó la relación entre la disminución de fosforilación oxidativa y el aumento de la tasa glucolítica, como lo proponen Willers y Cuezva para cáncer (Willers y Cuezva, 2011). Aunque ya se ha mencionado durante este trabajo, resulta importante subrayar que las muestras control obtenidas para este estudio fueron tomadas de una región del cévix aparentemente sana de la misma paciente a la que se le tomó la biopsia en la región de la lesión. En este sentido, existen trabajos que anteceden a éste en los que se hace de igual modo (Willers y colaboradores, 2010), pero también constan otros en los que las muestras control son tomadas de pacientes que no han padecido ninguna lesión (Isidoro y colaboradores, 2005). Nosotros elegimos el primer muestreo para minimizar las variaciones en los niveles de proteína inherentes a cada individuo, y poder monitorear los cambios relacionados al metabolismo propio de las células neoplásicas.

El análisis de la expresión de proteínas marcadoras del metabolismo energético celular en las diferentes muestras resulta realmente innovador, partiendo de que es la primera vez que se estudia la expresión de $\beta F1$ ATPasa, Hsp60 y Gapdh en lesiones cancerosas de cévix, pero es aún más novedoso el estudio de éstas en lesiones preinvasoras, como son las Lesiones Intraepiteliales Cervicales de bajo y alto grado. Este trabajo no sólo aporta avances substanciales en este campo, sino que promueve la realización de investigación de

esta naturaleza, en donde sea trascendental la identificación de lesiones preinvasoras que pudieran ser más o menos propensas a desarrollar cáncer de cérvix evitando así llegar a etapas de mayor severidad.

Un análisis más exhaustivo de los niveles de dichas proteínas y el cálculo del Índice Bioenergético podrían establecerse como una técnica para el diagnóstico de pacientes con lesiones cervicales, que pudieran presentar tendencias o diferencias estadísticamente significativas a alterar su fenotipo bioenergético y en algunos casos.

Lo primero que se obtuvo del cálculo del Índice Bioenergético coincide con lo reportado por Cuezva desde 2005 (Cuezva, 2005), quien analizó varios tejidos tumorales encontrando un comportamiento diferencial en cuanto a la existencia del efecto Warburg; es decir, el tejido cervical que presentó carcinoma invasor y que fue estudiado en este trabajo si mostró un fenotipo Warburg, ésto es un incremento en la tasa glucolítica y una disminución en fosforilación oxidativa significativos con respecto a la región sana.

Si bien se esperaba una disminución importante del Índice Bioenergético en lesiones de carcinoma invasor como ocurrió en este trabajo, también se esperaba observar tendencias similares en las lesiones preinvasoras, cosa que no ocurrió. Sin embargo, interesantemente, se observó una propensión a la alza en los Índices Bioenergéticos estimados para las muestras de regiones sanas de las pacientes, a medida que se iba aumentando el grado de severidad de la lesión diagnosticada. Una posible explicación a este hallazgo, podría adjudicarse a la simbiosis que presentan tejidos tumorales entre la región aparentemente sana y la región de la lesión. Es decir, la manera en la que se complementan bioenergéticamente ambas regiones impediría que la sección aparentemente sana muestre el

fenotipo metabólico normal esperado, lo cual se refleja en los valores diferentes de los índices bioenergéticos obtenidos de las distintas regiones sanas para los grupos de pacientes con distintos grados de lesión cervicales. Para poder comprender mejor este comportamiento pensemos en cómo las regiones que circundan la lesión se comprometen metabólicamente con esta lesión, reciclando el lactato producto de una alta tasa glucolítica para compensar la baja producción de ATP en el tejido hipóxico con una alta producción de ATP (más de lo que una región sana no comprometida tendría) en la región normóxica. Es de este modo como se explica la tendencia al incremento del Índice Bioenergético en las regiones aparentemente sanas en razón del grado de la lesión.

