



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“Expresión de Cox-1 y Cox-2 en lesión escamosa intraepitelial de
cérvix uterino e infección por el virus del papiloma humano”**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

JORGE GARCIA CORRALES

DIRECTORA DE TESIS: Dra. AMALIA VENCES VELÁZQUEZ

CHILPANCINGO, GRO., ENERO DEL 2011.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Investigación en Inmunología y Diagnóstico Molecular de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero.

Directora de Tesis

Dra. Amalia Vences Velázquez

Asesora Externa

Dra. Ma. Lilia Domínguez López, ENCB-IPN

Comité tutorial

Dra. Berenice Illades Aguiar

Dra. Mónica Espinoza Rojo

Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero

Durante los estudios de Maestría el sustentante Q.B.P. Jorge García Corrales, fue becario CONACYT de septiembre del 2008 a julio del 2010 con número de registro 272999. Así también esta investigación recibió financiamiento otorgado por el programa de reincorporación Ex-becarios PROMEP/SEP UAGRO-EXB-107.

AGRADECIMIENTOS

A mi comité tutorial

A mi directora de tesis, la **Dra. Amalia Vences Velázquez**, por todo el apoyo recibido, su confianza, paciencia, conocimientos y tiempo para la realización de este proyecto.

A la **Dra. Berenice Illades Aguiar**, la **Dra. Mónica Espinoza Rojo**, la **Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero** y la **Dra. Ma. Lilia Domínguez López**, por sus valiosas aportaciones y tiempo para el desarrollo de este trabajo.

A mi Tutor **Dr. Eduardo Castañeda Saucedo**, pues siempre estuvo dispuesto a brindarme su ayuda y consejos, ya que sin ello no hubiera podido terminar este trabajo. ¡Muchas Muchas Gracias!

A mi maestra de seminario **Dra. Berenice Illades Aguiar**, pues siempre mostró la mejor disposición para guiarme en la realización de mi trabajo de investigación.

A la **Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero**, por facilitarme las muestras utilizadas en esta investigación, las cuales fueron el eje principal de mi trabajo.

A la **Dra. Mónica Espinoza Rojo**, por abrirme las puertas de su laboratorio de investigación y por el adiestramiento en las técnicas que utilice en el desarrollo de mi trabajo.

A la **M. en C. Arianna Vega Peña** por la ayuda brindada en la toma de muestras, muchas gracias Ari sin tu valiosa ayuda esto no habría sido posible.

Al **M. en C. Adrián García Carreón**, Por apoyarme en la parte estadística de este trabajo, Amigo sin ti no habría podido cumplir esta meta más en mi vida. ¡Muchaasssssss Gracias!

A la Bióloga **Paola Macedo**, por toda la ayuda prestada en la parte administrativa, muchas gracias pao eres como ninguna.

DEDICATORIAS

A mis padres, **Filiberto García Garzón** y **Ma. Evelia Corrales Miranda** por que nuevamente confiaron en mí, por ser los pilares de mi vida y a quienes amo sobre todas las cosas.

A mis hermanas **Lilibet García Corrales** y **Grissel García Corrales**, por su apoyo recibido en toda mi vida, las quiero mucho hermanitas.

A mis sobrinos, **Andrés** y **Vannia** porque sin pedir nada a cambio siempre están para mí y me brindan una hermosa sonrisa, hacen que mi vida sea simplemente mejor.

A mí cuñado **Gio** porque eres una pieza fundamental de la familia y al cual quiero muchísimo.

A mis amigos del Laboratorio de Investigación en Inmunobiología y Diagnóstico Molecular: **Heysi, Ene, Liz, Naye, Mir, Ady, Geral, Lili, Vera, Luis Ángel, Ángel de Jesús, Lulú** y **Dei** por compartir tantos momentos que me ayudaron a superar todos los obstáculos en este trabajo. ¡Mil gracias! Siempre los recordare.

A mis hermanitos mayores académicos (**Mirna, Ady** y **Migue**), no tengo palabras para agradecerles todo lo que hicieron por mí, pues dedicaron parte de su tiempo y conocimiento con el cual me brindaron muchas armas para poder terminar mi trabajo. ¡Las quiero mucho!

A mis amigos de la generación MCB-2008-2010, más que amigos los considero mis hermanos (**Lupita, Maguitos, Nathalita, Betza, Ida, Karen, Pepe toño, Adriancito, Chucho, Turo, Jorge**) pues además de ser un gran ejemplo para mí y por cual los admiro mucho, me brindaron su amistad, estuvieron conmigo en los momentos en que la desesperación se apodero de mí, me ayudaron incondicionalmente y por todos los momentos que pasamos juntos. Nunca los olvidare, los llevo en mi corazón.

A mi Hermanitas (**Naye** y **Liz**) pues juntos emprendimos esta gran aventura de nuestro trabajo de investigación, probamos juntos muchos sinsabores, tristeza, desesperación, cansancio, pero también muchas alegrías y es por ello que se los agradezco enormemente. Hermanitas fue un gran honor compartir todo esto con ustedes.

A mi amiga **Maricela Martínez Portillo**, porque estuviste conmigo apoyándome a lo largo de toda esta travesía y sé que siempre puedo contar contigo. ¡Te quiero mucho chelita!

ÍNDICE

	Págs.
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
MATERIAL Y MÉTODOS.....	14
RESULTADOS.....	18
DISCUSIÓN y CONCLUSIONES.....	28
REFERENCIAS.....	36

RESUMEN

Antecedentes. La inflamación crónica juega un papel importante en la carcinogénesis cervical mediada por los VPH-AR. Estudios recientes muestran que la infección por VPH-AR activa enzimas pro-inflamatorias como las ciclooxigenasas (Cox-1 y Cox-2) que conducen a la formación de prostaglandinas, las cuales a su vez están involucradas en diversos mecanismos carcinogénicos: inhibición de la apoptosis, proliferación celular, modulación de la adhesión celular, estimulación de la angiogénesis e inmunosupresión. A pesar de las evidencias existentes de la sobre-expresión de Cox-1 y Cox-2 en cáncer cervical, se desconoce cuál es su implicación en etapas tempranas de la carcinogénesis cervical y su posible asociación con la infección por VPH.

Objetivo. Evaluar el nivel de expresión del mRNA de Cox-1 y Cox-2 en citologías sin LEI / VPH negativas, citologías sin LEI / VPH positivas, LEIBG y su asociación con el VPH.

Material y métodos. La expresión del mRNA de Cox-1 y Cox-2 se determinó mediante RT-PCR semicuantitativa, en 90 muestras de citologías cervicovaginales procedentes del Laboratorio de Citopatología de la Unidad Académica de Ciencias Químico-Biológicas, Chilpancingo, Gro. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de Anova de una vía y la prueba de Bonferroni.

Resultados. Se encontró asociación estadísticamente significativa de la expresión del mRNA de Cox-1 y Cox-2 con las LEIBG ($p=0.001$ y $p=0.01$) respectivamente, también se encontró asociación de la expresión del mRNA de Cox-1 con los VPH-BR ($p=0.017$) y la expresión del mRNA de Cox-2 con los VPH-AR ($p=0.001$)

Conclusiones. Los mRNA de Cox-1 y Cox-2 son sobre-expresados en LEIBG. Cox-2 molécula potencial como biomarcador celular de lesión temprana, además que es asociado con la infección del virus del papiloma humano de alto riesgo oncogénico.

Palabras clave. Cáncer cervical, LEI, LEIBG, inflamación, Cox-1, Cox-2, VPH

ABSTRACT

Background. Chronic inflammation plays an important role in HR-HPV associated cervical carcinogenesis. Recent studies show that HR-HPV infection activates proinflammatory enzymes such as cyclooxygenases (Cox-1 y Cox-2), leading to the formation of prostaglandins, which are involved in different cancer mechanisms such as: apoptosis inhibition, cellular proliferation, modulation of cellular adhesion, stimulation of angiogenesis and immunosuppression. Despite the evidences about the effects of Cox-1 and Cox-2 overexpression in cervical cancer, there no evidence for their role in early stages carcinogenesis and its possible association to HPV infection.

Objective. Evaluate the level of expression of the mRNA of Cox-1 and Cox-2 in cytologies without SIL and without HPV, cytologies without SIL with HPV, LSIL and its association with the HPV.

Method. The mRNA expression of Cox-1 and Cox-2 was determined by semiquantitative RT-PCR, in 90 samples of cervicovaginal cytologies obtained at the Cytopathology Laboratory in the Chemical and Biological Sciences Faculty of Chilpancingo, Gro. Statistic analysis where done using the One-way Anova test and Bonferroni test.

Results. We found a statistically significant association between Cox-1 and Cox-2 mRNA expression and the LSIL ($p=0.001$ and $p=0.01$, respectively). We also found an association between Cox-1 mRNA expression and LR-HPV infection ($p=0.017$), and between Cox-2 mRNA expression with HR-HPV infection ($p=0.001$).

Conclusions. The mRNA of the Cox-1 and Cox-2 are overexpressed in LSIL. Cox-2 is a potential biomarker for early lesions as it is associated with the infection by oncogenic high risk human papillomavirus.

Key Words. cervical cancer, SIL, HSIL, Inflammation, HPV, Cox-1, Cox-2

INTRODUCCIÓN

En la actualidad el cáncer cervical sigue siendo un grave problema de mortalidad entre la población femenina a nivel mundial, en México datos mostrados por la SSA en el 2009 muestran al cáncer cervical como la segunda causa de muerte entre la población de 25 años y más. En el estado de Guerrero la tasa de mortalidad en este mismo año para cáncer cervical fue de 14.1 defunciones por cada 100 mil mujeres en el rango de edad 25 años o más (SSA, 2009).

De acuerdo a estudios epidemiológicos, inmunoquímicos y clínicos, se afirma la relación entre la patogénesis del cáncer cervical con el Virus de Papiloma Humano (VPH), virus que se adquiere por transmisión sexual (Grim *et al.*, 2009). Muchas mujeres son infectadas rápidamente después de su primera relación sexual y con un alta prevalencia en mujeres menores de 25 años de edad (Woodman *et al.*, 2007). De estas mujeres, hasta un 25% desarrollan Lesiones Escamosas Intraepiteliales de Bajo Grado (LEIBG). No obstante, el 90–95% de las infecciones se resuelven espontáneamente, sin ningún tratamiento. La persistencia del VPH ocurre en un 5% en las mujeres de más de 35 años, este subgrupo tiene un mayor riesgo de desarrollar Lesiones Escamosas Intraepiteliales de Alto Grado (LEIGA) y cáncer cervical (L. Rincón O, 2007)

En el desarrollo a cáncer cervical se considera al VPH como una causa necesaria, pero no suficiente para la progresión a cáncer, pues se requieren otros factores y co-factores para que un porcentaje de infecciones persistentes por VPH logre en algún momento progresar y dar lugar al cáncer (Motoyama *et al.*, 2004; Sánchez-Hernández *et al.*, 2005).

