

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA DE CONCENTRACIÓN EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS

Generación 2010-2012

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS
ÁREA DE INFECCIONES CRÓNICAS Y CÁNCER

**“ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE FAS Y FAS-L A NIVEL
SISTÉMICO Y EN CÉRVIX EN MUJERES CON LESIONES
PREMALIGNAS EN CÉRVIX Y CÁNCER CERVICOUTERINO”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

Luz Yvette López Díaz

Comité de tesis:

Director: Dr. Vicente Madrid Marina

Asesor: Dra. Kirvis Torres Poveda

Asesor: M. en C. Alfredo Lagunas Martínez

CUERNAVACA, MORELOS, MÉXICO

MARZO DE 2013.

El presente trabajo de tesis fue realizado bajo la dirección del Dr. Vicente Madrid Marina en el laboratorio 4PB, perteneciente al Área de Infecciones Crónicas y Cáncer del Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública.

Durante la realización del mismo, se contó con el apoyo económico de una beca para maestría del CONACYT (becario número: 372174).

Comité de tesis:

Dr. Vicente Madrid Marina

Dra. Kirvis Torres Poveda

M. en C. Alfredo Lagunas Martínez

Jurado de examen:

Presidente: Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes

Secretario: Dr. Vicente Madrid Marina

1er Sinodal: Dra. Vilma Maldonado

2do Sinodal: Dra. Ana Isabel Burguete García

3er Sinodal: M. en C. Eduardo Guzmán Olea

DEDICATORIAS

A Dios, por acompañarme en cada paso que doy, por darme fortaleza, templanza y salud.

A Marco porque su amor, sabiduría y paciencia me ayudaron a alcanzar esta meta. Eres la sal de mi vida. Te amo.

A Amparo Díaz, por criarme con amor, por haber sido mi cómplice y apoyo. Te extraño.

A mis padres, por su cuidado, amor y ejemplo que me han ayudado a ser lo que soy.

A mi hermano, por su cariño, apoyo y por siempre estar ahí. Jessy, bienvenida!.

A Aurelio Díaz, Carmelita Salinas, por creer en mí, darme su apoyo y transmitirme su sabiduría. A Eduardo y Alejandro por su cariño y amistad. Agradezco el ser parte de su familia.

A mi abuelo, porque en silencio y fuertemente me da su amor. Eres único y te quiero. A mis tías, Imelda, peky y chepina por estar conmigo siempre y velar por mí a su modo. Porque cada una le ha dado un toque especial a mi vida.

A mis amigos: Jacqueline y José por su amistad incondicional, sus consejos y todos los momentos que hemos vivido juntos.

Gracias a todos ustedes por acompañarme y ayudarme durante este duro camino. Gracias por hacer posible la realización de esta meta.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Vicente Madrid por que bajo su tutela me guio por el maravilloso mundo de la ciencia, por su apoyo y sabiduría brindada.

A mis asesores Kirvis Torres y Alfredo Lagunas por su consejo y apoyo durante la realización de este trabajo y por haber compartido conmigo su experiencia y conocimientos.

A Margarita Baena y Alejandro Zurita por su asesoría y valiosísima ayuda en el qRT-PCR.

A Esmeralda Ortiz por su valiosa ayuda con el banco de muestras.

A Víctor Bermúdez, Oscar Peralta y Carla Contreras por sus valiosas observaciones y consejos.

A Gaby Martínez por su tiempo dedicado, sus consejos y enseñanzas. Eres mi asesora no oficial. Te estimo y te admiro.

A mis compañeros: Sepori, Abraham, Flor, Eli, Oswaldo, Violeta, Johnatan y Gloria por los momentos compartidos y darle ese toque especial a estos años de posgrado.

A los integrantes del laboratorio: Esmeralda, Gustavo, Abrahan, Cesar, Joseline, Flor, Eli, Oswaldo, Maribel, Alicia, Felipe, Elsa y los que se me olvidan (junto con una disculpa), por su disposición a ayudarme y hacer el trabajo cotidiano más alegre.

A los integrantes de Secretaría Académica: Salvador Mejía y Ana Reyes por su eficiencia y amabilidad.

A Miguel Sánchez Alemán y Carlos Conde Gonzales por instrucción y apoyo con mis trámites académicos, su excepcional desempeño y amabilidad brindada.

A los integrantes de mi jurado de tesis por sus valiosos consejos y observaciones.

ÍNDICE GENERAL

I. RESUMEN.....	7
II. INTRODUCCIÓN.....	9
EPIDEMIOLOGÍA DEL CaCU	9
PATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD.....	11
VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO	14
HISTORIA NATURAL DE LA ENFERMEDAD.....	16
PERSISTENCIA DEL VIRUS	17
RESPUESTA INMUNE FRENTE A VPH.....	18
FAS Y FASL.....	20
APOPTOSIS	21
III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	26
IV. ANTECEDENTES.....	26
V. JUSTIFICACIÓN.....	28
VI. HIPÓTESIS.....	28
VII. OBJETIVOS.....	29
OBJETIVO GENERAL	29
OBJETIVOS PARTICULARES	29
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
POBLACIÓN DE ESTUDIO: CRITERIOS DE Exclusión E INCLUSIÓN	30
OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA	31
EXTRACCIÓN DE ARN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA, EXUDADO Y BIOPSIAS DE CÉRVIX	32
SÍNTESIS DE ÁCIDO DESOXIRIBONUCLEICO COMPLEMENTARIO (ADNc)	32
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	33
DETECCIÓN DE FAS-L EN SUERO POR ELISA	35

RT-PCR CUANTITATIVO EN TIEMPO REAL (qRT-PCR)	35
RANGO DINÁMICO Y EFICIENCIAS DE AMPLIFICACIÓN	37
ANÁLISIS DE DATOS	37
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	38
RESULTADOS	39
ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DEL ARNm DE FAS Y FASL EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA	39
ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DEL ARNm DE FAS Y FASL A NIVEL DE CÉRVIX	41
CONCENTRACIÓN SÉRICA DE FASL SOLUBLE.....	43
ANÁLISIS DE CORRELACIÓN	45
DISCUSIÓN.....	46
CONCLUSIONES	51
PERSPECTIVAS	53
ANEXOs	54
CONSIDERACIONES ÉTICAS Y DE BIOSEGURIDAD	54
ANEXO 1: RANGOS DINÁMICOS	55
Anexo2: EFICIENCIAS DE AMPLIFICACIÓN	56
ANEXO 3: CARTAS DE APROBACIÓN POR LAS COMISIONES	57
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	64

I. RESUMEN

El Cáncer cervicouterino (CaCU) es uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial y se sitúa en el cuarto lugar como causa de mortalidad por cáncer en mujeres. El principal factor de riesgo de esta neoplasia es la infección por el virus del papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR). La persistencia del virus y la subsecuente producción de proteínas oncogénicas que transforman a las células infectadas, conducen al desarrollo de lesiones que van progresando en malignidad hasta convertirse en cáncer invasivo. La infección por el VPH en el cérvix es controlada por la respuesta inmune, por lo que una inmunosupresión local favorece el desarrollo del CaCU. El mecanismo de Fas y FasL es uno de los principales mecanismos ejecutados por la respuesta inmune celular contra infecciones virales. Existe evidencia experimental donde se ha observado una alteración en los niveles de expresión de éstas moléculas en pacientes tanto con melanoma como con CaCU. Debido a esto, analizar los niveles de expresión de Fas/FasL en sangre periférica y en el cérvix de pacientes con lesiones en diferentes estadios de la enfermedad y de CaCU, permitiría conocer la implicación biológica potencial de estas dos moléculas en el desarrollo de esta neoplasia. En el presente trabajo se analizó el nivel de expresión de Fas/FasL en muestras de sangre periférica y tejido cervicouterino de pacientes con diferentes estadios de lesiones de cérvix y CaCU mediante la técnica de RT-PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR). Se encontró que en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) el nivel de expresión del Ácido Ribonucleico mensajero (ARNm) tanto de Fas como de FasL fue mayor en todos los grupos analizados (lesión escamosa intraepitelial de bajo grado-LEIBG, lesión de alto grado-LIEAG y CaCU) al compararlo con el grupo sin lesión (SL). Las diferencias de expresión fueron estadísticamente significativas para todos los grupos, (Fas: LEIBG $p=0.002$, LEIAG $p=0.0002$ y CaCU $p=0.0001$; FasL: LEIAG $p=0.0001$), excepto, para los grupos LEIBG y CaCU en el análisis de FasL respecto al grupo sin lesión ($p=0.0121$ y $p=0.1557$ respectivamente). A nivel de Cérvix, el nivel de expresión del ARNm tanto de Fas como de FasL fue menor en los grupos LEIBG y LIEAG y mayor en el grupo de CaCU al compararlos con el grupo sin lesión (SL). Las diferencias de expresión fueron estadísticamente significativas solo para el grupo de CaCU (FasL: $p=0.003$). Cabe señalar

que no hubo diferencia estadística en el análisis de Fas: $p=0.010$, posiblemente por el tamaño de muestra analizado.

Al evaluar la concentración de FasLs a nivel sérico mediante la técnica de ELISA (del Inglés “Enzyme-Linked immuno Sorbent Assay”), se observó una diferencia estadísticamente significativa al comparar el nivel de proteína en los grupos de LEIBG ($p=0.0056$), LEIAG ($p=0.00001$) y CaCU ($p=0.000001$) con respecto al grupo sin lesión; observándose una disminución de los niveles de la proteína conforme avanzaba el grado de lesión.

Tras el análisis de correlación entre el nivel de expresión del ARNm de FasL a nivel sistémico y a nivel del cérvix en mujeres sin lesión en cérvix, con LEIBG, LEIAG y CaCU, no se encontró asociación entre las URE de FasL a nivel sistémico y las URE de FasL a nivel del cérvix para cada uno de los grupos ($r= -0.139$; $P=0.1573$). De igual forma, al analizar el nivel de expresión del ARNm de Fas a nivel sistémico y a nivel del cérvix en mujeres sin lesión en cérvix, con LEIBG, LEIAG y CaCU, no se encontró asociación entre las URE de Fas a nivel sistémico y las URE de Fas a nivel del cérvix ($r= 0.5556$; $P=0.1573$). Adicionalmente, se evaluó la correlación tanto de Fas como de FasL, a nivel sistémico y en cérvix estratificando por diagnóstico. Se encontró correlación positiva en los niveles de expresión tanto de Fas como de FasL, a nivel sistémico ($\rho=0.7793$, $p=0.0000$) y a nivel de cérvix ($\rho=0.8104$, $p=0.0000$), para el grupo de LEIBG. De manera similar hubo correlación positiva en los niveles de expresión tanto de Fas como de FasL, solo a nivel sistémico ($\rho=0.6117$, $p=0.0042$), para el grupo de LEIAG. En contraste se encontró para el grupo de CaCU, una correlación positiva en los niveles de expresión tanto de Fas como de FasL, solo a nivel de cérvix ($\rho=0.8374$, $p=0.0000$).

Finalmente se realizó un análisis de correlación intergrupar de la concentración de proteína de Fas-L a nivel sérico, en mujeres sin lesión en cérvix, con LEIBG, LEIAG y CaCU, y se encontró una asociación inversa entre la concentración de FasLs y los grupos analizados, con un coeficiente de correlación de $r= -0.5774$, $P=0.0001$.

Los datos obtenidos en este trabajo de tesis, apoyan la idea de que Fas y FasL juegan un papel como modulador negativo de la respuesta inmune local, lo cual favorecería la proliferación de las células tumorales y por consiguiente el desarrollo del CaCU.

II. INTRODUCCIÓN

EPIDEMIOLOGÍA DEL CaCU

El CaCU es uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial y representa la cuarta causa de muerte por cáncer en mujeres. Anualmente se reportan 530 mil nuevos casos de CaCU y aproximadamente 275 mil muertes a nivel mundial [1].

En países subdesarrollados se detectan más del 85% de los casos nuevos, alcanzando las tasas más altas de incidencia y mortalidad en las regiones de África, centro y sur de Asia y en América del sur; mientras que las regiones con menor incidencia son Asia occidental, América del norte, el centro de África, Australia, Nueva Zelanda y Europa (figura 1) [1, 2].

Los programas de tamizaje mediante estudios citológicos del cérvix han disminuido la mortalidad por CaCU en países desarrollados; sin embargo, en algunos países de Latinoamérica la mortalidad anual estimada por CaCU es de 32,000 mujeres [3]. La falta de información y la deficiencia en incorporar a las mujeres en los programas de salud, impide poder realizar un seguimiento sistematizado citológico que permitiría asegurar el diagnóstico y tratamiento oportuno de la enfermedad. América Latina no es la excepción, sobre todo en las regiones de pobreza extrema [4].

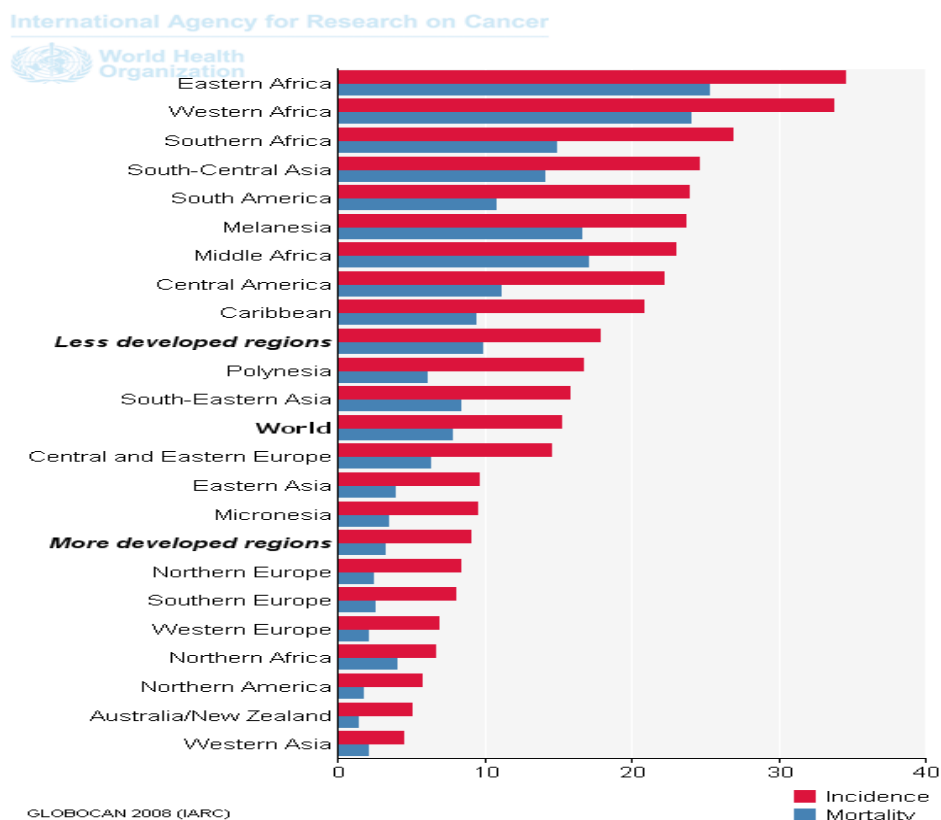


Figura 1. Tasas de incidencia y mortalidad estimadas para CaCU a nivel mundial, estandarizadas por edad, por cada 100,000 habitantes. Obtenido de Globocan 2008 (IARC).

En México, el CaCU es la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres entre 35 a 49 años de edad. Cada año se presentan 10,186 casos nuevos y 5,061 muertes por este tipo de cáncer [5]. La distribución de las tasas de mortalidad por estado en la República Mexicana en un reporte del año 2000 fue muy heterogénea. Las tasas más altas se presentan en Chiapas, Oaxaca, Guerrero y Yucatán; mientras que las tasas más bajas se encontraron en los estados del norte del país (figura 2) [6].

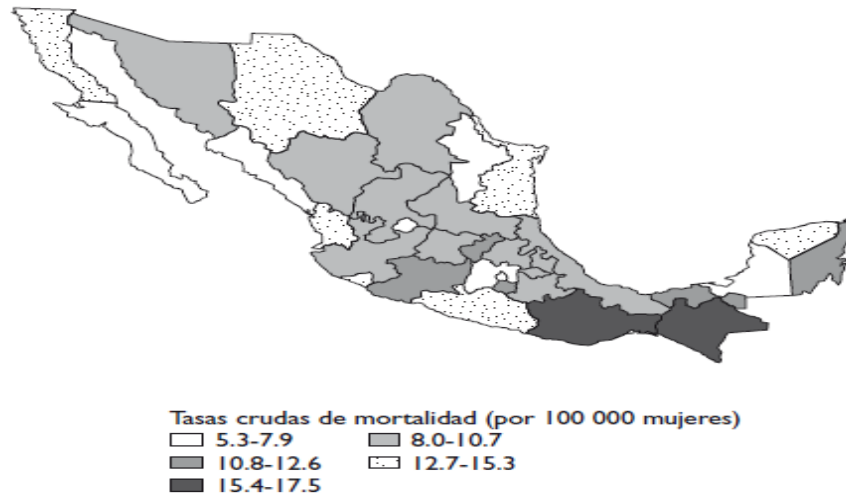


Figura 2. Variación de la tasa de mortalidad por CaCU en México. Modificado de Palacio-Mejía, 2003[6].

PATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD

La infección por VPH es transmitida vía contacto sexual y se adquiere en la mayoría de los casos al inicio de su vida sexual [4]. En la mujer, la enfermedad subsecuente a la infección de VPH, se caracteriza por cambios morfológicos progresivos localizados en el epitelio del cérvix (pérdida de la forma celular típica y agrandamiento nuclear), los cuales ocurren posteriores a la exposición de las células basales con el virus. Se ha descrito que micro-lesiones en el epitelio del cérvix, favorecen la exposición y entrada del VPH-AR en las células de la capa basal. El diagnóstico de las lesiones se puede realizar mediante examen citológico (Papanicolaou) y se puede confirmar por un examen histológico del cérvix [7, 8].

El sistema de nomenclatura vigente para clasificar histológicamente el tipo de lesión en cérvix, es el sistema Bethesda, el cual se basa en las características morfológicas del epitelio del cérvix y del extendido de la infección/lesión [9]. Para las anomalías escamosas del cérvix no invasivas (crecimientos anormales y precancerosos) se dan dos clasificaciones (figura 3 y 4) [10]:

1. LEIBG: Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado. Comprende Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) 1, también conocida como displasia leve. Se caracteriza por estar confinada a una tercera parte del epitelio basal del cérvix. Su principal característica morfológica es la observación de coilocitos, definidos como queratinocitos con forma redondeada y ovoide, los cuales presentan vacuolas perinucleares y atipia nuclear (núcleo agrandado e hiperocrómico). El 80% de los casos se encuentran asociados a la infección por VPH [10].
2. LEIAG: Lesión escamosa intraepitelial de alto grado. Se encuentra asociado en el 100% de los casos con infección por VPH. La morfología comprende células de mayor tamaño, citoplasma escaso, pérdida de la relación núcleo-citoplasma y poca presencia de coilocitos. Comprende NIC 2 y 3:
NIC 2: Displasia moderada. Es una lesión del cérvix escamosa de alto grado, caracterizada por una displasia moderada confinada a dos tercios del epitelio basal del cérvix.
NIC 3: Displasia severa. Cubre más de dos terceras partes de todo el epitelio del cérvix y puede llegar a cubrir la totalidad del grosor de su revestimiento. También es considerado como displasia severa y Carcinoma *in situ* (CIS) que no ha roto la capa basal y por lo tanto, no se ha extendido [10].

Finalmente se presenta el cáncer invasivo ó CaCU, asociado con la integración del genoma viral al genoma de la célula huésped y la sobre-regulación de la expresión de las proteínas oncogénicas E6 y E7 [11].

Dentro de los determinantes biológicos y genéticos que favorecen el progreso de LEIBG a LEIAG, está el grado de alteración cromosómica (aneuploidía), que caracteriza a las lesiones de alto grado y donde los cambios morfológicos son más evidentes. Por el contrario, las LEIBG presentan un contenido cromosómico normal (diploide) y tienden a revertir [12]. Modelos matemáticos estiman que el tiempo promedio de progresión de LEIBG a LEIAG es de cinco años aproximadamente, mientras que de LEIAG hacia cáncer invasor lleva alrededor de 10-13 años [13].

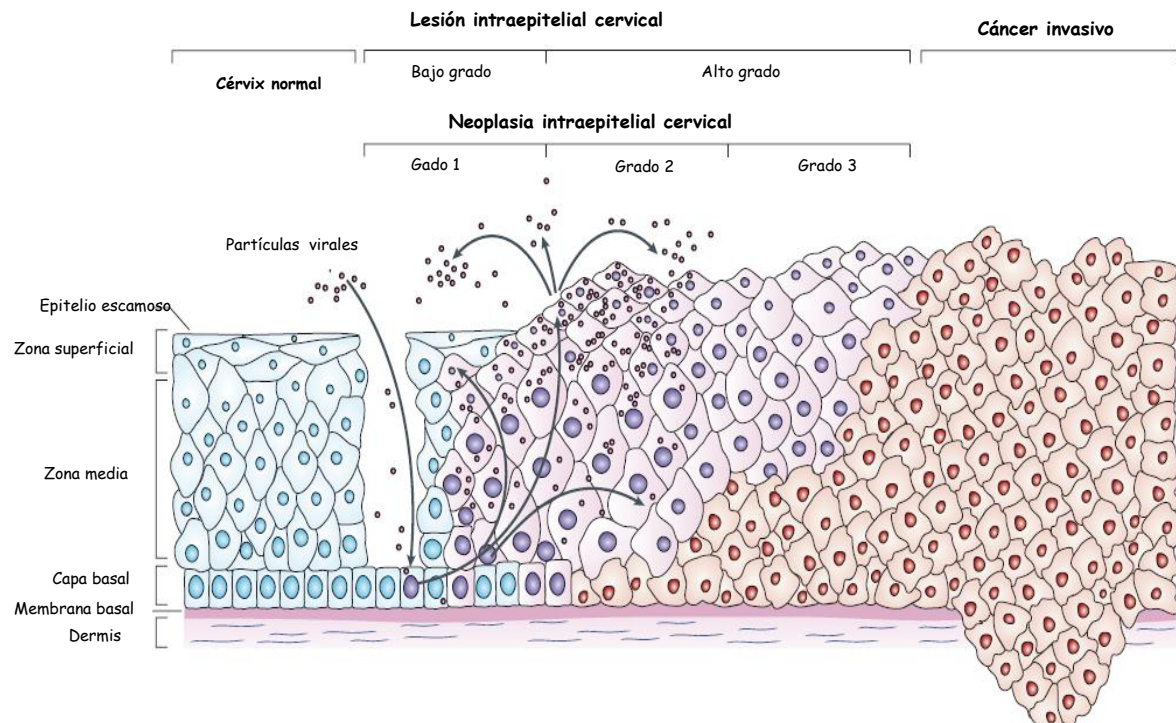


Figura 3. Patogenia de CaCU. Tipos de lesiones intra-epiteliales producidas por el VPH en el cérvix. Para detalles ver texto. Modificado de Woodman, 2007 [11].

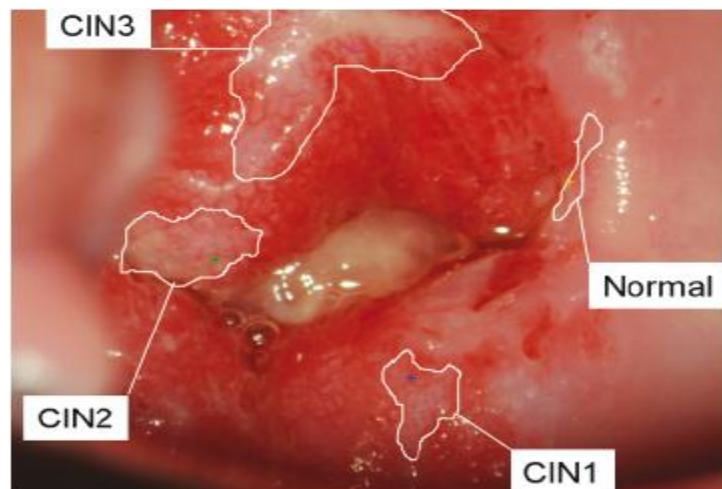


Figura 4. Imagen de diferentes lesiones intraepiteliales cervicales. Modificada de Schiffman, 2011 [14].

VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

A la fecha se han identificado más de 100 tipos del VPH, de los cuales, 40 infectan el tracto genital y cuya variabilidad genética se relaciona con su carcinogenicidad. El virus se replica en células estratificadas de piel y mucosas, causando lesiones como verrugas ó papilomas dependiendo del tipo de virus infectante, ya sea de bajo ó alto riesgo, respectivamente [5, 15].

El VPH es un virus que no posee envoltura lipídica y cuyo genoma consiste en ADN (Ácido desoxiribonucleico) de doble cadena de aproximadamente 8,000 pb (pares de bases) que se dividen en ocho ORFs, (siglas de “Open Reading Frame”), que codifican a las proteínas tempranas E6, 7, 1, 2, 4, 5 (E para early) y proteínas tardías L1 y 2 (L para Late). Dentro de la región LCR (siglas de “Long Control Region”) se encuentra el origen de replicación y secuencias que regulan la transcripción viral. La infección viral puede dividirse en etapas tempranas y tardías, y se han asociado al estado de diferenciación de la célula epitelial. Luego de infectar células de la capa basal, el virus expresa las proteínas tempranas (E1, 2, 4, 5, 6 y 7), lo que regula la replicación, transcripción y proliferación de la célula infectada. Durante el curso de la enfermedad, el virus se integra al genoma de la célula huésped. El ADN circular viral se corta en el ORF de E2. Parte de E2 y los ORFs adyacentes (E4, 5 y L2) son escindidos durante la integración viral (figura 5) [16].

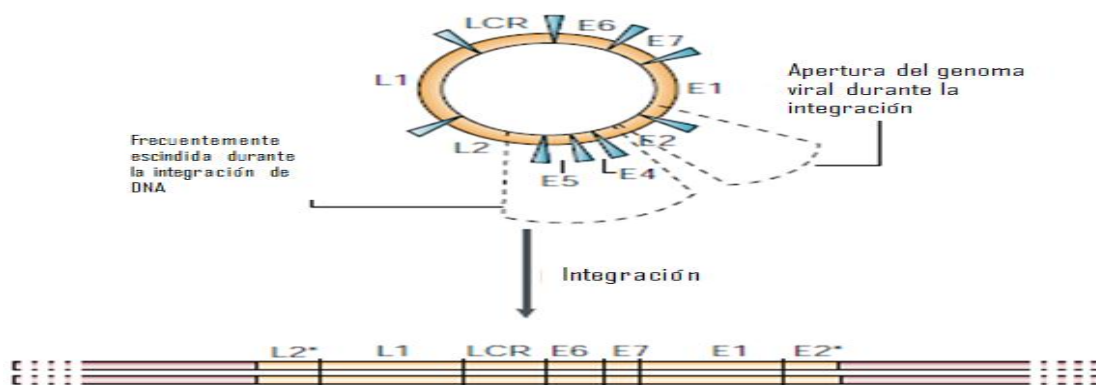


Figura 5. Organización del genoma viral de VPH y su integración en la célula huésped. Modificada de zur Hausen, 2002 [17]. Ver texto para detalles.

Luego de alcanzar la zona media del epitelio, el virus expresa las proteínas tardías y finalmente en la zona superficial del epitelio, produce y libera partículas virales completas (figura 6) [17].

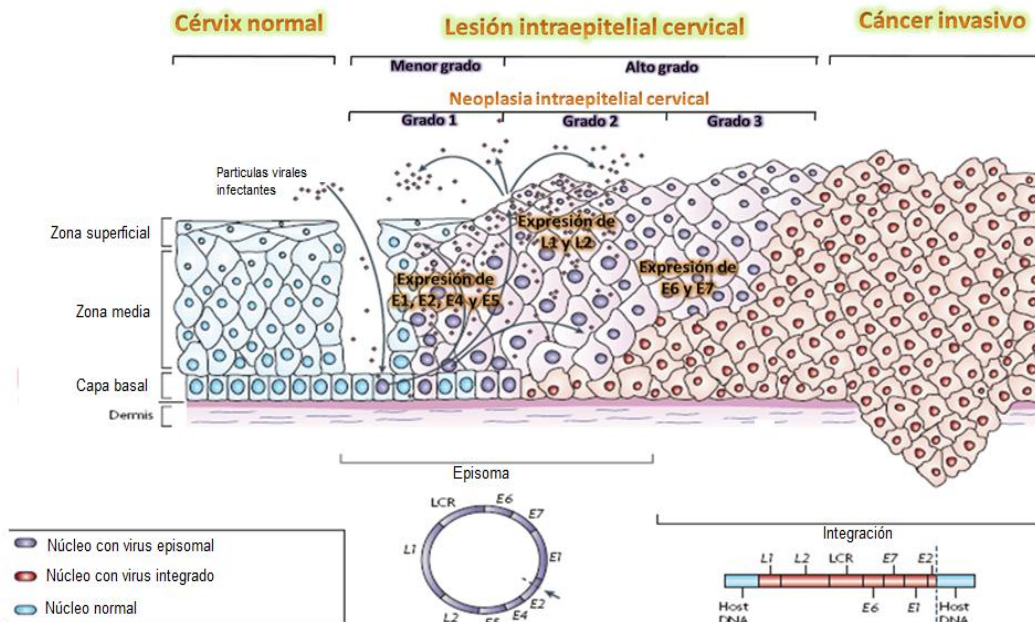


Figura 6. Etapas de la replicación de VPH. Modificado de Woodman, 2007 [11]. Para detalles, ver texto.

Las oncoproteínas virales E6 y E7 tienen la propiedad de transformar a las células normales infectadas en células tumorales. Los blancos celulares de E6 y E7 son las proteínas supresoras de tumores p53 y pRb respectivamente, promoviendo su degradación por el complejo proteosomal. Las proteínas p53 y pRb están involucradas en el control del ciclo celular, ya sea deteniéndolo frente a un daño al ADN (el cual si no es reparado, promueve la apoptosis celular) ó mediante la inhibición de la progresión del ciclo celular en la etapa G1/S. Por lo tanto, la proteólisis de proteínas celulares promovida por E6 y E7, permite la progresión del ciclo celular e inhibe la muerte celular, lo que favorece el crecimiento del tumor [15].

HISTORIA NATURAL DE LA ENFERMEDAD

Uno de los pioneros más importantes en el estudio de VPH como agente etiológico del CaCU fue el Dr. Harald zur Hausen, cuyos trabajos permitieron conocer que la infección por VPH es el factor de riesgo más importante para el desarrollo de la enfermedad [18-21]. Posteriormente los trabajos de Walboomers establecieron que la infección por VPH es una causa necesaria pero no suficiente para el desarrollo de CaCU [22].

Los tipos de VPH encontrados preferencialmente en CaCU se han designado como tipos de alto riesgo (VPH-AR), donde destacan los tipos 16, 18, 39, 45, 59, 68, 31, 33, 35, 52 y 58. Aquellos tipos VPH encontrados en lesiones no malignas, como condilomas, se denominan tipos de bajo riesgo (VPH-BR) a los cuales pertenece el tipo 11 y 6 [17, 20]. Los tipos de VPH-AR, principalmente VPH 16, están ampliamente distribuidos en toda la población humana. Los tipos 16 y 18 causan cerca de 60% a 70% de todas las lesiones precursoras y los cánceres invasores a nivel mundial, siendo los más agresivos, ya que desarrollan lesiones más tempranamente [18, 22, 23].

En 1995, la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) evaluó toda la información relevante existente hasta esa fecha, sobre el VPH y su relación en la carcinogénesis y concluyó que existía evidencia suficiente para declarar a los tipos de VPH 16 y 18 como carcinogénicos para el humano. En un estudio donde se analizaron más de 1000 casos confirmados histo-patológicamente como CaCU invasivo, en busca de ADN de viral mediante la técnica de PCR (siglas de “Polymerase Chain Reaction”), la positividad para VPH fue de 99.7% y los tipos de VPH con mayor prevalencia fueron: VPH16 (53%) VPH18 (15%), VPH 45 (9%), VPH 31 (6%) y VPH 33 (3%) [23].

PERSISTENCIA DEL VIRUS

La persistencia del virus en el cérvix es uno de los factores más importantes en el establecimiento y desarrollo de la neoplasia. La mayoría de las lesiones son eliminadas luego de 8-12 meses de su aparición gracias a la intervención del sistema inmune. Sin embargo, un pequeño porcentaje de las infecciones persiste, principalmente las causadas por VPH 16 [24], progresando a lesiones intra-epiteliales de alto grado, CIS y CaCU [25].

Para que se desarrolle el CaCU son necesarios dos eventos principales. El primero es la persistencia del VPH, que ocurre debido a una falla en el sistema inmune celular, que no permite la eliminación del virus. El segundo evento consiste en que se presenten los fenómenos de transformación en las células infectadas del epitelio del cérvix, como una consecuencia de la expresión de las proteínas oncogénicas del VPH. Los eventos anteriores ocurren en un lapso de tiempo largo que puede llegar hasta 20 años. En general las infecciones por VPH son transitorias y se reporta que 91% de los casos eliminan la infección, mientras que solamente 9% progresa a CaCU [26]. Se ha reportado un aumento de la expresión de IL-10 en muestras del epitelio del cérvix, conforme aumenta la severidad de la lesión, lo cual podría estar contribuyendo a un estado inmunosupresor en el micro ambiente de la lesión/tumor [27, 28].