Este trabajo constituye el primer abordaje experimental del metabolismo bioenergético celular en cáncer cervical y sus lesiones intraepiteliales preinvasoras. Además, resulta de gran relevancia el estudio de los marcadores moleculares descritos no sólo en carcinomas cervicales, sino también y quizá con mayor interés en lesiones preinvasoras de células escamosas o Neoplasias Intraepiteliales Cervicales, como una manera de evaluar el fenotipo bioenergético ligado a la progresión a cáncer. Asimismo, nuestros hallazgos abren una serie de incógnitas que deberán ser enfocadas en futuros estudios, y a pesar de que, en la práctica, resulta bastante complicado, sería importante el poder aumentar el número de biopsias a examinar para cada grupo de estudio.

De igual modo, sería relevante el poder hacer análisis de correlación entre la fase neoplásica y datos epidemiológicos como pueden ser la edad, la historia familiar, el número de partos, abortos, entre otros aspectos recabados en la hoja de captación de datos (ver anexo 1). Por otro lado, la tipificación del virus del VPH podría de igual modo aportar aspectos interesantes para la mejor comprensión del comportamiento de las células

neoplásicas infectadas. También estudios relacionados con el Factor Inducible por Hipoxia (HIF), como la evaluación de los niveles de mensajero o de proteína serían de gran aporte en este contexto, pues ya hemos visto que la expresión o no de este factor constituye un sensor de hipoxia-normoxia en el metabolismo tumoral, respectivamente. Finalmente, el análisis cuantitativo de los niveles de RNAm de las proteínas estudiadas resulta un aspecto pendiente de ensayar, pues poco se ha hecho al respecto en tejidos tumorales, nada se sabe en el caso particular del cáncer de cérvix y mucho menos aún en sus etapas preinvasoras.

9. CONCLUSIONES

- No se evidenciaron cambios estadísticamente significativos en los niveles de las proteínas β F1 ATPasa, GAPDH y HSP60 entre la región sana y la lesión de pacientes con NIC de bajo grado y NIC de alto grado.
- Los niveles de la subunidad β F1 ATPasa disminuyeron significativamente en las lesiones del grupo de pacientes con carcinoma invasor de cérvix con respecto a su regiones sanas.
- Los niveles de GAPDH aumentaron significativamente en las lesiones del grupo de pacientes con carcinoma invasor de cérvix con respecto a sus regiones sanas.
- El “Índice Bioenergético o Huella Metabólica” no varió significativamente entre las regiones sanas y las lesiones de pacientes con NIC de bajo y alto grado.
- El “Índice Bioenergético o Huella Metabólica” disminuyó significativamente en las lesiones del grupo de pacientes con carcinoma invasor de cérvix con respecto a sus regiones sanas.
- Los resultados apuntan una tendencia hacia un incremento del “Índice Bioenergético” en las regiones sanas del grupo de pacientes con carcinoma invasor de cérvix con respecto a las regiones sanas de los grupos de pacientes con NIC de bajo y alto grado.
- Nuestros resultados apuntan una relación inversa coordinada entre la fosforilación oxidativa y la glucólisis en el grupo de pacientes con carcinoma invasor de cérvix, lo cual, por vez primera, definiría la existencia de un efecto Warburg en carcinoma invasor de cérvix.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acebo P., D. Giner., P. Calvo., A. Blanco-Rivero., A. Ortega., P. Fernández., G. Roncador., E. Fernández-Malavé., M. Chamorro y J. Cuezva. 2009. Cancer Abolishes the Tissue Type–Specific Differences in the Phenotype of Energetic Metabolism. *Translational Oncology*. 2 (3): 138-145

Alexios-Fotios M. y E. Kararizou. 2010. Metabolism and cáncer: an up-to-date review of a mutual connection. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. (11):1437-1444

Baak J., A. Kruse, S. Robboy, E. Janssen, B. van Diermen e I. Skaland. 2006. Dynamic behavioural interpretation of cervical intraepithelial neoplasia with molecular biomarkers. *Clinical Pathology*. 59: 1017-1028

Botella J. 1997. El útero: Fisiología y Patología. Díaz Santos. Madrid.p 221-290

Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254

Bravo-Cuellar A., P. Ortiz-Lazareno, J. Lerma-Díaz, J. Domínguez-Rodríguez, L. Jave-Suárez, A. Aguilar-Lemarroy, S. del Toro-Arreola, R. Celis-Carrillo, J. Sahagun_flores, J. García de Elba-García y G. Hernández-Flores. 2010. Sensitization of cervix cáncer cells to adriamycin by pentoxifylline induces an increase in apoptosis and decrease senescence. *Molecular Cancer*. 9:114