Dentro de este grupo de factores y co-factores que han sido asociados con el riesgo de cáncer cervical, incluyen factores exógenos como el hábito de fumar y el uso prolongado de anticonceptivos orales, así también factores endógenos que incluyen la respuesta inmune, genéticos, inicio de vida sexual, edad y la multiparidad (Castle, 2004). Estos factores pueden actuar incrementando la persistencia viral vía inmunosupresión o pueden causar daño directo al tejido que

incrementa la predilección para el desarrollo de una LEIAG. Entre el grupo de co-factores encontramos las infecciones del tracto genital (por ej. *Chlamydia trachomatis* y el virus del herpes simple tipo II), inflamación cervical y factores nutricionales han sido sugeridos basándose en evidencia epidemiológica (Castle y Giuliano, 2003).

Estas co-infecciones inducen una respuesta inflamatoria que determinará con el tiempo y la respuesta inmune el tipo de inflamación (aguda o crónica). Citocinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α y proteasas son liberadas por células polimorfonucleares y macrófagos en el tejido epitelial (Germano *et al.*, 2008). La activación de macrófagos y neutrófilos resulta en la producción de moléculas altamente reactivas que dañan las células debido a la peroxidación lipídica, la oxidación de proteínas y del DNA. El óxido nítrico (NO) generado por la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) puede convertirse en radicales libres alterando la síntesis del DNA y proteínas. El anión superóxido (O_2^-) generado por los neutrófilos daña al DNA a través de la formación de aductos (Gonda *et al.*, 2009). Estudios recientes muestran que la infección por los VPH-AR, activan a enzimas pro-inflamatorias como la fosfolipasa A_2 y a las ciclooxigenasas Cox-1 y Cox-2, que conducen a la formación de prostaglandinas y que a su vez están involucradas en diversos mecanismos carcinogénicos: inhibición de la apoptosis, modulación de la adhesión celular, estimulación de la angiogénesis e inmunosupresión (Subbaramaiah, 2007; Kim *et al.*, 2009; Sobolewski *et al.*).

Por lo tanto la inflamación juega un papel importante en la carcinogénesis cervical mediada por el VPH. Aunque todavía no está claro si la sola infección por VPH induce el estado de inflamación, estudios epidemiológicos han revelado que la inflamación cervical en mujeres con infección por VPH es asociada con neoplasia cervical (Castle *et al.*, 2001; Castle y Giuliano, 2003). Se ha reportado también que la infección por VPH en co-infección con el virus del herpes simple tipo II está asociado con un incremento en el riesgo de carcinoma cervical invasivo (Smith *et al.*, 2002). Estudios epidemiológicos han mostrado que la enzima ciclooxigenasa 2, clave en el desarrollo del ambiente inflamatorio, se encuentra

sobre-expresada en cáncer cervical, por lo tanto la inflamación crónica se encuentra jugando un importante papel en la carcinogénesis cervical (Kulkarni *et al.*, 2001; Munkarah y Ali-Fehmi; 2005, Sarian *et al.*, 2006; Manchana *et al.*, 2006; Hammes *et al.*, 2008).

Las enzimas ciclooxigenasas intervienen en la conversión de ácido araquidónico a prostaglandinas (Gupta y Dubois, 2001) moléculas cruciales para numerosos procesos biológicos, incluyendo la inflamación, agregación plaquetaria, ovulación, gestación, angiogénesis y funciones inmunológicas (Williams y DuBois, 1996; Rouzer y Marnett, 2009) .

Hasta el momento se tienen identificadas tres ciclooxigenasas (Rouzer y Marnett, 2009) de las cuales dos isoformas (Cox-1 y Cox-2) han sido plenamente identificadas y Cox-3 es considerada como una isoforma de Cox-1 producida por “splicing” alternativo (Smith, 2002). Cox-1 es expresada constitutivamente en la mayoría de los tejidos y las prostaglandinas producidas por la misma regulan funciones fisiológicas o mejor conocidas como de mantenimiento, como citoprotección de la mucosa gástrica, regulación del flujo sanguíneo renal y agregación plaquetaria (Samuelsson *et al.*, 2007). En contraste, Cox-2 no es detectada normalmente en la mayoría de los tejidos o células, pero su expresión es rápidamente inducida por estímulos mitóticos e inflamatorios, como factores de crecimiento y citocinas (Kuwano *et al.*, 2004, Munkarah y Ali-Fehmi, 2005).

Una gran lista de evidencia sugiere que Cox-2 es importante en la carcinogénesis. Por ejemplo Cox-2 es sobre-expresada en células transformadas y tumores (Munkarah y Ali-Fehmi, 2005). Ratones modificados genéticamente para sobre-expresar Cox-2 en glándulas mamarias, piel y estómago presentan mayor susceptibilidad para el desarrollo de tumores en estos órganos (Muller-Decker *et al.*, 2002; Neufang *et al.*, 2001, Oshima *et al.*, 2004). Ratones deficientes de Cox-2 presentaron mayor resistencia para el desarrollo de cáncer intestinal, piel y de mama (Tiano *et al.*, 2002; Howe *et al.*, 2005; Hahn *et al.*, 2010). Oshima *et al.* 1996 mostró que ratones modificados genéticamente que carecían de Cox-2 tenían una marcada reducción en el tamaño y en el número de pólipos en un modelo de poliposis adenomatosa familiar. Ratones “knockout” para Cox-2

desarrollaron también el 75% menos de papilomas de piel que los ratones control (Oshima *et al.*, 1996). Además de la evidencia genética que implica a Cox-2 en carcinogénesis es apoyada por resultados farmacológicos, en los cuales inhibidores selectivos de Cox-2 suprimen la formación de una variedad de tumores en animales experimentales (Flower, 2003, Gupta y Dubois, 2001, FitzGerald, 2003).

Todos estos hallazgos nos sugieren que el incremento en los niveles de prostaglandinas presentes en tejido maligno es una consecuencia de la sobre-expresión de Cox-2. Sin embargo, recientemente ha sido demostrado que Cox-1 y Cox-2 son inducibles, la expresión de Cox-1 puede ser inducida *in vitro* por VEGF (Kim *et al.*, 2003), ácido araquidónico, forskolina, cAMP (Klein *et al.*, 2007) y PGE₂. Además la expresión elevada de Cox-1 ha sido reportada en tumores de pulmón en modelos murinos y en cánceres humanos como: carcinoma de próstata, mama y cervix (Hwang, 1998).

Se ha reportado en cáncer ovárico y endometrial que Cox-1 es sobre-expresado y que es el principal contribuyente para la producción de prostaglandinas en el tejido implicado y no así Cox-2 (Sugimoto *et al.*; 2007, Takiko Daikoku, 2006). Von Rahden en el 2005 demostró que Cox-1 y Cox-2 se encontraban sobre-expresados en niveles casi iguales en adenocarcinoma de esófago y que inducían la expresión de VEGF-A y VEGF-C (Von Rahden *et al.*, 2005). Sales en el 2002 demostró en líneas de cáncer cervical que Cox-1 esta sobre-expresada y con ello regulaba en una forma autocrina/paracrina la expresión de Cox-2, factores angiogénicos y los receptores EP (Sales *et al.*, 2002). A pesar de que se cuenta con investigaciones de la repercusión de la sobre-expresión de Cox-1 y Cox-2 en cáncer cervical, se desconoce cuál es su implicación en etapas tempranas de la carcinogénesis cervical y su posible asociación con la infección por los VPH.

Por lo tanto nos planteamos la hipótesis que en citologías cérvicovaginales con lesión escamosa intraepitelial de bajo grado y aquellas que presenten infección por VPH tendrán mayor expresión de Cox-1 y Cox-2.

El objetivo de este estudio fue evaluar el nivel de expresión de mRNA de Cox-1 y Cox-2 en etapas previas al cáncer cervical (citologías sin LEI VPH (-), citologías sin LEI VPH (+) y LEIBG) y su asociación con cada grupo citológico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población de estudio

Se analizaron 90 citologías cérvicovaginales (17 sin LEI VPH negativo, 26 sin LEI VPH positivo y 47 con LEIBG VPH positivo) de mujeres que asistieron al diagnóstico oportuno en el Laboratorio de Citopatología de la Unidad Académica de Ciencias Químico-Biológicas, Chilpancingo, Gro. Entre agosto del 2009 y mayo del 2010, se obtuvieron datos generales y ginecológicos de las mujeres mediante la aplicación de una encuesta.

Detección y tipificación del VPH

La detección del virus del papiloma humano fue realizado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los oligonucleótidos MY09/MY11 y GP5+ / 6+. La tipificación se realizó mediante RFLPs o secuenciación del DNA viral.

RT-PCR semicuantitativa de Cox-1 y Cox-2.

La extracción de RNA total se realizó a partir de material obtenido por raspado exoendocervical y se llevó a cabo mediante la utilización del kit (illustra triplePrepkit, GE Healthcare) de acuerdo a las instrucciones de fabricante. Se almacenó a -80 °C hasta su posterior procesamiento.

Una vez extraído el RNA total se inició la captura de los RNA mensajeros mediante hibridación de estos con oligo dT (Invitrogen). El cDNA se sintetizó a partir de 3 µg de RNA total. Se preparó una primera mezcla de reacción que consiste en 1µL de oligo dT (0.5 µg/mL. Invitrogen USA), 3 µg de RNA total y agua DEPC (Invitrogen) calculada para aforar a un volumen de 25 µL, esta mezcla se incubó a 65°C por 10 minutos para propiciar el alineamiento; mientras se realizó una segunda mezcla en la cual se depositó 1µL de solución buffer 5X (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 1 µL de DTT 0.1 M (catalizador de la enzima) y 0.5 µL de RNaseOUT 40 U/µL (inhibidor de RNasa), 1 µL de dNTPs (10mM dNTP Mix, Invitrogen) y se adicionó con 0.2µL de transcriptasa

reversa SuperScript II (200 U/ μ L), esta segunda mezcla se adicionó a los tubos de cada una de las muestras, posteriormente se incubó a 42°C durante 1 hora 30 minutos, para la reacción de extensión, finalmente se incubó a una temperatura de 70 °C durante 20 minutos para la inactivación de la enzima. El cDNA obtenido se deja enfriar y se guarda a -20 °C, hasta su uso.