Los factores de riesgo determinantes para el desarrollo de CaCU, se pueden agrupar en factores ambientales y genéticos. Estos interaccionan conjuntamente y mientras exista una mayor cantidad de ambos presentes en una persona y una elevada exposición para alguno de ellos, mayor será la probabilidad de que se desarrolle la enfermedad (figura 7).

Dentro de los cofactores de riesgo para la infección por VPH tenemos las características inmunológicas del huésped (inmunosupresión, inmunogenética, IL-10, Fas/FasL entre otros), determinantes epidemiológicos (número de embarazos, uso prolongado de anticonceptivos hormonales, la inflamación crónica causada por otros agentes infecciosos y desnutrición) [26].

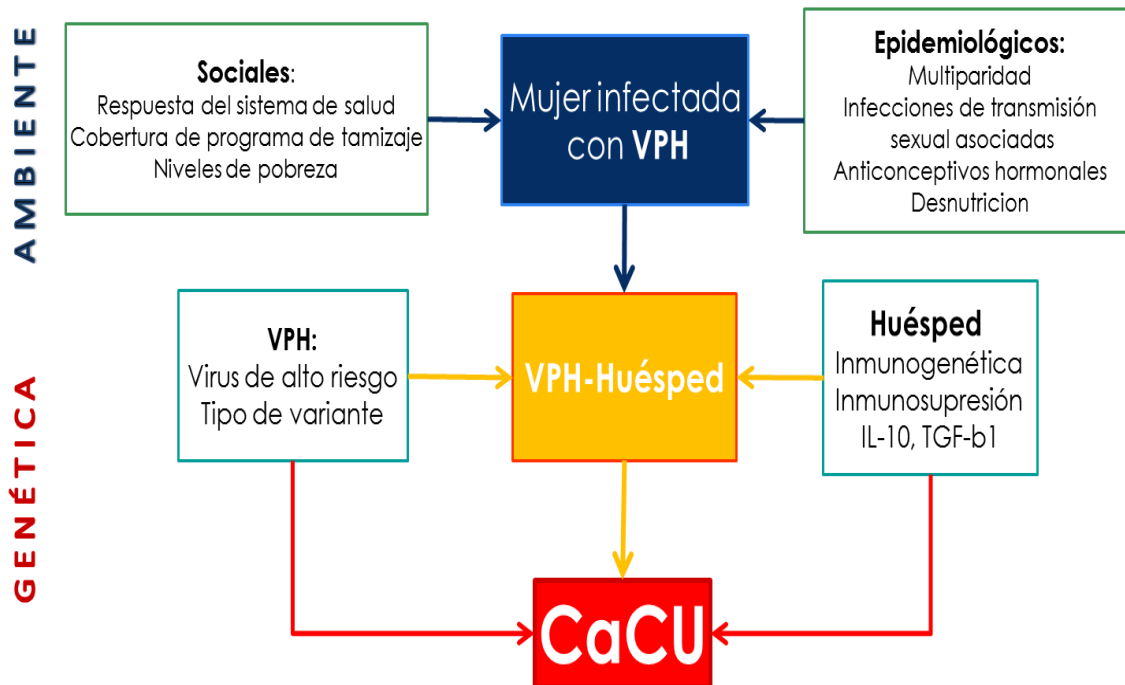


Figura 7. Factores de riesgo para CaCU. Modificado de Torres-Poveda, 2008[26].

RESPUESTA INMUNE FRENTE A VPH

La infección persistente por VPH, favorece el desarrollo de NIC; sin embargo, puede pasar desapercibido en fases tempranas. Sólo una pequeña parte de las mujeres infectadas por VPH desarrollan algún tipo de NIC y un menor porcentaje evoluciona a CaCU. Uno de los pasos determinantes para la progresión de la lesión es la permanencia del virus en el epitelio del cérvix. Lo anterior está ligado a una falla en el sistema inmune celular que impide la eliminación de la célula infectada por el virus [29, 30] .

La inmunidad celular es uno de los sistemas de vigilancia que utiliza el huésped para la eliminación de patógenos, entre ellos los virus. Durante el recambio celular, las células dendríticas (CD), censan y procesan proteínas de la célula infectada por el virus ó en su

defecto, de la célula tumoral, y los convierten en péptidos que son expuestos en su superficie. Posteriormente estas células maduran y expresan moléculas co-estimuladoras (CD80 y CD86), necesarias para la activación de linfocitos T (LT), la cual se lleva a cabo en el nódulo linfático. Así mismo, las células epiteliales infectadas exponen en su superficie péptidos, mediante el complejo mayor de histocompatibilidad clase 1 (CMH I), que son reconocidos por LT a través del TCR. La activación de los LT (CD4 y CD8) mediante la presentación antigénica, los convierte en células efectoras denominadas CD4+ cooperadoras (LTH) y CD8 citotóxicos (LTC), los cuales migran hacia el tejido y atacan de forma específica la célula infectada ó tumoral, mediante la secreción de citocinas (IL-2 e $\text{INF-}\gamma$), enzimas y moléculas de superficie (figura 8) activadoras de muerte celular (ej. Fas y FasL) [29].

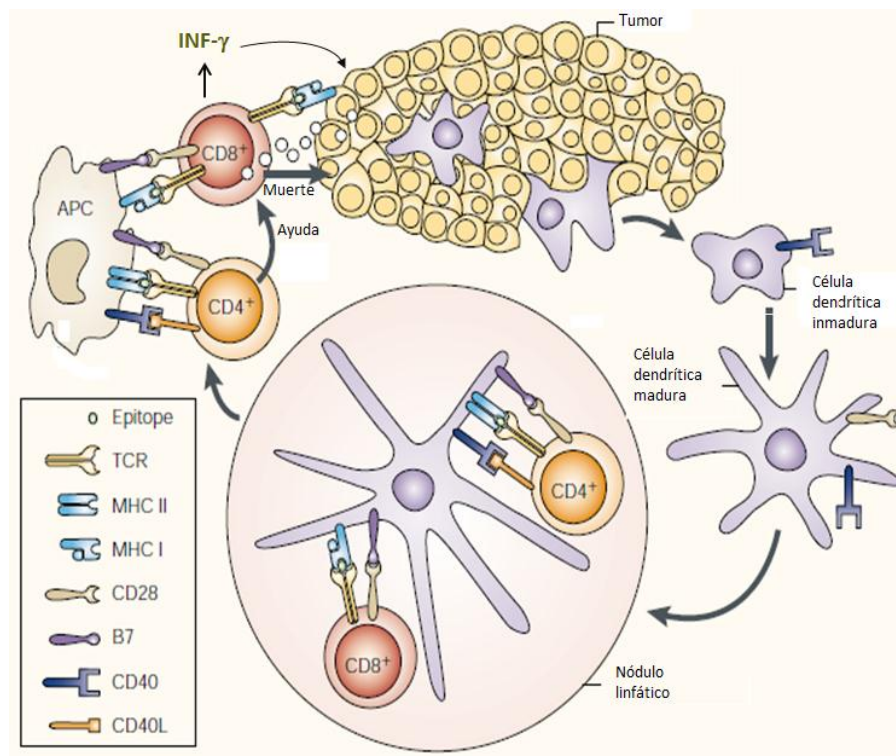


Figura 8. Respuesta inmune contra virus y célula tumoral.
Modificado de Tindle, 2002 [29].

La evasión del sistema inmune por el VPH es un paso importante en la progresión de la infección viral. Hasta la fecha se han propuesto diversos mecanismos de evasión del sistema inmune, efectuados por la célula infectada ó por la célula tumoral, entre los cuales se encuentran los siguientes:

1. Producción de citocinas inmunosupresoras (IL-10 y TGF- β) [27, 31].
2. Disminución de TLR9 [32].
3. Disminución de E-cadherina [33].
4. Expresión de enzima IDO y reclutamiento de células T reguladoras [34].
5. Muerte de linfocitos T citotóxicos mediante la activación de apoptosis a través del mecanismo de FAS/FASL [35-37].

FAS Y FASL

El ligando de Fas (FasL, CD95L) es una proteína de membrana tipo 2, con su extremo amino citosólico y su extremo carboxilo orientado extracelularmente. Es miembro de la súper familia de ligandos de TNF y cuyo gen se encuentra localizado en el cromosoma 1, locus 1q23 [38]. La proteína FasL se puede encontrar en la membrana citoplasmática (FasLm) ó de manera soluble no asociada a células (FasLs). FasLm es una proteína de 282aa (40kDa) [39]. MMP-7 regula a FasLm [40], quien lo escinde en la secuencia consenso “ELAELR”, entre el dominio transmembranal y el dominio de trimerización, generando a la proteína FasLs de 27kDa, que conserva su funcionalidad para unirse a su receptor. Mediante análisis bioquímicos, se observó que FasLs puede existir como trímero (70-80kDa) [41]. La expresión de FasL está restringida a células linfoides como, LT, LB y NK. Fuera del sistema inmune, su expresión se limita a células de sitios inmuno-privilegiados como lo son neuronas, ojos y testículos. Sin embargo, su expresión ha sido detectada en algunos tipos de cáncer (cáncer colorectal, de páncreas, melanoma, etc.) [42-46].

Por otra parte, Fas es un receptor transmembranal de tipo 1, también conocido como CD95 y APO-1. Tiene un tamaño de 48 kDa y pertenece a la superfamilia de TNF. El gen que codifica para Fas en humanos, se encuentra en el cromosoma 10, locus 10q24.1 [47]. La región promotora carece de caja TATA pero contiene una secuencia rica en GC y secuencias consenso para AP-1, GF-1, NY-Y, CP-2, EBP20 y c-myb [48]. Su ARNm consta de 2534pb, compuesto por nueve exones. La expresión de Fas se da en una amplia variedad de tejidos linfoides (LT, LB, macrófagos y NK) y no linfoides (intestino, queratinocitos, útero) [49]; también en algunos tipos de cáncer como el de endometrio, ovario, útero y cérvico uterino [50-52]. Su expresión puede ser aumentada por citocinas (IFN- γ , TNF) y por la activación de linfocitos T. Fas y FasL son importantes para activar un tipo de muerte celular programada: apoptosis.[53].

APOPTOSIS

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada (MCP), cuyo proceso es regulado genética y fisiológicamente y se encuentra conservado evolutivamente. Es un mecanismo importante de homeostasis celular y participa en los procesos de embriogénesis, morfogénesis y renovación de tejido normal. La apoptosis desencadena la muerte de la célula, la cual adopta una morfología típica, caracterizada por condensación de la envoltura nuclear, fragmentación del ADN, colapso del citoesqueleto, alteración de la membrana plasmática y encogimiento de la célula. Las células apoptóticas disminuyen su tamaño y son fragmentadas produciendo cuerpos apoptóticos delimitados por membrana. Estos cuerpos apoptóticos son absorbidos por las células vecinas que aprovechan los componentes celulares ingeridos. En este tipo de muerte, a diferencia de la necrosis, donde se libera el contenido celular, no se produce inflamación, lo cual impide el daño a células vecinas (figura 9) [54].

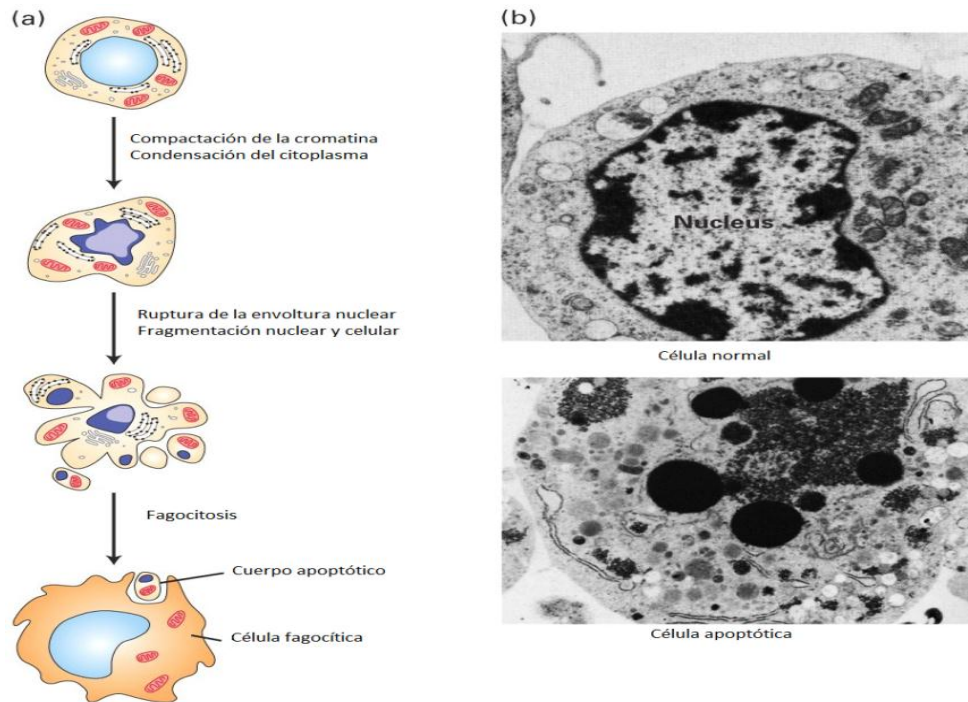


Figura 9. Características de la muerte celular apoptótica. A) esquema de la progresión de los cambios morfológicos en las células apoptóticas. B) micrografías que comparan una célula normal (arriba) y una célula apoptótica (abajo). Modificada de Lodish, 2004[55].

La apoptosis es producida por una cascada proteolítica iniciada y ejecutada por cisteín-proteasas llamadas caspasas, responsables de las características morfológicas de esta muerte celular. Existen dos rutas principales que activan las caspasas: la ruta intrínseca o mitocondrial y la ruta extrínseca ó mediada por receptores de muerte [55].

La ruta intrínseca se inicia luego de un estímulo tóxico (por ejemplo, especies reactivas de oxígeno y/o daño al ADN), que activa proteínas pro-apoptóticas como BIM y PUMA. Estas inhiben las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-X_L, dejando como consecuencia libre a las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak las cuales inducen permeabilización de la membrana mitocondrial a través de la formación de poros, que tiene como resultado la liberación del citocromo C (Cyt c) hacia el citosol (figura 10). Una vez en el citosol, el Cyt c interactúa con la molécula adaptadora Apaf-1 (siglas de “Apoptotic protease activating factor”), quien posterior a su oligomerización, recluta a la pro-caspasa 9 formando el apoptosoma, donde es activada. La activación de la caspasa 9 conduce a la activación de

las caspasas efectoras 3 y 7, que tienen como fin inducir las características morfológicas de la apoptosis [56, 57].

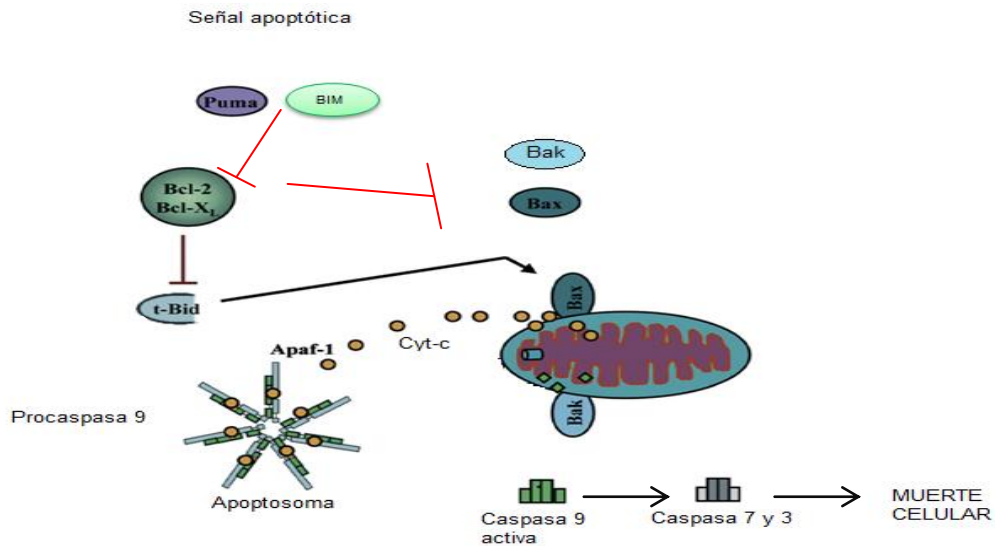


Figura 10. Ruta intrínseca. Modificado de Lagunas-Martínez, 2011[15]. Ver texto para detalles.

La ruta extrínseca se dispara por la activación de receptores de muerte luego de la unión de su ligando (figura 11). Estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores de TNF. Dentro de esta superfamilia de receptores encontramos a DR4/TRAIL-R1, DR5/TRAIL-R2, TNFRF-1 y Fas, cuyos ligandos son, TRAIL, TNF y FasL (CD95-L) respectivamente. Esta familia de receptores comparten homología en su dominio intracelular llamado “dominio de muerte” (DD). Existen otros receptores relacionados, como el receptor CD40, CD27 y p75-NGFR [58].