Carlson M., V. Iyer y E. Marcotte. 2007. Quantitative gene expression assessment identifies appropriate cell line models for individual cervical cancer pathways. *BMC Genomics*. 8:117

Cuezva J. 2005. Mecanismos moleculares y neuroendocrinos del balance energético: Patologías. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia, Monografía XVIII. Ana María Pascual-Leone Pascual. España. p 363-377

Domínguez-Ramírez L. y M. Tuena de Gómez-Puyou. 2003. Virtudes y pecados de una enzima: la F0F1 ATP sintasa. En: Mensaje Bioquímico Vol XXVII. Facultad de Medicina, UNAM.

Fagundes H., Pérez C., Grigsby P. y Lockett M. 1992. Distant metastases after irradiation alone in carcinoma of the uterine cervix. *Int.J. Radiant. Oncol. Biol. Phys.* 24 (2): 197-204

Flores Y., D. Bishai, A. Lorinez, K. Shah, E. Lazcano-Ponce, M. Hernández, V. Granados-García, R. Pérez y J. Salmerón. 2011. HPV testing for cervical cancer screening appears more cost-effective than Papanicolau cytology in Mexico. *Cancer Causes Control*. 22:261-272

GenBank. 2011. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>

Gravitt P. y R. Jamshidi 2005. Diagnosis and management of oncogenic cervical human papillomavirus infection. *Infect Dis Clin North Am*. 19: 439-458.

Gravitt P., M. Kovacic, R. Herrero, M. Schiffman, C. Bratti, y A. Hildesheim. 2007. High load for most high risk human papillomavirus genotypes is associated with prevalent cervical cancer precursors but only HPV16 load predicts the development of incident disease. *Int J Cancer*. 121: 2787-2793.

Hui C., Y. Jian-Xin, Y. Shou-Hua, D. Hui, Z. Rong-Wei y Z. Song. 2009. Overexpression of transketolase-like gene I is associated with cell proliferation in uterine cervix cancer. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. 28:43

Isidoro A., M. Martínez, P. Fernández. A. Ortega. G. Santamaría, M. Chamorro, J. Reed y J. Cuezva. 2004. Alteration of the bioenergetic phenotype of mitochondria is a hallmark of breast, gastric, lung and oesophageal cancer. *Biochemical Society*. 378: 17-20

Isidoro A., E. Casado, A. Redondo, P. Acebo, E. Espinosa, A. Alonso, P. Cejas, D. Hardisson, J. Fresno, C. Belda-Iniesta, M. González-Barón y J. Cuezva. 2005. Breast carcinomas fulfill the Warburg hypothesis and provide metabolic markers of cancer prognosis. *Carcinogenesis*. 26(12): 2095-2104

Jaramillo J. 1991. El Cáncer, Fundamentos de Oncología. Universidad de Costa Rica. Costa Rica. 239 pp

Lazcano A. 2005. Cáncer cervicouterino. Diagnóstico, prevención y control. Editorial Panamericana. Argentina. 359 pp

Magnusson P. y U. Gyllensten. 2000. Cervical cancer risk: is there a genetic component? *Mol Med Today* 2000, 6: 145-148.

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

Muñoz-Pinedo C., N. El Mjiyad y J. Ricci. 2012. Cancer metabolism: current perspectives and future directions. *Cell Death and Disease*. e248; doi:10.1038/cddis.2011.123

