



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGIA
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“Expresión diferencial de proteínas inducidas por
la infección por el VPH-16 en cáncer cervical”**

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A:
IDANYA RUBÍ SERAFÍN HIGUERA

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. LUZ DEL CARMEN ALARCÓN ROMERO

Chilpancingo de los Bravo, Gro. Diciembre del 2016.

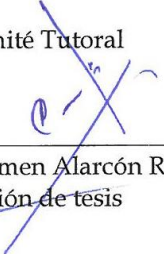



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

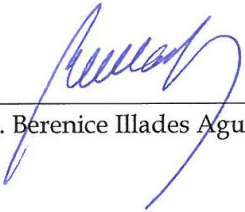
En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 10 días del mes de octubre del dos mil dieciséis, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado del Doctorado en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada “**Expresión diferencial de proteínas inducidas por la infección por el VPH-16 en cáncer cervical**”, presentada por la alumna Idanya Rubí Serafín Higuera, para obtener el Grado de Doctora en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.


El Comité Tutorial


Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero
Dirección de tesis


Dr. Alejandro Millán Vega


Dra. Mónica Espinoza Rojo


Dra. Berenice Illades Aguiar

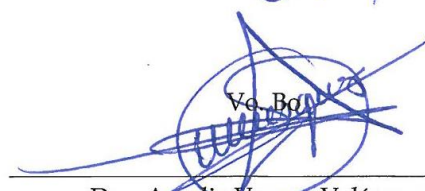

Dr. Mario César López Camarillo


Vo. Bo

Dra. Isela Parra Rojas
Coordinadora del Posgrado de la Facultad de
Ciencias Químico Biológicas



Coordinación 2014-2018


Vo. Bo
Dra. Amalia Vences Velázquez
Directora de la Facultad de Ciencias Químico
Biológicas



CRÉDITOS A INSTITUCIONES

La investigación se realizó con el financiamiento del Programa de Fortalecimiento Académico del Posgrado de Alta Calidad (I010/455/2013 C-677/2013).

Bajo la dirección de:

Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero

y la asesoría de:

Dra. Berenice Illades Aguiar

Dra. Mónica Espinoza Rojo

Dr. Alejandro Millán Vega

Dr. Mario César López Camarillo

Se agradece:

- A la Clínica de Displasias del **Hospital General “Dr. Raymundo Abarca Alarcón”**, por su colaboración en la muestra de biopsias y el diagnóstico realizado por el Dr Ginecólogo Colposcopista Raúl Peralta Catalán.
- Al **Instituto Estatal de Cancerología “Arturo Beltrán Ortega”** de la ciudad de Acapulco, Guerrero, por su colaboración y proporcionar las muestras histológicas con diagnóstico carcinoma de células escamosas y estadio clínico realizado por el Dr. Patólogo Marco Antonio López, además del apoyo del Dr. Guadalupe Muñoz Camacho y el Dr. Víctor Hugo Garzón Barrientos.
- Al **Hospital General de “Dr. Jorge Soberón Acevedo”** de la ciudad de Iguala, Guerrero por proporcionar las muestras histológicas con diagnóstico de negativas a lesión, al Patólogo Vladimir Rodríguez-Sandoval, a la Ginecóloga Teresa Saavedra Arellano y al Ginecólogo Colposcopista Jaime Acosta Burgos.
- Al personal del **Laboratorio de Biomedicina Molecular de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la UAGro**, por la colaboración para realizar la tipificación del VPH-AR mediante el método de INNO-LiPA.
- Al personal del **Servicio de Diagnóstico Integral en la Detección Oportuna del Cáncer Cérvico Uterino y VPH, de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la UAGro.**

Durante el Doctorado en Ciencias Biomédicas, la C.IDANYA RUBÍ SERAFÍN HIGUERA, recibió la beca del CONACYT con el número 222252 en el período 2011-2014.

**EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS
INDUCIDAS POR LA INFECCIÓN POR EL
VPH-16 EN CÁNCER CERVICAL**

ÍNDICE	Página
I. RESUMEN	
II. INTRODUCCIÓN	1
II.1 Historia natural de la infección por el VPH-16	2
II.1.1 Oncoproteínas del VPH-16	2
II.2 Lesiones precursoras del Cáncer Cervical	6
II.3 Estadios del Cáncer Cervical	9
II.4 Identificación de candidatos a biomarcadores usando herramientas proteómicas en Cáncer Cérvico Uterino	12
III. CAPÍTULO 1	17
Artículo: Differential proteins among normal cervix cells and cervical cancer cells with HPV-16 infection, through mass spectrometry-based Proteomics (2D-DIGE) in women from Southern México	
IV. DISCUSIÓN	27
V. CONCLUSIONES	41
VI. REFERENCIAS	42
VII. ANEXOS	50

I. RESUMEN

El Cáncer Cervical (CC) continúa siendo un problema de salud pública importante. En mujeres del sur de México la infección por el genotipo 16 se ha encontrado hasta en el 70% de los casos reportados de CC, considerándolos un factor central en el desarrollo de este carcinoma. El tratamiento del cáncer de cérvix uterino depende del estadio clínico, el llamado "cáncer cervical en etapa temprana" (FIGO IA2, IB, IIA y IIB) suele tratarse con una histerectomía radical, quimio-radioterapia o ambas. Actualmente se considera el diagnóstico histológico como el estándar de oro, sin embargo, similar al estudio citológico tiene como desventaja la subjetividad de la lectura, por lo que estudios proteómicos recientes han demostrado que moléculas encontradas en el huésped podrían servir como biomarcadores, representando una alternativa o un complemento a la citología y la detección del VPH por métodos moleculares. En este estudio se seleccionaron 6 casos de cáncer cervical con infección por VPH-16 (4 casos de estadio IIB, uno de IIB1 y otro de IIB2) y 4 de tejido sin LEI sin infección por el VPH, el diagnóstico clínico se realizó por estudio cito-histológico, colposcópico, y para la determinación de la presencia del ADN viral se realizó el estudio molecular mediante INNO-LIPA extra, hibridación in situ con amplificación por tiramida. Posteriormente se extrajeron proteínas, las cuales se sometieron a electroforesis diferencial en gel (2D-DIGE), se identificaron las spots diferenciales mediante el análisis de los geles en el software Decyder y mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF) se identificaron las proteínas Mimecan, Actin aortic smooth muscle y Lumican con expresión aumentada, y Peroxiredoxin-1, 14-3-3 protein, Alpha-enolase y Keratin type II cytoskeletal 5 con expresión disminuida en cáncer cervical. La alteración de la expresión de estas proteínas podría estar relacionada con presencia de la infección por el VPH-16, y se reportándose que participan en procesos como hipoxia, transición mesénquima epitelio, pérdida de la diferenciación celular y del control del ciclo celular, proliferación y metástasis, sin embargo, su expresión aún es controversial, por lo que se sugiere realizar más estudios sobre la relación de la abundancia de su expresión, distribución y su relación con el estadio del cáncer cervical, así como posibles biomarcadores de diagnóstico, pronóstico y como blancos terapéuticos.

II. Introducción

El Cáncer Cervical (CC) es la tercera causa de muerte por cáncer en la mujer a nivel mundial, ocasionando la muerte de aproximadamente un cuarto de millón de mujeres cada año en el mundo, con 530 000 nuevos casos y 275 000 muertes por año de cáncer de cérvix uterino, por lo que esta patología continua siendo un problema de salud pública importante (Arbyn *et al.*, 2011; Steenbergen *et al.*, 2014). En México en el 2009 la tasa de mortalidad fue de 14 muertes por cada 100 mil mujeres de 25 años o más y en Guerrero esta tasa se reportó de aproximadamente 15 (Ortíz-Domínguez, 2009). Se considera que el 70% de los casos de CC son diagnosticados como carcinoma de células escamosas (CCE), por lo que se considera la variante histológica más frecuente en el mundo seguido del adenocarcinoma (Spaans *et al.*, 2015). Además, los virus del papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR), son los agentes infecciosos necesarios en la transformación neoplásica del cérvix uterino y la causa necesaria pero no suficiente para el desarrollo del carcinoma invasor (zur Hausen, 2002). El VPH-AR, se ha encontrado en más del 99% de los casos de CC a nivel mundial, por lo que se considera un factor central en el desarrollo de este carcinoma (Johansson and Schwartz, 2013; Aguilar-Lemarroy *et al.*, 2015). En mujeres del sur de México la infección por el genotipo 16 se ha encontrado hasta en el 70% de los casos reportados de CC (Illades-Aguilar *et al.*, 2010).

II.1. Historia natural de la infección por el VPH-16

El VPH-16 entra al epitelio plano escamoso de la piel y mucosa de vulva, vaginal y de exocérvix que reviste el cérvix uterino a través de microlesiones y se une a proteoglicanos heparán sulfato de la membrana basal posteriormente infectan las células de la capa basal profunda (Johansson and Schwartz, 2013), actualmente se considera que el cáncer cervical inicia en la unión escamo-columnar o zona de transformación (Figura 1).

El genoma viral se replica en conjunto con el ADN celular durante la fase S y se mantiene como episomas estables. En estas células la expresión de las proteínas

virales se mantiene en bajos niveles lo cual probablemente facilita el escape a la respuesta inmune. Posterior a la división celular una de las células hijas sufre el proceso de diferenciación y sale del ciclo celular, y subsecuente diferenciación viral dependiente de sobrerregulación de promotores resultando en un incremento en la expresión de los genes virales tempranos (Figura 2) (Johansson and Schwartz, 2013; Steenbergen *et al.*, 2014).

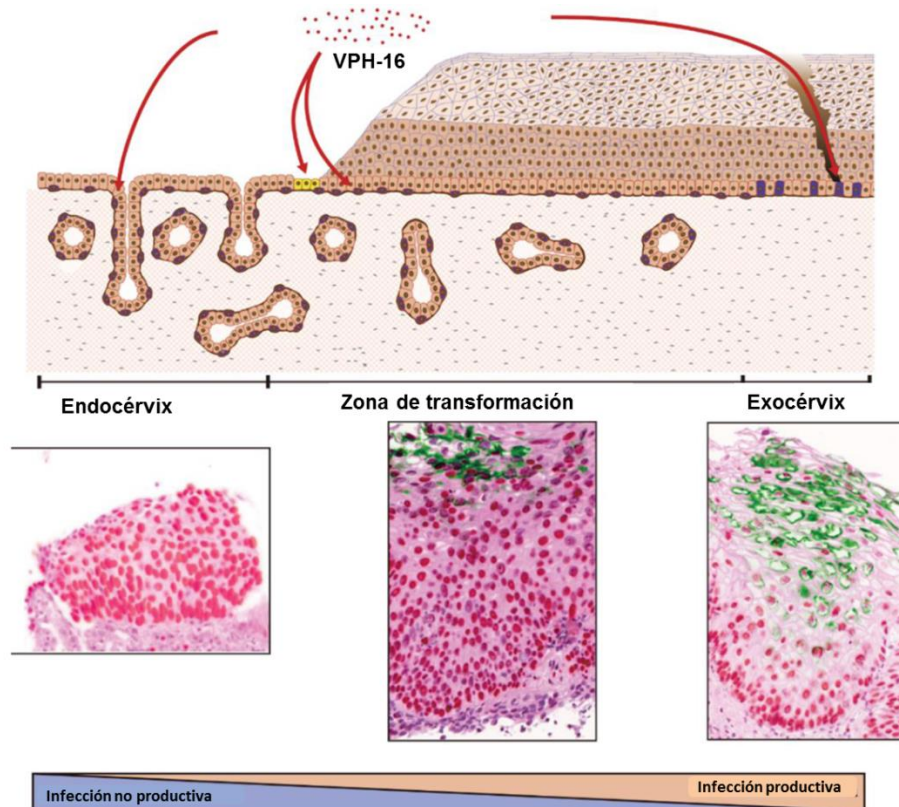


Figura 1. Sitios de ingreso al cérvix uterino del VPH-16. La mayoría de los cánceres cervicales surgen en la zona de transformación cervical, que es mantenida por un tipo especializado de células madre conocida como células de reservas (mostrada en púrpura en la zona de transformación), y posiblemente también por un grupo de células cuboidales (amarillo) localizadas en la unión escamo-columnar. Estas células pueden mantener el epitelio columnar del endocérvix o el epitelio estratificado de la zona de transformación dependiendo de su entorno extracelular. En el exocérvix, el epitelio está poblado por células madre de tejido epitelial (púrpura en el exocérvix). Actualmente se sugiere que la infección productiva es favorecida en el exocérvix, mientras que una infección no productiva o abortiva es más probable en el endocérvix. En las inmunotinciones, la expresión de MCM (rojo) indica la expresión de la proteína E7 viral. La expresión de E4 (verde) indica la infección productiva (Modificado de Egawa *et al.*, 2015; Doorbar *et al.*, 2015).

Los genes tempranos del VPH-16, mantienen la replicación viral y su segregación de tal manera que las células madre infectadas pueden mantenerse en la lesión por

un largo período. Debido a que las células hijas infectadas migran a la superficie del epitelio, los productos de genes virales tardíos son producidos resultando en altos niveles de amplificación del genoma viral. La replicación viral depende casi totalmente de factores de replicación del hospedero excepto por la helicasa viral E1, otros genes tempranos E5, E6 y E7 se considera que coordinan un medioambiente apropiado para la replicación del ADN, en el cual algunas veces induce síntesis de ADN del hospedero y evita la apoptosis (Narisawa-Saito y Kiyono, 2007; Burd, 2003).

La proteína E2 regula negativamente la transcripción de los oncogenes E6 y E7, (Teissier *et al.*, 2007) mediante la represión del promotor P97, este promotor está próximo a la caja TATA, a través de su unión a la región de control larga en sitios específicos con la secuencia 5'- ACCN6GGT-3' (Snellenberg *et al.*, 2012), y es el encargado de la transcripción de las oncoproteínas (Rivera *et al.*, 2006). Una vez integrado el genoma viral de la célula, se pierde la función reguladora de E2 provocando una sobreexpresión de los oncogenes E6 y E7 involucrados en la inducción de la transformación celular, mantenimiento del fenotipo maligno y progresión a carcinoma invasor, siendo estos transcritos más estables que los originados del ADN episomal del virus (Cricca *et al.*, 2009; McLaughlin-Drubin and Münger 2009). Las mutaciones, integración del genoma viral en el cromosoma del hospedero y el número de copias virales, son factores esenciales para la inmortalización, transformación y carcinogénesis celular inducida por los VPH-AR (Narisawa-Saito y Kiyono, 2007; Burd, 2003; Shukla *et al.*, 2014).

La persistencia de la infección por el VPH-16, puede causar anomalías cervicales asintomáticas y progresar a LEI (lesión escamosa intraepitelial). A pesar que se considera que las LEIBG regresan espontáneamente sin tratamiento, existen factores que contribuyen a la progresión de estas a lesiones como son, la persistencia de la infección por VPH-AR, expresión continua de los oncogenes virales E6 y E7, integración del ADN viral en el genoma de la célula hospedera e inactivación del gen E2 (Zehbe *et al.*, 2011). Varios estudios han sugerido, que las lesiones premalignas que presenten integrado el genoma viral, tienen un riesgo alto

para progresar a carcinomas invasivos (Briolat *et al.*, 2007; Vinokurova *et al.*, 2008; De Marchi-Triglia *et al.*, 2009). La integración del genoma viral y el alto número de copias ha sido asociado con el incremento en la persistencia de la infección por el VPH-AR y el aumento en el riesgo de desarrollo de la NIC 2/3 o cáncer (Steenbergen *et al.*, 2014).

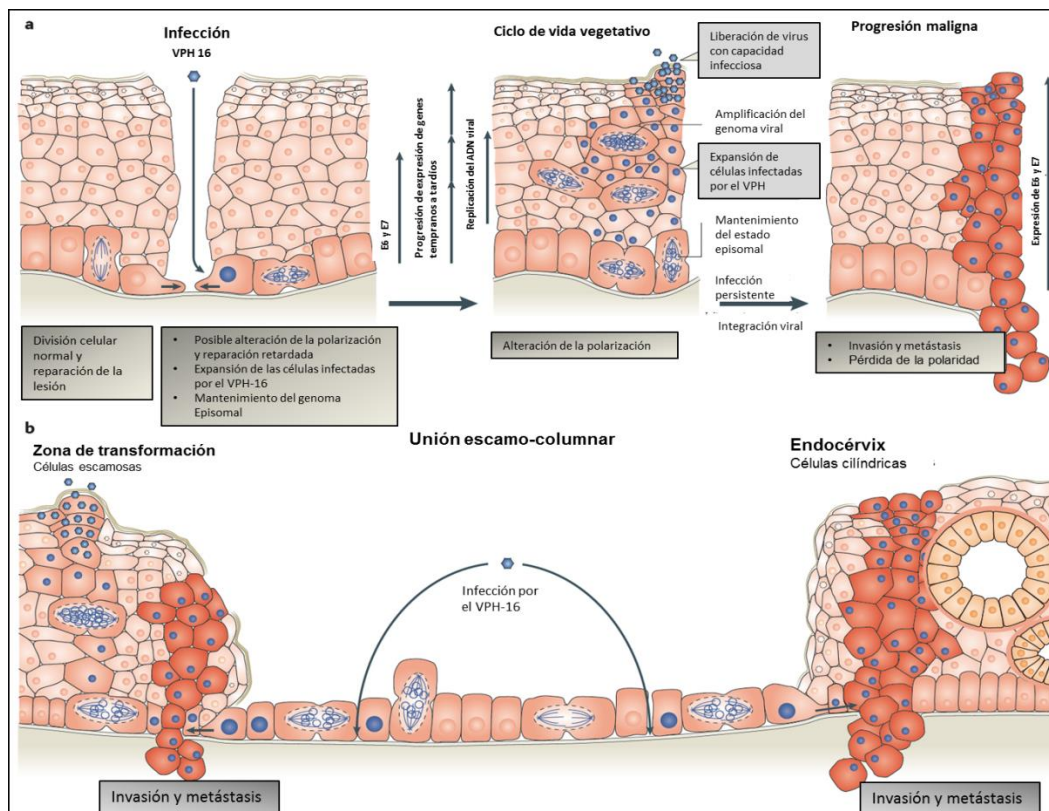


Figura 2. Ciclo biológico del VPH-16. **a.** El VPH-16 entra a las células de la capa basal a través de microlesiones, los genes tempranos E1- E7 son expresados y el ADN se mantiene en forma episomal. En la capa superficial del epitelio, el genoma viral se replica y sus genes tardíos como L1, L2 son expresados para formar la cápside viral. E4 se expresa para facilitar el rompimiento del citoesqueleto y liberar los viriones, capaces de infectar nuevas células (Ciclo vegetativo). Una vez integrado el genoma viral de la célula, se pierde la función reguladora de E2 provocando una sobreexpresión de los oncogenes E6 y E7 involucrados en la transformación celular y progresión a carcinoma invasor. **b.** Las células de la unión escamo-columnar no son permisivas para la infección viral y pueden albergar el virus durante períodos prolongados, lo que permite el inicio de eventos que pueden dar lugar al cáncer cervical. Estas células cuboidales también dan lugar a células que forman el endocérvix donde también pueden surgir tumores malignos. Las células que contienen ADN viral se muestran con núcleos azules (Modificado de Banks *et al.*, 2012).

