



UNIVERSIDAD ABIERTA Y A DISTANCIA DE MÉXICO



DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA SALUD,
BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

Proteínas MUC1 y MUC4 como posibles biomarcadores de progresión a malignidad en tejidos de cérvix con VPH.

PROYECTO TERMINAL QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA PRESENTA:

Yanira Alvarado Rodríguez.

ASESOR: Dr.J. Gabriel Díaz de León Díaz de León.

Gineco Obstetra y Docente.

ASESORA INTERNA: Dra. Diana Elinos Calderón.

Dedicatoria

Este trabajo se lo dedico muy especialmente **a mi esposo** por estar conmigo y ser parte de lo que es ahora mi felicidad, compartiendo mis logros y fracasos, y a mis **hijas Diana y Nahiby**, por ser mi motor y fortaleza en mi vida y siendo la fuente de inspiración para seguir con mi superación, por ese apoyo incondicional y por la manera que me han enseñado a seguir y no rendirme.

A mis padres **Ma. Auxilio Rodríguez y Jesús Alvarado**, también este agradecimiento que lo único que han hecho durante mi vida, es apoyarme para ser una mejor persona.

ÍNDICE

DEDICATORIA	-----	2
INDICE	-----	3
INDICE DE ABREVIATURAS, INDICE DE TABLAS	-----	6,7
RESUMEN	-----	10
INTRODUCCION	-----	11
ANTECEDENTES	-----	12
FACTORES DE RIESGO DEL CACU	-----	14
EPIDEMIOLOGIA DEL VPH	-----	15
PREVALENCIA	-----	16
INCIDENCIA	-----	16
METODOS DE DETENCION DEL VPH	-----	17
TRANSMISION DEL VPH	-----	18
CARACTERISTICAS DEL VPH	-----	19
CICLO VITAL DE LOS VPH	-----	20
ALTERACIONES DEL EPITELIO CERVICAL	-----	21
METODOS DE DETECCION DEL CaCu	-----	22
LESIONES PREMALIGNAS DEL CANCER DE CUELLO UTERINO	----	23
LESIONES INTRAEPITELIAL ESCAMOSA DE ALTO GRADO	-----	24
ANTECEDENTES DIRECTOS	-----	26
MARCADORES DE NEOPLASIAS CERVICALES	-----	26
MUCINAS	-----	27
INTERACCION DE LAS MUCINAS CON PROTEINAS EXTRA-INTRACELULAR	-	28
MUCINAS TRANMEMBRANALES E INTERACCION CON PROTEINAS	---	30
FUNCION DE LAS SUBUNIDADES ALFA Y BETA DE MUC1	-----	31

SUBUNIDAD BETA -----	32
PROTEÍNA MUC4-----	33
FUNCION DE LAS SUBUNIDADES ALFA Y BETA EN MUC4 -----	34
EXPRESION DE MUC1 Y MUC4 -----	35
APARATO REPRODUCTOR FEMENINO -----	36
MUCINAS COMO MARCADORES EN NEOPLASOAS CERVICALES -----	40
JUSTIFICACION-----	41
HIPOTESIS -----	42
OBJETIVO GENERAL -----	42
OBJETIVOS PARTICULARES-----	42
DESARROLLO EXPERIMENTAL -----	43
MATERIALES Y MÉTODOS -----	44
CORTE DE MUESTRAS -----	45
TINCION PAS-AZUL ALCIANO -----	46
INMUNOHISTOQUIMICA -----	47
ANTICUERPOS USADOS DURANTE EL ESTUDIO -----	48
HIBRITACIÓN <i>in situ</i> CROMOGENICA (CISH) -----	49
RESULTADOS -----	50
CLASIFICACION POR EDAD -----	51
PRESENCIA DE MUCOPOLISACARIDOS ÁCIDOS Y NEUTROS. -----	52
TINCIÓN DE MUESTRAS -----	54
IDENTIFICACION DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO -----	56
EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS L1 DEL VPH DE ALTO RIESGO. -----	58
CISH DE VPH DE ALTO RIESGO -----	59
BIOMARCADORES EN NEOPLASIAS CERVICALES -----	60

HISTOPATOLÓGICOS. -----	61
IDENTIFICACIÓN DEL P16 -----	62
IDENTIFICACION DE P53 -----	63
EXPRESIÓN DE BIOMARCADORES P53 EN LOS DIFERENTES DIAGNOSTICOS HISTOPATOLÓGICOS. -----	64
MUCINAS EN NEOPLASIAS CERVICALES. -----	65
EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA MUC1 -----	66
EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA MUC1 EN LOS DIFERENTES DIAGNOSTICOS HISTOPATOLÓGICOS. -----	69
IDENTIFICACIÓN DE MUC4 -----	70
EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA MUC4 EN LOS DIFERENTES DIAGNOSTICOS HISTOPATOLÓGICOS. -----	72
DISCUSIÓN -----	73
CONCLUSIÓN -----	75
PRESPECTIVAS AL FUTURO -----	76
REFERENCIAS -----	77

INDICE DE ABREVIATURAS

A:	Adenina
AP:	Proteína acoplada
AP1:	Factor de transcripción
AR:	Alto riesgo
ARNm:	Ácido ribonucleico mensajero
ASCUS:	Atipia de Células Escamosas de Significado Indeterminado
ATP:	Adenosín trifosfato
BAX:	Regulador de apoptosis
BR:	Bajo riesgo
BS:	Bissulfosuccinimidyl suberate
C:	citosina
CaCu:	Cáncer Cérvico-uterino
CDK:	Cinasa dependiente de ciclina
C-FOS:	Proto-oncogén
DNA:	Acido desoxirribonucleico
ELISA:	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
FAS:	Proteína de superficie de muerte celular.
G:	guanina
GAL:	galectina
IHQ:	inmunohistoquímica
INEGI:	Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática.
ISH:	Hibridación in situ
KI-67:	Proteína asociada a la proliferación celular
L1, L2:	Proteína tardías, codifican la Cápside
Met:	metionina
NIC:	Neoplasia Intraepitelial Cervical

OMS: Organización Mundial de la Salud
P16: Proteína supresora de tumores
P53: Proteína supresora de tumores
T: timina
U: uracilo
VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana.
VPH: Virus del Papiloma Humano

INDICE DE TABLAS

No. De tabla	Nombre
1	Tasa de mortalidad hospitalaria de la población de 20 años y más, Por principales tumores malignos según edad y sexo.
2	Casos y tasa de incidencia por entidad federativa de hombres y mujeres en Estados Unidos Mexicanos.
3	Clasificación citológica, mostrando las diferentes clasificaciones con las que se puede encontrar un diagnóstico.
4	Interacción de mucinas con diferentes moléculas, métodos de detección y función.
5	Anticuerpos usados durante el estudio.
6	Diagnósticos Histopatológicos de biopsias de epitelio cervical.
7	Muestras aptas y procesadas en el estudio.
8	Intensidad de Expresión de MUC1 en muestras de cérvix.
9	Intensidad de Expresión de MUC4 en muestras de cérvix.

INDICE DE FIGURAS

No. De figura

Nombre

1. Edad promedio en que se puede adquirir el VPH hasta llegar a padecer alguna lesión premaligna o cáncer.
2. Incidencia y Mortalidad a nivel Mundial por Cáncer Cervicouterino en el 2012.
3. Tasa de incidencia de infección por el VPH del 2000-2011 en Estados Unidos Mexicanos.
4. Cápside y DNA del Virus del Papiloma Humano.
5. Estructura del epitelio escamoso estratificado cervical y la expresión de las proteínas virales en la infección del VPH.
6. Colposcopia Cervical.
7. Tinción de Papanicolaou.
8. Estudios de NIC
9. Estructura de las Mucinas membranales.
10. Funciones celulares medidas por mucinas transmembranales.
11. Localización de MUC1 en el cromosoma 1
12. Dominio de la Proteína transmembranal MUC1

13. Localización celular de la proteína MUC1

14. Mecanismo de regulación en la transcripción de MUC1 en cáncer de células epiteliales.

15. Localización de MUC4 en el cromosoma 3

16. Localización celular de la proteína MUC4

17. Mucinas transmembranales MUC1 y MUC4

18. Distribución especial de mucinas en el cuerpo humano.

19. Incidencia por edades en intervalo de 10 años en los diferentes diagnósticos histopatológicos.

20. Muestras teñidas con H &E y PAS/AA.

21. Muestras teñidas con H &E y PAS/AA

22. Expresión de la proteína L1 del VPH de alto riesgo en las diferentes muestras.

23. Expresión de la proteína L1 del VPH de alto riesgo.

RESUMEN

El cáncer cérvico-uterino es la segunda causa de muerte en mujeres en México, la edad con más incidencias reportada está entre los 65 y 74 años, teniendo en cuenta el estudio realizado de pacientes de los años 2016, 2017. Un alto porcentaje de casos con estudios tempranos de malignidad se presentan en mujeres en edades jóvenes, donde la mayor incidencia está entre los 25 y 44 años, lo cual representa una oportunidad para realizar una detención del cáncer y promover el diagnóstico de la presencia del Virus del Papiloma Humano ya que es el factor predisponente más importante. De las biopsias de cérvix analizadas, el diagnóstico más sobresaliente es el de Neoplasia Intraepitelial Cervical de grado uno (NIC1). El diagnóstico de carcinoma fue reportado a partir de los 45 años, en cambio el diagnóstico de (NIC3) fue a los 19 años, indicando que en un corto tiempo la paciente tendrá un carcinoma invasor a temprana edad. Las mucinas son utilizadas en el diagnóstico para ver la malignidad de algunos canceres como el de páncreas, la sobre-expresión de estas proteínas transmembranales en neoplasias lleva a predecir metástasis, en algunos casos la sobre-expresión de estas mucinas pueden predecir el avance en el grado de malignidad, debido a su capacidad de inhibir la apoptosis. Estas proteínas no se expresan de manera normal en el tejido cervical, la sobre-expresión de la proteína MUC1 y MUC4 en NIC1 están presentes.

INTRODUCCION

El cáncer invasor de cuello uterino viene precedido generalmente por una larga fase de lesiones preneoplásicas. Esto se caracteriza microscópicamente por una serie de manifestaciones que van de la atipia celular a diversos grados de displasia o neoplasia intraepitelial cervical (NIC), antes de progresar a una neoplasia invasora. Estas lesiones, son invisibles a simple vista y no presentan síntomas, existen considerables diferencias entre las estimaciones de las tasas de progresión y regresión de NIC. Varios estudios han concluido que NIC puede progresar a cáncer invasivo e incluso, la neoplasia *in situ* en ciertos casos puede retroceder. La infección por el virus del papiloma humano (VPH) en el aparato genital, sobre todo algunos subtipos oncogénicos, juega un papel relevante en la aparición de las lesiones intraepiteliales y su posible evolución a una neoplasia invasora. Se han utilizado marcadores de proliferación celular Ki-67 y marcadores del ciclo celular como p16 y p53, para predecir el avance de la neoplasia cervical a carcinoma invasor, teniendo en cuenta esto en otros canceres epiteliales como el pancreático se han utilizado mucinas como marcadores para predecir el avance a malignidad del carcinoma o la metástasis.

Las mucinas son glicoproteínas de gran peso molecular. Estas macromoléculas, tienen abundantes filamentos presentes en el medio intracelular y extracelular, tienen tres clasificaciones dependiendo de su función, formadoras de gel, secretoras y transmembranales. Las mucinas se producen normalmente por una gran variedad de células incluyendo el epitelio gastrointestinal, respiratorio y tractos reproductivos. No sólo ayuda en la protección del epitelio y proporcionan un material de transporte para las células, también están implicados en otras funciones importantes tales como la renovación y la diferenciación epitelial, la integridad epitelial, y carcinogénesis. Las proteínas transmembranales MUC1 y MUC4 cuando se expresan en lugares donde antes no estaban pueden llegar a ser de mal pronóstico para el paciente, ya que se han asociado en tumores que progresan a metástasis, se han usado como marcadores de progresión en tumores de origen epitelial.

ANTECEDENTES

El cáncer cérvico-uterino, es a nivel mundial el segundo cáncer más frecuente en mujeres, debido al acceso limitado a los servicios de salud, la gran mayoría de las defunciones ocurren en mujeres que viven en países de ingresos bajos y medianos. Según la OMS cada año, más de 2700 000 mujeres mueren de cáncer cérvico-uterino el cual es causado por la infección del Virus del Papiloma Humano (VPH) sexualmente adquiridas. Los tipos de VPH involucrados en la neoplasia cervical invasora son siete, 16, 18, 45, 31, 33, 52 y 58, de los cuales los más comunes son el VPH 16 y VPH 18 (1,11,14).

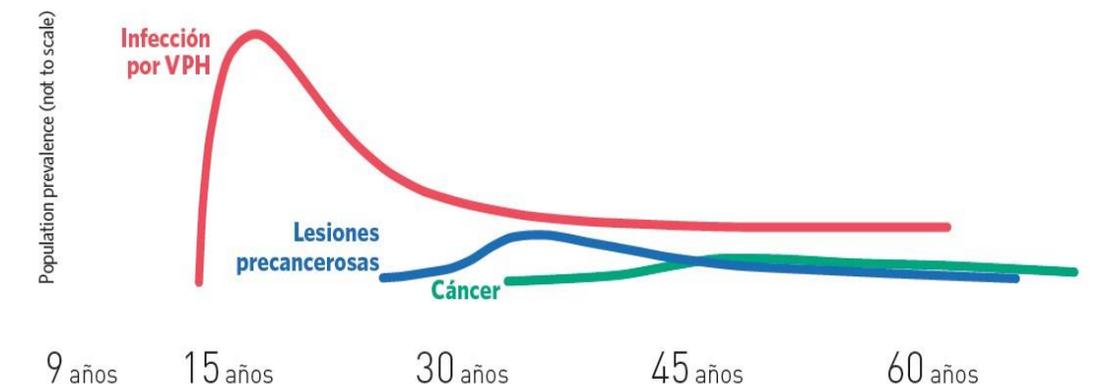


Figura No 1. Edad promedio en que se puede adquirir el VPH hasta llegar a padecer alguna lesión premaligna o cáncer. (1)

La OMS reportó que la infección por el virus del papiloma humano inicia con el comienzo de la vida sexual entre los 15 y 20 años, se pueden presentar lesiones preneoplásicas entre los 25 años en adelante y las cuales pueden progresar a cáncer después de los 30 años, como se puede observar en la figura No. -1 (1).

El cáncer cervicouterino es el tercer cáncer diagnosticado en mujeres de todo el mundo, centro América se encuentra en el sexto lugar con una incidencia del 22.3, por cada 100 mil habitantes y una mortalidad del 9.5 por cada 100 mil habitantes, visualizándolo en la Figura No. -2 (15)

En México la segunda causa de hospitalización en mujeres con diagnóstico de cáncer fue por el Cáncer Cérvico-uterino con un 9.7% en el grupo de 65 a 74 años se ubica la tasa más alta con 53 casos de cada 100 mil mujeres de ese grupo de edad, seguido por las mujeres de 50 a 59 años, con 51 de cada 100m mil mujeres de este grupo de edad, entre la acciones para prevenirlos se encuentran la vacuna de Papiloma Humano (VPH), la detección oportuna y el uso de condón, como se muestra en la Tabla No.-1 (2).