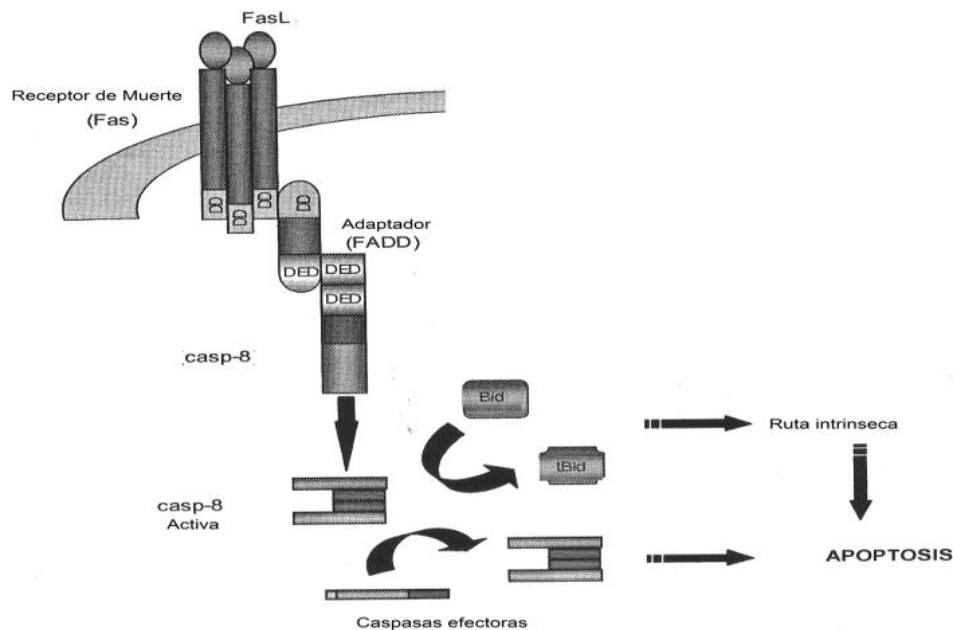


Figura 11. Ruta extrínseca. Modificado de Castro-Obregón, 2005 [59].ver texto para detalles.

La ruta intrínseca y extrínseca se une mediante caspasa-8. Esta escinde al miembro de la familia Bcl-2, Bid, formando t-Bid. t-Bid se une a Bax y Bak y les induce un cambio conformacional y oligomerización. Los oligómeros se traslocan a la mitocondria y generan un aumento en la permeabilidad de la membrana mitocondria. Por otro lado t-Bid se puede unir a proteínas de la membrana mitocondrial externa como Bcl-2 y BclX_L, inhibiéndolas e impidiendo que interactúen con Bax o Bak y antagonicen a estas últimas [53, 54].

La ruta de señalización mejor caracterizada es la activada por el receptor Fas. Posterior a la unión de su ligando (FasL), el receptor se oligomeriza reclutando en su extremo citoplasmático la proteína adaptadora FADD (siglas de “Fas-associated death domain”) quienes forman un complejo denominado DISC [60]. Esta proteína adaptadora interacciona con Fas a través del dominio DD en su extremo C-terminal y mediante el dominio DED presente en su extremo N-terminal, recluta y activa a la procaspasa 8 (una caspasa iniciadora, también llamada FLICE). Posterior a su activación, la caspasa 8

activa a caspasas efectoras (caspasas 3 y 7), que a su vez activan a proteasas y DNAsas para la ejecución de la muerte celular [59].

Normalmente, la expresión de ambas moléculas (Fas/FasL) solo se da en linfocitos T, B, macrófagos y células NK. La muerte celular mediada por Fas/FasL, participa principalmente en la regulación del sistema inmune desencadenando un proceso de “muerte celular inducida por la activación” (AICD). La AICD ayuda a mantener actividades importantes como, la homeostasis de células T citotóxicas y CD4+ activas [35], la selección de células T en el timo durante la selección negativa, la regulación de la activación de células B. En células no linfoides, el mecanismo de muerte Fas/FasL permite el establecimiento de sitios inmunológicos privilegiados como el ovario, testículos, útero, cerebro, ojos y placenta mediante la eliminación de linfocitos activos y células inflamatorias que expresan Fas y también permite la eliminación de células infectadas por virus o células tumorales [49].

Existe otro mecanismo ejecutado por los linfocitos T citotóxicos (LTC) para la eliminación de la célula blanco, el cual consiste en la secreción de proteínas como las perforinas y las granzimas. Las perforinas se encuentran en los gránulos de los LTC y células NK, y al ser liberadas se unen a la membrana de la célula blanco y forman un poro, el cual favorece la entrada de las granzimas al interior celular. Las granzimas son serin-proteasas cuyo papel es la activación de las caspasas [35].

La pérdida de la regulación de la apoptosis, le permite a las células (ej. infectadas por virus o células tumorales) escapar ó contrarrestar la respuesta del sistema inmune contra ellas. Se ha reportado que las células cancerosas pueden inducir la muerte apoptótica de linfocitos infiltrados en tumores a través de la expresión de FasL en su superficie celular. Por otro lado, alteraciones (como mutaciones) en el gen de Fas que conducen a la pérdida de la ruta extrínseca apoptótica, pueden contribuir a la carcinogénesis [61]. Dentro de los modelos donde se ha asociado la pérdida de la regulación de Fas/FasL en el desarrollo de tumores, se encuentra el carcinoma de células basales (CCB) y el carcinoma de células escamosas (CCS) [62].

III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el nivel de expresión del ARNm de Fas y FasL a nivel sistémico y en biopsias de mujeres con lesiones premalignas en Cérvix y CaCU, así como el nivel sérico de FasL?

IV. ANTECEDENTES

Para desarrollo de CaCU se requiere la persistencia de la infección por VPH. Como se mencionó anteriormente, un estado de inmunosupresión en pacientes con lesiones del cérvix y CaCU permite la persistencia de VPH. Dentro de los mecanismos de evasión de la respuesta inmune tenemos la eliminación de LTC mediante MCP inducida por la célula tumoral a través de Fas/FasL.

FasL puede presentarse de forma soluble (FasLs) y debido a que conserva su sitio de unión al receptor, permite la eliminación de células sensibilizadas (ej. LTC). Se han reportado concentraciones elevadas de FasLs en el suero de pacientes con patologías caracterizadas por múltiples eventos de muerte celular como sucede en la hepatitis alcohólica y en el melanoma maligno [44].

Das y col., analizaron la expresión de Fas y FasL en muestras de biopsias de cérvix mediante qRT-PCR, encontrando una disminución de la expresión de Fas y la expresión variable de FasL, en comparación con muestras control [63].

En 2006, Ibrahim y col., reportaron la expresión de la proteína FasL en la superficie de células escamosas cervicales de NIC y CaCU. En el mismo estudio se observó un

inducción de apoptosis de células Jurkat al co-cultivarlas con células Caski (que expresan FasL). Dicho efecto fue bloqueado al utilizar un anticuerpo contra FasL. Estos resultados sugieren que Fas y FasL juegan un papel importante en el escape del sistema inmune por las células derivadas de carcinoma cervical [64]. Posteriormente, el grupo de investigación de Xie examinó los patrones de expresión de Fas y FasL, en carcinoma de células cervicales y en NIC 1, 2, y 3 a través de la técnica de IHQ. Los investigadores observaron que la expresión de Fas es similar tanto en NIC 1 y 2 respecto a tejido cervical normal y se incrementa en células de carcinoma y en NIC 3, mientras que la expresión de FasL fue nula en todos los NICs y aumentó en el carcinoma [65].

Los datos previamente generados en nuestro grupo de investigación utilizando muestras de pacientes con diferentes grados de lesión y CaCU mediante RT-PCR punto final, indican un aumento en el número de muestras positivas para el ARNm FasL en los tres grupos analizados, comparados con muestras de cérvix normales y va disminuyendo conforme progresa la lesión a LEIAG y CaCU. Para el caso de Fas se observó un aumento en el porcentaje de muestras positivas en los grupos de lesiones precursoras, seguida de una disminución en los pacientes con CaCU comparados con el control (figura 12).

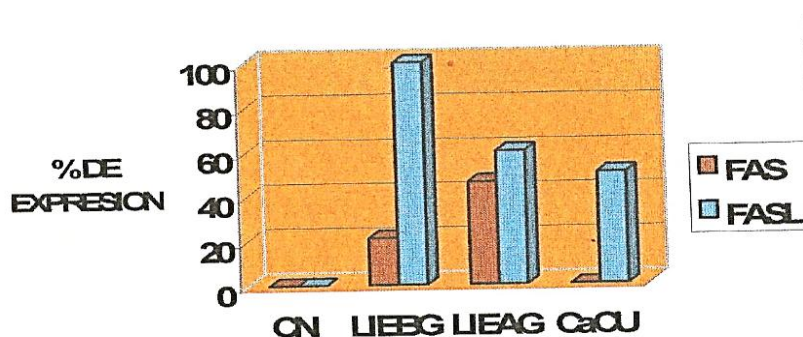


Figura 12. Expresión de ARNm DE Fas y FasL en diferentes estadios: LIEBG, LEIAG, CaCU y células normales (cn). Tomada de Tavernier, 2001 [66].

V. JUSTIFICACIÓN

El cáncer cérvico uterino es uno de los principales problemas de salud pública en México cuyo agente etiológico es el VPH. Un factor necesario para la progresión de la enfermedad es la persistencia viral. El sistema inmune juega un papel muy importante en el control de la infección. Dos moléculas efectoras del sistema inmune en esta tarea son Fas y su ligando, las cuales son expresadas en LT activados y favorecen la eliminación de células infectadas por el virus. Se ha reportado que la alteración en la expresión de estas moléculas en la célula infectada por VPH, favorece la evasión de la respuesta inmune contra el virus y la célula tumoral. Por lo tanto, el análisis de la expresión tanto a nivel sistémico como a nivel del cérvix de estas dos moléculas y el nivel sérico de FasL, en pacientes con diferentes estadios de la historia natural del cáncer cérvico uterino, nos permitiría definir la implicación biológica potencial de estas moléculas en la historia natural de la enfermedad.

VI. HIPÓTESIS

La expresión de Fas y FasL aumenta tanto a nivel sistémico como a nivel local, conforme la lesión premaligna en cérvix progresa.

VII. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Analizar la expresión de Fas y FasL a nivel sistémico y en biopsias de pacientes con lesiones premalignas del cérvix y CaCU, así como el nivel sérico de FasL.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Analizar la expresión del ARNm de Fas y FasL en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con lesiones premalignas del cérvix y CaCU.
2. Analizar la expresión del ARNm de Fas y FasL en biopsias de cérvix de pacientes con lesiones premalignas del cérvix y CaCU.
3. Detectar y cuantificar los niveles de la proteína FasL soluble en el suero de pacientes con lesiones premalignas del cérvix y CaCU.
4. Establecer las diferencias en el perfil de expresión de ARNm de Fas y Fas-L tanto a nivel sistémico como en cérvix entre cada uno de los estadios de la enfermedad y el grupo sin lesión en cérvix.
5. Establecer las diferencias en el nivel de proteína de Fas-L a nivel sérico, entre cada uno de los estadios de la enfermedad y el grupo sin lesión en cérvix.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

POBLACIÓN DE ESTUDIO: CRITERIOS DE EXCLUSIÓN E INCLUSIÓN

Este estudio piloto esta anidado al estudio transversal “Polimorfismos de la región reguladora del gen de IL-10 y su asociación con el riesgo de desarrollar cáncer cervical” del Instituto Nacional de Salud Pública, del cual se obtuvo un banco de muestras de suero, células mononucleares de sangre periférica y exudado cervical para el caso de mujeres sin lesión y biopsias de cérvix para el caso de lesiones premalignas y cáncer, que fueron obtenidas del CAPASAM (Centro de Atención para la Salud de la Mujer de los Servicios de Salud del Estado de Morelos) y del INCan (Instituto Nacional de Cancerología), según los criterios enumerados a continuación y durante el periodo comprendido entre junio-noviembre de 2008 y septiembre-diciembre de 2010, respectivamente.

Criterios de exclusión:

1. Padecer de enfermedad autoinmune o con un cuadro inflamatorio.
2. Co-infección de transmisión sexual.
3. Haber iniciado tratamiento.

Criterios de inclusión:

1. Mujer que acudió a CAPASAM con diagnóstico citológico negativo para lesión en cuello uterino y con diagnóstico histopatológico de lesión escamosa intraepitelial en cuello uterino. Mujer que acudió a la Unidad de Ginecología del INCan y con diagnóstico de CaCU invasor, en cualquier estadio.
2. Diagnóstico citológico, colposcópico e histopatológico reciente.
3. Consentimiento informado firmado donde se autorice la toma de muestra sanguínea y de cérvix.
4. Mayor de 18 años.
5. No haber iniciado tratamiento.

Del banco de muestras madre se obtuvo submuestras de suero y cDNA de cérvix y de células mononucleares de sangre periférica, seleccionadas de acuerdo a los siguientes criterios:

1. Integridad adecuada del ARN total extraído de las muestras de células mononucleares de sangre periférica, exudado cervical para el caso de mujeres sin lesión y biopsias de cérvix para el caso de mujeres con lesiones premalignas y cáncer.
2. Muestras de diferentes grados de lesión y CaCU, así como muestras control.

OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA

Las células mononucleares de sangre periférica se obtuvieron de muestras de sangre total tratadas con anticoagulante, las cuales previamente se diluyeron 1:1 en PBS estéril. Por cada 4 ml de sangre diluida en PBS se adicionaron 3 ml de ficoll. La sangre se adicionó cuidadosamente al tubo con ficoll para formar el gradiente. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 2000 rpm en una centrífuga clínica durante 30 minutos a temperatura ambiente y se recuperó la capa de linfocitos. Estas células fueron lavadas con PBS estéril, y después de centrifugarlos a 2000 rpm durante 10 minutos se recuperó la pastilla de linfocitos y se dividió en dos alícuotas. Una de éstas se resuspendió en medio RPMI (para su posterior estimulación con fitohemaglutinina (PHA)) y la otra en Tri-pure (1ml), ésta última se almacenó a -20°C para la posterior obtención de ARN. Por cada mililitro de sangre se obtuvieron de 800 mil a 1 millón de linfocitos.

EXTRACCIÓN DE ARN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA, EXUDADO Y BIOPSIAS DE CÉRVIX

Por cada seis millones de células ó de 50 a 100 mg de muestra (linfocitos resuspendidos en Tri-pure, exudado biopsia de cérvix), se agregó 1ml de Trizol. Se homogenizó la muestra y para el caso donde la muestra consistió de tejido se usó un politrón. Las muestras se incubaron por cinco minutos a temperatura ambiente con sus respectivos reactivos. Se agregaron 200 ul de cloroformo por cada ml de Trizol a las muestras y se incubaron por 4 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente fueron centrifugadas a 12,000 rpm en una centrífuga refrigerada por 15 minutos a 4°C. La fase superior correspondiente a ARN se transfirió a un tubo donde se añadieron 500 ul de isopropanol, y después de mezclar bien se incubó a -20°C por 15 minutos. Posteriormente la mezcla fue centrifugada a 12,000 rpm, durante 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla de ARN con 1ml de etanol al 75% diluido con agua con DEPC (dietil-pirocarbonato). El tubo con ARN se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 20 ul de agua libre de RNasas y DNasas. La muestra se incubó a 65°C por 10 minutos, se cuantificó el ARN y se almacenó a -20°C para su posterior uso para la síntesis de ADNc.

SÍNTESIS DE ÁCIDO DESOXIRIBONUCLEICO COMPLEMENTARIO (ADNc)

La síntesis de ADNc se realizó en dos fases; en la primera se colocó 2 ug/ul de ARN, oligo dT (0.5µg), ajustando el volumen con agua/DEPC para un volumen final de 10.8 ul y subsiguientemente se incubó por 10 minutos a 70°C. Posteriormente, se adicionó la mezcla de reacción que consistió en buffer 5X (Invitrogen™), inhibidor de RNAsa 20 U/ul (Invitrogen™), dNTP's 2.5 mM y la enzima transcriptasa reversa M-MLV 200U/ul) en un volumen final de 20 ul. La reacción se incubó 1 hr a 37°C y se prosiguió a inactivar la enzima mediante incubación durante 10 minutos a 70 °C. El ADNc se almacenó a -20°C.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Para constatar la integridad de la muestra de ADNc así como para la obtención de los controles positivos para la amplificación de Fas y FasL se realizó PCR en punto final, usando oligonucleótidos (oligos) para el gen constitutivo de G3PDH.

La reacción de PCR para la amplificación de G3PDH se realizó utilizando 1ul de ADNc, y los siguientes reactivos: 2ul de dNTP's 2.5mM, 2ul de MgCl₂ 25mM, 0.4ul de oligos sentido y antisentido (10pM), y 0.1ul de la enzima TaqPol (Invitrogene™). Las condiciones para el PCR se muestran en la tabla 1. El tamaño del amplicón esperado (450pb) fue corroborado mediante geles de agarosa al 1.2% (w/v), teñido con bromuro de etidio y visualizado con UV.