La amplificación se realizó a partir del cDNA, por la técnica de PCR semicuantitativa, para COX-1 se emplearon los oligonucleótidos (sentido) 5'-TGC CCA GCT CCT GGC CCG CCG CTT -3' y (antisentido) 5'-GTG CAT CAA CAC AGG CGC CTC TTC -3' (Invitrogen), el producto esperado es de 304 pb (Dai *et al.*, 2004) y para COX-2 (sentido) 5'- CAG TAC CAA AAT CGT ATT GCT GCT- 3' y (antisentido) 5'- GAG TGC TTC CAA CTC TGC AGA C -3' (Invitrogen), el producto esperado es de 369 pb. La reacción de PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: Buffer 10X (sin Mg²⁺) 1.5 μ l, MgCl² (25 mM) 1 μ l, dNTPs (10 mM) 1 μ L, oligo sentido 0.6 μ l, oligo antisentido 0.6 μ l, Taq pol (5U/ μ l) 0.3 μ l, agregar ddH₂O a 25 μ l. A cada tubo de reacción se le adicionó 3 μ L de cDNA, se incluyeron los controles positivos (cDNA de células mononucleares de sangre periférica estimuladas con lipopolisacarido (*E. coli* serotipo 0111:B4) para ambos genes) y el control negativo, sustituyendo el cDNA por agua. El perfil de termociclador para COX-1 fue 94°C, 2 min (1 ciclo); 94°C, 20 seg, 68°C, 20 seg, 72°C, 20 seg (35 ciclos), 72°C 8 min (1 ciclo final). Los productos de la PCR se corrieron en geles de agarosa al 2.0%, se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizan con luz UV a 312 nm. La semicuantificación de los mRNA se realizó mediante un Software (Kodak Molecular Imaging) el cual cuantifica la densidad de las bandas obtenidas en el corrimiento electroforético.

Con la finalidad de verificar la correcta síntesis cDNA y como consecuencia la integridad del RNA, todas las muestras se someten a PCR para β -actina, considerando como un gen de expresión constitutivo, utilizando los iniciadores (sentido) 5'TGC GTG ACA TTA AGG AGA AG-3' y el (antisentido) 5'- CTG CAT CCT GTC GGC AAT G-3'(Sigma). El producto esperado es de 316 pb. La mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 25 μ L de agua desionizada estéril, 1.5 μ L de buffer 10X (200 mM Tris-HCl pH 8.4), 1 μ L de oligo dNTPs (10 mM), 1

μL de MgCl_2 (50mM), 0.3 μL (10 μM) de cada uno de los iniciadores sentido y antisentido. Finalmente se agregaron 3 μL del cDNA sintetizado y 0.3 μL de Taq DNA polimerasa (5U/ μL) (Invitrogen USA). Los resultados de todos los productos de PCR fueron normalizados con los obtenidos para β -actina (Unidades de densidad de cada gen (Cox-1 y Cox-2) / unidades de densidad de β -actina X 100 (Vences-Velázquez, 2007).

Cultivo de células mononucleares de sangre periférica (CSMP)

La sangre periférica heparinizada, se diluyó 1:1 (20ml de sangre total y 20 ml de solución salina estéril fría) y se estratificó sobre Ficoll Hypaque (GE Healthcare) en una proporción de un volumen por tres volúmenes de la muestra. Las CMSP se obtuvieron por diferencia de densidad de gradientes, centrifugando a 3250 r.p.m. durante 40 minutos a 4°C. El botón celular fue lavado tres veces con 15 ml. de solución salina estéril fría a 2200 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C. Las células viables se contaron en una cámara de Neubauer con azul de tripano (azul de tripano al 0.1% en solución salina al 0.9%) y se ajustaron a 1.0×10^5 células/ml en medio RPMI 1640 (GIBCO-BRL). Se utilizaron placas de 24 pozos y a cada pozo se le adicionó 2 millones de células en 2.0 ml de medio de cultivo RPMI 1640 suplementado al 10% con suero fetal bovino (GIBCO-BRL), se estimularon con 10 μl de LPS (10 ng) (*E coli* serotipo 0111:B4). Las placas se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda con 5.0% en CO_2 durante 8 horas, se cosecharon y se realizó la extracción de RNA total (Vences-Velázquez, 2007).

Análisis de datos

Se trabajó con una base de datos que integra la información obtenida a través de la encuesta aplicada a cada una de las participantes en el estudio, además de los resultados de laboratorio, para el análisis estadístico se utilizó el paquete estadístico SPSS ver 17.0 y STATA v.9.0. Los resultados fueron expresados como medianas y rangos intercuartiles (percentil 25 y 75) para las variables cuantitativas continuas, y frecuencias absoluta y relativa para las

variables cualitativas (categóricas). Para determinar las diferencias de medias en la expresión del mRNA en ambos genes, se utilizó la prueba de ANOVA y la comparación entre grupos se realizó usando el ajuste de Bonferroni. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Se estudiaron 90 mujeres: 17 casos sin LEI / VPH negativas, 26 casos sin LEI / VPH positivas y 47 con Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado. En el grupo de mujeres sin LEI / VPH (-) se obtuvo un rango de edad entre los 27 y 36 años y el inicio de vida sexual activa fue entre los 19 y 26 años de edad, para este mismo grupo, más de la mitad (52.94%) de las mujeres refirieron tener 1 ó 2 hijos. En el grupo de mujeres sin LEI / VPH (+) el rango de edad fue de 36 a 42 años, con un IVSA de 17 a 25 años, reportando la mitad de estas mujeres (50%) 1 ó 2 hijos, destacando que el 38.46% tenían más de 2 hijos. Las mujeres que presentaron LEIBG su rango de edad fue de los 28 a 41 años, con un rango de 18 a 23 años en cuanto a su IVSA, reportando también la mayoría de mujeres (40.43%) 1 ó 2 hijos, 34.04% más de 2 hijos y el 25.53% no refirió tener ningún hijo. Datos mostrados en la tabla 1

Tabla 1. Características gineco-citológicas de las mujeres estudiadas

	Sin LEI, VPH (-) n= 17	Sin LEI, VPH (+) n= 26	LEIBG n= 47	Valor de p
Edad	30 ^a (27-36)	40 ^a (36-42)	36 ^a (28-41)	0.006 ^c
IVSA	23 (19-26)	21 (17-25)	20 (18-23)	0.16 ^c
Paridad n(%)				
Ninguno	5(29.41)	3(11.54)	12(25.53)	0.40 ^c
1 ó 2	9(52.94)	13(50)	19(40.43)	
Más de 2	3(17.65)	10(38.46)	16(34.04)	

^aLos datos son presentados en medianas, percentil 25 y percentil 75

^bLos datos son presentados en frecuencia absoluta y relativa

^cEl valor de p fue obtenido utilizando la prueba de χ^2 y Kruskal-wallis

IVSA inicio de vida sexual activa

LEI lesión escamosa intraepitelial

LEIBG lesión escamosa intraepitelial de bajo grado

VPH virus del Papiloma humano

(-) negativas a la infección por VPH

(+) positivas a la infección por VPH

Expresión del mRNA de los genes Cox-1 y Cox-2

A las 90 muestras se les determinó la expresión del mensajero de Cox-1 y Cox-2, así también β -actina como control interno, mediante la RT-PCR semicuantitativa. En la figura 1 se muestra el comportamiento de la expresión de ambos mensajeros estudiados, el mensajero de Cox-1 (Panel B) fue expresado en todas las muestras analizadas independientemente si las citologías fueron positivas a la infección por VPH o si tenían lesión escamosa intraepitelial. El mensajero de Cox-2 fue expresado en solo 1 muestra del grupo de citologías sin LEI/VPH positivas (Panel A, carril 6) con un nivel de expresión de 68.52 UAD y el tipo viral diagnosticado fue el 16. En el grupo de LEIGB 14 de 47 muestras fueron positivas para la expresión del mRNA de Cox-2, 10 de las cuales presentaron infección por VPH-AR principalmente por el tipo 16, 3 muestras por VPH de bajo riesgo oncogénico y 1 por infección viral múltiple.

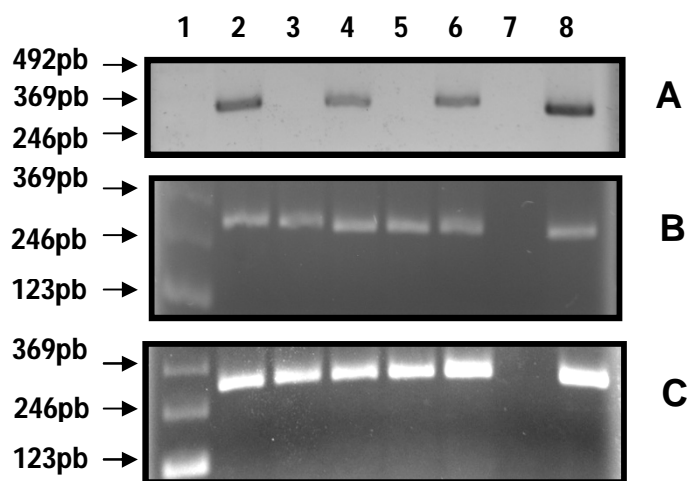


Figura 1. Comportamiento de la expresión de Cox-1 y Cox-2 en los diferentes grupos de muestras analizadas. En el panel **A** se muestra la expresión de Cox-2 siendo el producto esperado de 369 pb. En el panel **B** tenemos la expresión de Cox-1 en el cual el producto amplificado es de 303 pb y el panel **C** muestra la expresión de β -actina el cual se utilizó como control de carga, con su producto amplificado de 316 pb. En el carril **1**, marcador de peso molecular de 123 pb, carril **2, 3, 4** y **6**: citologías con LEIGB; carril **5**: citología sin LEI/VPH negativa; carril **7**: control negativo donde se utilizó toda la mezcla de reacción pero sin cDNA, carril **8**: control positivo para Cox-2 (CMSP estimuladas con LPS, *E coli* serotipo 0111:B4).

Para la evaluación en los niveles de expresión de los mensajeros (Cox-1 y Cox-2) se aplicó la prueba estadística de ANOVA de una vía, la cual nos permitió comprobar si existía diferencia estadísticamente significativa entre la expresión de ambos mensajeros con respecto a cada grupo estudiado (sin LEI/VPH negativas, sin LEI/VPH positivas y LEIBG).