Principales tumores malignos _____ más	Grupo de edad							
	20 a 29	30 a 39	40 a 49	50 a 59	60 a 64	65 a 74	75 a 79	80 y
Mujeres								
Bronquios	0.50	1.20	3.49	9.13	14.27	27.36	29.44	22.28
Estomago	0.68	2.88	6.95	11.52	17.38	20.79	28.09	23.11
Hígado y de las vías biliares intrahepáticas	0.37	0.52	2.25	6.59	15.92	20.30	30.64	24.29
Colon	1.12	3.44	8.41	16.47	24.21	27.63	27.94	27.12
Mama	4.13	34.53	100.87	156.26	157.95	135.24	115.50	74.75
Cervicouterino	3.75	20.14	39.789	51.09	47.81	52.56	43.26	37.49

Tabla 1.-Tasa de mortalidad hospitalaria de la población de 20 años y más, por principales tumores malignos según edad y sexo, por cada 100 000 habitantes. (2)

FACTORES DE RIESGO DEL CACU

Se ha demostrado que la infección por el virus del papiloma humano (VPH) es la causa necesaria, pero no la única suficiente, del cáncer cervicouterino. La gran mayoría de las mujeres infectadas por algún tipo de VPH oncógeno nunca presenta cáncer cérvico-uterino. Esto sugiere que otros factores adicionales que actúan juntamente con el VPH influyen en el riesgo de aparición de la enfermedad. Cofactores como la paridad, el uso de anticonceptivos orales, el tabaquismo, la inmunosupresión, particularmente la relacionada con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), la infección por otras enfermedades de transmisión sexual y la desnutrición se han asociado, en grado variable, con la aparición de cáncer invasivo del cuello uterino.

a) El tabaquismo está firmemente asociado con la aparición de lesiones cervicales preneoplásicas y neoplasias. El tabaquismo se encuentra entre los cofactores ambientales más uniformemente identificados con la probabilidad de influir en el riesgo de padecer cáncer cérvico-uterino, los estudios revelan que el riesgo para las fumadoras al menos duplica el de las no fumadoras.

b) Las mujeres infectadas por el VIH contraen más fácilmente los tipos de VPH de alto riesgo y tienen mayor probabilidad de presentar lesiones preneoplásicas (y de aparición más rápida), que las mujeres seronegativas para VIH, del mismo grupo etario. Sin embargo, hasta la fecha, está poco claro la magnitud del incremento del riesgo de cáncer cérvico-uterino entre estas mujeres.

c) Las mujeres con coinfección por el VPH y otro agente de transmisión sexual, como *Chlamydia trachomatis* o virus-2 de herpes simple (HSV-2), tiene mayor probabilidad de presentar cáncer cérvico-uterino que las mujeres sin coinfecciones. Un análisis compartido de siete estudios de casos y testigos, que examina el efecto de la infección con HSV-2 en la etiología del cáncer invasivo del cuello uterino, encontró que, entre las mujeres con seropositividad para el ADN de VPH, El HSV-2 se asociaba a un riesgo unas tres veces superior de presentar cáncer cervicouterino, después del ajuste para posibles variables de confusión.

d) Se considera que una baja condición socioeconómica es un factor de riesgo de numerosos problemas de salud, incluido el cáncer cérvico-uterino; en particular, en entornos de bajos recursos. Las mujeres con una baja condición socioeconómica a menudo tienen bajos ingresos, limitaciones para acceder a los servicios de atención de

salud, nutrición deficiente y escasa concientización acerca de los temas de salud y de conducta preventiva. Todos estos factores pueden hacerlas más proclives a enfermarse o a padecer enfermedades que pueden prevenirse, como el cáncer cérvico-uterino.

e) Si bien algunos investigadores han postulado que las prácticas higiénicas deficientes o las malas condiciones higiénicas pueden aumentar el riesgo de infección por el VPH o de cáncer cervicouterino, no existen pruebas uniformes que sustenten esta aseveración (1).

EPIDEMIOLOGIA DEL VPH

Los papilomavirus han cohabitado con los humanos a través de miles de años, sufriendo pocos cambios en su genoma. En nivel evolutivo los papilomavirus se han agrupado en 16 géneros y los VPH se agrupan en 5 de estos 16 géneros.

Los géneros más importantes del VPH son los papilomavirus Alpha y beta, la mayoría de los VPH que infectan el área genital pertenecen al género Alpha. El papilomavirus 16 es el más prevalente de los VPH oncogénicos, el cual es el responsable de más de la mitad de los tumores, mientras que el 18 es responsable del 20% de los tumores (16-18).

Las mujeres sexualmente activas, de cualquier edad, pueden infectarse con VPH oncogénico, sin embargo, el cáncer de cérvix invasor en mujeres jóvenes infectadas con el virus oncogénico es raro y la prevalencia de VPH en mujeres de 40 años o mayores no se correlacionan con la alta tasa de cáncer cervical. Es la presencia de VPH lo que da lugar al desarrollo de lesiones prenoplásticas y posteriormente el cáncer invasivo, lo cual puede llevar años para su desarrollo (16-19)

PREVALENCIA

La prevalencia del VPH se asocia a la edad, siendo más alta al inicio de las relaciones sexuales y responde al comportamiento sexual de la comunidad, los compañeros sexuales. La prevalencia puede llegar al 30-40% en mujeres menores de 25 años (20)

INCIDENCIA

Durante once años que va desde el 2000 al 2011, las infecciones por el virus del papiloma humano en México han ido incrementando, con 10393 casos en el 2010 hasta llegar a 36333 casos en el 2011 (2,19)

El virus del Papiloma Humano (VPH) en México ocupó el decimonoveno lugar de las veinte principales causas de enfermedades transmisibles, con un total de 36 333 casos en el 2010 (15). El grupo con mayor afección fue el de las mujeres en el rango de edad de 25 a 44 años a razón de 24.0 por cada hombre. Las entidades federativas que presentaron mayor número de casos fueron Distrito Federal (29.0 %), Jalisco (11.2%), y Nuevo León (5.8 %), las que menos presentaron fueron Colima (0.1%), Durango (0.2%) y Baja California Sur (0.4 %). La secretaría de Salud fue la institución con mayor número de casos (23 449) mientras que SEMAR fue la que menos casos notificó. Zacatecas en el 2011 se encontraba baja media nacional con una incidencia de 43.69 por cada 100 mil mujeres (2,21).

Tabla. 2 -Casos y tasa de incidencia por entidad federativa de hombres y mujeres en Estados Unidos de México durante el año 2011 (2).

Población Femenina

Entidad federativa	casos	Incidencia*
Aguascalientes	691	114.12
Baja California	60.7	38.16
Baja California Sur	120	42.62
Campeche	141	34.13
Coahuila	308	22.93
Colima	33	10.78
Chiapas	693	29.48
Chihuahua	772	45.63
Distrito Federal	8243	180.12
Durango	67	8.43
Guanajuato	882	32.94
Guerrero	1969	120.96
Hidalgo	1625	127.11
Jalisco	3903	107.91
México	1231	16.16
Michoacán	1033	50.24
Morelos	163	18.74
Nayarit	423	86.10
Nuevo León	2041	90.10
Oaxaca	1482	79.44
Puebla	392	13.10
Querétaro	482	52.92
Quintana Roo	1218	173.11
San Luis Potosí	1019	78.50
Sinaloa	1229	92.99
Sonora	505	40.09
Tabasco	349	33.05
Tamaulipas	497	30.44
Tlaxcala	671	111.40
Veracruz	1540	40.33
Yucatán	245	24.69
Zacatecas	311	43.64
total	34885	62.71

MÉTODOS DE DETECCIÓN DEL VPH

La detección del VPH puede realizarse mediante distintos métodos, los que se pueden clasificar en tres grupos:

1. **Diagnostico morfológico.** La identificación morfológica de las alteraciones citopáticas producidas por el VPH en las células escamosas, se pueden observar en exámenes citológicos e histopatológicos.
2. **Detención de proteínas virales.** La identificación de las proteínas virales se lleva a cabo por el método de inmunohistoquímica.
3. **Detención de secuencias genómicas del VPH.** Existen numerosas técnicas de análisis cualitativos del DNA, las técnicas más empleadas en el estudio del VPH son:
4. **Hibridación *in situ*.** Consiste en aplicar sondas complementarias marcadas con sustancias radiactivas o con colorantes que permiten su posterior visualización sobre un corte del tejido problema o sobre un extendido citológico.

5. **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).** Consiste en aplicar un proceso que multiplique el número de copias de un segmento de DNA si está presente en la muestra, se produce mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

6. **Captura de Híbridos.** Se utilizan sondas de RNA capaces de detectar varios tipos de VPH, cuando la muestra presenta infección vírica se produce un híbrido RNA-DNA que es capturado por un anticuerpo específico contra híbridos y detectado mediante una reacción tipo ELISA que utiliza un compuesto químico luminiscente para revelar la reacción. (22)

TRANSMISIÓN DEL VPH

La transmisión de la infección por VPH es por contacto sexual, a través de erosiones mínimas, algunas veces imperceptibles de la piel y mucosas. Las características de la actividad sexual se vinculan con la probabilidad de contraer la infección, pero no se consideran para la progresión de la infección al cáncer. Sin embargo, existen cofactores relacionados con la persistencia de la progresión al cáncer.

El factor de riesgo más importante para el cáncer cervicouterino es la infección con el virus del papiloma humano de alto riesgo como los tipos 16, 18 etc. El tabaquismo, ya que tienen el doble de posibilidades de padecer cáncer cervicouterino, se han detectado subproductos del tabaco en la mucosidad cervical de mujeres fumadoras, investigadores creen que estas sustancias dañan la integridad del DNA de las células epiteliales cervicales contribuyendo así al origen del cáncer cervical. La inmunosupresión por el VIH ocasiona que las mujeres estén en mayor riesgo de infectarse por el VPH. La infección por Clamidia, bacteria capaz de infectar el sistema reproductor ya que se contrae por contacto sexual, causando micro lesiones en el epitelio cervical favoreciendo la entrada del VPH. El uso de píldoras anticonceptivas por periodos prolongados aumenta el riesgo de cáncer cervical. La edad de su primer embarazo aumenta el riesgo, así como el estado socioeconómico en el que viven.

El virus puede permanecer latente en las células basales del epitelio, ocasionalmente las infecciones por VPH se transmiten de madre a recién nacido ocasionando infecciones en el tracto respiratorio superior, lo cual se conoce como papilomatosis

laríngea. La duración media de la infección por VPH varía entre 6-12 meses y 2 años (23).

CARACTERÍSTICAS DEL VPH

El virus del papiloma humano es un virus de DNA de doble cadena que pertenece a la familia papovaviridae, no poseen envoltura y tienen un diámetro aproximado de 52-55 mm. Las partículas virales están compuestas por una cápside proteica conformada en un 95% por proteínas L1 y un 5% por proteínas L2, las cuales se ensamblan para formar capsómeras heicosaedricas y que serían usadas para la fabricación de vacunas profilácticas. En el interior de la cápsula se encuentra el DNA circular de doble cadena de aproximadamente 8000 pares de bases, constituido por 8 genes y una región regulatoria no codificante, la cual contiene sitios de unión para factores proteicos y hormonales del hospedador, necesarios para que el virus complete el ciclo de reproducción (23).

El genoma del VPH, lo conforman dos tipos de genes aquellos que son codificados en las etapas tempranas de la infección, conocidos como genes E, y aquellos que son codificados durante las etapas tardías del ciclo de replicación del mismo, conocidos como L. Se conocen seis genes tempranos: E1, E2, E5, E6 y E7, y dos tardíos: L1 y L2. Los genes tempranos codifican proteínas involucradas en la replicación y regulación viral, así como en su capacidad carcinogénica Por otro lado los genes tardíos codifican las proteínas estructurales que conforman la cápside viral. Una región de aproximadamente 4000 pares de bases codifica las proteínas para la replicación viral y la transformación celular; otra región que posee 3000 pares de bases codifica proteínas estructurales de las partículas virales y finalmente una región de 1000 pares de bases que no codifica y tiene los elementos reguladores de la replicación y transcripción del DNA viral (24,25).

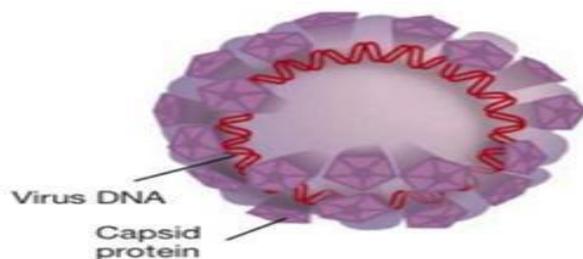


Figura No. -4 Cápside y DNA del Virus del Papiloma Humano (11)

CICLO VITAL DE LOS VPH.

INFECCIÓN Y DESENSAMBLE DE VIRIONES.

El ingreso de las partículas víricas a las células basales se da por lesiones o microtraumas en la piel, el receptor de membrana que facilita la entrada del virus aun no es identificado, pero se sabe que los proteoglicanos de sulfato de heparina presentes en la membrana son el lugar de fijación inicial previo al receptor. El virus es internalizado por endocitosis.

El desensamble del virión se da gracias a la ruptura de los enlaces disulfuro de las proteínas que conforman la cápside, dando así un cambio en el ambiente celular, favoreciendo el transporte del DNA viral al núcleo celular. (26,27)

MANTENIMIENTO DEL GENOMA.

Una vez ocurrida la infección y el desensamble, el virus usa las proteínas tempranas E1 y E2 para mantener su genoma en estado episomal y generar de manera correcta la segregación del virus en la división celular. (23,24,26,27)

FASE PROLIFERATIVA

La región larga de control (LCR) regula la expresión de las oncoproteínas tempranas E6 y E7, producidas para evitar que la célula basal interrumpa el ciclo celular, provocando el engrosamiento de la capa basal y el estrato espinoso. (26)

INTEGRACION DEL GENOMA

Las partículas del DNA vírico se integra al material genético celular, desencadenando una serie de alteraciones en el ciclo celular relacionadas con la expresión de las proteínas E6 y E7, las cuales bloquean a P53 y pRb. (23).

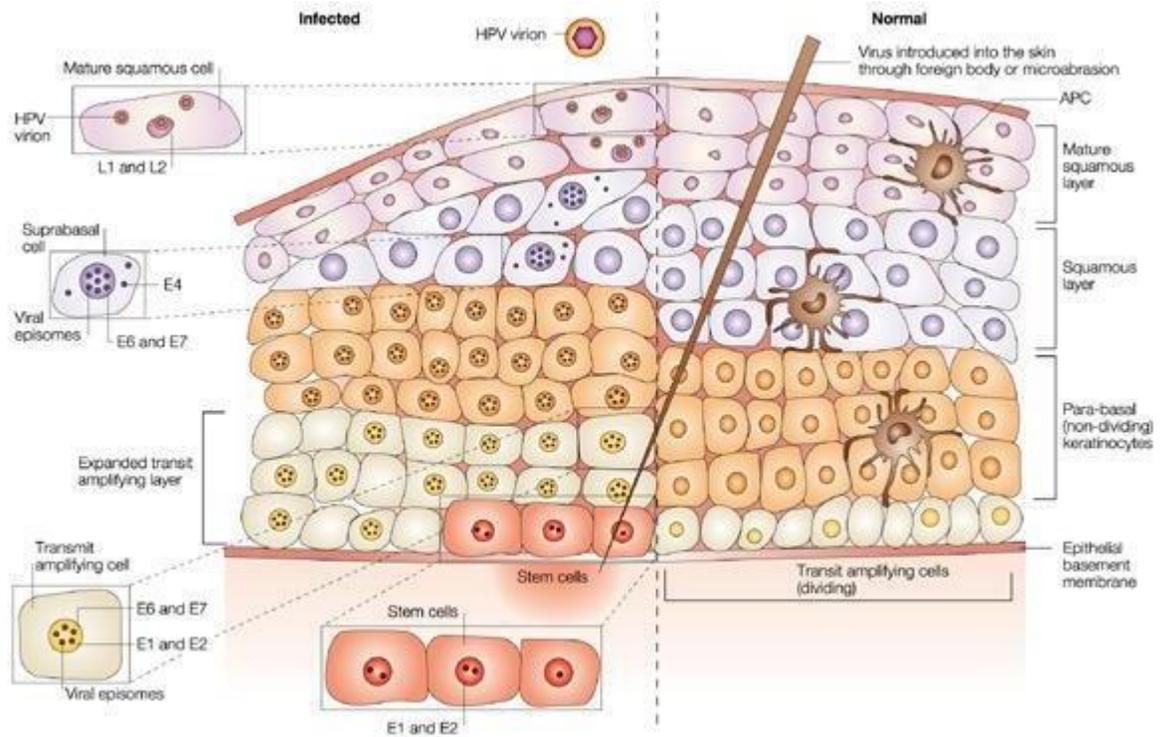


Figura No. -5 Estructura del epitelio escamoso estratificado cervical y la expresión de las proteínas virales en la infección del VPH (6).

ALTERACIONES DEL EPITELIO CERVICAL.

El cáncer cervical comienza en las células de la superficie del cuello uterino. Existen dos tipos de células en dicha superficie: escamosas y columnares. La mayoría de los cánceres de cuello uterino provienen de las células escamosas. Por lo general, es un cáncer de lento crecimiento y si se detecta de manera temprana puede tratarse con éxito. Los factores de riesgo para desarrollar este tipo de cáncer son, la presencia del virus de papiloma humano, antecedentes familiares, edad, historia sexual y reproductiva, estado socioeconómico, fumadores, infección por VIH y el uso prolongado de anticonceptivos orales. (28).

METODOS DE DETECCION DEL CaCu.

- **Examen macroscópico:** Comprende la observación directa de las lesiones genitales, se puede utilizar ácido acético, que tiñe de blanco las lesiones observadas mediante colposcopia del cuello uterino y la vagina, previamente teñida con yodo o ácido acético, como se muestra en la figura. (6).
- **Examen microscópico:** Observación de células sospechosas con cambios colocíticos en citologías de cuello Uterino y vagina en mujeres, usando la tinción de Papanicolaou, mostrados en la Figura No. -7. Se pueden tomar biopsias de lesiones sospechosas, verrugas genitales, tanto de hombres como de mujeres, y enviar las muestras a una sección de anatomía patológica para su análisis. (3).