Tabla 1. Condiciones empleadas en ensayos de PCR en punto final para amplificar el ADNc de G3PDH.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Ciclos
Desnaturalización Inicial	94	5	1
Desnaturalización	94	1	30
Alineamiento	57	1	
Extensión	72	1	
Extensión final	72	5	1

La reacción de PCR para la amplificación de Fas y FasL, se llevó a cabo en un volumen final de 25 ul conteniendo, 1ul de ADNc, 2 ul de dNTP's 2.5mM, 0.75ul de MgCl₂ 50mM, 1ul de oligos sentido y antisentido (20pM) y 0.1ul de DNA TaqPol (Invitrogene™). Las condiciones de PCR usadas para amplificar el ADNc de FasL y Fas se describen en las tablas 2 y 3, respectivamente.

Tabla 2. Condiciones empleadas en ensayos de PCR en punto final para amplificar el ADNc de FasL.

Etapas	Temperatura (grados centígrados)	Tiempo (minutos)	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	5	1
Desnaturalización	94	1	35
Alineamiento	67	1	
Extensión	72	1	
Extensión final	72	10	1

Tabla 3. Condiciones empleadas en ensayos de PCR en punto final para amplificar el ADNc de FAS.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	5	1
Desnaturalización	94	1	35
Alineamiento	62	1	
Extensión	72	1	
Extensión final	72	10	1

El tamaño de los amplicones esperados para FasL y Fas (417pb y 676 pb respectivamente) fue visualizado bajo luz ultra violeta, en geles de agarosa al 1.2% (w/v) teñidos con bromuro de etidio.

DETECCIÓN DE FAS-L EN SUERO POR ELISA

La muestra de suero de cada paciente fue almacenada a -80°C y descongelada inmediatamente antes de la determinación del nivel de FasL. Los niveles de Fas-L fueron determinados usando el kit Quantikine® (Human Fas Ligand/TNFSF6 Immunoassay, R&D Systems™), siguiendo las instrucciones del proveedor.

Por cada pozo de la placa se adicionaron 100ul de diluyente RD1S y 50 ul del estándar, muestra ó control y la placa fue incubada por dos horas a temperatura ambiente (TA). Al cabo de este tiempo, el contenido de los pozos se retiró y éstos fueron lavados cuatro veces. Posteriormente se adicionaron 200 ul de una solución de anticuerpo conjugado con la enzima fosfatasa alcalina a cada pozo y se incubó por dos horas a TA. Nuevamente se lavó cada pozo cuatro veces y posteriormente se adicionaron 200 ul de solución de sustrato por pozo y la placa se incubó por 30 minutos. Al término del paso anterior, se adicionaron 50 ul de la solución de paro de la reacción enzimática y fueron obtenidas las lecturas de absorbancia a 450 nm. Los resultados fueron expresados como pg/ml y representan el promedio de dos experimentos independientes.

RT-PCR CUANTITATIVO EN TIEMPO REAL (QRT-PCR)

Las sondas Taqman® para Fas, Fas-L y HPRT-1 (hipoxantina fosforibosil transferasa), utilizadas para el análisis de la expresión mediante PCR tiempo real se obtuvieron de Applied Biosystems™ y la información referente a ellas se muestra en la tabla 4. La amplificación del ADNc de HPRT-1 fue usada como control endógeno [67].

Tabla 4. Características de las sondas empleadas en los ensayos de qRT-PCR.

Sonda	Amplicón (pb)	Sitio de hibridación	Secuencia	Detector
FasL	78	Entre exones 2 y 3	GAAGCAAATAGGCCA CCCCAGTCCA	FAM
Fas	97	Entre exones 1 y 2	TCTGGACCCTCCTAC CTCTGGTTCT	FAM
HPRT-1	72	Entre exones 1 y 2	GCAGCCCTGGCGTC GTGATTAGTGA	FAM

La reacción de PCR para el análisis en tiempo real se preparó utilizando 10 ul de “Universal PCR Master Mix”, 1ul de sonda, 2ul de templado con una concentración de 100ug/ul y 7ul de agua libre de DNAsas y RNAsas. La reacción se llevó a cabo en el equipo 7900HT Fast Real-Time PCR System® (Applied Biosystems™) y las condiciones de la reacción se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Condiciones empleadas en ensayos de PCR cuantitativo.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Ciclos
Desnaturalización inicial	50	2	1
Desnaturalización	95	10	40
Alineamiento	95	15 segundos	
Extensión	60	1	

RANGO DINÁMICO Y EFICIENCIAS DE AMPLIFICACIÓN

Para establecer la concentración óptima de ADNc para el análisis de expresión de Fas-L y Fas por tiempo real, se construyó una curva de rango dinámico con factor de dilución 1:5, partiendo de una solución 100ng/ul de ADNc proveniente de células mononucleares de sangre periférica estimuladas por 72 hr con fitohemaglutinina (5ug/ml) (anexo 1).

Para determinar las eficiencias de amplificación de los ARNm de Fas, FasL y HPRT-1 se realizó una curva estándar con factor de dilución 1:10, partiendo de una solución 1000ng/ul de ADNc, proveniente de células mononucleares de sangre periférica estimuladas por 72 hr con fitohemaglutinina (5ug/ml). La eficiencia se determinó con base a la siguiente fórmula:

$$E=(10^{(-1/S)}-1)$$

Donde S es la pendiente de la curva estándar (anexo 2).

El porcentaje de eficiencia se determinó mediante la fórmula:

$$\%E= (E) * 100$$

ANÁLISIS DE DATOS

El nivel de expresión de ARNm para los genes estudiados, fue calculado mediante cuantificación relativa con el método Ct comparativo ($2^{-\Delta Ct}$) [68] y fue graficado como URE de Fas o FasL respecto al gen endógeno (HPRT-1) y al grupo de comparación (SL). Las muestras fueron analizadas por duplicado.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis del nivel de expresión del ARNm de Fas y Fas-L a nivel sistémico y en cérvix y de la concentración de proteína de Fas-L en mujeres con LEIBG versus sin lesión en cérvix (SL), LEIAG vs. SL, y CaCU vs. SL, se realizó usando la prueba estadística de Kruskal-Wallis. Como valor de p para evaluar la significancia estadística se tomó el valor de p ajustada dada por la prueba de Kruskal-Wallis.

Se llevó a cabo un análisis de correlación de Spearman para los análisis de correlación entre el nivel de expresión del ARNm de FasL y Fas a nivel sistémico y a nivel del cérvix en mujeres sin lesión en cérvix, con LEIBG, LEIAG y CaCU; análisis de correlación tanto de Fas como de FasL, a nivel sistémico y en cérvix estratificando por diagnóstico y el análisis de correlación intergrupar de la concentración de proteína de Fas-L a nivel sérico, en mujeres sin lesión en cérvix, con LEIBG, LEIAG y CaCU. Para los análisis de correlación la significancia estadística se aceptó cuando $P < 0.05$. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo empleando el programa STATA versión 9.2 (StataCorp®, Collage Station, TX, EUA) para Windows®.

RESULTADOS

ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DEL ARNm DE FAS Y FASL EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA

Para poder determinar la expresión del ARNm de Fas y FasL, primero se determinaron las eficiencias de amplificación y los rangos dinámicos para Fas, FasL y HPRT-1. Las eficiencias de amplificación de los genes Fas, FasL y HPRT-1 oscilaron entre el 90% y 95% (anexo 2). Basados en los resultados de la curva de rango dinámico, se determinó una concentración óptima de ADNc para la amplificación de 100ng (anexo 1).

Uno de los principales mecanismos de la respuesta inmune celular contra infecciones virales y células transformadas, es el sistema de Fas y FasL [35]. Por tal motivo se analizó la expresión de estas moléculas en CMSP de pacientes con diferentes grados lesión y CaCU.

La expresión de Fas en células linfoides permite regular la homeostasis de la respuesta inmune posterior a su activación [35].

Se encontró que en CMSP el nivel de expresión del ARNm de Fas fue mayor en todos los grupos analizados (LEIBG, LIEAG y CaCU) al compararlo con el grupo SL. Las diferencias de expresión fueron estadísticamente significativas para todos los grupos, (LEIBG $p=0.002$, LIEAG $p=0.0002$ y CaCU $p=0.0001$); observándose en el grupo de CaCU, 22.27 veces más URE al compararlo con el grupo SL (figura 13).

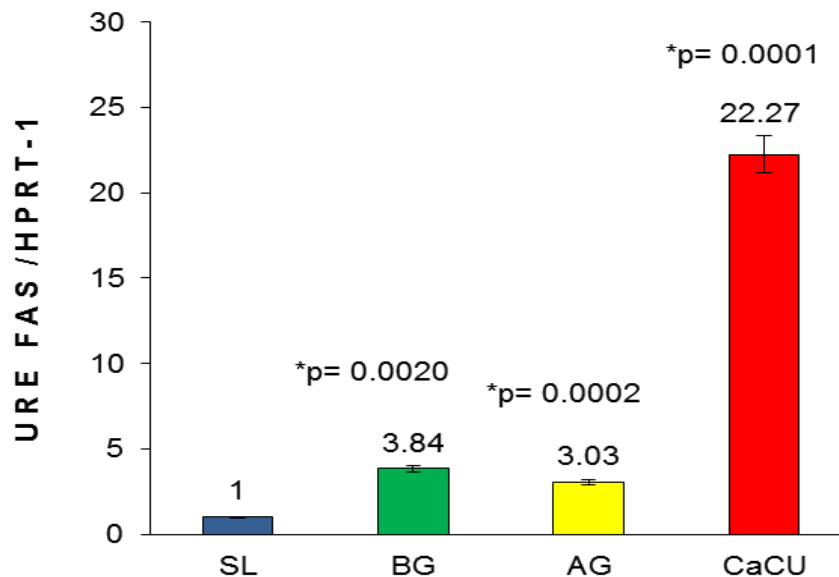


Figura 13. Diferencias en la expresión del ARNm de Fas en células mononucleares de sangre periférica durante la progresión del CaCU. Los niveles de expresión del ARNm de Fas fueron determinados como se indica en materiales y métodos, y son expresados como unidades relativas de expresión (URE) respecto al gen endógeno (HPRT-1) y a la condición de comparación (SL). *indica el valor “p” obtenido por la prueba de Kruskal-Wallis. Se consideró una significancia estadística cuando $p \leq 0.004$ (p ajustada Kruskal-Wallis).

Debido a que la inducción de apoptosis se activa cuando se une FasL a Fas, la siguiente pregunta fue si el ARNm de FasL se expresaba también en las muestras previamente analizadas.

Se encontró que en CMSP el nivel de expresión del ARNm de FasL fue mayor en todos los grupos analizados (LEIBG, LIEAG y CaCU) al compararlo con el grupo SL. Las diferencias de expresión fueron estadísticamente significativas, solo para el grupo de LIEAG ($p=0.0001$) respecto al grupo sin lesión, observándose 10.38 veces más URE al compararlo con el grupo SL (figura 14).

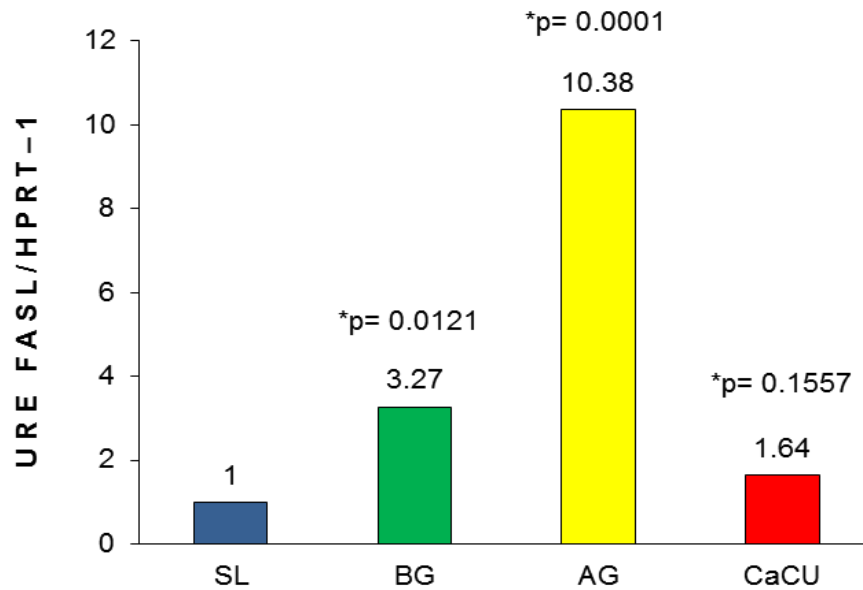


Figura 14. Diferencias en la expresión del ARNm de FasL en células mononucleares de sangre periférica durante la progresión del CaCU. Los niveles de expresión del ARNm de FasL fueron determinados como se indica en materiales y métodos, y son expresados como unidades relativas de expresión (URE) respecto al gen endógeno (HPRT-1) y a la condición de comparación (SL). *indica el valor “p” obtenido por la prueba de Kruskal-Wallis. Se consideró una significancia estadística cuando $p \leq 0.004$ (p ajustada Kruskal-Wallis).

ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DEL ARNm DE FAS Y FASL A NIVEL DE CÉRVIX

Uno de los mecanismos de evasión de la respuesta inmune por parte de la célula tumoral/infectada es la disminución de la expresión de Fas, lo cual trae como consecuencia una deficiencia en la acción citotóxica de los linfocitos contra la célula tumoral/infectada [69].

El nivel de expresión del ARNm de Fas fue menor en los grupos LEIBG y LIEAG y mayor en el grupo de CaCU al compararlos con el grupo sin lesión. Sin embargo no hubo diferencias estadísticamente significativas en el análisis de Fas para ninguno de los grupos, posiblemente por el tamaño de muestra analizado (figura 15).

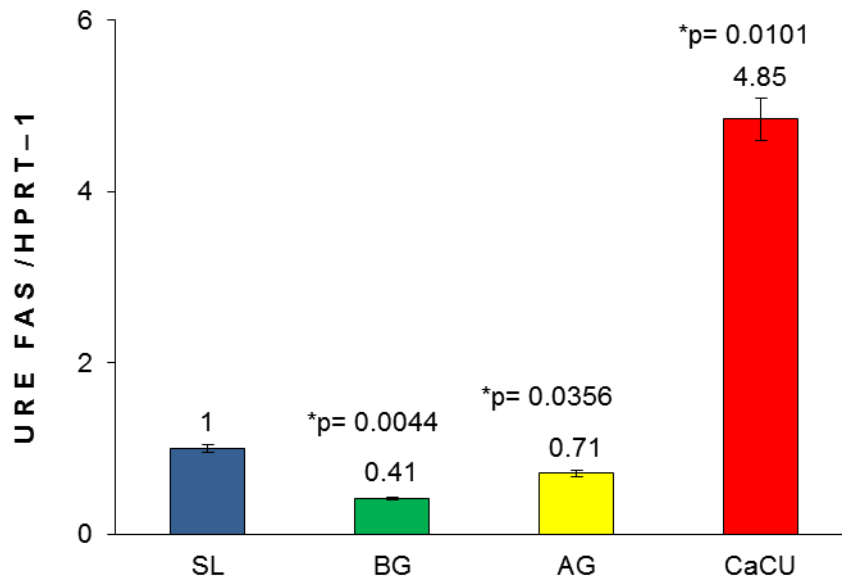


Figura 15. Diferencias en la expresión del ARNm de Fas en Cérvix durante la progresión del CaCU. Los niveles de expresión del ARNm de Fas fueron determinados como se indica en materiales y métodos, y son expresados como unidades relativas de expresión (URE) respecto al gen endógeno (HPRT-1) y a la condición de comparación (SL). *indica el valor “p” obtenido por la prueba de Kruskal-Wallis. Se consideró una significancia estadística cuando $p \leq 0.004$ (p ajustada Kruskal-Wallis).

La expresión de FasL por la célula tumoral/infectada, permite inducir apoptosis en los LIT, evadiendo su acción citotóxica y por consiguiente permitiendo el desarrollo de la neoplasia [35, 70]. Por tal motivo se analizó la expresión del ARNm de FasL en exudados y biopsias de cérvix.

El nivel de expresión de FasL fue menor en los grupos LEIBG y LIEAG y mayor en el grupo de CaCU al compararlos con el grupo sin lesión. Las diferencias de expresión fueron estadísticamente significativas solo para el grupo de CaCU ($p=0.003$); observándose 2.8 veces más URE al compararlo con el grupo SL (figura 16).

De tal manera, tanto para Fas como para FasL, los niveles de expresión vistos al comparar los grupos de lesiones premalignas y CaCU con respecto al grupo sin lesión, fueron similares a nivel del cérvix.