- Negrini B., M. Schiffman, R. Kurman, W. Barnes, L. Lannom, y K. Malley K. 1990. Oral contraceptive use, human papillomavirus infection, and risk of early cytological abnormalities of the cervix. *Cancer Res.* 50: 4670-4675.
- Pfaffl M. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research.* 29(9):2002-2007
- Porporato P., S. Dhup, R. Dadhich, T. Copetti y P. Sonveaux. 2011. Aticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: a comprehensive review. *Frontiers in pharmacology.* 2(49):1-18
- Ricart J., J. Izquierdo, C. Di Liegro y J. Cuezva. 2002. Assembly of the ribonucleoprotein complex containing the mRNA of the β -subunit of the mitochondrial H^+ ATP synthase requires the participation of two distal *cis*-acting elements and complex set of cellular *trans*-acting proteins. *Biochemical Journal.* 365:417-428
- Said. H., B. Polat, C. Hagemann, J. Anacker, M. Flentje y D. Vordermark. 2009. Absence of GAPDH regulation in tumor-cells of different origin under hypoxic conditions *in-vitro*. *BMC Research.* 2(8):1-9
- Sánchez-Aragó M. y J. Cuezva. 2011. The bioenergetic signature of isogenic colon cancer cells predicts the cell death response to treatment with 3-bromopyruvate, iodoacetate or 5-fluoracil. *Journal of Translational Medicine.* 9(19): 1-9
- Sarduy M. 2008. Neoplasia Intraepitelial Cervical. Preámbulo del cáncer cervicouterino. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología.* 34(2):1-9
- Saslow D., C. Runowicz, D. Solomon, A. Moscicki, R. Smith, H. Eyre y C. Cohen. 2011. American cancer society guideline for the early detection of cervical neoplasia and cancer. *A Cancer Journal for Clinicians.* 52(6):342-362
- Sellers J. y R. Sankaranarayanan. 2003. La colposcopia y el tratamiento de la neoplasia intraepitelial cervical. Organización Panamericana de la Salud. Washington. 134 pp
- Subhash A., D. Raghav, H. Singh y G.P.S. Raghava. 2011. CCDB: a curated database of genes involved in cervix cancer. *Nucleic Acids Research.* 39: 975-979
- UniProt. 2011. <http://www.uniprot.org/>
- Martínez-Diez M., G. Santamaría, A. Ortega y J. Cuezva. 2006. Biogenesis and Dynamics of Mitochondria during the Cell Cycle: Significance of 3'UTRs. *PLoS ONE.* 1(1)
- Velázquez-Márquez N., M. Paredes-Tello, H. Perez-Terron, G. Santos-Lopez, J. Reyes-Leyva y V. Vallejo-Ruiz. 2009. Prevalence of human papillomavirus genotypes in women from a rural region of Puebla, Mexico. *Int J Infect Dis.* 13: 690-695.

Warburg O., F. Wind y E. Negelein. 1927. The metabolism of tumors in the body. The Journal of General Physiology. 8(6): 519-530

Willers I. y J. Cuezva. 2011. Post-transcriptional regulation of the mitochondrial H⁺ATP synthase: A key regulator of the metabolic phenotype in cáncer. Biochimica et Biophysica Acta. 1807:543-551

Willers I., A. Isidoro, A. Ortega, P. Fernández y J. Cuezva. 2010. Selective inhibition of -F1-ATPase mRNA translation in human tumours. Biochemical Journal. 426:319-326

Woodman C., S. Collins, H. Winter, A. Bailey, J. Ellis, y P. Prior. 2001. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. Lancet. 357: 1831-1836.

11. ANEXOS

11.1 Hoja de captación de datos

La hoja de captación de datos fue construida considerando la información que se le pide a las pacientes del Centro Médico Nacional La Raza

HOJA DE CAPTACIÓN DE DATOS

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

“ESTUDIO DEL FENOTIPO BIOENERGÉTICO CELULAR EN NEOPLASIAS INTRAEPITELIALES CERVICALES DE BAJO GRADO, ALTO GRADO Y CARCINOMA INVASOR”

Datos personales

Nombre									
Edad		Control citológico previo	D	M	A	1era consulta	D	M	A
Diagnóstico			Registro						
Antecedentes de patología cervical					VIH				

Historia clínica

Antecedentes de cáncer propio	Si	No	Especifique		
Antecedentes de cáncer familiar	madre	Padre	hermanos	hijos	Otros
Primera menarca		Número embarazos		Número hijos	
Edad primera relación sexual		Número parejas sexuales		Uso anticoncep- tivos orales	
Partos		Abortos		Abuso de tabaco/ alcohol	