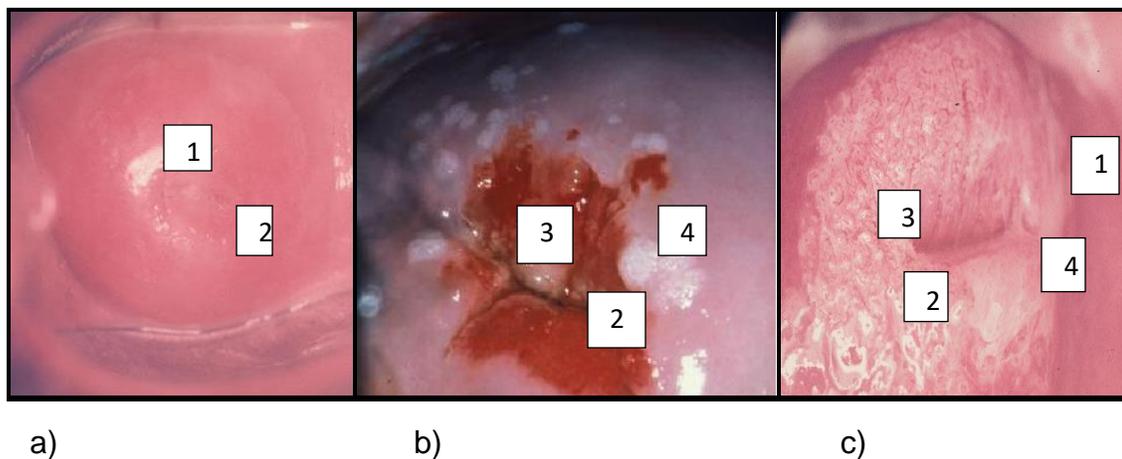
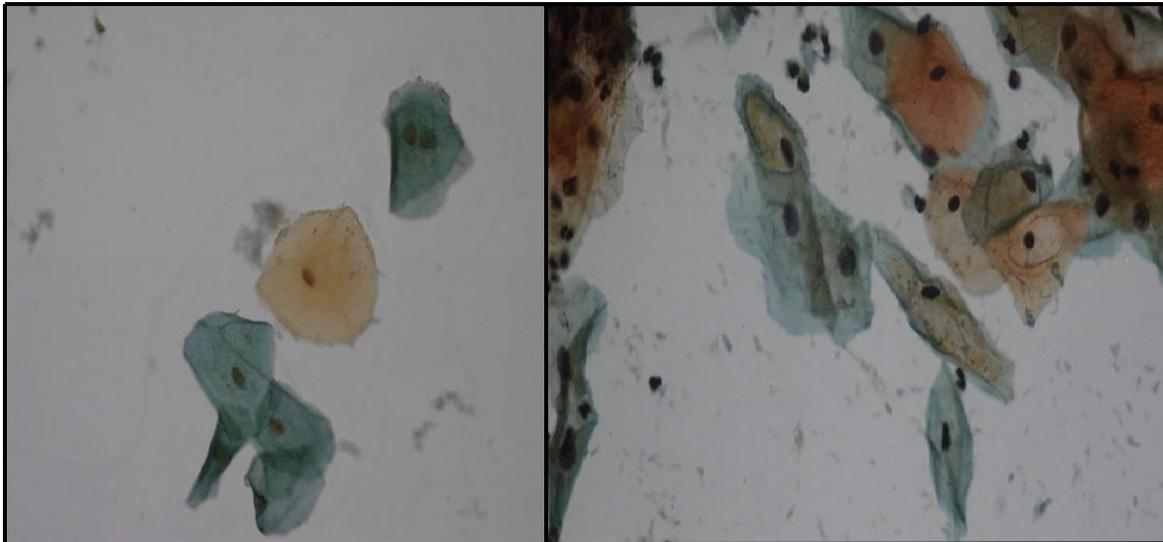


figura No. -6 Colposcopia Cervical a) Cérvix normal b) Lesión intraepitelial de bajo grado c) Lesión intraepitelial de alto grado. 1- Epitelio escamoso original 2- Orificio externo del canal 3- Epitelio columnares y 4- Epitelio acetoblanco (7).



a)

b)

Figura No. -7 Tinción de Papanicolau a) Células epiteliales normales b) Células Epiteliales con transformación causadas por el VPH.

Imagen tomada en el Laboratorio de Patología y Diagnóstico Molecular del IMSS, Microscopio NIKON 80i.

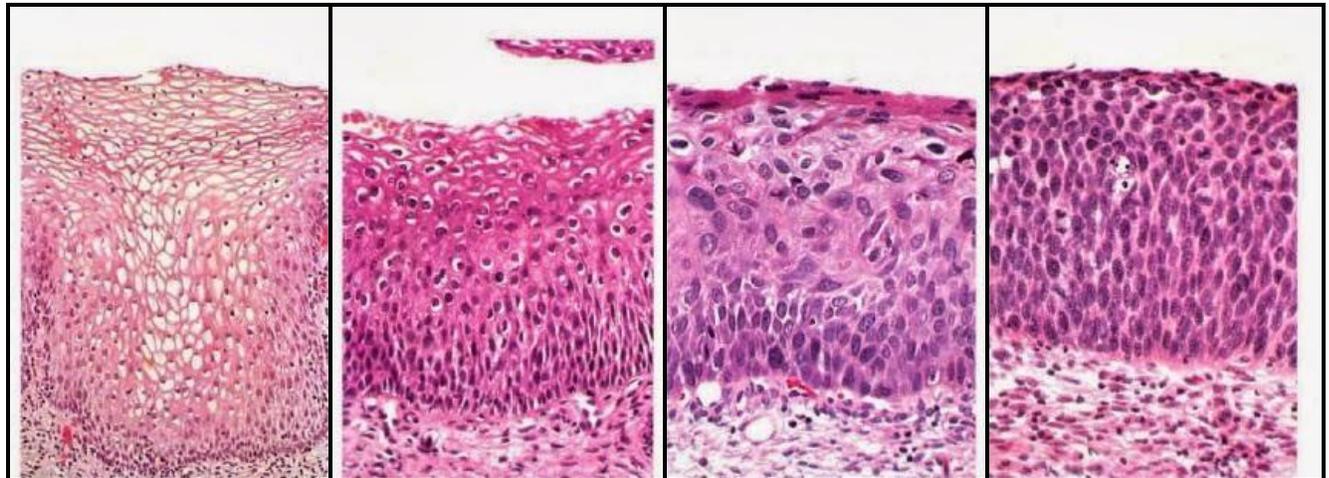
LESIONES PREMALIGNAS DEL CANCER DE CUELLO UTERINO.

El concepto y la terminología de las alteraciones premalignas del epitelio cervical han evolucionado paralelamente al avance del conocimiento de su biología e historia natural, inicialmente se usó el término “carcinoma in situ” para designar a las lesiones que se limitaban al epitelio cervical. En 1949, Papanicolaou introdujo el término “displasia” para designar cambios epiteliales menos agresivos. Posteriormente en 1953, Reagan consagró este término en histopatología cervical, la demostración de cambios histológicos similares en algunas displasias y el CIS condujo, a principios de los setenta a la introducción del concepto de neoplasia cervical intraepitelial (NIC), el cual los unificaba clasificando las lesiones en tres grados. Esta terminología sigue empleándose en la actualidad en el diagnóstico histológico, el término neoplasia cervical intraepitelial de grado III (NIC 3) incluye los CIS y las displasias severas, la mayoría de los patógenos coinciden en que la NIC 3 puede ser comparable con el CIS, sea la displasia severa mencionada o no.

La clasificación de las neoplasias cervicales intraepiteliales tiene una baja reproducibilidad diagnóstica, tanto en material citológico como histológico, y sobre todo en las lesiones menos graves, mostradas en la tabla No. -2. Este hecho junto con los avances en el conocimiento de la carcinogénesis cervical hizo que en 1989 se propusiera el Sistema Bethesda para describir las alteraciones citológicas, incluyendo nuevos conceptos relacionados con la infección por virus del papiloma humano (VPH). En el sistema Bethesda se sustituye el término neoplasia intraepitelial por el de lesión escamosa intraepitelial (SIL), con dos categorías: bajo grado (LSIL) y alto grado (HSIL). Esta división en dos grupos se justifica por la evidencia que las LSIL corresponden a infecciones víricas, en general autolimitadas y que sólo excepcionalmente progresan a carcinoma, mientras que las HSIL equivalen a verdaderos cambios premalignos que se corresponden con los siguientes términos utilizados en clasificaciones anteriores: displasia moderada (NIC2), displasia severa (NIC3) y carcinoma in situ. La determinación del tipo de VPH en las lesiones intraepiteliales ha demostrado que en las LSIL se identifican tipos muy heterogéneos, de alto y bajo riesgo oncogénico, mientras que en la gran mayoría de HSIL se hallan tipos de alto riesgo. (11,29).

LESIONES INTRAEPITELIAL ESCAMOSA DE ALTO GRADO

También llamadas Neoplasia Intraepitelial Cervical de grado dos o tres (NIC2, NUC3), mostradas en la figura No. -8, se caracteriza citológicamente por células con citoplasma inmaduro, núcleos anormales y aumento de la relación núcleo-citoplasma. Las células se presentan aisladas o en grupo o incluso en agregados sincitiales. Los núcleos son más pequeños que los expresados en LSIL, ya que el tamaño de los núcleos de HSIL es de 2-5 veces el tamaño de una célula intermedia. Los núcleos son hipercromáticos con cromatina granular gruesa, membranas nucleares arrugadas y hay anisonucleosis, las células presentan un estrecho ribete citoplasmático alrededor del núcleo hipercromático. (30,31).



a) b) c) d)
 figura No. -8 Estadios de NIC: a) Epitelio escamoso normal, b) NIC1 c) NIC2 y d) NIC3 (3)

PAPANICOLAU	REAGAN 1954	RICHART 1968	BETHESDA 2001
Clase I	Normal		
Clase II	Alt. Inflamación		
Clase III	Displasia leve	NIC1	LIEBG
	Moderada	NIC2	LIEAG
	Severa	NIC3	
Clase IV	-	CIS	
Clase V	invasor	Invasor	Invasor

tabla 3.- Clasificación citológica, mostrando las diferentes clasificaciones con las que se puede encontrar un diagnóstico.

ANTECEDENTES DIRECTOS

MARCADORES EN NEOPLASIAS CERVICALES

La evaluación histológica para determinar el estándar para diagnosticar a las mujeres con el virus del papiloma humano (VPH), con alguna neoplasia intraepitelial cervical inducidas, su detención y clasificación de la NIC se ha utilizado hematoxilina y eosina, la cual está limitada por la variabilidad de diagnósticos. Las pruebas que ayudan para la detección de VPH, tales como la hibridación *in situ* y reacción en cadena de la polimerasa indican la presencia de HPV, pero no proporcionan la evaluación del grado de displasia. (35)

MUCINAS COMO FACTOR DE PROGRESIÓN EN NEOPLASIAS EPITELIALES.

Las mucinas se han incorporado en el panel de biomarcadores para diagnosticar el pronóstico. Las mucinas se han usado como marcadores para clasificar tumores tanto d primarios hasta metastásicos. (12)

MUC1 y MUC4 se han asociado en tumores que progresan a metástasis, se han usado como marcadores de progresión en tumores de origen epitelial. La expresión de MUC1 representa un marcador de agresión biológica en carcinoma de células pequeñas en pulmón, estómago y el carcinoma colono rectal. En un estudio realizado en cáncer gástrico en ratones, se usaron como biomarcadores MUC1 y MUC5AC, donde los que expresaban MUC1 tenían un pronóstico de sobrevida malo y los que expresaban MUC5AC un pronóstico de sobrevida bueno.

La expresión de MUC4 en carcinomas depende de su localización histológica, ya que se ha asociado como un mal pronóstico en cáncer de mama, en carcinoma hepatobiliar, incrementando su agresividad hasta metástasis, en cambio su expresión en cáncer de

ovario, en carcinoma epidermoide de glándulas salivales y en carcinoma de células de ovario, en carcinoma epidermoide de glándulas salivales y en carcinoma de células escamosas del tracto Aero digestivo, tienen un pronóstico de sobrevida bueno. Esto indica que la expresión de MUC4 depende del origen del tumor. (8).

MUCINAS

Las mucinas son las principales glicoproteínas de la mucosa que recubre la superficie epitelial de vías respiratorias, digestivas y urogenitales (30). Su función es proteger a las células epiteliales de infecciones, deshidrataciones, lesiones físicas y químicas (38). Estas proteínas se acumulan en grandes gránulos secretores, regulados que ocupan la mayor parte del citoplasma apical de las células especializadas conocidas como células de la mucosa/ copa (39).

Las mucinas membranales son: MUC1, MUC4, MUC3B, MUC11, MUC12, MUC16, MUC17. Las mucinas de secreción son: MUC6, MUC2, MUC5AC, MUC5B y MUC19 (10,30). Los oligosacáridos presentes en las mucinas les confieren rigidez limitando la rotación alrededor de los enlaces peptídicos y por las cargas de repulsión de sus grupos en tándem (38).

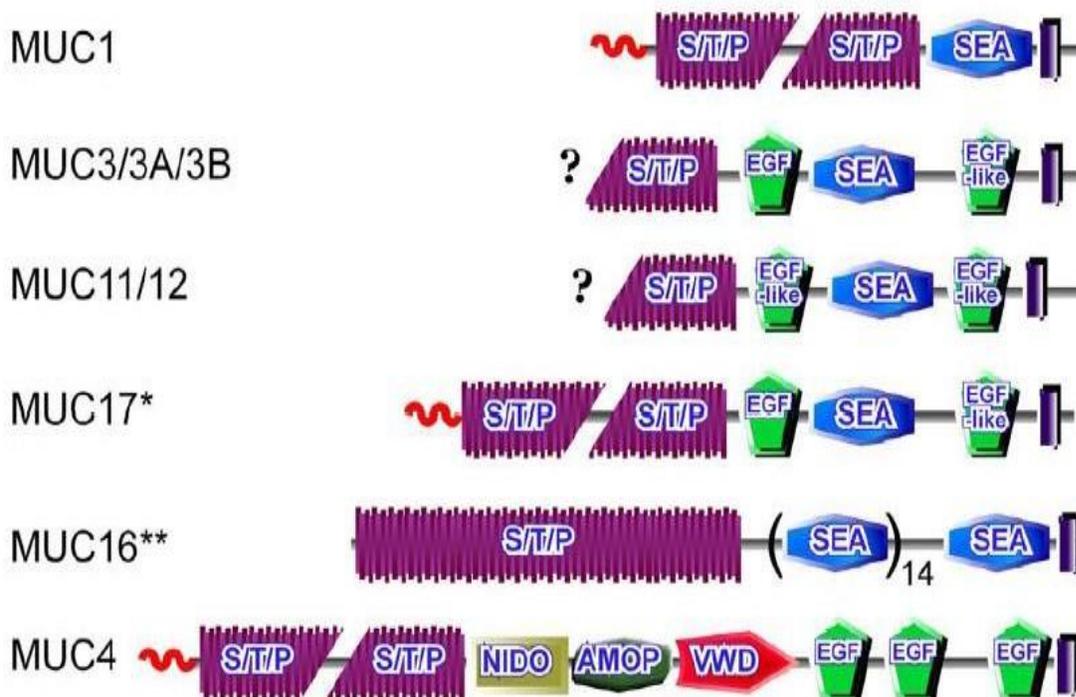


Figura No. -15 Estructura de las Mucinas membranales. (10)

INTERACCIÓN DE LAS MUCINAS CON PROTEÍNAS EXTRA-INTRACELULAR.

Las interacciones entre las mucinas transmembranales ejecutan diferentes funciones mediadas por diferentes eventos celulares y moleculares tal y como se muestra en la Tabla No. -4.

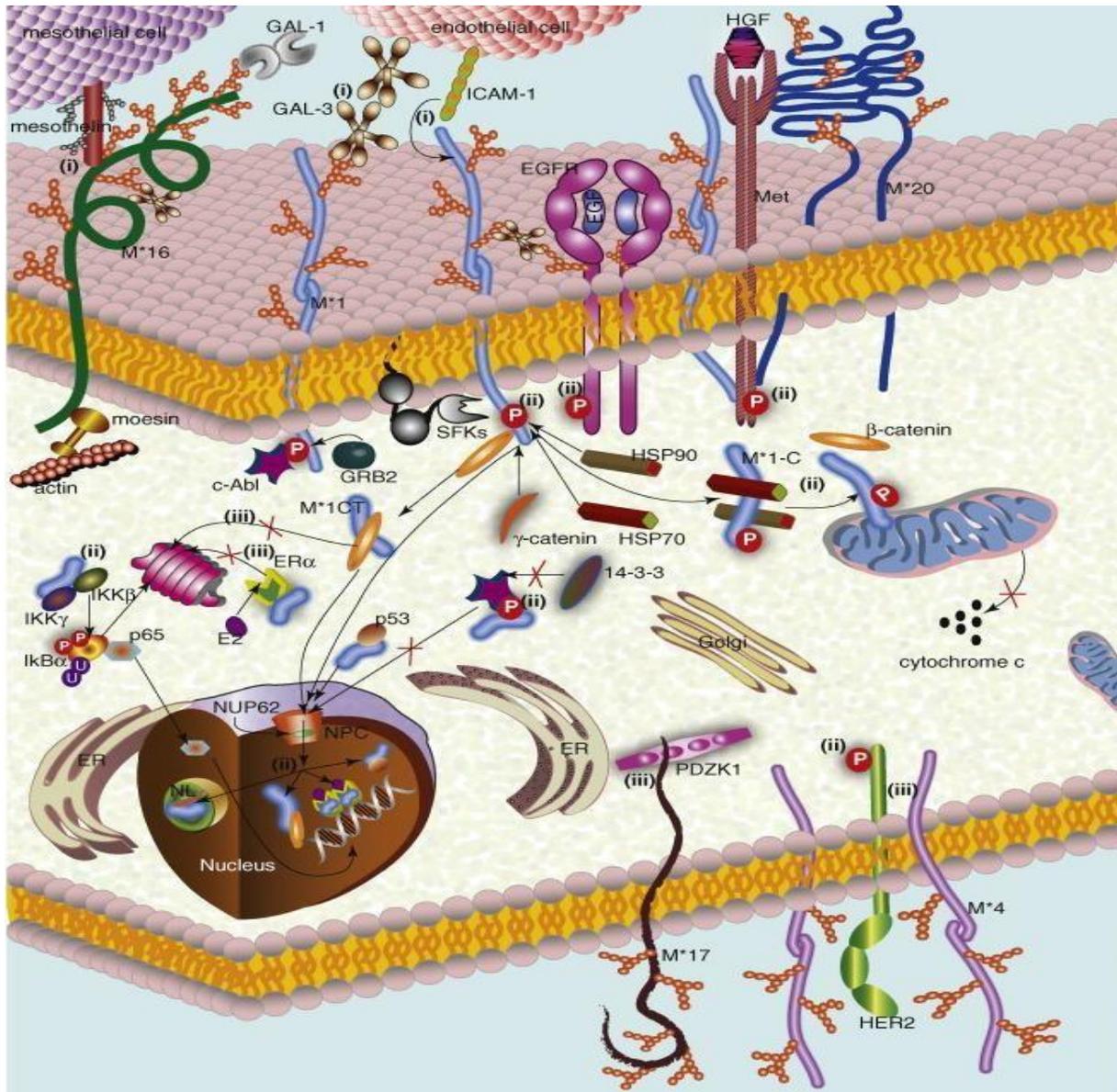


Figura No. -10 Funciones celulares mediadas por mucinas transmembranales.

