



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA**

**CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI  
Unidad de Investigación Médica en  
Enfermedades Oncológicas (UIMEO)**



**Maestría en Biología Experimental**

**Expresión de las proteínas HOX C9, HOXC12 y HOXD9 en  
lesiones del cérvix uterino y su relación con el Virus del  
Papiloma Humano**

**IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN BIOLOGÍA  
EXPERIMENTAL PRESENTA:**

**BIÓLOGA EXPERIMENTAL**

**AGLAÉ TREJO VARGAS**

**COMITÉ TUTORAL**

**Dra. Patricia Piña Sánchez**

**Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz**

**Dra. Sandra Adela Orozco Suárez**

**Diciembre 2010**

## COMITÉ TUTORAL

### Co-Directores:

#### **Dra. Patricia Piña Sánchez**

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas  
Hospital de Oncología CMN Siglo XXI IMSS  
patricia\_1307@yahoo.com.mx

#### **Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz**

Dpto. Ciencias de la Salud. D.C.B.S.  
Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa  
mcgr@xanum.uam.mx

### Asesor:

#### **Dra. Sandra Adela Orozco Suárez**

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas  
Hospital de Especialidades CMN Siglo XXI IMSS.  
sorozcos@cis.gob.mx

### Jurado:

#### **Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura**

Depto. Biología de la Reproducción  
Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa  
pgdm@xanum.uam.mx

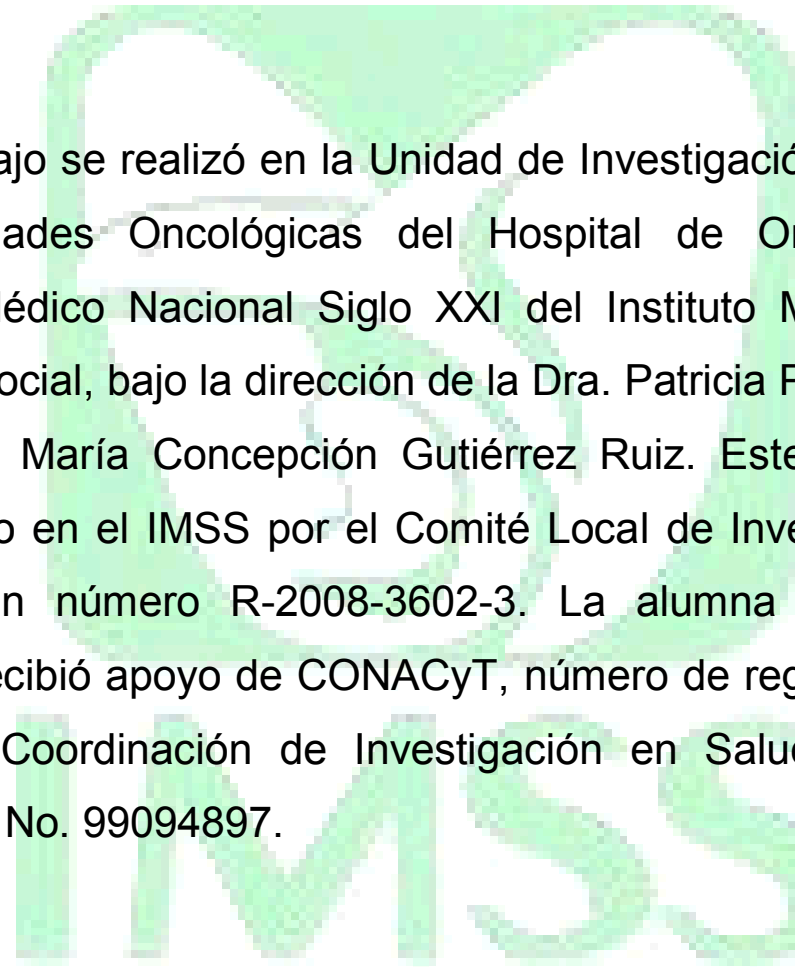
#### **Dr. Federico Ávila Moreno**

Unidad de Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.  
Unidad de Biomedicina FES-Iztacala UNAM.  
favila@iner.gob.mx

#### **Dr. Ricardo López Romero**

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Autoinmunes.  
Hospital de Especialidades CMN Siglo XXI IMSS  
rlopez\_99@yahoo.com

El programa de la Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-I:309-0) pertenece al Padrón del Posgrado de Excelencia del CONACyT PIFOP-CONACyT-SEP y cuenta con apoyo del mismo consejo a través del convenio 309-0, con la clave C/PFPN-2002-35-32.

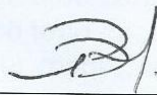


Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la dirección de la Dra. Patricia Piña Sánchez y la Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz. Este trabajo fue autorizado en el IMSS por el Comité Local de Investigación en Salud con número R-2008-3602-3. La alumna Aglaé Trejo Vargas recibió apoyo de CONACyT, número de registro 268425 y de la Coordinación de Investigación en Salud del IMSS, matrícula No. 99094897.

Los miembros del jurado designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada "Expresión de las proteínas HOXC9, HOXC12 Y HOXD9 en lesiones del cérvix uterino y su relación con el Virus del Papiloma Humano". Con fecha 14 de Diciembre del 2010.

**Presidente**

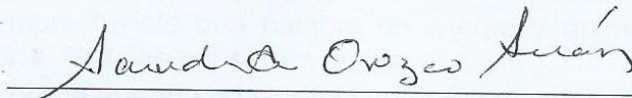
Dr. Pablo Damián Matzumura  
Depto. Biología de la Reproducción  
Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa  
pgdm@xanum.uam.mx



---

**Secretaria**

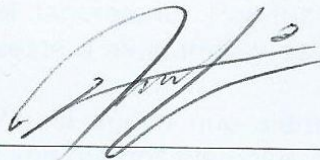
Dra. Sandra Adela Orozco Suárez  
Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas  
Hospital de Especialidades CMN Siglo XXI IMSS.  
sorozcos@cis.gob.mx



---

**Vocal**

Dr. Federico Ávila Moreno  
Unidad de Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.  
Unidad de Biomedicina FES-Iztacala UNAM.  
favila@iner.gob.mx



---

**Vocal**

Dr. Ricardo López Romero  
Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Autoinmunes.  
Hospital de Especialidades CMN Siglo XXI IMSS  
rlopez\_99@yahoo.com



---

## AGRADECIMIENTOS

**A Dios.** Por ser mi creador, el motor de mi vida, por no haber dejado que me rinda en ningún momento e iluminarme para salir adelante, porque todo lo que tengo, lo que puedo y lo que recibo es regalo que él me ha dado.

**A mi madre, mi abuelita y mi tío.** Por el amor, los valores, el impulso, la motivación, el cuidado, la protección, los desvelos, los consejos y el sacrificio que han tenido para mí. Ni una sola palabra puede expresar el infinito agradecimiento que tengo hacía ustedes por todo lo hermoso que me han dado.

**A mis hermanos.** Por su apoyo, comprensión y motivación para lograr esto. Porque siempre he querido lo mejor para ustedes.

**A la Dra. Patricia Piña Sánchez.** Quien más que una jefa has sido una gran amiga para mí y un buen ejemplo de vida. Gracias por el tiempo, la dedicación y paciencia que has tenido conmigo y por la formación que me has dado, porque es a ti a quien debo todo cuanto sé. Porque eres un gran ejemplo a seguir y porque a pesar de ser madre, esposa e investigadora nunca estás demasiado ocupada para dar un consejo, ánimo y apoyo cuando más lo necesitamos. A tu familia sin duda por la comprensión que han tenido y permitirme robarles tiempo que les pertenece a ellos.

### **A mis amigos de laboratorio.**

- Ana Lilia. Gracias porque nunca estuviste suficientemente ocupada para regalarme parte de tu tiempo y explicarme y enseñarme todo cuanto sé. Porque siempre tuviste una palabra de aliento y ánimo cuando pensaba que no podría. Gracias por ser mi amiga.
- Eduardo. Porque aunque no somos los mejores amigos del mundo siempre tienes un consejo para ser mejor profesional. Te admiro porque tienes una visión muy diferente de las cosas y agradezco infinitamente que la compartas conmigo.
- Elisa. Porque llegaste más que ser una compañera de trabajo, una gran amiga y compañera de aventuras, regaños y vivencias. Gracias por hacer tan amenos los días en el laboratorio. Por tus múltiples ocurrencias y porque siempre estas dispuesta a ayudarme y escucharme cuando más lo necesito.
- A Vane, Sergio y Hugo. Por el apoyo que siempre recibí de ustedes y porque como profesionistas son buenos ejemplos para mí.
- A Julio Almanza. Por el tiempo y la ayuda que me brindaste para que pudiera entrar a la maestría. Tus conocimientos y tu ejemplo ha sido muy valioso para mí. Te admiro querido amigo.

**Al Dr. Mauricio Salcedo.** Por persuadirme a trabajar con Paty y por el apoyo y el tiempo que me permitió trabajar en su laboratorio.

**A la Dra. Conchita.** Porque a pesar de todo el trabajo que tiene aceptó ser parte de mi comité durante la maestría y porque su ejemplo me ayuda a seguir esforzándome por lograr cada día más.

**A la Dra. Sandra.** Por ayudarme a concluir con este proyecto y por todos los consejos que me dio durante la maestría, además por todo el tiempo que me dedicó para que lograra con mí objetivo.

**Al Dr. Pablo, Dr. Ricardo y al Dr. Federico.** Por el tiempo que invirtieron revisando mi tesis, por sus valiosos comentarios y por aceptar ser parte de mi jurado en mi examen.

**Al Dr. Alarcón.** Por darme las bases en el campo de la investigación y porque aunque por condiciones ajenas no pude trabajar con usted durante la maestría quiero que sepa que le agradezco muchísimo todo lo aprendí con mientras fui su alumna y porque como persona es alguien a quien le admiro y le agradezco todos los consejos que recibí.

**Al Dr. Alejandro Andrade.** Jefe del Dpto. de Patología del Hospital de Gineco-Obstetricia No. 4 por las facilidades otorgadas para la obtención de las muestras.

**A mis profesores de la UAM-I.** Por la formación y el conocimiento que recibí de ustedes, porque cada uno puso gran parte de esfuerzo para que alcanzara mis metas.

**Al IMSS y al CONACyT.** Por el apoyo económico que recibí de ustedes.

Y a todos aquellos que directa o indirectamente siempre me ayudaron a alcanzar mi objetivos.

**MUCHAS GRACIAS!!!**

## ÍNDICE GENERAL

Resumen	Pág. 14
Abstract	Pág. 16
1. Introducción	
a. Histología y anatomía del cérvix uterino.	Pág. 18
b. Epidemiología del cáncer cervicouterino (CaCU).	Pág. 20
c. Clasificación y tipos histológicos del CaCU	Pág. 22
d. Desarrollo del CaCU	Pág. 24
e. Factores de riesgo en el desarrollo de CaCU.	Pág. 25
f. Virus del Papiloma Humano.	Pág. 26
g. Infección del VPH.	Pág. 29
h. Caracterización de alteraciones moleculares en CaCU: desarrollo de biomarcadores.	Pág. 30
i. Genes <i>HOX</i>	Pág. 31
j. Regulación de los genes <i>HOX</i> : Estrógenos, ncRNA, policomb y tritorax.	Pág. 33
k. Genes <i>HOX</i> y el desarrollo del Cáncer	Pág. 34
l. Genes <i>HOX</i> en CaCU.	Pág. 36
2. Justificación	Pág. 39
3. Hipótesis	Pág. 39
4. Objetivos	
a. Objetivo General	Pág. 39
b. Objetivos Particulares	Pág. 40
5. Material y Métodos	Pág. 40
a. Tipo de estudio.	
b. Criterios de inclusión	Pág. 40
c. Criterios de exclusión	Pág. 40
d. Aspectos éticos.	Pág. 40
e. Colecta de Muestras	Pág. 41
f. Construcción de microarreglos de tejidos (MAT)	Pág. 41
g. Detección de las proteínas HOXC9, HOXD9 y HOXC12 por inmunohistoquímica.	Pág. 42
f. Extracción de DNA.	Pág. 43
g. Cuantificación y verificación de DNA.	Pág. 43
h. Detección de VPH.	Pág. 43
i. Análisis de datos.	Pág. 44
6. Resultados	
a. Recolección de muestras.	Pág. 45
b. Cortes histológicos.	Pág. 45
c. Extracción de DNA y tipificación de VPH.	Pág. 45
d. Construcción de microarreglos de tejidos (MAT).	Pág. 49
e. Expresión de las proteínas HOXC9, HOXD9 y HOXC12	Pág. 50
7. Discusión	Pág. 68
8. Conclusión	Pág. 76
9. Bibliografía	Pág. 77
10. Anexos	Pág. 89



## SIGLAS Y ABREVIATURAS

<b>CaCU</b>	Cáncer Cervicouterino.
<b>CSC</b>	Cancer Stem Cell (Células Tallo de Cáncer).
<b>E</b>	Early (Genes de expresión temprana del genoma del VPH).
<b>ER</b>	Receptores de estrógenos.
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration(Administración de drogas y alimentos).
<b>H-E</b>	Hematoxilina-Eosina.
<b>HUGO</b>	Human Genome Organization (Organización del Genoma Humano).
<b>IHQ</b>	Inmunohistoquímica.
<b>L</b>	Late (Genes de expresión tardía del genoma del VPH).
<b>LCR</b>	Long Control Region (Región Larga de Control).
<b>LEIBG</b>	Lesión Intraepitelial Escamosa de Bajo Grado.
<b>LEIAG</b>	Lesión Intraepitelial Escamosa de Alto Grado.
<b>MAT</b>	Microarreglos de Tejidos.
<b>ORF</b>	Open Reading Frames (Marcos de Lectura Abierta).
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
<b>pRB</b>	Proteína del retinoblastoma.
<b>RNAnc</b>	RNA no codificantes.
<b>VPH</b>	Virus del Papiloma Humano.
<b>VPHar</b>	Virus del Papiloma Humano de alto riesgo.
<b>VPHbr</b>	Virus del Papiloma Humano de bajo riesgo.
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la anatomía de cérvix uterino.	Pág. 18
Figura 2. Esquema del epitelio escamoso estratificado.	Pág. 19
Figura 3. Esquema del epitelio columnar.	Pág. 20
Figura 4. Incidencia y mortalidad de cáncer en mujeres a nivel mundial.	Pág. 20
Figura 5. Mortalidad en mujeres con cáncer en México	Pág. 21
Figura 6. Porcentaje de defunciones en mujeres por tumores malignos 1998-2008.	Pág. 21
Figura 7. Cortes histológicos de cérvix uterino teñidos con H-E	Pág. 24
Figura 8. Lesiones precursoras del epitelio cervical.	Pág. 24
Figura 9. Progresión del CaCU.	Pág. 25
Figura 10. Genoma de los VPH.	Pág. 28
Figura 11. Progresión a CaCU mediada por VPH.	Pág. 29
Figura 12. Conservación entre el cluster <i>HOM-C</i> y <i>HOX</i> .	Pág. 31
Figura 13. Expresión espacial de los genes homeóticos homólogos <i>HOXA9</i> , <i>HOXA10</i> , <i>HOXA11</i> y <i>HOXA13</i> .	Pág. 32
Figura 14. Expresión de los genes <i>HOX</i> del grupo Abd-B en tejidos normales y con carcinoma invasivo.	Pág. 38
Figura 15. Electroforesis de DNA de las muestras.	Pág. 46
Figura 16. Detección de VPH por iniciadores consenso GP5+/GP6.	Pág. 47
Figura 17. Detección de HPV-16 por iniciadores de E6 de VPH16	Pág. 48
Figura 18. Fragmentos amplificados de DNA mitocondrial de la región D-loop.	Pág. 48
Figura 19. Construcción de los microarreglos de tejidos.	Pág. 49
Figura 20. Matriz de un microarreglo de tejidos.	Pág. 50
Figura 21. Expresión de la proteína <i>HOXC9</i> en línea celular de cáncer de cérvix HeLa.	Pág. 51
Figura 22. Expresión nuclear de la proteína <i>HOXC9</i> en tejidos sin alteraciones neoplásicas.	Pág. 52
Figura 23. Expresión nuclear de la proteína <i>HOXC9</i> en LIEBG.	Pág. 53
Figura 24. Expresión nuclear de la proteína <i>HOXC9</i> en LIEAG.	Pág. 54
Figura 25. Expresión nuclear de la proteína <i>HOXC9</i> en CaCU.	Pág. 55
Figura 26. Diferencia de intensidad y % de células positivas	

de la expresión nuclear de HOXC9.	Pág. 57
Figura 27. Expresión nuclear de la proteína HOXC12 en tejido sin alteraciones neoplásicas.	Pág. 59
Figura 28. Expresión nuclear de la proteína HOXC12 en LIEBG.	Pág. 60
Figura 29. Expresión nuclear de la proteína HOXC12 en LIEAG.	Pág. 61
Figura 30. Expresión nuclear de la proteína HOXC12 en CaCU.	Pág. 62
Figura 31. Expresión nuclear de la proteína HOXD9 en tejido sin alteraciones neoplásicas.	Pág. 63
Figura 32. Expresión nuclear de la proteína HOXD9 en LIEBG.	Pág. 64
Figura 33. Expresión nuclear de la proteína HOXD9 en LIEAG.	Pág. 66
Figura 34. Expresión nuclear de la proteína HOXD9 en CaCU.	Pág. 66
Figura 35. Base de datos de la proteína HOXC9.	Pág. 70
Figura 36. Base de datos de la proteína HOXC12.	Pág. 73
Figura 37. Base de datos de la proteína HOXD9.	Pág. 74

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Variedades histológicas del CaCU.	Pág. 22
Tabla 2. Función de las oncoproteínas de VPH.	Pág. 28
Tabla 3. Función de los genes <i>HOX</i> en cáncer.	Pág. 35
Tabla 4. Genes <i>HOX</i> y CaCU.	Pág. 37
Tabla 5. Muestras seleccionadas para amplificación de DNA.	Pág. 47
Tabla 6. Expresión nuclear de HOXC9 en tejidos sin alteraciones neoplásicas.	Pág. 52
Tabla 7. Expresión nuclear de HOXC9 en LIEBG.	Pág. 54
Tabla 8. Expresión nuclear de HOXC9 en LIEAG.	Pág. 55
Tabla 9. Expresión nuclear de HOXC9 en CaCU.	Pág. 56
Tabla 10. Expresión nuclear de HOXC12 en tejido sin alteraciones neoplásicas.	Pág. 59
Tabla 11. Expresión nuclear de HOXC12 en LIEBG.	Pág. 60
Tabla 12. Expresión nuclear de HOXC12 en LIEAG.	Pág. 61
Tabla 13. Expresión nuclear de HOXC12 en CaCU.	Pág. 62
Tabla 14. Expresión nuclear de HOXD9 en tejido sin alteraciones neoplásicas.	Pág. 64
Tabla 15. Expresión nuclear de HOXD9 en LIEBG.	Pág. 65
Tabla 16. Expresión nuclear de HOXD9 en LIEAG.	Pág. 66
Tabla 17. Expresión nuclear de HOXD9 en CaCU.	Pág. 66

## LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Tipo VPH en tejidos sin alteraciones neoplásicas, LIEBG, LIEAG y CaCU.	Pág. 49
Gráfica 2. Expresión nuclear de la proteína HOXC9 en lesiones del cérvix uterino.	Pág. 51
Gráfica 3. Expresión nuclear de la proteína HOXC9 en muestras sin alteración neoplásica y VPH.	Pág. 53
Gráfica 4. Expresión nuclear de la proteína HOXC9 en LIEBG y VPH.	Pág. 54
Gráfica 5. Expresión nuclear de la proteína HOXC9 en LIEAG y VPH.	Pág. 55
Gráfica 6. Expresión nuclear de la proteína HOXC9 en CaCU y VPH.	Pág. 56
Gráfica 7. Expresión semicuantitativa de la proteína HOXC9, HOXC12 y HOXD9.	Pág. 58
Gráfica 8. Expresión nuclear de la proteína HOXC12 en lesiones del cérvix uterino.	Pág. 58
Gráfica 9. Expresión nuclear de la proteína HOXC12 en tejido sin alteración neoplásica y VPH.	Pág. 59
Gráfica 10. Expresión nuclear de la proteína HOXC12 en LIEBG y VPH.	Pág. 60
Gráfica 11. Expresión nuclear de la proteína HOXC12 en LIEAG y VPH.	Pág. 61
Gráfica 12. Expresión nuclear de la proteína HOXC12 en CaCU y VPH.	Pág. 62
Gráfica 13. Expresión nuclear de la proteína HOXD9 en lesiones del cérvix uterino.	Pág. 63
Gráfica 14. Expresión nuclear de la proteína HOXD9 en tejido sin alteración neoplásica y VPH.	Pág. 64
Gráfica 15. Expresión nuclear de la proteína HOXD9 en LIEBG y VPH.	Pág. 65
Gráfica 16. Expresión nuclear de la proteína HOXD9 en LIEAG y VPH.	Pág. 66
Gráfica 17. Expresión nuclear de la proteína HOXD9 en CaCU y VPH.	Pág. 67

## RESUMEN

El cáncer cervicouterino (CaCU) es la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres en el mundo y en México. El CaCU es precedido de lesiones precursoras conocidas como lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LIEBG) y de alto grado (LIEAG). El principal factor etiológico es la infección por el Virus del Papiloma Humano (VPH), el cual se encuentra en más del 99% de los casos de CaCU. La infección por VPH es una causa necesaria pero no suficiente para el desarrollo de CaCU, ya que no todas las mujeres infectadas con VPH desarrollan cáncer, por lo que se ha sugerido la participación de otros factores. En este sentido es necesario identificar el conjunto de alteraciones moleculares que caracterizan al CaCU y a las lesiones precursoras que potencialmente progresarán a CaCU. Para ello diversos estudios se han enfocado a identificar las alteraciones cromosómicas y a nivel transcripcional en el CaCU. Dentro de los cambios transcripcionales, se han reportado a los factores de transcripción *HOX*. Los genes *HOX* se encuentran involucrados en procesos de proliferación y diferenciación durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, diversos estudios han mostrado alteración en la expresión de genes *HOX* en varios tipos de cáncer, tales como ovario, colon, hígado próstata, pulmón, glioblastomas y leucemias, entre otros. Sin embargo, a la fecha existen ocho reportes sobre alteraciones en la expresión de genes *HOX* en CaCU, de los cuales, sólo en 2 se han identificado la presencia de las proteínas HOXC10 y HOXD13. López y cols. (2006a) analizaron la expresión (mRNA), de 16 genes *HOX* en biopsias de tejidos de cérvix normal y con CaCU, encontrando expresión de RNAm en tejido con cáncer de *HOXB13*, *HOXC9*, *HOXC11*, *HOXC12*, *HOXC13*, *HOXD9* y *HOXD10*. Sin embargo, hasta el momento no existen estudios que hayan reportado la presencia de las proteínas HOXC9, HOXD9 y HOXC12 en CaCU, por lo que es importante confirmar o descartar la presencia de proteína de los genes diferencialmente expresados, ya que se han reportado mecanismos de regulación post-transcripcional (RNA no codificantes) que impiden la síntesis de proteínas. Por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar la expresión de las proteínas HOXC9, HOXD9 y HOXC12 en CaCU y sus lesiones precursoras, ya que no existen reportes de la expresión de estas proteínas en CaCU.

Se colectaron un total de 351 biopsias embebidas en parafina, con los siguientes reportes histopatológicos: 65 muestras sin alteraciones neoplásicas, 36 muestras con LIEBG, 143 muestras con LIEAG y 107 muestras con CaCU. Se realizó la detección de VPH por PCR y se construyeron 5 microarreglos de tejidos (MAT) en los cuales se realizó la detección de las proteínas HOXC9, HOXD9 y HOXC12 mediante inmunohistoquímica (IHQ) con anticuerpos específicos.

En general, se detectó a la proteína HOXC9 en 89% de los casos de tejidos sin neoplasias, 85% de tejidos con LIEBG, 100% de los tejidos con LIEAG y 83% de los tejidos con CaCU. En epitelio cervical sin neoplasia, la expresión se encontró en núcleos de células basales y parabasales; mientras que en LIEBG y LIEAG la expresión aumentó conforme avanzaba al grado de lesión hasta CaCU, aunque no necesariamente se asoció a la presencia de VPH. El análisis semicuantitativo mostró sobreexpresión nuclear de HOXC9 en LIEAG y CaCU,

La expresión nuclear de la proteína HOXD9 en muestras sin alteraciones neoplásicas se encontró en 27% y en 19% de los tejidos con CaCU. En cuanto a la proteína HOXC12, se detectó expresión nuclear en 79% de tejidos sin alteraciones neoplásicas y en CaCU sólo el 49%. Las proteínas HOXD9 y HOXC12 también se localizaron en citoplasma, sin embargo se desconoce si llevan a cabo una función en particular en citoplasma. Previamente se reportó expresión de RNAm de *HOXD9* y *HOXC12* en CaCU en más del 80% de los casos; sin embargo, nuestros resultados mostraron baja expresión de la proteína de *HOXD9* y *HOXC12*, por lo que podrían estar implicados mecanismos de regulación post-transcripcional.

Finalmente, nuestros resultados sugieren que la sobreexpresión nuclear de HOXC9 podría estar implicada en los procesos de transformación neoplásica, por lo cual es necesario identificar los genes blanco que son regulados por este factor de transcripción. Por otra parte, la baja expresión de HOXD9 y HOXC12, respecto a lo reportado previamente en RNAm, sugiere posibles mecanismos de regulación postranscripcional.

## ABSTRACT

Cervical cancer (CC) is the second leading cause of cancer death in women worldwide and in Mexico. The CC is preceded by precursor lesions known as squamous intraepithelial lesions of low grade (LSIL) and high grade (HSIL). The main etiological factor is infection with the Human Papilloma Virus (HPV), which is over 99% of cases of cervical cancer. HPV infection is a necessary but not sufficient for development of cervical cancer, since not all women infected with HPV develop cancer, as has been suggested the involvement of other factors. In this regard it is necessary to identify all the molecular alterations that characterize the CaCU and potential precursor lesions progress to cervical cancer. To this end, various studies have focused on identifying chromosomal alterations in transcriptional level and the CC. Within the transcriptional changes have been reported to *HOX* transcription factors. *HOX* genes are involved in proliferation and differentiation processes during embryonic development. However, several studies have shown altered expression of *HOX* genes in various cancers such as ovarian, colon, liver, prostate, lung, glioblastoma and leukemia, among others. However, to date there are eight reports on alterations in the expression of *HOX* genes in CC, of which only 2 have identified the presence of proteins HOXC10 and HOXD13. López et al. (2006a) analyzed the expression (mRNA) of 16 *HOX* genes in biopsies of normal cervical tissue with cervical cancer, and found expression of mRNA in cancer tissue HOXB13, Hoxc9, HOXC11, HOXC12, HOXC13, HOXD9 and HOXD10. However, to date no studies have reported the presence of proteins HOXC9, HOXD9 and HOXC12 in CC, so it is important to confirm or exclude the presence of protein in differentially expressed genes, as mechanisms have been reported post-transcriptional regulation (non coding RNA) that prevent protein synthesis. So the aim of this study was to evaluate the expression of proteins HOXC9, HOXD9 and HOXC12 in CC and its precursor lesions, as there are no reports of expression of these proteins in CC. We collected a total of 351 paraffin-embedded biopsies, histopathology reports the following: 65 samples without neoplastic changes, 36 samples with LSIL, 143 HSIL samples and 107 samples with cervical cancer. We performed HPV detection by PCR and constructed 5 tissue microarrays (MAT) was performed in



which the detection of proteins Hoxc9, HOXC12 HOXD9 and immunohistochemistry (IHC) with specific antibodies.