1.2 Cálculo de densitometría

Grade	Segment	Pixel Total	Pixel Total %	Segment Size	Segment Size %	Maximum Pixel	Average Pixel	- background	/actin	Sample	Protein
ALTO GRADO	4	242611	0.69	1632	0.68	241	148.66	148.66	3.06136738	2sa	βF1ATP asa
	5	205873	0.59	1632	0.68	214	126.15	126.15	2.61396602	2la	
	6	170212	0.49	1632	0.68	141	104.3	104.3	2.09774739	3sa	
	7	230391	0.66	1632	0.68	230	141.17	141.17	1.82531678	3la	
	8	252796	0.72	1632	0.68	245	154.9	154.9	2.95667112	4sa	
	9	244183	0.7	1632	0.68	240	149.62	149.62	2.06457845	4la	
	80	290600	0.83	1632	0.68	243	178.06	177.91	4.85827417	8sa	
	81	216512	0.62	1632	0.68	230	132.67	132.52	2.33063665	8la	
	82	224312	0.64	1632	0.68	232	137.45	137.3	8.59198999	9sa	
	83	240615	0.69	1632	0.68	233	147.44	147.29	3.61004902	9la	
	14	187920	0.54	1632	0.68	198	115.15	11.14	0.22940692	2sa	Hsp60
	15	196353	0.56	1632	0.68	221	120.31	16.3	0.33775383	2la	
	16	190574	0.54	1632	0.68	125	116.77	12.76	0.25663717	3sa	
	17	208854	0.6	1632	0.68	229	127.97	23.96	0.30980088	3la	
	18	185526	0.53	1632	0.68	146	113.68	9.67	0.18457721	4sa	
	19	222524	0.64	1632	0.68	242	136.35	32.34	0.44625362	4la	
	89	296659	0.85	1632	0.68	244	181.78	92.78	2.5335882	8sa	
	90	277060	0.79	1632	0.68	246	169.77	80.77	1.42050651	8la	
	91	239508	0.68	1632	0.68	241	146.76	57.76	3.61451815	9sa	
	92	274543	0.78	1632	0.68	242	168.22	79.22	1.94166667	9la	
	24	361314	1.03	1632	0.68	227	221.39	20.03	0.41247941	2sa	Gapdh
	25	356255	1.02	1632	0.68	230	218.29	16.93	0.35080812	2la	
	26	343302	0.98	1632	0.68	228	210.36	9	0.18101368	3sa	

	27	357349	1.02	1632	0.68	228	218.96	17.6	0.22756659	3la	
	28	356160	1.02	1632	0.68	224	218.24	16.88	0.32219889	4sa	
	29	350930	1	1632	0.68	226	215.03	13.67	0.18862978	4la	
	98	291844	0.83	1632	0.68	198	178.83	32.73	0.89377389	8sa	
	99	316211	0.9	1632	0.68	229	193.76	47.66	0.83819909	8la	
	100	259180	0.74	1632	0.68	182	158.81	12.71	0.79536921	9sa	
	101	310060	0.89	1632	0.68	227	189.99	43.89	1.07573529	9la	
	34	161528	0.46	1632	0.68	108	98.98	48.56		2sa	Actina
	35	161044	0.46	1632	0.68	112	98.68	48.26		2la	
	36	163425	0.47	1632	0.68	109	100.14	49.72		3sa	
	37	208510	0.6	1632	0.68	236	127.76	77.34		3la	
	38	167790	0.48	1632	0.68	112	102.81	52.39		4sa	
	39	200554	0.57	1632	0.68	241	122.89	72.47		4la	
	107	218651	0.62	1632	0.68	241	133.98	36.62		8sa	
	108	251680	0.72	1632	0.68	248	154.22	56.86		8la	
	109	184964	0.53	1632	0.68	201	113.34	15.98		9sa	
	110	225473	0.64	1632	0.68	234	138.16	40.8		9la	
BAJO GRADO	115	231455	0.66	1632	0.68	228	141.82	37.82	3.58823529	2sb	β F1ATP asa
	116	239068	0.68	1632	0.68	231	146.49	42.49	10.5696517	2lb	
	3	199160	0.53	1632	0.69	187	122.03	25.02	0.37709118	6sb	
	4	182871	0.49	1632	0.69	135	112.05	15.04	1.0773639	6lb	
	5	174358	0.46	1632	0.69	120	106.84	9.83	1.10822999	7sb	
	6	187804	0.5	1632	0.69	145	115.08	18.07	0.28059006	7lb	
	7	199472	0.53	1632	0.69	183	122.23	25.22	1.57428215	8sb	
	8	184140	0.49	1632	0.69	159	112.83	15.82	0.5672284	8lb	
	41	190939	0.51	1632	0.69	216	117	15.97	0.7913776	9sb	