Tabla 4.- Interacción de mucinas con diferentes moléculas, métodos de detección y función.

Mucinas	Interacción	Método de Detección	Molecular/Interacción en función celular
MUC1	ICAM-1	IP ^a	Promotor cáncer metastásico (<i>in vitro</i>)
	Galectin-3	IP and AC ^b	Promotor cáncer metastásico (<i>in vitro</i>)
	EGFR	IP	Promotor de tumorigenesis. Regulador de proliferación y diferenciación normal de células epiteliales (<i>in vitro</i>)
	Met	IP, IKA ^c and MS/MS	Reduce cáncer metastásico (<i>in vitro</i>)
	FGFR3	IP	Ayuda a MUC1CT en la translocación nuclear y mitocondrial (<i>in vitro</i>)
	PDGFR β	IKA	Promotor cáncer metastásico (<i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>)
	c-Src	IP and IKA	Promotores de tumorigenesis (<i>in vivo</i>)
	Lyn	IP and IKA	Maduración y expansión de la respuesta inmune (propuesta)
	Lck	IP and IKA	Activación de células T (propuesta)
	c-Abl	IP and IKA	Promotor tumorigenesis (<i>in vitro</i>)
	GRB2	IP, and IBA	Promotor de tumorigenesis
	APC	IP	Posible rol en cáncer de mama iniciación and progresión (propuesta)
	ERa	IP	Promotor de tumorigenesis (<i>in vitro</i>)
MUC4	HER2	IP	Promotor de tumorigenesis (<i>in vitro</i>)

MUCINAS TRANSMEMBRANALES E INTERACCION CON PROTEINAS.

La mayoría de las interacciones entre las mucinas transmembranales y sus parejas unidas a la membrana se producen en condiciones patológicas tales como cáncer, estas parejas de unión típicamente pertenecen a las familias de tirosina quinasas de receptores o moléculas de adhesión. (9)

PROTEÍNA MUC1

El gen localizado en 1q22, como se observa en la Figura No-17, codifica una proteína unida a la membrana que es un miembro de la familia de mucina. Las mucinas son proteínas O-glicosiladas que juegan un papel esencial en la formación de barreras mucosas protectoras sobre las superficies epiteliales (5,36) estas proteínas también juegan un papel en la señalización intracelular. Esta proteína se expresa en la superficie epical de las células epiteliales que recubren las superficies mucosas de muchos tejidos diferentes, incluyendo de pulmón, mama, estómago y páncreas. Esta proteína se encinde proteolíticamente en subunidades alfa y beta que forman un complejo heterodímero. Las funciones de las subunidades alfa N-terminal en la adhesión celular y la subunidad beta C-terminal está involucrado en la señalización celular. La sobreexpresión, localización intracelular aberrante, y los cambios en la glicosilación de esta proteína se han asociado con carcinomas. Este gen se sabe que contiene un dominio variable altamente polimórficos repeticiones en tándem. La subunidad alfa tiene propiedades adhesión celular. Puede proporcionar una capa protectora sobre las células epiteliales contra bacterias. La subunidad beta contiene un dominio C-terminal que está implicado en la señalización celular, a través de fosforilación y de las interacciones proteína-proteína . Modula la señalización de ERK, SRC y las vías de NF-Kappa-B. En las células T activadas, las influencias directa o indirectamente la vía Ras/MAPK. Promueve la progresión del tumor (46,47). Regula la transcripción mediada por TP53 y determina el destino celular en la respuesta al estrés genotípico. Se liga, junto con KLF4, el elemento promotor PE21 de TP53 y TP53 reprime la actividad. (5, 48)

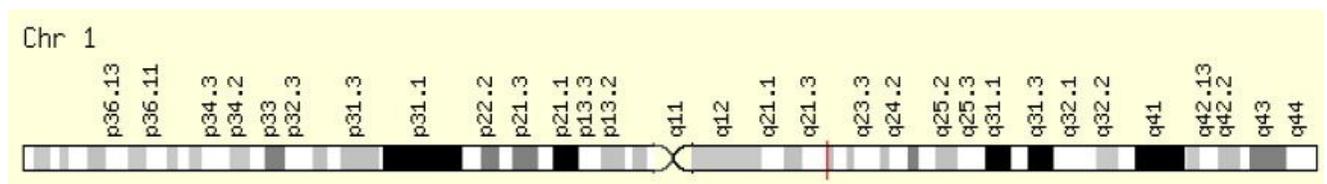
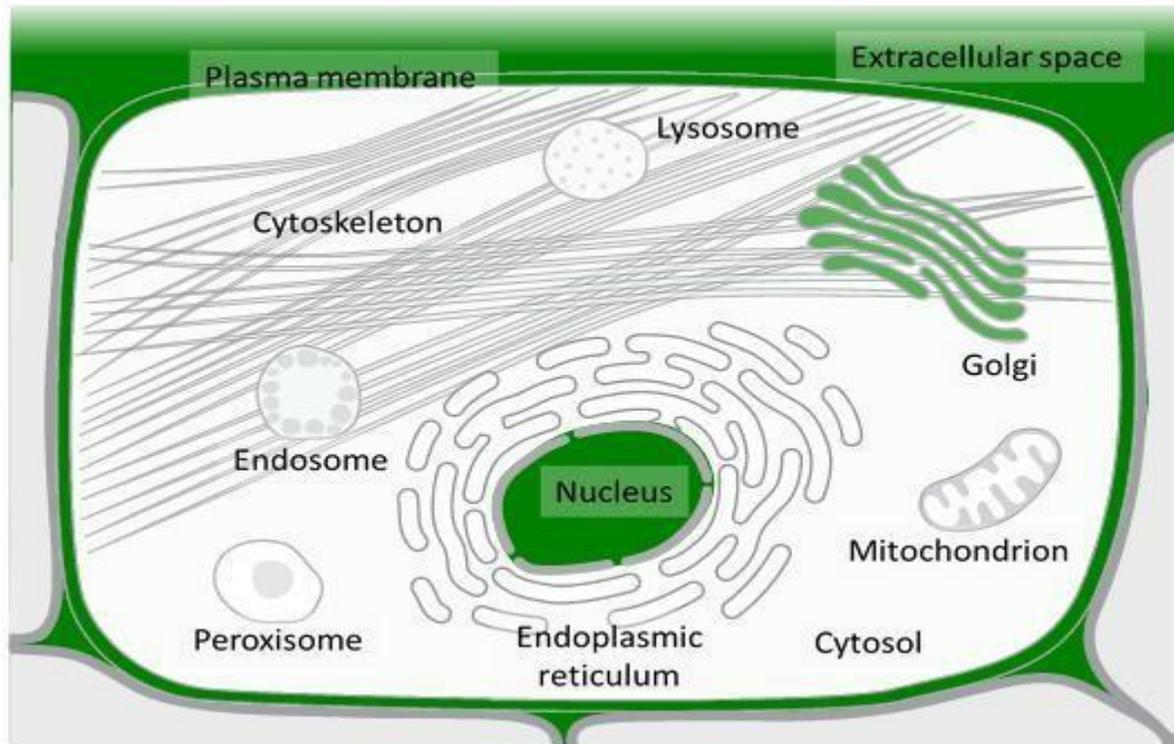


Figura No. -11 Localización de MUC1 en el cromosoma 1 (5).

La proteína MUC1 puede ser detectada por medio de la técnica de inmunohistoquímica la cual se observa principalmente en membrana, citoplasma, núcleo y en el aparato de Golgi, de acuerdo con el anticuerpo empleado como se observa en la siguiente figura No. -13(5).



FUNCION DE LAS SUBUNIDADES ALFA Y BETA DE MUC1

SUBUNIDAD ALFA.

La subunidad alfa tiene la función de la lubricación epitelial y protección superficial, resulta en la formación de geles en la superficie celular epical, permeable a iones, moléculas y partículas. Algunos investigadores la denominan un antígeno asociado a tumor, debido a su interacción con las células tumorales. Se cree que por la propiedad adhesiva y anti adhesiva de alfa-MUC1 promueve la migración celular, su estructura cargada negativamente le confiere propiedades anti adhesivas a las células que sobre expresan MUC1, ya que interfiere en la comunicación celula-celula. Por otra parte, a las células tumorales que sobre expresan MUC1 les confiere propiedades de adhesión cuando están presentes a células endoteliales, ayudada por las selectinas y la galectina-3. La alfa-MUC1 es un autoantígeno que desata la respuesta inmune en

pacientes con cáncer, pero la presencia de alfa-MUC1 inhibe la respuesta inmune de los linfocitos T citotóxicos debido a sus propiedades de anti-adhesión. (13).

SUBUNIDAD BETA

La subunidad beta contribuye en la señalización de crecimiento celular. Beta MUC1 contiene 72 aminoácidos que al pasar al citoplasma (MUC1-CD) conserva el 95% de sus aa, promueve la progresión tumoral y la metástasis. La señalización de beta-MUC1 en la membrana celular ocurre después de su fosforilación. MUC1 CD contiene restos de tirosina, lo cual es un muy buen sustrato, el receptor de crecimiento de fibroblastos y el factor de crecimiento de plaquetas. Un residuo de asparagina en N-glicosilación presente en la región extracelular de beta-MUC1 proporciona la unión de la galectina-3. (13).

REGULACIÓN EN LA TRANSCRIPCIÓN DE MUC1 EN NEOPLASIA DE CELULAS EPITELIALES.

La regulación en la transcripción de MUC1 ha sido ampliamente estudiada en las células del cáncer de mama, ya que su sobreexpresión contribuye a la progresión de la enfermedad. El promotor de MUC1 es rico en guanina y citosina (GC), contiene una caja TATA situada a 25 nucleótidos río arriba del sitio de inicio de la transcripción. Se caracteriza por numerosos sitios de unión para la proteína específica -1, en carcinomas relanes MUC1 es regulado directamente por el factor de hipoxia inducible, esto puede ser observado en la figura No. -14 (8).

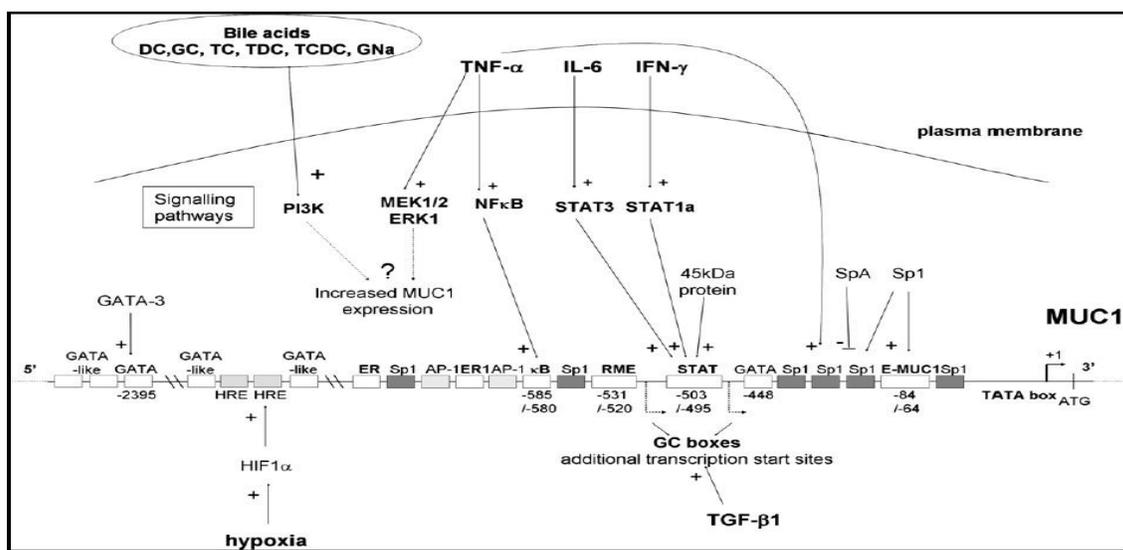


Figura No -14 Mecanismo de regulación en la transcripción de MUC1 en cáncer de células epiteliales (8).

PROTEINA MUC4

Los principales constituyentes de moco, la secreción viscosa que cubre las superficies epiteliales tales como los de la tráquea, el colón y cuello uterino, son proteínas altamente glicosiladas denominadas mucinas. (49). Estas glicoproteínas juegan un papel importante en la protección de las células epiteliales y se han implicado en la renovación y la diferenciación epitelial. Este gen se localiza en 3q29 como se muestra en la Figura No. - 21, codifica una glicoproteína de membrana integral que se encuentra en la superficie celular, aunque puedan existir isoformas secretadas (5, 50). Se han encontrado variantes de transcripción de este gen, aunque la transcripción de larga duración no se ha determinado o sólo se encuentran en los tejidos tumorales. Este gen contiene una región en la secuencia de codificación que tiene un número variable (>100) de 48 repeticiones en tándem (5). Puede desempeñar un papel en la progresión tumoral, tiene capacidad para promover el crecimiento del tumor debido principalmente a la represión de la apoptosis en oposición a la proliferación. Tiene propiedades anti-adhesivas. Parece alterar el comportamiento celular a través de efectos anti adhesivas en la célula-célula y las interacciones célula-matriz extracelular y tiene la capacidad de actuar como un ligando intramembranal para ErbB2. (5,52).

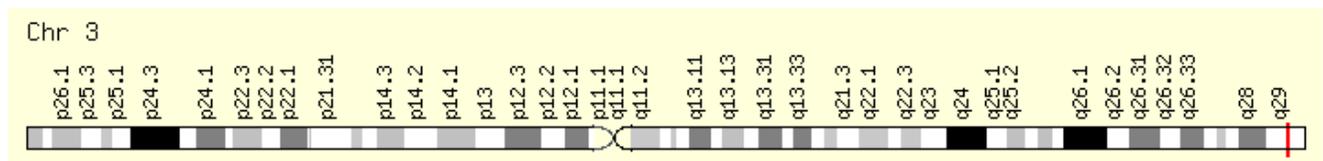


Figura No. 15 localización de MUC4 en el cromosoma 3 (5).

La expresión de la proteína MUC-4 puede ser detectada por medio de la técnica de inmunohistoquímica observándose principalmente en membrana, citoplasma y aparato de Golgi dependiendo del anticuerpo empleado como se observa en la figura No. (5)

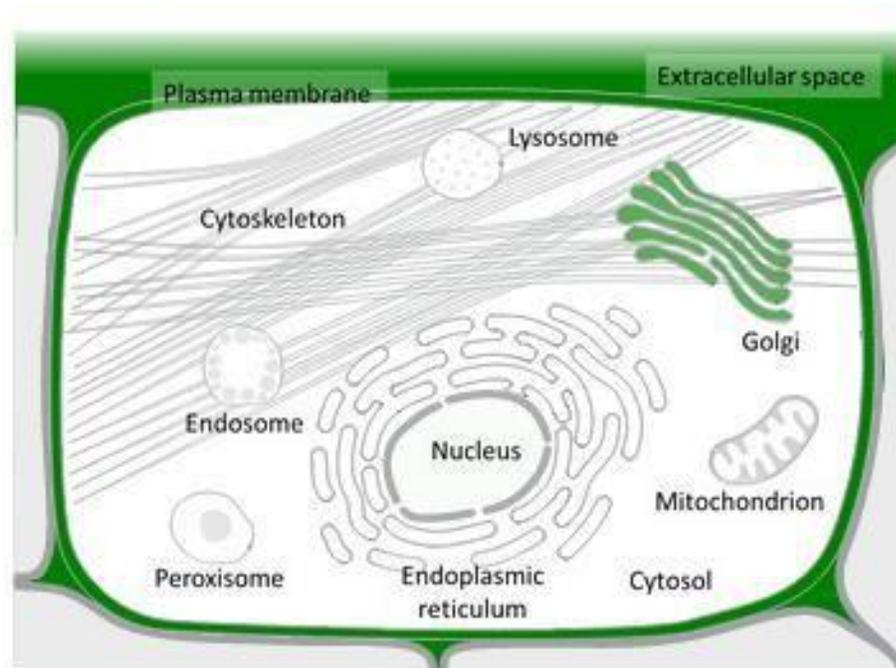


Figura No. - 10 Localización celular de la proteína MUC4. (5).