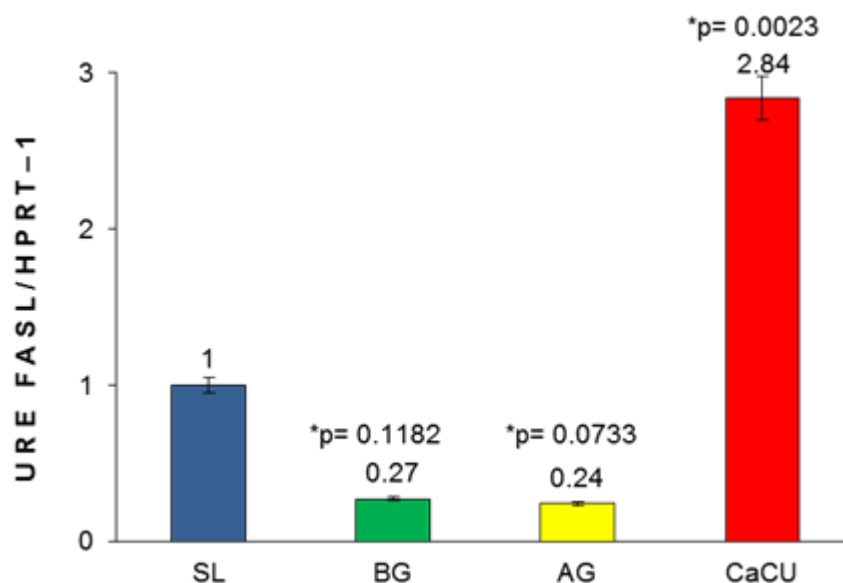


Figura 16. Diferencias en la expresión del ARNm de FasL en cérvix durante la progresión del CaCU. Los niveles de expresión del ARNm de FasL fueron determinados como se indica en materiales y métodos, y son expresados como unidades relativas de expresión (URE) respecto al gen endógeno (HPRT-1) y a la condición de comparación (SL). *indica el valor “p” obtenido por la prueba de kruskal-wallis. Se consideró una significancia estadística cuando $p \leq 0.004$ (p ajustada kruskal-wallis).

CONCENTRACIÓN SÉRICA DE FASL SOLUBLE

Un posible mecanismo de evasión de la respuesta inmune, es la liberación de FasL al medio extracelular para inducir apoptosis en linfocitos [71]. Por tal motivo, se determinó el nivel sérico de FasLs en pacientes con lesiones premalignas del cérvix y CaCU, utilizando un kit comercial de ELISA (ver materiales y métodos).

Al evaluar la concentración de FasLs a nivel sérico, el promedio de la concentración de FasLs en el grupo sin lesión, LEIBG, LEIAG y CaCU, fue de 116.89 pg/ml, 90.3 pg/ml, 67.84 pg/ml y 61.93 pg/ml, respectivamente. Se observó una diferencia estadísticamente significativa al comparar el nivel de proteína en los grupos de LEIBG ($p=0.0056$), LEIAG ($p=0.00001$) y CaCU ($p=0.000001$) con respecto al grupo sin lesión; observándose una disminución de los niveles de la proteína conforme avanzaba el grado de lesión (figura 17).

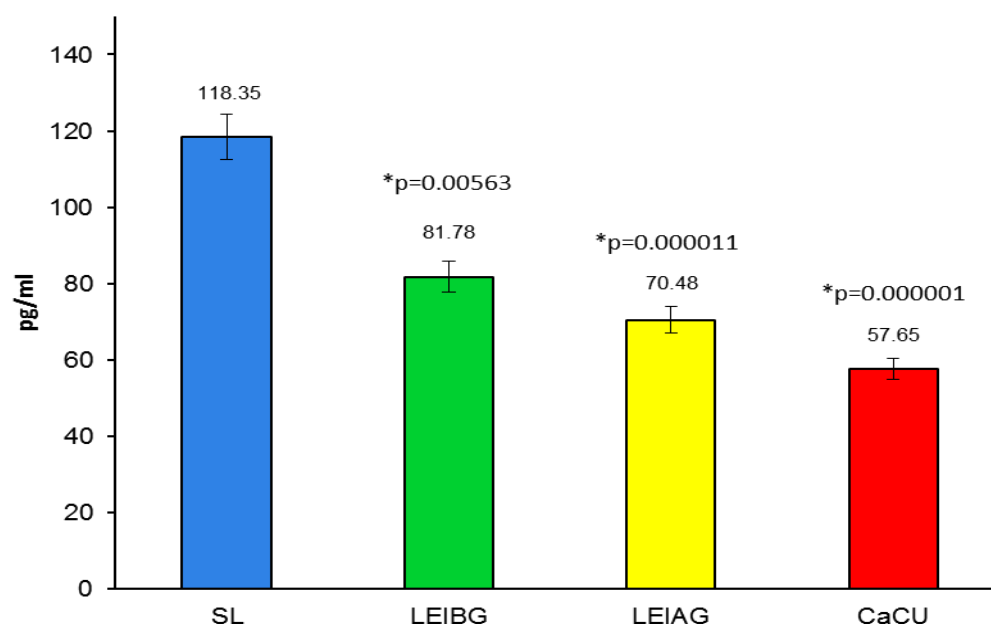


Figura 17. Concentración de FasL soluble en pacientes sin lesión (VPH -) vs lesión de bajo grado, lesión de alto grado y CaCU. La concentración sérica de FasLs fue determinada por ELISA como se detalla en materiales y métodos. Se muestra el promedio de la concentración de FasL en los diferentes grupos. *indica el valor “p” obtenido por la prueba de Kruskal-Wallis. Se consideró una significancia estadística cuando $p<0.05$.

ANÁLISIS DE CORRELACIÓN

Tras el análisis de correlación entre el nivel de expresión del ARNm de FasL a nivel sistémico y a nivel del cérvix en mujeres sin lesión en cérvix, con LEIBG, LEIAG y CaCU, no se encontró asociación entre las URE de FasL a nivel sistémico y las URE de FasL a nivel del cérvix para cada uno de los grupos ($r = -0.139$; $P = 0.1573$). De igual forma, al analizar el nivel de expresión del ARNm de Fas a nivel sistémico y a nivel del cérvix en mujeres sin lesión en cérvix, con LEIBG, LEIAG y CaCU, no se encontró asociación entre las URE de Fas a nivel sistémico y las URE de Fas a nivel del cérvix ($r = 0.5556$; $P = 0.1573$).

Adicionalmente, se evaluó la correlación tanto de Fas como de FasL, a nivel sistémico y en cérvix estratificando por diagnóstico. Se encontró correlación positiva en los niveles de expresión tanto de Fas como de FasL, a nivel sistémico ($\rho = 0.7793$, $p = 0.0000$) y a nivel de cérvix ($\rho = 0.8104$, $p = 0.0000$), para el grupo de LEIBG. De manera similar hubo correlación positiva en los niveles de expresión tanto de Fas como de FasL, solo a nivel sistémico ($\rho = 0.6117$, $p = 0.0042$), para el grupo de LEIAG. En contraste se encontró para el grupo de CaCU, una correlación positiva en los niveles de expresión tanto de Fas como de FasL, solo a nivel de cérvix ($\rho = 0.8374$, $p = 0.0000$).

El análisis de correlación intergrupar de la concentración de proteína de Fas-L a nivel sérico, en mujeres sin lesión en cérvix, con LEIBG, LEIAG y CaCU, se encontró una asociación inversa entre la concentración de FasLs y los grupos analizados, con un coeficiente de correlación de $r = -0.5774$, $P = 0.0001$.

DISCUSIÓN

El CaCU es una de las enfermedades neoplásicas de gran importancia epidemiológica tanto en México como en el mundo. Se sabe que el desarrollo de las neoplasias se ve favorecido por un estado de inmunidad comprometida ó abatida [27, 72]. En este contexto, Fas y FasL son dos moléculas importantes en la regulación de la respuesta inmune y se ha demostrado que sus niveles de expresión se encuentran alterados en diferentes neoplasias (como en el cáncer esofágico, de mama, pulmón, pancreático, renal, entre otros) [45, 73-77], lo cual ha sugerido que la desregulación de estas moléculas participa en el desarrollo de la enfermedad.

Para el caso del CaCU, algunos trabajos han sugerido que el nivel de expresión de Fas y FasL podría tener un papel importante durante la historia natural de la enfermedad. Mediante estudios realizados en líneas celulares derivadas de cáncer cérvico uterino, se ha detectado la expresión de FasL y FasLs con capacidad de inducir la apoptosis de LT [64, 71]. También se ha reportado que FasLs tiene menor actividad que la forma FasLm [78].

Estudios realizados con biopsias de cérvix de pacientes con CaCU de diversos grados de malignidad empleando la técnica de IHQ, indican que el número de muestras positivas a Fas disminuye conforme avanza el grado de lesión [63, 79]. Para el caso de FasL, se ha reportado un aumento en el número de muestras de cérvix positivas para expresión de esta molécula conforme aumenta el grado de lesión y/o tumor [65, 80, 81].

El presente trabajo describe por primera vez el nivel de expresión del ARNm de estas moléculas, en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con lesiones premalignas y CaCU, lo cual es muy relevante para integrar de manera global, el perfil de expresión de Fas y FasL en el contexto de la respuesta inmune durante el curso de la enfermedad. Para el caso de Fas y FasL, se observó un aumento de la expresión del

ARNm en todos los grupos con respecto al grupo sin lesión, siendo mayor esta diferencia para Fas en el grupo de CaCU y para FasL en el grupo de LEIAG.

En el presente estudio, el análisis de la expresión del ARNm de Fas en las muestras de biopsias de cérvix reveló una disminución en las lesiones precursoras y un aumento en el grupo con CaCU con respecto al grupo de comparación. Das y col., reportaron una disminución del ARNm de Fas en muestras de biopsias de cérvix de pacientes con CaCU analizadas por qRT-PCR. Dicho hallazgo es contrario al resultado encontrado en el presente trabajo, esto puede deberse a diferencias en la metodología empleada ya que, el gen endógeno utilizado por Das y col., para normalizar los resultados de qRT-PCR fue G3PDH, gen que se expresa a nivel de cérvix en cantidades superiores al gen blanco, por lo que se podría estar subestimando la expresión real del gen blanco, Fas. El gen endógeno recomendado para este tipo de análisis en células epiteliales es HPRT-1 [67].

Para el caso de FasL en muestras de cérvix, se observó una disminución de la expresión del ARNm en lesiones precursoras y un aumento en el grupo con CaCU, con respecto al grupo de comparación. Das y col., reportan una expresión variable del ARNm de FasL en muestras de biopsias de cérvix de mujeres con CaCU analizadas mediante qRT-PCR. Como se mencionó anteriormente, las diferencias encontradas entre nuestros resultados y los del reporte de Das y col., pueden ser debido a las diferencias en la metodología empleada. Por otra parte, estudios previos donde se analizó la expresión de FasL por IHQ, en muestras de biopsias de cérvix de mujeres con lesiones premalignas y CaCU, reportan un aumento de muestras positivas para FasL, comparadas con muestras de pacientes normales [64, 65, 81]. Lo anterior aunado a nuestros resultados de la cuantificación de FasL a nivel de ARNm, sugiere que su expresión a nivel de proteína podría estar aumentada. Para confirmar el aumento de la expresión de FasL a nivel de proteína es necesario determinar su expresión de forma cuantitativa por ELISA ó citometría de flujo.

Por otra parte, cuando se evaluó la concentración sérica de FasLs de pacientes con lesiones premalignas y CaCU, se encontró una disminución de esta molécula conforme avanza el grado de lesión. Los hallazgos del presente estudio son similares a lo reportado por López-Álvarez y col., quienes observaron una disminución de FasLs en suero de pacientes con CaCU y postulan que esta molécula no está involucrada en el mecanismo de evasión por parte de la célula tumoral [82]. En contraste, Aguilar-Lemarroy y col., no pudieron detectar la proteína soluble al analizar suero de pacientes con CaCU por ELISA, lo que los llevó a concluir que esta molécula no es relevante como biomarcador de CaCU [83]. Sin embargo las diferencias entre el anterior trabajo y el reportado por López-Álvarez, así como en nuestros hallazgos, pudieran deberse la sensibilidad en el límite de detección de los kits de ELISA utilizados.

Una explicación alternativa de la disminución en la concentración de FasLs pudiera ser que la expresión de la metaloproteasa MMP-7, encargada de escindir a FasLm, disminuyera conforme avanza el grado del tumor. Wang y col., y Strand y col., mediante estudios de IHQ en biopsias de pacientes con carcinoma colorectal y estudios in vitro en células de cáncer hepático respectivamente, han reportado una relación inversa entre la expresión de Fas y la MMP-7 [84, 85]. Nuestros resultados muestran un aumento en la expresión de ARNm de Fas a nivel de cérvix en el grupo de CaCU. Por lo tanto, sería factible plantear que la disminución de la concentración de FasLs es debida a una disminución en la proteína MMP-7 que correlacionara con el aumento de Fas observado en nuestro trabajo. Sin embargo, es necesario evaluar la expresión de MMP-7 para demostrar la idea sugerida.

En cuanto a los análisis de correlación realizados no se encontró asociación entre el nivel de expresión del ARNm de Fas y Fas-L a nivel sistémico y el nivel de expresión en cérvix en mujeres sin lesión en cérvix, con LEIBG, LEIAG y CaCU, lo cual puede deberse a la diferencia del tipo celular donde se evalúa la expresión de los mensajeros, ya que las células mononucleares, tienen más elevado el nivel de expresión de estas moléculas que las células del cérvix. Por otro lado el análisis de correlación para Fas y FasL a nivel sistémico y en cérvix estratificado por diagnóstico, sugiere que existe una activación de la respuesta inmune local y a nivel sistémico en LEIBG; en el grupo de diagnóstico de

LEIAG sugiere que la respuesta inmune esta activa solo a nivel sistémico en y únicamente a nivel local en el grupo de diagnóstico con CaCU.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en CMSP y en cérvix, hipotetizamos que la expresión aumentada del ARNm de FasL en CMSP en los grupos de lesiones precursoras y su disminución a nivel del cérvix en estos mismos grupos, podría indicar que el sistema inmune contiene contra la infección viral en lesiones de bajo y alto grado, con lo cual se puede retrasar el avance de la lesión y evitar que se desarrolle el CaCU. Sin embargo, el efecto contrario observado en el grupo de CaCU (disminución de expresión del ARNm de FasL en CMSP y un aumento a nivel del cérvix), sugeriría que a nivel local FasL pudiera estar participando en la evasión del sistema inmune por parte del tumor. Esta hipótesis es apoyada por los resultados encontrados por varios grupos de investigación, donde encuentran que líneas celulares derivadas de CaCU y en otro tipo de carcinoma, expresan la proteína FasL y son capaces de inducir la apoptosis de LT [64, 71, 86]. Además la disminución del ARNm de FasL en CMSP apoyaría lo anterior, debido a que el LIT no puede inducirle la muerte a la célula infectada/tumoral. Sin embargo, es importante determinar la expresión de la proteína FasL en CMSP para constatar la falta de su expresión en la superficie de estas células.

Nuestros hallazgos del aumento del ARNm de Fas en CMSP en lesiones precursoras y su disminución a nivel del cérvix, sugiere que las células de las lesiones precursoras cervicales pueden evadir la muerte ejercida por el FasL presente en CMSP. En el grupo de CaCU se observó un aumento del ARNm de Fas en CMSP y en cérvix. Lerma y col., reportaron un aumento de la población de LIT en biopsias de cáncer cervical proporcional al aumento del grado del tumor [81]. Debido a lo anterior, el aumento de la expresión del ARNm de Fas en el grupo de CaCU en cérvix podría deberse al incremento de la presencia de LIT que expresan Fas en dichas muestras. La disminución de la proteína Fas encontrada en muestras de cérvix en pacientes con CaCU en el estudio realizado por Reesnik-Peters y col, junto con nuestro resultado del incremento del ARNm de Fas encontrado en CaCU a nivel de cérvix, fortalece la idea de que este aumento pueda ser debido a la expresión del ARNm de Fas en LIT proveniente de las CMSP.

En conjunto, nuestros datos sugieren que el sistema inmune contiene contra el desarrollo de la neoplasia; sin embargo, el contrataque de las células tumorales mediante el mecanismo de Fas/FasL opera en forma eficiente contra la respuesta del sistema inmune celular, permitiendo el establecimiento y la persistencia del virus, el desarrollo de lesiones y finalmente el desarrollo del CaCU.

Los datos obtenidos en este trabajo de tesis, apoyan la idea de que Fas y FasL juegan un papel como modulador negativo de la respuesta inmune local, lo cual favorecería la proliferación de las células tumorales y por consiguiente el desarrollo del CaCU [36, 37].