In general, the protein was detected in 89% HOXC9 cases of tissues without tumors, 85% of tissues with LSIL, 100% of tissues with HSIL and 83% of tissues with cervical cancer. Cervical epithelium without neoplastic, the expression was found in nuclei of basal and parabasal cells, whereas in LSIL and HSIL expression increased with the degree of injury to CC, but not necessarily associated with the presence of HPV. The semiquantitative analysis showed nuclear overexpression of Hoxc9 in HSIL and CC,

Nuclear expression of the protein HOXD9 in samples without neoplastic changes were found in 27% and 19% of tissues with cervical cancer. As HOXC12 protein, nuclear expression was detected in 79% neoplastic tissue and unchanged in CC only 49%. HOXC12 HOXD9 proteins and also localized in the cytoplasm, however it is unknown if they perform a particular function in the cytoplasm. Previously reported mRNA expression in CC HOXC12 HOXD9 and over 80% of cases, however, our results showed low expression of the protein HOXC12 HOXD9 and therefore mechanisms might be involved post-transcriptional regulation.

Finally, our results suggest that nuclear overexpression of HOXC9 could be involved in neoplastic transformation processes, so it is necessary to identify target genes that are regulated by this transcription factor. Moreover, the low expression of HOXD9 and HOXC12 respect to those reported previously in mRNA, suggesting possible posttranscriptional regulatory mechanisms

## 1. INTRODUCCIÓN

### a. Histología y anatomía del cérvix uterino

El cérvix es la porción fibromuscular más baja del útero. Su forma es cilíndrica o cónica y mide de 3 a 4 cm de longitud y 2.5 cm en diámetro. La mitad inferior del cérvix es llamada “porción vaginal” y penetra en la vagina por su pared anterior, mientras que la mitad superior queda por encima de la vagina (Figura 1, Sellors *et al.*, 2003).

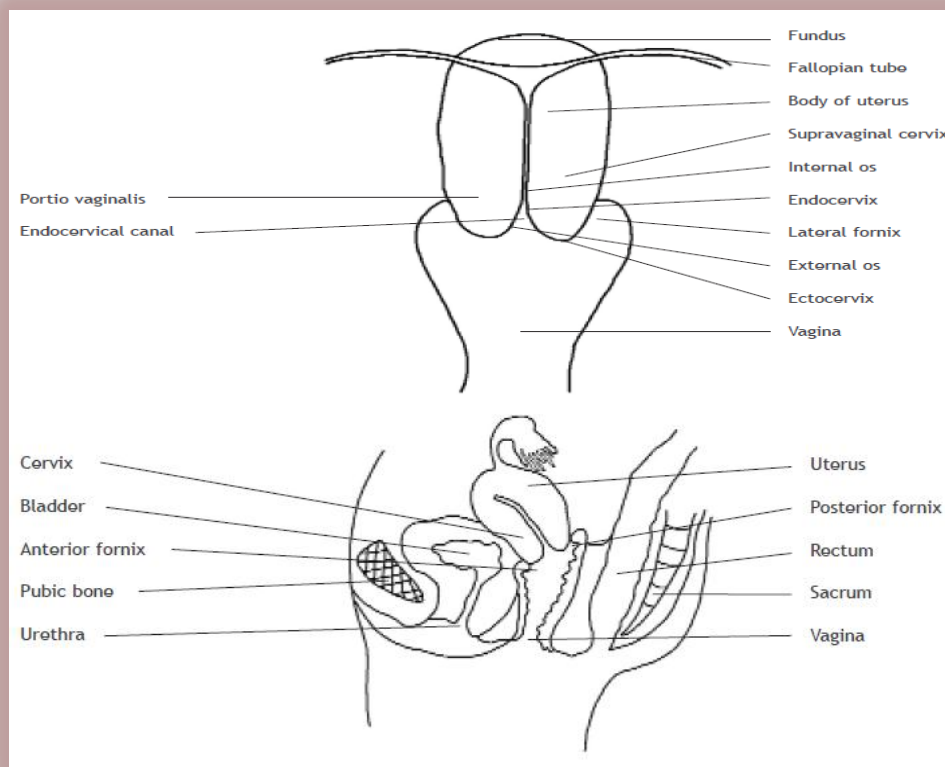


Figura 1. Esquema de la anatomía del cérvix uterino. Tomado de Sellors *et al.*, 2003.

El conducto cervical desemboca en la vagina por el orificio cervical externo. La porción exterior del cuello se denomina exocérnix y es la porción más visible del cérvix y la porción del cuello uterino interior al orificio externo se denomina endocérnix (Sellors *et al.*, 2003).

El **exocérnix** tiene de 15 a 20 capas de células formando el epitelio escamoso no queratinizado similar al epitelio vaginal. Este epitelio se divide en tres estratos:

- El **estrato basal / parabasal** o **estrato germinal**, constituido por una línea de células basales que presentan núcleos alargados dispuestos en forma

perpendicular a la membrana basal. Las células parabasales constituyen dos hileras superiores y son células con mayor cantidad de citoplasma más grandes que las células basales, estas son las encargadas del crecimiento y regeneración epitelial.

- El **estrato medio** o **estrato espinoso**, formado por células que están madurando, se caracteriza por el aumento del tamaño del citoplasma, los núcleos son redondos con cromatina finamente granular. Estas células son las llamadas intermedias en la citología exfoliativa. Ellas pueden tener glucógeno en su citoplasma y dar la imagen característica de una vacuola clara en el citoplasma.
- El **estrato superficial**, es el compartimento más diferenciado del epitelio. Las células son alargadas, presentan abundante citoplasma y núcleo picnótico característico. La función de estas células es de protección y evitar las infecciones. Su descamación se debe a la escasez de desmosomas (Kurman, 2002) (Figura 2).

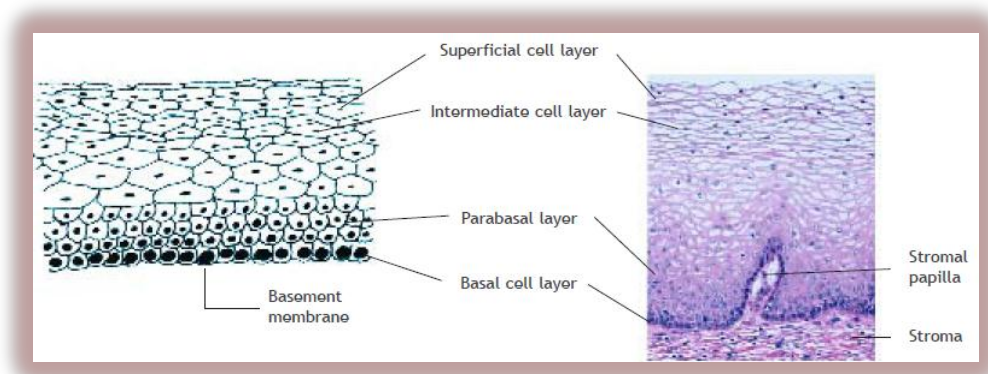


Figura 2. Esquema del epitelio escamoso estratificado (20 x). Tomado de Sellors *et al.*, 2003.

El **canal endocervical** o **endocérvix** está formado por una hilera de células cilíndricas que revisten la superficie y las estructuras glandulares. El epitelio escamoso y el glandular se unen en la unión escamocolumnar (Kurman, 2002) (Figura 3). Es precisamente en esta zona donde se inician las lesiones que dan origen al cáncer cervicouterino (CaCU).

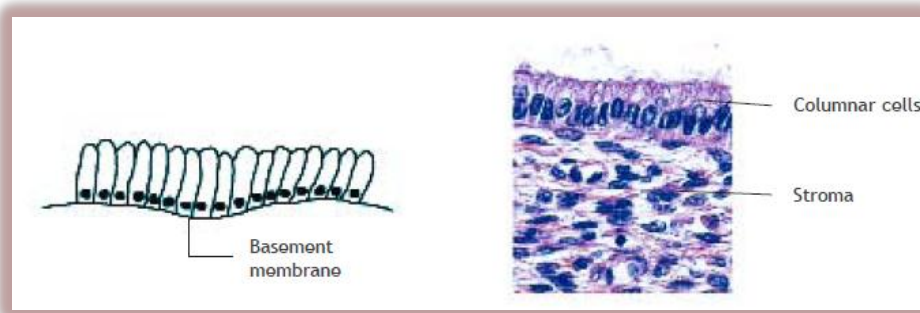


Figura 3. Esquema del epitelio columnar (40 x). Tomado de Sellors *et al.*, 2003.

### b. Epidemiología del cáncer cervicouterino (CaCU)

A nivel mundial el CaCU es la segunda causa de muerte por neoplasias malignas en la mujer. El CaCU es el segundo tipo de cáncer más común en mujeres alrededor del mundo, con una incidencia de 529,828 nuevos casos y 275,128 muertes reportadas en el año 2008 (GLOBOCAN, 2008). En términos generales el CaCU es mucho más frecuente en países en vías de desarrollo donde se presenta el 83% de los casos (Figura 4) (Parkin *et al.*, 2005).

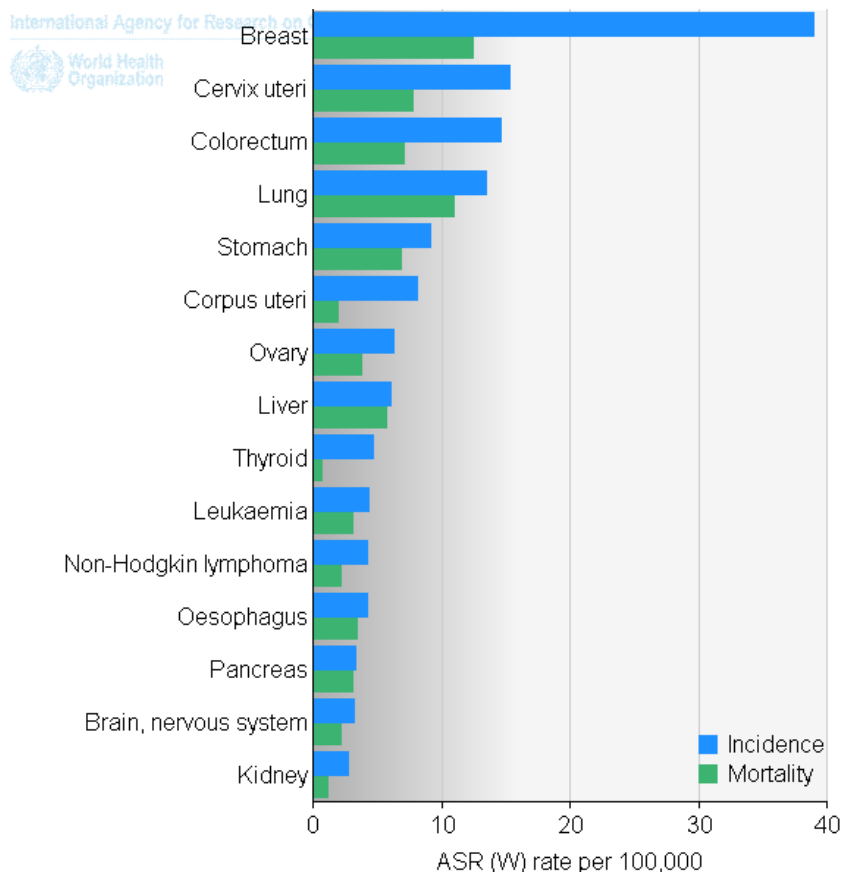


Figura 4. Incidencia y mortalidad de cáncer en mujeres a nivel mundial. Tomado de GLOBOCAN, 2008.

En México, en el año 2002, se presentaron 12,512 nuevos casos de CaCU, de los cuales 5,777 (46%) fueron decesos. Esta enfermedad fue la

primera causa de muerte entre las mujeres mexicanas con cáncer, ocupando un 16.6% (Figura 5). La mayoría de las mujeres que desarrollan este cáncer tienen entre 40 y 50 años de edad. Sin embargo, cada vez es más frecuente en mujeres jóvenes (20 a 30 años) (Ferlay *et al.*, 2004).

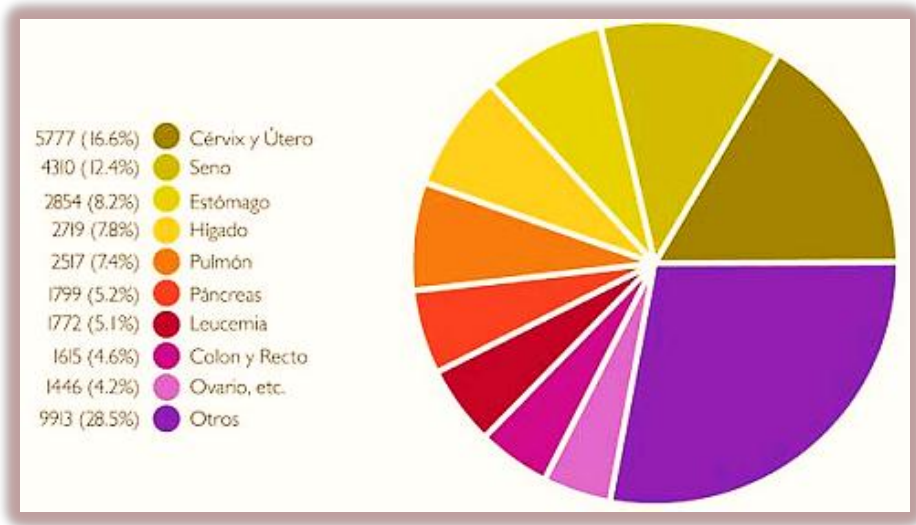


Figura 5. Mortalidad en mujeres con cáncer en México para el año 2002. El 16.6% de los casos, fueron decesos por cáncer cervicouterino. Esta enfermedad fue la primera causa de muerte entre las mujeres mexicanas con cáncer. Fuente GLOBOCAN 2002, IARC.

Datos del INEGI en el año 2009 muestran que los tres primeros tipos de cáncer que causaron mayor número de muertes en la población femenina fueron el de mama (13.8%), cuello del útero (12.1%) e hígado (7.6%) (INEGI, 2009); es importante señalar que en las mujeres, desde 1998 y hasta 2005, el cáncer del cuello del útero ocupó el primer lugar de causa de muerte por cáncer; a partir de 2006 es el cáncer de mama (Figura 6) (INEGI, 2010).

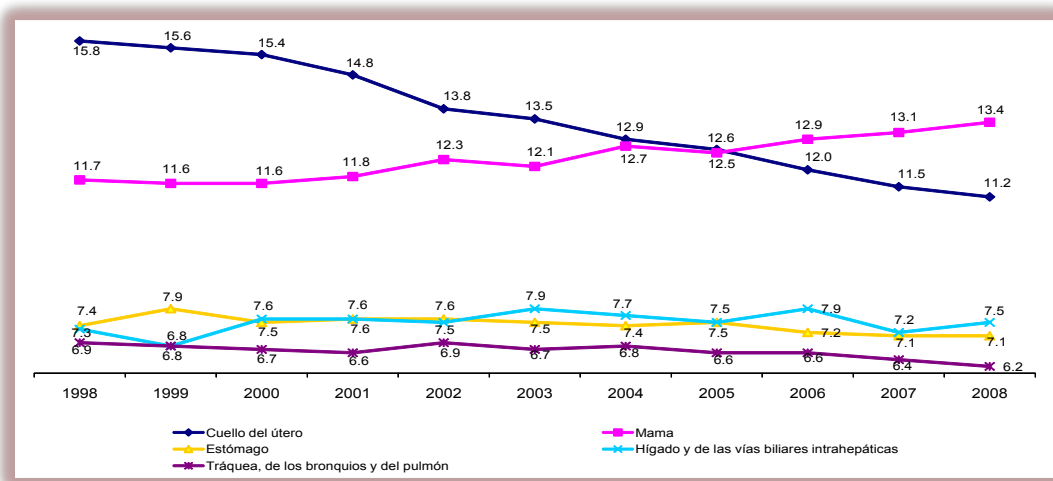


Figura 6. Porcentaje de defunciones en mujeres debidas a tumores malignos 1998-2008. Fuente: INEGI, 2010.

### c. Clasificación y tipos histológicos del CaCU

Uno de los avances más importantes en el tratamiento de la neoplasia de cérvix ha sido la identificación de las lesiones precursoras, las cuales han sido objeto de diferentes clasificaciones.

La primera clasificación se realizó en 1930 y se designó con el término de displasia. De acuerdo a su gravedad se denominaba: leve, moderada o severa. En 1968 se acuñó el concepto de Neoplasia Cervical Intraepitelial (NIC), con diferentes grados: NIC I, NIC II y NIC III o carcinoma *in situ* (Barron *et al.*, 1968; Richart *et al.*, 1969). Esta clasificación se da con base en el espesor de la invasión por parte de las células escamosas. Sin embargo la clasificación más reciente es la desarrollada en 1988 y posteriormente modificada en el año 2001 (Solomon *et al.*, 2002; Berek *et al.*, 2003; Bergeron *et al.*, 2003; Fidda *et al.*, 2004) y se conoce como el Sistema Bethesda. Con ella se originó el concepto de lesiones escamosas intraepiteliales, subdividiéndose en lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado (LIEBG) y lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado (LIEAG).

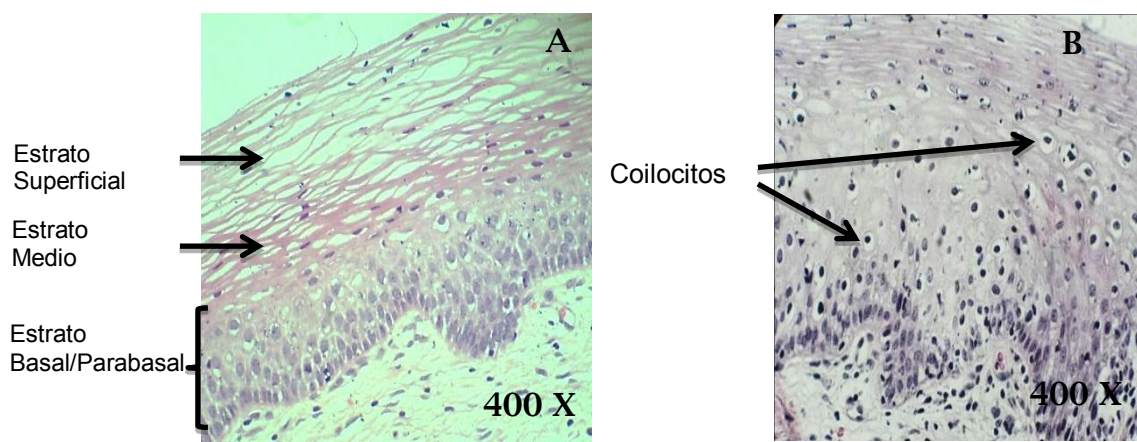
Existen diversas clasificaciones histológicas del CaCU pero en la actualidad se consideran tres tipos fundamentales conforme se ilustra en la Tabla 1.

<b>Tabla 1. Variedades histológicas del CaCU. Fuente. Bonfiglio-Kuman, 1994.</b>
<b>Carcinoma de Células escamosas epidermoide (60-80%).</b> <ul style="list-style-type: none"><li>- Queratinizante</li><li>- No queratinizante</li><li>- Verrugoso</li><li>- Condilomatoso</li><li>- Papilar</li><li>- Similar a linfoepitelioma</li></ul>
<b>Adenocarcinoma (15%)</b> <ul style="list-style-type: none"><li>- Mucinoso</li><li>- De tipo endocervical</li><li>- De tipo intestinal</li><li>- Endometriode</li><li>- De células claras</li><li>- Seroso</li><li>- Mesonéfrico</li></ul>
<b>Carcinoma adenoescamoso (10.4%)</b>

El carcinoma escamoso constituye la forma histológica más frecuente del tumor maligno del cérvix, representando más del 75%, en la mayoría de los

estudios, sin embargo otros autores opinan que este tipo histológico está presente en 78.9% de los casos (Bened *et al.*, 2001) o en hasta el 83.8% (Shingleton *et al.*, 1995).

En la figura 7 se muestran los tejidos representativos de cada diagnóstico. En los tejidos de cérvix uterino sin alteraciones neoplásicas se observa una hilera de células basales con núcleos alargados dispuestos en forma perpendicular a la membrana basal. Hileras de células parabasales con mayor cantidad de citoplasma y más grandes que las células basales. Células con citoplasma de mayor tamaño, núcleos redondos con cromatina finamente granular formando el estrato medio y células chatas con abundante citoplasma y núcleo picnótico formando el estrato superficial (Figura 7A). En los tejidos con lesión de bajo grado se observan alteraciones celulares confinadas al tercio inferior del epitelio escamoso, los cambios consisten en pérdida de la madurez epitelial; reducción moderada de la polaridad; anormalidades nucleares como anisonucleosis leve (células con núcleos de forma y tamaño muy diferente entre ellas), se observa la presencia de coilocitos (células atípicas con cavitación o halo perinuclear en el citoplasma, que indica cambios citopáticos debidos a la infección por VPH) (Figura 7B). Tejido de cérvix uterino con lesión de alto grado se observa proliferación de células basales atípicas; cuando ocupan más de dos terceras partes del espesor epitelial. Las células son inmaduras, con pérdida de la polaridad; además el citoplasma es muy escaso en las capas (Figura 7C) y tejido de cérvix uterino con cáncer donde se observa invasión de las células epiteliales hacia el estroma (Figura 7D) (Alonso *et al.*, 2005).





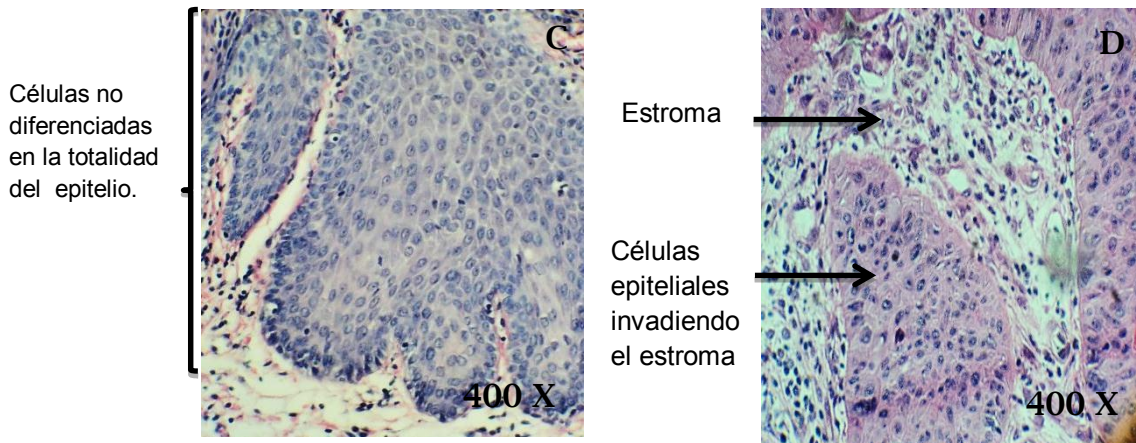


Figura 7. Cortes histológicos de cérvix uterino teñidos con H-E. A) Tejido de cérvix uterino sin neoplasia. B) Tejido de cérvix uterino con lesión de bajo grado. C) Tejido de cérvix uterino con lesión de alto grado. D) Tejido de cérvix uterino con cáncer.

#### d. Desarrollo del CaCU

El CaCU es precedido de lesiones precursoras conocidas como LIEBG, en donde aparecen en un tercio del epitelio, células con citoplasma de aspecto vacío y núcleos hiper Cromáticos (coilocitos), otra característica importante es que la membrana basal continúa intacta mientras que hay pérdida de la maduración de células epiteliales escamosas de la superficie. Las LIEBG pueden progresar y avanzar a LIEAG, donde se pueden encontrar un gran número de células displásicas en dos tercios o en la totalidad del epitelio, según la clasificación de Bethesda (Figura 8) (Castellsagué *et al.*, 2002; Solomon, 2002).

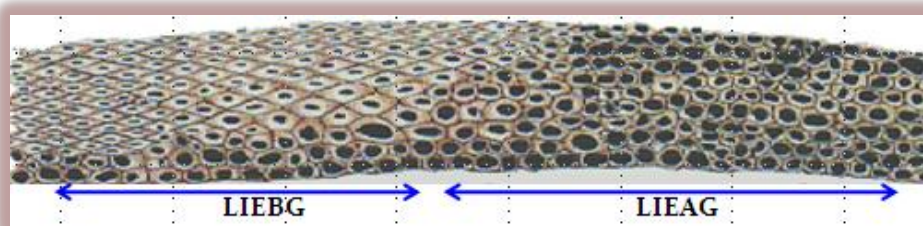


Figura 8. Lesiones precursoras del epitelio cervical. En LIEBG se encuentran células con citoplasma de aspecto vacío y núcleos hiper Cromáticos en un tercio del epitelio y en LIEAG se observan células con estas características en dos tercios o la totalidad del epitelio (Tomado y modificado de Alonso, 2000).

Desde la década de los ochenta se identificó al Virus del Papiloma Humano (VPH) como una causa necesaria pero no suficiente para desarrollar CaCU (Bosch *et al.*, 2002; Muñoz, 2000; Burd *et al.*, 2003); así mismo, previamente Walboomers y col. han informado que el CaCU invasor se asocia



con la presencia de VPH en 99.7% de los casos (Walboomers *et al.*, 1999), siendo la infección por VPH el principal factor de riesgo para desarrollar este tipo de cáncer. Sin embargo, no todas las mujeres que son infectadas con VPH desarrollan lesiones precursoras y CaCU ya que la mayoría de las lesiones leves o moderadas revierten espontáneamente en individuos inmunocompetentes (Holowaty *et al.*, 1999). Por lo que, sólo el 20% de las mujeres infectadas con VPH pueden desarrollar lesiones precursoras, de las cuales aproximadamente el 54% tienen regresión sin tratamiento. En el caso de LIEAG, del 12% a 70% progresan a CaCU (Figura 9) (Chakrabarti *et al.*, 2003), mientras que otros autores afirman que esta cifra sólo representa 30% (McCrede, 2008) lo cual sugiere que hay otros factores que intervienen en el desarrollo de esta neoplasia (Hildesheim *et al.*, 2002).

En general, se estima que sólo 1/10 000 mujeres infectadas con VPH desarrollan CaCU (Mayran, 2000) en un lapso de 10 a 20 años, desde la infección con VPH hasta el desarrollo del CaCU.

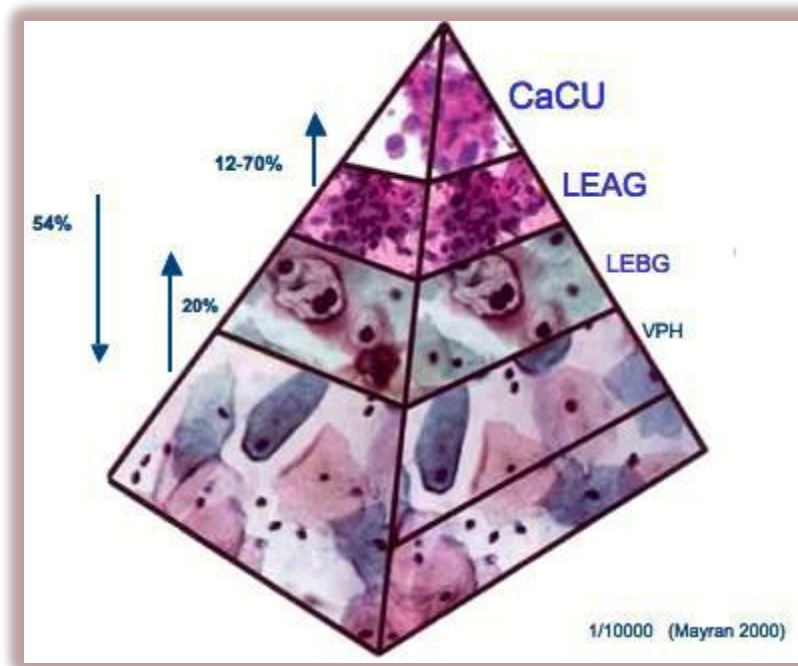


Figura 9. Progresión del CaCU en donde se muestra el porcentaje de mujeres que infectadas por VPH progresan a lesiones neoplásicas, observando que no todas las mujeres infectadas por VPH desarrollan cáncer (Tomado de Alonso, 2000; Mayran, 2000).