FUNCION DE LAS SUBUNIDADES ALFA Y BETA DE MUC4

SUBUNIDAD ALFA

Una función importante de la subunidad alfa-MUC4 en la célula tumoral es la prevención o interrupción de la interacción célula-célula, un estudio realizado mostró que MUC4 tiene formas esto debido a la presencia de VNTR, en donde la MUC4 que tiene ocho elementos de VNTR es más eficiente en la interrupción de la adhesión celular, en cambio las otras MUC-4 con cinco, tres o un VNTR disminuyen la anti-adhesión celular. (13).

SUBUNIDAD BETA

La subunidad beta-MUC-4 parece estar implicada en la señalización oncogénica, sin embargo, la porción citoplasmática hasta el momento no se ha demostrado que juegue un papel prominente. La región extracelular de MUC4 contiene tres dominios de factores de crecimiento epidermoide, donde uno de ellos tiene una gran similitud con los factores de crecimiento, el cual activan a los miembros de la familia de HER, se ha

demostrado que MUC4 y HER2 se asocian cuando dos proteínas se coexpresan en la célula, en este caso es el dominio homologado a EGF (52). Cabe señalar que MUC4 podría ser un ligando potencial para HER2, debido a la elevación de la fosforilación de la tirosina de HER2 la cual no se produce en todas las células. (13,52).

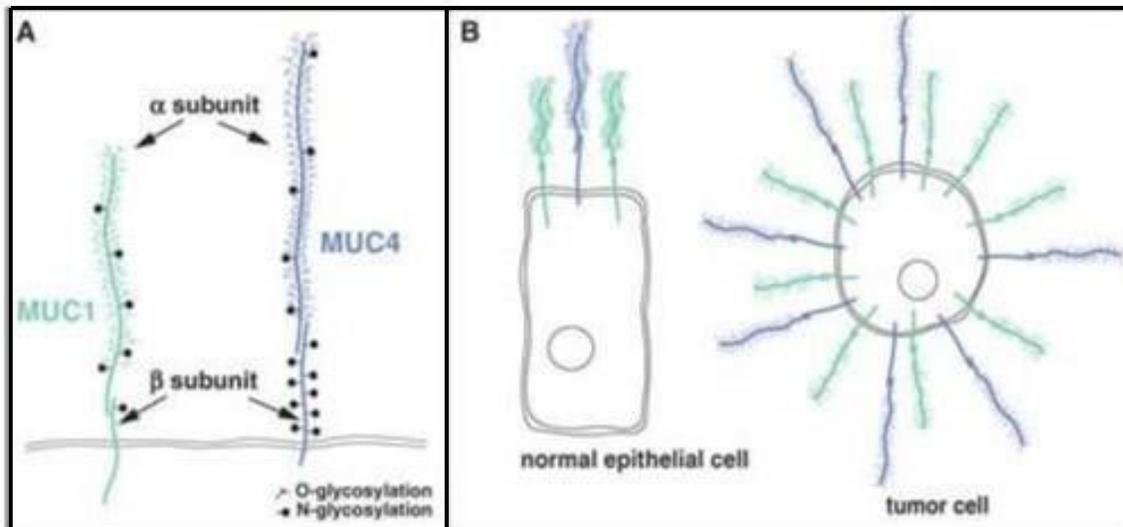


Figura No. -17. Mucinas transmembranales MUC1 y MUC4 A) Proteína MUC1 y MUC4 en la superficie de células epiteliales. B) Proteínas MUC1 y MUC4 transmembranales en células epiteliales normales y en tumorales (13).

EXPRESIÓN DE MUC1 Y MUC4

Cuando un epitelio sufre transformación maligna, los genes de las mucinas pueden someterse a la expresión aberrante causando reducción en la producción de una mucina y/o producción esperada de una mucina estructuralmente diferente e inesperado en el epitelio transformado. (53).

A) VIAS RESPIRATORIAS

El patrón de expresión de genes de mucina en las vías respiratorias normales es complejo. Genes de mucina se expresan en una variedad de células epiteliales que exhiben diversos fenotipos: MUC1 en las glándulas submucosas, MUC1 MUC4 y MUC13 en el epitelio de superficial. En los bronquiolos distales, células claras expresan MUC1 y MUC4. En la hiperplasia atípica adenomatosa, la lesión preinvasiva de

adenocarcinomas pulmonares periféricas, expresa altos niveles de MUC1 y bajos niveles de otra mucina. (54).

B) TRACTO GASTRO INTESTINAL

***Esófago**

MUC1 y MUC4 son las principales mucinas expresan tanto en los niveles de ARNm y proteínas en el epitelio escamoso estratificado. MUC1 y MUC4 se encuentran predominantemente en las células epiteliales de la membrana. (55)

***Estómago**

La mucosa normal del estómago se caracteriza por la expresión de MUC1, MUC5AC, MUC6, MUC1 su expresión epical se produce en el epitelio y células de la zona del cuello, MUC4 está generalmente ausente en la mucosa gástrica normal. (56).

***Intestino delgado**

MUC1 se detecta en las glándulas de Bruner, en el duodeno normal, la apomucina MUC1 no se detecta mientras MUC4 se encuentra en las células columnares y las glándulas de Bruner. (57)

***Colon**

Las dos mucinas unidas a la membrana MUC3 y MUC4 se expresan por las células caliciformes columnares del colon. (58).

***Páncreas**

MUC1 es la principal mucina unidas a la membrana expresada en condiciones normales en el páncreas, no existe la expresión de MUC4 de manera normal, pero en lesiones no neoplásicas como en conductos atróficos o en inflamaciones. (60)

***Tracto Hepatobiliar**

Se ha descrito una fuerte expresión de MUC3 y una débil expresión de MUC1 en células epiteliales biliares y en hepatocitos. El aumento en la expresión de MUC1 y MUC4 está relacionado con el comportamiento agresivo de células carcinogénicas de mal pronóstico. (61)

C) Mama

MUC1 se identificó por su marcada sobreexpresión en cánceres de mama humanos en comparación con las células normales en ductales epiteliales de mama, Los cambios en los O-glicanos de MUC4 presentes en esta glicoproteína se han asociado al desarrollo del cáncer de mama. Se han asociado las mucinas MUC2, MUC5AC, MUC3, MUC6 en el desarrollo del cáncer de mama. (40)

D) APARATO REPRODUCTOR FEMEMENINO

El tracto reproductivo femenino humano expresa una variedad de mucinas incluyendo ambos tipos secretadas y unidas a la membrana. Mientras MUC4 y MUC5B son las mucinas predominantes que se encuentran en el epitelio del tracto reproductivo. En contraste, MUC5AC cuenta con una mayor expresión en liminal que en el epitelio glandular, mientras que MUC6 exhibe una distribución irregular sin correlación a luminal o regiones glandulares. Los altos niveles de MUC8 se han detectado en diversos tejidos del tracto reproductivo, como la placenta, endometrio y cérvix, lo que contrasta con una expresión débil o falta de detección en el ovario, trompas de Falopio y el útero. MUC1,

se expresa de forma ubicua en todos los tejidos epiteliales del tracto reproductivo, incluyendo la trompa de Falopio, el útero, endocérvix, exocérvix y la vagina, mientras MUC4 es producido por la endocervical, ectocervical, y las células epiteliales vaginales. Sólo el endocérvix expresa consistentemente las mucinas secretadas, MUC5AC, MUC5B, MUC6, y menor medida MUC2. (12).

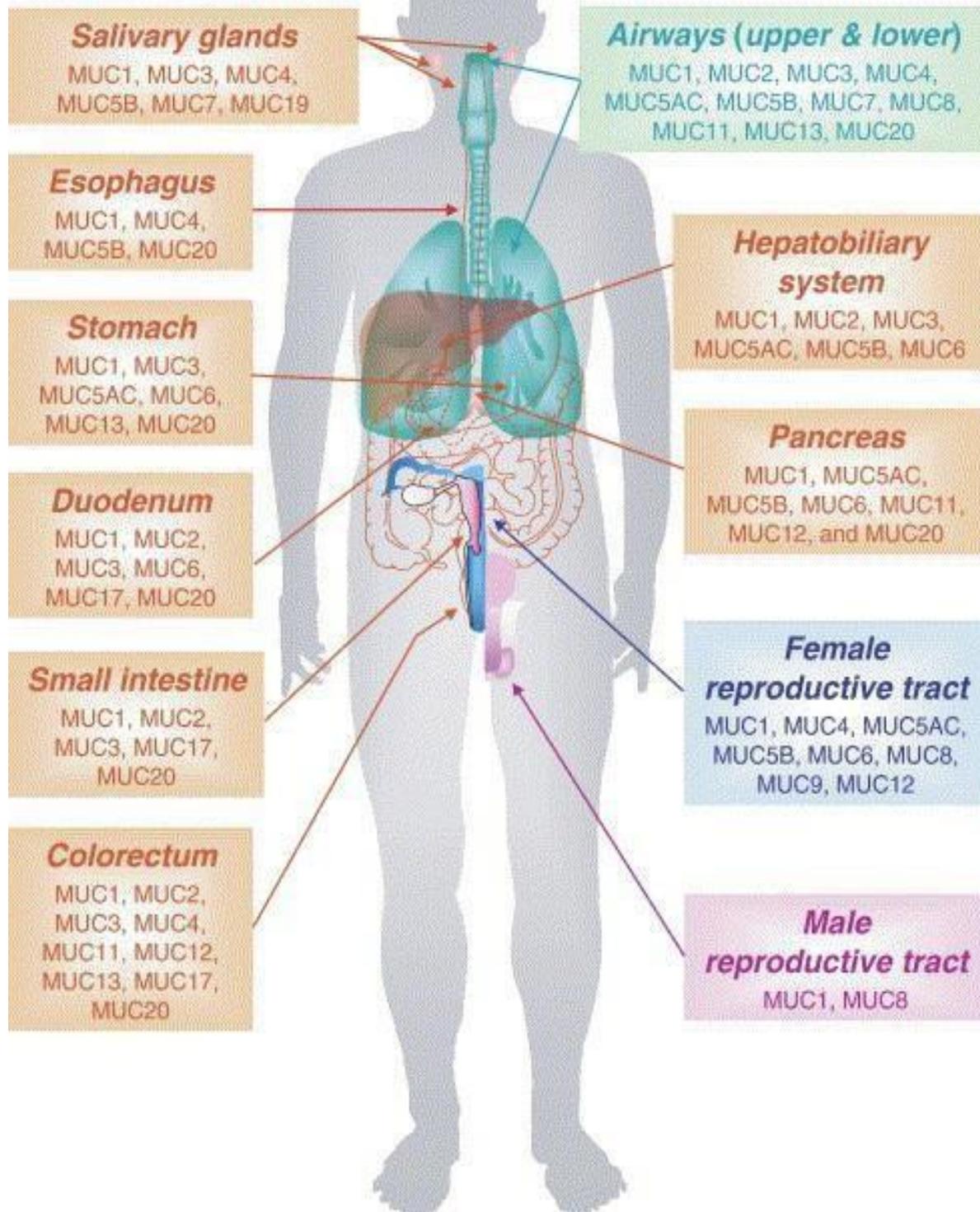


Figura No. - 18 Distribución especial de mucinas en el cuerpo humano. Las mucinas se producen por una variedad de tejidos epiteliales. Mostrando (un código de colores) son los principales sistemas de órganos productoras de mucina y las mucinas expresan en condiciones fisiológicas normales. (12).

MUCINAS COMO MARCADORES EN NEOPLASIAS CERVICALES.

El cuello útero tiene 2 tipos de células epiteliales: en el endocérvix que está compuesto por células secretoras de moco que expresa varios genes de mucina, y el exocérvix con un típico de epitelio escamoso estratificado y no expresa mucinas secretadas. El dominio transmembranal de MUC4 y su estructura molecular sugiere que tiene un papel protector y también pueden estar implicados en la señalización en el exocérvix. El epitelio cervical normal está cubierto por una capa de moco secretado por las células secretoras de moco endocervical que protege el epitelio de las agresiones externas y facilita la fecundación (53,62). El moco se compone principalmente por mucinas, proteínas altamente glicosiladas entre las cuales están MUC2, MUC5AC, MUC5B y MUC6, que codifican la formación de gel MUC1, MUC3, MUC4 y MUC12, codifican para las glicoproteínas transmembranales. Estudios realizados por Allyson Baker, William Grizzle y David Chhieng, donde evalúan la expresión de las mucinas en lesiones de cérvix, demostraron que en lesiones del exocérvix se presenta MUC4, en lesiones inmaduras de metaplasia escamosa se encuentran MUC2 y MUC4, basándose en los adenocarcinomas encontraron la sobre- expresión de MUC1 y en neoplasias endocervicales MUC2. Estudios realizados por la Unidad de Biología Celular y molecular del Instituto Municipal de Investigación Médica de Barcelona España en el 2001, demuestran que MUC4 en epitelio exocervical normal no se expresa, en cambio en lesiones por el Virus del Papiloma Humano en estudios NIC2 y NIC3 existe una expresión en la mayoría de las células con esta condición, aunque la relación entre la expresión de MUC4 y la infección por el VPH no se conoce, la activación de MUC4 en respuesta a la infección por VPH podría ser la consecuencia de la activación de las proteínas E6 / E7, así MUC4 puede ser un marcador útil para la transformación displásica cervical (62). MUC1, se ha estudiado extensamente en el tracto reproductivo femenino y se expresa en el endometrio. Desempeña un papel importante durante la implantación y el del embrión, pero se han revelado niveles altos en el adenocarcinoma de endometrio y de carcinomas de cuello uterino en comparación con los tejidos endometriales y cervicales normales (64).

JUSTIFICACIÓN

El cáncer-uterino ocupa uno de los principales lugares en muertes a nivel mundial, sin embargo, es considerado un cáncer cien por ciento prevenible, ya que toma años su desarrollo desde la infección de VPH en el cuello uterino, lo cual da un lapso donde la prevención y detección temprana pueden hacer la diferencia. En el tracto reproductor femenino se muestra normalmente una débil expresión de MUC1 y una fuerte expresión de MUC4. Cuando un epitelio sufre transformación maligna, los genes de las mucinas pueden someterse a la expresión aberrante causando reducción en la producción de una mucina y/o producción esperada de una mucina estructuralmente diferente en el epitelio transformado. La sobreexpresión de MUC1 y MUC4, se han asociado en tumores que progresan a metástasis, se han usado como marcadores de progresión en tumores de origen epitelial. MUC4 en epitelio exocervical normal no se expresa, en cambio en lesiones por el Virus del Papiloma Humano en estudios NIC2 y NIC3 (LIEAG) existe una expresión en la mayoría de las células con esta condición, así MUC4 puede ser un marcador útil para la transformación displásica cervical. MUC1, se ha estudiado extensamente en el tracto reproductivo femenino y se expresa en el endometrio y se han revelado niveles altos en el adenocarcinoma de endometrio y de carcinomas de cuello uterino en comparación con los tejidos endometriales y cervicales normales. Bajo estas investigaciones resulta evidente la realización de estudios por medio de inmunohistoquímica para la observación de la expresión de MUC1 y MUC4 en neoplasias cervicales con presencia del VPH, para predecir el cambio a malignidad. (62,64).

HIPOTESIS

La expresión de las proteínas MUC1 y MUC4, en tejidos de cérvix se pueden correlacionar directamente con neoplasias causadas por el virus del papiloma humano por medio de la técnica de inmunohistoquímica.