CONCLUSIONES

1. El aumento del nivel de expresión del ARNm de Fas y FasL a nivel sistémico sugiere una activación de la respuesta inmune a nivel sistémico.
2. El aumento en el nivel de expresión del ARNm de FasL en cérvix en el grupo de CaCU sugiere que a nivel local FasL puede participar en la evasión de la respuesta inmune por parte del tumor.
3. La disminución de la expresión del ARNm Fas a nivel del cérvix en los grupos de lesiones precursoras sugiere que la célula infectada/tumoral puede evadir la muerte celular ejercida por FasL presente en CMSP.
4. El aumento en el nivel de expresión del ARNm de Fas a nivel sistémico y el aumento en el nivel de expresión del ARNm de FasL a nivel del cérvix en el grupo de CaCU, sugiere que la célula infectada/tumoral puede eliminar a LIT fas positivos.
5. La disminución de la proteína FasL soluble en suero, conforme aumentó el grado de lesión y CaCU, sugiere que FasLs podría no estar involucrada en el mecanismo de evasión de la respuesta inmune por parte del tumor.
6. El análisis de correlación tanto de URE de FasL como URE de FAS a nivel sistémico con respecto a las URE en cérvix de ambas moléculas, indicó que no existe correlación. Solo se encontró una correlación positiva tanto para Fas como FasL a nivel sistémico y en cérvix estratificando por diagnóstico.
7. El análisis de correlación para Fas y FasL a nivel sistémico y en cérvix estratificado por diagnóstico, sugiere que existe una activación de la respuesta inmune local y a nivel sistémico en LEIBG, solo a nivel sistémico en LEIAG y únicamente a nivel local en CaCU.
8. El nivel de expresión tanto de Fas como FasL aumenta para todos los tipos de lesión a nivel sistémico y solo para el grupo de CaCU a nivel local.

9. Los datos obtenidos en este trabajo, apoyan la idea de que FasL y Fas juegan un papel como moduladores negativos de la respuesta inmune local, lo cual favorecería la proliferación de las células tumorales y por consiguiente el desarrollo del CaCU.

PERSPECTIVAS

1. Analizar la presencia de FasL en células mononucleares de pacientes con lesiones en cérvix y CaCU (citometría de flujo).
2. Confirmar la presencia de la proteína de Fas y FasL en biopsias de pacientes (inmunohistoquímica o citometría de flujo).
3. Detectar y cuantificar los niveles de la proteína Fas soluble en el suero de pacientes con lesiones premalignas del cérvix y CaCU (ELISA).
4. Evaluar la expresión de la proteína MMP-7 en suero de pacientes con lesiones en cérvix y CaCU (ELISA).
5. Investigar el posible papel de oncoproteínas virales en la expresión de los genes Fas y FasL (expresión transitoria de proteínas virales en líneas celulares).

ANEXOS

CONSIDERACIONES ÉTICAS Y DE BIOSEGURIDAD

Este estudio estuvo anidado al estudio transversal “Polimorfismos de la región reguladora del gen de IL-10 y su asociación con el riesgo de desarrollar cáncer cervical” del Instituto Nacional de Salud Pública, el cual cuenta con la aprobación de las comisiones de Investigación y Ética del Instituto Nacional de Salud Pública y del Instituto Nacional de Cancerología. Del estudio transversal al que estuvo anidada este trabajo, se obtuvo el banco de muestras de ARN y sueros. Debido a que se trabajó con un banco de biológicos cuya identificación del participante que dono la muestra estuvo bajo estricta confidencialidad, la privacidad de la información se conservó en su totalidad. Dado que no existió manipulación directa de muestras biológicas, sino del producto obtenido de las mismas, resguardado en el banco de biológicos, este protocolo se considera como investigación con riesgo mínimo.

Este trabajo de tesis cuenta con la aprobación de las comisiones de Investigación, Ética y Bioseguridad del Instituto Nacional de Salud Pública (anexo 3).

ANEXO 1: RANGOS DINÁMICOS

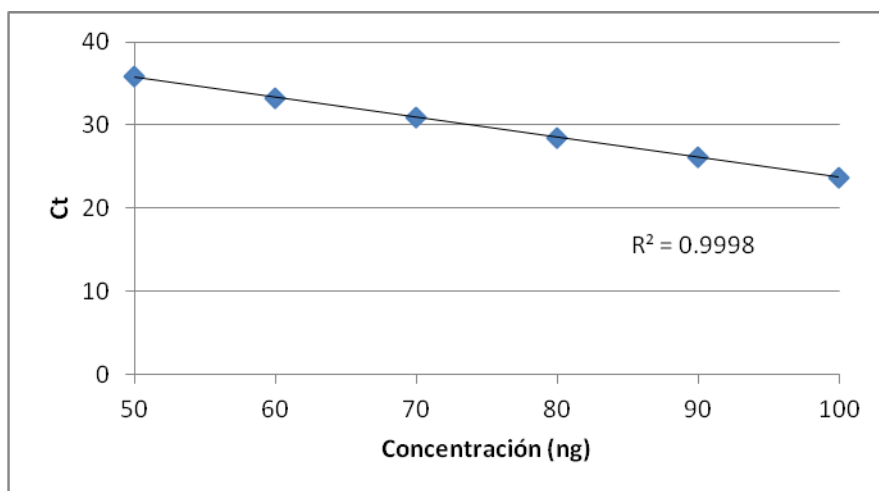


Figura 18. Determinación del rango dinámico para el ARNm de FasL. Se realizó qRT-PCR a partir de diluciones seriales de ADNc obtenido de CMSP para la detección de FasL (ver detalles en materiales y métodos).

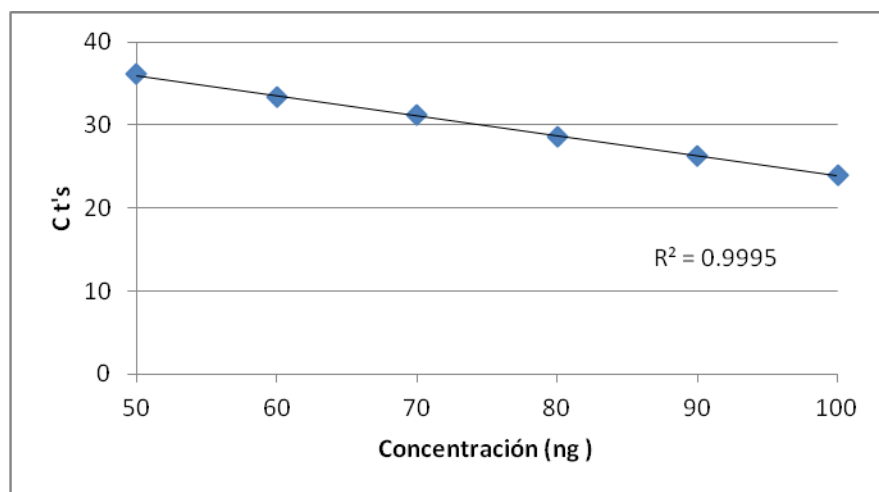


Figura 19. Rango dinámico para el ARNm de Fas. Se realizó qRT-PCR a partir de diluciones seriales de ADNc obtenido de CMSP para la detección de Fas (ver detalles en materiales y métodos).

ANEXO2: EFICIENCIAS DE AMPLIFICACIÓN

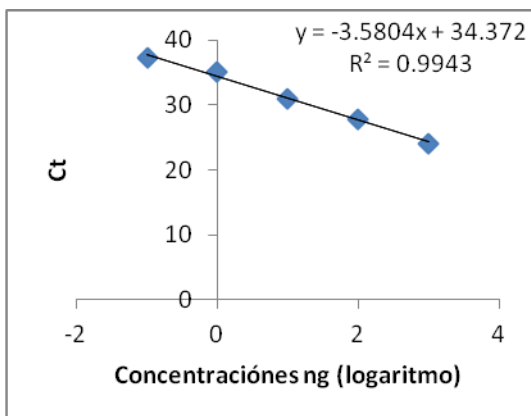


Figura 20. Eficiencia de amplificación del ARNm de FasL. Se realizó qRT-PCR a partir de diluciones seriales de ADNc obtenido de CMSP para la detección de FasL. Luego de aplicar la fórmula, la eficiencia determinada para fas fue del 90% (ver detalles en materiales y métodos).

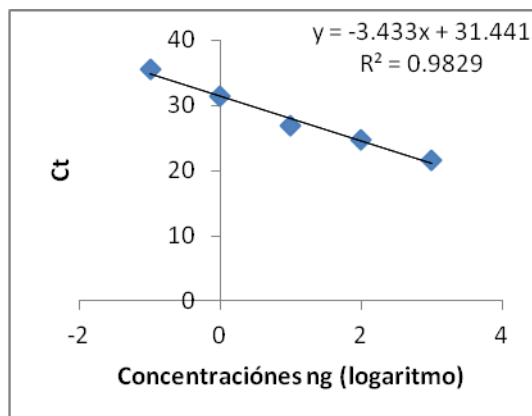


Figura 21. Eficiencia de amplificación del ARNm de Fas. Se realizó qRT-PCR a partir de diluciones seriales de ADNc obtenido de CMSP para la detección de Fas. Luego de aplicar la fórmula, la eficiencia determinada para fas fue del 95% (ver detalles en materiales y métodos).

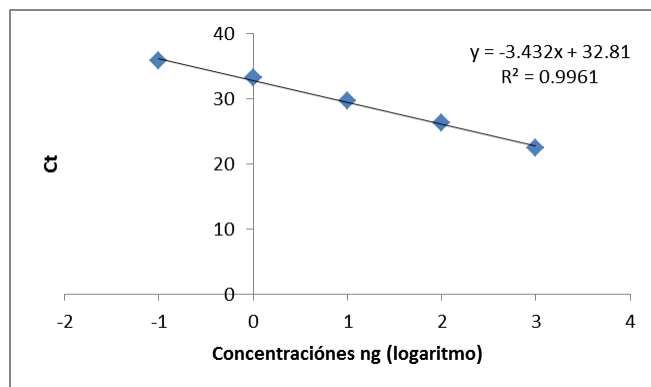


Figura 22. Eficiencia de amplificación del ARNm de HPRT-1. Se realizó qRT-PCR a partir de diluciones seriales de ADNc obtenido de CMSP para la detección de HPRT-1. Luego de aplicar la fórmula, la eficiencia determinada para fas fue del 95% (ver detalles en materiales y métodos).

ANEXO 3: CARTAS DE APROBACIÓN POR LAS COMISIONES



Instituto Nacional de Salud Pública
Comisión de Ética

Cuernavaca, Morelos, a 9 de julio de 2012.

CI Tesis: 473

Luz Yvette López Díaz

Maestría en Ciencias de la Salud

Área de concentración en Enfermedades Infecciosas

Presente

En relación a su protocolo de tesis titulado "**Análisis de la expresión de Fas y Fas-I a nivel sistémico y en cérvix en mujeres con lesiones premalignas en cérvix y cáncer cervicouterino**", me permito informarle que los miembros de esta Comisión han acordado otorgarle el dictamen de:

Aprobado

Le informamos que esta aprobación tiene vigencia hasta el 8 de julio del 2013.

Renovación anual: Si su estudio se extiende por un periodo mayor, favor de presentar el formato de *Renovación anual* con 45 días de anticipación a su fecha de vencimiento. Favor de solicitar vía electrónica el formato correspondiente a esta Comisión. **Nota: Es responsabilidad de usted como Investigador Responsable de este proyecto solicitar la renovación anual de su estudio con suficiente anticipación.**

Consentimiento: Para obtener el consentimiento de los sujetos humanos de su estudio únicamente se deberán utilizar los materiales que han sido aprobados y sellados por esta Comisión.

Addenda/Modificaciones: Le recuerdo que cualquier cambio o actualización en los procedimientos de este estudio deberá ser enviado a esta Comisión previo a su implementación.

Le solicito atentamente que en caso de ocurrir algún cambio o actualización de datos que afecten el planteamiento actual de su protocolo de tesis, lo comunique oportunamente para someterlo a consideración de esta Comisión.

Atentamente

Dra. Julieta Ivone Castro Romero
Presidenta de la Comisión de Ética

ccp. Dr. Carlos Jesús Conde- Coordinador Maestría en Ciencias de la Salud-Enfermedades Infecciosas
Mtro. Miguel Ángel Reyes Castañeda – Depto. De Servicios Escolares.

Avenida Universidad 655
Colonia Santa María Ahuacatlán
62100 Cuernavaca, Morelos, México
conm.: (777) 329 3000
Ext. 2465, 7424, 2262

www.insp.mx



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA COMISION DE BIOSEGURIDAD



CB12-276.

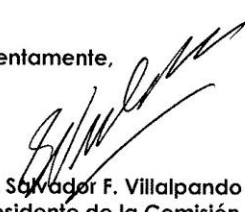
Cuernavaca, Mor., a 17 de Septiembre del 2012.

CB: 460

C. López Díaz Luz Yvette
Tesisista Maestría en Enfermedades Infecciosas (MC)
Instituto Nacional de Salud Pública
P r e s e n t e

Por medio del presente informo a usted que después de haber indicado al M.C. Alfredo Lagunas Martínez como responsable de los desechos generados, tal como fue solicitado para el proyecto titulado: "**Análisis de la expresión de Fas y FasL a nivel sistémico y en cérvix en mujeres con lesiones premalignas en cérvix y cáncer cervicouterino**" el dictamen de la Comisión de Bioseguridad es: **APROBADO** debido a que dicho proyecto establece las medidas de uso y manejo de residuos peligrosos biológico infecciosos (RPBI) y CRETI; por lo que desde el punto de vista de Bioseguridad no existe ninguna objeción para continuar su proceso.

Atentamente,


Dr. Salvador F. Villalpando Hernández
Presidente de la Comisión
de Bioseguridad-INSP

Col. Santa María Ahuacatitlán
62508 Cuernavaca, Morelos
México

e-mail: svillalp@insp.mx

Tel-Fax:01 (777) 3293000 ext 7204
Secretaría: 7204



Instituto Nacional de Salud Pública
Comisión de Investigación

No. de Proyecto **472.**

Cuernavaca, Mor., a 14 de agosto del 2012.

C. Luz Yvette López Díaz
Maestría en Ciencias de la Salud
Área de Concentración en Enfermedades Infecciosas
Instituto Nacional de Salud Pública

Por medio del presente informo a usted la Comisión de Investigación, evaluó su proyecto de tesis titulado: **"Análisis de la expresión de FAS y FAS-L a nivel sistémico y en cérvix en mujeres con lesiones premalignas en cérvix y cáncer cervicouterino."**; el dictamen de esta comisión es: **aprobado.**

Aprovecho la ocasión para enviarle un saludo cordial.

Atentamente,


Dr. Eduardo C. Lazcano Ponce
Presidente de la Comisión
de Investigación-INSP

Ccp. Mtra. Lorena Elizabeth Castillo Castillo.- Jefe del departamento de Asuntos Escolares.- Presente.

Avenida Universidad 655
Colonia Santa María Ahuacatitlán
62100 Cuernavaca, Morelos, México
cont: (777) 329 3000
Ex: 3109

www.insp.mx

Cuernavaca, Morelos; Junio 27 de 2010

A quien corresponda

Escuela de Salud Pública de México

Por medio de la presente autorizo el uso de las muestras y base de datos original originada en el Proyecto *"Polimorfismos de la Región Reguladora del Gen de Interleucina-10 y su asociación con el riesgo de desarrollar cáncer cervical en mujeres procedentes del Estado de Guerrero"*, para que sean utilizados para el desarrollo del protocolo de tesis de Maestría en Ciencias, área de concentración en enfermedades infecciosas titulado *"ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE FAS Y FAS-L A NIVEL SISTÉMICO Y EN CÉRVIX EN MUJERES CON LESIONES PREMALIGNAS EN CÉRVIX Y CÁNCER CÉRVICO-UTERINO"*, de la alumna **Luz Yvette López Díaz**. Se adjunta copia de las aprobaciones de comisiones de Ética, Bioseguridad e Investigación del proyecto base del cual soy el investigador responsable.

Agradeciendo la atención a la presente, y aprovecho para enviarle un cordial saludo.

Atentamente



Dr. Vicente Madrid Marina

Investigador Responsable



Instituto Nacional de Salud Pública
Comisión de Investigación

No. de Ref. 814.

CI-231.

Cuernavaca, Mor., a 5 de junio del 2009.

Dr. Vicente Madrid Marina
Responsable de Proyecto
CISEI-INSP
Presente

Por medio del presente informo a usted que se registró la aprobación de la Comisión de Bioseguridad del proyecto de investigación titulado: **"Polimorfismos de la Región Reguladora del Gen de Interleucina-10 y su asociación con el riesgo de desarrollar cáncer cervical en mujeres procedentes del estado de Guerrero"**; cumpliendo con los requisitos para la **Aprobación** definitiva de la Comisión de Investigación.

Aprovecho la ocasión para enviarle un saludo cordial.

Atentamente,

Dr. Eduardo C. Lazcano Ponce
Presidente de la Comisión
de Investigación-INSP

Ccp. Dra. Ma. de Lourdes García García.- Directora Adjunta del CISEI.-Presente.
Lic. Raúl Contreras Alcántara.- Director de Administración y Finanzas.- Presente.
C.P. Raúl Figueroa Muñoz.- Subdirector de Apoyo Académico del CISEI.-Presente.