II.1.1 Oncoproteínas del VPH-16

Durante la integración del genoma viral, generalmente se pierden los genes E2 y E5 por lo que, se creía que la oncoproteína E5 no ejercía una función importante en la progresión maligna sin embargo, en las lesiones premalignas del cérvix uterino, el ADN del VPH-16 puede existir en estado integrado episomal o integrado y episomal, es decir en estado físico mixto y en cáncer cervical se ha encontrado proteína E5 en un 60% de los casos. La activación por la oncoproteína E5 de las vías EGF-R y de Ras-Raf-MAP quinasa o PI3K-Akt conduce a la alteración de la proliferación celular, angiogénesis y apoptosis. Otro mecanismo por el cual E5 aumenta la proliferación celular es mediante la regulación negativa de las proteínas p21/p27 (Venuti *et al.*, 2011). Por otro lado las proteínas E4 se expresan a partir de un ARNm empalmado (E1 Δ E4) encontrándose en células en las que se produce la replicación del ADN viral (ciclo productivo), se localizan principalmente en los filamentos intermedios (FI) citoplasmáticos en LEIBG causadas por VPH-16, también de manera difusa en citoplasma y perinuclear. Aunque su significado no es totalmente claro, la expresión de la proteína E1 Δ E4 del VPH-16 en cultivos de queratinocitos en monocapa provoca el colapso de la red de FI y citoqueratinas, permitiendo la liberación de nuevas partículas virales, así como la pérdida de diferenciación celular, lo que da origen a las células denominadas coilocitos (Doorbar *et al.*, 2000; Grases *et al.*, 2005; Davy *et al.*, 2006). El marco de lectura abierto de E4 se encuentra superpuesto al de E2, por lo que se ha sugerido que E4 podría estar implicado en el control postranscripcional de la expresión génica debido a que se ha encontrado unido a la caja DEAD de helicasas en *E. coli* y *S. cerevisiae* (Doorbar *et al.*, 2000)

La continua expresión de E6 y E7 es necesaria para el mantenimiento del fenotipo maligno. La expresión de las oncoproteínas es regulada por el estado físico del ADN del VPH-16, número de copias, metilación del promotor P97 y secuencias aumentadoras río arriba (Dutta *et al.*, 2015). La proteína E6 del VPH 16 es encontrada en el núcleo y citoplasma (Tao *et al.*, 2003), tiene 151 ácidos nucleicos que codifican para motivos Cys-X-X-Cys que forman 2 estructuras denominadas dedos de zinc, que le permiten unirse a un gran número de proteínas celulares como p53 en un complejo ternario con la ubiquitina ligasa E6-AP resultando en su

ubiquitinación y subsecuente degradación. E6 también se une a p300/CPB, un coactivador de p53 interfiriendo de manera indirecta. Al unirse al blanco transcripcional de p53, p21 un inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas lo inactiva, al igual que cuando se une a p27. P53 también actúa como activador transcripcional uniéndose a secuencias específicas de ADN requeridas para el arresto del crecimiento posterior a un daño al ADN. La pérdida de estas funciones resulta en continua replicación del material genético, seguido de daño al ADN e inestabilidad cromosomal, siendo el aspecto más importante de la progresión de la infección latente por VPH-AR (Wittekindt *et al.*, 2012). La mayoría de las proteínas E6 de los VPH de bajo riesgo (VPH-BR), no se unen a p53 o lo hacen débilmente y no lo degradan. La oncoproteína E6 del VPH-16 tiene 4 motivos PDZ que permiten la interacción con miembros de la familia MAGUK lo que conduce a la degradación de proteínas celulares y en consecuencia la pérdida de polaridad celular y el contacto célula-célula (Ghittoni *et al.*, 2010)

La proteína E7 representa una fosfoproteína de unión dedos de zinc con dos dominios Cys-X-X-Cys compuesto de 98 aminoácidos, que es capaz de unirse a Rb. Cuando Rb es expresado constitutivamente p107 es expresado durante la fase S y p130 prevalece en fase G0, estas pequeñas proteínas desfosforiladas forman un complejo con los factores de transcripción E2F/DP1, en la progresión de la fase G1-S, Rb es fosforilada por complejos ciclina-cinasa, liberando factores E2F que activan promotores de genes involucrados en la fase S (zur Hausen, 2006; Feller *et al.*, 2009). E7 del VPH-16 se une a las proteínas p107 y p130 por lo que se inhibe la actividad represora de los complejos E2F4 y E2F5; esta oncoproteína es capaz de suprimir la actividad citotóxica a través de la desregulación de TAP1. E6 y E7 del VPH-16 son capaces de alterar mecanismos para escapar a la respuesta inmune, E6 interactúa con el regulador transcripcional positivo del factor 3 (IRF3) regulador del INF β el cual se activa en respuesta a la infección por el virus, E7 se une a IRF-1 y previene la activación del INF α y β (Ghittoni *et al.*, 2010).

La proteína E6 activa la telomerasa y cinasas SRC e inhibe p53 y BAK, en sinergia con la inducción de la inmortalización la proteína E7 estimula ciclinas A y E. E6

previene la apoptosis inducida por altos niveles de E2F, mientras E7 protege a E6 de la inhibición por p16. Estas oncoproteínas de los VPH-AR se unen a un gran número de proteínas celulares con mayor afinidad (Tabla 1) dando como resultado pérdida de sus funciones y en consecuencia continua replicación del material genético, seguido de daño al ADN e inestabilidad cromosomal (Boulet *et al.*, 2007; Ghittoni *et al.*, 2010).

Tabla 1.-Blancos celulares de las oncoproteínas E6 y E7 de los VPH-AR (Boulet *et al.*, 2007; Muñoz-Bello *et al.*, 2015).

Proteínas blanco de las oncoproteínas del VPH-AR	Efectos biológicos
Oncoproteína E6	
Bak, Bax, FADD, procaspasa 8	Efecto anti-apoptótico.
CBP/p300	Desregulación de transcripción dependiente de p53.
c-myc	Prevención de apoptosis inducida por myc. Incremento en la expresión del gen hTERT
E6AP	Desregulación de la transducción de señales inducidas en células en proliferación.
E6TP1	Inhibición de señalización mediada por Rap.
E6BP	Inhibición de diferenciación celular terminal. Efecto anti-apoptótico independiente de p53.
hDlg	Desregulación del ciclo celular. Pérdida de la diferenciación celular.
hScrib	Influencia en adhesión y polaridad celular. Disminución de transcripción de interferón β .
MAGI-1/2/3	Efecto antiapoptótico independiente de p53.
Mcm 7	Evita el punto de arresto en la fase G1 temprana
Paxilina	Disrupción de citoesqueleto de actina e interacciones con la matriz celular
p53	Desregulación del ciclo celular. Efecto anti-apoptótico.
XRCC1	Interferencia en la eficiencia de la reparación del ADN
BRCA 1	Activación de vía de señalización del receptor de estrógeno
Tyk 2	Incapacidad de activación de Tyc2 como consecuencia inhibición de señalización inducida por INF
NFX1-91	Degradación de NFX1-91 y activación de hTERT
Dv12	Estabilización de β -catenina y activación de señalización de Wnt
Proteína con dominio PDZ	Degradación de las proteínas con dominios PDZ, pérdida de la arquitectura celular y la polaridad
Oncoproteína E7	
Miembros de la familia AP1	Supresión de actividad transcripcional de IRF-1
c-myc	Aumento de transcripción inducida por c-myc
Complejos ciclina A y E	Activación de ciclinas A/E, regulación del ciclo celular
Cinasa histona H1	Interferencia en la transición G2/M del ciclo celular
IGFBP3	Efecto anti-apoptótico. Estimulación de la proliferación celular.
Mi2 β	Supresión de actividad transcripcional de IRF-1.
pRb	Liberación de E2F con posterior activación de genes de fase S
Proteínas pequeñas asociadas a pRb (p107/p130)	Desregulación del ciclo celular. Activación de genes para la progresión del ciclo celular.
p21 ^{CIP-1/WAF-1} , p27 ^{KIP-1}	Estimulación del crecimiento por desregulación del ciclo celular.
p48	Inhibición de vías de señalización del interferón.
Subunidad 4 ATPasa	Degradación de pRb vía proteosoma.
TBP	Interferencia con la iniciación de la transcripción.
PP2A	Inhibición de actividad catalítica PP2A
p27	Supresión de la función inhibidora del ciclo celular de p27,
IRF1	Dotando a la célula con propiedades invasivas
Mi2	Supresión de la función de transactivación de IRF1
p600	Unión a HDAC para promover la transcripción mediada por E2F2 Contribución al crecimiento libre de anclaje y transformación

II.2. Lesiones precursoras del Cáncer cervical

En el 2001 el sistema Bethesda establece una terminología para el diagnóstico de muestras citológicas de tejido cervical, clasificando las lesiones premalignas en lesiones escamosas intraepiteliales (LEI) de bajo grado (LEIBG) que equivale a la neoplasia intraepitelial cervical grado 1 (NIC 1), también conocida como displasia leve y las LEI alto grado (LEIAG) que incluye las NIC 2 y 3 lo que corresponde a Displasia moderada o severa y Carcinoma *in situ* respectivamente, cuyas características se detallan en la tabla 2 (Apgar *et al.*, 2003; Grases *et al.*, 2005). La evaluación de una paciente con sospecha de LEI requiere de acuerdo con consensos internacionales y de la misma Norma Oficial Mexicana (NOM-014-SSA2-1994), estudios de citología, colposcopia y biopsia, que pueden complementarse con biología molecular e inmunohistoquímica (De la Torre- Rendón 2008). Las LEIBG pueden ser causadas por los VPH-AR y bajo riesgo (VPH-BR). El concepto de que existe una serie de alteraciones histopatológicas continuas desde tejido normal, LEI de bajo y alto grado hasta el cáncer invasivo ha sido ampliamente aceptado por muchos años, sin embargo, el curso completo de células normales a transformadas no ha sido completamente entendido (Zhu *et al.*, 2009). Las NIC I pueden ser causadas por los tipos de VPH-AR y VPH-BR. Se ha estimado que el 20% progresan a NIC 2 y aproximadamente el 30% de estas lesiones progresará a la neoplasia más severa sin tratamiento. Se ha reportado un alto grado de regresión en estas lesiones (57%), un 32% persiste y solo un 1% progresa a carcinoma invasor. Dentro de las LEIAG aproximadamente el 40% progresan a cáncer. De este modo las LEI reflejan un proceso dinámico que puede progresar o persistir pero también regresar. Si se considera que en la mayor parte de las lesiones premalignas del cérvix uterino, cualquiera que sea su grado o cantidad de coilocitos, se ha demostrado por técnicas de biología molecular el genoma del VPH, entonces el diagnóstico preciso debe incluir la identificación del agente causal (VPH) mediante técnicas moleculares específicas, debido a que el diagnóstico etiológico (infección por VPH), con base en la morfología, tiene limitaciones. Cuando existe presencia de coilocitos, el diagnóstico es confiable mediante citología o biopsia; sin embargo, la ausencia de coilocitos no excluye la infección viral, como en las displasias severas o NIC de alto grado (Zehbe *et al.*, 2011). La clasificación incorrecta de estas lesiones

puede dar lugar a un sobre-tratamiento o evitar que se reciba el adecuado. Por lo que es necesario utilizar métodos para evaluar el grado de displasia y así predecir el riesgo de progresión (Doorbar, 2006; Baak *et al.*, 2006).

Tabla 2. Clasificación de las LEI de acuerdo al Sistema Bethesda 2001 y sus hallazgos cito e histológicos.

Sistema Bethesda 2001	Hallazgos citológicos	Hallazgos histológicos
Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LEIBG)	Alteración manifiesta en células superficiales o intermedias altas. Signos de inmadurez. Se conserva la diferenciación. Citoplasmas normales. Bordes nítidos. Citoplasmas ligeramente irregulares. Coloración eosinófila y cianófila. Núcleos grandes. Alteración de la relación N/C. Puede haber multinucleación. Hiper cromasia. Cromatina fina granular. Un nucléolo. Coilocitosis.	Incluye: -Displasia leve o NIC I: Hay maduración en los 2/3 superficiales del epitelio, atipias nucleares en el 1/3 basal. Mitosis anormales escasas. Frecuentemente coexiste con cambios coilocíticos propios del efecto citopático del VPH.
Lesión escamosa intraepitelial de alto grado (LEIAG)	Pérdida de cohesión., a veces disposición en fila india. Alteración en células intermedias y parabasales hasta en basales. Alteración de la maduración y diferenciación. Cianofilia. Citoplasma con bordes nítidos , ó escaso, poco diferenciado , cianófilo y vacuolizado ó ausente. Dentro de las características nucleares: Hipertrofia nuclear, puede haber multinucleación, alteración de la relación N/C, polimorfismo., hiper cromasia, cromatina gruesa, y nucléolos aparentes ó irregular con marcada alteración de la relación N/C, hiper cromasia, cromatina en grumo grueso ("sal y pimienta")y ausencia de nucléolos.	Incluye: -Displasia moderada ó NIC II: Hay maduración en las capas superficiales. Las atipias nucleares se encuentran a niveles más próximos a la superficie. Las mitosis se localizan en los dos tercios inferiores del espesor del epitelio y mitosis atípicas -Displasia severa ó NIC III y carcinoma <i>in situ</i> : Hay escasa maduración, las atipias nucleares se evidencian en todas las capas celulares. En displasia severa la cromatina nuclear es menos densa y hay mayor variación en la forma y tamaño de los núcleos. En carcinoma <i>in situ</i> los núcleos son ovoides, hiper cromáticos y su eje mayor se dispone perpendicularmente a la basal. Las mitosis se encuentran en todos los niveles, varían en cantidad y suelen observarse numerosas mitosis atípicas.

NIC: Neoplasia intraepitelial cervical, N/C. núcleo/citoplasma.

II.3 Estadios del Cáncer Cervical

El sistema de estadificación de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) es utilizado en todo el mundo para la toma de decisiones terapéuticas para el cáncer cervical (Tabla 3). Aunque los factores pronósticos, como el tamaño del tumor primario, la metástasis a los ganglios linfáticos pélvicos, la invasión del estroma y la invasión del espacio linfovascular se han correlacionado

con el resultado del paciente en muchos estudios, el tamaño tumoral es el único parámetro que define la estadificación FIGO (Lai *et al.*, 2013).

El tratamiento del cáncer de cérvix uterino depende del estadio clínico. El llamado "cáncer cervical en etapa temprana" (FIGO IA2, IB, IIA y IIB) suele tratarse con una histerectomía radical, denominada operación de Wertheim Meigs-, a una quimio-radioterapia o ambas. Una correcta estadificación y evaluación de los factores pronósticos es crucial, por lo que el sistema TNM de la American Joint Committee on Cancer (AJCC) ha sido integrado a los estadios aceptados por la FIGO. Estos métodos se basan en el examen físico de la pelvis y en estudios de diagnóstico por imágenes, ya que los ginecólogos tienen dificultades en la valoración del componente endomiocervical del tumor, la invasión parametrial, la evaluación de la pared lateral pélvica y de los ganglios linfáticos regionales y extrapélvicos (Álvarez *et al* 2012; van Gent *et al.*, 2016).

Tabla 3: Estadios del cáncer de cuello uterino de acuerdo a los criterios unificados de la AJCC y FIGO (Álvarez *et al.*, 2012)

Categoría TNM	Estadio FIGO	
TX		El tumor primario no puede evaluarse.
T0		No hay evidencia de tumor primario.
Tis*		Carcinoma <i>in situ</i> (carcinoma preinvasivo).
T1	I	Carcinoma cervical confinado al útero (la extensión al cuerpo no debe ser tenida en cuenta).
T1a**	IA	Carcinoma invasor diagnosticado sólo mediante microscopía. Invasión del estroma con una profundidad máxima de 5 mm y una extensión horizontal \leq a 7 mm. El compromiso del compartimento vascular, venoso o linfático no afecta la clasificación.
T1a1	IA1	Invasión estromal \leq 3 mm en profundidad y \leq 7 mm de extensión horizontal.
T1a2	IA2	Invasión estromal $>$ 3 mm y \leq 5 mm en profundidad, con una extensión horizontal \leq a 7 mm.
T1b	IB	Lesión clínicamente visible confinada al cuello uterino o lesión microscópica mayor que T1a/IA2.
T1b1	IB1	Lesión clínicamente visible \leq 4 cm en su mayor diámetro.
T1b2	IB2	Lesión clínicamente visible $>$ 4 cm en su mayor diámetro.
T2	II	Carcinoma cervical que invade más allá del útero, pero no compromete la pared pélvica o el tercio inferior de la vagina.
T2a	IIA	Tumor sin invasión de parametrios.
T2a1	IIA1	Lesión clínicamente visible \leq 4 cm en su mayor diámetro.
T2a2	IIA2	Lesión clínicamente visible $>$ 4 cm en su mayor diámetro.
T2b	IIB	Tumor con invasión de parametrios, sin llegar a la pared pelviana.
T3	III	Tumor que se extiende a la pared pélvica y/o compromete el tercio inferior de la vagina y/o causa hidronefrosis o alteración de la función renal.
T3a	IIIA	El tumor compromete el tercio inferior de la vagina, sin extensión a la pared pélvica.
T3b	IIIB	El tumor se extiende a la pared pélvica y/o causa hidronefrosis o alteración de la función renal.
T4	IVA	El tumor invade la mucosa de la vejiga o del recto y/o se extiende más allá de la pelvis (el edema buloso no es suficiente para clasificar un tumor como T4).