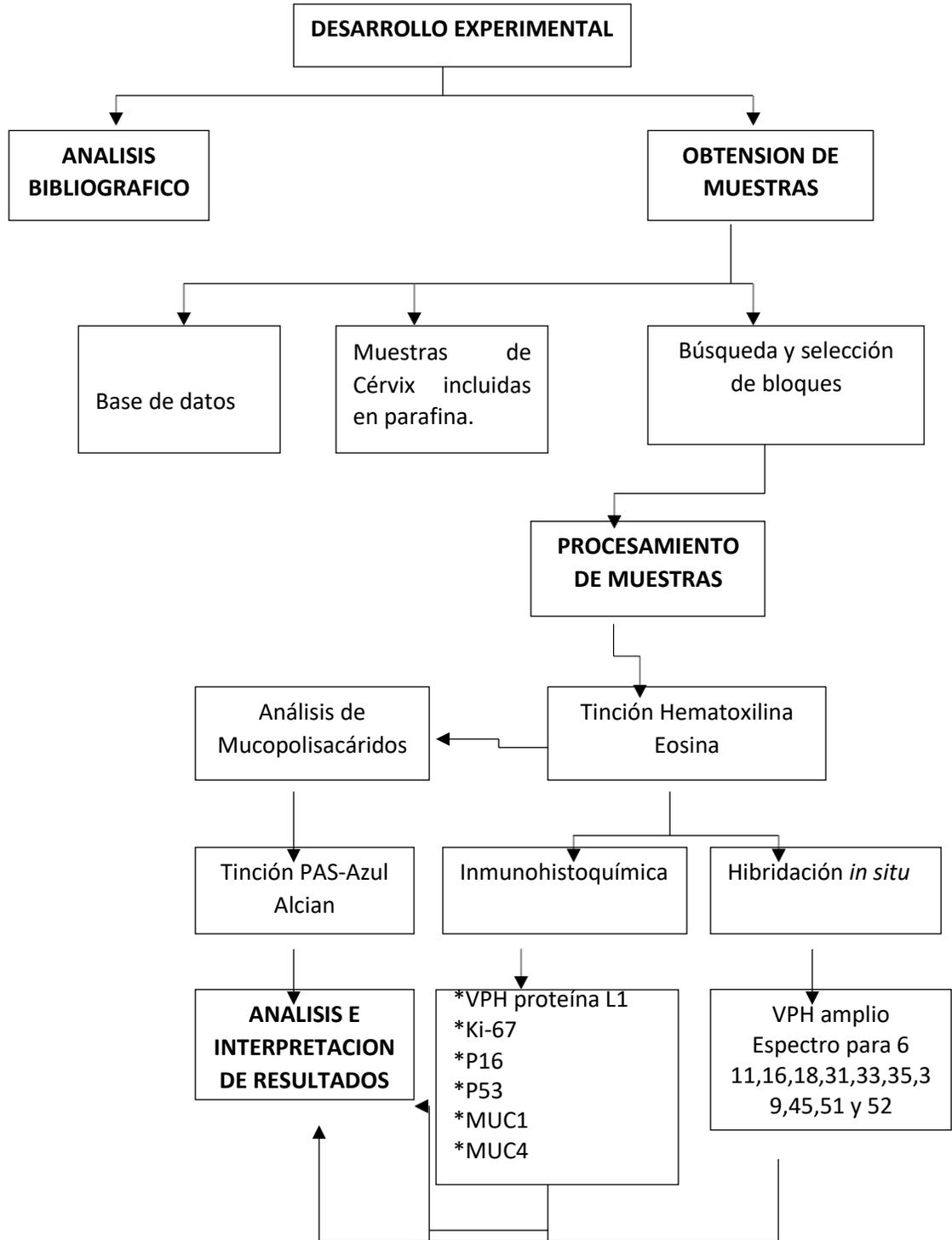
OBJETIVO GENERAL

Identificar la expresión de MUC1 y MUC4 transmembranales en biopsias de cérvix con neoplasias causadas por el virus del papiloma humano, por medio de la técnica de inmunohistoquímica.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Clasificar las biopsias de cérvix de acuerdo con la malignidad.
- Identificar la presencia de mucopolisacáridos ácidos y neutros en las biopsias de cérvix.
- Identificar la presencia del virus del papiloma humano en las muestras mediante inmunohistoquímica.
- Clasificar los tejidos de acuerdo con su malignidad utilizando los biomarcadores Ki-67, p16 y p53.
- Detectar la expresión de las proteínas MUC1 y MUC4 en las biopsias de cérvix por medio de inmunohistoquímica.
- Correlacionar la expresión de MUC1 y MUC4 con el estudio de malignidad en tejido cervical.

DESARROLLO EXPERIMENTAL



MATERIALES Y METODOS

SELECCIÓN DE MUESTRAS

Este fue un estudio de tipo retrospectivo, donde se incluyeron biopsias de cérvix. Dichas biopsias se obtuvieron de la Clínica de displasias de los Servicios de Salud de Zacatecas, muestras que fueron previamente diagnosticadas histopatológicamente por Patólogo y Oncólogo. Diagnósticos de pólipos inflamatorios, cervicitis, NIC1, NIC2, NIC3 y carcinomas.

Se recolectó un total de 255 muestras, pero 109 fueron las que cumplieron con los requisitos para ser procesadas por la técnica de inmunohistoquímica (Edad y condiciones físicas adecuadas para su procesamiento). El trabajo experimental tuvo lugar en el laboratorio de Patología y Diagnóstico Molecular.

PRETRATAMIENTO DE PORTAOBJETOS

Se preparó Silano Sigma-Aldrich al 2.5% en acetona, los portaobjetos fueron limpiados con gasa, incubados por 5 minutos en el silano, lavados con dos cambios de agua destilada y se dejaron secar a 60-70°C por una hora, esto se realizó para que los tejidos se adhieran mucho mejor a los portaobjetos.

CORTE DE MUESTRAS

El corte de las muestras se llevó a cabo en el laboratorio de Patología y Diagnóstico Molecular, los cortes realizados de cada bloque de parafina se realizaron en un micrótopo de rotación "LEICA RM2125RTS" de un grosor de 1-2 μ C. Un corte de cada muestra fue teñido con Hematoxilina y Eosina para destacar su estructura al microscopio óptico y así verificar el diagnóstico y el lugar de la lesión.

TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA

El método de coloración más convencional usado en histología e histopatología se conoce como hematoxilina y eosina. La hematoxilina es un colorante básico (colorante catiónico) por la presencia del grupo amino (-NH₂), que tiñe los componentes ácidos de los tejidos, los núcleos celulares por su contenido de DNA se observan de color azul-violáceo. La eosina es un colorante ácido (colorante aniónico) por la presencia del grupo carboxilo (-COOH) tiñe los componentes básicos de los tejidos, el citoplasma celular de distintas tonalidades de rojo (65).

Los tejidos fueron desparafinados en xileno, hidratados en alcoholes degradados empezando por etanol absoluto hasta agua destilada, teñidos con Hematoxilina de Harris de *Hyce*, decolorados con alcohol ácido al 0.5% y fijando el color en Carbonato de litio, lavados en agua destilada, en etanol al 96% y teñidos con Eosina de *Sigma*, lavados y deshidratados en cambios graduales de alcohol hasta llegar a alcohol absoluto, se dejaron secar a temperatura ambiente, se montaron con cubre objetos de vidrio y resina sintética y se observaron, para el análisis histológico e identifican el sitio de la lesión causada por el Virus del Papiloma Humano.

TINCIÓN PAS-AZUL ALCIANO

Esta técnica se encuentra una oxidación de ácido periódico, que reacciona con grupos hidroxilos libres de una hexosa o con grupos adyacentes hidroxilo y amino de una hexosamina, convirtiéndolos en grupos aldehídos con rotura de la unión carbono-carbono. En el siguiente paso, los aldehídos reaccionan con el reactivo de Schiff produciendo un complejo estable de color rojo magenta en los sitios donde se encuentran los azúcares ya mencionados. La mayor parte de esta reacción correspondiente a glucógeno y glicoproteínas. El azul alciano reacciona con compuestos aniónicos, como sustancias mucosas ácidas o mucinas ácidas con pH 2.5, las sustancias mucosas ácidas, tanto carboxílicas como sulfatadas, se tiñen de azul. La demostración de las diversas mucinas dependerá de sus características particulares. Las mucinas neutras pueden ser teñidas por la tinción de PAS, mientras que las mucinas ácidas pueden teñirse con azul alciano.

Los tejidos fueron desparafinados en xileno, hidratados en alcoholes degradados empezando por etanol absoluto hasta agua destilada, se cubrió cada tejido con ácido acético al 3%, se tiñó con azul alciano de *Sigma*, fueron lavadas con agua destilada, secando cada laminilla se le adicionó ácido periódico al 0.5% y lavadas con agua destilada, se cubrió cada tejido con el reactivo de Shift, lavadas con agua corriente para terminar la reacción, teñidas con Hematoxilina de Harris de *HyceI*, fueron lavadas con agua destilada, deshidratadas en cambios graduales de etanol desde agua destilada

Hasta etanol absoluto, se dejaron secar a temperatura ambiente, se montaron y se observaron, para identificar los mucopolisacáridos ya sean ácidos o neutros que pudo presentar la muestra.

INMUNOHISTOQUIMICA

La técnica inmunohistoquímica (IHQ) es un método con el objetivo de localizar un antígeno específico en tejidos, basándose en el reconocimiento antígeno anticuerpo. Esta técnica ha ido evolucionando y juega un papel importante en el diagnóstico histopatológico, especialmente con respecto a la clasificación y diagnóstico de un tumor. Por otra parte, se ha ido adaptando para la identificación y demostración de marcadores pronósticos y predictivos (68,69).

Los tejidos fueron desparafinados en xileno, hidratados en alcoholes degradados empezando por etanol absoluto hasta agua destilada, los epitopes fueron desenmascarados con Buffer Citrato 10mM de pH 6.03 en la olla de presión Oster y tender Cocker, lavados con PBS de pH 7.4, la peroxidasa endógena fue bloqueada con H₂O₂ al 0.9%, el anticuerpo primario fue incubado a temperatura ambiente durante 45 minutos, se realizaron lavados con PBS, se incubó con el anticuerpo secundario a temperatura ambiente durante 20 minutos, se lavó con PBS, se incubó con estreptavidina durante 15 minutos, se lavó con PBS, se revelaron las reacciones con diaminobencidina al 4% monitoreado cada reacción al microscopio, fueron contra teñidas con Hematoxilina de Harrys *Hycel* por, fueron lavadas con agua destilada, deshidratadas en cambios graduales de etanol desde agua destilada hasta etanol absoluto, se dejaron secar a temperatura ambiente, se montaron con cubre objetos de vidrio y resina sintética y se observaron. El kit de inmunohistoquímica utilizado fue el Starr Trek Universal HRP Detection System de Biocare medical y para p16 el kit de detección de BIOSB. Los controles utilizados para esta técnica fueron piel, pólipos de colón, adenocarcinomas de colón, células siHa y Caski.

Los anticuerpos utilizados es este trabajo fueron:

Tabla 5.- Anticuerpos usados durante el estudio

Anticuerpo	Origen	Clona	Buffer Recuperación antigénica	Marca y No. De catálogo.	Control positivo.
HPV Cocktail Broad (HPV- 1,6,11,16- 16,18,31)	Ratón Monoclonal	BPV- 1/1H8+CAM VIR	Citrato 10mM pH=6.03	BIOCARE MEDICAL PM 177 AA	Células siHa y Caski
Ki-67	Conejo Monoclonal	SP6	Citrato 10mM pH=6.03	THERMO SCIENTIFIC RM-9106-S1	Piel, CaCu
P16	Ratón Monoclonal	2D9A12	Citrato 10 mM pH=6.03	ABCAM	CaCu
P53	Conejo Monoclonal	EP9 Anteriormente Y5	Citrato 10 mM pH=6.03	BIOCARE MEDICAL CME 298 AK	Adenocarcinoma de colon
MUC1	Ratón Monoclonal	695	Citrato 10mM pH=6.03	BIOCARE MEDICAL CM 319 B	Adenocarcinoma de colon
MUC4	Ratón Monoclonal	1G8	Citrato 10Mm pH=6.03	INVITROGEN BY LIFE TECHNOLOGI ES 18-2322	Pólipos de colon

HIBRITACIÓN *in situ* CROMOGÉNICA (CISH)

Hidratación *in situ* es una técnica que detecta secuencias de ácidos nucleídos en células, cromosomas o tejidos preservados. La detección *in situ* provee una visualización directa de la localización espacial de secuencias específicas que es crucial para dilucidar la organización y función génica, por lo que el método de hibridación *in situ* se ha convertido en una técnica importante en diversos campos, incluyendo diagnósticos de rearrreglos cromosomales, detección de infecciones virales y análisis de la función génica durante el desarrollo embrionario.

La hibridación *in situ* toma como fundamento la complementariedad de los ácidos nucleídos, la cual puede ser DNA y/o RNA, a través de puentes de hidrógeno formados entre las bases: adenina-timina (DNA) o uracilo (RNA) y citosina guanina (DNA y RNA). Este apareamiento da lugar a una doble cadena en la cual una cadena, tiene la orientación opuesta a la otra con respecto al esqueleto azúcar-fosfato. La secuencia es leída de 5´ a 3´ (70).

Los tejidos fueron desparafinados en xileno, hidratadas en alcoholes degradados empezando por etanol absoluto hasta agua destilada, los epitopes fueron desenmascarados por medio de una digestión enzimática con proteínas K, lavadas con PBS de pH 7.4, la peroxidasa endógena fue bloqueada con H₂O₂ al 0.90%, se deshidrataron las muestras y se le colocó la sonda HPV amplio espectro para 6,11,16,18,31, 33, 35, 39, 45, 51 y 52, DAKO CYTOMATION. Se colocaron en el equipo Microprobe™ FisherBiotech, se incubó a 95°C por 10 minutos, después se incubó a 37°C toda la noche para maximizar la hibridación, se dio un lavado astringente a 55°C por 30 minutos, se maximizó la señal y se reveló con diaminobensidina, se contra tiñó con Hematoxilina de Harris Hycel, fueron lavadas con agua destilada, deshidratadas en cambios graduales de etanol desde agua destilada hasta etanol absoluto, se dejaron secar a temperatura ambiente, se montaron y se observaron. Los controles fueron células Caski.

RESULTADOS

Se realizó un estudio analítico, cualitativo y retrospectivo, donde se identificaron los diferentes diagnósticos en biopsias de cérvix, para después analizar la expresión de las mucinas transmembranales MUC1 y MUC4.

CLASIFICACIÓN DEL TOTAL DE BIOPSIAS RECOLECTADAS

Clasificación por diagnóstico.

Se identificaron 255 biopsias de cérvix de los meses octubre a diciembre 2018, obtenidas del consultorio médico y Laboratorio de Patología y Oncología. Se seleccionaron las muestras que tuvieran la edad reportada para el estudio. Como se puede ver en la tabla No. -6 se arrojaron diferentes diagnósticos, donde el que más se observa en la población de estudio es la de NIC1 con un total de 163 muestras lo que corresponde al 79.80% de las muestras, se observa que va aumentando este diagnóstico que va de 45 muestras en octubre y 70 muestras de noviembre a diciembre 2018. Se reportaron 12 muestras de NIC2 arrojando un mayor número, en cambio solo se reportaron 3 NIC2, se reportaron 5 carcinomas y un adenocarcinoma. Se reportaron 49 cervicitis, 15 pólipos endocervicales inflamatorios, una hiperplasia escamosa, 3 quistes de Naboth, un leiomioma, adenofibroma y una muestra sin lesión aparente.

Tabla 6.- Diagnósticos Histopatológicos de biopsias de epitelio cervical de octubre a diciembre del 2018.

Muestras

MDIAGNÓSTICO	octubre	noviembre	diciembre	total	%
NIC1	45	48	70	163	79.80
NIC2	4	3	5	12	2.63
NIC3	0	0	3	3	0.65
CARCINOMA	1	2	2	5	1.09

ADENOCARCINOMA	0	0	1	1	0.22
CERVICITIS	2	25	22	49	10.77
POLIPO ENDOCERVICAL INFLAMATORIO	4	8	3	15	3.30
HIPERPLASIA ESCAMOSA	0	0	1	1	0.22
QUISTE DE NABOTH	0	1	2	3	0.65
LEIOMIOMA	0	1	0	1	0.22
ADENOFIBROMA	0	1	0	1	0.22
SIN LESION	0	0	1	1	0.22
TOTAL	56	89	110	255	100%

CLASIFICACIÓN POR EDAD

Se clasificaron las muestras de acuerdo con la edad, tomando en cuenta cada diagnóstico.

Como se puede observar en la figura No.27 mostrando el rango de edad donde se pueden clasificar los diagnósticos de las pacientes, el registro de edad en el diagnóstico de NIC1 va desde los 16 a los 64 años de edad, donde un 18.6% de las muestras con este diagnóstico tienen una edad entre los 15 y 24 años, el 32.6% va de los 25 a los 34 años, el 32% va de los 35 a los 44 años, 14.6% va de 45 a 54 años y el 2% de 55 a 64 años de edad. Por consiguiente, los rangos de edad más frecuentes en la población de estudio para este diagnóstico están entre los 25 y 44 años. El registro de edad en NIC2 va desde los 25 a los 74 años con el 11.11% entre los 25 a los 34 años y 65 a los 74 años, un 55.55% entre los 35 a los 44 años, 22.22% entre los 45 a los 54 años, observando que el rango de edad más frecuente para este diagnóstico en la población de estudio es 35 a 44 años. El registro de edad en NIC3 va de los 19 a los 34 años en la población de estudio siendo el diagnóstico más severo reportado en una edad temprana. El registro de edad en carcinoma va de 45 a los 84 años, dando un 40% entre 45 a 54 años y en 75 a 84 años. El registro de edad en cervicitis va de 15 a los 54 años, donde el rango de edad más frecuente con un 50% está entre 25 a 34 años, seguido por un 34.6% entre 35 a 44 años. El registro de edad de los pólipos

inflamatorios va de los 15 a los 54 años, donde el rango de edad más frecuente está entre 25 a 34 años y de los 35 a 44 años con un 34.6% cada uno.