#### e. Factores de riesgo en el desarrollo de CaCU

Factores tanto ambientales como genéticos deben coincidir con la infección de VPH para el desarrollo de CaCU, ya que se ha detectado hasta un

38% de infección por VPH en mujeres sanas jóvenes (Collins *et al.*, 2002), misma que puede remitir con el tiempo (Moscicki *et al.*, 2004; Woodman *et al.*, 2001). Dentro de los factores asociados al riesgo a desarrollar CaCU, se encuentran:

- Promiscuidad. Alto número de parejas sexuales e inicio temprano de actividad sexual (Burk *et al.*, 1996).
- Antecedentes de cáncer de pene o cérvix o verrugas genitales en su pareja sexual.
- Tabaquismo. Componentes químicos como los benzopirenos en el humo del tabaco tienen efectos carcinógenos (Hildesheim *et al.*, 2001; Szarewski *et al.*, 1998; Alam *et al.*, 2003).
- Edad. Infección más común en mujeres jóvenes sexualmente activas, de 18 a 30 años de edad, después de los 30 años decrece la prevalencia. El CaCU es más común después de los 35 años, lo que sugiere infección a temprana edad y progresión lenta a cáncer (Adam *et al.*, 2000; Burk *et al.*, 1996).
- Uso prolongado de anticonceptivos hormonales (más de 5 años) (Moreno *et al.*, 2002).
- Co-infección con otros agentes infecciosos como el virus de inmunodeficiencia adquirida humana (VIH), *Chlamydia trachomatis* o virus-2 de herpes simple (HSV-2) (de San José *et al.*, 2002; Clarke *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2002).
- Multiparidad (Brinton *et al.*, 1993; Muñoz *et al.*, 2002).
- Predisposición genética afecta la susceptibilidad a la infección por VPH, la capacidad para resolverla y el tiempo de desarrollo de la enfermedad. (Magnusson *et al.*, 2000).
- Inmunosupresión (supresión de la respuesta inmunológica), explicando recurrencias o persistencia del VPH hasta desarrollar cáncer (Launay *et al.*, 2003; Nobbenhuis *et al.*, 1999; Remmink *et al.*, 1995).

#### **f. Virus del Papiloma Humano**

El VPH pertenece a la familia *Papillomaviridae*, son virus de DNA circular de doble cadena de aproximadamente 7,200-8,000 pb, el tamaño de su virión es de aproximadamente 55 nm de diámetro, estos virus son

epiteliotrópicos y específicos en cada especie los cuales pueden inducir desde lesiones hiperproliferativas benignas comúnmente conocidas como verrugas, hasta tumores epiteliales malignos (Garnett y Duerksen-Hughes, 2006; Zheng *et al.*, 2006; Lenselink *et al.*, 2008).

Se han reportado más de 200 tipos de VPH de los cuales 100 tipos de VPH han sido aislados y secuenciados completamente (Ulrich, 2005). De acuerdo a su capacidad oncogénica los VPH se clasifican en alto riesgo (VPHar) por encontrarse asociados al CaCU en más de 95% de los casos, siendo los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68 los más comunes (Clifford *et al.*, 2003; Muñoz *et al.*, 2003). Por otra parte, los VPH como el 6, 11, 42, 43 y 44 muestran una débil asociación con el CaCU denominándose, tipos de bajo riesgo (VPH-br) (Clifford *et al.*, 2003).

La mayoría de los tipos de VPH que infectan la mucosa genital son agrupados como  $\alpha$ -papilomavirus, mientras que los que infectan la piel están principalmente agrupados dentro de  $\beta$ -papilomavirus (Ulrich, 2005). Los VPH también han sido clasificados dentro de subtipos cuando hay diferencias del 2 al 10% con otros tipos en su secuencia nucleotídica y en variantes cuando muestran únicamente diferencia del 2% en regiones codificantes y diferencias en la secuencia del 5% en regiones no codificantes de un tipo particular (Ulrich, 2005).

El genoma de los VPH puede ser dividido en tres principales regiones: una región temprana E (Early) con ORFs (Open Reading Frames) o marcos de lectura abierta E1, E2, E4, E5, E6 y E7, la cual codifica para las proteínas virales necesarias para la replicación del DNA viral, la regulación de la transcripción y la transformación e inmortalización celular, una región tardía L (Late), que codifica dos proteínas estructurales L1 la cual es la principal proteína de la cápside y L2 la menor proteína de la cápside y una región reguladora de aproximadamente 1 Kb conocida como región larga de control LCR (Long Control Region), que contiene la secuencia de DNA que permite el control de la replicación y de la expresión del genoma viral (Figura 10) (McMurray *et al.*, 2001). Las funciones de los ORFs son descritas en la Tabla 2 (Stanley *et al.*, 2007).

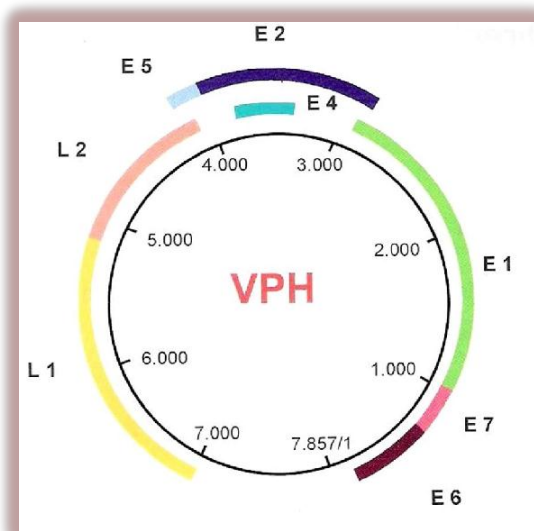


Figura 10. Genoma del VPH. Los ORFs E6, E7, E1, E2, E4 y E5 codifican proteínas requeridas para la regulación de la replicación del DNA viral y expresión génica viral. Los ORFs L1 y L2 codifican proteínas de la cápside viral. Tomado de McMurray, 2001.

Solo una cadena de la doble hebra del DNA sirve como molde para la expresión génica viral codificando un número de RNAm policistrónicos. La transcripción es regulada por secuencias potenciadoras localizadas en la LCR, la cual se une a factores celulares y al producto de E2. El sitio de inicio de la transcripción de varios promotores difiere dependiendo del tipo de virus, pero en todos los tipos el promotor es dependiente de la diferenciación de los queratinocitos (Stanley *et al.*, 2007).

<b>Tabla 2. Función de las oncoproteínas de VPH. (Tomado de Stanley, 2010).</b>	
<b>ORF</b>	<b>Función</b>
E6	Se une a p53, dirige la degradación de p53 mediante ubiquitinación. Con E7 inmoviliza los queratinocitos primarios.
E7	Se une a la proteína retinoblastoma (pRB), desregula el punto de control G1/S. Copera con E6 para inmortalizar las células primarias.
E1	Helicasa, ATPasa, proteína de unión a ATP esencial para la replicación del DNA viral.
E2	Factor de transcripción viral. Se une a E1 para facilitar la iniciación de la replicación viral importante en la encapsidación del genoma.
E5	Débil actividad transformante, sobre regula los receptores de factores de crecimiento.
E4	Interactúa con proteínas del citoesqueleto, permite el ensamble viral.
L1	Principal proteína de la cápside.
L2	Menor proteína de la cápside.

### g. Infección del VPH

El VPH entra a las células basales a través de micro abrasiones en el epitelio cervical. Los virus infectan a los queratinocitos de las capas basales del epitelio escamoso estratificado. Sin embargo, la expresión y replicación génica viral es regulada exclusivamente durante la diferenciación de los queratinocitos (Woodman *et al.*, 2007). El más alto nivel de expresión y ensamblaje de las proteínas virales ocurre únicamente en las capas más superiores del estrato espinoso y granuloso del epitelio escamoso (Doorbar, 2005). El VPH infecta un grupo de células basales con un bajo número de copias, después de algún tiempo la replicación del DNA parece ser independiente al ciclo celular el cual amplifica aproximadamente de 50 a 100 copias/célula. En su forma episomal o de plásmido el mantenimiento de la expresión génica es mínima y en particular la expresión de los oncogenes E6 y E7 es apenas detectable. Cuando los queratinocitos infectados entran al compartimento de diferenciación al ciclo celular hay una masiva sobre-regulación de la expresión génica viral, hay una integración del genoma de VPH dentro de los cromosomas del hospedero, con una pérdida asociada o disrupción de E2 y subsecuente sobre-regulación de la expresión de los oncogenes E6 y E7, al menos 1000 copias/célula (Figura 11) (Middleton *et al.*, 2003).

En particular, E6 y E7 son dos oncoproteínas virales que inactivan, respectivamente a p53 y pRb, proteínas supresoras de tumores (Munger *et al.*, 2002). Existen aproximadamente 24 proteínas celulares ya identificadas que pueden interactuar con las oncoproteínas virales, modificando su función y contribuyendo al desarrollo neoplásico (Pim *et al.*, 2010).

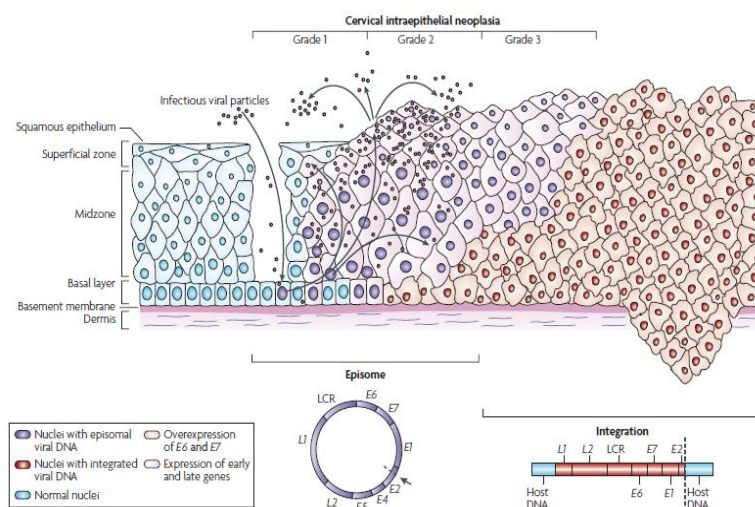


Figura 11. Progresión a cáncer cervical mediada por VPH. Esquema de la expresión espacial y temporal de las diferentes proteínas del VPH la cual comienza en la capa

de células basales del epitelio para su posterior migración a las capas superficiales del epitelio. Tomado de Woodman, 2007.

#### **h. Caracterización de alteraciones moleculares en CaCU: desarrollo de biomarcadores**

Aunque la gran mayoría (99.7%) de los carcinomas escamosos del cuello uterino, como se mencionó anteriormente, están asociados a infección por VPH, éste no es el único factor para explicar la etiología del cáncer de cuello uterino, por lo cual, la detección y tipificación de VPH, no sería suficiente para determinar si una lesión precursora avanza hasta carcinoma invasor o tiene regresión. Por ello es necesario caracterizar las alteraciones moleculares que se presentan en la progresión del CaCU, de esta manera es posible identificar potenciales marcadores moleculares para determinar el riesgo de progresión de las lesiones precursoras y/o marcadores de pronósticos y predictivos en CaCU. Actualmente, el único marcador (en cuanto a expresión) en CaCU aprobado en U.S.A. por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) es p16. El inhibidor de cinasas dependiente de ciclinas p16INK4a (CDKN2A) participa en el ciclo celular, éste se ha definido como marcador tumoral en el desarrollo del CaCU y se encuentra sobreexpresado en líneas celulares infectadas con VPH, determinándose más útil que la presencia del VPHar en el diagnóstico citológico (Rocha *et al.*, 2007).

En la actualidad, gracias a los avances y el desarrollo de nuevas tecnologías como los microarreglos de expresión, se ha logrado describir un gran número de genes que son alterados en la progresión de diversas neoplasias, como el CaCU (Zhai *et al.*, 2007; Pérez *et al.*, 2007; Vázquez *et al.*, 2007; Scotto *et al.*, 2008; Rajkumar *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2010; Imadome *et al.*, 2010), por lo cual actualmente, se tiene un gran número de potenciales biomarcadores en esta enfermedad, aunque es necesario validarlos y demostrar su papel funcional en el desarrollo neoplásico. Dentro de estos estudios cabe destacar la participación de diversos factores de transcripción, los cuales tienen un papel preponderante en el desarrollo neoplásico, como ya se ha demostrado por la inactivación de genes supresores de tumores como *TP53* y/o por la activación de oncogenes como *c-myc*. Otros factores de transcripción que no son catalogados como oncogenes o genes supresores de

tumor son también relevantes en el desarrollo neoplásico, tal es el caso de la familia de factores de transcripción *HOX*.

### i. Genes *HOX*

Los genes *HOX* son una familia de factores de transcripción involucrados en procesos de proliferación y diferenciación durante el desarrollo embrionario (Krumlauf, 1994). Estos factores de transcripción contienen una región de 61 aminoácidos formando 3  $\alpha$ -hélice (homeodominio), altamente conservada en diversas especies, las cuales se unen a secuencias específicas del DNA en varios genes blanco, regulando su expresión (Gehring *et al.*, 1994). Al menos 39 genes *HOX* han sido descubiertos en humanos, los cuales están organizados en 4 grupos homólogos (A-D), y localizados en las regiones 7p15.3, 17q21.3, 12q13.3 y 2q31 respectivamente en el genoma (Apiouet *al.*, 1996). Cada grupo contiene de 9 a 11 genes (parálogos) de acuerdo a su secuencia de nucleótidos, similitud y posición en el locus. La contraparte de los genes *HOX*(ortólogos) en *Drosophila* es el complejo *HOM-C* el cual consiste de los complejos *Antennapedia* (*ANT-C*) dentro del cual están los subgrupos *lab* (labial), *pb* (proboscipedia), *Dfd* (Deformed), *Scr* (Sex combs reduced) y *Antp* (Antennapedia) y el complejo *Bithorax* (*BX-C*) con sus subgrupos *Ubx* (Ultrabithorax), *abd-A* (abdominal-A) y *Abd-B* (Abdominal-B) (Figura 12).

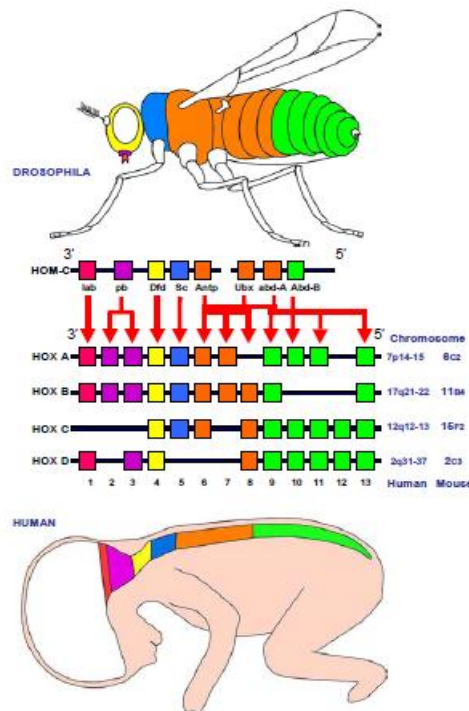


Figura 12. Conservación entre el cluster *HOM-C* y *HOX*. Los cuatro clusters de los genes *HOX* encontrados en mamíferos son conservados en el complejo *Hom-C* en



*Drosophila* en términos de secuencia de nucleótidos y expresión colinear. Durante el desarrollo embrionario, los genes se expresan correlacionándose a su posición cromosómica. Los genes 3' son expresados más tempranamente y anteriormente que los 5'. Tomado de Daftary *et al.*, 2008.

Durante el desarrollo embrionario, cada gen *HOX* es expresado bajo las reglas de colinearidad espaciotemporal de acuerdo a su posición dentro de cada grupo; es decir, los genes localizados en el extremo 3' son expresados tempranamente en la región anterior del eje rostro-caudal en el cuerpo del embrión, mientras que los genes localizados en el extremo 5' son expresados más tarde en la región caudal del embrión y la región distal de las extremidades (Krumlauf, 1994; McGinnis *et al.*, 1992). Los genes del extremo 5' (parálogos 9-13) homólogos al tipo Abdominal-B (Abd-B) en *Drosophila melanogaster* (Zeltser *et al.*, 1991) están involucrados en la diferenciación de estructuras genitourinarias en la región lumbosacra (Krumlauf, 1994; McGinnis *et al.*, 1992) y parece que juegan un papel importante en el mantenimiento y funcionamiento de algunas estructuras genitales adultas (Figura 14). La expresión de los genes *HOX* Abd-B como el *Hoxd10*, *Hoxd11*, *Hoxd12*, *Hoxd13* (Dollé *et al.*, 1991) y *Hoxa9*, *Hoxa10*, *Hoxa11*, *Hoxa13* (Taylor *et al.*, 1997) han sido reportadas en estructuras genitales de embriones de ratón, persistiendo la expresión de los genes *Hoxa9*, *Hoxa10*, *Hoxa11*, *Hoxa13* en tejidos adultos (Taylor *et al.*, 1997; Ma *et al.*, 1998).

La expresión de los genes *HOXA11* y *HOXA13* ha sido reportada en cérvix humano sugiriendo que la persistente expresión de estos genes en adultos puede jugar un importante papel en la plasticidad del tejido cervical durante el ciclo menstrual (Taylor *et al.*, 1997). También se ha sugerido que *HOXA10* (Taylor *et al.*, 1998; Cermik *et al.*, 2001) y *HOXA11* (Taylor *et al.*, 1999) juegan un importante papel en el desarrollo del endometrio y miometrio bajo la regulación de hormonas sexuales esteroideas (Figura 13).

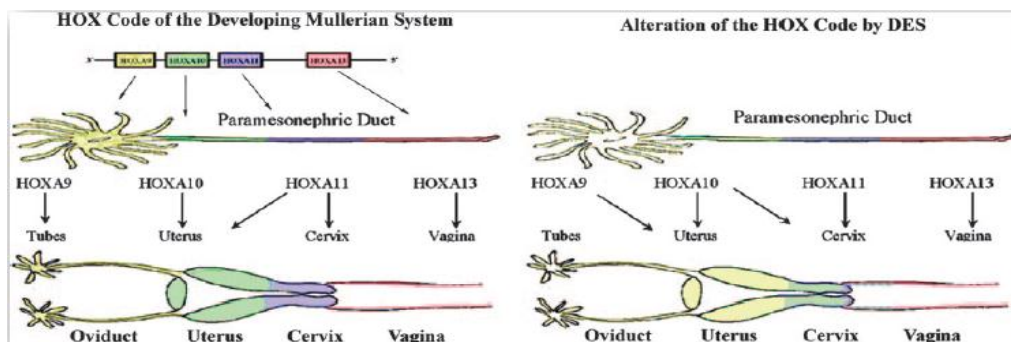


Figura 13. Expresión espacial de los genes homeóticos homólogos *HOXA9*, *HOXA10*, *HOXA11* y *HOXA13*. Desarrollo de los ductos paramesonéfricos humanos, donde



observamos las características de colinearidad de los genes del extremo 3' expresados anteriormente en el desarrollo de los oviductos mientras que los genes ortólogos del extremo 5' expresados posteriormente en el desarrollo vaginal (Daftary *et al.*, 2006).

Dicha expresión se sabe es controlada mediante los diferentes mecanismos de regulación entre otros factores endógenos hormonales, así como factores de regulación epigenética (Soshnikova *et al.*, 2009)

**j. Regulación de los genes *HOX*: Estrógenos, ncRNA, policomb y tritorax.**

Actualmente, se sabe que la expresión de los genes *HOX* durante el desarrollo es altamente regulada de manera espaciotemporal en parte mediante modificaciones químicas de histonas con capacidad de remodelación de la cromatina. Particularmente los productos de los genes del complejo policomb (PcG) y del complejo tritorax (TrxG) mantienen la apropiada expresión de los genes *HOX* durante subsecuentes estadios del desarrollo (Schwartz *et al.*, 2007).

Mientras las proteínas PcG mantienen a los genes *HOX* reprimidos (Simon *et al.*, 1992), los productos de los genes TrxG son requeridos para contrarrestar el silenciamiento mediante PcG y mantener a los genes *HOX* activos, si fuera necesario (Klymenko *et al.*, 2004).

Otro mecanismo que regula la expresión de los genes *HOX* es mediante la expresión de pequeños RNA no codificantes (ncRNA) entre ellos los micro RNAs (miRNAs), los cuales se unen a secuencias complementarias en la región no traducida (3' UTR) de los RNAm blancos inhibiendo la expresión mediante el bloqueo de la traducción de la proteína o induciendo la degradación del RNAm, de esta manera actúan como reguladores post-transcripcionales, modulando procesos fisiológicos y patológicos. Dentro del locus *HOX* se ha identificado la presencia de los miRNA, miR-196-1,2 y miR-10, los cuales regulan la expresión algunos genes *HOX* (Chopra *et al.*, 2006). En la actualidad se sabe que el miRNA-196 regula la expresión de *HOXA7* y los parálogos *HOXB8*, *HOXC8*, *HOXD8* (Yekta *et al.*, 2004) y *HOXB7* (Braig *et al.*, 2010), mientras que el miR10 regula la expresión de *HOXA1*, *HOXA3* y *HOXD10* (Ma *et al.*, 2007; Garzon *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2007)

Estudios recientes han dado evidencia de otros ncRNAs dentro del grupo *HOX*. Muchas de estas unidades de transcripción son antisentido a los genes *HOX* y contienen secuencias complementarias a los transcritos de *HOX*. Algunos de los transcritos primarios son policistrónicos (Mainguy *et al.*, 2007; Sessa *et al.*, 2006).

Así mismos la regulación de los genes *HOX* también es mediante lo estrógenos. Estos son necesarios para el desarrollo embrionario del tracto reproductivo femenino. La señalización de los estrógenos en los genes *HOX*es dependiente del ligando. Por ejemplo dietilstilbestrol (estrógeno no esteroide sintético) causa perturbación de la expresión de los genes *HOX*, resultando en anomalías en el desarrollo tracto reproductivo (Daftary, 2006). Los estrógenos ejercen sus efectos por la unión a los receptores de estrógenos (ER), los cuales actúan como factores de transcripción. De esta manera se sugiere que la expresión de los genes *HOX* es regulada por la combinación de ER, coactivadores y estrógenos (Block *et al.*, 2000).

#### **k. Genes *HOX* y el desarrollo del Cáncer**

En general, los genes *HOX*, están involucrados en procesos de proliferación, diferenciación y apoptosis durante el desarrollo, así como en algunos tejidos adultos, controlando la identidad celular, por lo cual pueden actuar como genes maestros (Daumas *et al.*, 2003; Gaurang *et al.*, 2006). Dichos procesos están relacionados con la carcinogénesis, por lo cual se sugiere que podrían tener un papel importante en el desarrollo del cáncer (Svingen *et al.*, 2006; Zhai *et al.*, 2007).

Se han descrito la participación de los genes *HOX* en diversos tipos de cáncer (De Grier, 2005; Abate-Shenet *et al.*, 2002), tales como leucemias (Starkova *et al.*, 2010), ovario (Hong *et al.*, 2010; Morgan *et al.*, 2010), colon, hígado (Kanai *et al.*, 2010) próstata (Miller *et al.*, 2003), pulmón (Plowright *et al.*, 2009), glioblastomas (Okamoto *et al.*, 2007). Algunas de las alteraciones descritas en los genes *HOX* en cáncer van desde sobre-expresión, disminución de la expresión y metilación de sus secuencias promotoras (Tabla 3).

La expresión de algunos miembros de esta familia está asociada con un mal pronóstico en algunos tipos de cáncer o como candidatos terapéuticos para erradicar el tumor, tal es el caso de la expresión de *HOXB13*, cuya expresión se encuentra relacionada a mal pronóstico en cáncer de próstata

(Schulz y Hatina, 2006). También se ha asociado con la proliferación e invasión en líneas celulares de cáncer de ovario (Miao *et al.*, 2007) y es un fuerte candidato comofactor de mal pronóstico en el cáncer de mama (Xiao-Jun *et al.*, 2006). Pacientes con cáncer de mama con sobre-expresión de *HOXB13* presentan baja respuesta al tratamiento con tamoxifeno, lo cual indica que la proteína *HOXB13* puede ser usado como marcador predictivo para respuesta al tratamiento (Jerevall *et al.*, 2010). Por otro lado, la expresión de *HOXC9* en glioblastomas se asocia al fenotipo de célula iniciadora o troncal de cáncer, lo cual podría ser usado como blanco terapéutico para erradicar el tumor (Okamoto *et al.*, 2007).

<b>Tabla 3. Función de los genes <i>HOX</i> en cáncer</b>					
<b>Tipo de tumor</b>	<b>Gen <i>HOX</i></b>	<b>Mecanismo del efecto de <i>HOX</i></b>	<b>Cambios en genes <i>HOX</i></b>	<b>Efecto</b>	<b>Referencia</b>
<b>Pulmón</b>	<i>HOXA1, HOXC5</i>	Dominancia génica	Sobre-expresión	Asociado con tumores primarios	Abe <i>et al.</i> , 2006
<b>Leucemia</b>	<i>HOXA9</i>	Desregulación tiempo-espacial	Sobre-expresión	Indicador de mal pronóstico para leucemia mieloide aguda	Golub <i>et al.</i> , 1999
	<i>HOXA9, HOXA10, HOXC6, MEIS1</i>	Dominancia génica	Sobre-expresión	Sobre-expresión por translocaciones con <i>MLL</i> en leucemia aguda; asociado con agresiva leucemia aguda linfocítica.	Armstrong <i>et al.</i> , 2002
<b>Mama</b>	<i>HOXA10</i>	Desregulación tiempo-espacio	Sub-expresión	Sub-expresión de p53 en tumores primarios positivos a RE.	Chu <i>et al.</i> , 2004
	<i>HOXA5</i>	Regulación epigenética	Metilación del promotor y sub-expresión	Sub-expresión de p53; decremento de RAR $\beta$ , a través de la caspasa 2 y 8	Chen <i>et al.</i> , 2005
	<i>HOXB13</i>	Dominancia génica	Sobre-expresión	Asociado con resistencia a tamoxifeno en tumores primarios positivos a RE; asociado a la invasión <i>in vitro</i> ; sub-regulación de RE	Wang <i>et al.</i> , 2007; Ma <i>et al.</i> , 2003; Jerevall <i>et al.</i> , 2008
<b>Ovario</b>	<i>HOXB13</i>	Dominancia Génica	Sobre-expresión	Asociado con tumores	Miao <i>et al.</i> , 2007

				primarios; sobre-expresión de RE y resistencia a tamoxifeno in vitro.	
<b>Próstata</b>	<i>HOXB13</i>	Desregulación tiempo-espacio	Sub-expresión	Pérdida de diferenciación; permite la transactivación de AR y proliferación	Jung <i>et al.</i> , 2004

## I. Genes *HOX* en CaCU

A la fecha solo ocho reportes han descrito alteraciones en la expresión de los genes *HOX* tanto en líneas celulares derivadas de cáncer cervical como en tejidos de CaCU.

Shim y cols. (1998) mediante arreglos de expresión de cDNA detectaron varios genes expresados solo en muestras con CaCU. El RNAm de dos genes *HOX* se encontraron expresados en CaCU. El RNAm de *HOXA1* se detectó sobre-expresado en muestras con cáncer, mientras que *HOXA7* se encontró sub-expresado en las mismas.

Alami y cols. (1999) determinaron que en la línea celular SiHa derivada de CaCU, el mensajero de *HOXA5* y *HOXA8* por RT-PCR se encuentran silenciados, por lo que podrían estar involucrados en el proceso de desarrollo de esta neoplasia.

Li y cols. (2002) mediante librerías de cDNA de la línea celular HeLa, derivada de un adenocarcinoma, detectó al transcrito *HOXD9*.