Tumor Primario (T)

* FIGO ya no considera el estadio 0 (Tis).

** Todas las lesiones visibles macroscópicamente, aun con invasión superficial, son consideradas como T1b/IB.

II.4. Identificación de candidatos a biomarcadores usando herramientas proteómicas en Cáncer Cérvico Uterino

El estudio proteómico es una herramienta útil en el estudio de cambios en la expresión de proteínas inherentes al proceso patofisiológico del desarrollo del cáncer, ya que actualmente se ha utilizado en el descubrimiento de candidatos biomarcadores y para dilucidar las vías de señalización que conducen al desarrollo de células cancerosas, lo cual permitiría la identificación de posibles blancos terapéuticos y el desarrollo de nuevas estrategias de prevención del cáncer (Hondermark *et al.*, 2001).

El término biomarcador de tumor, se ha usado para definir algún antígeno de superficie celular o proteína intracelular asociada al tumor, y es utilizado para entender los mecanismos de progresión al cáncer, influyendo en el desarrollo de los

métodos de detección, terapia y pronóstico. Un biomarcador ideal debería ser económico, fácil de evaluar en biofluidos o bioespecímenes, mostrar sensibilidad y especificidad del 100 % y ser detectado por tecnología automatizada de fácil manipulación. En casos de CaCU, se han evaluado diferentes biomarcadores dentro de los que se incluyen los factores de crecimiento y sus receptores (la familia del EGFR, TGF- β), de angiogénesis y linfangiogénesis (VEGF, miembros de la familia FGF, PECAM1/CD31, CD34, β 3-Integrina, catepsinas, MMPs), proteínas del ciclo celular (CDK 1,2,4 y 6, ciclinas A, B, D y E, p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, pRb, E2F, p21^{WAF1/CIP1}, P27^{Kip1}, P14^{ARF}, MDM2), de apoptosis y proteínas relacionadas (índice apoptótico, miembros de la familia Bcl2, inhibidores de proteínas apoptóticas), anomalías cromosomales (rearrreglos estructurales del cromosoma 1) aductos de ADN, marcadores epigenéticos (DNMT3b y algunos genes blanco, p73, cambios en la conformación de la cromatina, acetilación de histonas, metilación de genes y de islas CpG en regiones promotoras; metilación e hipermetilación en los genes APC, PTEN, GADD45G, MGMT, cadherinas, BRCA1, FANCF, HIC1, FHIT, RARb2), marcadores metabólicos (poliaminas, estrógenos, lípidos), marcadores de imágenes (tomografía computarizada, resonancia magnética, entre otras), activación de oncogenes RAS, mutaciones, sobreexpresión, rearrreglos y translocaciones en el gen MYC, sobre-expresión de COX-2 y proteínas del mantenimiento del minicromosoma; sin embargo, siguen evaluándose solos o en conjunto para encontrar el biomarcador eficaz (Kumar and Verma, 2006; Rodríguez-Pérez, 2008). Recientemente la detección proteómica ha sido empleada para el descubrimiento e identificación de marcadores en cáncer gástrico, de pulmón, ovario, vejiga y de mama. A nivel molecular, es posible identificar las mutaciones y los cambios en la expresión de genes de susceptibilidad, permitiendo establecer un diagnóstico, y pronóstico, así como la posible resistencia al tratamiento. El uso de la electroforesis en gel de poliacrilamida en 2 dimensiones (2-DE) ha sido usado para analizar la expresión de proteínas en estos tumores, debido a que permite analizar esta expresión cualitativa y cuantitativamente. El uso combinado de 2-DE y MALDI-TOF-MS se emplea para la identificación de proteínas específicas de cáncer y que puedan servir para entender el proceso de carcinogénesis, mejorar el

diagnóstico, la detección temprana, manejo y terapia personalizada (Zhu *et al.*, 2009). Empleando esta tecnología se han realizado estudios en CaCU, Choi *et al.*, en el 2005 en fracciones citoplasmáticas y nucleares de casos de carcinomas invasivos de células escamosas con la infección por VPH 16 y 18 identificó proteínas con expresión disminuida (proteína XRCC2 y XRCC3, fosfatasa Cdc25, proteína hipotética DJ845O24, CASP-14, proteína sigma 14-3-3 entre otras) y sobreexpresadas (PCNA, p50Cdc3, CHRAC, vimentina, proteína de unión a c-myc, Mdm 4, MCM 8 entre otras) en comparación con líneas celulares HaCaT, estos productos de oncogenes y protooncogenes están relacionados en la regulación del ciclo celular, estabilidad genómica, activación de telomerasa e inmortalización celular. En otro estudio en tejido cervical de CaCU, Fukushima *et al.*, en el 2011, encontraron 27 proteínas sobreexpresadas y 5 de ellas fueron identificadas como citoqueratina 19, HSP70, HSP 27, gliceraldehido-3- fosfato deshidrogenasa y transgelina-2. En el estudio realizado para la identificación de proteínas expresadas diferencialmente mediante análisis proteómico, en China, Zhu *et al.*, 2009 encontraron 55 proteínas con expresión diferencial de las cuales 24 mostraron expresión aumentada y 31 disminuida en cáncer cervical comparadas con tejido adyacente normal, además se confirmó la sobreexpresión de las proteínas tirosina cinasa 2, S100A9 y la proteína dedos de zinc 217, en el estudio de. El análisis proteómico se ha utilizado para la búsqueda de proteínas que permitan distinguir el grado de lesión identificándose 114 proteínas implicadas en procesos metabólicos, transducción de señales, procesos relacionados al ciclo celular y tráfico y transporte de proteínas en muestras de tejido de NIC 2 y NIC 3 (Uleberg *et al.*, 2011). Rader *et al.*, en el 2011 encontró 390 spots de proteínas expresadas diferencialmente al comparar tejido de CaCU y normal, las proteínas identificadas se ha reportado que participan en procesos alterados en el cáncer cervical tal como regulación del punto de control de G2-M y G1-S, señalización de p53 y la vía de señalización de HNRPA2B1. En el 2004, Fountoulakis *et al.*, analizó el proteoma de la línea celular HeLa, encontrando aproximadamente 3000 spots e identificó 1200 proteínas producto de 297 genes, algunas de sus funciones aún son desconocidas, algunas proteínas están asociadas a tumor, protooncogenes o estructuras relacionadas a la

proliferación, por ejemplo P42771 ha sido involucrado en el desarrollo de tumor en un amplio rango de tejidos, Q9Y230 es un factor esencial en la transformación oncogénica por c-Myc; P06730, P56537, P35232, P11802 se han asociado a varios carcinomas. Dentro del estudio del perfil proteómico de 6 líneas celulares, 2 de ellas positivas a la infección por VPH-18 (HeLa y CaLo), 2 positivas a VPH-16 (SiHa y Caski), y 2 negativas a la infección (ViBo y C-33A); usando la línea celular HaCaT, de queratinocitos inmortalizados como control Higareda-Almaraz *et al.*, en el 2011, identificando 66 proteínas consensus llamándolas núcleo central del cáncer cervical, por sus funciones estas proteínas se dividieron en 3 grupos: El primer grupo incluye proteínas relacionadas a la migración y metástasis (anexina 2, proteína disulfideisomerasa, vimentina, ezrin y vinculina,), en un segundo grupo proteínas relacionadas a la evasión de la apoptosis (GRP78, HSP71, HSP7C, HS90B y GRP75) y en un tercer grupo encontraron proteínas asociadas con el metabolismo central (gliceraldehido-3-fosfatasa deshidrogenasa, fosfoglicerato mutasa 1, enolasa y lactato deshidrogenasa B) y se sugiere que 14-3-3 ζ es un punto determinante en la proliferación o muerte celular. Lee *et al.*, en el 2005 realizó un estudio en células HaCaT para identificar proteínas que interaccionan con la oncoproteína E7, encontrando 28 spots de proteínas que son reguladas por E7, de estos actina y la proteína LEI mostraron expresión disminuida, mientras que la fosfoproteína 1 inducida por estrés, proteína 1 de unión a CD2, catalasa, proteína 1 del complejo T, proteína de unión a Ku70, HSP 60, ciclina E1 y piroxirredoxina 2 presentaron sobreexpresión; y 22 spots se encontraron interactuando con E7: proteínas parecidas a MG11, livin inhibidor de apoptosis, proteína serin cinasa c17, proteína de unión a CD2, ciclina E1, factor asociado a la proteína de unión a la caja TATA y cinasa 2 citidin uridina, por lo que probablemente E7 se encuentra regulando los factores relacionados a señalización celular, apoptosis y ciclo celular. En la búsqueda de candidatos a biomarcadores en muestras de células exfoliadas de cérvix se encuentra el estudio de Gu *et al.*, en el 2007 en extendidos de muestras de citología en base líquida, encontrando 1011 proteínas expresadas diferencialmente en LEIAG y negativas a lesión, las más predominantes en la LEIAG fueron nucleares y mitocondriales, aproximadamente 150 mostraron

sobreexpresión como las ribonucleoproteínas y 70 expresión disminuida entre estas varias proteínas de unión al citoesqueleto. Debido a que no existe un biomarcador eficaz, se origina la necesidad de buscar nuevos biomarcadores mediante la identificación de patrones de expresión de proteínas, que permitan realizar un diagnóstico oportuno y al mismo tiempo que sean evaluados en muestras obtenidas por medio de métodos poco invasivos (como la citología en base líquida). Por lo que en este estudio se identificaron las proteínas sobreexpresadas diferencialmente en cáncer cervical en presencia de la infección por el VPH-16 como Mimecan, Actin aortic smooth muscle y Lumican; y con expresión disminuida Keratin, type II cytoskeletal 5, Peroxiredoxin-1, alpha-enolase y 14-3-3 protein sigma, comparadas con el tejido de cérvix normal en mujeres del estado de Guerrero, México que podrían ser utilizadas como marcadores moleculares potenciales en la carcinogénesis cervical en presencia de la infección por VPH-AR y evaluar su importancia en el diagnóstico, predicción y progresión de las lesiones premalignas y estadios clínicos del carcinoma invasor del cérvix uterino, además de la recurrencia de la enfermedad o de posibles blancos terapéuticos.

III. CAPÍTULO I

Differential proteins among normal cervix cells and cervical cancer cells with HPV-16 infection, through mass spectrometry-based Proteomics (2D-DIGE) in women from Southern México

RESEARCH

Open Access



Differential proteins among normal cervix cells and cervical cancer cells with HPV-16 infection, through mass spectrometry-based Proteomics (2D-DIGE) in women from Southern México

Idanya Serafín-Higuera¹, Olga Lilia Garibay-Cerdenares², Berenice Illades-Aguilar², Eugenia Flores-Alfaro¹, Marco Antonio Jiménez-López³, Pavel Sierra-Martínez¹ and Luz del Carmen Alarcón-Romero^{1,4*}

Abstract

Background: Cervical cancer (CC) is the fourth most common cancer in women worldwide with an estimated 528,000 new cases in 2012. The same year México had an incidence of 13,960 and a mortality of 4769 cases. There are several diagnosis methods of CC; among the most frequent are the conventional Pap cytology (Pap), colposcopy, and visual inspection with acetic acid (VIA), histopathological examination, tests of imaging and detection of high-risk papilloma virus (HR-HPV) with molecular tests (PCR, hybridization, sequencing). Proteomics is a tool for the detection of new biomarkers that can be associated with clinical stage, histological type, prognosis, and/or response to treatment. In this study we performed a comparative analysis of CC cells with normal cervical cells. The proteomic analysis was carried out with the fluorescent two-dimensional electrophoresis (2D-DIGE) technique to subsequently identify differential protein profiles using Decyder Software, and the selected proteins were identified by Mass Spectrometry (MALDI-TOF).

Results: The proteins that showed an increased expression in cervical cancer in comparison with normal cervix cells were: Mimecan, Actin from aortic smooth muscle and Lumican. While Keratin, type II cytoskeletal 5, Peroxiredoxin-1 and 14-3-3 protein sigma showed a decrease in their protein expression level in cervical cancer in comparison with normal cervix cells.

Conclusions: Thus, this study was successful in identifying biomarker signatures for cervical cancer, and might provide new insights into the mechanism of CC progression.

Keywords: Cervical cancer, Human Papilloma Virus 16 (HPV-16), Proteomics, 2D DIGE, Mass spectrometry

Abbreviations: ECM, Extracellular matrix; FIGO, International Federation of Gynecology and Obstetrics; HR-HPV, High-risk papilloma virus; MALDI-TOF, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight; OGN, Osteoglycin; Prdxs, Peroxiredoxins; ROS, Reactive oxygen species; SCC, Squamous cell carcinoma; SIL, Squamous Intraepithelial Lesion; SLRP, Small leucine rich proteoglycan

* Correspondence: luzdelcarmen14@gmail.com; luzcarmen14@gmail.com

¹Laboratorio de Citopatología e Histoquímica, Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero, México

⁴Laboratorio de Investigación en Citopatología e Histoquímica, Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas Universidad Autónoma de Guerrero Avenida Lázaro Cárdenas, Ciudad Universitaria, Chilpancingo, Guerrero C.P. 39090, México

Full list of author information is available at the end of the article



© 2016 The Author(s). **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Cervical cancer is the fourth most common malignancy and accounts for 10–15 % of cancer-related deaths in women worldwide [1, 2]. Cervical cancer affects approximately six out of 100,000 women and accounts for approximately 275,000 deaths annually in developing countries, which corresponds to 88 % of cases worldwide [2, 3].

Human papillomavirus (HPV) is the main etiological agent of cervical cancer detected in 95 to 100 % of cases [4–6]. Although more than 150 variants of this virus exist, only certain genotypes, such as HPV 16, 18, 33, 45 and 58 are known as high-risk types (HR-HPV); low-risk HPV types (LR-HPV), mainly HPV 6 and 11, seldom cause genital tumors; however, they do cause condylomata acuminata (anogenital warts) [7]. Persistent HPV oncoprotein expression (E6/E7) in HPV infected epithelial basal cells deregulates cell division [8]. Overexpression of these viral genes causes the deregulation of cell proliferation, metabolism, apoptosis, differentiation and genomic instability, all of which may lead to consecutive stages of cervical cancer [9].

Current approaches for the prevention of cervical cancer relies mainly on the cytologic screening, known as the Pap test, often combined with the detection of high-risk human papillomaviruses (HR-HPVs) [10]. Patients with abnormal Paps undergo colposcopy with directed biopsies. If precursor lesions are identified, patients are treated by cryotherapy or loop electrosurgical excision procedure (LEEP). The treatment is effective in the prevention of cervical cancer; however, it is expensive, cumbersome, and dependent on very good infrastructure and well-trained personnel [11]. Nevertheless, the diagnosis may results in a poor outcome, which lies on the lack of valuable objective indicators for determining cervical chronic inflammation, reactive hyperplasia, and benign or malignant lesions [12].

Compared with conventional 2-DE, two-dimensional differential in-gel electrophoresis (2D-DIGE)-based quantitative

proteomics has several advantages, such as higher sensitivity, accuracy, and reproducibility, which facilitate spot-to-spot comparisons, precisely because of pre-labeling of protein samples with different fluorescent dyes (Cy3, and Cy5) prior to separation by 2-DE [13]. As a result, samples labeled with different dyes are separated in the same 2D gel; moreover, the same internal standard is used in all gels to avoid inter-gel variation [12, 14]. In the present study, a differential proteomic technique was applied for the comparative analysis of cervical cancer samples infected with HPV 16 and normal cervical tissue.

Results

To carry out a comparative analysis of cervical cancer/HPV-16 and normal samples without HPV, a proteomic analysis was done. Two groups of pooled samples were used. The first one consisted of six samples from women (average age of 50.7 years) diagnosed with HPV-16, by the INNOLIPA assay, and with histopathological staging of squamous cell carcinoma (SCC) of which four cases were stage IIB, one stage IB1 and one case stage IB2. The second group consisted of four pooled samples from women (mean age of 49.8 years) with normal cytology and colposcopy and negative for HPV infection. In Fig. 1 is observed the proliferation index of the cervical tissues by immunohistochemistry. Figure 2 shows the protein profile of each pooled sample, used as a reference pattern, allowing the visualization of more than 2204 spots that were resolved for each 2D gel analyzed. The samples were pooled in two groups and analyzed by triplicated and whose profiles showed technical reproducibility.

To compare samples, Decyder software (www.gelifesciences.com) was used, which is a platform that allows the qualitative and quantitative evaluation of spots profiles from fluorescent bidimensional electrophoresis gels (DIGE) (Fig. 3).