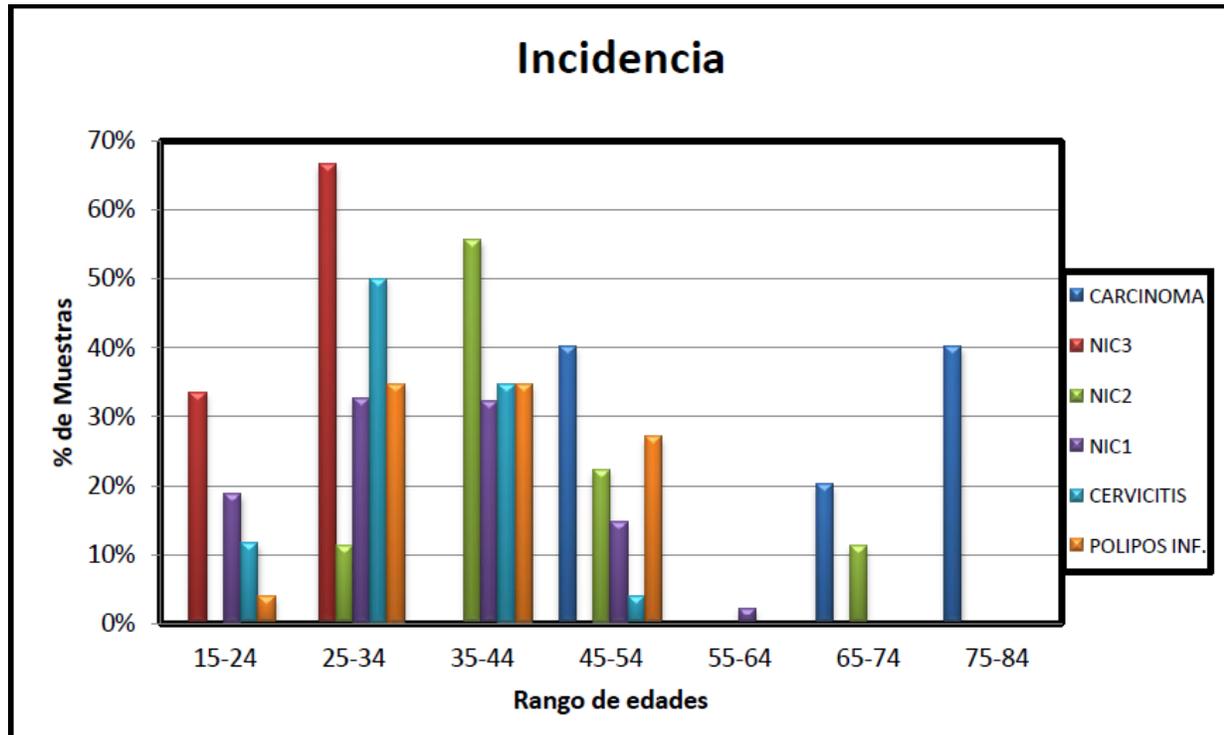


Figura No. - 19 Incidencia por edades a partir de la primera edad más joven reportada en los diferentes diagnósticos histopatológicos en muestras de epitelio cervical.

PRESENCIA DE MUCOPOLISACARIDOS ÁCIDOS Y NEUTROS

Se realizaron los cortes a las muestras recuperadas y se tiñeron con las técnicas de H&E y PAS/AA como se menciona en el apartado de materiales y métodos, de las cuales se excluyeron las que no tenían un buen proceso de fijación.

PROCESADAS				
DIAGNOSTICO	OCTUBRE	NOVIEMBRE	DICIEMBRE	TOTAL
NIC1	8	58	43	109
NIC2	3	3	3	9
NIC3	0	0	3	3
CARCINOMA	1	2	2	5
POLIPOS INFLAMATORIOS	0	1	0	1
CERVICITIS	0	0	1	1

Tabla No. -7 Muestras aptas y procesadas en el estudio.

La expresión de mucopolisacaridos ácidos y neutros en las muestras procesadas de NIC1, NIC2, NIC3, carcinoma y cervicitis fueron negativos a secreción tanto para mucopolisacáridos ácidos como neutros, así como se muestra en la figura No. -21. Las muestras procesadas de pólipos inflamatorios fueron positivas a secreción a mucopolisacáridos ácidos, dando una coloración azul, así como se muestra en las figuras No. - 22 y 21.

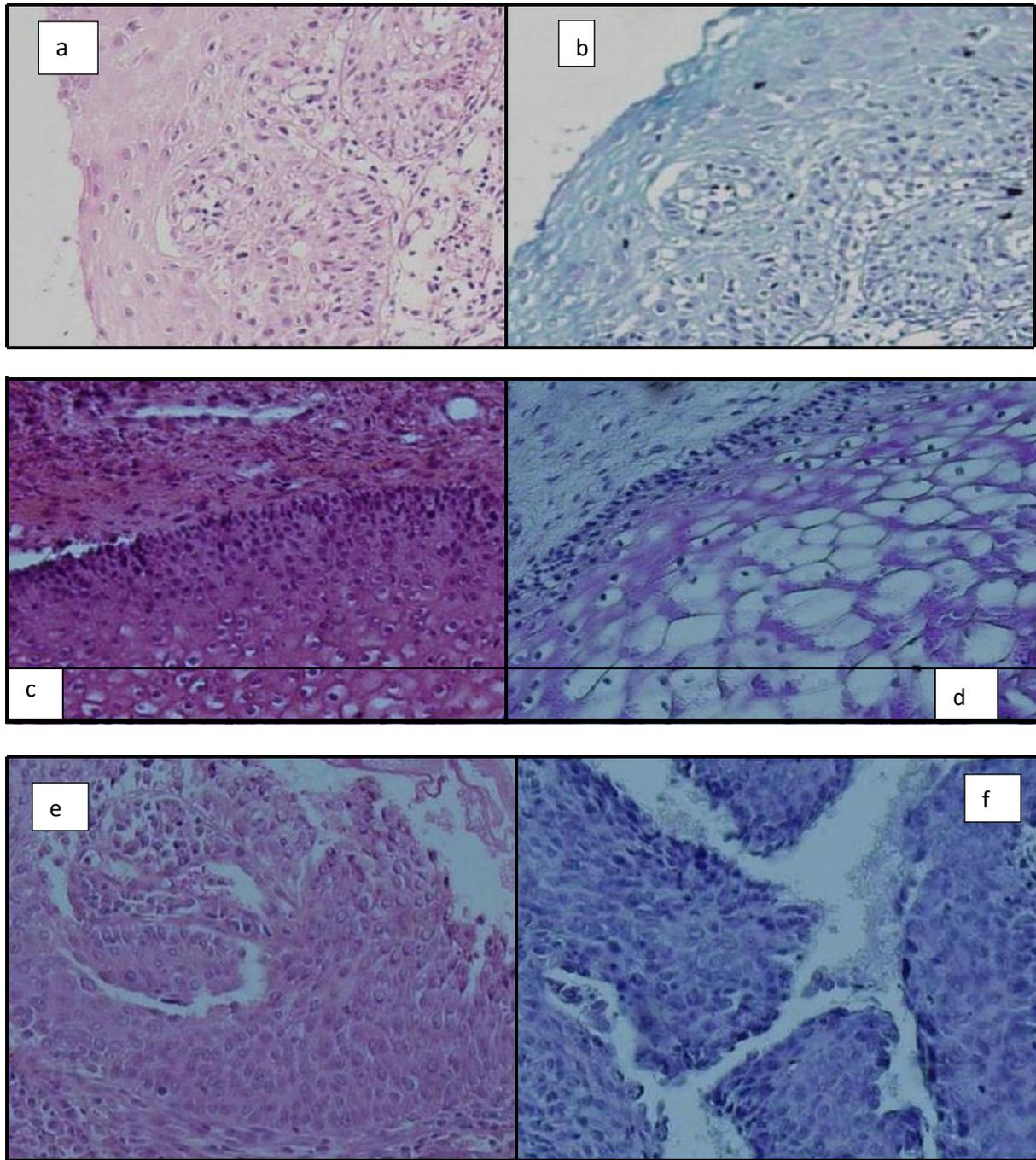


Figura No. 20. Muestras teñidas con H&E y PAS/AA. a) NIC1 tinción H&E b) NIC1 tinción PAS/AA c) NIC2 tinción H&E d) NIC2 tinción PAS/AA e) NIC3 tinción H&E f) NIC3 tinción PAS/AA. Las fotografías fueron tomadas en el Microscopio Olympus 1x71 en el objetivo de 20x.

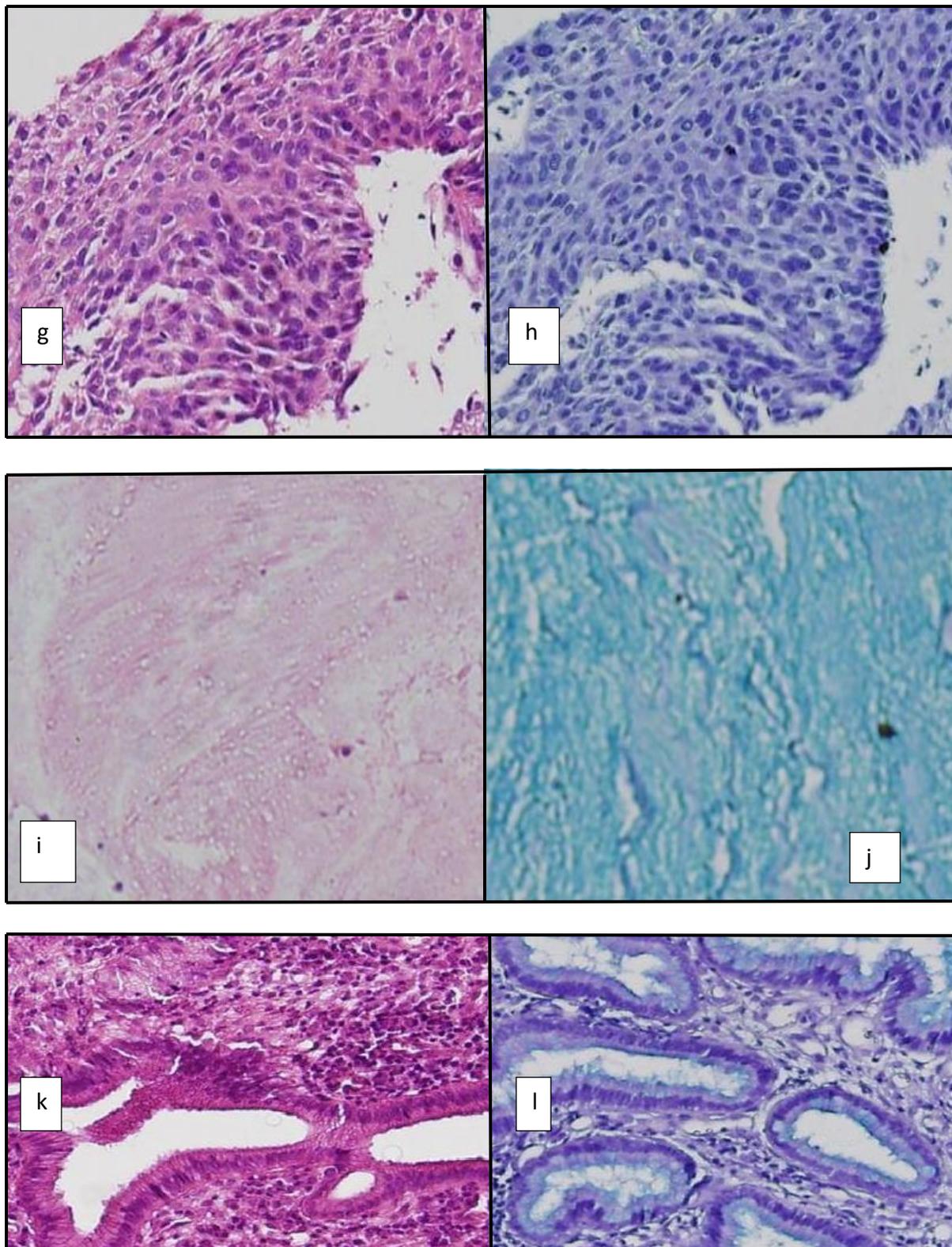


Figura No. - 2 Muestras teñidas con H&E y PAS/AA g) Carcinoma tinción H&E h) Carcinoma tinción PAS/AA i) Cervicitis tinción H&E j) Cervicitis tinción PAS/AA k) Pólipo inflamatorio tinción H&E l) Pólipo inflamatorio tinción PAS/AA. Las fotografías fueron tomadas en el Microscopio Olympus 1x71 en el objetivo de 20x.

IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

Se realizó la técnica de Inmunohistoquímica para anti L1 de VPH como se menciona en el apartado de materiales y métodos. La presencia de la proteína L1 de la Capside del Virus del Papiloma Humano en las muestras procesadas mostradas en la Tabla No. 7 va disminuyendo conforme la lesión aumenta como se puede observar en la Figura No. -22. Las muestras procesadas con el diagnóstico de NIC1 dio positivo en el 90% de las muestras, en cambio en las muestras procesadas de NIC2 y NIC3 dieron positivo por debajo del 33% de las muestras, en carcinoma el 20% de las muestras procesadas dieron positivo, pero solo en aquellas células que no están completamente transformadas, así como se muestra en la figura No. -23.

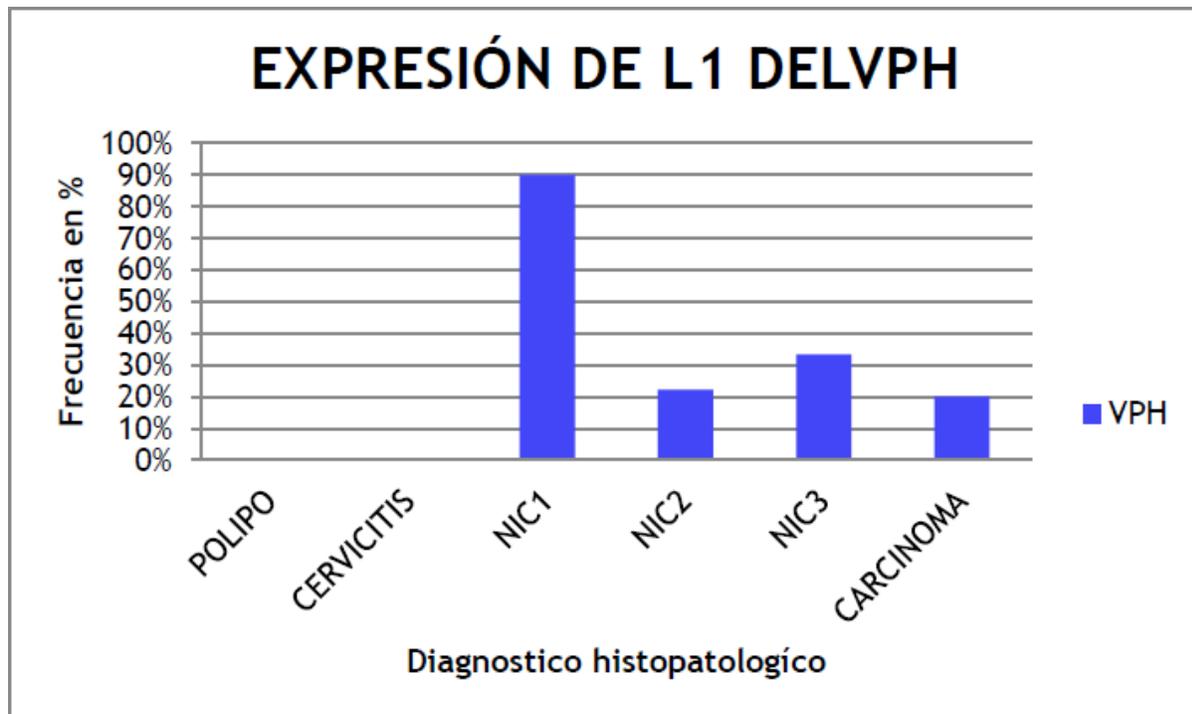


Figura No. - 22 Expresión de la proteína L1 del VPH de alto riesgo en las diferentes muestras.

Se realizó la técnica de Hibridación *in Situ* Cromogénica (CISH) como se menciona en el apartado de materiales y métodos en algunas de las muestras procesadas, se llevó a cabo en el Laboratorio de Patología comprobando que el DNA viral se encuentra en las muestras procesadas, el DNA del VPH de alto riesgo fue detectado en los diagnósticos NIC1, NIC2, NIC3 y carcinoma, en cambio en las muestras procesadas con los diagnósticos de cervicitis y pólipos inflamatorios dieron negativo a la presencia del DNA viral, así como se muestra en la Figura No.-24.