42	178771	0.47	1632	0.69	156	109.54	8.51	3.12867647	9lb	
43	172266	0.46	1632	0.69	111	105.56	4.53	0.27371601	10sb	
44	180923	0.48	1632	0.69	158	110.86	9.83	0.63665803	10lb	
124	293619	0.84	1632	0.68	244	179.91	79.81	7.57210626	2sb	Hsp60
125	286959	0.82	1632	0.68	245	175.83	75.73	18.8383085	2lb	
12	266412	0.71	1632	0.69	246	163.24	70.22	1.05832705	6sb	
13	202993	0.54	1632	0.69	231	124.38	31.36	2.24641834	6lb	
14	184486	0.49	1632	0.69	229	113.04	20.02	2.25704622	7sb	
15	297666	0.79	1632	0.69	243	182.39	89.37	1.38773292	7lb	
16	342806	0.91	1632	0.69	246	210.05	117.03	1.69094062	8sb	
17	288213	0.77	1632	0.69	246	176.6	83.58	1.49543747	8lb	
50	260039	0.69	1632	0.69	193	159.34	24.77	2.35009488	9sb	
51	251643	0.67	1632	0.69	186	154.19	19.62	4.88059701	9lb	
52	280973	0.75	1632	0.69	246	172.16	37.59	0.37485042	10sb	
53	339758	0.9	1632	0.69	247	208.19	73.62	2.6510623	10lb	
133	302149	0.86	1632	0.68	204	185.14	85.34	8.09677419	2sb	Gapdh
134	315506	0.9	1632	0.68	218	193.32	93.52	23.2636816	2lb	
21	392172	1.04	1632	0.69	246	240.3	29.27	0.44114544	6sb	
22	387808	1.03	1632	0.69	253	237.63	26.6	1.90544413	6lb	
23	378938	1.01	1632	0.69	242	232.19	21.16	2.38556933	7sb	
24	388796	1.03	1632	0.69	247	238.23	27.2	0.42236025	7lb	
25	370544	0.98	1632	0.69	248	227.05	16.02	0.97032102	8sb	
26	389919	1.04	1632	0.69	247	238.92	27.89	0.48219225	8lb	
59	385284	1.02	1632	0.69	246	236.08	20.18	1.73218884	9sb	
60	356782	0.95	1632	0.69	243	218.62	2.72	0.04099472	9lb	
61	379358	1.01	1632	0.69	245	232.45	16.55	1.18553009	10sb	
62	377547	1	1632	0.69	246	231.34	15.44	1.74069899	10lb	

	140	296965	0.85	1632	0.68	228	181.96	82.26		2sb	Actina
	141	189656	0.54	1632	0.68	218	116.21	16.51		2lb	
	28	249324	0.66	1632	0.69	245	152.77	57.84		6sb	
	29	173943	0.46	1632	0.69	215	106.58	11.65		6lb	
	30	263212	0.7	1632	0.69	242	161.28	66.35		7sb	
	31	177714	0.47	1632	0.69	214	108.89	13.96		7lb	
	32	169405	0.45	1632	0.69	212	103.8	8.87		8sb	
	33	260025	0.69	1632	0.69	238	159.33	64.4		8lb	
	68	141713	0.38	1632	0.69	122	86.83	10.54		9sb	
	69	131073	0.35	1632	0.69	88	80.31	4.02		9lb	
	70	288161	0.76	1632	0.69	230	176.57	100.28		10sb	
	71	169822	0.45	1632	0.69	214	104.06	27.77		10lb	
CARC. INVASOR	37	266134	0.71	1632	0.69	224	163.07	62.04	2.8855814	1sc	β F1ATP asa
	38	167076	0.44	1632	0.69	123	102.38	1.35	0.02328791	1lc	
	39	173465	0.46	1632	0.69	158	200.32	99.29	0.99728807	2sc	
	40	183517	0.49	1632	0.69	213	112.45	11.42	0.2700402	2lc	
	77	200325	0.53	1632	0.69	173	159.23	59.1	1.19926948	5sc	
	78	201268	0.53	1632	0.69	173	123.33	23.2	0.46114093	5lc	
	79	204618	0.54	1632	0.69	176	125.38	25.25	0.41170716	6sc	
	80	200672	0.53	1632	0.69	164	122.96	22.83	1.1890625	6lc	
	112	365244	0.97	1632	0.69	248	223.8	123.79	1.38746918	8sc	
	113	282482	0.75	1632	0.69	251	173.09	73.08	0.85835095	8lc	
	116	329727	0.88	1632	0.69	246	202.04	102.03	1.47080871	10sc	
	117	170379	0.45	1632	0.69	238	104.4	4.39	0.09147739	10lc	
	46	316194	0.84	1632	0.69	243	160.03	25.46	1.18418605	1sc	Hsp60