La expresión del mensajero de Cox-1 se identificó en el total de las 90 muestras analizadas de los tres diferentes grupos de citologías analizadas, en el caso de las 17 citologías sin LEI, VPH negativas su media fue de 18.62 ± 7.36 UAD. Las citologías sin LEI/VPH (+) tuvieron una media en su nivel de expresión del mensajero de Cox-1 de 22.92 ± 8.47 UAD, 4 UAD por arriba que las citologías sin infección por VPH, en las citologías con LEIBG mostraron una media en la expresión del mismo transcrito de 30.54 ± 12.13 UAD, 7 UAD por arriba de las citologías sin LEI y sin infección por VPH. En el análisis estadístico muestra claramente que existe una diferencia estadísticamente significativa al comparar las medias de la expresión del mensajero de Cox-1 entre los grupos de citologías sin LEI/VPH (-) y las LEIBG con un valor de $p = < 0.001$ y cuando se compara la media de la expresión del mismo mensajero en el grupo de citologías sin LEI/VPH (+) y las LEIBG con un valor de $p = 0.011$ (figura 2).

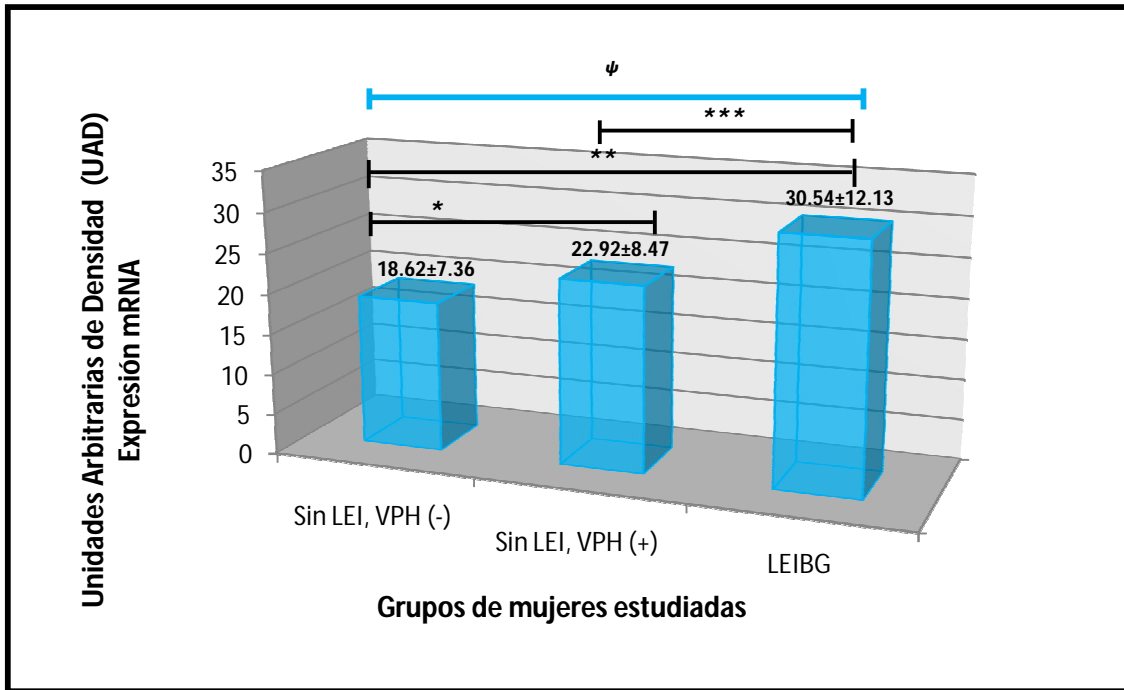


Figura 2. Niveles de expresión del mRNA de Cox-1 de acuerdo al grupo de mujeres estudiadas. Los valores de expresión del mensajero son representados en medias \pm DE. Los asteriscos denotan las comparaciones hechas entre los grupos, * $p=0.56$, ** $p<0.001$, *** $p=0.011$ mediante ajuste de Bonferroni y ψ $p=0.0003$ la comparación total entre los 3 grupos realizada por ANOVA de una vía. LEI: Lesión escamosa intraepitelia, LEIBG: Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado, VPH: virus del papiloma humano

El grupo de citologías sin LEI/VPH (-) no presentó expresión del mensajero de Cox-2. Sin embargo, en el grupo de citologías sin LEI/VPH (+) solo una fue positiva para Cox-2 con una media de 2.63 ± 13.43 UAD, destacando que el tipo de VPH diagnosticado en dicha muestra fue el 16. En el grupo de citologías con LEIBG solo 14 de 47 muestras amplificaron el mensajero de Cox-2 con una media de 8.49 ± 16.79 UAD contando la mayoría de estas muestras con infección por tipos de VPH-AR. Una diferencia de 6 UAD en la media de expresión del mensajero de Cox-2 entre el grupo de citologías sin LEI/VPH (+) y LEIBG. Mediante la prueba de ajuste de Bonferroni se determinó que únicamente existen diferencias estadísticamente significativas al comparar la media de la expresión del mRNA de Cox-2 entre los grupos de citologías sin LEI/VPH (-) y LEIBG con un valor de $p=0.01$ y en la comparación de media entre el grupo de citologías sin LEI/VPH (+) y LEIBG con un valor de $p=0.01$ (figura 3).

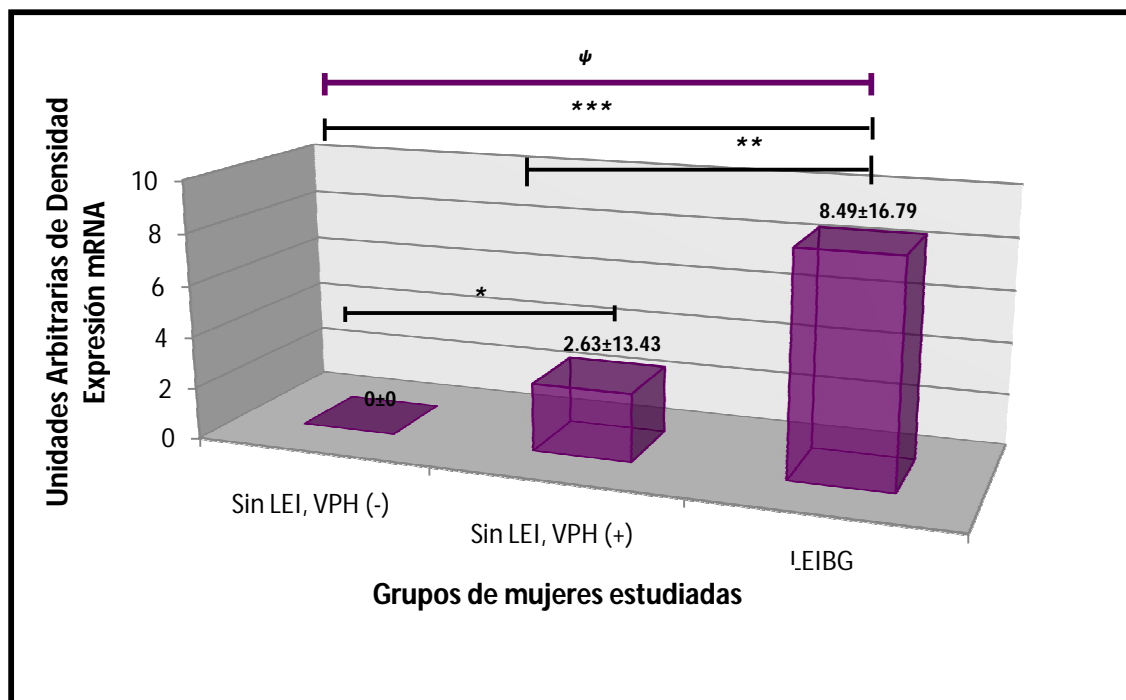


Figura 3. Niveles de expresión del mRNA de Cox-2 de acuerdo al grupo de mujeres estudiadas. Los valores en la expresión del mensajero son presentados en medias \pm DE. Los asteriscos denotan las comparaciones hechas entre los grupos, $*p=0.41$, $**p<0.01$, $***p=0.01$ mediante ajuste de Bonferroni y $\psi p=0.003$ la comparación total entre los 3 grupos realizada por ANOVA de una vía.

Se realizó la tipificación del virus del papiloma humano en las 90 citologías analizadas en colaboración con el Laboratorio de Biomedicina Molecular de la Unidad Académica de Ciencias Químico-Biológicas. Se estableció la asociación entre el tipo (s) de VPH de las pacientes con respecto a la expresión de Cox-1 y Cox-2. Se encontraron 11 genotipos diferentes de VPH de los cuales 8 (16, 18, 31, 35, 52, 58, 66 y 81) corresponden a VPH-AR y 9 genotipos virales fueron de bajo riesgo oncogénico (6, 11, 32, 42, 62, 69, 71, 84 y 90). En el grupo de mujeres con citologías sin LEI/VPH positivas, 17 de las mujeres (65.38%) fueron positivas a la infección por el virus pero no se logró una identificación satisfactoria por el método empleado, 4 muestras presentaron infección por genotipos virales de alto riesgo de los cuales 3 (11.53%) fueron por el tipo 16 y la otra muestra por el tipo viral 52, también se identificaron 2 casos con infección por más de un tipo viral de VPH.

En las LEIBG, 8 citologías (17.02%) presentaron infección viral múltiple, 18 infección por VPH de alto riesgo con las siguientes frecuencias; tipo viral 16 (12.76%), VPH 66 y VPH 81 (6.4%), VPH 18 (4.25%), VPH 31, 35, 52 y 58 con (2.12%). Así también se encontraron 12 tipos virales de bajo riesgo; VPH 6 y 84 (6.4%), VPH 11, 32, 42, 62, 69 y 71 con (2.12%) (tabla 2).