Av. Universidad No. 655
Col. Santa María Ahuacatitlán
62508 Cuernavaca, Morelos
México

e-mail: elazcano@insp.mx

Tels: 01 (777) 3293003
01 (777) 3293078
Fax: 01 (777) 3111148



**INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PUBLICA
COMISION DE BIOSEGURIDAD**



CB10-041.

Cuernavaca, Mor., a 21 de Enero del 2010.

CB: 806 - CI: 814

**Dr. Vicente Madrid Marina
Responsable de Proyecto
CISEI-INSP
Presente**

Por medio del presente informo a usted que el dictamen de la Comisión de Bioseguridad para la incorporación de dos co-investigadores, los M. en C. Margarita Bahena Román y Alfredo Lagunas Martínezen en el proyecto de investigación titulado: **"Polimorfismos de la Región Reguladora del Gen de Interleucina-10 y su asociación con el riesgo de desarrollar cancer cervical en mujeres procedentes del Estado de Guerrero"** es: **EXENTO DE REVISIÓN.**

Atentamente,

**Dr. Salvador F. Villalpando Hernández
Presidente de la Comisión
de Bioseguridad-INSP**

ccp. Dr. Eduardo Lazcano Ponce.- Presidente de la Comisión de Investigación.-Presente.
Dra. Julieta Ivonne Castro Romero.- Presidenta de la Comisión de Ética.- Presente.

Col. Santa María Ahuacatlán
62508 Cuernavaca, Morelos
México

e-mail: svillalp@insp.mx

Tel-Fax:01 (777) 3293000 ext 7204
Secretaría: 7204



INSTITUTO NACIONAL DE
SALUD PÚBLICA

Avenida Universidad 655,
Colonia Santa María Ahuacatlán
62100 Cuernavaca, Morelos, México

Teléfono: +52 (777) 329 30 00 Ext. 2465
Email: jcastro@insp.mx
web: www.insp.mx

COMISIÓN DE ÉTICA

Dra. Julieta Ivone Castro Romero
Presidenta

Cuernavaca, Mor., 18 de enero, 2010.
CI: 814,

Vicente Madrid Marina
Investigador principal
Presente

Estimado investigador,

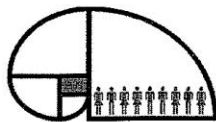
Por medio del presente me permito informar a usted que el dictamen de la Comisión de Ética al addendum de su estudio titulado: ***"Polimorfismos de la Región Reguladora del Gen de Interleucina-10 y su asociación con el riesgo de desarrollar cáncer cervical en mujeres procedentes del Estado de Guerrero"*** fue:

Exento de revisión

Para registrar a los M. en C. Margarita Bahena Román y Alfredo Lagunas Martínez como co-investigadores del presente estudio.

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

Atentamente



IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics*. CA Cancer J Clin, 2011. **61**(2): p. 69-90.
2. International Agency for Research on Cancer (IARC), G. *Cervical Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2008*. 2008 October 01 2012 [cited 2012 October 01]; Available from: <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp>.
3. International Agency for Research on Cancer (IARC), G., *CANCER INCIDENCE MORTALITY AND PREVALENCE LATIN AMERICA AND CARIBBEAN IN 2008*, 2008.
4. Almonte, M., et al., *[New paradigms and challenges in cervical cancer prevention and control in Latin America]*. Salud Publica Mex, 2010. **52**(6): p. 544-59.
5. Tapia-Conyer R., K.-M.P., Macias-martínez C.G. , *Registro histopatológico de Neoplasias en México*. Dirección General de Epidemiología, Secretaria de Salud., 2000.
6. Palacio-Mejia, L.S., et al., *Cervical cancer, a disease of poverty: mortality differences between urban and rural areas in Mexico*. Salud Publica Mex, 2003. **45 Suppl 3**: p. S315-25.
7. Moody, C.A. and L.A. Laimins, *Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(8): p. 550-60.
8. NOM-009-SCT4-1994, *NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-014-SSA2-1994, PARA LA PREVENCION, DETECCION, DIAGNOSTICO, TRATAMIENTO, CONTROL Y VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA DEL CANCER CERVICO UTERINO*.
9. Lacruz-Pelea, *Nomenclatura de las lesiones cervicales (de Papanicolau a Bethesda 2001)*. REV ESP PATOL, 2003. **36**(1): p. 5-10.
10. Elva Lorena Díaz-Amézquita, N.M.d.L., Irma Yadira Dragustinovis Valdéz, *Correlación citológica-colposcópica e histológica de lesiones de bajo y alto grado en cérvix*. Rev Hosp Gral Dr. M Gea González, 2006. **7**(2): p. 54-58.
11. Woodman, C.B., S.I. Collins, and L.S. Young, *The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(1): p. 11-22.
12. Grubisic, G., et al., *Diagnostic approach for precancerous and early invasive cancerous lesions of the uterine cervix*. Coll Antropol, 2009. **33**(4): p. 1431-6.
13. Myers, E.R., et al., *Mathematical model for the natural history of human papillomavirus infection and cervical carcinogenesis*. Am J Epidemiol, 2000. **151**(12): p. 1158-71.
14. Schiffman, M., et al., *Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer*. J Natl Cancer Inst, 2011. **103**(5): p. 368-83.
15. Lagunas-Martinez, A., V. Madrid-Marina, and P. Gariglio, *Modulation of apoptosis by early human papillomavirus proteins in cervical cancer*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1805**(1): p. 6-16.

16. Howley P.M. y Lowy D.R. Papillomaviruses. En Knipe DM, H.P.F.V., 5th Edition. Lippincott Williams and Wilkins. 2007. Pages 2300-2354. 5th Edition ed: Lippincott Williams and Wilkins.
17. zur Hausen, H., *Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(5): p. 342-50.
18. zur Hausen, H., *Papillomaviruses in human cancer*. Appl Pathol, 1987. **5**(1): p. 19-24.
19. de Villiers, E.M., L. Gissmann, and H. zur Hausen, *Molecular cloning of viral DNA from human genital warts*. J Virol, 1981. **40**(3): p. 932-5.
20. de Villiers, E.M., et al., *Classification of papillomaviruses*. Virology, 2004. **324**(1): p. 17-27.
21. zur Hausen, H., *Similarities of papillomavirus infections with tumor promoters*. Princess Takamatsu Symp, 1983. **14**: p. 147-52.
22. Walboomers, J.M., et al., *Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide*. J Pathol, 1999. **189**(1): p. 12-9.
23. Muñoz, N., *Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence*. J Clin Virol, 2000. **19**(1-2): p. 1-5.
24. McCredie, M.R., et al., *Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: a retrospective cohort study*. Lancet Oncol, 2008. **9**(5): p. 425-34.
25. Petry, K.U., et al., *Cellular immunodeficiency enhances the progression of human papillomavirus-associated cervical lesions*. Int J Cancer, 1994. **57**(6): p. 836-40.
26. Torres-Poveda, K.J., et al., *[Human papilloma virus infection and cervical cancer: a public health perspective]*. Rev Invest Clin, 2008. **60**(5): p. 414-20.
27. Bermudez-Morales, V.H., et al., *Correlation between IL-10 gene expression and HPV infection in cervical cancer: a mechanism for immune response escape*. Cancer Invest, 2008. **26**(10): p. 1037-43.
28. Torres-Poveda, K., et al., *The SNP at -592 of human IL-10 gene is associated with serum IL-10 levels and increased risk for human papillomavirus cervical lesion development*. Infect Agent Cancer, 2012. **7**(1): p. 32.
29. Tindle, R.W., *Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(1): p. 59-65.
30. Kanodia, S., L.M. Fahey, and W.M. Kast, *Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response*. Curr Cancer Drug Targets, 2007. **7**(1): p. 79-89.
31. Siegel, P.M. and J. Massague, *Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(11): p. 807-21.
32. Hasan, U.A., et al., *TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16*. J Immunol, 2007. **178**(5): p. 3186-97.
33. Leong, C.M., et al., *Deregulation of E-cadherin by human papillomavirus is not confined to high-risk, cancer-causing types*. Br J Dermatol, 2010. **163**(6): p. 1253-63.

34. Nakamura, T., et al., *Expression of indoleamine 2, 3-dioxygenase and the recruitment of Foxp3-expressing regulatory T cells in the development and progression of uterine cervical cancer*. Cancer Sci, 2007. **98**(6): p. 874-81.
35. Abbas A K., L.A.H., Pillai S. Inmunología celular y molecular. 6ª edición. ELSEVIER. 2007.
36. Nagata, S., *Fas ligand and immune evasion*. Nat Med, 1996. **2**(12): p. 1306-7.
37. Rubio, C.A., *Tumor cells induce apoptosis in lymphocytes*. Nat Med, 1997. **3**(3): p. 253-4.
38. NCBI. *tumor necrosis factor ligand superfamily member 6 [Homo sapiens]*. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_000630.
39. Takahashi, T., et al., *Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity*. Int Immunol, 1994. **6**(10): p. 1567-74.
40. Knox, P.G., et al., *Inhibition of metalloproteinase cleavage enhances the cytotoxicity of Fas ligand*. J Immunol, 2003. **170**(2): p. 677-85.
41. Vargo-Gogola, T., et al., *Identification of novel matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) cleavage sites in murine and human Fas ligand*. Arch Biochem Biophys, 2002. **408**(2): p. 155-61.
42. Du, C. and Y. Wang, *The immunoregulatory mechanisms of carcinoma for its survival and development*. J Exp Clin Cancer Res, 2011. **30**: p. 12.
43. Lettau, M., et al., *Storage, expression and function of Fas ligand, the key death factor of immune cells*. Curr Med Chem, 2008. **15**(17): p. 1684-96.
44. Hahne, M., et al., *Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape*. Science, 1996. **274**(5291): p. 1363-6.
45. Kornmann, M., et al., *Fas and Fas-ligand expression in human pancreatic cancer*. Ann Surg, 2000. **231**(3): p. 368-79.
46. Shiraki, K., et al., *Expression of Fas ligand in liver metastases of human colonic adenocarcinomas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(12): p. 6420-5.
47. NCBI. *FAS Fas (TNF receptor superfamily, member 6) [Homo sapiens]*. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/355>.
48. Cheng, J., et al., *Characterization of human Fas gene. Exon/intron organization and promoter region*. J Immunol, 1995. **154**(3): p. 1239-45.
49. Greil, R., A. Egle, and A. Villunger, *On the role and significance of Fas (Apo-1/CD95) ligand (FasL) expression in immune privileged tissues and cancer cells using multiple myeloma as a model*. Leuk Lymphoma, 1998. **31**(5-6): p. 477-90.
50. Nagata, S. and P. Golstein, *The Fas death factor*. Science, 1995. **267**(5203): p. 1449-56.
51. Imai, A., et al., *Frequent expression of Fas in gonadotropin-releasing hormone receptor-bearing tumors*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 1997. **74**(1): p. 73-8.
52. Mahmood, Z. and Y. Shukla, *Death receptors: targets for cancer therapy*. Exp Cell Res, 2010. **316**(6): p. 887-99.

53. Krammer, P.H., *CD95's deadly mission in the immune system*. Nature, 2000. **407**(6805): p. 789-95.
54. Alberts B., J.A., et al. Molecular biology of the cell. 4th Edition. Garland Science. 2002. Pages 1010-1014.
55. Lodish H., B.A., et al. Molecular and Celular biology. 5th Edition. W. H. Freeman and Company. 2004. Pages 924-925.
56. Green, D.R., *Apoptotic pathways: ten minutes to dead*. Cell, 2005. **121**(5): p. 671-4.
57. Hotchkiss, R.S., et al., *Cell death*. N Engl J Med, 2009. **361**(16): p. 1570-83.
58. Ashkenazi, A., *Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(6): p. 420-30.
59. Castro-Obregón S., C.L.T.o.c.d.b.m., En Massieu L, Arias C and Morán J "The neurochemistry of neuronal death". Research Signpost. 2005. Pages 1-27.
60. Kischkel, F.C., et al., *Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor*. EMBO J, 1995. **14**(22): p. 5579-88.
61. Zoodsma, M., et al., *Interleukin-10 and Fas polymorphisms and susceptibility for (pre)neoplastic cervical disease*. Int J Gynecol Cancer, 2005. **15 Suppl 3**: p. 282-90.
62. Wang, X.Y., R. Zhang, and S. Lian, *Aberrant expression of Fas and FasL pro-apoptotic proteins in basal cell and squamous cell carcinomas*. Clin Exp Dermatol, 2011. **36**(1): p. 69-76.
63. Das, H., et al., *Quantitation of Fas and Fas ligand gene expression in human ovarian, cervical and endometrial carcinomas using real-time quantitative RT-PCR*. Br J Cancer, 2000. **82**(10): p. 1682-8.
64. Ibrahim, R., et al., *Expression of FasL in squamous cell carcinomas of the cervix and cervical intraepithelial neoplasia and its role in tumor escape mechanism*. Cancer, 2006. **106**(5): p. 1065-77.
65. Zhou, J.H., et al., *Fas-mediated pathway and apoptosis in normal cervix, cervical intraepithelial neoplasia and cervical squamous cancer*. Oncol Rep, 2006. **16**(2): p. 307-11.
66. Tavernier, F.R., *Expresión del RNA mensajero de Fas y su ligando en pacientes infectadas con virus del papiloma humano que presentan lesiones intraepiteliales escamosas o cancerosas del cérvix*2001: Universidad Autonoma de Chiapas.
67. Vandesompele, J., et al., *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*. Genome Biol, 2002. **3**(7): p. RESEARCH0034.
68. Schmittgen, T.D. and K.J. Livak, *Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method*. Nat Protoc, 2008. **3**(6): p. 1101-8.
69. Viard-Leveugle, I., et al., *Frequent loss of Fas expression and function in human lung tumours with overexpression of FasL in small cell lung carcinoma*. J Pathol, 2003. **201**(2): p. 268-77.

70. O'Connell, J., et al., *Fas counter-attack--the best form of tumor defense?* Nat Med, 1999. **5**(3): p. 267-8.
71. Padierna-Mota et al. Revista Salud Pública y Nutrición. 2007; 7. UANL, M.
72. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting*. Immunity, 2004. **21**(2): p. 137-48.
73. Gratas, C., et al., *Up-regulation of Fas (APO-1/CD95) ligand and down-regulation of Fas expression in human esophageal cancer*. Cancer Res, 1998. **58**(10): p. 2057-62.
74. Herrnring, C., et al., *Expression of the apoptosis-inducing ligands FasL and TRAIL in malignant and benign human breast tumors*. Histochem Cell Biol, 2000. **113**(3): p. 189-94.
75. Kim, Y.S., et al., *Fas (APO-1/CD95) ligand and Fas expression in renal cell carcinomas: correlation with the prognostic factors*. Arch Pathol Lab Med, 2000. **124**(5): p. 687-93.
76. Lee, S.H., et al., *Expression of Fas and Fas-related molecules in human hepatocellular carcinoma*. Hum Pathol, 2001. **32**(3): p. 250-6.
77. Niehans, G.A., et al., *Human lung carcinomas express Fas ligand*. Cancer Res, 1997. **57**(6): p. 1007-12.
78. Schneider, P., et al., *Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity*. J Exp Med, 1998. **187**(8): p. 1205-13.
79. Reesink-Peters, N., et al., *Death receptors and ligands in cervical carcinogenesis: an immunohistochemical study*. Gynecol Oncol, 2005. **96**(3): p. 705-13.
80. Munakata, S., et al., *Expression of Fas ligand and bcl-2 in cervical carcinoma and their prognostic significance*. Am J Clin Pathol, 2005. **123**(6): p. 879-85.
81. Lerma, E., et al., *Prognostic significance of the Fas-receptor/Fas-ligand system in cervical squamous cell carcinoma*. Virchows Arch, 2008. **452**(1): p. 65-74.
82. López-Álvarez A, D.-R.J., Hernández-Lopres G, Lerma-Díaz JM, Sierra-Díaz E., *Correlación de los niveles séricos de Fas y FasL solubles en pacientes con cáncer de cérviz y sus lesiones precursoras*. Revista Médica, 2011. **2**(4): p. 191-197.
83. Aguilar-Lemarroy, A., et al., *Apoptosis induction in Jurkat cells and sCD95 levels in women's sera are related with the risk of developing cervical cancer*. BMC Cancer, 2008. **8**: p. 99.
84. Wang, W.S., et al., *Matrix metalloproteinase-7 increases resistance to Fas-mediated apoptosis and is a poor prognostic factor of patients with colorectal carcinoma*. Carcinogenesis, 2006. **27**(5): p. 1113-20.
85. Strand, S., et al., *Cleavage of CD95 by matrix metalloproteinase-7 induces apoptosis resistance in tumour cells*. Oncogene, 2004. **23**(20): p. 3732-6.
86. Strand, S., et al., *Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells--a mechanism of immune evasion?* Nat Med, 1996. **2**(12): p. 1361-6.