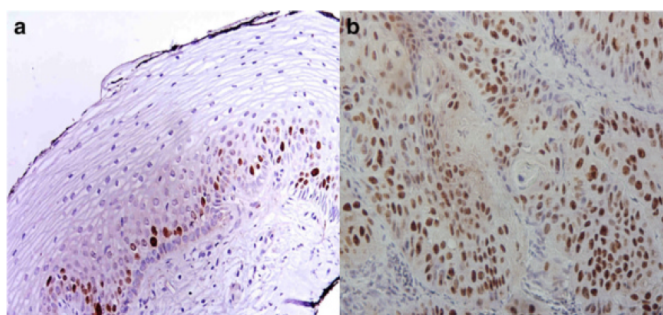
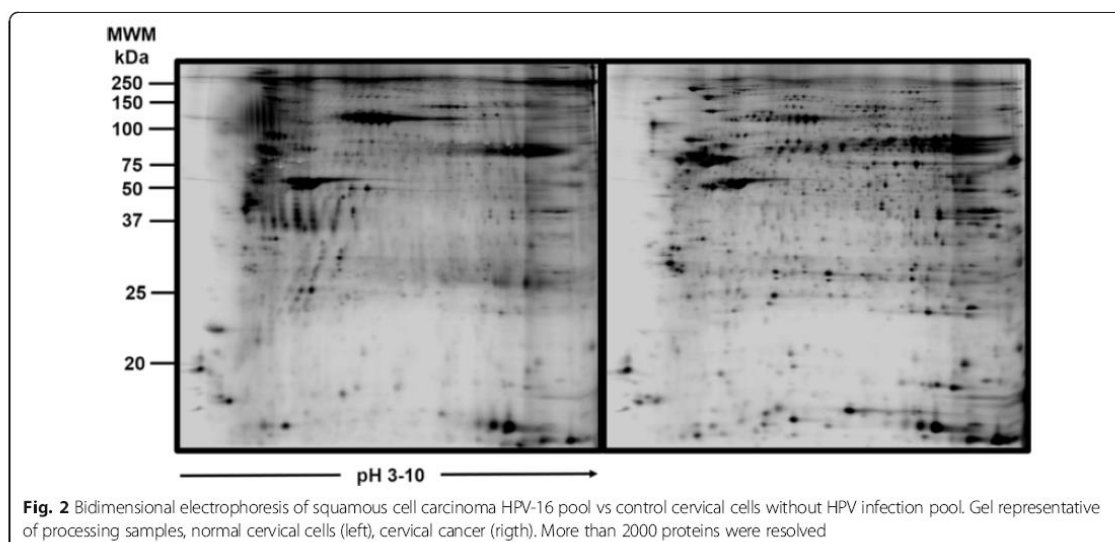


Fig. 1 Expression of Ki-67. **a** Without SIL and HPV infection tissue showing nuclear immunostaining was exclusively confined to the parabasal layers of normal epithelium **(b)** SCC and HPV-16 infection tissue showing strong immunostaining of Ki-67 in large pleomorphic nuclei of malignant squamous cells form irregular nests invading the stroma. 40 X Immunohistochemistry



The profile of proteins achieved under these conditions was reproducible among pools, the comparison showed different areas of differential expression (yellow spots). An area with a differential expression pattern among samples was located, from which 129 spots with a diminishing expression and 150 with increased

expression \pm 5 times, 53 spots showed a greater differential expression and the identification of the ten spots was achieved by Mass Spectrometry (MALDI-TOF). Figure 4 shows that Mimecan, Actin aortic smooth muscle and Lumican increased their expression in cervical cancer, in comparison with normal cervical cells, while Keratin, type II cytoskeletal 5, Peroxiredoxin-1 and 14-3-3 protein sigma showed a decrease in their protein expression pattern in cervical cancer in comparison with no SIL tissues.

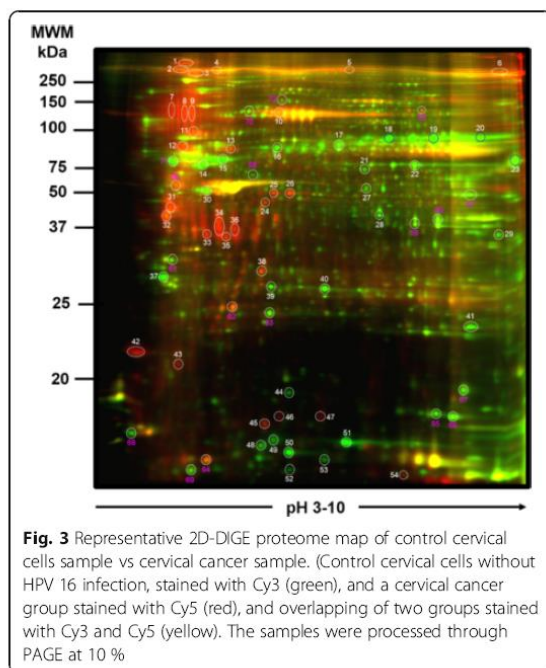
Table 1 shows the identification of proteins and some biochemical characteristics as name, identification code, and chromosomal localization among others.

Analyzing the participation of the identified proteins in different cellular pathways through Reactome Database (www.reactome.org), the results suggest biosynthesis, metabolism and degradation of keratan sulfate, transcriptional regulation by TP53, metabolism of carbohydrates, intrinsic pathway for apoptosis, detoxification of reactive oxygen species, and cell cycle as the most important.

Discussion

In 2012 the CC was the second cause of cancer death in Mexican women [15], HPV-16 has been reported in studies carried out by our group, as the more common in populations of women of the southern region of Mexico since 1997 [16, 17].

Multiple genes are involved in the occurrence and development of cancers, and even though genes carry the genetic information, proteins are the final executors of life events [1]. Due to this, the proteomic profiling offers



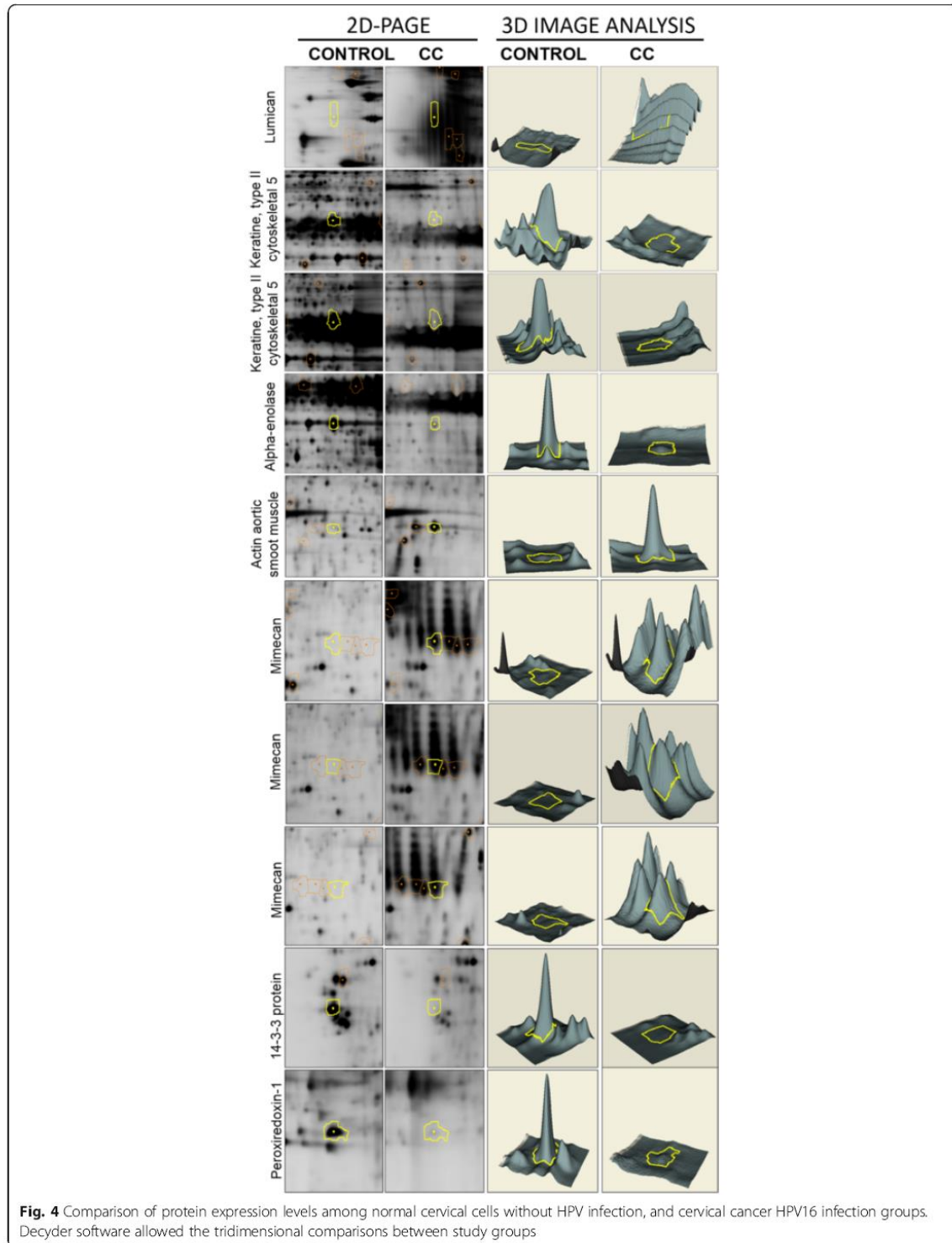


Table 1 Differential expression of proteins in SCC/HPV-16 against control (without SIL and HPV infection)

Protein	Expression index (n+/-)	Accession number	Chromosomal localization	Gene	Peptide coverage (%)	Score
Mimecan	38.85	MIME_HUMAN	9q22	OGN	46	956
Mimecan	31.23	MIME_HUMAN	9q22	OGN	54	820
Actin, aortic smooth muscle	19.14	ACTA_HUMAN	10q23.31	ACTA2	59	311
Mimecan	17.77	MIME_HUMAN	9q22	OGN	54	447
Lumican	16.52	LUM_HUMAN	12q21.33	LUM	40	556
Peroxiredoxin-1	-8.37	PRDX1_HUMAN	1p34.1	PRDX1	79	968
14-3-3 protein sigma	-14.97	1433S_HUMAN	1p36.11	SFN	67	977
Alpha-enolase	-17.38	ENOA_HUMAN	1p36.2	ENO1	71	976
Keratin, type II cytoskeletal 5	-39.7	K2C5_HUMAN	12q13.13	KRT5	52	885
Keratin, type II cytoskeletal 5	-65.34	K2C5_HUMAN	12q13.13	KRT5	52	1 090

an option for the selection of differential protein patterns whose expression levels could be associated with progression, prognosis and/or survival.

There have been several experimental approaches for the analysis of differential protein expression in cervical cancer, such as the analysis of tissues [12], cells [1], and even plasma samples [12]. In this study, cells that come from women with cervical cancer and infection with HPV-16 were compared with normal cells of the cervix recovered from individuals without HPV infection, diagnosed through INNOLIPA assay and *in situ* hybridization with tyramide amplification.

Bidimensional electrophoresis is a very useful tool to analyze broad and complex samples, through the wide distribution of protein profiles based on their isoelectric points and molecular weights. The additional use of fluorescence during this technique allows for an increase in sensitivity in 2D DIGE, and the use of special software facilitates the differential analysis. Finally, the use of MALDI-TOF MS, allowed the successful identification of ten differentially expressed proteins among the two different groups.

In the present study, the proteins identified were mimecan (osteoglycin), aortic smooth muscle, Lumican, Peroxiredoxin-1, 14-3-3 protein sigma, Alpha-enolase, Keratin, type II cytoskeletal 5, as differential proteins among cervical cancer and normal cervical cells, whose expression patterns were either increased or diminished. Mimecan (or Osteoglycin, OGN), is a secretory protein that belongs to a family of small leucine rich proteoglycan (SLRPs). It has been found in several cancer cell lines, although its physiological function has not been completely understood [18, 19], being abundant in bone matrix, cartilage cells, and connective tissues; it is also important for collagen fibrillogenesis, cellular growth, differentiation and migration [20] and it has been involved in the pathogenesis of different cancers such as colorectal [21], laryngeal carcinoma [19] and cervical cancer.

The actin cytoskeleton is substantially altered in cancer cells as a result of the changes in the abundance of proteins, among other factors. As a result, cancer cells acquire increased motility and distinctive mechanical properties, which are important for processes such as invasion and metastasis [22]. ACTA2 is a α -smooth muscle actin whose expression is transformation sensitive to growth signals in normal cells [23].

In cases of basal cell carcinoma skin cancer, it has been found with a high expression too, both in the tumor and in the adjacent stroma and it is used as a marker of aggressiveness in pancreatic cancer, because it is presenting more aggressive histological variants [24], suggesting that the increased expression may contribute to the local invasion. Its role in the biology of the tumor is not completely known, however, it has been hypothesized that increases in the cellular motility result in an increase in the cells capacity of invasion [25].

Lumican is a keratin sulphate belonging to the SLRP family of extracellular matrix (ECM) proteins and is expressed in different forms in several tissues and organs, such as cornea, bone, cartilage, artery, skin, kidney, and lung. It has been found to have a key role both in the organization of the extracellular matrix (ECM) and as an important modulator of biological functions in breast, lung, and pancreas cancer [26, 27], and it has been correlated with lung cancer progression as well [28].

The peroxiredoxins were identified primarily by their ability to protect the protein oxidative damage induced by free radicals, such as reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS), which is currently recognized as a promotor for cancer development [29]. The peroxiredoxins (Prdxs) are small proteins of sweep (scavenging) of H_2O_2 , that could prevent tumor development since the loss of Prdx1 in mice leads to premature death due to cancer [30].

Keratins are expressed in all types of epithelial cells (simple, stratified, keratinized and cornified), are important protectors of epithelial structural integrity under

conditions of stress, but have also been recognized as regulators of other cellular functions, including motility, signaling, growth and protein synthesis [31]. KRT5 Keratin, type II cytoskeletal 5 was found decreased in primary early-stage cervical squamous cell cancer tissue with pelvic lymph node metastasis (PLNM) vs without PLNM using DIGE-based proteomics [32].

Conclusion

Based on the above results, it was possible to identify differential protein patterns among cases of cervical lesions related to cervical cancer progression with HPV-16 infection in comparison with tissue without lesion and negative for HPV infection from Mexican women. These proteins could be analyzed as potential candidates for biomarkers due to their relationship with their presence in early stages of cervical cancer development, improving the understanding of viral pathogenesis and its role in the development of cervical cancer. Eventually this information could be used in the development of strategies in clinical management, diagnosis and treatment.

Methods

Study population

A cross-sectional study was conducted, which included two study groups, the first included a pool of 6 cases of cervical cancer with HPV-16 infection (cervical cancer/HPV-16) of which four cases were stage IIB, one stage IB1 and one case stage IB2 and the second group, which served as a comparison, consisted of a pool of four cases from surgical specimens extracted by fibroids without lesions related to cervical cancer and without HPV infection, and whose previous cytological study showed normal cells with reactive changes to nonspecific inflammatory processes, with normal colposcopy. All cases had antecedents cytological that were reported according to the Bethesda System 2001 and without coinfection by

Trichomonas vaginalis, *Candida sp*, *Actinomyces sp* and *Herpes simplex virus* [33].

The diagnosis and detection of HPV in each sample was performed as follows: three different sections of each biopsy were obtained. The first embedded in paraffin and were cut to a thickness of 3 μm (one stained with hematoxylin-eosin for histopathological diagnosis, another for detecting cell proliferation antigen Ki-67 and finally another slide for detection of DNA detection HPV by *in situ* hybridization with tyramide amplification). The second section was used for detection of HPV DNA by molecular analysis (INNOLiPA, Uniparts Innogenetics) and the third was used for protein extraction. These data allowed the formation of the two comparative groups (Table 2).

The cervical cancer tissues were obtained from the Instituto Estatal de Cancerología “Arturo Beltrán Ortega”, and normal cervix tissues from patients from the Hospital General “Dr. Jorge Soberón Acevedo”. The histopathological diagnosis was carried out by pathologists in each institution independently, according to each clinical record. Both groups contained women with no history of prior local treatment, chronic degenerative diseases, non-smoking and non-alcoholism history, and without coinfections corroborated by colposcopic, cytological and microbiological analyses. The diagnosis was reported in accordance with the system of the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) [34]. Ages in both groups were 37–69 years with a mean age of 50.7 years among cervical cancer patients and 49.8 among patients free-cervical. Women signed an informed consent and their data were analyzed in a confidential manner. This study was approved by the Committee of Bioethics at the Autonomous University of Guerrero, Mexico, according to the ethical guidelines of the Declaration of Helsinki 2008 [35].

Table 2 Characteristics of cervical tissues samples of comparatives groups CC/HPV-16 and control without SIL and HPV infection

Tests ^a	Pool CC/HPV-16	Pool without SIL and HPV infection (control)
Background	Cytological ^b study: Squamous cell carcinoma Colposcopic examination: cervical carcinoma Clinical diagnosis: 4 cases stage IIB, one stage IB1 and 1 case stage IB2	Cytological ^b study: normal cells with reactive changes to nonspecific inflammatory processes Normal colposcopy
Section 1 (paraffin embedding) - Histopathological diagnosis (H-E) - <i>in situ</i> hybridization with tyramide amplification - Immunohistochemistry for Ki-67	Squamous Cell Carcinoma Positive of HR- HPV Positive in large pleomorphic nuclei of malignant squamous cells form irregular nests invading the stroma	Negative Negative Positive in nuclei of parabasal cells in basal layer
Section 2 - INNO-LiPA extra (Genotyping of HVP)	HPV-16	Negative of HPV infection
Section 3 - Extraction of proteins for 2D- DIGE and MALDI-TOF	Increased expression in cervical cancer Mimecan, Actin from aortic smooth muscle and Lumican. Decreased expression: Keratin, type II cytoskeletal 5, Peroxiredoxin-1 and 14-3-3 protein sigma	

^aEach sample of tissue fragment into three sections and all tests were performed, six samples for group CC / HPV-16 and four samples were used for the control group. For more details see section Methods

^b Without coinfection by *Trichomonas vaginalis*, *Candida sp*, *Actinomyces sp*, *Herpes simplex virus* according to the Bethesda 2001 system

Immunohistochemistry for Ki-67

To evaluate the expression of Ki-67, the monoclonal antibody MIB-1 (Dako, Carpinteria, CA, USA) was used with the Cytoscan HRP/DAB immunohistochemical system of detection (Cell Marque Corporation, Hot Springs, AR, USA [now relocated to Rocklin, CA, USA]). The histological slices were deparaffinized and placed in a solution of immunodNA Retriever (BioSB, Inc., Santa Barbara, CA, USA). Later, the primary antibody, previously diluted in accordance with the manufacturer's instructions, was added; the chromogen diaminobenzidine was added; and finally, the specimens were stained with Mayer's hematoxylin (Merck, USA). The expression in the without SIL tissues was evaluated in accordance to the distribution and localization of the positive reaction within the cells and within the depth of the epithelium. The expression of Ki-67 was considered positive when a brown ochre color was evident in the nucleus of the cells. In SCC is observed in large pleomorphic nuclei of malignant squamous cell form irregular nests invading the stroma and tissue without SIL some cells of the parabasal layers were found (Fig. 1).

Detection and genotyping of HPV DNA by in situ hybridization with tyramide amplification and INNO-LiPA Extra

In the *in situ* hybridization with a system of tyramide signal amplification (Gen Point Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA), a drop of test reagent (biotinylated viral DNA) with probes for 13 HR-HPV genotypes (16,18,31,33,39,45,51,52,56,58,59 and 68) was added to each slide. The slide were denatured for 10 min and subjected to hybridization for 20 h (Hybridizer Dako, Carpinteria, CA, USA). For HVP-INNO-LIPA extra, the DNA extraction from cervical tissue samples the conventional TRIZOL method (Cat. No.15596018, Invitrogen a part of life Tech. Corp) was used, according to the manufacturer's instructions. Tissues were tested for the presence of the HPV genotypes by polymerase chain reaction (PCR), using the short PCR fragment 10 (SPF10) primers, a highly sensitive method for HPV DNA detection, according to the method of Pirog et al. [36].