Hung y cols. (2003) encontraron que el RNAm de *HOXA1*, *B2*, *B4*, *C5*, *C10* y *D13* únicamente en líneas celulares de CaCU y no en tejidos cervicales normales; *HOXA9*, *A11*, *A13*, *B5*, *C4*, *D3* y *D9* en ambos grupos y el RNAm de *HOXA2*, *A3*, *A5*, *A6*, *A7*, *B1*, *C6*, *C8*, *C9*, *C12*, *C13*, *D1* y *D12* estuvo ausente en ambos grupos. Por otro lado, mutaciones somáticas en los genes *HOX* han sido reportadas en cáncer. En este estudio se encontró mutaciones en los exones 1 y 2 de los genes *HOXA10* y *HOXA13*, estas regiones están asociadas a la activación transcripcional mediante la unión al DNA. Así mismo, sus resultados mostraron una inserción de una base y/o sustitución en el intrón 1 de *HOXA13* en 4 de las 11 líneas celulares derivadas de cáncer

López y cols. (2006) Determinaron por PCR en punto final la expresión de los genes *HOXB13*, *C9*, *C11*, *C12*, *C13*, *D9*, y *D10a* nivel de RNAm en

tejidos con cáncer comparados con tejidos de cérvix normales en donde no se detectó el mensajero. Así mismo en ese mismo año, ese mismo grupo de trabajo encontró a los genes HOXB2, HOXB4 y HOXB13, otros miembros de esta misma familia, expresados a nivel de RNAm y sugiriendo su posible papel en el desarrollo de esta neoplasia (Figura 14).

Zhai y cols. (2007) realizaron la detección de 171 genes sobre-expresados en CaCU, dentro de los cuales se encontró a *HOXC10*. Se determinó la presencia de RNAm y proteína por PCR tiempo real e inmunohistoquímica, respectivamente. Así mismo, en ensayos funcionales se demostró que la expresión de esta proteína participa en la invasión.

Cantile y cols. (2009) determinaron mediante microarreglos de tejidos e inmunohistoquímica, la expresión de HOXD13 en 4000 tejidos de 79 tipos de tumores entre los que se encontraban cáncer mama, próstata, melanoma, astrocitomas y CaCU; así como sus correspondientes tejidos sin alteraciones neoplásicas. Los resultados obtenidos específicamente en cérvix, mostraron expresión de la proteína en tejidos con cáncer en contraste con tejidos normales.

De esta forma se ha postulado la expresión diferencial entre tejidos normales y con cáncer como un evento importante en la transformación y desarrollo del CaCU (Tabla 4).

<b>Tabla 4. Genes HOX y CaCU</b>				
	<i>HOX</i>	Expresión	Técnica	Referencia
<b>cDNA de tumores primarios</b>	<i>A1</i> <i>A7</i>	Sobre-expresión Sub-expresión	Microarreglos de expresión	Shim <i>et al.</i> , 1998
<b>Tejido con CaCU y líneas celulares de carcinoma y normales.</b>	<i>C5</i> , <i>C8</i>	Sobre-expresión	RT-PCR	Alami <i>et al.</i> , 1999.
<b>Línea celular HeLa</b>	<i>D9</i>	Sobre-expresión	Librería de cDNA RT-PCR	Li. <i>et al.</i> , 2002.
<b>Líneas celulares de carcinoma y adenocarcinoma</b>	<i>A1</i> , <i>B2</i> , <i>B4</i> , <i>C5</i> , <i>C10</i> , <i>D13</i>	Sobre-expresión	RT-PCR	Hung <i>et al.</i> , 2003.
<b>Tejidos con CaCU</b>	<i>B13</i> , <i>D9</i> , <i>D10</i> , <i>C9</i> , <i>C11</i> ,	Sobre-expresión	RT-PCR, Hibridación <i>in situ</i>	López <i>et al.</i> , 2006a

	<i>C12, C13</i>			
<b>Tejidos con CaCU</b>	<i>B2, B4, B13</i>	Sobre-expresión	RT-PCR, Hibridación <i>in situ</i>	López <i>et al.</i> , 2006b
<b>Tejidos con LIEAG y CaCU</b>	<i>C10</i>	Asociado a invasión.	RT-PCR Inmunohistoquímica Ensayos funcional	Zhai <i>et al.</i> , 2007
<b>Tejido con cáncer</b>	<i>D13</i>	Sobre-expresión	IHQ y MAT de tejidos	Cantile <i>et al.</i> , 2009

Sin embargo, el patrón de expresión *in situ* de los genes *HOX* en tumores primarios permanece poco conocido (López *et al.*, 2006a). Inclusive en el caso de la expresión diferencial del *HOXC12* el único reporte que hay es el de López y cols. (2006) en CaCU, por lo que el conocimiento de éste es muy escaso. Con la finalidad de describir el patrón de expresión de los genes *HOX* en lesiones precursoras y en CaCU, así como de determinar su papel como marcadores de progresión de las lesiones precursoras y/o marcadores de pronósticos y predictivos en CaCU, así como validar su probable implicación en el cáncer cervical; se evaluó la expresión de las proteínas de tres miembros de la familia Abd-B, *HOXC9*, *HOXD9* y *HOXC12* en tejidos libres de lesión (normal), lesiones precursoras y con carcinoma cervicouterino.

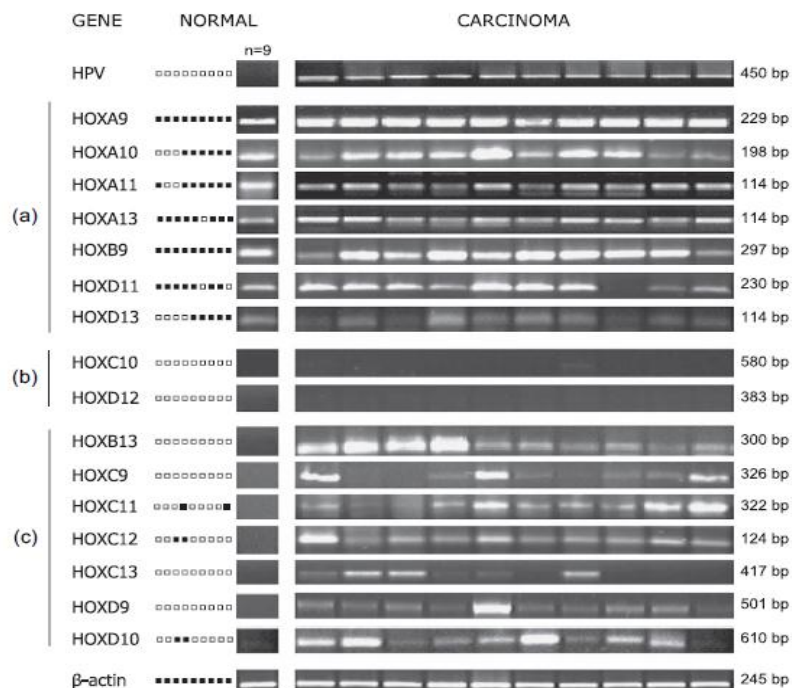


Figura 14. Expresión de los genes *HOX* del grupo Abd-B en tejidos normales y con carcinoma invasivo. Tomado de López *et al.*, 2006a.

## **2. JUSTIFICACIÓN**

Actualmente, el CaCU es un importante problema de salud. En México y en el mundo es la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres. Aunque el VPH es el principal factor etiológico involucrado en el desarrollo de esta neoplasia, son necesarios otros factores y alteraciones moleculares para el desarrollo de cáncer. Por este motivo es necesario identificar las alteraciones moleculares que caracterizan a la transformación neoplásica, dichas alteraciones además puedan ser de utilidad diagnóstica y/o pronóstico. Los genes *HOX* codifican a factores de transcripción involucrados en el desarrollo embrionario, y se ha observado alteración en su expresión en diferentes tipos de cáncer como: mama, pulmón, próstata, ovario, entre otros; sin embargo, la expresión de estos factores de transcripción en CaCU ha sido muy poco estudiada. Estudios previos mostraron expresión diferencial del RNAm de *HOXC9*, *HOXC12* y *HOXD9* (RT-PCR en punto final) en CaCU y tejido cervical normal. Sin embargo, a la fecha no se ha estudiado la expresión y localización de las proteínas codificadas por dichos genes en lesiones precursoras y CaCU, por lo cual es necesario identificar dichas proteínas en las diferentes etapas de ésta neoplasia. En este trabajo se propone identificar a las proteínas HOXC9, HOXD9 y HOXC12 en epitelio sin alteraciones neoplásicas, lesiones precursoras y CaCU, así como su posible relación con VPH, lo cual permitirá conocer las alteraciones en la expresión de estos factores de transcripción, así como su posible papel como biomarcadores en el desarrollo del CaCU.

## **3. HIPÓTESIS**

La expresión de las proteínas HOXC9, HOXC12 y HOXD9 aumentará en la progresión del CaCU.

## **4. OBJETIVOS**

### **a. Objetivo General**

Identificar la expresión de las proteínas HOXC9, HOXD9 y HOXC12 en lesiones precursoras de cáncer cervical y cáncer cervicouterino y su posible asociación con el VPH.

**b. Objetivos particulares**

- ✓ Identificar la expresión de las proteínas HOXC9, HOXC12 y HOXD9 en epitelio cervical sin alteraciones neoplásicas, lesiones precursoras y CaCU.
- ✓ Identificar la presencia de VPH.
- ✓ Determinar si hay alguna asociación entre la expresión de las proteínas HOXC9, HOXD9 y HOXC12 y el VPH.
- ✓ Determinar la asociación entre la expresión de las proteínas HOXC9, HOXD9 y HOXC12 y el diagnóstico histopatológico.

**5. MATERIALES Y MÉTODOS**

**a. Tipo de estudio:** Estudio retrospectivo, observacional de casos y controles. Un estudio de **casos y controles**, es un estudio observacional. Donde se define a un caso como: biopsias con diagnóstico histopatológico de LIEBG, LIEAG y CaCU; y como control tejidos del cérvix uterino libres de alteraciones neoplásicas o histopatológicamente normales

**b. Criterios de inclusión**

- Como control: Biopsias incluidas en parafina con diagnóstico histopatológico libre de alteraciones neoplásicas.
- Como casos: Biopsias incluidas en parafina de lesiones precursoras con diagnóstico histopatológico LIEBG o NIC I y LIEAG o NIC II-NIC III y carcinoma cervicouterino tipo epidermoide.
- Que en ambos casos (casos y controles) el material biológico ya haya sido utilizado para el diagnóstico histopatológico.

**c. Criterios de exclusión**

- Que hayan recibido tratamiento previo a la toma de biopsia.
- Diagnóstico histopatológico adenocarcinoma.
- Que la cantidad de material sea escaso.

**d. Aspectos éticos**

Este estudio es de tipo retrospectivo a partir de muestras de archivos de patología y se desarrolló bajo las recomendaciones de diversas organizaciones internacionales (Human Genome Organization (HUGO), UNESCO - International Bioethics Committee, Organización Mundial de la Salud (OMS)



Council of Europe), las cuales aprueban el uso de material de archivos de patología bajo los siguientes criterios sin necesidad de consentimiento informado:

- Que el material usado no comprometa el diagnóstico.
- Que se mantenga la identidad de las pacientes en confidencialidad.

Este protocolo está aprobado por el Comité Local de Investigación en Salud con No. de Registro R-2008-3602-3.

#### **e. Colecta de muestras**

Se colectaron 514 biopsias de tejido cervical embebidas en parafina de los archivos de patología, de las cuales 97 fueron muestras sin alteraciones neoplásica, 81 muestras de LIEBG, 211 muestras con LIEAG y 125 muestras con CaCU.

Se realizaron cortes histológicos a 4  $\mu\text{m}$  en un micrótomo marca Leica modelo RM 2125, éstos se desparafinaron a 60° C por 20 minutos, después se colocaron en xilol por 10 minutos. Posteriormente se hidrataron con una serie de alcoholes graduales (etanol absoluto, etanol al 96%, etanol al 70% y agua destilada), por 2 minutos cada uno. Los tejidos se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (HE) para identificar la región de interés. Los tejidos se introdujeron en hematoxilina de Harris por 1 minuto y después se lavaron con agua corriente hasta virar, se contrastaron con Eosina por 1 minuto, se enjuagaron en agua corriente y posteriormente se deshidrataron con alcoholes graduales (agua destilada, etanol al 70%, etanol al 96%, etanol absoluto), cada uno por 2 minutos y xilol. Finalmente se realizó el montaje con resina sintética y cubreobjetos. El diagnóstico histopatológico fue corroborado y la selección de las zonas de representativas fue seleccionada por un patólogo.

#### **f. Construcción de microarreglos de tejidos (MAT)**

Después de identificar la región de interés, se realizó la construcción de los microarreglos de tejidos con el equipo marca CHEMICON ATA-100. Para ello se obtuvieron cilindros de 1 mm de diámetro, los cuáles fueron representativos de la lesión de interés (bloque donador). El cilindro fue colocado en un cubo de parafina blanco (bloque receptor) el cual poseía una matriz de perforaciones previamente diseñada. Una vez que se insertaron todos los cilindros de tejidos en el microarreglo, se sellaron cubriendo con una

capa de parafina la superficie del bloque sobre los cilindros. Posteriormente, se realizaron cortes histológicos a 4 µm con el micrótomo y se colocaron sobre laminillas electrocargadas para realizar la inmunohistoquímica.

**g. Detección de las proteínas HOXC9, HOXD9 y HOXC12 por inmunohistoquímica.**

Para llevar a cabo la técnica de inmunohistoquímica, se realizó la estandarización de la concentración de los anticuerpos monoclonales HOXC9 clona HOXCA6E6 (1:100), HOXD9 clona H-2 (1:100) y HOXC12 clona LX-O (1:100) de Santa Cruz Biotechnology en tejidos de cérvix.

Los cortes obtenidos de los microarreglos fueron desparafinados e hidratados como anteriormente se describió. Los cortes ya hidratados se colocaron en amortiguador de fosfatos salino (PBS) pH 7.2, posteriormente se realizó la recuperación antigénica con Trilogy 1X (CellMark) en una olla de presión (aprox. 100° C) por 15 minutos. Los cortes se lavaron con amortiguador PBS, se incubaron a 37° C durante 1 hora con el anticuerpo primario. El sistema de detección utilizado fue de peroxidasa de rábano acoplada a un anticuerpo secundario el cual fue revelado con diaminobenzidina (DAB). Los tejidos fueron contrastados con Hematoxilina, y deshidratados con alcoholes graduales (agua destilada, Etanol al 70%, 96%, Etanol Absoluto), cada uno por dos minutos, aclarados en xilol y montados con resina sintética.

Posteriormente se hizo el análisis de la reacción, valorada como positiva o negativa. Dados los resultados, posteriormente se realizó un método semicuantitativo para evaluar la expresión de las proteínas, reportado previamente por Saegusa (1999) que consiste en asignar valores por porcentaje (%) de células positivas y por intensidad de reacción:

Para el % de células positivas

- 0= Tinción totalmente negativa
- 1= Tinción esporádica menor de 10% de células.
- 2= Tinción heterogénea menor de 30% de células
- 3= Tinción en más del 30% y menor del 70% de células.
- 4= Tinción positiva en más del 70% de células.

Para la intensidad

- 0= Negativa
- 1= Leve

2= Moderada

3= Intensa

El valor final se asignó, multiplicando los valores de ambos parámetros tomando en cuenta la reacción obtenida en los epitelios, donde el valor máximo es 12. La evaluación se hizo comparando los resultados de dos observadores. Para determinar las diferencias entre los grupos se realizó un análisis de ANOVA.

#### **f. Extracción de DNA**

Se utilizó el estuche comercial Wizard de Promega. Se realizaron cortes histológicos de 10 µm, los cuáles se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 ml para la extracción de DNA. Se desparafinaron e hidrataron como se describió previamente. Se agregó 300 µl de Buffer de lisis nuclear y 20 µl de proteinasa K para desnaturalizar las proteínas, se incubaron a 55° C durante toda la noche. Se agregaron 3 µl de RNAsa por 15 minutos. Posteriormente se adicionaron 200 µl de solución de precipitación de proteínas y se centrifugó a 10000 gravedades por 15 minutos. El sobrenadante se recuperó y se agregaron 600 µl de isopropanol para la precipitación del DNA, para después centrifugar a 16000 gravedades por 5 min. Se descartó el sobrenadante, se lavó el botón de DNA con etanol al 70% y centrifugó a 16000 gravedades por 2 min. (2 repeticiones) y se dejaron secar. Una vez seco el DNA se hidrató con 50 µl de agua libre de DNAsas.

#### **g. Cuantificación y verificación de DNA**

La integridad del DNA obtenido de cada una de las muestras fue verificada en un gel de agarosa al 1%. Se cuantificó el DNA en el equipo Nanodrop (Spectrophotometer ND 1000) a una absorbancia de 260/280. Las muestras con DNA mayor a 30 ng/µL fueron incluidas para el análisis de VPH.

#### **h. Detección de VPH**

Para la detección genérica del VPH, se realizó PCR con los iniciadores GP5+ (S) 5' TTTGTTACTGTGGTAGATACTA 3' y GP6+ (A) 5' GAAAATAAACTGTAAATCATATTC 3', los cuales amplifican una región del gen L1 de 150 pb. Las concentraciones finales utilizadas fueron Amortiguador de Taq pol 1X, dNTPs 0.2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, iniciadores 25 pmol, Taq

polimerasa 1U y 150 ng de DNA. Las condiciones de amplificación fueron 1 ciclo a 94°C durante 4 minutos (desnaturalización), 40 ciclos a 94°C por 40 segundos, 40°C por 1 minuto y 72°C por 40 segundos (alineación) y 1 ciclo a 72 °C por 4 minutos (extensión final). Los productos de la PCR se analizaron por electroforesis en gel agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio y visualizado con transiluminación por UV. Como control positivo se utilizó DNA de la línea celular inmortalizada HeLa, en cuyo genoma hay sitios de integración de secuencias del VPH-18 y como control negativo la mezcla de la PCR solamente.

En las muestras positivas para VPH, se realizó tipificación viral por PCR convencional de la región de 126 pb del gen E6 del tipo viral 16, ya que según lo reportado en la literatura este tipo de VPH es el de mayor frecuencia en CaCU y sus lesiones precursoras (Zehbe y Wilander, 1997; Nakagawa *et al.*, 2002). VPH16 iniciadores: (S) 5' ATCATCAAGAACACGTAGAG 3' y (A) 5' GATCAGTTGTCTCTGGTTGCAAAT 3'. Las concentraciones finales utilizadas fueron Amortiguador de Taq pol 1X, dNTPs 0.2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, Iniciadores 25 pmol, Taq polimerasa 1U y 150 ng de DNA. Las condiciones de amplificación fueron 1 ciclo a 95°C durante 3 minutos (desnaturalización), 39 ciclos a 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos (alineación) y 1 ciclo a 72 °C por 5 minutos (extensión final). Los productos de la PCR fueron analizados por electroforesis en gel agarosa al 1.5 %, teñido con bromuro de etidio y visualizado con transiluminador UV. Como control positivo se utilizó DNA de la línea celular CaSki, en cuyo genoma hay sitios de integración de secuencias del VPH-16 y como control negativo la mezcla de la PCR.

Se realizó una PCR por tercera ocasión para determinar si el DNA de los casos VPH negativos era amplificable o no. Los iniciadores usados fueron de DNA mitocondrial de la región D-Loop $mt3F3$  (5'-CGTACATTACTGCCAGCCACCAT -3') y  $mt3R3$  (5'-GGTGGCTTTGGAGTTGCAGTTG-3'). Las concentraciones finales utilizadas fueron Amortiguador de Taq pol 0.2X, dNTPs 0.2 mM, MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM, Iniciadores 0.25 pmol, Taq polimerasa 0.1 U y 150 ng de DNA. Como control positivo se usó DNA de CaSki (VPH-16) y como control negativo la mezcla de PCR solamente. Las condiciones de amplificación fueron 1 ciclo a 94°C durante 4 minutos (desnaturalización), 33 ciclos a 94°C por 35 segundos, 63°C

por 21 segundos y 72°C por 1 min (alineación) y 1 ciclo a 72 °C por 4 minutos (extensión final). Los productos amplificados (166pb) fueron analizados en un gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio y visualizado por UV en un transiluminador. Las muestras que resultaron negativas fueron excluidas del estudio por la mala calidad del DNA.

**i. Análisis de datos**

Se determinó la presencia y/o ausencia de las proteínas en las muestras de las diferentes lesiones precursoras del cérvix y se realizó un análisis estadístico de X<sup>2</sup> (Ji cuadrada) para determinar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos estudiados con ayuda del paquete estadístico SPSS v15.0.

## RESULTADOS

### a. Recolección de muestras

Se realizó la búsqueda y recolección de las muestras de tejidos de cérvix uterino incluidos en parafina, en los archivos de patología del Hospital de Gineco-Obstetricia No. 4 “Luis Castelazo Ayala”, IMSS.

Un total de 514 muestras fueron colectadas, de acuerdo con el diagnóstico histopatológico 97 (19%) son epitelios sin neoplasia, 81 (16%) epitelios con LIEBG, 211 (41%) epitelios con LIEAG y 125 (24%) epitelios de CaCU. También se colectaron tejidos incluidos en parafina de cáncer de mama, ovario, pulmón y próstata para utilizarse como tejidos control.

### b. Cortes histológicos

Se realizaron cortes histológicos de 4  $\mu\text{m}$  de grosor de las muestras colectadas por duplicado, para tinción con hematoxilina y eosina (H-E) y para extracción de DNA.

Los cortes histológicos para la tinción de H-E fueron teñidos y fueron analizados por un patólogo identificando la región representativa de acuerdo al diagnóstico de la muestra de tejido o bloque.

### c. Extracción de DNA y tipificación de VPH

Se realizó la extracción de DNA de todas las muestras colectadas. La integridad del DNA fue verificada por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% y visualizados en un transiluminador. El DNA obtenido de las muestras incluidas en parafina aunque son de bajo peso molecular debido al método de fijación de los tejidos es de buena calidad (Figura 15). Se cuantificó el DNA con ayuda del espectrofotómetro NanoDrop 1000 a una absorbancia de 260/280 y una pureza obtenida de 1.7-2.1 indicando que la mayoría de las muestras de DNA son de buena calidad.

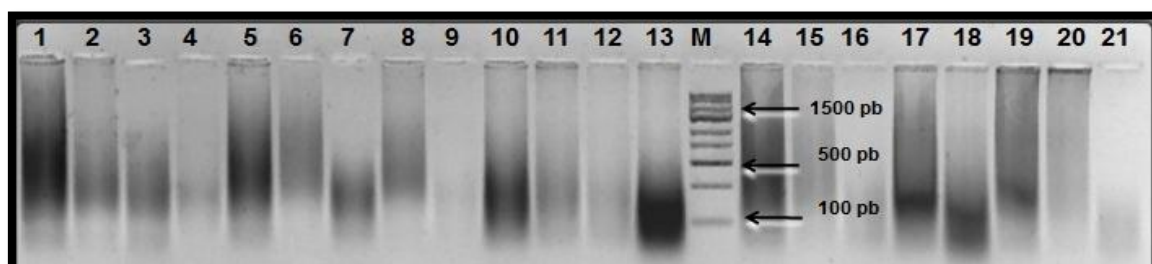


Figura 15. Electroforesis de DNA de las muestras procesadas por el método de formol-parafina. Se observan los pozos enumerados del 1-21 de algunas muestras escogidas

al azar que se analizaron, en el pozo M se observa el marcador de peso molecular. Gel de agarosa al 1.5%.

Se excluyeron 191 muestras debido a baja concentración de DNA menor a 30 ng/μL. Para la amplificación de DNA por PCR se eligieron 65 muestras de tejido sin alteraciones neoplásicas, 37 muestras con LIEBG, 114 muestras con LIEAG y 107 muestras con CaCU, los datos se pueden observar en la Tabla 5.

<b>TABLA 5. Muestras seleccionadas para amplificación de DNA</b>		
<b>Diagnóstico</b>	<b>Muestras totales</b>	<b>Muestras DNA&gt;30ng/μl</b>
Normal	97	65
LEIBG	81	37
LIEAG	211	114
CaCU	125	107
TOTAL	514	323

LIEBG: Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado.  
 LIEAG: Lesión escamosa intraepitelial de alto grado.  
 CaCU: Cáncer cervicouterino.

La amplificación del DNA con iniciadores Gp5+/Gp6+ se observan en la figura (Figura 16), se obtuvo la banda esperada de 150 pb indicando presencia de VPH en las muestras.

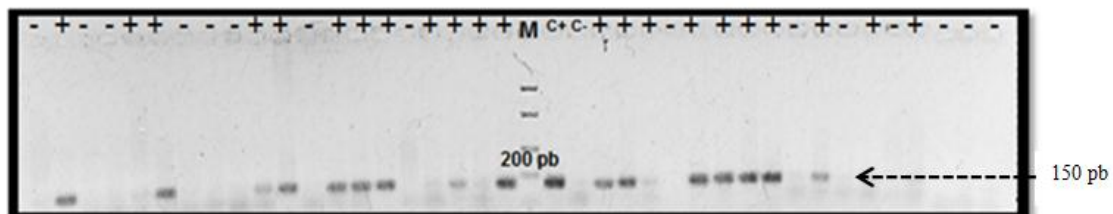


Figura 16. Detección de VPH por iniciadores consenso GP5+/GP6+. Marcador de peso molecular (200 pb). Control positivo DNA de la línea celular Hela (VPH-18). Control negativo (Mezcla de PCR). Producto amplificado de 150 pb.

Posteriormente, se realizó una PCR para las muestras positivas a VPH para determinar si las muestras positivas a VPH tenían el tipo 16 ya que según lo reportado en la literatura este es el más común en lesiones precursoras y CaCU (Zehbe y Wilander, 1997; Nakagawa *et al.*, 2002). En la figura (Figura 17) se observan los productos de 126 pb amplificados para E6 de HPV16, lo cual nos indica que las muestras positivas están infectadas con VPH16.

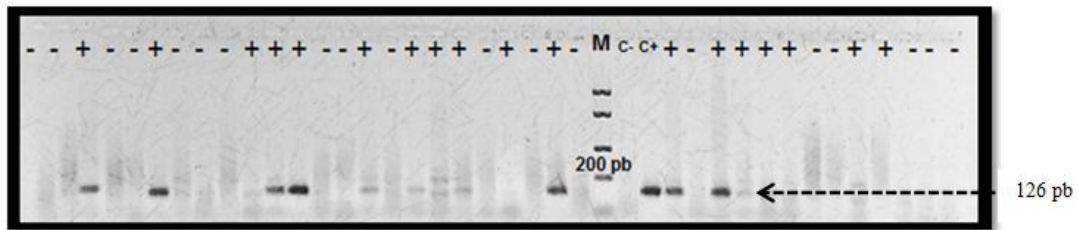


Figura 17. Detección de HPV-16 por iniciadores de E6 del tipo viral 16. Marcador de peso molecular (200 pb). Control positivo DNA de la línea celular CaSki (VPH-16). Productos amplificados de 126.

Finalmente se realizó una PCR con iniciadores de DNA mitocondrial de la región D-Loop a las muestras que resultaron negativas para VPH-16 y VPH, para verificar que las muestras realmente son negativas o la calidad del DNA no es buena (Figura 18). Las muestras que resultaron negativas en esta PCR fueron excluidas del estudio.

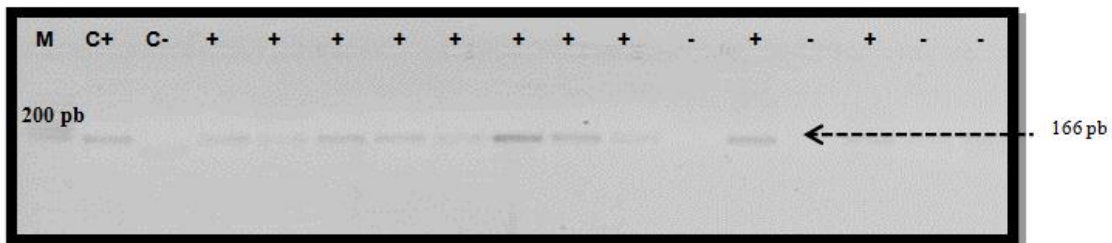


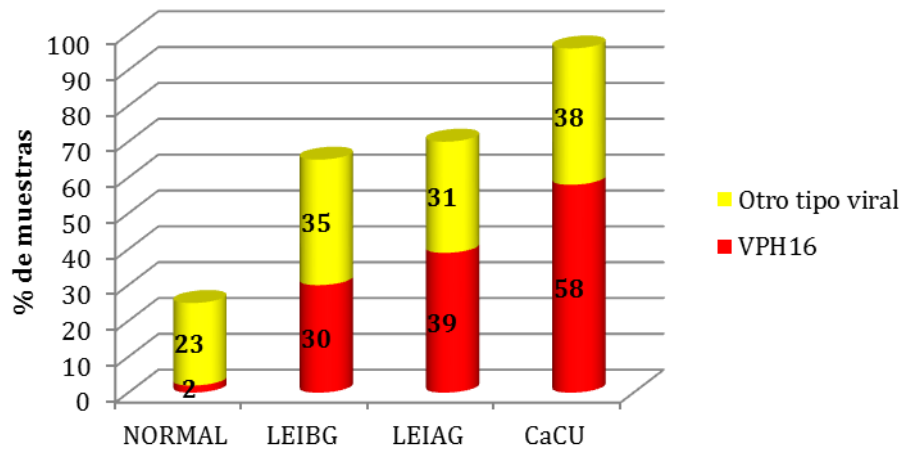
Figura 18. Fragmentos amplificados (166 pb) de DNA mitocondrial de la región D-Loop. Marcador de peso molecular (200 pb). Control positivo DNA de CaSki (VPH-16).