Tabla 2. Genotipos de VPH diagnosticados en las citologías cérvicovaginales

Tipo Oncogénico	Sin LEI / VPH (+)	LEIBG	Valor de p
Bajo Riesgo			<0.001
6	1(3.85)	3(6.4)	
11	0(0.0)	1(2.12)	
32	0(0.0)	1(2.12)	
42	0(0.0)	1(2.12)	
62	0(0.0)	1(2.12)	
69	0(0.0)	1(2.12)	
71	0(0.0)	1(2.12)	
84	1(3.85)	3(6.4)	
90	1(3.85)	0(0.0)	
Alto riesgo			
16	3(11.53)	6(12.76)	
18	0(0.0)	2(4.25)	
31	0(0.0)	1(2.12)	
35	0(0.0)	1(2.12)	
52	1(3.85)	1(2.12)	
58	0(0.0)	1(2.12)	
66	0(0.0)	3(6.4)	
81	0(0.0)	3(6.4)	
Infección Viral Múltiple	2(7.69)	8(17.02)	
VPH X	17(65.38)	9(19.14)	
Total	26(100)	47(100)	

Los datos son mostrados en frecuencia absoluta y relativa

LEI lesión escamosa intraepitelial

LEIBG lesión escamosa intraepitelial de bajo grado

VPH X, Virus no Identificado

Se determinó la expresión de ambos mensajeros investigados con respecto al tipo de VPH diagnosticados en las citologías (Alto riesgo, Bajo riesgo, Infección viral múltiple, VPH X) y el comportamiento de la expresión del mRNA de Cox-1 y Cox-2 cuando no existía infección por VPH, para ello se aplicó la prueba estadística ANOVA de una vía, la cual nos permitió conocer dicha asociación. Las citologías con mayor expresión del transcrito de Cox-1 fueron aquellas con infección por VPH-BR con una media en su expresión de 30.7 ± 14.8 , seguido de las citologías con infección por VPH-AR con una media de 28.9 ± 9.2 , las citologías con infección por varios tipos virales tuvieron una media en la expresión del mensajero de Cox-1 de 27.2 ± 9.8 UAD seguida por aquellas citologías positivas a la infección por VPH pero que no se logró una identificación satisfactoria por el método empleado. La expresión del mRNA de Cox-1 en estos 4 grupos de citologías solo obtuvo una varianza de 2 a 3 UAD en la media de la expresión del mensajero, pero cuando se relacionó la expresión en aquellas citologías sin infección por VPH su nivel disminuyó en aproximadamente 10 UAD con respecto a las citologías con infección por VPH-AR y VPH-BR.

La expresión del mRNA de Cox-2 solo fue detectado en aquellas citologías que tuvieron infección por VPH, presentándose la mayor expresión del mensajero en aquellas citologías con infección por VPH-AR con una media de 17.9 ± 22.0 , disminuyendo considerablemente en aquellas citologías con infección por VPH de bajo riesgo (4.9 ± 13.7), infección viral múltiple (5.9 ± 18.7) y citologías en las cuales no se identificó satisfactoriamente el tipo viral (6.3 ± 5.5) (figura 4).

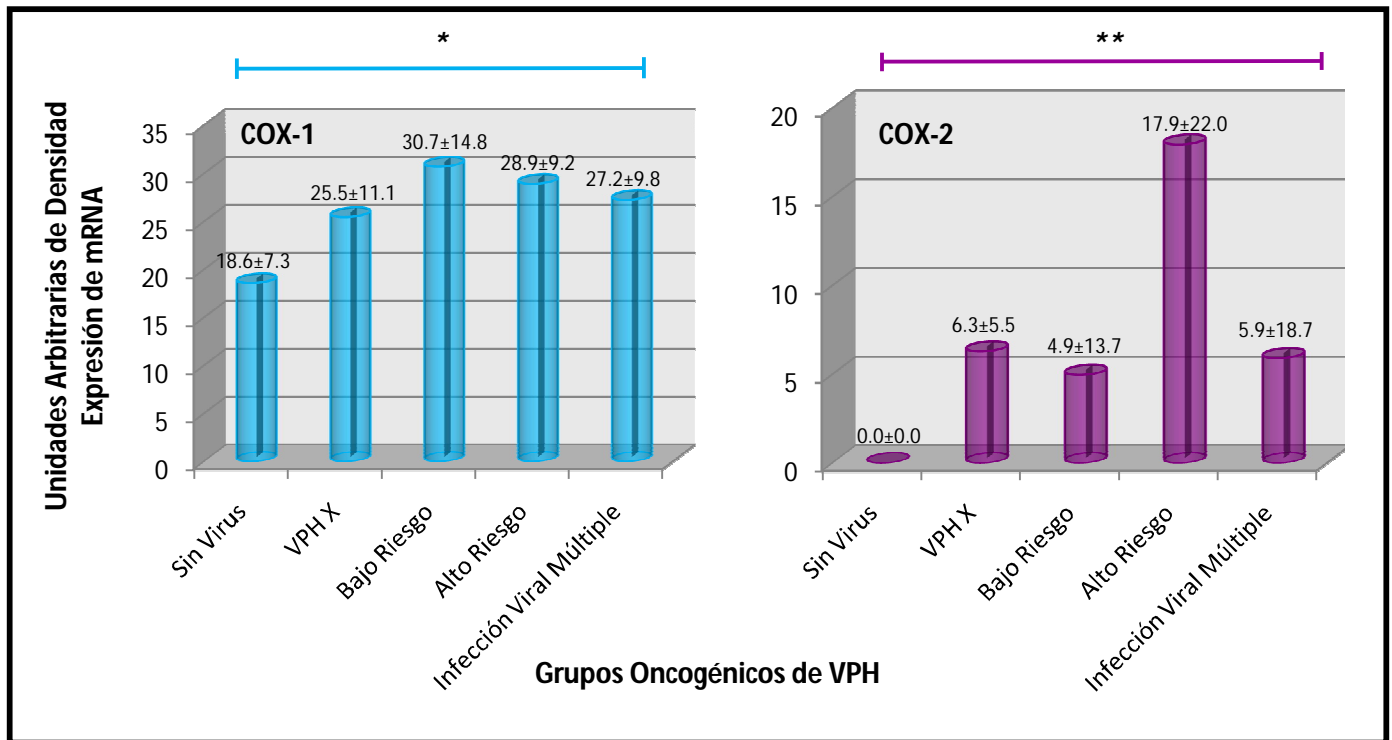


Figura 4. Niveles de expresión del mRNA de Cox-1 y Cox-2 asociado al tipo oncogénico de los VPH. Los valores en la expresión de los mensajeros son presentados en medias \pm DE. Los asteriscos denotan la comparación total entre los cinco grupos realizada de cada marcador estudiado mediante la prueba ANOVA de una vía, $*p=0.01$, $**p=0.0002$.

Se realizó la prueba estadística de Bonferroni para poder diferenciar si entre los grupos se presentaba diferencia estadística significativa al comparar las medias de expresión de ambos mensajeros. Se comparó la media del nivel de expresión del mensajero de Cox-1 entre los 4 grupos de VPH diagnosticados (VPH alto riesgo, VPH bajo riesgo, Infección viral múltiple, VPH X), únicamente se muestran resultados estadísticamente significativos al comparar la media de expresión del mensajero de Cox-1 en las citologías sin infección por VPH y aquellas citologías con infección por VPH de bajo riesgo con un valor de $p=0.017$ (tabla 3).

Tabla 3. Comparación del Nivel de expresión de mRNA de Cox-1 y Cox-2 entre los tipos oncogénicos de VPH.

Cox-1		VPH-BR	VPH X	VPH-AR	Infección viral múltiple
		30.7±14.8**	25.5±11.1**	28.9±9.2**	27.2±9.8**
VPH X	25.5±11.1**	1.000*			
VPH-AR	28.9±9.2**	1.000*	1.000*		
Infección viral múltiple	27.2±9.8**	1.000*	1.000*	1.000*	
Sin virus	18.6±7.3**	0.017*	0.426*	0.062*	0.489*

Cox-2		VPH-BR	Virus X	VPH-AR	Infección viral múltiple
		4.9±13.7**	6.3±5.5**	17.9±22.0**	5.9±18.7**
VPH X	6.3±5.5**	1.000*			
VPH-AR	17.9±22.0**	0.042*	0.000*		
Infección viral múltiple	5.9±18.7**	1.000*	1.000*	0.216*	
Sin virus	0.0±0.0**	1.000*	1.000*	0.001*	1.000*

Los datos mostrados representan las comparaciones realizadas mediante la prueba estadística de Bonferroni

VPH X, Virus no identificado

VPH-AR, Virus del papiloma humano de alto riesgo oncogénico

VPH-BR, Virus del papiloma humano de bajo riesgo oncogénico

** Expresión del mRNA de Cox-1 y Cox-2 representado en media ±DE

* Los asteriscos indican el valor de **p**

La expresión del mensajero de Cox-2 también se comparó con todos los grupos de VPH diagnosticados, obteniéndose resultados estadísticamente significativos cuando se comparó la media del nivel de expresión del mensajero Cox-2 del grupo de citologías con infección por VPH de alto riesgo con aquellas citologías sin infección por VPH con un valor de $p= 0.001$. El grupo de citologías con infección por VPH de alto riesgo en la comparación de su media de expresión del mRNA de Cox-2 con aquellas citologías con infección por VPH no identificados también mostró significancia estadística con un valor de $p=<0.001$. La comparación de la media del nivel de expresión del mismo mensajero de las citologías con infección por VPH de alto riesgo con las citologías con infección por VPH de bajo riesgo mostró significancia estadística con un valor de $p=0.04$ (tabla 3).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Diversos estudios experimentales y epidemiológicos indican que algunos procesos infecciosos (virales) y enfermedades autoinmunes, principalmente de origen crónico, generan como consecuencia un estado de inflamación crónica la cual es fuertemente asociada al desarrollo y progresión de cáncer (Mantovani *et al.*, 2008; Porta *et al.*, 2009). A pesar de la evidencia de que los VPH-AR es una condicionante fuertemente implicada para el desarrollo a cáncer cervical, la infección por VPH, por sí sola, no es garantía de progresión a cáncer (zur Hausen, 1996), la respuesta inmune de las mujeres juega un papel principal en el control de la infección por VPH y el subsecuente desarrollo a una Lesión Escamosa Intraepitelial (LEI), pues se ha observado indirectamente un aumento en su frecuencia en mujeres inmunodeficientes (pacientes con VIH-SIDA) (Nicol *et al.*, 2007). Mediante diversos estudios epidemiológicos se ha demostrado que las enzimas ciclooxigenasas (Cox-1 y Cox-2) desempeñan un papel crucial en la generación de este microambiente inflamatorio en el desarrollo a cáncer cervical (Williams *et al.*, 1999, Kulkarni *et al.*, 2001, Sales *et al.*, 2002, Gupta *et al.*, 2003, Ferrandina *et al.*, 2004, Konturek *et al.*, 2005, Munkarah y Ali-Fehmi, 2005, Naghshvar *et al.*, 2009). Sin embargo, aun no queda muy claro cuál enzima en particular y sus productos son los principales contribuyentes en la generación de este microambiente, si bien es sabido que la transcripción de Cox-2 obedece a estímulos mitóticos e inflamatorios como factores de crecimiento y diversas citocinas (Kuwano *et al.*, 2004, Munkarah y Ali-Fehmi, 2005), en estudios recientes se ha demostrado que la enzima Cox-1 que se consideraba de transcripción constitutiva también puede inducirse su expresión con diversas moléculas como VEGF (Kim *et al.*, 2003), cAMP, ácido araquidónico y la prostaglandina E₂ (Klein *et al.*, 2007).