Protein sample labeling with CyDye

CyDye DIGE fluors (Cy2, Cy3, and Cy5) were used to label the protein extracts following the manufacturer's protocol (GE Healthcare). The internal standard pool was generated by combining equal amounts of extracts from all samples, labeled with Cy2. Protein extracts from the normal and cervical cancer cells were labeled with Cy3 and Cy5, respectively. The labeling reaction was performed on ice for 30 min in darkness, and was then quenched with 10 mM lysine for 10 min on ice under

dark conditions. The labeled samples were then mixed and prepared for the following steps.

2-D electrophoresis in polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Total extracts from normal and cancer tissues were processed according to Klose protocol [37]. Briefly, samples were diluted in rehydration buffer containing 8 M urea, 0.5 % (w/v) CHAPS, 10 mM DTT, 0.001 % bromophenol blue, and Bio-Lyte 3–10 Ampholyte (0.2 %) (Bio-Rad, Cat. No.163-1113). The protein mixture was then applied to ReadyStrip™ IPG 7 cm strips, pH 3–10 (linear). Rehydrated strips were isoelectrically focused using a PROTEAN IEF cell System. To perform the second dimension analysis, the strips were processed by 10 % SDS-PAGE. Finally the 2D gels were stained with Coomassie staining. The IPG strips were balanced in a buffer consisting of 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 6 M urea and 30 % v/v glycerol, 2 % p/v SDS and traces of bromophenol blue, being carried out in two steps, using in each 5 ml of balanced solution per strip; in the first one, the strips were incubated in the balanced buffer described above with 1 % w/v of DTT, remaining in this solution for 20 min in agitation at room temperature. In the second step, 2.5 % w/v of iodoacetamide was added to the balanced buffer, repeating the 20 min incubation in agitation at room temperature; once the procedure was completed, the proteins could be picked for mass spectrometry analysis.

Image analysis

The images were analyzed using the DeCyder™ 2D Differential Analysis Software (DeCyder 2D V8.0) by differential in-gel analysis (DIA) and biological variation analysis (BVA). Protein spots were marked and selected with changes in abundance ratio >1.5-fold, *P* values <0.05 for protein identification. The gels were subjected to Coomassie blue staining for spot visualization and picking.

Protein identification by MALDI-TOF

Coomassie-stained 2D gels were scanned and digital images were compared using the Decyder Software. Each pool was run three times. The electrophoretic entities of interest were excised, alkylated, reduced, and digested up to obtain a peptide mass fingerprint. Peak lists of the tryptic peptide masses were generated using FlexAnalysis1.2vSD1 Patch 2 (Bruker Daltonics). The search engine MASCOT server 2.0 was used to compare the fingerprints against human taxonomy with the following parameters: one missed cleavage allowed, carbamidomethyl cysteine as the fixed modification and oxidation of methionine as the variable modification. Proteins with scores greater than 50 and a *p* < 0.05 were accepted.

Acknowledgments

We thank the strengthening program graduate high with file number: I010/455/2013 C-677/2013 of UAGro. Serafín-Higuera I was recipient of a Doctoral fellowship with file number 222252 from CONACYT, México. We are grateful to Vladimir Rodríguez-Sandoval, Pathologist of Hospital General "Jorge Soberón Acevedo" Iguala, Guerrero, México for help us in diagnosis support and to Dra Patricia Talamás-Rohana for manuscript review and comments.

Funding

This project was funded by Programa de Fortalecimiento Académico del Posgrado de Alta Calidad (I010/455/2013 C-677/2013). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Availability of data and materials

All data generated or analysed during this study are included in this published article.

Authors' contributions

The work presented here was carried out in collaboration between all authors. Conceived and designed the experiments: ISH, LCAR, BIA, PSM, MAJL. Performed the experiments: ISH, LCAR. Analyzed the data: ISH, LCAR, BIA, EFA, PSM, OLG. Contributed reagents/materials/analysis tools: ISH, LCAR, BIA, EFA, PSM, OLG, MAJL. Wrote the paper: ISH, OLG, LCAR. All authors read and approved the final manuscript.

Authors' information

Olga Lilia Garibay-Cerdenares: Professor of CONACYT.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

Informed consent was obtained from the patient for publication of this paper and this study was approved by the Committee of Bioethics at the Autonomous University of Guerrero, Mexico. Folio CB-002/16.

Author details

¹Laboratorio de Citopatología e Histoquímica, Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero, México. ²Laboratorio de Biomedicina Molecular, Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero, México. ³Instituto Estatal de Cancerología "Dr. Arturo Beltrán Ortega", Acapulco, Guerrero, México. ⁴Laboratorio de Investigación en Citopatología e Histoquímica, Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas Universidad Autónoma de Guerrero Avenida Lázaro Cárdenas, Ciudad Universitaria, Chilpancingo, Guerrero C.P. 39090, México.

Received: 19 December 2015 Accepted: 16 August 2016

Published online: 05 September 2016

References

- Zhao Q, He Y, Wang XL, Zhang YX, Wu YM. Differentially expressed proteins among normal cervix, cervical intraepithelial neoplasia and cervical squamous cell carcinoma. *Clin Transl Oncol*. 2015;17:620–31.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin*. 2015; 65:5–29.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. GLOBOCAN 2012 v1.1, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2014. <http://globocan.iarc.fr> accessed on 5 Sep 2015.
- Adam ML, Pini C, Túlio S, Cantalice JCLL, Torres RA, Correia MTDS. Assessment of the Association Between Micronuclei and the Degree of Uterine Lesions and Viral Load in Women with Human Papillomavirus. *Cancer Genomics Proteomics*. 2015;12:67–72.
- Cortés-Gutiérrez EJ, Dávila-Rodríguez MI, Vargas-Villarreal J, Hernández-Garza F, Cerda-Flores RM. Association between Human Papilloma Virus-type Infections with Micronuclei Frequencies. *Prague Med Rep*. 2010;111(1):35–41.
- Snijders PJF, Steenbergen RDM, Heideman DAM, Meijer CJLM. HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications. *J Pathol*. 2006;208: 152–64.
- Paavonen J. Human papillomavirus infection and the development of cervical cancer and related genital neoplasias. *Int J Infect Dis*. 2007; 11(Supplement 2):S3–9.
- Maglennon GA, McIntosh P, Doorbar J. Persistence of viral DNA in the epithelial basal layer suggests a model for papillomavirus latency following immune regression. *Virology*. 2011;414:153–63.
- Van Raemdonck GAA, Tjalma WAA, Coen EP, Depuydt CE, Van Ostade XWM. Identification of Protein Biomarkers for Cervical Cancer Using Human Cervicovaginal Fluid. *PLoS One*. 2014;9:e106488.
- Lynge E, Rygaard C, Baillet MV-P, Dugué P-A, Sander BB, Bondé J, Rebolj M. Cervical cancer screening at crossroads. *APMIS*. 2014;122:667–73.
- Kim HS. Correction: primary, secondary, and tertiary prevention of cervical cancer. *J Gynecol Oncol*. 2014;25:261.
- Guo X, Hao Y, Kamilijiang M, Hasimu A, Yuan J, Wu G, Reyimu H, Kadeer N, Abudula A. Potential predictive plasma biomarkers for cervical cancer by 2D-DIGE proteomics and Ingenuity Pathway Analysis. *Tumor Biol*. 2015;36: 1711–20.
- Maurya P, Meleady P, Dowling P, Clynes M. Proteomic approaches for serum biomarker discovery in cancer. *Anticancer Res*. 2007;27(3A):1247–55.
- Ortiz-Ortiz J, Alarcon-Romero L, Jimenez-Lopez M, Garzon-Barrientos V, Calleja-Macias I, Barrera-Saldana H, Leyva-Vazquez M, Illades-Aguiar B. Association of human papillomavirus 16 E6 variants with cervical carcinoma and precursor lesions in women from Southern Mexico. *Virology*. 2015;12:29.
- Illades-Aguiar B, Alarcón-Romero LC, Antonio-Vejar V, Zamudio-López N, Sales-Linares N, Flores-Alfaro E, Fernández-Tilapa G, Vences-Velázquez A, Muñoz-Valle J, Leyva-Vázquez M. Prevalence and distribution of human papillomavirus types in cervical cancer, squamous intraepithelial lesions, and with no intraepithelial lesions in women from Southern Mexico. *Gynecol Oncol*. 2010;117:291–6.
- Yinghong W, Yu M, Bingjian L, Enping X, Qiong H, Maode L. Differential expression of mimecan and thioredoxin domain-containing protein 5 in colorectal adenoma and cancer: A proteomic study. *Exp Biomed Biol*. 2007; 232:1152–9.
- Li L, Zhang Z, Wang C, Miao L, Zhang J, Wang J, Jiao B, Zhao S. Quantitative Proteomics Approach to Screening of Potential Diagnostic and Therapeutic Targets for Laryngeal Carcinoma. *PLoS One*. 2014;9:e90181.
- Zheng C, Zhao S, Wang P, Yu H, Wang C, Han B, Su B, Xiang Y, Li X, Li S, et al. Different expression of mimecan as a marker for differential diagnosis between NSCLC and SCL. *Oncol Rep*. 2009;22:1057–61.
- Wang Y, Ma Y, Lü B, Xu E, Huang Q, Lai M. Differential expression of mimecan and thioredoxin domain-containing protein 5 in colorectal adenoma and cancer: a proteomic study. *Exp Biol Med*. 2007;232:1152–9.
- Efremov YM, Dokrunova AA, Efremenko AV, Kirpichnikov MP, Shaitan KV, Sokolova OS. Distinct impact of targeted actin cytoskeleton reorganization on mechanical properties of normal and malignant cells. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1853:3117–25.
- Huang H-L, Yao H-S, Wang Y, Wang W-J, Hu Z-Q, Jin K-Z. Proteomic identification of tumor biomarkers associated with primary gallbladder cancer. *World J Gastroenterol*. 2014;20:5511–8.
- Sinn M, Denkert C, Strieler JK, Pelzer U, Stieler JM, Bahra M, Lohneis P, Dörken B, Oettle H, Riess H, Sinn BV. α -Smooth muscle actin expression and desmoplastic stromal reaction in pancreatic cancer: results from the CONKO-001 study. *Br J Cancer*. 2014;111:1917–23.
- Mercut R, Ciurea ME, Margaritescu C, Popescu SM, Craitoiu MM, Cotoiu OS, Voinescu DC. Expression of p53, D2-40 and α -smooth muscle actin in different histological subtypes of facial basal cell carcinoma. *Rom J Morphol Embryol*. 2014;55(2):263–72.
- Dolhnikoff M, Morin J, Roughley PJ, Ludwig MS. Expression of Lumican in Human Lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998;19:582–7.
- Nikitovic D, Papoutsidakis A, Karamanos NK, Tzanakakis GN. Lumican affects tumor cell functions, tumor-ECM interactions, angiogenesis and inflammatory response. *Matrix Biol*. 2014;35:206–14.

28. Cappellesso R, Millioni R, Arrigoni G, Simonato F, Caroccia B, Iori E, Guzzardo V, Ventura L, Tessari P, Fassina A. Lumican Is Overexpressed in Lung Adenocarcinoma Pleural Effusions. *PLoS One*. 2015;10:e0126458.
29. Rhee SG, Woo HA, Kil IS, Bae SH. Peroxiredoxin Functions as a Peroxidase and a Regulator and Sensor of Local Peroxides. *J Biol Chem*. 2012;287:4403–10.
30. Neumann CA, Fang Q. Are peroxiredoxins tumor suppressors? *Curr Opin Pharmacol*. 2007;7:375–80.
31. Karantz V. Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers. *Oncogene*. 2011;30(2):127–38.
32. Wang W, Jia H-L, Huang J-M, Liang Y-C, Tan H, Geng H-Z, et al. Identification of biomarkers for lymph node metastasis in early-stage cervical cancer by tissue-based proteomics. *Br J Cancer*. 2014;110:1748–58.
33. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright Jr T, Young N, Forum Group Members. Bethesda 2001 Workshop. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*. 2002;287:2114–9.
34. Benedet JL, Bender H, Jones III H, Ngan HYS, Pecorelli S. FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers. *Int J Gynecol Obstet*. 2000;70:209–62.
35. Williams JR. The Declaration of Helsinki and public health. *Bull World Health Organ*. 2008;86:650–2.
36. Pirog EC, Kleter B, Olgac S, Bobkiewicz P, Lindeman J, Quint WGV, et al. Prevalence of Human Papillomavirus DNA in Different Histological Subtypes of Cervical Adenocarcinoma. *Am J Pathol*. 2000;157:1055–62.
37. Klose J, Kobalz U. Two-dimensional electrophoresis of proteins: An updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis*. 1995;16:1034–59.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



IV. DISCUSIÓN

Actualmente los estudios epidemiológicos informan que se han identificado más de 200 distintos subtipos genéticos de VPH, de estos los tipos de VPH-AR, se han asociado con el desarrollo de más del 90% de los casos de cáncer cervical y en menor medida con otros cánceres anogenitales así como de cabeza y cuello (Junk *et al.*, 2015; Wakeham *et al.*, 2016) similar a los resultados encontrados en este estudio en el 100% de los casos de cáncer cervical se encontró presente la infección por el VPH-AR, siendo el más frecuente el VPH-16 individual o en coinfección por otro genotipo. Sin embargo esta frecuencia del VPH-16 fue mayor comparada con el 57% encontrada en casos de CC de mujeres que acudieron al Instituto Mexicano del Seguro Social en las áreas Metropolitana, Oriental, Occidental y Centro de México en el período 2006-2012 (Mauricio-Salcedo *et al.*, 2014). La infección por VPH-16 también ha sido la más frecuentemente reportada en China, Arabia Saudita e India (Srivastava *et al.*, 2014).

Los programas de tamizaje basados en la evaluación de la citología con la tinción de Papanicolaou han reducido la incidencia del cáncer cervical en los últimos 50 años (Schiffman *et al.*, 2011), sin embargo, de acuerdo a la encuesta Nacional de Salud realizada en el 2012 (ENSANUT) en Guerrero, solo el 38.4% de las mujeres de 20 años a más, se realizó una prueba de Papanicolaou para la detección oportuna, durante el año previo al levantamiento de la encuesta, encontrándose este porcentaje por debajo de la media nacional (Gutiérrez *et al.*, 2012), por lo que en países como Estados Unidos ya han sido aprobados los métodos moleculares por la FDA como prueba de cribado primario similar a la citología permiten la detección del VPH más rápida, precisa y específica, cuyos resultados han tenido un gran impacto en el tamizaje (Herrera- Piña-Sánchez, 2015).

La detección del riesgo de progresión a cáncer se ha dificultado debido a que generalmente las lesiones precursoras no presentan manifestaciones y afortunadamente se requieren años o décadas para el desarrollo de cáncer, lo que permite la detección por medio de la citología exfoliativa que tiene como ventaja su bajo costo y menor tiempo de realización. Por otro lado la citología en base líquida

tiene ventajas como mayor rapidez en la interpretación, menor cantidad de muestras insatisfactorias y la posibilidad de realizar el diagnóstico molecular de la misma muestra (Cuzick *et al.*, 2008). La desventaja que presenta estos estudios junto al diagnóstico histológico (que se considera el estándar de oro) es la subjetividad de la lectura, por lo que recientes estudios han demostrado que moléculas encontradas en el huésped podrían servir como biomarcadores representando una alternativa o un complemento a la citología y la detección del VPH por métodos moleculares (Michener *et al.*, 2002; de Freitas *et al.*, 2014).

El adecuado tratamiento y seguimiento de las mujeres depende de correcto diagnóstico, así los marcadores de tumor podrían permitir un diagnóstico temprano, predicción de la respuesta a la terapia y monitoreo de las lesiones (Dasari *et al.*, 2015), debido a esto actualmente existen estudios mediante el enfoque proteómico que se han basado en la búsqueda de nuevas proteínas alteradas en el cáncer cervical, probablemente por la presencia de las oncoproteínas del VPH-AR, en este estudio se logró la identificación de proteínas alteradas en cáncer cervical con infección por el VPH-16 de las cuales Mimecan, Actin aortic smooth muscle y Lumican se encontraron con expresión aumentada, y Peroxiredoxin-1, 14-3-3 protein, Alpha-enolase y Keratin type II cytoskeletal 5 con expresión disminuida. Estas proteínas podrían estar relacionadas en el proceso de carcinogénesis cervical y a la infección por este genotipo viral, la evaluación de su expresión podría utilizarse como posibles biomarcadores de diagnóstico y recurrencia o blancos terapéuticos.

Alteración de la expresión de las proteínas Mimecan, Actin aortic smooth muscle, Lumican, Peroxiredoxin-1, 14-3-3 protein, Alpha-enolase y Keratin type II cytoskeletal 5 en cáncer

Los proteoglicanos son macromoléculas compuestas de un núcleo proteico unido covalentemente cadenas laterales de glucosaminoglucanos, las córneas humanas están conformadas principalmente de los proteoglicanos dermatan y keratan sulfato (entre ellos Lumican y Mimecan, que en este estudio se encontraron con expresión

umentada), así como por pequeñas cantidades de heparán sulfato (Michelacci, 2003).

Mimecan (gen OGN), es una proteína secretora, que pertenece a una familia de pequeños proteoglicanos ricos en leucina (SLRPs). La expresión de OGN se ha encontrado ausente en varias líneas celulares de cáncer, aunque su función fisiológica no ha sido completamente entendida (Li *et al.*, 2014). Es esencial en la transparencia de la córnea y regulación del crecimiento celular en humanos (Tasheva and Conrad 2003), se ha encontrado involucrado en la patogénesis de la aterosclerosis, implicado en la regulación de la proliferación, apoptosis y migración de las células del musculo liso vascular (Zhang *et al.*, 2015). El gen de mimecan es regulado por los factores de transcripción USF-1, Oct-1, p53 e IRF-1 que son expresados de manera ubicua (Tasheva, 2002).