En general, la presencia de VPH en tejidos sin alteraciones neoplásicas se detectó en 25% (16/65), en LIEBG 65% (24/37), en LIEAG 70% (77/114) y en CaCU 96% (103/107).

En tejidos sin alteraciones neoplásicas el 2% (1/65) son positivas a VPH16 y el 23% (15/65) tienen otro tipo viral. En tejidos con LIEBG el 30% (11/37) son positivas a VPH16 y el 35% (13/37) tienen otro tipo viral. En tejidos con LIEAG el 31% (44/142) son positivas a VPH16 y el 39% (55/142). En tejidos con CaCU el 58% (62/107) son VPH16 y 38% (41/107) son positivas otro tipo viral (Gráfica 1).



## Tipo de VPH



Gráfica 1. Presencia de VPH en tejidos sin alteraciones neoplásicas, LIEBG, LIEAG y CaCU,

### d. Construcción de microarreglos de tejidos (MAT)

Para la construcción de microarreglos de tejidos se seleccionaron 174 muestras: 28 sin alteraciones neoplásicas, 44 LIEBG, 9 LIEAG y 93CaCU tomando en cuenta que la cantidad de tejido fuera suficiente. Se marcaron los tejidos para la construcción de microarreglos de tejidos (Figura 19). Se diseñó una matriz con sistema de coordenadas para la fácil detección de los tejidos, también se añadieron tejidos control de tejidos incluidos en parafina de cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de mama y cáncer de ovario (Figura 20). En total se realizó la construcción de 5 microarreglos de tejidos.



Figura 19. A) Construcción de los microarreglos de tejidos construidos donde se observa la organización de los tejidos en los bloques los cuales son de aproximadamente 1 mm de diámetro y se encuentran colocados en hileras. B) Microarreglador de tejidos ATA-100 de Chemicon con el cual se realizó la construcción de los mismos.

MICROARREGLO G4-2													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<b>A</b>	B06-6825-29	B06-6825-29	B05-8382-7	B05-8382-7	B02-1748-1	B02-1748-1	B02-1748-1	B02-1748-1	B06-6825-36	B06-6825-36	B06-6825-36	B06-6825-36	B06-6825-36
<b>B</b>	B06-4801-21	B06-6825-10	B06-6825-10	B06-6825-10	B05-8382-1	B05-8382-1	B05-8382-1	B05-8382-1	B08-6114-2	B08-6114-2	B08-6114-2	B06-6559-1	B06-6559-1
<b>C</b>	B06-4801-21	B06-4801-21	B06-4801-21	B06-6559-14	B06-6559-14	B06-6559-14	B06-2618-1	B06-2618-1	B06-2618-1	B01-3102-1	B01-3102-1	B01-3102-1	B02-1748-9
<b>D</b>	B06-2618-4	B06-2618-4	B08-4768	B06-6825-1	B06-6825-1	B01-1229	B01-1229	B06-2018-1	B06-2018-1	B02-8680-3	B02-8680-3	B02-5353	B02-5353
<b>E</b>		CT CaOE PM	CT CaOes mB	CT Mama	CT Mama	B01-5065-2	B01-5065-2	B01-5065-2	B02-4112	B02-4112	B02-4112		
<b>F</b>		B06 6559-3	B07-7756	B07-7756	B02-1748-8	B02-1748-8	B02-1748-8	B02-1748-8	B05-8680-1	B05-8680-1	B05-8680-1		
<b>G</b>		B06 6559-3	B01-1135	B01-1135	B06-2018-2	B06-2018-2	B06-6825-3	B06-682-3	B08-6341	B01-5065-1	B01-5065-1		
<b>H</b>		CT Mama	CT Pulmón	CT Ovario	CT mama	B08-6114-1	B08-6114-1	B01-3102-26	B08-10422	B08-10422	B01-5065-1		
<b>I</b>		CT Mama	CT Pulmón	CT Cérvix									

Figura 20. Matriz de un microarreglo de tejidos. Se indica el nombre del microarreglo en la parte superior de la tabla, el número de identificación de la muestra de donde proviene el tejido y los controles (color naranja) incluidos en el microarreglo con base en un sistema de coordenadas.

#### e. Expresión de las proteínas HOXC9, HOXC12 y HOXD9.

Se realizaron cortes histológicos de los microarreglos de tejidos a 4 µm, se realizó la técnica de inmunohistoquímica a cada uno de éstos con anticuerpos específicos para HOXC9 clona HOXCA6E6 (Santa Cruz Biotechnology Inc.), HOXC12 clona LX-O (Santa Cruz Biotechnology Inc.) y HOXD9 clona H-2 (Santa Cruz Biotechnology Inc.). En todos los casos la dilución óptima fue 1:100.

Se tomó como positiva (color café) la expresión de las proteínas HOX de cada una de las pruebas de inmunohistoquímica cuando la expresión de éstas se encontró en al menos 10% de las células epiteliales. El resultado de la expresión de las proteínas HOXC9, HOXC12 y HOXD9 en tejido sin alteraciones neoplásicas, LIEBG, LIEAG y en CaCU se describen a continuación.

- **EXRESIÓN DE LA PROTEÍNA HOXC9**

Como control de la expresión de la proteína HOXC9 se utilizó la línea celular derivada de CaCU (HeLa) (Figura 21).

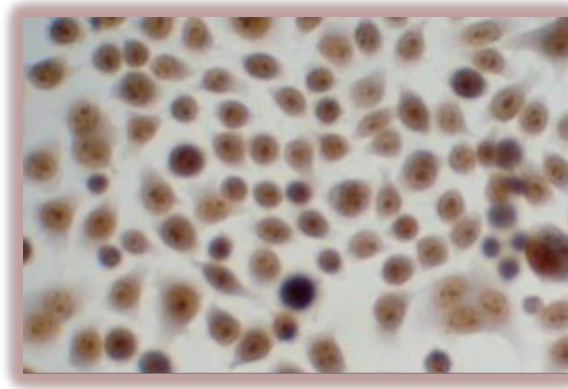
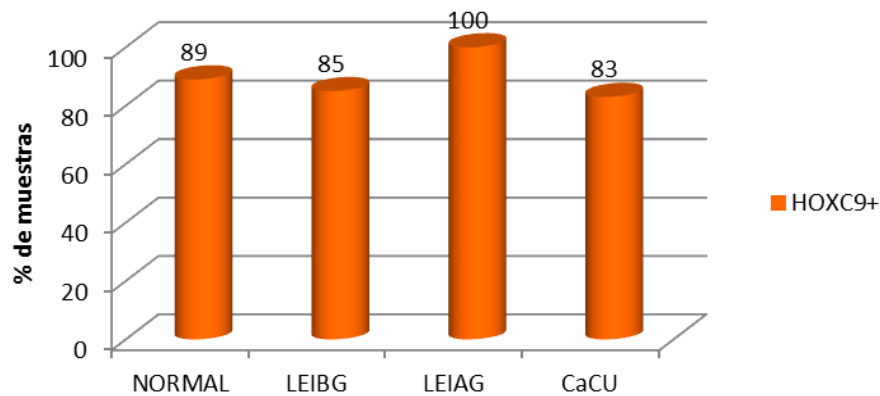


Figura 21. Expresión de la proteína HOXC9 en línea celular de cáncer de cérvix HeLa (VPH-18).

Se evaluó la expresión de HOXC9 en los diferentes grados de lesión. La expresión de la proteína en muestras sin alteraciones neoplásicas se encuentra en el 89% de las muestras, en LIEBG en el 85%, en LIEAG en el 100% y en CaCU en el 83% de las muestras analizadas (Gráfica 2).

### Expresión de HOXC9 en lesiones del cérvix uterino



Gráfica 2. Expresión nuclear de la proteína HOXC9 en lesiones del cérvix uterino. Se consideró baja y alta expresión.

Contrario a lo esperado en los tejidos sin alteraciones neoplásicas identificamos expresión de la proteína HOXC9 principalmente en los núcleos de las células basales, parabasales y algunas células del estroma, sin embargo hubo casos en los que la expresión de la proteína fue negativa en el epitelio (Figura 22). En general 89% de las muestras analizadas sin alteraciones neoplásicas fueron positivas a la proteína HOXC9 y 11% fueron negativas.

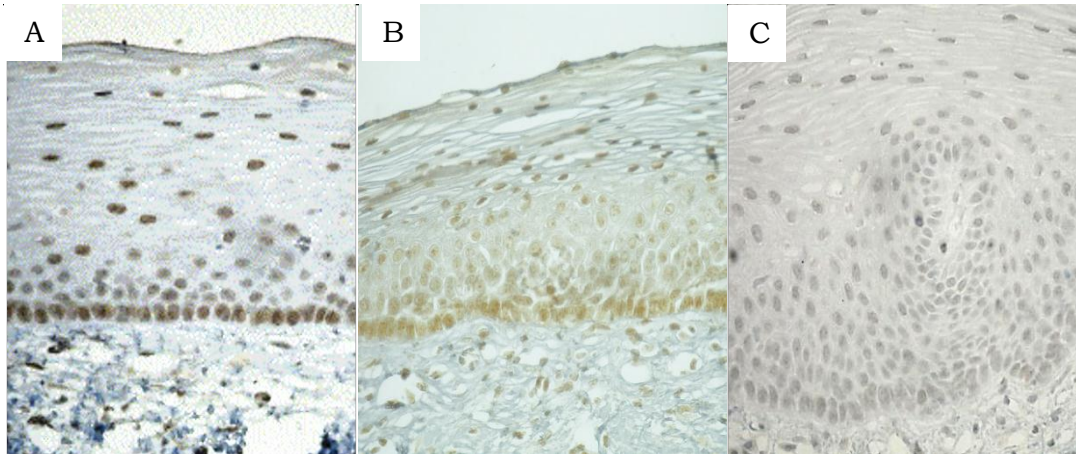
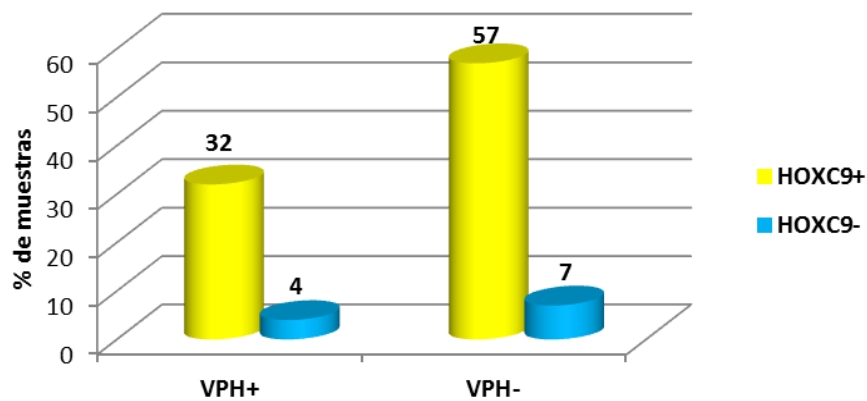


Figura 22. Expresión nuclear de la proteína HOXC9 en tejidos sin alteraciones neoplásicas. A) Expresión positiva nuclear. B) Baja expresión. C) Expresión negativa nuclear.

Por otro lado se determinó la presencia de VPH en las muestras con expresión positiva y negativa de la proteína HOXC9. El 32% de las muestras positivas a HOXC9 también fueron positivas a VPH. El 57% de las muestras negativas a HOXC9 fueron negativas a VPH (Tabla 6; Gráfica 3).

<b>Tabla 6. Expresión nuclear de HOXC9 en tejidos sin alteraciones neoplásicas</b>		
<b>n=28</b>	<b>VPH+</b>	<b>VPH-</b>
<b>HOXC9+</b>	5	9
<b>HOXC9-</b>	1	2
<b>HOXC9 Baja Expresión</b>	4	7

### Expresión nuclear de la proteína HOXC9 en tejidos sin alteración neoplásica y VPH



Gráfica 3. Expresión nuclear de la proteína HOXC9 en muestras sin alteración neoplásica, asociadas a VPH. Los datos no resultaron estadísticamente significativos  $p=0.584^*$  (\*Corrección de Yate's).

En tejidos con LIEBG se identificó la expresión de la proteína HOXC9 principalmente en los núcleos de las células basales, parabasales, superficiales y algunas células del estroma, sin embargo hubo casos en los que la expresión de la proteína fue negativa en el epitelio (Figura 23). En general 85% de las muestras analizadas fueron positivas a HOXC9 y 15% fueron negativas (Gráfica 2).

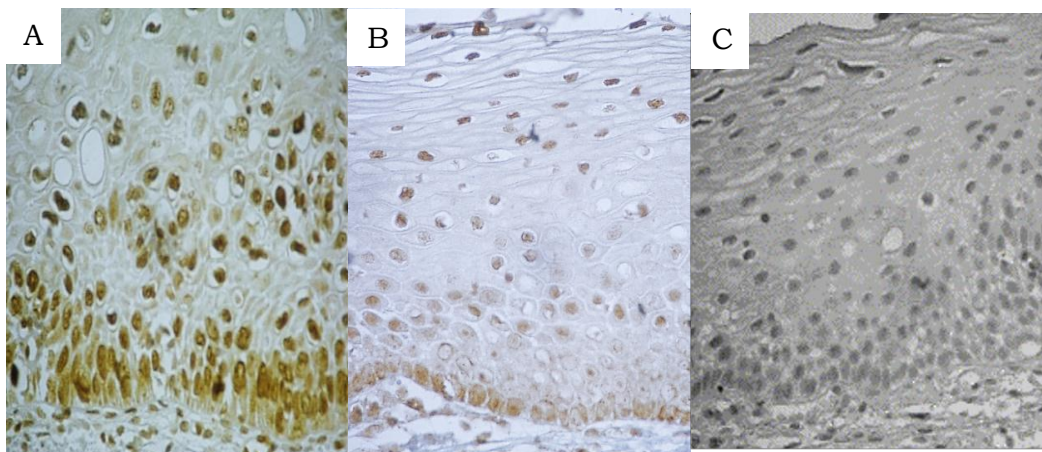
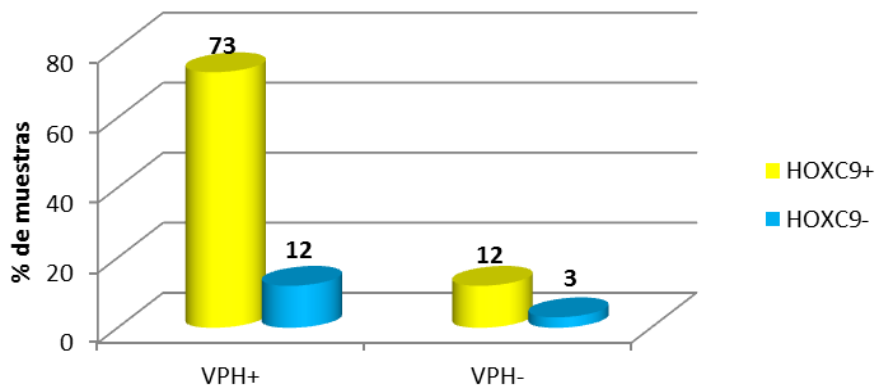


Figura 23. Expresión nuclear de la proteína HOXC9 en LIEBG. A) Expresión positiva nuclear. B) Baja expresión nuclear. C) Expresión negativa nuclear.

En LIEBG el 73% de las muestras que son positivas nucleares a la proteína HOXC9 además de positivas a VPH. Mientras que el 12% de las muestras positivas a HOXC9 son negativas a VPH (Tabla 7) (Gráfica 4).

Tabla 7. Expresión nuclear de HOXC9 en LIEBG		
n=41	VPH+	VPH-
HOXC9+	23	3
HOXC9-	5	1
HOXC9 Baja Expresión	7	2

### Expresión nuclear de la proteína HOXC9 en LIEBG y VPH



Gráfica 4. Expresión nuclear de la proteína HOXC9 en LIEBG y VPH. Los datos no fueron estadísticamente significativos  $p=0.249^*$  (\*Corrección de Yate's).

En tejidos con LIEAG se identificó la expresión de la proteína HOXC9 en casi todos los núcleos de las células epiteliales y algunas células del estroma, sin embargo hubo casos en los que la expresión de la proteína fue negativa en el epitelio (Figura 24). En general 100% de las muestras analizadas fueron positivas a HOXC9.

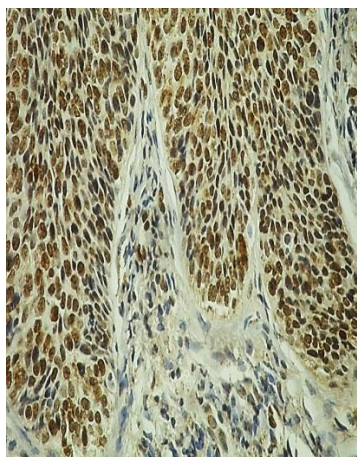


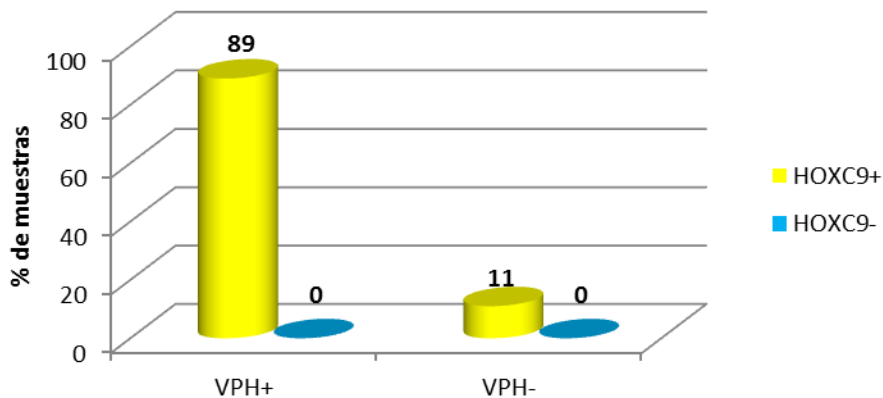
Figura 24. Expresión nuclear de la proteína HOXC9 en LIEAG.

En LIEAG el 89% mostró infección por VPH mientras que 11% de las muestras fueron negativas a VPH (Tabla 8) (Gráfica 5).



Tabla 8. Expresión nuclear de HOXC9 en LIEAG		
n=9	VPH+	VPH-
HOXC9+	8	1
HOXC9-	0	0
HOXC9 Baja Expresión	0	0

### Expresión nuclear de la proteína HOXC9 en LIEAG y VPH



Gráfica 5. Expresión nuclear de la proteína HOXC9 en LIEAG y VPH. Los datos fueron estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ).

Finalmente del 83% de las muestras positivas a la proteína HOXC9, el 60% mostró alta expresión (figura 25A) en todas las células neoplásicas en los tejidos de CaCU, mientras que en el 23% de los casos hubo baja expresión (Figura 25B) y 17% fue negativa (Figura 25C).

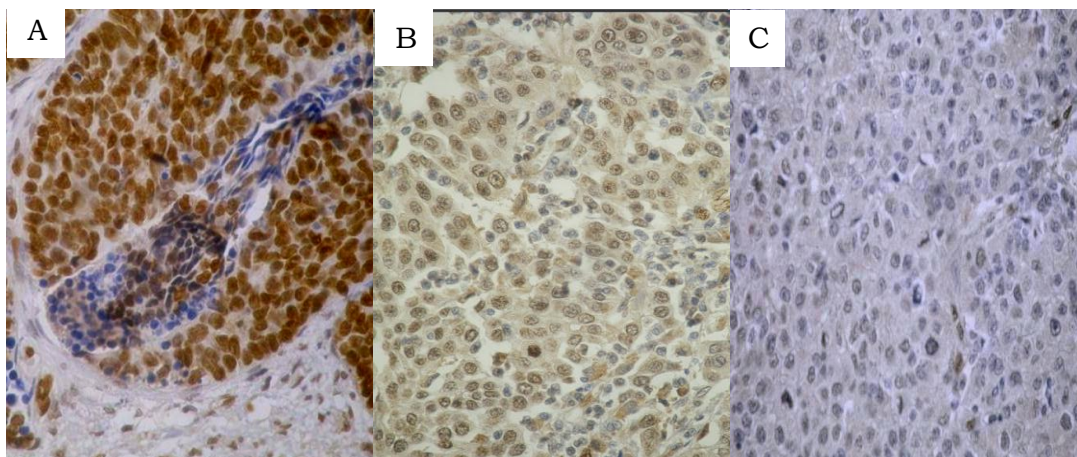


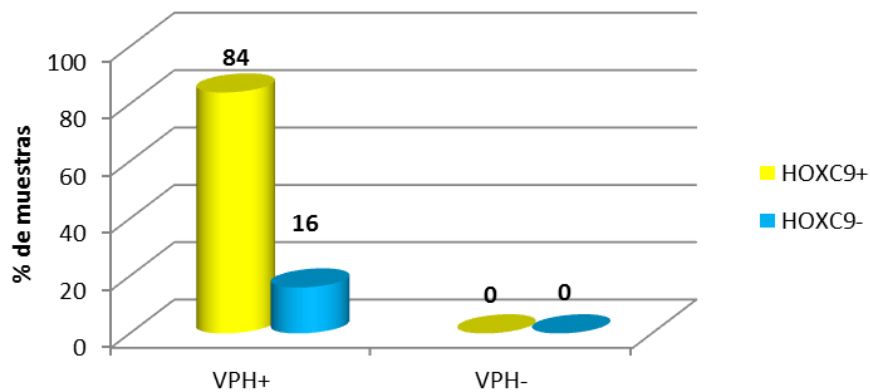
Figura 25. Expresión nuclear de la proteína HOXC9 en CaCU. A) Expresión positiva nuclear. B) Baja expresión nuclear. C) Expresión negativa nuclear.

El 100% de las muestras de CaCU analizadas para inmunohistoquímica, fueron positivas a VPH, de las cuales el 84% mostró expresión nuclear de la

proteína, el 16% fueron negativas a la expresión nuclear de la proteína (Tabla 9) (Gráfica 6).

Tabla 9. Expresión nuclear de HOXC9 en CaCU		
n=91	VPH+	VPH-
HOXC9+	54	0
HOXC9-	15	0
HOXC9 Baja Expresión	22	0

### Expresión nuclear de la proteína HOXC9 en CaCU y VPH



Gráfica 6. Expresión nuclear de la proteína HOXC9 en CaCU y VPH. Los datos fueron estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ).

Como se muestra en la figura 26, en todos los tejidos se tomó como positiva la expresión de HOXC9, sin embargo la intensidad de la expresión y el % de las células positivas en el epitelio cervical fue diferente entre cada diagnóstico.

Debido a las diferencias en cuanto a la intensidad y porcentaje de células positivas en los tejidos analizados, se realizó un análisis semicuantitativo para evaluar la expresión de las proteínas, reportado previamente por Saegusa (1999) que consiste en asignar valores por porcentaje (%) de células positivas e intensidad de reacción. El valor máximo de referencia es 12. Se realizó un análisis estadístico de ANOVA de una sola vía.



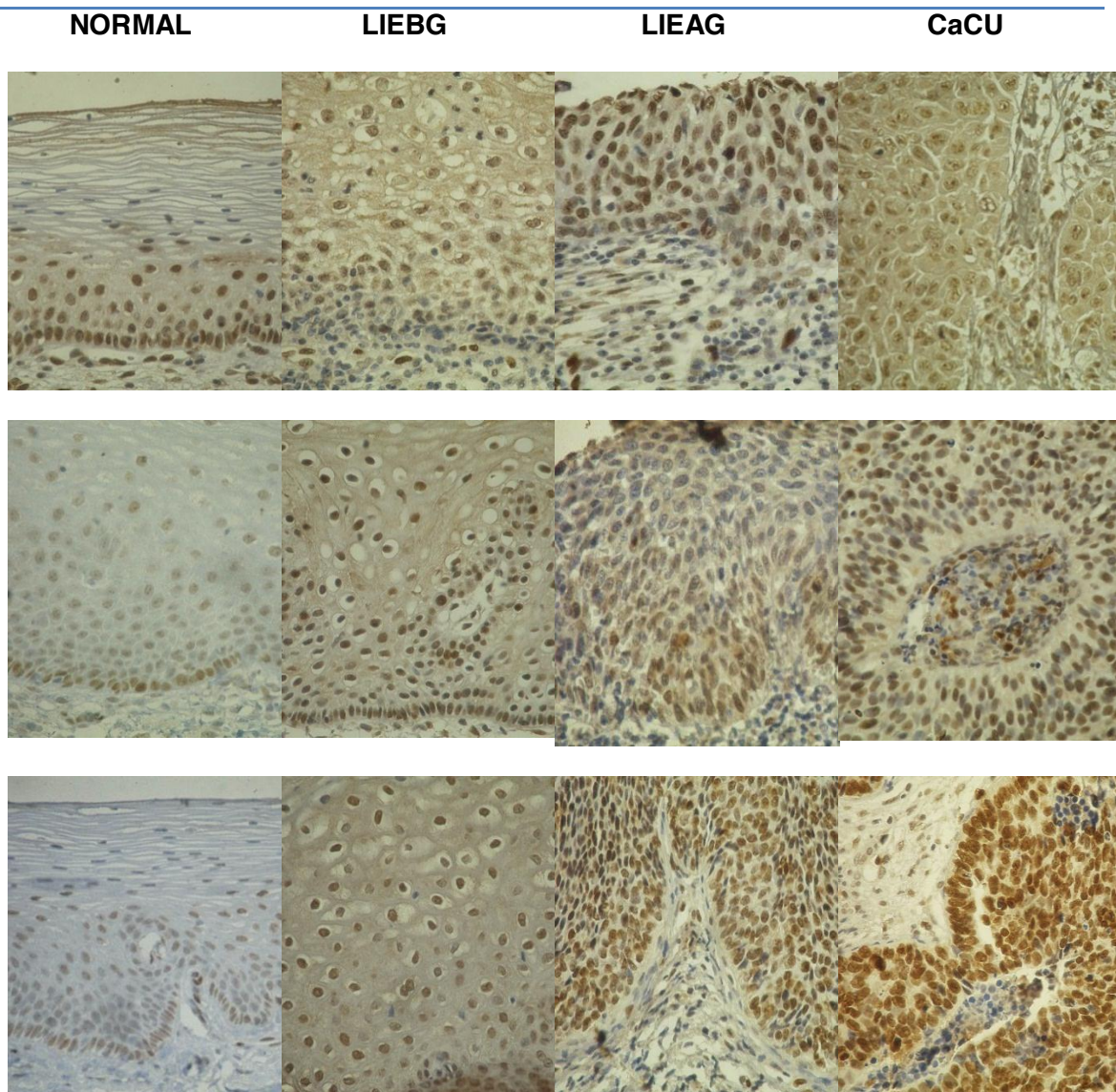
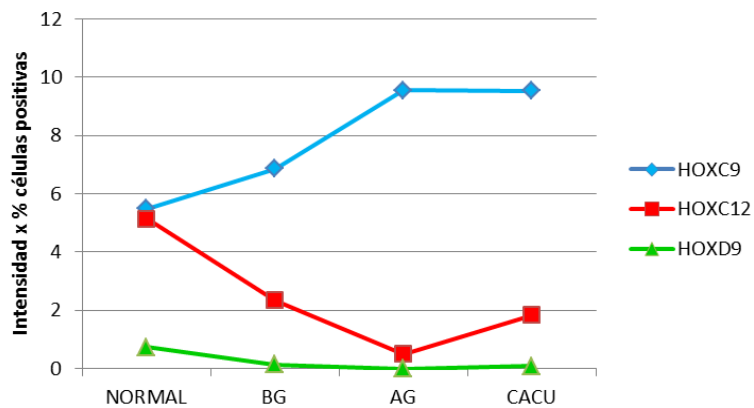


Figura 26. Diferencia de intensidad y % de células positivas de la expresión positiva nuclear de HOXC9 en tejidos sin alteración neoplásica, LIEBG, LIEAG y CaCU.