Es por ello que se decidió buscar la expresión del mRNA de ambas enzimas (Cox-1 y Cox-2), para evidenciar cuál de ellas presentaba sobre-expresión en citologías de cérvix uterino en etapas previas a cáncer cervical y su posible asociación con la infección por el VPH. En cuanto a los niveles de

expresión de ciclooxigenasa 1 en los diferentes grupos estudiados se observó que en el grupo de citologías sin LEI/VPH positivas, con una media de 22.92 ± 8.47 UAD y en el grupo de citologías con LEIBG, con una media de 30.54 ± 12.13 UAD presentaron un aumento en la expresión del mensajero con respecto al grupo control, mujeres negativas a LEI sin infección por VPH con una media de 18.62 ± 2.36 . Presentándose entre los grupos sin LEI/VPH negativas y LEBG una diferencia de 10 UAD en su nivel de expresión del mensajero. Sin embargo, solo se obtuvo significancia estadística cuando se comparó al grupo de citologías negativas a LEI/VPH negativas con el grupo de las LEIBG ($p < 0.01$) y entre los grupos de citologías sin LEI/VPH positivas y LEIBG ($p = 0.011$).

Los niveles de expresión de la enzima ciclooxigenasa 2 no fueron detectados en ninguna de las 17 citologías sin LEI/VPH negativas, estos resultados podrían sugerirnos que ninguna de las mujeres del grupo control presentaban inflamación cervical crónica y que la presencia del VPH es importante para el desarrollo de la lesión y la expresión de las Coxs. En el grupo de citologías sin LEI/VPH positivas solo 1 de 26 muestras amplificó para el mensajero de Cox-2, obteniéndose una media de 2.63 ± 13.43 UAD, en el caso de las citologías con LEIBG 14 de un total de 47 muestras amplificaron para el mRNA de Cox-2 con una media de 8.49 ± 14.79 UAD. Al realizar el análisis estadístico se observó únicamente diferencias significativas de los niveles de expresión del mensajero de Cox-2, entre los grupos de citologías sin LEI/VPH positivas y LEIBG con un valor de $p < 0.001$ y en la comparación entre las medias de los grupos sin LEI/VPH negativas y las citologías con LEIBG con un valor de $p < 0.001$. El trabajo realizado por Vences-Velázquez en el 2007 el cual evaluó la expresión del mensajero de Cox-2 y VEGF en biopsias cervicales de mujeres guerrerenses también mostró resultados similares a los obtenidos en este estudio, amplificando el mensajero de Cox-2 en 10 muestras de un total de 43, en lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado (LEIBG) con un nivel de expresión de 0-54.9 UAD, también se evaluaron 32 muestras de lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado de las cuales 10 amplificaron el mensajero de Cox-2 con un nivel de expresión de 0-160.4 UAD, mostrando significancia estadística ambos resultados.

Se sabe que Cox-2 está involucrada en el proceso de tumorigenesis en una amplia gama de canceres (Munkarah y Ali-Fehmi, 2005), incluyendo el cáncer cervical (Kulkarni *et al.*, 2001, Ferrandina *et al.*, 2004). Las prostaglandinas las cuales son productos corriente abajo de las ciclooxigenasas, contribuyen en la inhibición de la apoptosis, promoción de la angiogénesis, invasión y metastasis (Konturek *et al.*, 2005, Rask *et al.*, 2006). Así como en otros canceres la expresión de Cox-2 es sobre-regulada, en cáncer cervical se ha demostrado este fenómeno *in vivo* e *in vitro* (Manchana *et al.*, 2006, Jeon *et al.*, 2007). En términos clínicos estas son evidencias claras que Cox-2 es sobre-expresado en muestras de cáncer cervical. En este estudio se demostró que dicha expresión se encuentra asociada a las lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado, expresándolo 14 muestras de un total de 47, con una media de 8.49 ± 16.79 UAD, además también se encontró que las LEIBG que expresaban el mensajero de Cox-2 tenían infección por VPH-AR siendo la mayoría por VPH de tipo 16. Las citologías sin LEI/VPH (+) expresaron el mRNA de Cox-2 en un mínimo nivel con una media de 2.63 ± 13.43 UAD, siendo estas citologías también positivas para VPH-AR tipo 16 y ninguna citología sin LEI/VPH negativa expresó el mensajero de Cox-2. Por lo tanto se presume que la expresión del mRNA de Cox-2 es aumentada en aquellas citologías con lesión escamosa intraepitelial y con infección por VPH-AR, en conjunto el efecto sinérgico de los cambios celulares propios de las LEIBG con el daño ocasionado por la infección de los VPH-AR propician la expresión del mensajero de Cox-2.

En cuanto a Cox-1, enzima que es considerada de mantenimiento por su expresión constitutiva en la mayoría de los tejidos y células, la cual realiza funciones importantes en varios procesos fisiológicos normales (Rouzer y Marnett, 2009). Sin embargo, se ha reportado la inducción de Cox-1 en tumores de próstata, endometrio y líneas celulares de cáncer de mama, aunque esta acción se ha observado en muy pocos estudios y no así Cox-2 (Kino *et al.*, 2005). Con respecto a canceres de tipo ginecológicos, algunos han proporcionado evidencia que Cox-1 se encuentra sobre-expresado y juega un importante papel en cáncer de ovario y cervical (Kim *et al.*, 2003). En este estudio las 17 citologías sin

LEI/VPH (-) amplificaron para el mensajero de Cox-1 con una media de 18.6 UAD tomando este nivel de expresión del mRNA de Cox-1 como base de este grupo citológico, ya que no están presentes los cambios celulares propios de las LEI y el efecto que tiene la infección del VPH en las células. Las citologías sin LEI/VPH (+) presentaron un incremento de aproximadamente 4 UAD en el nivel de expresión del mensajero de Cox-1 con respecto a la media del grupo control. Las LEIBG tuvieron 30.5 UAD en su nivel de expresión del mismo mensajero, una diferencia de más de 10 UAD con respecto al grupo control, teniendo valor estadístico esta diferencia de la expresión del mensajero de Cox-1 entre ambos grupos de citologías con un valor de $p=0.001$. La expresión del mRNA de Cox-1 en los tres grupos de citologías analizados nos muestra que si hay un incremento de la expresión de este mensajero del grupo control (citologías sin LEI/VPH -) con respecto al grupo de las citologías sin LEI/VPH (+) y las LEIBG.

Se han reportado estudios en los cuales solo se presenta sobre-expresión de solo uno de los mensajeros de las ciclooxigenasas (Cox-1 ó Cox-2), Kino et al. (2005) y Daikoku et al. (2005) demostraron que se presentaba una sobre-expresión con mayor frecuencia de Cox-1 y no Cox-2 en líneas celulares de cáncer de ovario, sugiriendo que Cox-1 era el principal contribuyente para la producción de prostaglandinas en líneas de cáncer de ovario. Sin embargo, en nuestro estudio mostramos que ambos mensajeros presentan niveles elevados en su expresión con respecto a su grupo control, siendo el mRNA de Cox-2 el que presentó una mayor expresión con respecto a su grupo control. Estos resultados sugieren que ambos mensajeros son sobre-expresados y por lo tanto sus productos finales como lo son las prostaglandinas. Siendo principalmente la PGE_2 una molécula implicada en el proceso de carcinogenesis cervical. Se tiene reportes que la PGE_2 puede regular de una manera simultánea la sobre-expresión de Cox-1 y Cox-2, en carcinomas cervicales en una vía denominada autocrina/paracrina, debido a la estimulación de los receptores de EP (Sales *et al.*, 2002), señalización que desencadena la activación de la transcripción de Cox-1 y Cox-2 participando en un proceso cíclico de sobre-expresión de ambos mensajeros.

Se ha reportado también que la PGE₂ puede inducir la expresión de factores angiogénicos como el factor inductor de hipoxia 1 alfa (HIF-1 α), el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), angiopoyectina 1 y angiopoyectina 2 (Sales *et al.*, 2002, Vences-Velázquez, 2007). En un estudio previo realizado por este grupo de trabajo se demostró que VEGF se encontraba sobre-expresado en LEIBG y LEIAG de mujeres guerrerenses, además de que su expresión se encontró asociada a la expresión de Cox-2 (Romero-Hernández, 2009). Así pues la expresión de factores angiogénicos en el sitio de lesión pueden estimular la formación de nuevos vasos sanguíneos necesarios para el aseguramiento de nutrientes y oxígeno que ayudan en el mantenimiento de las células transformadas.

Otra molécula que ha sido asociada a la sobre-expresión de Coxs es la MMP-9 la cual participa en la remodelación y degradación de la matriz extracelular en el tejido y debido a ello facilitan la invasión de células tumorales y la subsecuente invasión vascular (Sheu *et al.*, 2003), Romero-Hernández, (2009) mediante inmunohistoquímica demostró que el 70% del tejido sano analizado era negativo a esta proteína, pero en LEIBG y LEIAG mostraron un 80% y 75% de positividad respectivamente. Por lo tanto la vía de señalización Cox-1/Cox-2 – PGE₂ pudiera ser identificada como una de las principales vías que promueven el crecimiento celular y la supervivencia de las células transformadas que es capaz de mediar a otras moléculas claves en los denominados sellos del cáncer como son: un ambiente inflamatorio, insensibilidad a señales anti-crecimiento, autosuficiencia en señales de crecimiento, evasión de la apoptosis, angiogénesis sostenida, potencial replicativo ilimitado, invasión de tejido y metastasis, procesos necesarios para el desarrollo a cáncer (Greenhough *et al.*, 2009).