Lumican, una clase II de pequeños proteoglicanos ricos en leucina (SLRP) se ha encontrado tiene un papel clave tanto en la organización de la matriz extracelular (MCE); en tejidos en cáncer de mama, de páncreas, lumican se ha encontrado sobreexpresado (Naito *et al.*, 2002), sin embargo, su expresión es aún controversial debido a que se ha sugerido que presenta actividad anti-angiogénica dependiendo de las señales de su microambiente (Sharma *et al.*, 2013).

Se encuentra expresado en músculo esquelético, córnea humana, riñón, placenta, corazón, discos intervertebrales, vasos sanguíneos, útero, páncreas y en menor cantidad en hígado, cerebro y pulmón, no se expresa en queratinocitos normales (Takayama *et al.*, 2014); en cáncer de mama se ha encontrado el RNAm en fibroblastos adyacentes al tumor pero no en células cancerígenas (Naito *et al.*, 2005).

Lumican es capaz de facilitar la migración de queratocitos en ensayos de migración celular *in vitro*, regulando la adhesión celular, la migración y la proliferación y contribuyendo así a la cicatrización de las heridas epiteliales corneales. Después de una cirugía de cataratas, las células epiteliales del cristalino proliferan y sufren el proceso de transición epitelio mesenquima (EMT) en el tejido de la cicatriz (conformado por colágeno fibroso y lumican). Esta transición se caracteriza por la

expresión de la proteína α -smooth muscle actin (α -SMA) en células epiteliales del cristalino del ojo. Es posible que Lumican regula el proceso de la EMT debido a que en células epiteliales del cristalino del ratón nulo a la expresión de Lumican se encontró disminución de la expresión de α -SMA y retraso de la inducción de la EMT (Kao *et al.*, 2006).

Lumican tiene un papel importante debido a que mediante sus interacciones regula el desarrollo del tumor y la progresión. La mayoría de los reportes existentes tienden a asignar un papel antitumoral para lumican, sin embargo, los efectos de esta proteína son claramente dependientes de la correlación específica entre su abundancia, distribución y tipo / etapa de tumor.

El citoesqueleto de actina se modifica sustancialmente en células de cáncer a causa de los cambios en la abundancia de proteínas de unión a la actina abundancia, como consecuencia, las células de cáncer tienen la motilidad y propiedades mecánicas distintivas, que son importantes para procesos como la invasión y metástasis (Efremov *et al.*, 2015). ACTA2 es una α -actina del músculo liso, cuya expresión es sensible a las señales de crecimiento en las células normales, mutaciones en ACTA2 causa predisposición a una variedad de enfermedades vasculares, incluyendo aneurisma de la aorta torácica, enfermedad de la arteria coronaria de inicio temprano y accidente cerebrovascular (Huang *et al.*, 2014).

La expresión de la proteína α -SMA en este estudio se encontró con expresión aumentada, esta se ha utilizado para la detección de la diferenciación de miofibroblastos y está involucrada en la producción de fuerza contráctil. La regulación transcripcional del gen ACTA, implican factores estimulantes como inhibitorios, entre los activadores se encuentran el factor de respuesta a suero (SRF) y el factor-1 aumentador de la transcripción (TEF-1), los cuales se unen a la secuencia CC(A/T)6GG (CArG) y a CATTCT (MCAT) respectivamente; otros activadores importantes son Smad3 y su elemento de unión, el factor 5 parecido a Krüppel (KLF5) y los factores de especificidad 1 y 3 (Sp 1 y Sp3) que se unen a elementos de control proximal TGF β y activados en la diferenciación inducida por TGF β 1; elementos río arriba incluyen la región de hipersensibilidad TGF β y un

elemento de unión a Smad, los cuales son activados respectivamente por Sp1/Sp3 y Smad3, otros factores de transcripción adicionales reportados son la proteína de unión al aumentador CCAAT, CSL y c-Myb. Entre los factores que disminuyen la expresión de α -SMA y por tanto suprimen la activación de la diferenciación de miofibroblastos, se encuentra KLF4 el cual puede competir con sus activadores para unirse a elementos de control de TGF β e interactuar con el dominio de homología Mad (MH2) de Smad3 evitando su unión al promotor de ACTA, otros represores reportados son Nkx2.5, receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR) y la proteína de unión a la caja Y. La activación independiente del promotor puede involucrar proteína activada por mitógenos (MAP) cinasas, la interacción de CSL con el elemento de unión en el promotor de ACTA en la vía de señalización Notch implicada en la transición endotelio a mesénquima y diferenciación de miofibroblastos en pulmón, la inducción de Jagged1, un ligando de Notch1, que promueve la activación de esta vía con la activación subsecuente de la transcripción de ACTA (Hinz *et al.*, 2012).

La progresión maligna afecta la integridad de la membrana basal, lo que resulta en el deterioro de su estructura organizada, las células tumorales invasivas pierden sus características epiteliales y adquieren fenotipo metastásico, durante esta transición de epitelio normal a carcinoma invasivo específicamente los fibroblastos asociados al cáncer (CAF) dentro del estroma reactivo, expresan cantidades elevadas de proteínas de la matriz extracelular (MEC) como Actin aortic smooth muscle y proteasas. Durante este proceso, las nuevas proteínas de la MEC sintetizadas sirven como un andamio para que las células tumorales se muevan, así como proporcionando soporte estructural para la angiogénesis (Fullár *et al.*, 2015). Sin embargo el microambiente tumoral es una población heterogénea de células de soporte reclutadas por células cancerosas que promueven eventos tales como angiogénesis, proliferación, invasión y metástasis tumoral, además son capaces de regular algunos mecanismos de resistencia terapéutica. Las células estromales reclutadas varían en el tipo e incluyen células mesenquimales, células endoteliales, células inmunes, adipocitos y fibroblastos, en médula ósea; en tejido conectivo, fibroblastos y células mesenquimales; adipocitos en tejido adiposo, pericitos y

células endoteliales en vasos sanguíneos. Durante la cicatrización normal de heridas y en procesos inflamatorios, las células estromales locales cambian su fenotipo para convertirse en estroma reactivo, pero bajo ciertas condiciones, las células tumorales pueden activar células estromales asociadas con tumores (TASCs). Estas TASCs expresan elevados niveles de proteínas como α -SMA comparado con células no reactivas. Existe evidencia de que las células de cáncer también poseen la capacidad de transdiferenciarse en células parecidas a las estromales, que permite la progresión tumoral o bien pueden tener la capacidad de transdiferenciarse de células estromales a otro tipo estromal, actualmente se han identificado al menos cinco subtipos de fibroblastos asociados a tumores que se distinguen por marcadores específicos durante el curso de la progresión tumoral: el tipo *MSC-like* es el menos agresivo, *endoteliales-like*, *Miofibroblastos-like* (expresa α -SMA), *Pericito-like* y el subtipo más agresivo *Matrix-remodeling* que presenta expresión disminuida de α -SMA (Bussard *et al.*, 2016).

Existe evidencia de la relación del aumento de la expresión de α -SMA y metástasis mediada por EMT, en un estudio en células HeLa y SiHa, encontraron que la hipoxia indujo cambios morfológicos de tipo mesenquimal de estas células. Mediante la activación del gen de respuesta a hipoxia, lisil oxidasa (LOX) se induce la transición de células epiteliales (con morfología polar, adhesión celular bien desarrollada, expresión de E-caderina e inhibición por contacto) en células móviles mesenquimales con fenotipo fibroblástico y expresión aumentada de α -SMA, vimentina, metoloproteinasas 2 y 9, así como disminución de E-caderina. La migración e invasión celular es un proceso complejo sin embargo, hacen falta más estudios que permitan comprender como los VPH-AR realizan la activación de marcadores mesenquimales como α -SMA, en condiciones como la hipoxia (Yang *et al.*, 2013).

El miR-21 es un regulador positivo de α -SMA, debido a que inhibe la expresión de Smad7, un regulador negativo de su gen. En las líneas celulares CaSki positivas a la infección por VPH-16 y en HeLa positivas a VPH-18, se ha encontrado relación entre el aumento de la expresión miR-21 y de α -SMA (Bumrunghai *et al.*, 2015). En

células HeLa mediante la transfección de vectores de expresión de E7 del VPH-16, se ha demostrado que esta oncoproteína es capaz de aumentar el crecimiento celular y potenciar la proliferación e invasión a través de la regulación positiva de miR-21 (Kong *et al.*, 2015). En células Cx transfectadas con E6/E7 del VPH-16 (CxWJ) y tratadas con FGF2 y 4 se encontró una sobreexpresión de α -SMA y vimentina así como una disminución de la expresión de E-caderina (Cheng *et al.*, 2012). Recientemente se evaluó la expresión de α -SMA, comparando 29 casos de cáncer cervical (carcinoma de células escamosas, IIA, IB y IIB, con infección por VPH-16 y un caso con coinfección con VPH-18) y 27 de cérvix normal, encontrándose remodelamiento de la matriz extracelular por fibroblastos asociados a tumor y un aumento en la expresión de esta proteína de 5.2 veces en el estroma intersticial determinado mediante densitometría, indicando que una función importante en la activación de fibroblastos (Fullar *et al.*, 2015). Por lo que es probable que en nuestro estudio la sobreexpresión de α -SMA esté relacionada directamente con la regulación de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH-16, en el proceso de EMT, implicado en la metástasis e invasión del cáncer cervical.

Por otro lado, en la epidermis humana la expresión de 14-3-3 σ aumenta gradualmente durante la diferenciación de queratinocitos, la supresión de su expresión anula la diferenciación terminal e inmortaliza los queratinocitos primarios humanos en cultivo celular (Winter *et al.*, 2016). Los niveles de 14-3-3 se han encontrado disminuidos o ausentes debido a la metilación de su promotor; al unirse con Cdks y p53 participa en el punto de control G2 / M en casos de cáncer de mama, gástrico y otros (Dougherty and Morrison, 2004). Esta proteína es inducida por daño al ADN y es necesaria para la detención del ciclo celular en las células epiteliales que en este estudio se encontró su expresión se encontró disminuida, su gen está regulado directamente por p53 y es silenciado por la metilación de CpG en una gran proporción de carcinomas, la pérdida de la expresión de 14-3-3 σ sensibiliza a las células tumorales al tratamiento con fármacos citostáticos convencionales por lo que su regulación podría tener un enfoque terapéutico (Hermeking, 2003; Hermenkin and Benzinger, 2006).

Se ha demostrado que la inactivación de 14-3-3 sigma, en diversos cánceres se produce principalmente por hipermetilación epigenética, no por modificación genética (Sano et al., 2004). Para evaluar si la regulación de 14-3-3 σ (stratifin) está relacionada con el VPH-AR se analizó su expresión mediante inmunohistoquímica en casos de NIC I, II y, II y carcinoma de células escamosas, encontrándose que la expresión de 14-3-3 σ aumentó en relación al grado de lesión y a la presencia del VPH-AR determinado por captura de híbridos (CH2) (Syrjänen *et al.*, 2010). La disminución de la expresión de la proteína supresora de tumor 14-3-3 sigma, en carcinoma de células escamosas se ha hipotetizado se debe a la regulación directa de su gen por las oncoproteínas E6 y E7, debido a que su expresión es inducida en respuesta al daño al ADN y de manera dependiente de p53 (Merkley *et al.*, 2009). La disminución de la expresión de 14-3-3 σ no se ha encontrado asociado a la expresión de la proteína p53 en un estudio en casos de cáncer de vulva, ovario, de vejiga, próstata, endometrio, mama y tumores neuroendocrinos pulmonares, estos indicando que la disminución de la expresión de 14-3-3 σ puede ser regulada por otros factores independientes de p53 (Wang *et al.*, 2008). En este estudio encontramos disminución de la expresión de 14-3-3 σ en casos de CCE cervical por lo que hipotetizamos que esta disminución es mediada principalmente por la oncoproteína E7 del VPH-16 a través de su unión a su activador p53 y de esta manera alterando el control del ciclo celular y aumentando la inestabilidad genómica en las células de cáncer.

La pérdida de la proteína 14-3-3s ocurre no sólo dentro de los propios tumores, sino también en el tejido circundante pre-displásico (la denominada cancerización de campo), lo que indica que 14-3-3s podría tener una importante función supresora de tumores que se pierde en el proceso de evolución tumoral (Wilker *et al.*, 2007).

La proteína α -enolase (Eno1) Es una enzima glicolítica que cataliza la deshidratación del 2-fosfoglicerato al fosfoenolpiruvato, en los últimos pasos de la vía glicolítica catabólica. Es una metaloenzima que requiere que el ion metálico magnesio (Mg²⁺) para que sea catalíticamente activo, su secuencia es altamente conservada. En los vertebrados, esta enzima se encuentra en casi todos los tejidos

humanos, mientras que la β -enolasa (Eno3) se encuentra predominantemente en los tejidos musculares, y γ -enolasa (Eno2) sólo se encuentra en las neuronas y los tejidos neuroendocrinos. La traducción de ARNm α -enolasa se ha encontrado significativamente incrementada durante el crecimiento celular y prácticamente indetectable durante fases quiescentes (Díaz-Ramos *et al.*, 2012). El gen ENO1 se localiza en la región cromosómica 1p36.3-1p36.2. Este gen codifica un producto traducido alternativamente, además de la proteína ENO1, iniciando la traducción en el residuo Met-97 codificado en el exón 5. Este producto se identifica como proteína 1 de unión al promotor c-myc (MBP-1) uniéndose al promotor P2 c-myc. La forma de ENO1 de 48 kDa tiene actividad enzimática y está localizada en el citoplasma o tanto en el citoplasma como en el núcleo, mientras que la forma de 37 kDa más corta (MBP-1), que carece de los primeros 96 residuos de aminoácidos, es preferentemente localizada en los núcleos celulares. Ambas proteínas funcionan como reguladores negativos para la expresión de c-myc (Ito *et al.*, 2007).

La proteína ENO1 está implicada en el estrés celular, las infecciones bacterianas, fúngicas y parasitarias, en la actividad de autoantígenos, la aparición y metástasis de cáncer, y, el crecimiento, desarrollo y reproducción de organismos. También se ha descrito como un factor neurotrófico, como proteína de choque térmico (HSP48) y de estrés hipóxico. Tiene la capacidad de interactuar con otras moléculas nucleares, citoplásmicas o de membrana, directamente con otras isoformas de enolasa (α , β y γ) para formar dímeros enzimáticamente activos, otras enzimas glicolíticas como piruvato quinasa, fosfoglicerato mutasa y aldolasa, también puede unirse a las proteínas de la red de los microtúbulos, como F-actina y tubulina; y en la superficie celular interactúa con proteínas de la membrana, plasminógeno y plasmina, en diferentes tipos celulares, incluyendo células de carcinoma actuando como receptor del plasminógeno promoviendo el metabolismo celular en condiciones anaerobias, conduciendo la invasión tumoral y degradación de la matriz extracelular (Díaz-Ramos *et al.*, 2012; Ji *et al.*, 2016).

La proteína α -enolasa se ha detectado en la superficie de células hematopoyéticas como en monocitos, células T y células B, células neuronales y células endoteliales

con receptor fuerte de plasminógeno, modulando la actividad fibrinolítica pericelular (Díaz-Ramos *et al.*, 2012); en cáncer de pulmón se encontró en la membrana celular promoviendo la degradación de la matriz extracelular y la invasión de las células cancerosas, y se ha considerado como un blanco terapéutico para suprimir la metástasis tumoral; de manera similar se encontró sobre-expresada en queratinocitos transfectados con vectores retrovirales que expresan E6, E7 del VPH 16 (Merkley *et al.*, 2009), sin embargo en el estudio proteómico de Bae y colaboradores en casos de carcinoma de células escamosas de cérvix se encontró disminuida, similar a los hallazgos en este estudio (Bae *et al.*, 2007; Hsiao *et al.*, 2013).

Durante la formación del tumor y la expansión, las células tumorales deben aumentar el metabolismo de la glucosa. La hipoxia es característica común de los tumores sólidos, por lo que la sobreexpresión de los genes glicolíticos se ha encontrado en una gran cantidad de cánceres humanos. En las células tumorales, α -enolasa es sobre-expresada como coadyuvante de la proliferación anaeróbica (efecto Warburg), y expresándose en la superficie celular, donde promueve la invasión del cáncer. Por lo tanto, parece que la α -enolasa está desempeñando un papel pleitrópico en la progresión de las células cancerosas. Además, se ha demostrado que se encuentra sobre-expresada en adenocarcinoma ductal pancreático, donde sufre una serie de modificaciones postraduccionales, como acetilación, metilación y fosforilación, se considera que la expresión así como las modificaciones postraduccionales podrían ser de valor diagnóstico y pronóstico en el cáncer, todas estas diferencias en su expresión sugieren que la α -enolasa podría ser parte de un grupo de sensores celulares universales que responden a múltiples estímulos diferentes (Díaz-Ramos *et al.*, 2012).

Las modificaciones postraduccionales (PTM) de ENOA (acetilación, metilación y fosforilación) son más frecuentes en células tumorales que en tejidos normales, lo que indica que muchas PTM están asociados con el desarrollo del cáncer y algunos son específicos para cada tipo de tejido o cáncer. Esto puede reflejar la activación específica de las vías de señalización pro-mitogénicas en las células tumorales. En

muchos casos, las PTMs regulan la estabilidad y las funciones de las proteínas; por ejemplo, en las enzimas metabólicas, la acetilación actúa como un mecanismo de interruptor de encendido / apagado, mientras que la metilación en cadenas laterales carboxilato aumenta la hidrofobicidad por el aumento de la afinidad de las proteínas de los fosfolípidos, se especula que las PTM son mecanismos importantes en la regulación de las funciones de ENOA, localización e inmunogenicidad. Se ha encontrado acetilación de α -enolasa en cáncer de cuello uterino, de colon, leucemia, conductos pancreáticos normales y células pancreáticas tumorales, catorce residuos de lisina en la leucemia, el cáncer de páncreas y el páncreas normal, y solo un residuo acetilado en tumores del cuello uterino. La fosforilación es el PTM que muestra el patrón más específico en cada línea celular, dos residuos de serina y una treonina se encontraron específicamente en el cáncer de cuello uterino, una treonina y una serina en el riñón embrionario, tres serinas y dos treoninas en la leucemia (Capello *et al.*, 2010).