A partir de este análisis, la expresión nuclear de la proteína HOXC9 aumentó conforme avanza el grado de lesión (Gráfica 7). El valor mínimo de la expresión de la proteína en tejidos sin alteraciones neoplásicas fue de 6, mientras que el valor máximo de la proteína en LIEAG y CaCU fue de 10.

Los datos de la expresión semicuantitativa de esta proteína fueron estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ).

### Expresión semicuantitativa de HOXC9, HOXC12 y HOXD9

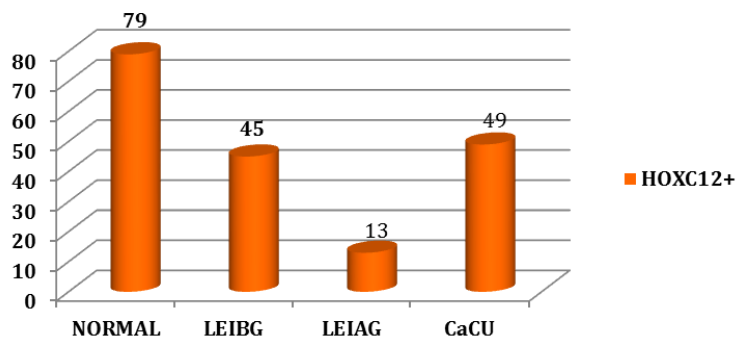


Gráfica 7. Expresión semicuantitativa de las proteínas HOXC9, HOXC12 y HOXD9.

- EXRESIÓN DE LA PROTEÍNA HOXC12**

La expresión positiva nuclear (color café) de HOXC12 se evaluó la expresión de HOXC12 en los diferentes grados de lesión. La expresión de la proteína en muestras sin alteraciones neoplásicas se encontró en el 79% de éstas, en 45% de LIEBG, en 13% de LIEAG y en 49% de CaCU (Gráfica 8).

### Expresión de HOXC12 en lesiones del cérvix uterino



Gráfica 8. Expresión nuclear de la proteína HOXC12 en lesiones del cérvix uterino.

La expresión de la proteína HOXC12 en tejidos libre de alteraciones neoplásicas, se observa principalmente en los núcleos de las células parabasales y del estrato intermedio, incluyendo algunas células que forman parte del estroma (Figura 27).

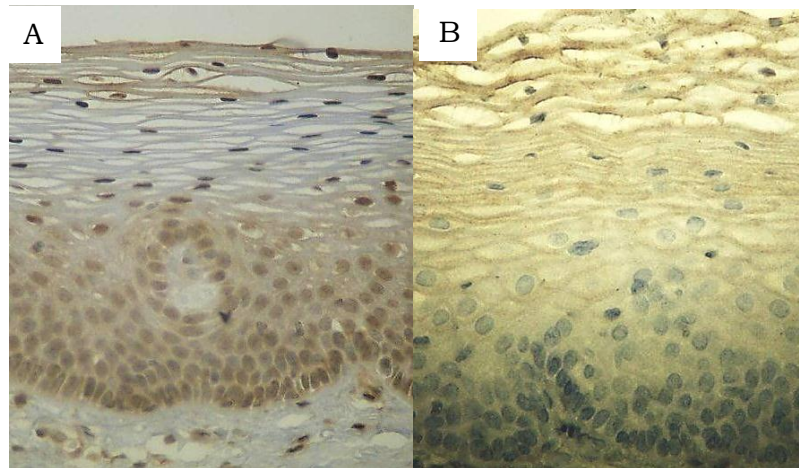
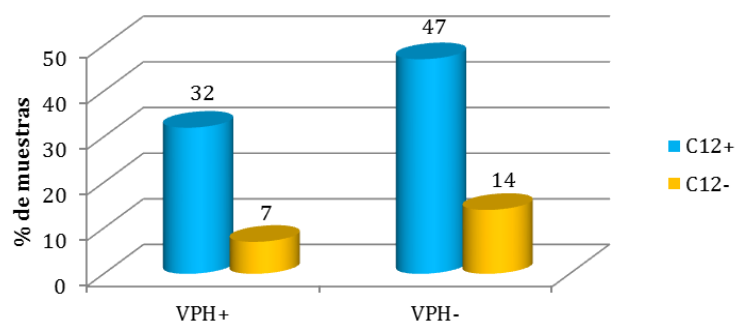


Figura 27. Expresión de HOXC12 en tejido sin alteraciones neoplásicas. A) Expresión positiva. B) Expresión negativa.

En tejido libre de neoplasia el 32% de las muestras mostraron expresión nuclear de la proteína y fueron positivas a VPH. Mientras que 7% de las muestras fueron negativas nucleares a HOXC12 pero positivas a VPH (Tabla 10) (Gráfica 9).

Tabla 10. Expresión nuclear de HOXC12 en tejido sin alteraciones neoplásicas		
n=28	VPH+	VPH-
HOXC12+	9	13
HOXC12-	2	4

### Expresión de HOXC12 en tejidos sin alteración neoplásica



Gráfica 9. Expresión de la proteína HOXC12 en tejido sin alteración neoplásica y VPH. Los datos no fueron estadísticamente significativos  $p=0.89^*$  (\*Corrección de Yate's).

En tejidos con lesiones de bajo grado se puede observar que la expresión positiva de la proteína HOXC12 se encuentra en el primer tercio del epitelio cervical. Sin embargo, en algunos casos la expresión de la proteína fue negativa (figura 28).

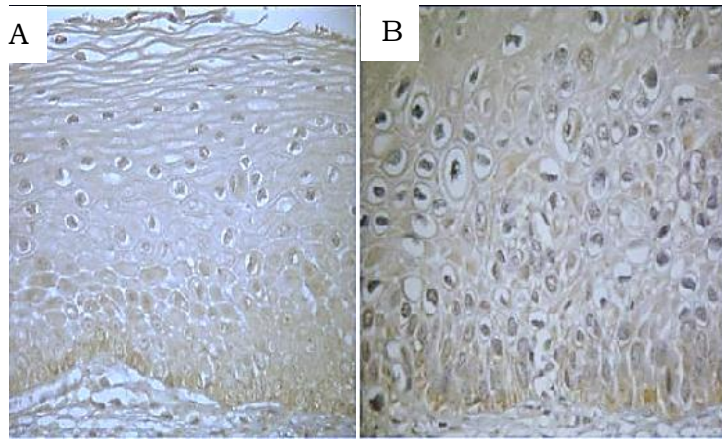
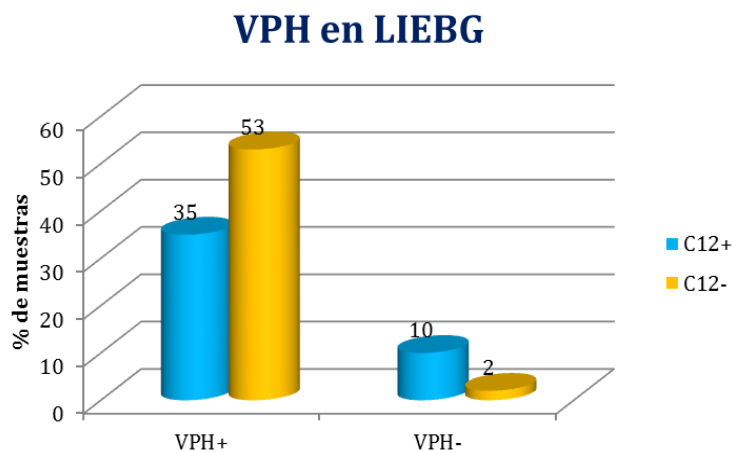


Figura 28. Expresión de la proteína HOXC12 en LIEBG. A) Expresión positiva nuclear. B) Expresión negativa

En tejido con LIEBG el 35% de las muestras con expresión nuclear de la proteína fueron positivas a VPH. El 10% de las muestras fueron positivas nucleares a HOXC12 pero negativas a VPH (Tabla 11) (Gráfica 10).

Tabla 11. Expresión nuclear de HOXC12 en LIEBG		
n=40	VPH+	VPH-
HOXC12+	14	4
HOXC12-	21	1



Gráfica 10. Expresión de la proteína HOXC12 en LIEBG y VPH. Los datos no fueron estadísticamente significativos  $p=0.22^*$  (\*Corrección de Yate's).

En LIEAG, la expresión nuclear de la proteína HOXC12 se perdió y sólo el 12% fue positivo. (Figura 29).



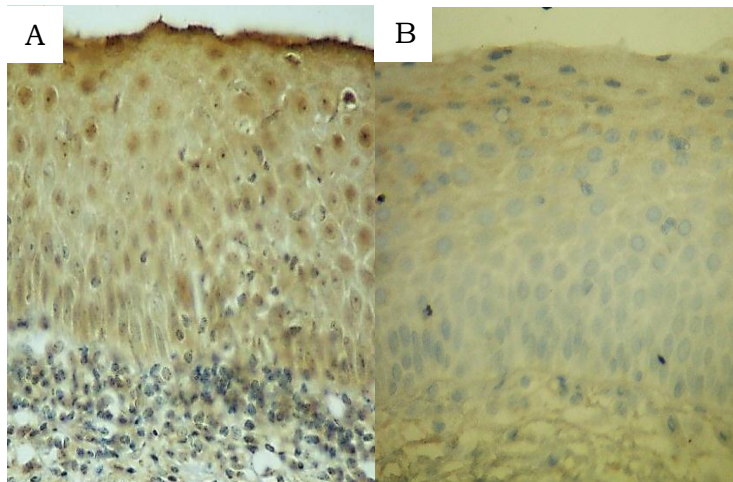
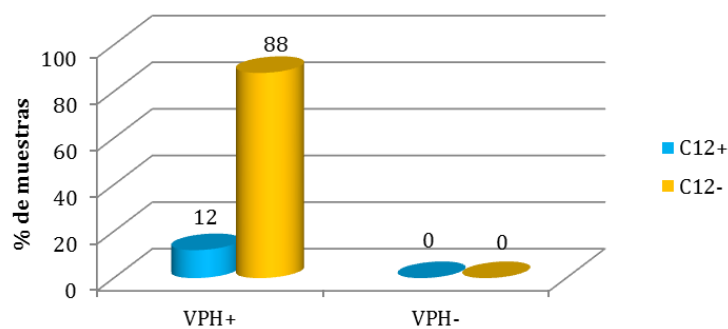


Figura 29. Expresión de la proteína HOXC12 en LIEAG. A) Expresión positiva, B) Expresión negativa nuclear.

En tejido con LIEAG sólo 12% mostraron expresión nuclear de la proteína y fueron positivas a VPH. El 88% de las muestras fueron negativas nucleares a HOXC12 pero positivas a VPH (Tabla 12) (Gráfica 11).

Tabla 12. Expresión nuclear de HOXC12 en LIEAG		
n=8	VPH+	VPH-
HOXC12+	1	0
HOXC12-	7	0

### Expresión de HOXC12 en LIEAG y VPH



Gráfica 11. Expresión de la proteína HOXC12 en LIEAG y VPH. Los datos fueron significativamente estadísticos ( $p < 0.05$ ).

Finalmente los tejidos con cáncer mostraron expresión de la proteína en todos los núcleos de las células epiteliales, pero al igual que en las muestras con lesiones de menor grado hubieron muestras negativas a la expresión de la proteína HOXC12 (Figura 30).

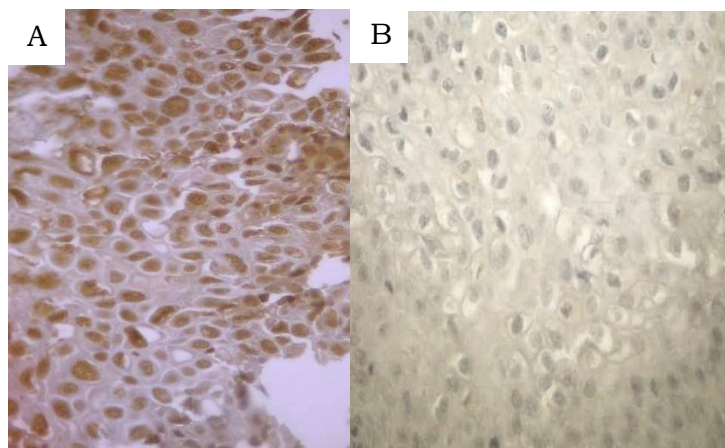
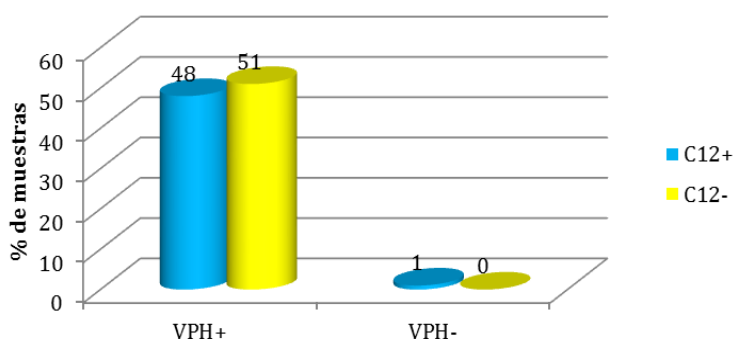


Figura 30. Expresión de la proteína HOXC12 en CaCU. A) Expresión positiva, B) Expresión negativa.

En tejido con CaCU 48% mostraron expresión nuclear de la proteína y fueron positivas a VPH. El 51% de las muestras fueron negativas nucleares a HOXC12 pero positivas a VPH (Tabla 13) (Gráfica 12).

Tabla 13. Expresión nuclear de HOXC12 en CaCU		
n=110	VPH+	VPH-
HOXC12+	53	1
HOXC12-	56	0

### Expresión de HOXC12 en CaCU y VPH



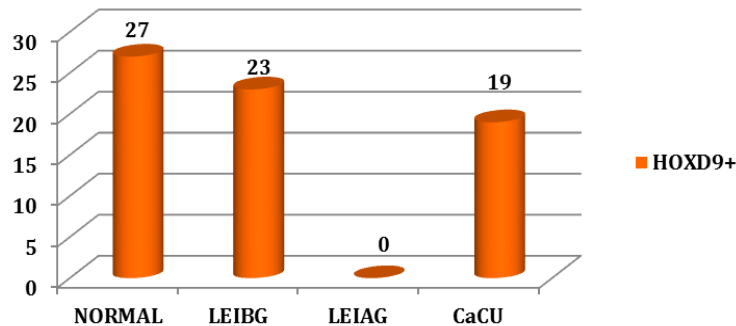
Gráfica 12. Expresión de HOXC12 en CaCU y VPH. Los datos son estadísticamente significativos  $p < 0.05$ .

El análisis semicuantitativo de la proteína HOXC12 mostró en lesiones sin alteraciones neoplásicas un valor promedio de 5, mientras que CaCU es apenas 2. En general, la expresión nuclear de la proteína HOXC12 muestra un comportamiento contrario a la proteína HOXC9, la expresión nuclear se pierde conforme avanza el grado de lesión (Gráfica 7). Los datos de la expresión semicuantitativa de esta proteína son estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ).

- **EXRESIÓN DE LA PROTEÍNA HOXD9**

La expresión nuclear de HOXD9 se detectó en 27% de muestras libre de alteraciones neoplásicas, en 23% de LIEBG, 0% en LIEAG y en 19% de CaCU (Gráfica 13). También se detectó la proteína HOXD9 en citoplasma y/o membrana en 80%, 61, 73% y 80% de los tejidos sin alteraciones neoplásicas, LIEBG, LIEAG y CaCU, respectivamente.

### Expresión de HOXD9 en lesiones del cérvix uterino



Gráfica 13. Expresión de la proteína HOXD9 en lesiones del cérvix uterino.

En tejidos libre de alteraciones neoplásicas identificamos expresión de la proteína HOXD9 en los núcleos de las células basales, parabasales y algunas células del estroma, sin embargo hubo casos en los que la expresión de la proteína fue negativa en el epitelio pero con algunas células del estroma que mostraron expresión (Figura 31).

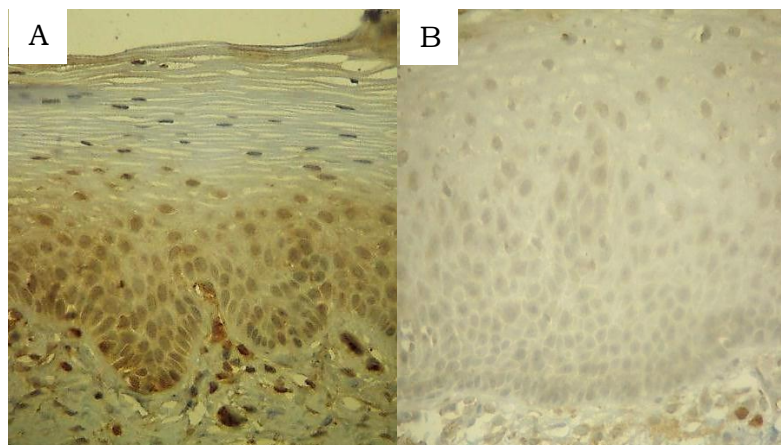


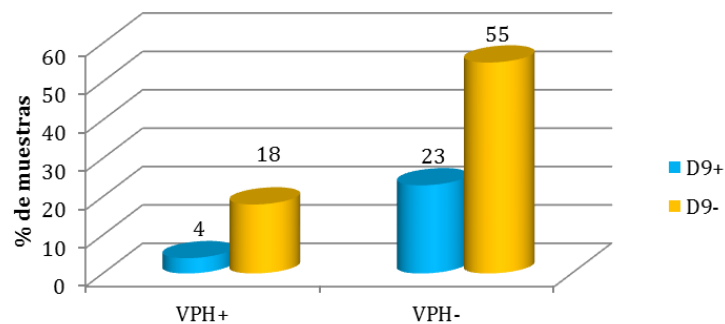
Figura 31. Tejido libre de alteraciones neoplásicas. A) Expresión positiva en células basales y parabasales y fuerte expresión en células del estroma B) Expresión negativa de la proteína HOXD9.

En tejido libre de alteraciones neoplásicas sólo 4% de las muestras que mostraron expresión nuclear de la proteína son positivas a VPH, mientras que

el 18% de las muestras que no mostraron expresión de la proteína son positivas a VPH (Tabla 14) (Gráfica 14).

Tabla 14. Expresión nuclear de HOXD9 en tejidos libre de alteraciones neoplásicas		
n=22	VPH+	VPH-
HOXD9+	1	5
HOXD9-	4	12

### Expresión de HOXD9 en tejido sin alteración neoplásica y VPH



Gráfica 14. Expresión de la proteína HOXD9 en tejido sin alteración neoplásica y VPH. Los datos no fueron estadísticamente significativos  $p=0.87^*$  (\*Corrección de Yate's).

En tejidos con LIEBG se puede observar que la expresión nuclear positiva se perdió en la mayoría de los casos, sin embargo hubo algunos casos en donde se observó expresión nuclear en células basales y parabasales del epitelio cervical (Figura 32). El 20% de las muestras que mostraron expresión nuclear de la proteína tienen infección por VPH, mientras que 71% de las muestras negativas a la proteína, fueron positivas a VPH (Tabla 15) (Gráfica 15).

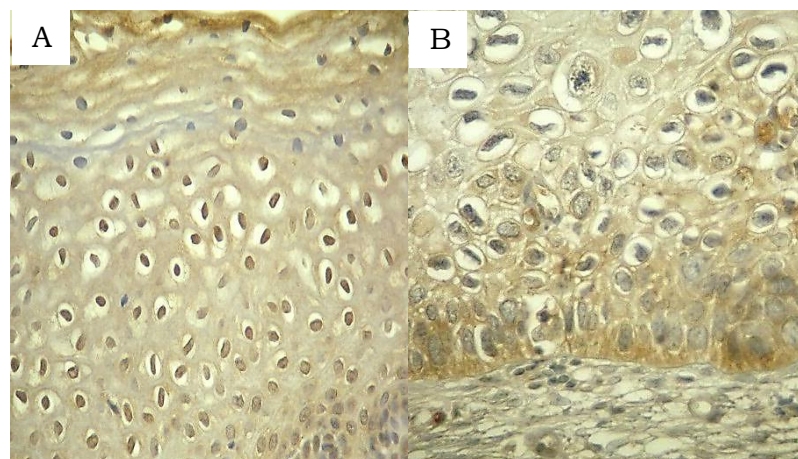
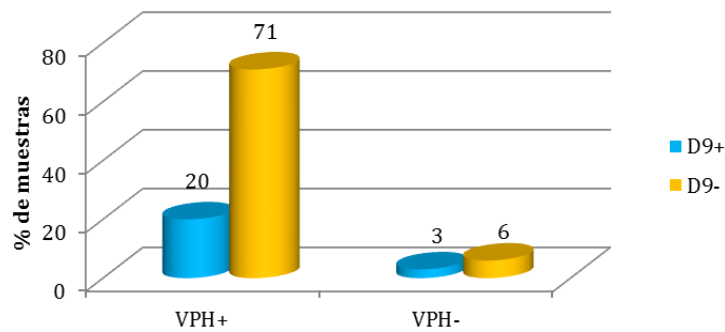


Figura 32. Tejido con lesiones de bajo grado con expresión positiva y negativa de la proteína HOXD9.



Tabla 15. Expresión nuclear de HOXD9 en LIEBG		
n=35	VPH+	VPH-
HOXD9+	7	1
HOXD9-	25	2

### Expresión de HOXD9 en LIEBG y VPH



Gráfica 15. Expresión de HOXD9 en LIEBG y VPH. Los datos no fueron estadísticamente significativos  $p=0.78^*$  (\*Corrección de Yate's).

En tejidos con LIEAG, la expresión de la proteína HOXD9 se observó en las células epiteliales y en algunas células del estroma. Ninguna muestra presentó localización nuclear de la proteína, ésta fue encontrada en citoplasma o membrana nuclear (figura 33) (Tabla 16) (Gráfica 16).

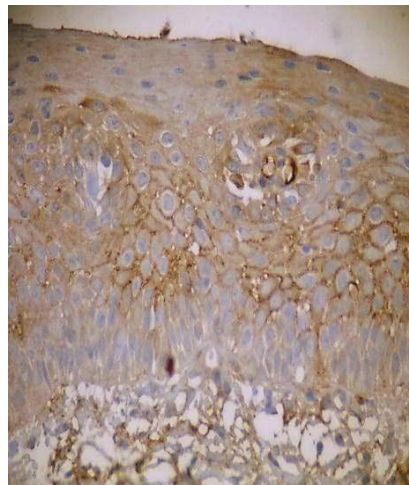
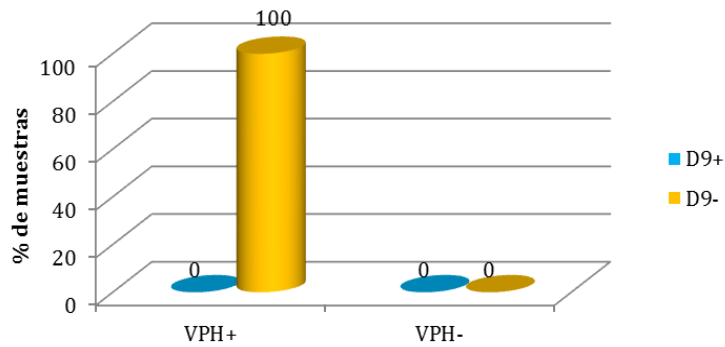


Figura 33. Expresión de la proteína HOXD9 en LIEAG. Expresión negativa nuclear. Se observa reacción positiva en membrana, sin embargo, negativa en núcleos.

Tabla 16. Expresión nuclear de HOXD9 en LIEAG		
n=8	VPH+	VPH-
HOXD9+	0	0
HOXD9-	8	0

## Expresión de HOXD9 en LIEAG y VPH



Gráfica 16. Expresión de HOXD9 en LIEAG y VPH. Los datos fueron estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ).

En tejido con CaCU el 78% de las muestras no mostraron expresión de la proteína, sin embargo fueron positivas a VPH. El 20% de las muestras fueron positivas a ambos, proteína e infección por VPH (Tabla 17) (Figura 34) (Gráfica 20).

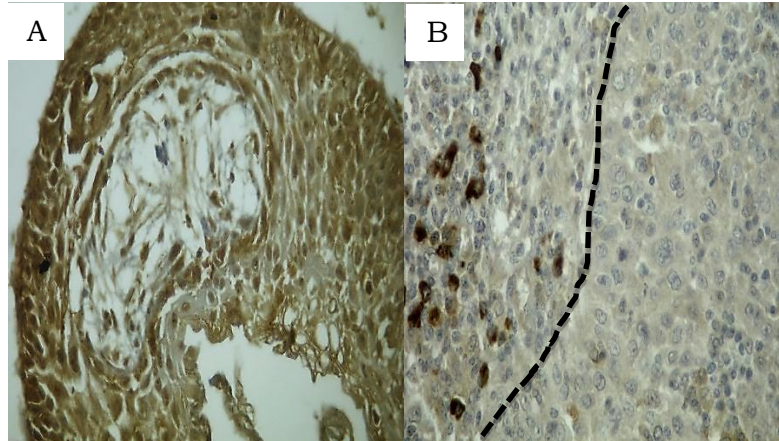
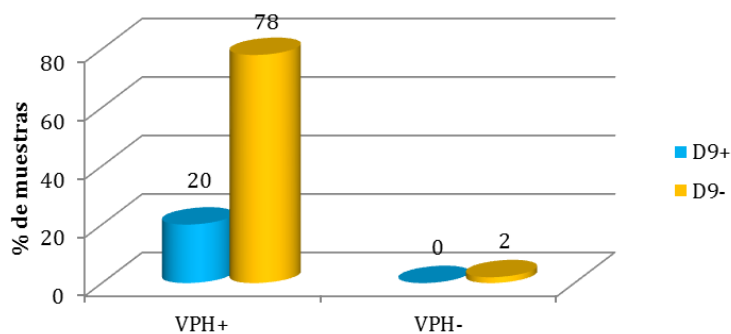


Figura 34. Expresión de la proteína HOXD9 en CaCU. A) Expresión positiva. B) Expresión negativa. Línea punteada delimita a la izquierda el estroma y a la derecha las células tumorales.

Tabla 17. Expresión nuclear de HOXD9 en CaCU		
n=102	VPH+	VPH-
HOXD9+	20	0
HOXD9-	80	2

## Expresión de HOXD9 en CaCU y VPH



Gráfica 17. Expresión de la proteína HOXD9 en CaCU y VPH. Los datos no fueron estadísticamente significativos  $p=0.48^*$  (\*Corrección de Yate's).

Mediante el análisis semicuantitativo de expresión de la proteína HOXD9 se pudo observar el mismo comportamiento para la proteína HOXC12, conforme avanza la lesión hay una pérdida en la expresión nuclear de dichos factores de transcripción (Gráfica 8). El valor promedio del análisis semicuantitativo en lesiones sin alteraciones neoplásicas fue 0.8, mientras que en CaCU el valor fue de 0.2. Los datos de la expresión semicuantitativa de esta proteína no fueron estadísticamente significativos ( $p=0.053$ ). Cabe señalar que estos resultados fueron exclusivamente considerando la presencia nuclear de la proteína.