También se evaluó la expresión del mRNA de Cox-1 y Cox-2 con respecto el tipo de VPH presentes en las citologías, con la finalidad de establecer si su expresión se encontraba influenciada por la infección del VPH. Es necesario precisar que la conformación categórica de los grupos de VPH, para una mejor comprensión del análisis estadístico, fue de la siguiente manera: en el grupo de VPH de bajo riesgo incluyó (tipos virales de bajo riesgo y riesgo no determinado),

el grupo de VPH de alto riesgo incluyó (tipos virales de probable alto riesgo y alto riesgo), el grupo de VPH de infección viral múltiple a aquellas citologías por más de dos tipos virales. El grupo de citologías con infección por VPH de bajo riesgo fueron las citologías con mayor expresión del mensajero de Cox-1 con una media de 30.7 ± 14.8 UAD, siguiendo las citologías con infección por VPH-AR con una media de 28.9 ± 9.2 UAD, el grupo de citologías con infección por más de dos tipos virales tuvo una media de 27.2 ± 9.8 UAD, seguido de aquellas citologías en las que no se identificó el VPH (VPH X) con una media de 25.5 ± 11.1 UAD, se esperaba que aquellas citologías con infección por VPH-AR tuvieran el nivel más alto en expresión del mRNA de Cox-1 seguido de las citologías con infección por más de un tipo viral, ya que en este grupo se encuentran actuando en conjunto varios tipos de VPH y la mayoría de este grupo de citologías presentan al menos un tipo de VPH-AR, y en los grupos con menor expresión del mensajero de Cox-1 tendríamos a las citologías con infección por VPH-BR y las citologías en las que no se tuvo una identificación plena del VPH. Sin embargo, debido al arreglo de los grupos de VPH planteado con anterioridad se pudiera explicar que en el grupo de citologías con VPH-BR, los tipos virales de riesgo no determinado esten ocasionado la sobre-expresión del mensajero de Cox-1 y no los tipos virales de bajo riesgo. Además entre los 4 grupos de citologías con infección por VPH (Alto riesgo, Bajo riesgo, Infección viral múltiple y virus no identificado), se observa una variación en sus niveles de expresión del mensajero de Cox-1 de aproximadamente 5 UAD. El análisis estadístico mostró que las citologías con infección por VPH-BR en comparación a aquellas sin infección viral tienen significancia estadística con un valor de $p=0.017$, la comparación de las citologías con infección por VPH-AR con respecto a las citologías sin infección por VPH mostró un valor muy cercano a tener significancia estadística ($p=0.06$), como se mencionó anteriormente este resultado puede ser debido al ajuste del grupo formado por VPH-AR y a los tipos virales de probable alto riesgo. Estos hallazgos sugieren que aquellas mujeres con infección por VPH-BR y VPH-AR pueden sobre-expresar el mensajero de Cox-1 en contraste a aquellas mujeres que no presentan infección por ningún tipo de VPH.

Al asociar la expresión del mensajero de Cox-2 con el tipo viral de VPH se obtuvieron resultados mas claros, en el grupo de citologías sin infección por VPH (grupo control) ninguna citología amplificó para el mensajero de Cox-2, entonces tomamos al valor de 0 como valor de la expresión del mensajero de Cox-2 en aquellas citologías en las que el VPH no esta presente. Las citologías con infección de VPH-AR tuvieron el mayor nivel de expresión del mRNA de Cox-2 con una media de 17.9 ± 22.0 UAD, seguidas de las citologías con infección por VPH no identificado con una media de 6.3 ± 5.5 UAD, obteniendo el menor nivel de expresión del mensajero de Cox-2 aquellas citologías con infección por más de dos tipos virales de VPH y de bajo riesgo con una media de 5.9 ± 18.7 y 4.9 ± 13.7 UAD respectivamente. El análisis estadístico mostró, mediante la comparación de las medias de la expresión del mensajero Cox-2 con respecto a los diferentes tipos de VPH, que las mujeres con citologías con infección por VPH-AR pueden sobre-expresar el mRNA de Cox-2 en comparación a aquellas sin ningún tipo de VPH, así también de las citologías por los VPH-BR, debido a que las tres comparaciones de las medias del nivel de expresión de Cox-2 que tuvieron significancia estadística fueron las siguientes: citologías con infección por VPH-AR con respecto a las citologías con infección por VPH-BR ($p=0.04$), citologías con infección por VPH-AR con respecto a las citologías en las que no se identificó el VPH satisfactoriamente ($p<0.001$), citologías con infección por VPH-AR con aquellas que no tenían infección por ningún tipo viral ($p=0.001$).

Estos resultados podrían explicarse ya que en estudios recientes se ha demostrado que proteínas provenientes de los papilomavirus humanos, “oncoproteínas” como E6 y E7 principalmente de los VPH de alto riesgo oncogénico, como el tipo viral 16 y 18 pueden estimular la transcripción del mRNA de Cox-2 por el aumento en la unión del factor de transcripción AP-1 en una región promotora del gen denominada sitio CRE (Subbaramaiah, 2007). También empieza a tomar fuerza la hipótesis en relación a la oncoproteína E5 del tipo viral 16, ya que esta es capaz de activar a factores transcripcionales como AP-1 y NF- κ B. Sin embargo, Su-Hyeong et al. (2009) demostró que NF- κ B era el principal factor inductor de la expresión de Cox-2 junto con el factor AP-1, pero que este

tenía un papel menor, además que la vía de señalización desencadenada mediante E5 difiere de la disparada por las oncoproteínas E6 y E7. (Subbaramaiah, 2007, Kim *et al.*, 2009).

En conclusión nuestros resultados muestran que la expresión del mRNA de Cox-1 y Cox-2 se encuentra con mayor frecuencia sobre-expresado en las Lesiones Escamosas Intraepiteliales de Bajo Grado. En base a nuestros resultados el mensajero de Cox-2 mostró mejor utilidad que Cox-1 como biomarcador celular de una lesión temprana, el cual nos puede ayudar a discernir una citología sin LEI de una LEIBG y con ello ayudar en el pronóstico de una LEI.

La expresión de Cox-1 y Cox-2 se encuentra influenciada principalmente por VPH de alto riesgo oncogénico. Por lo tanto se sugiere que aquellas citologías que presenten una LEI e infección por VPH-AR, sobre-expresarán ambos mensajeros ocasionando sobre-regulación de moléculas claves en el proceso de la carcinogénesis cervical.

Estos hallazgos evidencian a los enzimas Cox-1 y Cox-2 como moléculas importantes en el desarrollo de lesiones cervicales tempranas y que pudieran utilizarse como moléculas blancas para evitar el desarrollo de Lesiones Escamosas Intraepiteliales de Alto Grado y Cáncer.

REFERENCIAS

- CASTLE, P. E.** (2004) Beyond human papillomavirus: the cervix, exogenous secondary factors, and the development of cervical precancer and cancer. *J Low Genit Tract Dis*, 8, 224-30.
- CASTLE, P. E. & GIULIANO, A. R.** (2003) Chapter 4: Genital tract infections, cervical inflammation, and antioxidant nutrients--assessing their roles as human papillomavirus cofactors. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 29-34.
- CASTLE, P. E., HILLIER, S. L., RABE, L. K., HILDESHEIM, A., HERRERO, R., BRATTI, M. C., SHERMAN, M. E., BURK, R. D., RODRIGUEZ, A. C., ALFARO, M., HUTCHINSON, M. L., MORALES, J. & SCHIFFMAN, M.** (2001) An association of cervical inflammation with high-grade cervical neoplasia in women infected with oncogenic human papillomavirus (HPV). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 10, 1021-7.
- FERRANDINA, G., RANELLETTI, F. O., LEGGE, F., GESSI, M., SALUTARI, V., DISTEFANO, M. G., LAURIOLA, L., ZANNONI, G. F., MARTINELLI, E. & SCAMBIA, G.** (2004) Prognostic role of the ratio between cyclooxygenase-2 in tumor and stroma compartments in cervical cancer. *Clin Cancer Res*, 10, 3117-23.
- FITZGERALD, G. A.** (2003) COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease. *Nat Rev Drug Discov*, 2, 879-90.
- FLOWER, R. J.** (2003) The development of COX2 inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*, 2, 179-91.
- GERMANO, G., ALLAVENA, P. & MANTOVANI, A.** (2008) Cytokines as a key component of cancer-related inflammation. *Cytokine*, 43, 374-9.
- GONDA, T. A., TU, S. & WANG, T. C.** (2009) Chronic inflammation, the tumor microenvironment and carcinogenesis. *Cell Cycle*, 8, 2005-13.
- GREENHOUGH, A., SMARTT, H. J., MOORE, A. E., ROBERTS, H. R., WILLIAMS, A. C., PARASKEVA, C. & KAIDI, A.** (2009) The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis*, 30, 377-86.
- GRM, H. S., BERGANT, M. & BANKS, L.** (2009) Human papillomavirus infection, cancer & therapy. *Indian J Med Res*, 130, 277-85.
- GUPTA, R. A. & DUBOIS, R. N.** (2001) Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat Rev Cancer*, 1, 11-21.
- GUPTA, R. A., TEJADA, L. V., TONG, B. J., DAS, S. K., MORROW, J. D., DEY, S. K. & DUBOIS, R. N.** (2003) Cyclooxygenase-1 is overexpressed and promotes angiogenic growth factor production in ovarian cancer. *Cancer Res*, 63, 906-11.
- HAHN, E., KRAUS, S. & ARBER, N.** (2010) Role of cyclooxygenase-2 in pathogenesis and prevention of colorectal cancer. 28, 585-9.
- HAMMES, L. S., TEKMAL, R. R., NAUD, P., EDELWEISS, M. I., KIRMA, N., VALENTE, P. T., SYRJANEN, K. J. & CUNHA-FILHO, J. S.** (2008) Up-regulation of VEGF, c-fms and COX-2 expression correlates with severity of cervical cancer precursor (CIN) lesions and invasive disease. *Gynecol Oncol*, 110, 445-51.
- HOWE, L. R., CHANG, S. H., TOLLE, K. C., DILLON, R., YOUNG, L. J., CARDIFF, R. D., NEWMAN, R. A., YANG, P., THALER, H. T., MULLER, W. J., HUNDIS, C., BROWN, A. M., HLA, T., SUBBARAMAIAH, K. & DANNENBERG, A. J.** (2005) HER2/neu-induced mammary tumorigenesis and angiogenesis are reduced in cyclooxygenase-2 knockout mice. *Cancer Res*, 65, 10113-10119.
- HWANG, D., SCOLLARD, D., BYRNE, J., AND LEVINE, E.** (1998) Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst*, 455-460.