En un estudio para evaluar los niveles de expresión de α -enolasa en casos de carcinoma de células escamosas y tejido epitelial adyacente normal oral, se encontraron 3 niveles de expresión: nuclear, citoplasmática y nuclear-citoplasmática. En células del carcinoma de células escamosas (CCE), se encontró en el citoplasma de células del parénquima, al igual que en las células basales del epitelio normal, que puede correlacionarse con la función glicolítica requerida para la proliferación y diferenciación celular durante la renovación del epitelio oral, la expresión de MBP-1 se encontró generalmente en el núcleo en los dos tipos de tejido principalmente en casos de carcinoma por lo que la regulación negativa de MBP-1 en la activación de c-Myc puede resultar en la transformación maligna del epitelio oral. No se detectaron señales por inmunotinción para la proteína c-Myc en CCE oral a diferencia de la expresión en tejido normal (Ito *et al.*, 2007), por lo que al encontrar la disminución de α -enolasa en casos de CCE cervicales, hipotetizamos que en este estudio podría suceder este tipo de regulación.

Las peroxiredoxinas (Prdxs) se identificaron principalmente por su capacidad de proteger a las proteínas de daño oxidativo inducido por radicales libres, como

especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS), que actualmente se reconoce promueven el desarrollo del cáncer (Rhee *et al.*, 2011), son enzimas basadas en cisteína que no requieren cofactores especiales para su actividad, se encuentran íntimamente ligadas a la regulación de los procesos de señalización. El H₂O₂ es un segundo mensajero en muchos procesos de señalización incluyendo la señalización del factor de crecimiento, angiogénesis, receptor tipo Toll y la señalización de citoquinas. Los complejos activados de NADPH oxidasa (Nox) son la fuente predominante del H₂O₂ relacionado con la señalización, es producido directamente (por ejemplo, por Nox4 y DUOXs) o a través de la dismutación del superóxido producido inicialmente. En la señalización del factor de crecimiento, el H₂O₂ generado por Nox aumenta los niveles de las formas activas de fosfotirosina de los receptores u otras proteínas de señalización, al menos en parte inhibiendo tirosina fosfatasas. La oxidación de Cys en el sitio activo de fosfatasa es reversible, permitiendo que los tioles de Cys activos reducidos se reformen y actúen para "frenar" cascadas de fosforilación mediadas por cinasas (Perkins *et al.*, 2015).

Las peroxirredoxinas son pequeñas proteínas de barrido (scavenging) del H₂O₂, por lo que podrían prevenir el desarrollo tumoral ya que la pérdida de Prdx1 en ratones conduce a muerte prematura por cáncer (Neumann and Fang, 2007), se ha sugerido se debe a la interacción con PTEN previniéndolo de la inactivación inducida por la oxidación (Cao *et al.*, 2009). En nuestro estudio la expresión de Prdx1 se encontró disminuida en casos de SSC en comparación de tejido cervical sin lesión sin embargo, las funciones de Prdx1 son complejas, actuando como un sensor redox y transductor, siendo muy probable que el papel de Prdx1 varíe con el tipo de célula, el estímulo y otros factores. También se ha demostrado que actúa como una chaperona molecular con la capacidad de modular las acciones de numerosas moléculas, un regulador de la transcripción, o como un inmunomodulador, PRDX1 participa en la regulación redox de las células y reduce los peróxidos con equivalentes reductores proporcionados a través de la Trx, compuesto por NADPH, Trx y TrxR, formando el sistema Trx con PRDXs. El gen PRDX1 está mapeado en el cromosoma 1p34.1 y es un miembro de la familia peroxiredoxina que contiene un

sitio consenso (Thr (90)-Pro-Lys-Lys) para la fosforilación por quinasas dependientes de ciclina. Se fosforila en Thr-90 durante la fase M, lo que conduce a una disminución de más del 80% de la actividad enzimática a través del sistema Trx, su función se encuentra muy relacionada con otros tipos de Prdxs, PRDX2 se localiza en el citosol y se encarga del barrido de ROS en el citosol, bloquea a Bax que se encarga de regular la muerte celular por la inhibición de la apoptosis celular. PRDX3 se localiza en la mitocondria y reduce el nivel de H₂O₂ y protege a las células de los daños oxidativos. PRDX4 posee un péptido señal hidrofóbico N-terminal que conduce a su secreción de células y localización predominante en el retículo endoplásmico. PRDX5 reduce de manera similar reduce el H₂O₂ e hidroperóxidos de alquilo actuando como antioxidante en diferentes tejidos en condiciones normales y procesos inflamatorios a través del sistema Trx en los peroxisomas. PRDX6 implicado en la regulación redox de la célula puede reducir el H₂O₂ y la cadena corta de ácidos orgánicos, ácidos grasos e hidroperóxidos de fosfolípidos. PRDX6 desempeña un papel en la regulación de la rotación de fosfolípidos, así como en la protección contra lesiones oxidativas. (Park *et al.*, 2016)

La función de Prdx 1 en cáncer aún es controversial sin embargo, se considera que tiene un papel dual, en primer lugar, el efecto antitumoral de PRDX1 está bien establecido en los cánceres de mama. Varias evidencias sugieren que PRDX1 puede actuar como un supresor de tumores al interactuar con el oncogén c-Myc y suprimir su actividad transcripcional, así como proteger la función supresora del tumor de la fosfatasa PTEN, probablemente debido a la presencia de una cisteína sensible a ROS en el dominio catalítico. Por otro lado se ha encontrado un efecto promotor en cáncer de mama, carcinoma de células escamosas oral, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células escamosas esofágico y cáncer de páncreas. Estudios recientes han demostrado que la sobreexpresión del ARNm de PRDX1 en el carcinoma de mama humano se asocia con mayor grado tumoral y alta expresión de la proteína PRDX1 citoplásmica se correlacionó con un mayor riesgo de recurrencia local después de la radioterapia. PRDX1 aumenta la expresión del gen de la ciclooxigenasa (COX) - 2 mediada por p65 en células de cáncer de mama humano deficientes en receptores

de estrógenos (RE) (MDA-MB-231) y la reducción de PRDX1 puede atenuar la expresión de COX-2 reduciendo la transactivación de NF- κ B en células de cáncer de mama deficientes RE (Park *et al.*, 2016).

Es probable que la Peroxiredoxin 1 en este estudio tenga un papel como supresora de tumor, otros hallazgos parecen apoyar esta hipótesis, como el estudio de la expresión de Prx I que se evaluó mediante inmunohistoquímica en 49 casos de tejido de cérvix (12 de tejido normal, 9 de LEIBG, 8 de LEIAG y 20 de cáncer cervical). Los tejidos normales fueron negativos o moderadamente positivos para mientras que en las lesiones los niveles de expresión de Prx I fueron negativos o débilmente positivos. En cáncer cervical, el 60% fueron sólo débilmente positivo (Kim *et al.*, 2009), otro estudio sugiere Prdx1 tiene un papel importante en la quimioterapia coadyuvante, en células HeLa se eliminó la expresión de Prxd1 provocando acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la activación de la proteína quinasa activada por mitógeno dando como resultado una respuesta aumentada a la β -lapachona (Zhang *et al.*, 2016 a).

Las citoqueratinas (CKs), pueden participar en la regulación del tamaño y la proliferación celular, ya que se han observado cambios en su expresión en tejidos en diferenciación, lesionados y metástasis. Aunque el mecanismo exacto aún se desconoce, se ha comprobado que dos proteínas participan activamente, éstas corresponden a la proteína – cinasa de mamíferos blanco de la rapamicina (mTOR, mammalian target of rapamycin) y a la proteína 14-3-3 (Aquino-Pérez and Santa-Cruz, 2008). Las CKs consisten en 20 polipéptidos bioquímicamente y antigénicamente diferentes con pesos moleculares de entre 40- 67 KDa y punto isoeléctrico de pH of 4.9–7.8, se dividen en 2 subfamilias, en la primera encontramos proteínas básicas de 52-67 KDa nombradas CK 1-8, y en la segunda proteínas más ácidas y más pequeñas (40-56KDa) numeradas del 9 al 20. En este estudio encontramos disminución de la expresión de citoqueratina 5 (CK 5), la localización de su gen se encuentra en 12q13.13, se encuentra principalmente expresadas en la capa de células basales, de epitelios queratinizado y no queratinizado orales, en el cual puede contener células madre, disminuye su expresión en células

diferenciadas (Belaldavar *et al.*, 2016). CK 5 se ha reportado como blanco del micro RNA-196, el cual se ha encontrado sobreexpresado en casos de cáncer de mama y cáncer de páncreas (Chen *et al.*, 2011), esta regulación podría explicar la disminución de CK5 en este estudio, en casos de cáncer cervical con infección por el VPH-16 en comparación con tejido normal sin VPH-16.

En este estudio hipotetizamos que la alteración de las proteínas está relacionada con la presencia de la infección por el VPH-16, debido a que están relacionadas a eventos importantes como hipoxia, transición mesénquima epitelio, pérdida de la diferenciación celular y del control del ciclo celular, proliferación y metástasis, sin embargo, se ha reportado la disminución o aumento de manera controversial por lo que se sugiere continuar estudiando la expresión de estas proteínas en una población mayor y la relación que existe con las oncoproteínas del VPH-16.

CONCLUSIONES

La proteómica es una alternativa para la identificación de nuevos potenciales biomarcadores que podrían aumentar la eficacia en el diagnóstico, tratamiento y manejo de pacientes con lesiones precursoras y cáncer cervical, En este estudio encontramos la alteración en la expresión de las proteínas Mimecan, Actin aortic smooth muscle, Lumican, Peroxiredoxin-1, 14-3-3 protein, Alpha-enolase y Keratin type II cytoskeletal en 5 en casos de CCE cervicales con VPH-16 en comparación con casos de tejidos sin LEI sin VPH. Estas proteínas han sido implicadas en procesos importantes en la carcinogénesis como hipoxia, transición mesénquima epitelio, pérdida de la diferenciación celular y del control del ciclo celular, proliferación y metástasis e hipotetizamos que la alteración en la expresión de estas proteínas se encuentra relacionada a las oncoproteínas del VPH-16, sin embargo aún es necesario realizar la evaluación de la presencia de estas proteínas para lograr un panel de biomarcadores que permitan aumentar la sensibilidad y especificidad en la detección oportuna del carcinoma invasor de células escamosas. Además hacen falta estudios sobre la relación del incremento de su expresión, distribución y su relación con el estadio del cáncer cervical, así como posibles biomarcadores de diagnóstico, pronóstico y como blancos terapéuticos.

V. REFERENCIAS

Aguilar-Lemarroy A., Vallejo-Ruiz V., Cortés-Gutiérrez E., Salgado-Bernabé M., Ramos-González, N., Ortega-Cervantes L., et al. (2015) Human papillomavirus infections in Mexican women with normal cytology, precancerous lesions, and cervical cancer: Type-specific prevalence and HPV coinfections. *J. Med. Virol.*, 87: 871–884.

Álvarez C., Castro E., Virginillo J., Bruno G., González C., Vallejos J., et al., (2012). Actualización de la estadificación de cáncer de cuello uterino. *RAR* 76 (2): 169-171.

Apgar B., Zoschnick L. (2003). The 2001 Bethesda System Terminology. *Am Fam Physician* 68, 1992–1998.

Aquino C., Santa Cruz F. (2008). Citoqueratinas en dermatología. *Dermatología Rev Mex*; 52(6):254-62.

Arbyn M., Castellsagué X., de Sanjosé S., Saraiya M., Ferlay J. (2011) Worldwide burden of cervical cancer in 2008. *Annals of oncology* 1-12.

- Baak J.**, Kruse A., Robboy S., Janssen E., Van Diermen B., Skaland I. (2006) Dynamic behavioural interpretation of cervical intraepithelial neoplasia with molecular biomarkers. *J Clin Pathol* 59, 1017–1028.
- Bae S.**, Min H., Ding G., Kwak S., Cho Y., Nam., et al. (2006). Protein expression profile using two-dimensional gel analysis in squamous cervical cancer patients. *Cancer Res Treat.* 38(2): 99-107.
- Banks L.**, Pim D., Thomas M. (2012). Human tumour viruses and the deregulation of cell polarity in cancer. *Nature Reviews Cancer.* 12: 877 - 886.
- Boulet G.**, Horvath V., Berghmans S., Bogers, J. (2007). Human papillomavirus in cervical cancer screening: important role as biomarker. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention* 17, 4: 810-7.
- Briolat J.**, Dalstein V., Saunier M., Cuadroy S., Prétet J., et al. (2007) HPV prevalence, viral load and physical state of HPV-16 in cervical smears of patients with different grades of CIN. *Int J Cancer* 121, 2198–2204.
- Bumrungthai S.**, Ekalaksananan T., Evans M., Chopjitt P., Tangsiriwatthana T., Patarapadungkit N., et al. (2015). Up-Regulation of miR-21 is associated with cervicitis and human infection in cervical tissues. *PLoS ONE* 10(5): e0127109.
- Burd, E. M.** (2003) Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 1-17.
- Bussard K.**, Mutkus L., Stumpf K., Gomez-Manzano C., Marini F. (2016). Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. *Breast Cancer Research.* 18: 84.
- Cao J.**, Schulte J., Knight A., Leslie N., Zagozdzon A., Bronson R., et al. (2009). Prdx1 inhibits tumorigenesis via regulating PTEN/AKT activity. *The EMBO Journal*; 28, 1505–1517.
- Capello M.**, Ferri-Borgogno S., Cappello P., Novelli F. (2011). a-enolase: a promising therapeutic and diagnostic tumor target. *FEBS Journal.* 278: 1064–1074.
- Cheng Y.**, Chou C., Hsu Y., Chen M., Wing L. (2012). The role of human papillomavirus type 16 E6/E7 oncoproteins in cervical epithelial-mesenchymal transition and carcinogenesis. *Oncology Letters.* 3: 667-671.
- Choi, Y. P.**, Kang, S. Hong, S. Xie, X and Cho, N. H. (2005). Proteomic analysis of progressive factors in uterine. *Proteomics:* 1481-1493.
- Cricca, M. Venturoli, S.** Silvano Costa, E. L. Musiani, M. and Zerbini, M. (2009). Disruption of HPV 16 E1 and E2 genes in precancerous cervical lesions. *Journal of Virological Methods* 158: 180-183
- Cuzick J.**, Arbyn M., Sankaranarayanan R., Tsu V., Ronco G., Mayrand M. et al. (2008). Overview of human papillomavirus-based and other novel options for cervical cancer screening in developed and developing countries. *Vaccine.* 26S: K29–K41.
- Dasari S.**, Wudayagiri R., Valluru L. (2015). Cervical cancer: Biomarkers for diagnosis and treatment. *Clinica Chimica Acta.* 445: 7–11.
- Davy C.**, Ayub M., Jackson D., Das P., McIntosh P., Doorbar J. (2006). HPV16 E1^{E4} protein is phosphorylated by Cdk2/cyclin A and relocalizes this complex to the cytoplasm. *Virology,* 349: 230–244.

- De la Torre Rendón, F. E.** (2008). Lesión premaligna escamosa del cuello uterino, un enfoque actualizado. *Patología* 46, 4: 332-342.
- De Marchi Triglia, R.,** Metze, K., Zeferino, L. C., De Angelo-Andrade L. A. L. (2009). HPV in situ hybridization signal patterns as a marker for cervical intraepithelial neoplasia progression. *Gynecol Oncol.* 112,114-118.
- Deckx S.,** Heymans S., Papageorgiou A. (2016). The diverse functions of osteoglycin: a deceitful dwarf, or a master regulator of disease?. *The FASEB Journal.* 30: 2651-2661.
- Díaz-Ramos A.,** Roig-Borrellas A., Garcia-Melero A., Lopez-Aleman R. (2012). α -Enolase, a multifunctional protein: Its role on pathophysiological situations. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* ID 156795.
- Doorbar, J.** (2006) Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science,* 110, 525–541.
- Doorbar J.,** Elston R., Napthine S., Raj K., Medcalf E., Jackson D., et al. (2000). The E1 E4 protein of human papillomavirus type 16 associates with a putative RNA helicase through sequences in its C terminus. *Journal of Virology,* 74 (21): 10081–10095.
- Doorbar J.,** Egawa N., Griffin H., Kranjec C., Murakami I. (2015). Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev. Med. Virol.* 25: 2–23.
- Dougherty M.** And Morrison D. (2004). Unlocking the code of 14-3-3. *Journal of Cell Science.* 117: 1875-1884.
- Dutta S.,** Chakraborty C., Dutta A., Mandal R., Roychoudhury S., Basu P., et al. (2015). Physical and methylation status of human papillomavirus 16 in asymptomatic cervical infections changes with malignant transformation. *J Clin Pathol.* 68: 206–211.
- Efremov Y.,** Dokrunova A., Efremenko A., Kirpichnikov M., Shaitan K. Sokolova O. (2015). Distinct impact of targeted actin cytoskeleton reorganization on mechanical properties of normal and malignant cells. *Biochim Biophys Acta.* S0167-4889 (15) 00154-8.
- Egawa N.,** Egawa K., Griffin H., Doorbar J. (2015). Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. *Viruses,* 7, 3863-3890.
- Feller, L.,** Khammissa, R. A. G., Wood, N. H., Lemmer, J. (2009) Epithelial maturation and molecular biology of oral HPV. *Infectious Agents and Cancer* 4, 1-9
- Fountoulakis, M.** Tsangaris, G. Oh, J. Maris, A. and Lubec, G. (2004) Protein profile of the HeLa cell line. *Journal of Chromatography A.* 1038: 247-265.
- De Freitas A.,** Coimbra E., Leitão M. (2014). Molecular targets of HPV oncoproteins: Potential biomarkers for cervical carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1845: 91–103.
- Fukushima, C.** Murakami, A. Yoshitomi, K. Sueoka, K. Nawata, S. Nakamura, K. and Sugino, N. (2011). Comparative proteomic profiling in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Proteomics. Clinical applications* 5:3-4: 133-40.
- Fullár A.,** Dudás J., Oláh L., Hollósi P., Papp Z., Sobel G., et al. (2015). Remodeling of extracellular matrix by normal and tumor-associated fibroblasts promotes cervical cancer progression. *BMC Cancer.* 15:256.
- Ghittoni, R. Accardi,** R and Hasan, U. (2010). The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *Virus Genes:* 1-13.
- Grases, P. J.,** Tresserra-Casas, F., López-Marín, L. (2005) Cuello uterino: Atipias y lesiones premalignas no invasoras. *Rev Obstet Ginecol Venez* 66, 2.