47	295660	0.78	1632	0.69	245	181.16	46.59	0.80369156	1lc	
48	303335	0.81	1632	0.69	246	185.87	51.3	0.51526718	2sc	
49	291226	0.77	1632	0.69	246	178.45	43.88	1.03759754	2lc	
86	245698	0.65	1632	0.69	246	150.55	51.32	1.0413961	5sc	
87	252707	0.67	1632	0.69	250	154.85	55.62	1.10554562	5lc	
88	181831	0.48	1632	0.69	172	111.42	12.19	0.1987608	6sc	
89	353121	0.94	1632	0.69	244	216.37	117.14	6.10104167	6lc	
121	267442	0.71	1632	0.69	218	163.87	20.81	0.23324367	8sc	
122	309614	0.82	1632	0.69	246	189.71	46.65	0.54792107	8lc	
125	235269	0.62	1632	0.69	203	170.16	27.1	0.39065879	10sc	
126	365214	0.97	1632	0.69	248	185.59	42.53	0.8862263	10lc	
55	363163	0.96	1632	0.69	250	216.56	2.36	0.10976744	1sc	Gapdh
56	359558	0.95	1632	0.69	247	243.15	27.25	0.47007073	1lc	
57	379050	1.01	1632	0.69	246	232.26	16.36	0.16432302	2sc	
58	366428	0.97	1632	0.69	247	236.9	21	0.49657129	2lc	
95	383673	1.02	1632	0.69	244	210.3	18.25	0.37033279	5sc	
96	384828	1.02	1632	0.69	247	235.8	43.75	0.86960843	5lc	
97	378831	1.01	1632	0.69	248	232.13	40.08	0.65351378	6sc	
98	351539	0.93	1632	0.69	241	215.4	23.35	1.21614583	6lc	
130	329203	0.87	1632	0.69	220	201.72	18.63	0.20880968	8sc	
131	323973	0.86	1632	0.69	220	231.21	48.12	0.56518675	8lc	
134	326154	0.87	1632	0.69	213	199.85	16.76	0.241603	10sc	
135	319233	0.85	1632	0.69	206	195.61	12.52	0.26088768	10lc	
64	159598	0.42	1632	0.69	131	97.79	21.5		1sc	Actina
65	219117	0.58	1632	0.69	235	134.26	57.97		1lc	
66	286980	0.76	1632	0.69	247	175.85	99.56		2sc	
67	193529	0.51	1632	0.69	234	118.58	42.29		2lc	

104	219141	0.58	1632	0.69	247	134.28	49.28	5sc
105	220820	0.59	1632	0.69	248	135.31	50.31	5lc
106	238813	0.63	1632	0.69	249	146.33	61.33	6sc
107	170061	0.45	1632	0.69	218	104.2	19.2	6lc
139	290860	0.77	1632	0.69	243	178.22	89.22	8sc
140	284190	0.75	1632	0.69	243	174.14	85.14	8lc
143	258453	0.69	1632	0.69	246	158.37	69.37	10sc
144	223567	0.59	1632	0.69	250	136.99	47.99	10lc

El jurado designado por la **Universidad Autónoma de la Ciudad de México** aprobó esta tesis el día 31 de enero del 2013, en la Ciudad de México D.F. para optar al Grado de Maestra en Ciencias Genómicas, a la Biol. Carla Marayenarih Orozco Suárez

Dra. Mavil López Casamichana

Dr. Ma. Guadalupe De Dios Bravo

Dr. Israel López Reyes

Dr. Mario César López Camarillo