## 6. Discusión

Siendo el VPH el principal factor etiológico para desarrollar CaCU, se determinó la presencia de infección por este virus en tejidos libre de alteraciones neoplásicas, lesiones precursoras (LIEBG y LIEAG) y CaCU. La presencia de VPH aumentó conforme avanzó el grado de lesión. En tejidos control sin alteraciones neoplásicas se detectó infección en 25% de las muestras y en CaCU, 96%. Los resultados que obtuvimos concuerdan con lo reportado en la literatura a nivel mundial ya que este virus en CaCU se ha detectado en aproximadamente el 91% de las muestras analizadas (Muñoz *et al.*, 2003). Aunque Walboomers y cols. (1999) afirman que en el 99.7% de las muestras analizadas hay presencia del VPH y nosotros hayamos obtenido sólo el 96% con VPH es posible que se haya debido a una subdetección del VPH causante por el bajo número de copias o a la presencia de tipos virales no detectados fácilmente por el método empleado.

Debido a que analizamos muestras de archivo del departamento de Patología fijadas en formaldehído, se obtuvo DNA de bajo peso molecular, por lo cual amplificamos por PCR una región del D-loop mitocondrial de 166 pb como gen endógeno de referencia (Agorastos *et al.*, 2005), para determinar si el DNA extraído en las muestras negativas era amplificable o no. Algunas de las muestras fueron excluidas debido a que no se logró amplificar el gen endógeno. Por lo cual en este tipo de muestras sería necesario llevar a cabo la amplificación de un gen endógeno con un producto de PCR más pequeño, lo mismo para la identificación de VPH. Al respecto los iniciadores SPF10, que amplifican una región del gen L1 con un producto de 65 pb podrían utilizarse en estudios posteriores (Van Hammont *et al.*, 2006).

Según los últimos reportes de la OMS, en México el 67.5% de CaCU es atribuido a los VPH tipo 16 y 18 (OMS/ICO *et al.*, 2010). Nuestros resultados son congruentes con estas cifras ya que en CaCU se encontró la presencia de VPH16 en el 58% de las muestras analizadas y 38% de las muestras poseen otro tipo de VPH.

Si bien, la infección por VPH es el principal factor etiológico existen otros factores asociados al desarrollo de esta neoplasia. Existen mecanismos fundamentales que llevan a una célula a convertirse en neoplásica tales como, autosuficiencia en señales de crecimiento, angiogénesis sostenida, invasión de tejidos y evasión de la apoptosis (Hanahan-Weinberg, 2000). Se ha propuesto

así mismo, que proteínas con capacidad reguladora involucradas en la embriogénesis y mantenimiento de células en condiciones de normalidad fisiológica pueden ser potenciales candidatos como reguladores oncogénicos (Castronovo *et al.*, 1994; Ford, 1998; Cillo *et al.*, 1999; Hanahan-Weinberg, 2000; Cillo *et al.*, 2001).

Se ha reportado que los genes *HOX* son inapropiadamente expresados en el fenotipo maligno, indicando que estos factores de transcripción son directamente o indirectamente involucrados en la transformación oncogénica.

Por lo tanto, los genes *HOX* constituyen puntos focales que permiten explicar el descontrol genético en el desarrollo de la carcinogénesis. Si bien, estos genes codifican proteínas que se unen al DNA mediante su homeodominio especificando la orientación anterior-posterior de una variedad de órganos durante el desarrollo embrionario y regulando la diferenciación en tejidos adultos, también estas proteínas reguladoras pueden estar involucradas en varios aspectos del desarrollo del cáncer.

En otros tipos de cáncer se han identificado alteraciones en la expresión de *HOXC9*, aunque a la fecha sólo hay ocho reportes donde se analiza a nivel de RNAm. Este transcrito se encuentra en neoplasias derivadas de la cresta neural y tumores mesenquimales derivados del mesodermo intermedio (Redline *et al.*, 1999). En cáncer de esófago se ha encontrado diferencialmente expresado (Guet *et al.*, 2007). En astrocitomas se encuentra sobre-expresado en poblaciones celulares con fenotipo de células tipo troncal o iniciadoras del cáncer “cáncer stem cell” (CSC) (CD133+, CD34+) por lo cual posiblemente la expresión de ese gen esté relacionado a la quimiorresistencia (Okamoto *et al.*, 2007).

Sin embargo, a la fecha no existe ningún reporte en cuanto a la expresión de la proteína, incluso analizando base de datos de proteínas no hay datos al respecto. Por lo cual, este trabajo es el primero realizado sobre la detección *in situ* de las proteínas *HOX*, en lesiones del cérvix uterino (Figura 35).

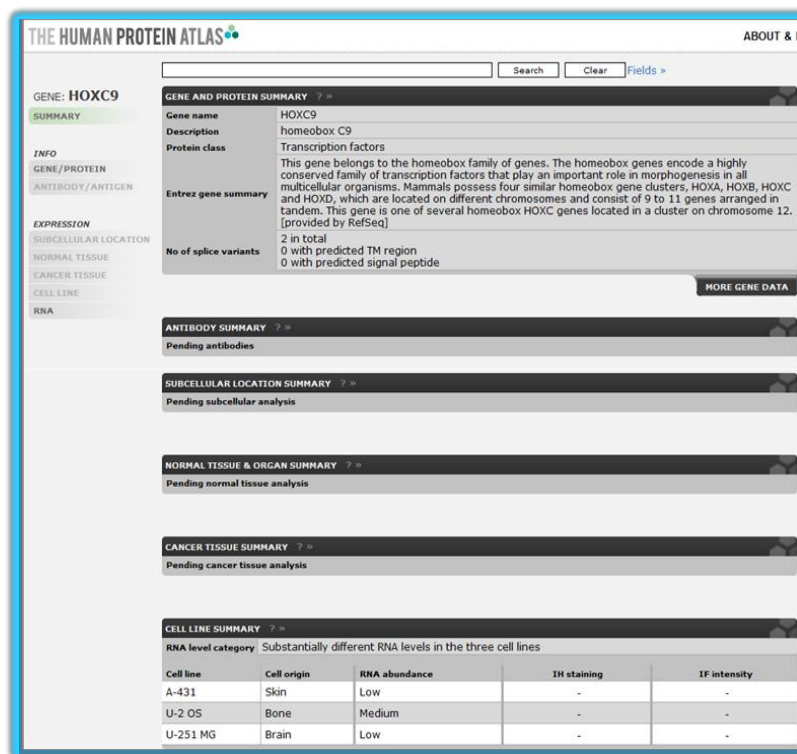


Figura 35. Base de datos de la proteína HOXC9.

En este trabajo se detectó la expresión de la proteína HOXC9 tanto en tejido normal como en lesiones precursoras y CaCU, evaluándose inicialmente como positiva o negativa, aunque estadísticamente no existieron diferencias entre los grupos de estudio (89% N vs 83% CaCU), se observó que la expresión de la proteína aumenta conforme avanza la lesión. Aparentemente estos datos fueron contradictorios, respecto al antecedente de López y cols. (2006a), donde no reportaron detección de RNAm de *HOXC9* mediante RT-PCR en tiempo final en tejidos control. Esta discrepancia puede deberse a que las muestras de tejido empleadas por los autores fueran con diagnóstico normal, mientras que las incluidas en el presente estudio fueron también epitelios normales sin alteraciones neoplásicas, pero adyacentes a tejido con cervicitis. Otra posibilidad es que haya transcritos en baja cantidad y por tanto de baja detección por RT-PCR convencional de tiempo final, por lo que sería necesario evaluar en tejidos control mediante un método más sensible y cuantitativo como RT-PCR en tiempo real.

En general, 100% los tejidos con LIEAG expresaron la proteína HOXC9 mientras que 83% de los CaCU (incluyendo baja expresión), este último dato es consistente con lo reportado por López y cols. (2006a) quienes reportan 80% aunque exclusivamente en muestras con VPH 16. Específicamente, en

nuestro trabajo 89% de las muestras de CaCU positivas a VPH16 tuvieron expresión positiva de HOXC9, por lo que los resultados tanto de RNA como de proteína son similares aún en muestras independientes.

Respecto a la disminución de casos positivos a HOXC9 en CaCU respecto a LIEAG este comportamiento es similar a lo previamente reportado con la proteína p16, la cual actualmente permanece como el único marcador biológico de células con cambio displásico o maligno inducido por VPH aprobado por la FDA, donde se ha reportado en 100% de los casos de LIEAG y 43% en CaCU (Jin *et al.*, 200). Esta disminución de la expresión de la proteína p16 en CaCU se debe principalmente a silenciamiento por metilación del promotor (Dong *et al.*, 2001).

En cuanto a la metilación de *HOXC9* poco se sabe al respecto, el único estudio que existe es en cáncer de pulmón, en donde HOXC9 se encuentra metilado en carcinomas de células no pequeñas estadio I, mientras que la metilación en lesiones precursoras es baja (Lin *et al.*, 2009). Por lo que se sugiere que aquellos CaCU negativos a HOXC9 pudieran estar metilados. Otra posibilidad sería la pérdida de material genético, sin embargo se ha reportado que menos del 20% de los casos de CaCU (Progenetix <http://www.progenetix.net/cgi-bin/pgHome.cgi>) presentan alteraciones cromosómicas en la región donde se encuentra este gen.

El análisis semicuantitativo mostró aumento gradual en la expresión de esta proteína HOXC9 a medida que avanza la lesión, debido a que la intensidad de la proteína aumenta en tejidos con cáncer sugiriendo una asociación con el desarrollo de cáncer (Gráfica 8).

En glioblastomas se ha reportado la expresión de HOXC9 en poblaciones celulares CD133+, CD34+, las cuales son características de células tipo *Cancer Stem Cells* (CSC). Este tipo de células tienen alta capacidad proliferativa y habilidad de iniciar y dirigir la progresión del tumor en modelos animales (Singh *et al.*, 2004). Por lo cual, en CaCU sería necesario analizar la expresión de esta proteína en relación a la etapa clínica de los tumores, así como con respuesta a terapia, en comparación con los casos que son negativos.

En CaCU es poco lo que se sabe sobre las CSC, sin embargo un grupo de células subcolumnares han sido las mejores candidatas para formar parte de las CSC o células iniciadoras de tumor en CaCU, las cuales proporcionan

un depósito de regeneración de epitelio que forma la mucosa cervical. La longevidad de tales células los hace potenciales blancos de transformación y malignidad, jugando un papel en el desarrollo del cáncer (Martens *et al.*, 2005). La hipótesis de la existencia de este tipo de células tiene grandes implicaciones clínicas, las cuales podrían explicar la falla en la terapia y reincidencia de la patología como resultado de la capacidad de resistencia de estas células a diversos tipos de tratamientos entre ellos quimio y radioterapia.

Las características biológicas de las CSC tales como, quiescencia, alta capacidad de proliferación y resistencia a los fármacos las hace blancos para el desarrollo de terapias para la erradicación de la rápida división celular. Más aún, la identificación y caracterización de éstas para pronóstico y tratamiento de CaCU.

A la fecha, los factores de transcripción Nanog, nucleostemina y musashi han sido identificados como los primeros marcadores de CSC en CaCU (Ye *et al.*, 2008). Un reciente estudio usó marcadores de superficie celular como CD44 y CD17 para enriquecer la población celular de las CSC. Actualmente, se ha aportado a la caracterización de estas células su capacidad tumorigénica y expresión de genes expresados en la etapa embrionaria y adulta entre otros factores *Oct-4* el cual pertenece a la familia de genes homeobox, así como *Piwi12*, *C-myc*, *Stat3* y *Sox2* (Feng *et al.*, 2009).

Por otro lado, en cuanto al gen HOXC12 en cáncer, sólo existen dos reportes al respecto. En linfoma folicular este gen se encuentra hipermetilado acompañado de represión transcripcional (Bennett *et al.*, 2009). En contraste en CaCU se observó expresión diferencial a nivel de RNA (20% normales vs 100% CaCU) (López *et al.*, 2006a). En cuanto a la expresión de la proteína no existe información en las bases de datos (Figura 36). En nuestro trabajo determinamos la presencia de esta la proteína HOXC12 tejidos sin alteraciones neoplásicas, LIEBG, LIEAG y CaCU, encontrando disminución de los casos que presentan la proteína.



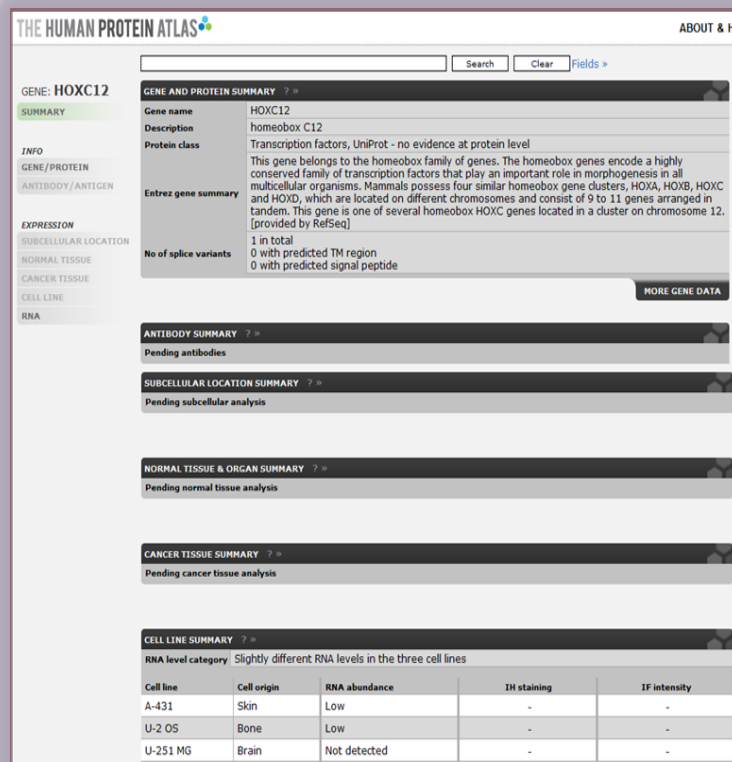


Figura 36. Base de datos de la proteína HOXC12.

En tejido sin alteraciones neoplásicas la proteína se expresa en 79% mientras que en CaCU la expresión nuclear sólo en 48%. Por lo que es necesario determinar porque no hay una correlación entre el mensajero de HOXC12 y proteína en CaCU con el fin de determinar los posibles mecanismos de regulación post-transcripcional tales como la expresión de RNAs no codificantes tales como micro RNAs (miRNAs). Sin embargo, hasta el momento no existe información sobre posibles miRNAs cuyo blanco sea el transcrito de *HOXC12*.

En cuanto a su relación con el VPH, se puede observar que la expresión de HOXC12 en tejidos libres de alteraciones neoplásicas y LIEBG se da en mayor medida en aquellas muestras en donde se encuentra presencia de VPH; sin embargo, tanto en LIEAG como en CaCU disminuye el número de casos positivos a HOXC12 en presencia de VPH.

Finalmente, analizamos la expresión de la proteína HOXD9. En primer lugar, buscando en la base de datos *HUMAN PROTEIN ATLAS* (<http://www.proteinatlas.org/>) no encontramos ningún reporte de la expresión de la proteína en CaCU o algún otro tipo de cáncer (Figura 37). Sin embargo,

en la base de datos PUBMED (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) encontramos información sobre la presencia de RNAm en líneas celulares. Aunque en la literatura se reporta la expresión de la proteína HOXD9 en cáncer de esófago en 60% de las células neoplásicas (Liu *et al.*, 2005), hasta el momento sólo dos publicaciones describen a nivel de RNAm en cáncer de cérvix. Li y cols. (2002) y López y cols. (2006) detectaron RNAm de HOXD9 en el 100% de las muestras con CaCU, mientras que en ambos estudios no se detectó en tejidos normales.

Con estos antecedentes, analizamos la expresión de la proteína HOXD9 y encontramos la proteína nuclear en 19% de las muestras con CaCU, mientras que en citoplasma y/o membrana en 80%. Por lo tanto, nuestros resultados en CaCU concuerdan con lo reportado por López (2006a) a nivel de RNAm.

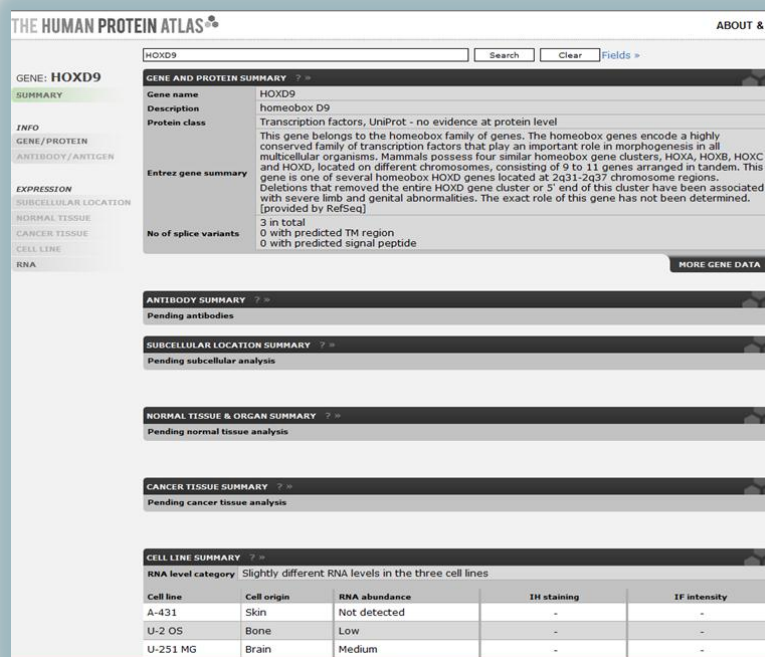


Figura 37. Base de datos de la proteína HOXD9.

En el análisis semicuantitativo de esta proteína no encontramos diferencias estadísticamente significativas en la expresión nuclear, de hecho podríamos considerar que no hubo expresión nuclear, ya que el valor evaluado de intensidad con % de células positivas no alcanzó el valor de 1.

Las proteínas HOXC9 y HOXC12 fueron localizadas en citoplasma y/o membrana en lesiones de CaCU, también se ha reportado en citoplasma en cáncer de esófago (Liu *et al.*, 2005). Sin embargo, no se ha descrito si hay un

mecanismo que impida translocarse al núcleo, o si lleva a cabo una función en particular en el citoplasma.

La re-expresión de los genes HOX en una amplia variedad de células transformadas han sugerido su papel como antígenos oncofetales involucradas en el desarrollo celular normal, carcinogénesis y progresión del tumor (Liu *et al.*, 2005).

Como se ha mencionado anteriormente la expresión desregulada de los genes *HOX* ha sido descrita en muchos tumores sólidos y líneas celulares. Por lo que la expresión de los genes *HOX* puede ser considerada dentro de tres modelos según Abate-Shen (2002):

- **Re-expresión:** Que se expresan en el desarrollo embrionario y en la etapa adulta se apagan, mientras que cáncer se detecta nuevamente la expresión y algunos ejemplos de estos incluyen cerebro, glándula mamaria y riñón.
- **Expresión *de novo*:** cuando no hay expresión ni en el desarrollo embrionario ni en etapas adultas y en cáncer ocurre expresión de los genes. Un ejemplo de este es *PAX5* que es expresado en meduloblastoma pero no el cerebelo de donde derivan estas células.
- **Silenciamiento:** Puede ocurrir una expresión ya sea en el desarrollo embrionario y en la etapa adulta, mientras que en el desarrollo neoplásico puede ocurrir un silenciamiento en la expresión, principalmente por mecanismos epigenéticos como la metilación de los promotores, como se ha descrito en pulmón (Lin *et al.*, 2009).

Teniendo esto en cuenta podemos decir que hay sobreexpresión nuclear de *HOXC9* en CaCU, por lo que es necesario identificar los posibles genes blanco que están siendo regulados por dicho factor de transcripción y determinar las rutas biológicas que están siendo modificadas para que junto con otros eventos moleculares se favorezca el desarrollo de cáncer. Mientras que para *HOXC12* y es necesario determinar la correlación de la presencia de RNAm y la proteína, para descartar mecanismos de regulación postranscripcional; así como determinar su función en citoplasma de células neoplásicas.

## **8. CONCLUSIONES**

Existe sobreexpresión de la proteína HOXC9 en lesiones precursoras y CaCU, sugiriendo estar implicada en los procesos de proliferación y diferenciación dentro del desarrollo de esta neoplasia. Por lo que es necesario identificar los posibles genes blancos así como su papel funcional en el desarrollo de CaCU.

El aumento de la expresión de la proteína HOXC9 se observó en muestras positivas a VPH, especialmente en LIEAG, por lo cual es necesario determinar si la sobre-expresión de las proteínas HOX está regulada directa o indirectamente por alguna oncoproteína de VPH.

La expresión de las proteínas HOXC12 disminuyó conforme avanzó la lesión, lo cual podría deberse a mecanismos post-transcripcionales como RNA no codificantes.

Aparentemente no hay cambios significativos en cuanto a la expresión de HOXD9, sin embargo en la mayoría de las muestras incluidas en el estudio se localiza en citoplasma y/o membrana, por lo que sería importante definir los mecanismos involucrados en la localización subcelular y su posible función.

## 9. BIBIOGRAFÍA

- Abate-Shen C. Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence? *Nature Review* 2002; (2): 777-785.
- Abe M, Hamada J, Takahashi O, Takahashi Y, Tada M, Miyamoto M, Morikawa T, Kondo S, Moriuchi T. Disordered expression of HOX genes in human non-small cell lung cancer. *Oncol. Rep.* 2006; (15): 797–802.
- Adam E, Berkova Z, Daxnerova Z. Papillomavirus detection: demographic and behavioral characteristics influencing the identification of cervical disease. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2000; (182): 257-26.
- Agorastos T, Dinas K, Lloveras B, de Sanjose S, Kornegay JR, Bonti H, Bosch FX, Constantinidis T, Bontis J. Human papillomavirus testing for primary screening in women at low risk of developing cervical cancer. *The Greek experience, Gynecologic Oncology* 2005; 96(3): 714-720
- Alami Y, Castronovo V, Belotti D, Flagiello D, Clause N. HOXC5 and HOXC8 expression are selectively turned on in human cervical cancer cells compared to normal keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; (257):738–45.
- Alonso, Lazcano, Hernandez. Cáncer cervicouterino: Diagnóstico, prevención y control. Editorial Médica Panamericana.México, DF. 200
- Apiou F, Flagiello D, Cillo C, Malfoy B, Poupon F, Dutrillaus B. Fine mapping of human HOX gene clusters. *Cytogenet Cell Genet* 1996; (73):114-115.
- Armstrong, S. A. et al. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nature Genet.* 2002; (30): 41–47.
- Barron BA, Richart RM. A statistical model of the natural history of cervical carcinoma based on a prospective study of 557 cases. *J Natl. Cancer Inst.* 1968; (41): 1343-1353.
- Benedet JL, Odicino F, Maisonneuve P, Beller U, Creasman WT, Heintz AP, Ngan HY, Sideri M, Pecorelli S. Carcinoma of the cervix uteri. *J Epidemiol Biostat.* 2001; 6(1): 7-43.
- Bennett LB, Schnabel JL, Kelchen JM, Taylor KH, Guo J, Arthur GL, Papageorgio CN, Shi H, Caldwell CW. DNA hypermethylation accompanied by

transcriptional repression in follicular lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2009; 48(9):828-41.

- Berek JS. Simplification of the new Bethesda 2001 classification system. *Am J Obstet Gynecol.* 2003; (188): S2-5-S6-7.
- Bergeron C. The 2001 Bethesda System. *Salud Pública Méx.* 2003; (45) Suppl 3: S340-4.
- Block K, Kardana A, Igarashi P, Taylor S. In utero diethylstilbestrol (DES) exposure alters Hox gene expression in the developing Mullerian system. *FASEB J.* 2000; (14): 1101–1108.
- Bonfiglio RT, Kurman R. Histological typing of female genital tract tumors. 2 a. edición 1994 Berlin, Springer-Verlag.
- Bosch X, Muñoz N. The viral etiology of cervical cancer. *Virus Res* 2002; (89):183-190.
- Braig S, Mueller D, Rothhammer T, Bosserhoff A. MicroRNA miR-196a is a central regulator of HOX-B7 and BMP4 expression in malignant melanoma expression in malignant melanoma. *Cell. Mol. Life Sci.* 2010; (67):3535–3548.
- Brinton LA, Herrero R, Reeves WC, de Britton RC, Gaitan E, Tenorio F. Risk factors for cervical cancer by histology. *Gynecol Oncol.* 1993 Dec;51(3):301-6
- Burd M. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev* 2003; (16):1-17.
- Burk RD, Kelly P, Feldman J. Declining presence of cervicovaginal human papillomavirus infection with age is independent of other risk factors. *Sex. Transm. Dis.* 1996; (23): 333-341.
- Castellsagué X. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Research* 2002; (89): 191-199.
- Castronovo, V., M. Kusaka, A. Chariot, J. Gielen and M. Sobel. Homeobox genes: Potential candidates for the transcriptional control of the transformed and invasive phenotype. *Biochem. Pharmacol.* 1994; 47(1):137-143.
- Cermik D, Karaca M, Taylor HS. HOXA10 expression is repressed by progesterone in the myometrium: differential tissue-specific regulation of HOX gene expression in the reproductive tract. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; (86):3387–92.

- Chakrabarti O and Krishna S. Molecular interactions of “high risk” human papillomaviruses E6 and E7 oncoproteins: implications for tumour progression. *J Biosci.* 2003; 28(3): 337-348.
- Cheng, W., Liu, J., Yoshida, H., Rosen, D. & Naora, H. Lineage infidelity of epithelial ovarian cancers is controlled by HOX genes that specify regional identity in the reproductive tract. *Nature Med.* 2005; (11): 531–537.
- Chopra S y Mishra K. "Mir"acles in hox gene regulation. *Bioessays* 2006; 28(5):445-8.
- Chu, M. C., Selam, F. B. & Taylor, H. S. HOXA10 regulates p53 expression and matrigel invasion in human breast cancer cells. *Cancer Biol. Ther.*(2004); 568–572.
- Cillo, C., A. Faiella, M. Cantile and E. Boncinelli. Homeobox genes and cancer. *Exp. Cell Res*; 1999; (248): 1-9.
- Cillo C, Cantile M, Faiella A, Boncinelli E. Homeobox genes in normal and malignant cells. *J Cell Physiol.* 2001; 188(2): 161-9.
- Clarke B, Chetty R. Postmodern cancer: the role of human immunodeficiency virus in uterine cervical cancer. *Molecular Pathology* 2002; 55(1):19–24.
- Clifford M, Smith S, Plummer M, Munoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a metaanalysis. *Br J Cancer* 2003; (88):63-73; 10.
- Collins S, Mazloomzadeh S, Winter H, Blomfield P, Bailey A, Young S, Woodman B. High incidence of cervical human papillomavirus infection in women during their first sexual relationship. *BJOG* 2002; 109:96-98.
- Daftary G. Taylor H. Endocrine Regulation of HOX Genes. *Endocrine Reviews* 2006; 27(4): 331–355.
- De Sanjose S, Palefsky J. Cervical and anal HPV infections in HIV positive women and men. *Virus Research.* 2002; 89(2):201–211.
- De Villiers, Fauquet C., Broker T., Bernard H., Zur hausen. Classification of papillomaviruses. *J Virology.* 2004; 324(1): 17-27.
- Dollé P, Izpisúa C, Brown M, Tickle C, Duboule D. Hox-4 genes and the morphogenesis of mammalian genitalia. *Genes Dev* 1991; (5):1767–76.
- Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology* 2005; (32) 7-15.