- Gu, Y.** Wu, S-L. Meyer, J. L. Hancock, W. S Burg, L. J. Linder, J. Hanlon, D. W., et al. (2007). Proteomic analysis of high-grade dysplastic cervical cells obtained from thinprep slides using laser capture microdissection and mass spectrometry research articles. *Journal of Proteome Research*: 4256-4268.
- Gutiérrez JP**, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Villalpando-Hernández S, Franco A, Cuevas-Nasu L, Romero-Martínez M, Hernández-Ávila M. Encuesta nacional de salud y nutrición 2012. Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública (MX), 2012.
- Hermeking H.** (2003). The 14-3-3 cancer connection. *Nature Reviews Cancer*. 3: 931 - 943.
- Hermeking H** and Benzinger A. (2006). 14-3-3 proteins in cell cycle regulation. *Semin Cancer Biol*. 16(3):183-92
- Herrera Y** and Piña-Sánchez P. (2015). Historia de la evolución de las pruebas de tamizaje en el cáncer cervicouterino. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 6: 670-677.
- Higareda-Almaraz, J. C.**, Enriquez-Gasca, M. R. Hernandez-Ortiz, M. Resendis-Antonio O. Encarnacion-Guevara S. (2011). Proteomic patterns of cervical cancer cell lines, a network perspective. *BMC systems biology* 5,96.
- Hinz B.**, Phan S., Thannickal V., Prunoto M., Desmouliere A., Varga J. et al. (2012). Recent developments in myofibroblast biology. *The American Journal of Pathology*. 180: 1340-1355.
- Hondermarck, H.** Vercoutter-Edouar, A. S. Révillion, .F Lemoine, J. El-Yazidi-Belkoura, I. et al., (2001) Proteomics of breast cancer for marker discovery and signal pathway profiling. *Proteomics* 1,1216-1232.
- Hsiao K.**, Shih N., Fang H., Huang T., Kuo C., Chu P., et al. (2013). Surface α -Enolase promotes extracellular matrix degradation and tumor metastasis and represents a new therapeutic target. *PLoS ONE* 8(7): e69354.
- Huang L.**, Yao H., Wang Y., Wang W., Hu Z., Jin K. (2014). Proteomic identification of tumor biomarkers associated with primary gallbladder cancer. *World J Gastroenterol*. 18: 5511-5518.
- Illades-Aguilar**, B. Alarcón-Romero, L. C. Antonio-Véjar, V. Zamudio-López, N. Sales-Linares, N. Flores-Alfaro, et al., (2010) Prevalence and distribution of human papillomavirus types in cervical cancer, squamous intraepithelial lesions, and with no intraepithelial lesions in women from Southern Mexico. *Gynecologic oncology* 117, 2.
- Ito S.**, Honma T., Ishida K., Wada N., Sasaoka S., Hosoda M., et al. (2007). Differential expression of the human α -enolase gene in oral epithelium and squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*. 98: 499–505.
- Ji H.**, Wang J., Guo J., Li Y., Lian S., Guo W., et al. (2016). Progress in the biological function of alpha-enolase. *Animal Nutrition*. 2: 12-17.
- Johansson C.** And Schwartz S. (2013). Regulation of human papillomavirus gene expression by splicing and polyadenylation. *Nature Reviews Microbiology*. 11: 239 - 251.
- Jung H.**, Rajasekaran N., Ju W., Shin Y. (2015). Human papillomavirus: current and future RNAi therapeutic strategies for cervical cancer. *J. Clin. Med.*, 4: 1126-1155.
- Kao W.**, Funderburgh J., Xia Y., Liu C., Conrad W. (2006). Focus on Molecules: Lumican. *Experimental Eye Research*. 82: 3–4.

- Kong Q.**, Wang W., Li P. (2015). Regulator role of HPV E7 protein on miR-21 expression in cervical carcinoma cells and its functional implication. *Int J Clin Exp Pathol.*, 8(12): 15808-15813.
- Kumar, D.** and Verma. M. (2006). Molecular markers of cervical squamous cell carcinoma. *Cme Journal Of Gynecologic Oncology*: 41-60.
- Lai J.**, Chou Y., Huang N., Tsai J., Huang S., Yang Y., et al. (2013). Survival analysis of Stage IIA1 and IIA2 cervical cancer patients. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology*, 52: 33-38.
- Lee, K-A.**, Kang, J-W. Shim, J-H. Won, C. Goo, S. Gu, H. Paik, S-G et al., (2005). Protein profiling and identification of modulators regulated by human papillomavirus 16 E7 oncogene in HaCaT keratinocytes by proteomics. *Gynecologic Oncology* 99: 142-152.
- Li L.**, Zhang Z., Wang C., Miao L., Zhang J., Wang J., et al. (2014). Quantitative proteomics approach to screening of potential diagnostic and therapeutic targets for laryngeal carcinoma. *PLoS ONE* 9(2): e90181.
- Salcedo M.**, Pina-Sanchez P., Vallejo-Ruiz V., Monroy-Garcia A., Aguilar-Lemarroy A., Cortes-Gutierrez E., et al. (2014). Human papillomavirus genotypes among females in Mexico: a study from the Mexican Institute for Social Security. *Asian Pac J Cancer Prev.*, 15 (23): 10061-10066.
- Mclaughlin-Drubin, M. E.** and Münger, K. (2009). Oncogenic activities of human papillomaviruses. *Virus Research* 143: 195-208.
- Merkley M.**, Hildebrandt E., Podolsky R., Arnouk H., Ferris D., Dynan., et al. (2009). Large-scale analysis of protein expression changes in human keratinocytes immortalized by human papilloma virus type 16 E6 and E7 oncogenes. *Proteome Science* 7:29.
- Michelacci Y.** (2003). Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 36: 1037-1046
- Michener C.**, Ardekani A., Petricoin E., Liotta L., Kohn E. (2002). Genomics and proteomics: application of novel technology to early detection and prevention of cancer. *Cancer Detection and Prevention.* 26: 249–255.
- Miller D.**, Thomas S., Islam A., Muench D., Sedoris K. (2012). c-Myc and cancer metabolism. *Clin Cancer Res.* 18: 5546-5553.
- Muñoz Bello O.**, Olmedo Nieva L., Contreras Paredes A., Fuentes Gonzalez A., Rocha Zavaleta L., Lizano M. (2015). Regulation of the Wnt/ β -Catenin signaling pathway by human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins. *Viruses.* 7: 4734-4755.
- Naito Z.**, Ishiwata T., Kurban G., Teduka K., Kawamoto Y., Kawahara K., et al. (2002). Expression and accumulation of lumican protein in uterine cervical cancer cells at the periphery of cancer nests. *Int J Oncol.* 20(5):943-8.
- Naito Z.** (2005). The role of small Leucine-rich proteoglycan (SLRP) family in pathological lesions and cancer cell growth. *J. Nippon Med Sch.* 72: 137 - 145.
- Narisawa-Saito M.**, and Kiyono, T. (2007) Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci* 98, 1505-11.
- Neumann CA** and Fang Q. (2007). Are peroxiredoxins tumor suppressors? *Curr Opin Pharmacol.* 7(4):375-80.

- Nikitovic D.**, Papoutsidakis A., Karamanos N., Tzanakakis G. (2014). Lumican affects tumor cell functions, tumor–ECM interactions, angiogenesis and inflammatory response. *Matrix Biology*. 35: 206–214.
- NOM-014-SSA3-2013**. Para la asistencia social alimentaria a grupos de riesgo. Diario Oficial de la Federación. Martes 11 de noviembre de 2014.
- Ortiz-Domínguez M. E.** Rendición de cuentas 2009. Obtenida en diciembre de 2010 de www.dged.salud.gob.mx
- Rader J.**, Malone, J. P. Gross, J. Gilmore, P. Brooks, R. A. Nguyen, L. et al. (2011). Cervical Cancer screening. *Proteomics* 2, 12: 1658-1669.
- Rhee S.** (2016). Overview on Peroxiredoxin. *Mol. Cells*. 39: 1-5.
- Rivera Z.**, R., Delgado, D., Painel, P., Barrero, R, Larraín, H. (2006) Mecanismo de infección y transformación neoplásica producido por virus papiloma humano en el epitelio cervical. *Rev Chil Obstet Ginecol* 71, 135-140.
- Rodríguez-Pérez M.**, Medina-Unon,A. Encarnación-Guevara S. M. Bernal-Silva , S. Barrera-saldaña, H. Albar-Ramírez, J. P.(2008). In silico analysis of protein neoplastic biomarkers for cervix and uterine cancer. 604-617.
- Sano T.**, Shimooka H., Weixa P., Segawa A., Jian Z., Motegi A., et al. (2004). Immunohistochemical expression of 14-3-3 sigma protein in various histological subtypes of uterine cervical cancers. *Pathology International*. 54: 743–750.
- Sharma S.**, Mandal P., Sadhukhan T., Chowdhury R., Mondal N., Chakravarty B., et al. (2015). Bridging links between long noncoding RNA HOTAIR and HPV oncoprotein E7 in cervical cancer pathogenesis. *Sci. Rep.* 5: 11724.
- Shukla S.**, Mahata S., Shishodia G., Pande S., Verma G., Hedau S. et al. (2014). Physical state & copy number of high risk human papillomavirus type 16 DNA in progression of cervical cancer. *Indian J Med Res*. 139: 531-543.
- Snellenberg S.**, D. M. Claassen-kramer, D. M. Meijer, C. J. L. Snijders, P. J. F and Steenbergen R. D. M. (2012) Methylation status of the E2 binding sites of HPV16 in cervical lesions determined with the Luminex® xMAP™ system. *Virology* 422, 2: 357-365
- Spaans VM**, Trietsch MD, Peters AA, Osse M, Ter Haar N, Fleuren GJ, et al. (2015). Precise classification of cervical carcinomas combined with somatic mutation profiling contributes to predicting disease outcome. *PLoS One*. 10(7):e0133670
- Srivastava S**, Shahi UP, Dibya A, Gupta S, Roy JK. (2014). Distribution of HPV genotypes and involvement of risk factors in cervical lesions and invasive cervical cancer: A study in an Indian population. *Int J Mol Cell Med*. 3(2):61-73.
- Steenbergen R.**, Snijders P., Heideman D., Meijer C. (2014). Clinical implications of (epi)genetic changes in HPV-induced cervical precancerous lesions. *Nature Reviews Cancer*. 14: 395 - 405.
- Syrjänen S.**, Naud P., Sarian L., Derchain S., Roteli-Martins C., Longatto-Filho A., et al. (2010). Up-Regulation of 14-3-3 σ (Stratifin) Is associated with High-Grade CIN and High-Risk human papillomavirus (HPV) at baseline but does not predict futcomes of HR-HPV infections or incident CIN in the LAMS* Study. *Am J Clin Pathol*. 133: 232-240.
- Tao M.**, Kruhlak M., Xia S., Androphy E., Zheng Z. (2003). Signals that dictate nuclear localization of human papillomavirus type 16 oncoprotein E6 in living cells. *Journal of Virology* 132, 77(24): 13232–13247.

- Takayama R.**, Ansai S., Ishiwata T., Yamamoto T. Matsuda Y., Naito Z., et al. (2014). Expression of Lumican in hidroacanthoma simplex and clonal-type seborrheic keratosis as a potent differential diagnostic marker. *Am J Dermatopatho.* 36: 655–660.
- Tasheva ES** (2002). Analysis of the promoter region of human mimecan gene. *Biochim Biophys Acta.*3; 1575(1-3):123-9.
- Tasheva ES** and Conrad GW. (2003). The UV responsive elements in the human mimecan promoter: a functional characterization. *Mol Vis.* 2; 9:1-9
- Teissier S.**, Khalifa, Y.B., Mori, M., Pautier, P., Desaintes, C., Thierry, F. (2007) A New E6/P63 pathway, together with a strong E7/E2F mitotic pathway, modulates the transcriptome in cervical cancer cells. *J Virol* 81,17, 9368–9376.
- Uleberg K.**, Munk, A. C. Brede, C. Gudlaugsson, E. van Diermen, B. Skaland, I. et al., (2011). Discrimination of grade 2 and 3 cervical intraepithelial neoplasia by means of analysis of water soluble proteins recovered from cervical biopsies. *Proteome science* 9, 36.
- Van Gent M.**, Romijn L., van Santen K., Trimbos J., Kroon C. (2016). Nerve-sparing radical hysterectomy versus conventional radical hysterectomy in early-stage cervical cancer. A systematic review and meta-analysis of survival and quality of life. *Maturitas.* 94: 30–38.
- Vargas-Hernández V.**, Acosta-Altamirano G., Moreno-Eutimio M., Vargas-Aguilar V. (2014). Nuevas directrices en la detección oportuna del cáncer cervicouterino. *Cir Cir.*, 82: 453-459.
- Venuti A.**, Paolini F., Nasir L., Corteggio A., Roperto S., Campo M., et al. (2011). Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. *Molecular Cancer.* 10: 140.
- Vinokurova S.**, Wentzensen, N., Kraus, I., Klaes, R., Driesch, C., Melsheimer, P., et al. (2008) Type-Dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer Res* 68, 307-313.
- Wakeham K.**, Kavanagh K., Cuschieri K., Millan D., Pollock K., Bell S. et al. (2016). HPV status and favorable outcome in vulvar squamous cancer. *Int J Cancer.* doi: 10.1002/ijc.30523.
- Wang Z.**, Tropè C., Suo Z., Trøen G., Yang G., Nesland J., et al. (2008). The clinicopathological and prognostic impact of 14-3-3 sigma expression on vulvar squamous cell carcinomas. *BMC Cancer.* 8:308.
- Wilker E.**, van Vugt M., Artim S., Huang P., Petersen C., Reinhardt H., et al. (2007). 14-3-3s controls mitotic translation to facilitate cytokinesis. *NATURE.* 446: 329 - 332.
- Winter M.** Lodygin D. Verdoodt B. Hermeking H. (2016). Deletion of 14-3-3 σ sensitizes mice to DMBA/TPA-induced papillomatosis. *Oncotarget.* 7, No. 30.
- Wittekindt C.**, Wagner S., Mayer C., Klussmann J. (2012). Basics of tumor development and importance of human papilloma virus (HPV) for head and neck cancer. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg.* 11: Doc09.
- Yang X.**, Li S., Li W., Chen J., Xiao X., Wang Y., et al. (2013). Inactivation of lysyl oxidase by β -aminopropionitrile inhibits hypoxia-induced invasion and migration of cervical cancer cells. *Oncology Reports.* 29: 541-548.
- Zehbe I.**, H. Westerback, A. Lambert, P. F. Tommasino, M. Sherman L. (2011). Rare human papillomavirus 16 E6 variants reveal significant oncogenic potential. *Molecular Cancer:* 1-14.

Zhang HJ, Wang J, Liu HF, Zhang XN, Zhan M, Chen FL. (2015). Overexpression of mimecan in human aortic smooth muscle cells inhibits cell proliferation and enhances apoptosis and migration. *Exp Ther Med.* 10(1):187-192.

Zhang W., Zhou Q., Tao X., Shen Z., Luo H., Zhu X. (2016). Expression and function of peroxiredoxins in gynecological malignancies. *Frontiers in Bioscience.* 21, 986-997.

Zhang C., Arentz G., Winderbaum L., Lokman N., Klingler-Hoffmann M., Mittal P., et al. (2016). MALDI mass spectrometry imaging reveals decreased CK5 levels in vulvar squamous cell. Carcinomas compared to the precursor lesion differentiated vulvar intraepithelial neoplasia. *Int. J. Mol. Sci.* 17: 1088.

Zhu X., Lv J., Yu L., Zhu X., Wu J., Zou S., Jiang S. (2009) Proteomic identification of differentially-expressed proteins in squamous cervical cancer. *Gynecologic oncology* 112 (1): 248-56.

Zur Hausen H. (2002) Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2, 342-50.

Zur Hausen H. (2006) Infections causing human cancer. *Nat Rev Cancer* 145-190.

VI. ANEXOS

ANEXO 1

Tabla 5. Abundancia relativa de Mimecan, Actin from aortic smooth muscle, Lumican, Keratin, type II cytoskeletal 5, Peroxiredoxin-1, alpha-enolase y 14-3-3 protein en cáncer comparado con tejido normal

Proteína	Tipo de cáncer	
	Expresión aumentada	Expresión disminuida
Mimecan	Mama, colón, pulmón, ovario, próstata, páncreas, gástrico, cervical, vaginal, laringe, tiroides, tumores de pituitaria (Deckx <i>et al.</i> , 2016).	Leiomiomas (Deckx <i>et al.</i> , 2016)
Lumican	Mama, colorectal, adenocarcinoma de páncreas, cervical, pulmón, melanoma (Nikitovik <i>et al.</i> , 2014). Carcinoma de células escamosas cervicales (Sifaki <i>et al.</i> , 2006)	Mama, próstata (Nikitovik <i>et al.</i> , 2014)
α-SMA	Células estromales de cáncer de colon y de mama, células HeLa y SiHa (Yang <i>et al.</i> , 2013; Bumrunghai <i>et al.</i> , 2015)	
14-3-3 sigma	Carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma y adenocarcinocarcinoma escamoso cervical (Sano <i>et al.</i> , 2004)	Mama y gástrico (Dougherty and Morrison, 2004), carcinoma de células escamosas oral (Bhawal <i>et al.</i> , 2008), cáncer de ovario (Wang <i>et al.</i> , 2008)
Alpha-enolase	Cáncer de pulmón y queratinocitos transfectados con vectores retrovirales que expresan E6, E7 del VPH 16 (Merkley <i>et al.</i> , 2009), carcinoma ductal de mama invasivo (Lo Presti <i>et al.</i> , 2010), cáncer de cabeza y cuello (Díaz-Ramos <i>et al.</i> , 2012)	Carcinoma de células escamosas de cérvix (Bae <i>et al.</i> , 2007)
Prdx 1	Carcinoma de células escamosas orales, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células escamosas esofágico, cáncer de páncreas y cáncer de mama (Park <i>et al.</i> , 2016)	Cáncer de mama (Park <i>et al.</i> , 2016)
Ck5	Carcinoma urotelial de vejiga (Batavia <i>et al.</i> , 2014)	Carcinoma de células escamosas vulvar (Zhang <i>et al.</i> , 2016 b)