- JEON, Y. T., SONG, Y. C., KIM, S. H., WU, H. G., KIM, I. H., PARK, I. A., KIM, J. W., PARK, N. H., KANG, S. B., LEE, H. P. & SONG, Y. S.** (2007) Influences of cyclooxygenase-1 and -2 expression on the radiosensitivities of human cervical cancer cell lines. *Cancer Lett*, 256, 33-8.
- KIM, M. H., SEO, S. S., SONG, Y. S., KANG, D. H., PARK, I. A., KANG, S. B. & LEE, H. P.** (2003) Expression of cyclooxygenase-1 and -2 associated with expression of VEGF in primary cervical cancer and at metastatic lymph nodes. *Gynecol Oncol*, 90, 83-90.
- KIM, S. H., OH, J. M., NO, J. H., BANG, Y. J., JUHN, Y. S. & SONG, Y. S.** (2009) Involvement of NF-kappaB and AP-1 in COX-2 upregulation by human papillomavirus 16 E5 oncoprotein. *Carcinogenesis*, 30, 753-7.
- KINO, Y., KOJIMA, F., KIGUCHI, K., IGARASHI, R., ISHIZUKA, B. & KAWAI, S.** (2005) Prostaglandin E2 production in ovarian cancer cell lines is regulated by cyclooxygenase-1, not cyclooxygenase-2. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 73, 103-111.
- KLEIN, T., SHEPHARD, P., KLEINERT, H. & KOMHOFF, M.** (2007) Regulation of cyclooxygenase-2 expression by cyclic AMP. *Biochim Biophys Acta*, 1605-1618.
- KONTUREK, P. C., KANIA, J., BURNAT, G., HAHN, E. G. & KONTUREK, S. J.** (2005) Prostaglandins as mediators of COX-2 derived carcinogenesis in gastrointestinal tract. *J Physiol Pharmacol*, 56 Suppl 5, 57-73.
- KULKARNI, S., RADER, J. S., ZHANG, F., LIAPIS, H., KOKI, A. T., MASFERRER, J. L., SUBBARAMAIAH, K. & DANNENBERG, A. J.** (2001) Cyclooxygenase-2 is overexpressed in human cervical cancer. *Clin Cancer Res*, 7, 429-34.
- KUWANO, T., NAKAO, S., YAMAMOTO, H., TSUNEYOSHI, M., YAMAMOTO, T., KUWANO, M. & ONO, M.** (2004) Cyclooxygenase 2 is a key enzyme for inflammatory cytokine-induced angiogenesis. *FASEB J*, 18, 300-10.
- L. RINCÓN O** (2007) Human papillomavirus, immune response and cervical cancer: a complex relationship. *Revista Colombiana de Obstetricia y ginecología*, 58, 11.
- MANCHANA, T., TRIRATANACHAT, S., SIRISABYA, N., VASURATNA, A., TERMRUNGRUANGLERT, W. & TRESUKOSOL, D.** (2006) Prevalence and prognostic significance of COX-2 expression in stage IB cervical cancer. *Gynecol Oncol*, 100, 556-60.
- MANTOVANI, A., ALLAVENA, P., SICA, A. & BALKWILL, F.** (2008) Cancer-related inflammation. *Nature*, 454, 436-44.
- MOTOYAMA, S., LADINES-LLAVE, C. A., LUIS VILLANUEVA, S. & MARUO, T.** (2004) The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *Kobe J Med Sci*, 50, 9-19.
- MULLER-DECKER, K., NEUFANG, G., BERGER, I., NEUMANN, M., MARKS, F. & FURSTENBERGER, G.** (2002) Transgenic cyclooxygenase-2 overexpression sensitizes mouse skin for carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 12483-12488.
- MUNKARAH, A. & ALI-FEHMI, R.** (2005) COX-2: a protein with an active role in gynecological cancers. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 17, 49-53.
- NAGHSHVAR, F., TORABIZADEH, Z., EMADIAN, O., ENAMI, K. & GHAREMANI, M.** (2009) Correlation of cyclooxygenase 2 expression and inflammatory cells infiltration in colorectal cancer. *Pak J Biol Sci*, 12, 98-100.
- NEUFANG, G., FURSTENBERGER, G., HEIDT, M., MARKS, F. & MULLER-DECKER, K.** (2001) Abnormal differentiation of epidermis in transgenic mice constitutively expressing cyclooxygenase-2 in skin. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 7629-7634.
- NICOL, A. F., SALOMAO-ESTEVEZ, A., OLIVEIRA, M. P., PIRMEZ, C., NUOVO, G. J., GRINSZTEJN, B., TRISTAO, A., RUSSOMANO, F. & LAPA E SILVA, J. R.** (2007) Immune factors involved in the cervical immune response in the HIV/HPV co-infection. *Journal of Clinical Pathology*, 1, 6.

- OSHIMA, H., OSHIMA, M., INABA, K. & TAKETO, M. M.** (2004) Hyperplastic gastric tumors induced by activated macrophages in Cox-2/mPGES-1 transgenic mice. *Embo. J.*, 23.
- OSHIMA, M., DINCHUK, J. E., KARGMAN, S. L., OSHIMA, H., HANCOCK, B., KWONG, E., TRZASKOS, J. M., EVANS, J. F. & TAKETO, M. M.** (1996) Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell* 87, 803-809.
- PORTA, C., LARGHI, P., RIMOLDI, M., TOTARO, M. G., ALLAVENA, P., MANTOVANI, A. & SICA, A.** (2009) Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer. *Immunobiology*, 214, 761-77.
- RASK, K., ZHU, Y., WANG, W., HEDIN, L. & SUNDFELDT, K.** (2006) Ovarian epithelial cancer: a role for PGE2-synthesis and signalling in malignant transformation and progression. *Mol Cancer*, 5, 62.
- ROMERO-HERNÁNDEZ, M. A.** (2009) Expresión de COX-2, MMP-9 y VEGF en lesiones premalignas de cérvix uterino e infección por el virus del papiloma humano. *Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas*, 29.
- ROUZER, C. A. & MARNETT, L. J.** (2009) Cyclooxygenases: structural and functional insights. *J Lipid Res*, 50 Suppl, S29-34.
- SALES, K. J., KATZ, A. A., HOWARD, B., SOETERS, R. P., MILLAR, R. P. & JABBOUR, H. N.** (2002) Cyclooxygenase-1 is up-regulated in cervical carcinomas: autocrine/paracrine regulation of cyclooxygenase-2, prostaglandin e receptors, and angiogenic factors by cyclooxygenase-1. *Cancer Res*, 62, 424-32.
- SAMUELSSON, B., MORGENSTERN, R. & JAKOBSSON, P. J.** (2007) Membrane prostaglandin E synthase-1: a novel therapeutic target. *Pharmacol Rev*, 59, 207-24.
- SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, J. A., HUERTA-PINEDA, M. I., RIVERA-TAPÍA, J. A. & ROSALES-PÉREZ, M.** (2005) Infección por VPH y cáncer cervicouterino. *Rev Mex Patol Clin*, 52, 222-233.
- SARIAN, L. O., DERCHAIN, S. F., YOSHIDA, A., VASSALLO, J., PIGNATARO, F. & DE ANGELO ANDRADE, L. A.** (2006) Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and Ki67 as related to disease severity and HPV detection in squamous lesions of the cervix. *Gynecol Oncol*, 102, 537-41.
- SHEU, B., LIEN, H. & HO, H.** (2003) Increased Expression and Activation of Gelatinolytic Matrix Metalloproteinases Is Associated with the Progression and Recurrence of Human Cervical Cancer. *AACR*, 63, 6537-42.
- SMITH, A.** (2002) Time for a new COX. *NATURE REVIEWS*, 1, 1.
- SMITH, J. S., HERRERO, R., BOSETTI, C., MUNOZ, N., BOSCH, F. X., ELUF-NETO, J., CASTELLSAGUE, X., MEIJER, C. J., VAN DEN BRULE, A. J., FRANCESCHI, S. & ASHLEY, R.** (2002) Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*, 94, 1604-13.
- SOBOLEWSKI, C., CERELLA, C., DICATO, M., Ghibelli, L. & DIEDERICH, M.** The role of cyclooxygenase-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies. *Int J Cell Biol*, 2010, 215158.
- SSA** (2009) Rendición de Cuentas en Salud. *Secretaría de Salud*, 139.
- SUBBARAMAIAH, K. E. A.** (2007) Cyclooxygenase-2 transcription is regulated by human papillomavirus 16 E6 y E7 oncoproteins: evidence of a corepressor/coactivator exchange. *Cancer Res*, 67, 3976-3985.
- SUGIMOTO, T., KOIZUMI, T., SUDO, T., YAMAGUCHI, S., KOJIMA, A., KUMAGAI, S. & NISHIMURA, R.** (2007) Correlative expression of cyclooxygenase-1 (Cox-1) and human epidermal growth factor receptor type-2 (Her-2) in endometrial cancer. *Kobe J Med Sci*, 53, 177-87.

- TAKIKO DAIKOKU, S. T., IRINA N. TROFIMOVA, DANIELA M. DINULESCU.** (2006) Cyclooxygenase-1 Is Overexpressed in Multiple Genetically Engineered Mouse Models of Epithelial Ovarian Cancer. *Cancer Res*, 5, 5.
- TIANO, H. F., LOFTIN, C. D., AKUNA, J., LEE, C. A., SPALDING, J., SESSOMS, A., DUNSON, D. B., ROGAN, E. G., MORHAM, S. G., SMART, R. C. & LANGENBACH, R.** (2002) Deficiency of either cyclooxygenase (COX-1) o COX-2 alters epidermal differentiation and reduces mouse skin tumorigenesis. *Cancer Res.*, 62, 3395-3401.
- VENCES-VELÁZQUEZ, A.** (2007) Expresión de ciclooxigenasa-2 y el factor de crecimiento del endotelio vascular en cáncer cervicouterino y virus del papiloma humano. *Instituto Politecnico Nacional*, 73.
- VON RAHDEN, B. H., STEIN, H. J., PUHRINGER, F., KOCH, I., LANGER, R., PIONTEK, G., SIEWERT, J. R., HOFER, H. & SARBIA, M.** (2005) Coexpression of cyclooxygenases (COX-1, COX-2) and vascular endothelial growth factors (VEGF-A, VEGF-C) in esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res*, 65, 5038-44.
- WILLIAMS, C. S. & DUBOIS, R. N.** (1996) Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms? *Am J Physiol*, 270, G393-400.
- WILLIAMS, C. S., MANN, M. & DUBOIS, R. N.** (1999) The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene*, 18, 7908-16.
- WOODMAN, C. B., COLLINS, S. I. & YOUNG, L. S.** (2007) The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer*, 7, 11-22.