- Feng D, Peng C, Li C, Zhou Y, Li M, Ling B, Wei H, Tian Z. Identification and characterization of cancer stem-like cells from primary carcinoma of the cervix uterine. *Oncol Rep* 2009; (22):1129-34.
- Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin M. Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, iarc cancer base no. 5. Version 2.0, IARC Press, Lyon, 2004. GLOBOCAN 2002. (<http://www-dep.iarc.fr/>).
- Fidda N, Miron J, Rodgers WH, Rader A. Impact of the new Bethesda System 2001 on specimen adequacy of conventional cervicovaginal smears. *Diagn Cytopathol.* 2004; 30(4):235-9.
- Ford, H. L. Homeobox genes: A link between development, cell cycle, and cancer. *Cell Biol*; 1998; 22(6): 397-400.
- Garnett T and Duerksen-Hughes P. Modulation of apoptosis by human papillomavirus (HPV) oncoproteins. *Arch Virol.* 2006; 151(12): 2321-35.
- Garzon R, Pichiorri F, Palumbo T, Iuliano R, Cimmino A, Aqeilan R et al. MicroRNA fingerprints during human megakaryocytopoiesis. *Proc Natl Acad Sci* 2006; (103): 5078–5083.
- GLOBOCAN, 2008 <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/cervix.asp>
- Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999; (286): 531–537.
- Han L, Witmer PD, Casey E, Valle D, Sukumar S. DNA methylation regulates microRNA expression. *Cancer Biol Ther* 2007; (6): 1284–1288.
- Hanahan D. Weinberg R. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 2000; (100):57–70.
- Hans-Ulrich B. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *Journal of Clinical Virology.* 2006; 27(4): 331-355.
- Hildesheim A, Wang S. Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review. *Virus Research.* 2002; 89: 229-240.
- Hildesheim A, Herrero R, Castle PE, et al. HPV co-factors related to the development of cervical cancer: results from a population-based study in Costa Rica. *British Journal of Cancer* 2001; 84(9): 1219–1226.
- HUMAN PROTEIN ATLAS (<http://www.proteinatlas.org/>)



- Hung C, Ueda M, Terai Y, Kumagai K, Ueki K, Kanda K, Yamaguchi H, Akise D, Ueki M. Homeobox gene expression and mutation in cervical carcinoma cells. *Cancer Sci.* 2003; 94(5):437-41.
- Holowaty P, Miller B, Rohan T. Natural dysplasia of the uterine cervix. *J. Natl. Cancer Inst.* 1999; (91): 252-258.
- Hong JH, Lee JK, Park JJ, Lee NW, Lee KW, Na JY. Expression pattern of the class I homeobox genes in ovarian carcinoma. *J Gynecol Oncol.* 2010; 21(1):29-37.
- Imadome K, Iwakawa M, Nakawatari M, Fujita H et al. Subtypes of cervical adenocarcinomas classified by EpCAM expression related to radiosensitivity. *Cancer Biol Ther* 2010; (10): 10.
- Instituto nacional de estadística y geografía, 2009. Norma Oficial Mexicana. Disponible en: [www.hgm.salud.gob.mx/servmed/nom\\_014\\_ssa2\\_1994.pdf](http://www.hgm.salud.gob.mx/servmed/nom_014_ssa2_1994.pdf)
- Instituto nacional de estadística y geografía, 2010. Norma Oficial Mexicana. Disponible en: [www.inegi.org.mx/inegi/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2010/cancer10.doc](http://www.inegi.org.mx/inegi/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2010/cancer10.doc)
- Kanai M, Hamada J, Takada M, Asano T, Murakawa K, Takahashi Y, Murai T, Tada M, Miyamoto M, Kondo S, Moriuchi T. Aberrant expressions of HOX genes in colorectal and hepatocellular carcinomas. *Oncol Rep.* 2010; 23(3):843-51.
- Klymenko T, Müller J. The histone methyltransferases Trithorax and Ash1 prevent transcriptional silencing by Polycomb group proteins. *EMBO Rep* 2004; (5):373-7.
- Krumlauf R. Hox genes in vertebrate development. *Cell* 1994; (78):191–201.
- Kurman RJ. Blaustein's Pathology of the female genital tract; 3rd ed., New York: Springer-Verlag; 2002.
- Jerevall, P. L. et al. Exploring the two-gene ratio in breast cancer— independent roles for HOXB13 and IL17BR in prediction of clinical outcome. *Breast Cancer Res. Treat*(2008); (107): 225–234.
- Launay O, Guillevin L. [Epidemiology of HIV-associated malignancies]. *Bull Cancer.* 2003; 90(5):387-92.

- Jung, C., Kim, R. S., Zhang, H. J., Lee, S. J. & Jeng, M. H. HOXB13 induces growth suppression of prostate cancer cells as a repressor of hormoneactivated androgen receptor signaling. *Cancer Res.* 2004; (64): 9185–9192.
- Lenselink C, Melchers W, Quint W, Hoebbers A, Hendriks J, Massuger L, Bekkers R. Sexual Behaviour and HPV Infections in 18 to 29 Year Old Women in the Pre-Vaccine Era in the Netherlands. *PLoS One.* 2008; 3(11): e3743.
- Li H, Huang CJ, Choo KB. Expression of homeobox genes in cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2002;84(2):216-21.
- Lin Q, Geng J, Ma K, Yu J, Sun J, Shen Z, Bao G, Chen Y, Zhang H, He Y, Luo X, Feng X, Zhu J. RASSF1A, APC, ESR1, ABCB1 and HOXC9, but not p16INK4A, DAPK1, PTEN and MT1G genes were frequently methylated in the stage I non-small cell lung cancer in China. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2009; 135(12):1675-84.
- Liu DB, Gu ZD, Cao XZ, Liu H, Li JY. Immunocytochemical detection of HoxD9 and Pbx1 homeodomain protein expression in Chinese esophageal squamous cell carcinomas. *World J Gastroenterol.* 2005;14;11(10):1562-6.
- López R, Garrido E, Piña P, Hidalgo A, Lazos M, Ochoa R, Salcedo M. HOXB homeobox gene expression in cervical carcinoma. *Int J Gynecol Cancer.* 2006a: 329-35.
- López R., Garrido E., Vazquez G., Piña P., Perez C., Alvarado I., and Salgado M. A subgroup of HOX Abd-B gene is differentially expressed in cervical cancer. *Int Int J Gynecol cancer.* 2006b; (16):1289-1296.
- Ma L, Benson V, Lim H, Dey K, Mass L. Abdominal B (AbdB) Hoxa genes: regulation in adult uterus by estrogen and progesterone and repression in mullerian duct by the synthetic estrogen diethylstilbestrol (DES). *Dev Biol* 1998; (197):141–54.
- Ma XJ, Dahiya S, Richardson E, Erlander M, Sgroi DC. Gene expression profiles of human breast cancer progression. *Proc. Natl Acad. Sci.*2003; (100), 5974–5979.
- Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature* 2007; (449): 682–688.

- Magnusson PKE, Lichtenstein P, Gyllenstein UB. Heritability of cervical tumors. *Int. J. Cancer*, 2000; (88): 698-701.
- Mainguy G, Koster J, Woltering J, Jansen H, Durston A. Extensive Polycistronism and Antisense Transcription in the Mammalian Hox Clusters. *PLoS One*. 2007; 4;2(4):e356.
- Martens, J.H., O'Sullivan, R.J., Braunschweig, U., Opravil, S., Radolf, M., Steinlein, P. and Jenuwein, T. The profile of repeat-associated histone lysine methylation states in the mouse epigenome. *Embo J* 2005; (24): 800-12.
- McGinnis W, Krumlauf R. Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 1992; 68:283–302.
- McMurray HR, Nguyen D, Westbrook TF, McAnce DJ. Biology of human papillomaviruses. *Int J Exp Pathol* 2001; 82:15-33.
- Miao J, Wang Z, Provencher H, Muir B, Dahiya S, Carney E, Leong CO, Sgroi DC, Orsulic S. HOXB13 promotes ovarian cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(43):17093-8.
- Middleton K, Peh W, Southern S, Griffin H, Sotlar K, Nakahara T, El Sherif A, Morris L, Seth R, Hibma M, Jenkins D, Lambert P, Coleman N, Doorbar J. Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *Virology*. 2003; 77(19):10186-201.
- Miller GJ, Miller HL, van Bokhoven A, Lambert JR, Werahera PN, Schirripa O, Lucia MS, Nordeen SK. Aberrant HOXC expression accompanies the malignant phenotype in human prostate. *Cancer Res*. 2003; 15;63(18):5879-88.
- Moreno V, Bosch FX, Muñoz N, *et al*. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* 2002; 359(9312):1085–1092.
- Morgan R, Plowright L, Harrington KJ, Michael A, Pandha HS. Targeting HOX and PBX transcription factors in ovarian cancer. *BMC Cancer*. 2010; 10(10):89
- Moscicki B, Shiboski S, Hills K, Powell J, Jay N, Hanson N, Miller S, Canjura L, Farhat S, Broering M, Darragh M. Regression of low-grade squamous intra-epithelial lesions in young women. *Lancet* 2004; 364(9446):1678-83.

- Munger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res* 2002; (89):213–228.
- Muñoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol* 2000;(19):1-5.
- Muñoz N, Franceschi S, Bosetti C, *et al.* Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* 2002; 359(9312)1093–1101.
- Muñoz N, Bosch X, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Keerti V, Shah D, Peter F. Snijders D, Chris M. Meijer, D. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348:518-527.
- Nakagawa H, Sugano K, Fujii T, Kubushiro K, Tsukazaki K and Nozawa S. Frequent detection of human papilloma viruses in cervical dysplasia by PCR single-strand DNA-conformational polymorphism analysis. *Anticancer Res.* 2002; 22(3): 1655-1660.
- Nobbenhuis MA, Walboomers JM, Helmerhorst TJ, Rozendaal L, Remmink AJ, Risse EK, van der Linden HC, Voorhorst FJ, Kenemans P, Meijer CJ. Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: a prospective study. *Lancet.* 1999;354(9172): 20-5.
- Okamoto OK, Oba-Shinjo SM, Lopes L, Nagahashi Marie SK. Expression of HOXC9 and E2F2 are up-regulated in CD133(+) cells isolated from human astrocytomas and associate with transformation of human astrocytes. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 769(7-8):437-42.
- Parkin, Bray, Ferlay and Pisani. Global Cancer Statistics, 2002. CA: *A Cancer Journal for Clinicians* 2005; 55(2): 74.
- Pim D. Lawrence B. Interaction of viral oncoproteins with cellular target molecules: infection with high-risk vs low-risk human papillomaviruses. *APMIS* 118: 471–493
- Pereira PM, Marques JP, Soares AR, Carreto L *et al.* MicroRNA expression variability in human cervical tissues. *PLoS One* 2010 Jul 26;5(7):e11780.

- Perez C, Vázquez G, López R, Piña P, Moreno J, Salcedo M. Genome wide expression analysis in HPV16 Cervical Cancer: identification of altered metabolic pathways. *Infect Agent Cancer*. 2007; (2):16.
- Plowright L, Harrington KJ, Pandha HS, Morgan R. HOX transcription factors are potential therapeutic targets in non-small-cell lung cancer (targeting HOX genes in lung cancer). *Br J Cancer*. 2009;100(3):470-5.
- PUBMED (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).
- Progenetix <http://www.progenetix.net/cgi-bin/pgHome.cgi>
- Redline W, Hudock P, MacFee M, Patterson P. Expression of AbdB-type homeobox genes in human tumors. *Lab Invest*. 1994; 71:663–670.
- Rajkumar T, Vijayalakshmi N, Sabitha K, Shirley S et al. A 7 gene expression score predicts for radiation response in cancer cervix. *BMC Cancer* 2009 Oct 15;9:365.
- Remmink AJ, Walboomers JM, Helmerhorst TJ, Voorhorst FJ, Rozendaal L, Risse EK, Meijer CJ, Kenemans P. The presence of persistent high-risk HPV genotypes in dysplastic cervical lesions is associated with progressive disease:natural history up to 36 months. *Int J Cancer*.1995;4; 61(3):306-11.
- Richart RM, Barron BA. A follow-up study of patients with cervical dysplasia. *Am J Obst Gyn*. 1969. 105: 386-93.
- Saegusa M. Hashimura M. Machida D. Okayasu I. Down-regulation of CD44 standard and variant isoforms during the development and progression of uterine cervical tumours. *J Pathol*. 1999;187(2):173-83.
- Schwartz, Y.B., and Pirrotta, V. Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes. *Nat. Rev. Genet*. 2007;(8): 9–22.
- Scotto L, Narayan G, Nandula SV, Arias-Pulido H et al. Identification of copy number gain and overexpressed genes on chromosome arm 20q by an integrative genomic approach in cervical cancer: potential role in progression. *Genes Chromosomes Cancer* 2008;47(9):755-65.
- Sellors J. Sankaranarayanan R. Colposcopy and Treatment of Cervical Intraepithelial Neoplasia: A Beginners' Manual. IARC. Francia (2003). pp 13-15
- Sessa L, Breiling A, Lavorgna G, Silvestri L, Casari G, Orlando V. Noncoding RNA synthesis and loss of Polycomb group repression accompanies the colinear activation of the human HOXA cluster. *RNA*. 2007; 13(2):223-39.

- Shim C, Zhang W, Rhee CH, Lee JH. Profiling of differentially expressed genes in human primary cervical cancer by complementary DNA expression array. *Clin Cancer Res* 1998; (4): 3045–50.
- Singh SK, Clarke ID, Hide T, Dirks PB. Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene* 23(43):7267-73, 2004.
- Shingleton HM, Bell MC, Fremgen A, Chmiel JS, Russell AH, Jones WB, Winchester DP, Clive RE. Is there really a difference in survival of women with squamous cell carcinoma, adenocarcinoma, and adenosquamous cell carcinoma of the cervix? *Cancer*. 1995; (76): 1948-55.
- Simon J, Chiang A, Bender W. Ten different Polycomb group genes are required for spatial control of the *abdA* and *AbdB* homeotic products. *Development* 1992; (114):493-505.
- Smith JS, Herrero R, Bosetti C, *et al.* Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 2002; 94(21):1604–1613.
- Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T Jr, Young N; Forum Group Members; Bethesda 2001 Workshop. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*. 2002;24;287(16):2114-9.
- Stanley M. Pett M. Coleman N. HPV: from infection to cancer. *Biochemical Society Transactions* 2007;(35): 6
- Starkova J, Zamostna B, Mejstrikova E, Krejci R, Drabkin HA, Trka J. HOX gene expression in phenotypic and genotypic subgroups and low HOXA gene expression as an adverse prognostic factor in pediatric ALL. *Pediatr Blood Cancer*. 2010; 1; 55(6):1072-82.
- Svingen T. and Tonissen K. Hox transcription factors and their elusive mammalian gene targets. *Nature* 2006; (97): 88-96.
- Szarewski A, Cuzick J. Smoking and cervical neoplasia: a review of the evidence. *Journal of Epidemiological Biostatistics* 1998; (3):229–256).
- Taylor S, Vanden B, Igarashi P. A conserved Hox axis in the mouse and human female reproductive system: late establishment and persistent adult expression of the Hoxa cluster genes. *Biol Reprod* 1997; (57):1338–45.

- Taylor S, Arici A, Olive D, Igarashi P. HOXA10 is expressed in response to sex steroids at the time of implantation in the human endometrium. *J Clin Invest* 1998; (101):1379–84.
- Taylor S, Igarashi P, Olive L, Arici A. Sex steroids mediate HOXA11 expression in the human peri-implantation endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; (84):1129–35.
- van Hamont D, van Ham MA, Bakkers JM, Massuger LF, Melchers WJ. Evaluation of the SPF10-INNO LiPA human papillomavirus (HPV) genotyping test and the roche linear array HPV genotyping test. *J Clin Microbiol.* 2006;44(9):3122-9.
- Vazquez G, García A, Ciudad J, Noé V, Peñuelas S, López R, Mendoza P, Piña P, Salcedo M. Differentially expressed genes between high-risk human papillomavirus types in human cervical cancer cells. *Int J Gynecol Cancer* 2007, (17), 484–491.
- WHO/ICO. Human Papillomavirus and Related Cancers. México 2010([www.who.int/hpvcentre](http://www.who.int/hpvcentre))
- Woodman B, Collins S, Winter H, Bailey A, Ellis J, Prior P, Yates M, Rollason P, Young S. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet* 2001; 357:1831-1836.
- Woodman C. Collins S. Young L. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature Reviews.* 2007; (7)
- Walboomers M, Jacobs V, Manos M, Bosch X, Kummer A, Shah V, Peter J, Snijders F, Peto J, Chris L, Meijer M, Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189(1):12-9.
- Wang Z, Dahiya S, Provencher H, Muir B, Carney E, Coser K, Shioda T, Ma XJ, Sgroi DC. The prognostic biomarkers HOXB13, IL17BR, and CHDH are regulated by estrogen in breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 2007; (13):6327–6334.
- Xiao-Jun Ma, Susan G., Hilsenbeck, Wilson W, Li D., Sgroi D., Bender R., Osborne C., Craig A. and Erlander G. The HOXB13:IL17BR expression index is a prognostic factor in early-stage breast cancer. *Journal of Clinical Oncology.* 2006; 24(28): 4611-4619.

- Ye F, Zhou C, Cheng Q, Shen J, Chen H. Stem-cell-abundant proteins Nanog, Nucleostemin and Musashi1 are highly expressed in malignant cervical epithelial cells. *BMC Cancer* 2008; (8):108.
- Yekta S, Hung S, Bartel D. MicroRNA-Directed Cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* 2004; (304) pp. 594-596.
- Zehbe I and Wilander E. Human papillomavirus infection and invasive cervical neoplasia: a study of prevalence and morphology. *J Pathol.* 1997; 181(3):270-275.
- Zhai Y, Kuick R, Nan B, Ota I, Weiss S, Trimble C, Fearon E, Cho K. Gene Expression Analysis of Preinvasive and Invasive Cervical Squamous Cell Carcinomas Identifies HOXC10 as a Key Mediator of Invasion. *Cancer Res.* 2007; 67(21): 10163-72.
- Zeltser L, Desplan C, Heintz N. Hoxb-13: a new Hox gene in a distant region of the HOXB cluster maintains colinearity. *Development* 1996; (122):2475–84.
- Zheng Z, Baker C. Papillomavirus Genome, Structure, Expression and Post-Transcriptional Regulation. *Front Biosci* 2006; (11): 2286-2302.



## 10. Anexos.

### Diseños de matrices de los MAT construidos.

MAT "G4-1"										
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1								81	80	79
2	1	2	2	4	5	6	7	8	9	10
3	20	19	18	17	16	15	14	13	12	11
4	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
5	40	39	38	37	36	35	34	33	32	31
6	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
7	60	59	58	57	56	55	54	53	52	51
8	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
9			78	77	76	75	74	73	72	71

Muestras usadas en el MAT G4-1					
1	CT Ovario CaOsmb	31	B02-5451-3	61	B01 1227
2	CT Mama 2954-9	32	B02-5451-3	62	B02 6616-2
3	B01 7002-8	33	B02-1909-1	63	B02 6616-2
4	B01 7002-8	34	B02-1909-1	64	B06 1758-1
5	B02 6548-2	35	B06-8806-1	65	B06 1758-1
6	B02 6548-2	36	B06-8806-1	66	B06 6351
7	B08-6897	37	B05 5672	67	CT Mama I.8431-02
8	B08-6897	38	B05 5672	68	B08 10224-5
9	B07-10830	39	B02-605-7	69	B08 10224-5
10	B07-10830	40	B02-5280	70	B08 10224-5
11	B02-5451-2	41	B02-5280	71	B08 4995-2
12	B02-5451-2	42	B01-5191-2	72	B08 4995-2
13	B02-5451-2	43	B01-5191-2	73	B08 4995-2
14	B02-4129-1	44	CT Ovario CaOsmb	74	B08 11084-5
15	B02-4129-1	45	B02 1909-2	75	B08 8718-1
16	B02-4129-5	46	B02 1909-2	76	B08 160-3
17	B02-4129-5	47	B06 1314	77	B08 6187-6
18	B02-4129-5	48	B06 1314	78	B08 150-3
19	B02-598-7	49	B02 4704-10	79	CT CaO EPH
20	B02-598-7	50	B02 4704-10	80	CT Mama I.8431-02
21	B02 605-7	51	CT Ganglio Mama	81	CT Ganglio Mama
22	B02 605-7	52	B02 4024		
23	B02-6428-3	53	B02 4024		
24	B02-6428-3	54	B04 7158		
25	B02-6428-3	55	B04 7158		
26	B01 2603-6	56	B04 7158		
27	B01 2603-6	57	B04 7158		
28	B01 7363	58	B02 -645		
29	B01 7363	59	B02 -645		
30	B02-5451-3	60	B01 1227		

MAT "G4-2"													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
B	26	25	24	23	22	21	20	19	18	17	16	15	14
C	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
D	52	51	50	49	48	47	46	45	44	43	42	41	40
E		53	54	55	56	57	58	59	60	61	62		
F		72	71	70	69	68	67	66	65	64	63		
G		73	74	75	76	77	78	79	80	81	82		
H		92	91	90	89	88	87	86	85	84	83		
I		93	94	95									

Muestras usadas en el MAT G4-2							
1	B06-6825-29	31	B06-6559-14	61	B02-4112	91	CT Pulmón
2	B06-6825-29	32	B06-6559-14	62	B02-4112	92	CT Mama
3	B05-8382-7	33	B06-2618-1	63	B06-8680-1	93	CT Mama
4	B05-8382-7	34	B06-2618-1	64	B06-8680-1	94	CT Pulmón
5	B02-1748-1	35	B06-2618-1	65	B06-8680-1	95	CT Cérnix
6	B02-1748-1	36	B01-3102-1	66	B02-1748-8		
7	B02-1748-1	37	B01-3102-1	67	B02-1748-8		
8	B02-1748-1	38	B01-3102-1	68	B02-1748-8		
9	B06-6825-36	39	B02-1748-9	69	B02-1748-8		
10	B06-6825-36	40	B02-5353	70	B07-7756		
11	B06-6825-36	41	B02-5353	71	B07-7756		
12	B06-6825-36	42	B02-8680-3	72	B06 6559-3		
13	B06-6825-36	43	B02-8680-3	73	B06 6559-3		
14	B06-6559-1	44	B06-2018-1	74	B01-1135		
15	B06-6559-1	45	B06-2018-1	75	B01-1135		
16	B08-6114-2	46	B01-1229	76	B06-2018-2		
17	B08-6114-2	47	B01-1229	77	B06-2018-2		
18	B08-6114-2	48	B06-6825-1	78	B06-6825-3		
19	B05-8382-1	49	B06-6825-1	79	B06-6825-3		
20	B05-8382-1	50	B08-4768	80	B08-6341		
21	B05-8382-1	51	B06-2618-4	81	B01-5065-1		
22	B05-8382-1	52	B06-2618-4	82	B01-5065-1		
23	B06-6825-10	53	CT CaOE PM	83	B01-5065-1		
24	B06-6825-10	54	CT CaOesmB	84	B08-10422		
25	B06-6825-10	55	CT Mama	85	B08-10422		
26	B06-4801-21	56	CT Mama	86	B01-3102-2		
27	B06-4801-21	57	B01-5065-2	87	B08-6114-1		
28	B06-4801-21	58	B01-5065-2	88	B08-6114-1		
29	B06-4801-21	59	B01-5065-2	89	CT Mama		
30	B06-6559-14	60	B02-4112	90	CT Ovario		

MAT "G4-3"												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B	24	23	22	21	20	19	18	17	16	15	14	13
C	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
D	48	47	46	45	44	43	42	41	40	39	38	37
E	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
F	72	71	70	69	68	67	66	65	64	63	62	61
G	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
H	96	95	94	93	92	91	90	89	88	87	86	85
I					104	103	102	101	100	99	98	97

Muestras usadas en el MAT "G4-3"							
1	B06-1021-10	31	B08-2087-1	61	B08-6293	91	B08-10186
2	B06-1021-10	32	B06-2087-1	62	B08-6293	92	B08-10186
3	B06-1021-4	33	B06-2087-1	63	B02-6625-12	93	B07-11449
4	B06-1021-4	34	B08-6213-6	64	B06 1746	94	B07-11449
5	B06-2087-2	35	B08-6213-6	65	CT Pene	95	B02-6616-2
6	B06-2087-2	36	B08-6345-1	66	CT Ojo	96	B02-6616-2
7	B08-6597-1	37	B06-1546	67	CT CaO	97	CT Pulmón
8	B08-6213-6	38	B06-1746	68	CT Ojo	98	CT Pulmón
9	B08-6213-6	39	B06-1746	69	CT laringe	99	CT Mama
10	B08-6345-1	40	CT Ojo	70	CT Pulmón	100	CT Pene
11	B08-6345-1	41	CT Ojo	71	B08-6213-6	101	CT Cérvix
12	B02-6428-4	42	CT CaO	72	B08-6293	102	CT Ovario
13	B02-6428-2	43	CT Cérvix	73	B08-6293	103	CT Ojo
14	B02-6428-2	44	CT Mama	74	B02-6625-12	104	CT Ojo
15	B06-8954	45	B02-6625-12	75	B02-6625-12		
16	B06-8954	46	B06-1021-10	76	B02-6625-12		
17	CT Pulmón	47	B06-1021-10	77	B06-1746		
18	CT CaO	48	B06-1021-1	78	B06 2087-2		
19	CT Mama	49	B06-1021-1	79	B02-6625-14		
20	CT Cérvix	50	B06-1021-1	80	B02-6625-14		
21	CT Laringe	51	B06-1021-1	81	B02-6625-14		
22	B06-2087-1	52	B02-6625-14	82	B02-6428-4		
23	B06-2087-2	53	B02-6625-14	83	B02-6428-4		
24	B08-6597-1	54	B02-6428-4	84	B08-4707		
25	B08-6428-4	55	B02-6428-4	85	B02-1029-8		
26	B08-5686	56	B02-6428	86	B08-6597-1		
27	B01-5207-2	57	B02-6428	87	B02-424-7		
28	B02-6777-3	58	B02 6777-3	88	B07-8667		
29	B08-4707	59	B08-4707	89	B06-2087-1		
30	B08-6293	60	B08-4707	90	B06-2087-1		

MAT "G4-5"												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
a	1	14	15	28	29	42	43	56	57	70	71	
b	2	13	16	27	30	41	44	55	58	69	72	
c	3	12	17	26	31	40	45	54	59	68	73	
d	4	11	18	25	32	39	46	53	60	67	74	81
e	5	10	19	24	33	38	47	52	61	66	75	80
f	6	9	20	23	34	37	48	51	62	65	76	79
h	7	8	21	22	35	36	49	50	63	64	77	78

Muestras usadas en el MAT "G4-5"					
1	CT Mama	31	B08-4801-1	61	B08-10913-3
2	CT Mama	32	B08-5185-1	62	B08-10913-3
3	CT Pene	33	B08-5185-1	63	B08-5249-2
4	CT Pene	34	B08-4881-1	64	B08-5249-2
5	CT Ojo	35	B08-4881-1	65	B07-10888-6
6	CT Ojo	36	B08-8487-2	66	B07-10888-6
7	CT Pulmón	37	B08-8487-2	67	B08-7634
8	CT Pulmón	38	B08-9976-2	68	B08-9040-5
9	CT Próstata	39	B08-9976-2	69	B08-9040-5
10	CT Próstata	40	B08-9971-4	70	B08-5023-3
11	CT Mama	41	B08-9971-4	71	B08-10423
12	B08-6354-1	42	B08-5435-3	72	B08-10423
13	B08-6354-1	43	B08-5435-3	73	B08-6466
14	B08-6247-1	44	B07-9020-1	74	B08-6466
15	B08-6247-1	45	B07-9020-1	75	B08-7012
16	B08-5197-3	46	CT Pulmón	76	B08-7012
17	B08-5197-3	47	CT Pulmón	77	B08-6734
18	B08-6775-2	48	CT Mama	78	B08-6734
19	B08-6775-2	49	CT Mama	79	B08-10202-4
20	B08-10075-	50	CT Pene	80	B08-10202-4
21	B08-10075-	51	CT Pene	81	B08-10202-4
22	B08-6545-2	52	CT Ojo		
23	B08-6545-2	53	CT Ojo		
24	B08-10167-5	54	B08-11087-2		
25	B08-10167-5	55	B08-11087-2		
26	B08-10251-1	56	B08-10123-4		
27	B08-10251-1	57	B08-10123-4		
28	B08-4893-7	58	B07-6032-6		
29	B08-4893-7	59	B08-1306-3		
30	B08-4801-1	60	B08-10119-3		