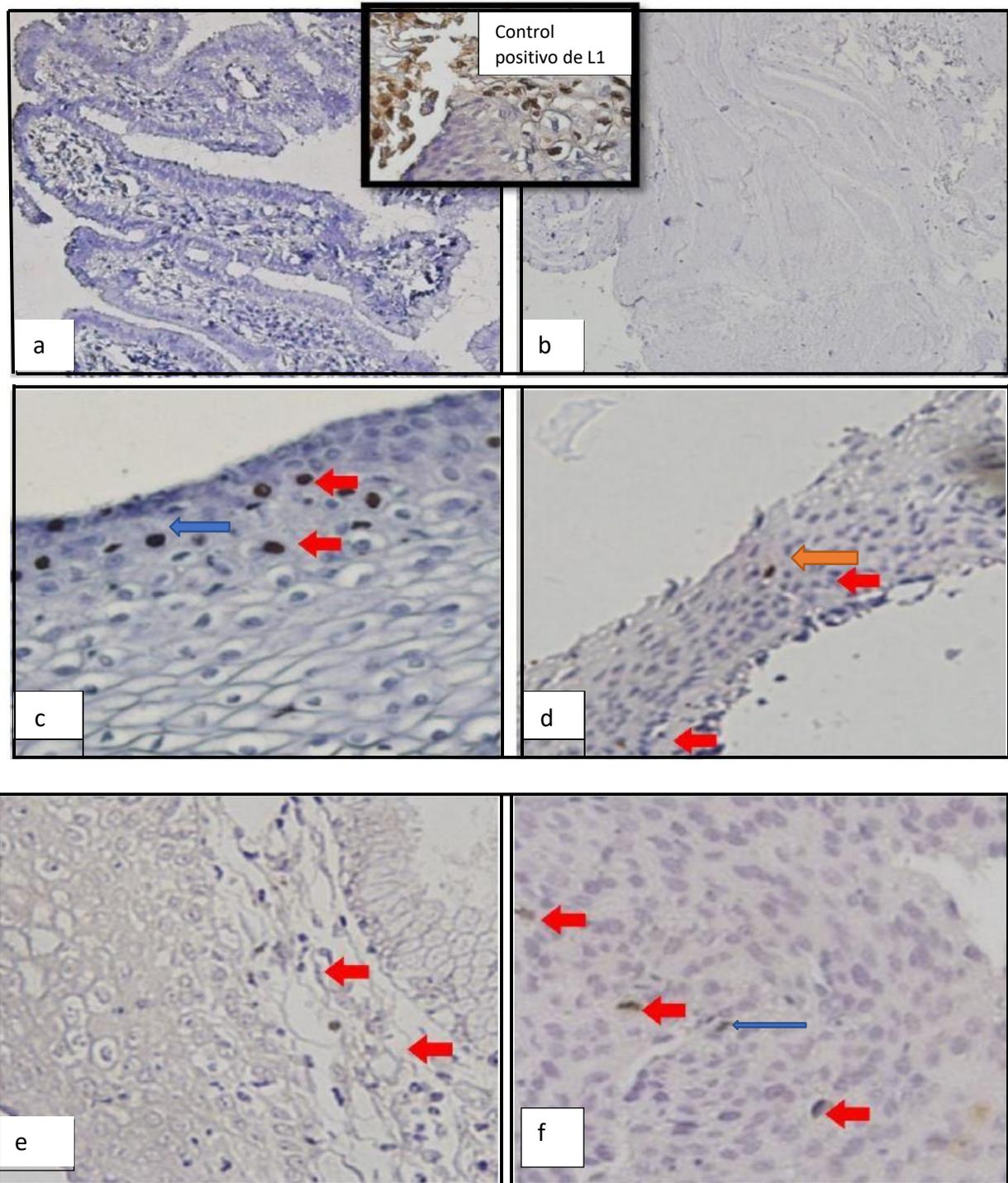


Figura No. - 23 Expresión de la proteína L1 del VPH de alto riesgo en: a) Pólipo inflamatorio b) Cervicitis c) NIC1 d) NIC2 e) NIC3 y f) Carcinoma. Las flechas señalan la señal positiva a la proteína. Las muestras estudiadas fueron reveladas con DAB y contra teñidas con hematoxilina.

Las fotografías fueron tomadas en el Microscopio Olympus 1x71 en el objetivo de 40x. En el recuadro de la parte superior se encuentra el control positivo de L1 del VPH en un carcinoma de cérvix.

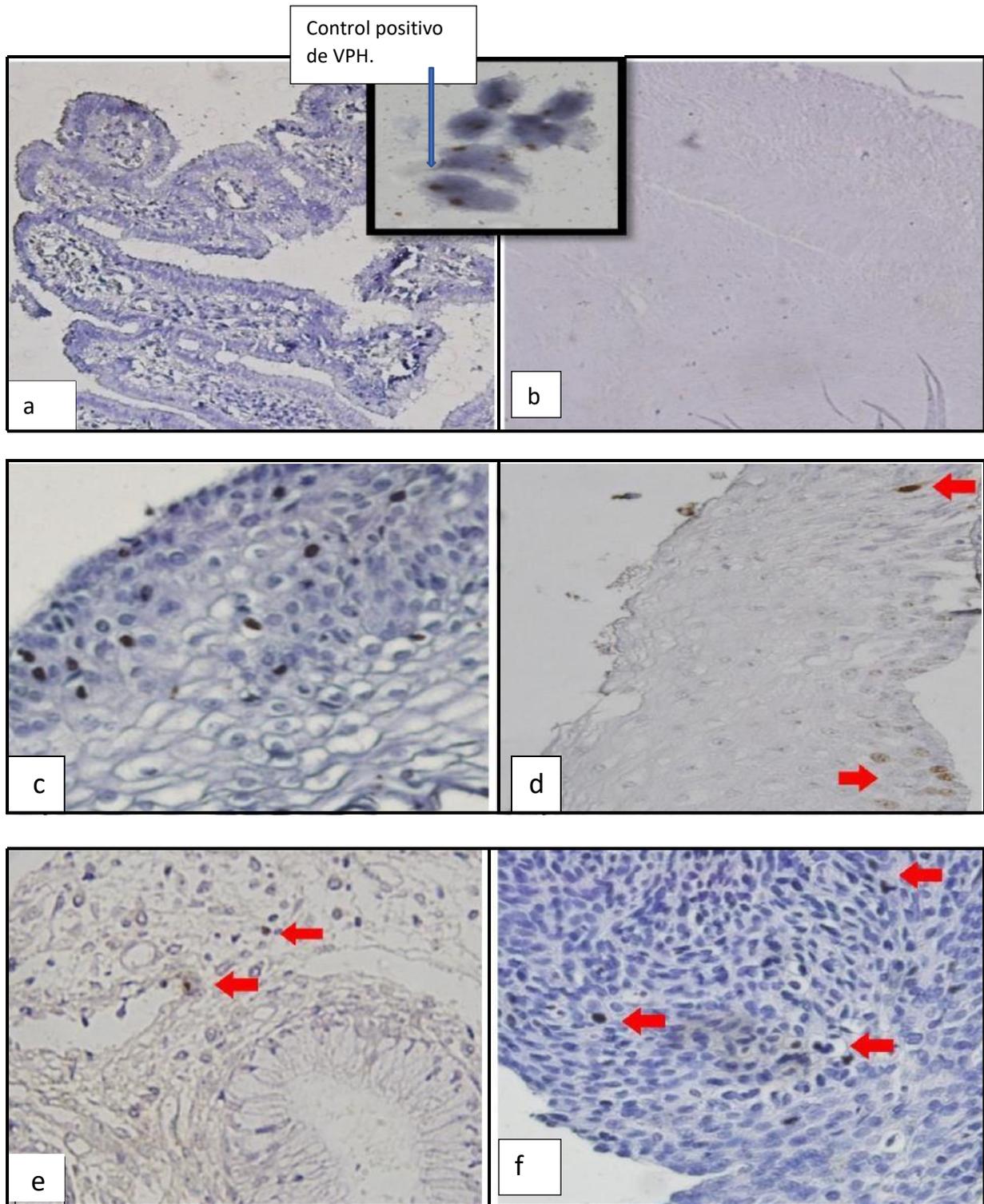


Figura No. -24 CISH de VPH de alto riesgo en: a) Pólipo inflamatorio b) Cervicitis c) NIC1 d) NIC2 e) NIC3 f) Carcinoma. Las flechas señalan la señal positiva al DNA viral. Las muestras estudiadas fueron reveladas con DAB y contra teñidas con hematoxilina. Las fotografías fueron tomadas en el Microscopio Olympus 1x71 en el objetivo de 40x. En el recuadro de la parte superior se encuentra el control positivo del VPH en la línea celular Casky.

BIOMARCADORES EN NEOPLASIAS CERVICALES

En este estudio se analizaron y procesaron un total de 109 biopsias de cérvix incluidas en parafina con las metodologías de IHQ, ampliamente descritas en la sección de material y métodos, observadas en la Tabla No. -7

IDENTIFICACION DE KI-67

Se realizó la técnica de Inmunohistoquímica para anti-Ki-67 como se menciona en el apartado de materiales y métodos. La presencia del marcador de proliferación celular en las muestras procesadas con presencia y ausencia del Virus del Papiloma Humano se encuentra expresado con forme aumenta la malignidad de la lesión, salvo las muestras procesadas con el diagnostico de NIC3 que fueron negativas a este biomarcador. En la Figura No. – 25, se observa que el 23.68% de las muestras procesadas con diagnóstico de NIC1 son positivas y el 100% de los carcinomas expresan este biomarcador, en cambio las muestras procesadas con el diagnostico de cervicitis y pólipos inflamatorios dieron un resultado negativo a la expresión del biomarcador como se puede observar en la Figura No. -26.

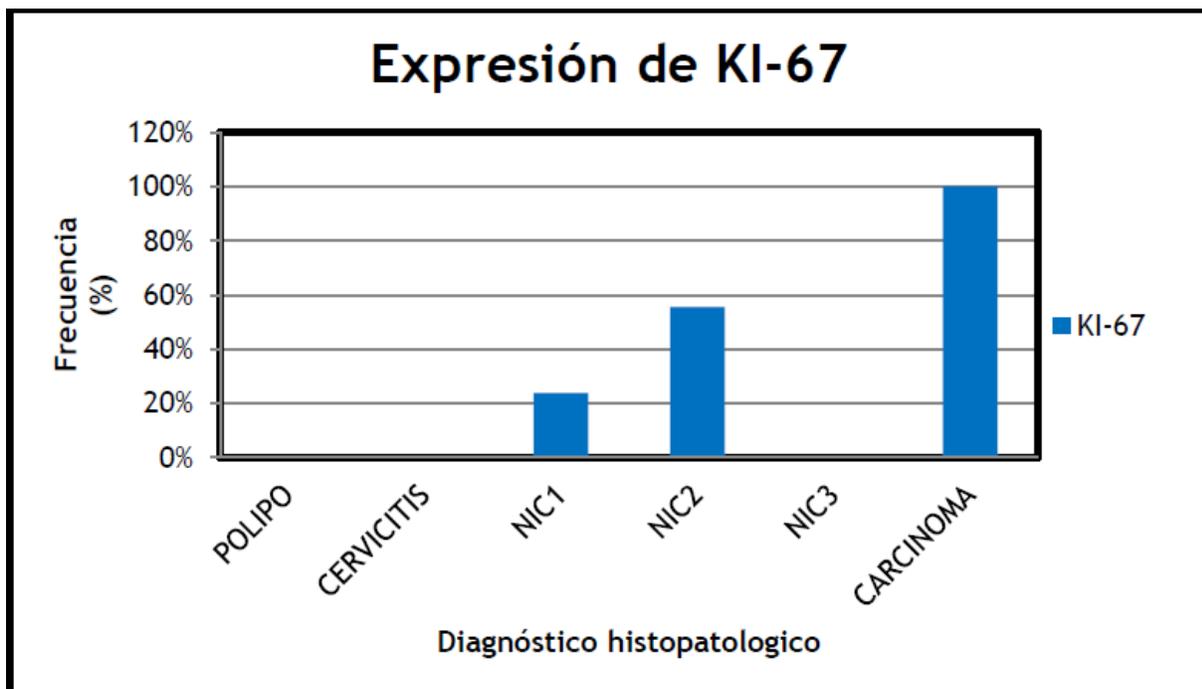


Figura No. -26. Expresión del biomarcador Ki-67 en los diferentes diagnósticos histopatológicos de las muestras procesadas.

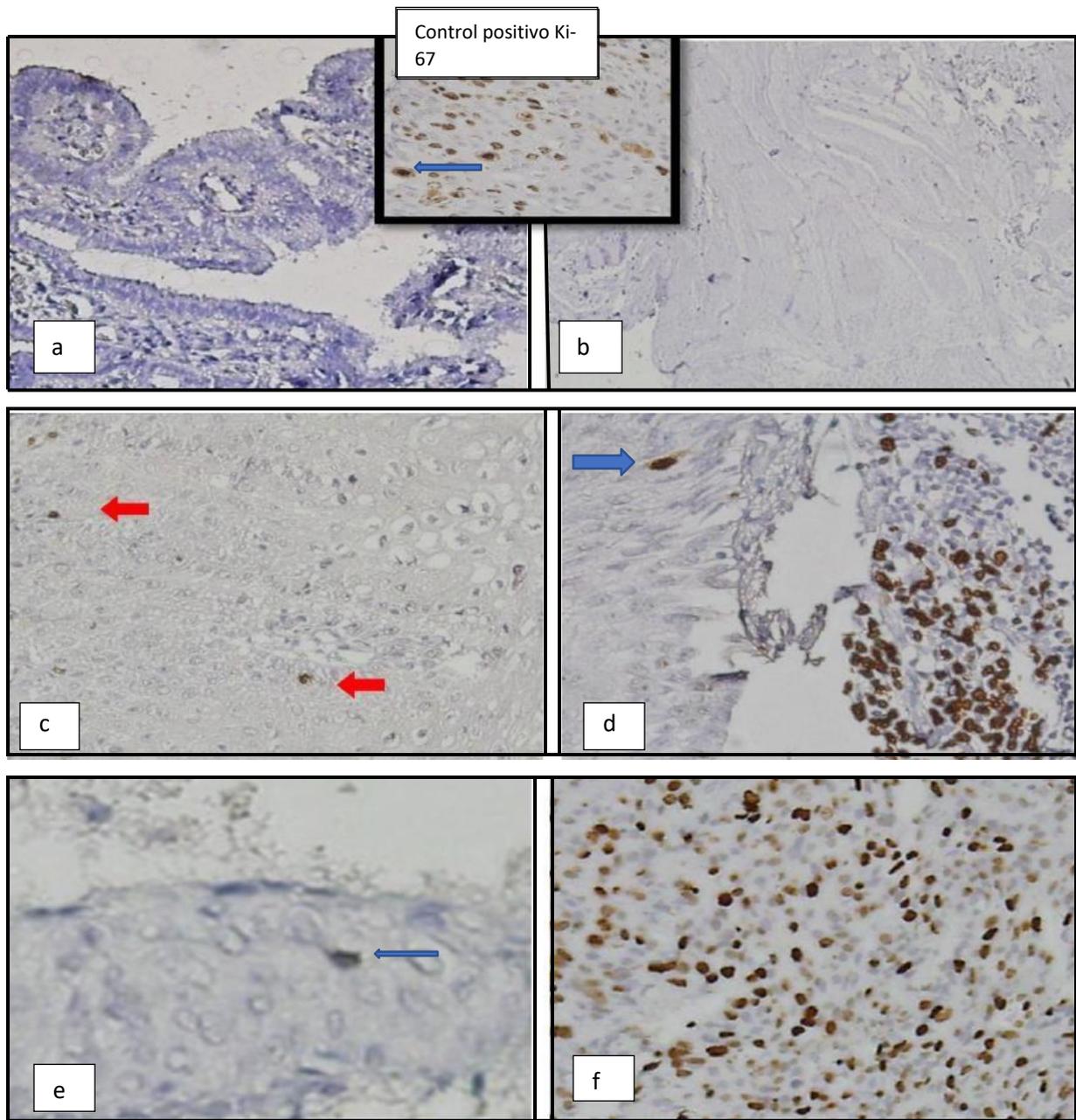


Figura No. -26 Expresión del biomarcador Ki-67 en los diferentes diagnósticos histopatológicos de: a) Pólipos inflamatorios b) Cervicitis c) NIC1 d) NIC2 e) NIC3 y f) Carcinoma. Las flechas señalan la señal positiva a la proteína Ki-67. Las muestras estudiadas fueron reveladas con DAB y contra teñidas con hematoxilina. Las fotografías fueron tomadas en el Microscopio Olympus 1x71 en el objetivo de 40x. En el recuadro de la parte superior se encuentra el control positivo de Ki-67.

IDENTIFICACION DE P16

La identificación de p16 en algunas de las muestras procesadas se llevó a cabo en el Laboratorio de Patología. En la figura No. - 27 podemos observar la expresión de p16 en las muestras procesadas con los diagnósticos de NIC1, NIC2, NIC3 y carcinoma, donde la expresión en las muestras procesadas con el diagnóstico de NIC3 observamos solo una baja expresión citoplasmática del biomarcador, en comparación de los demás diagnósticos donde se observa tanto en núcleo como en citoplasma.

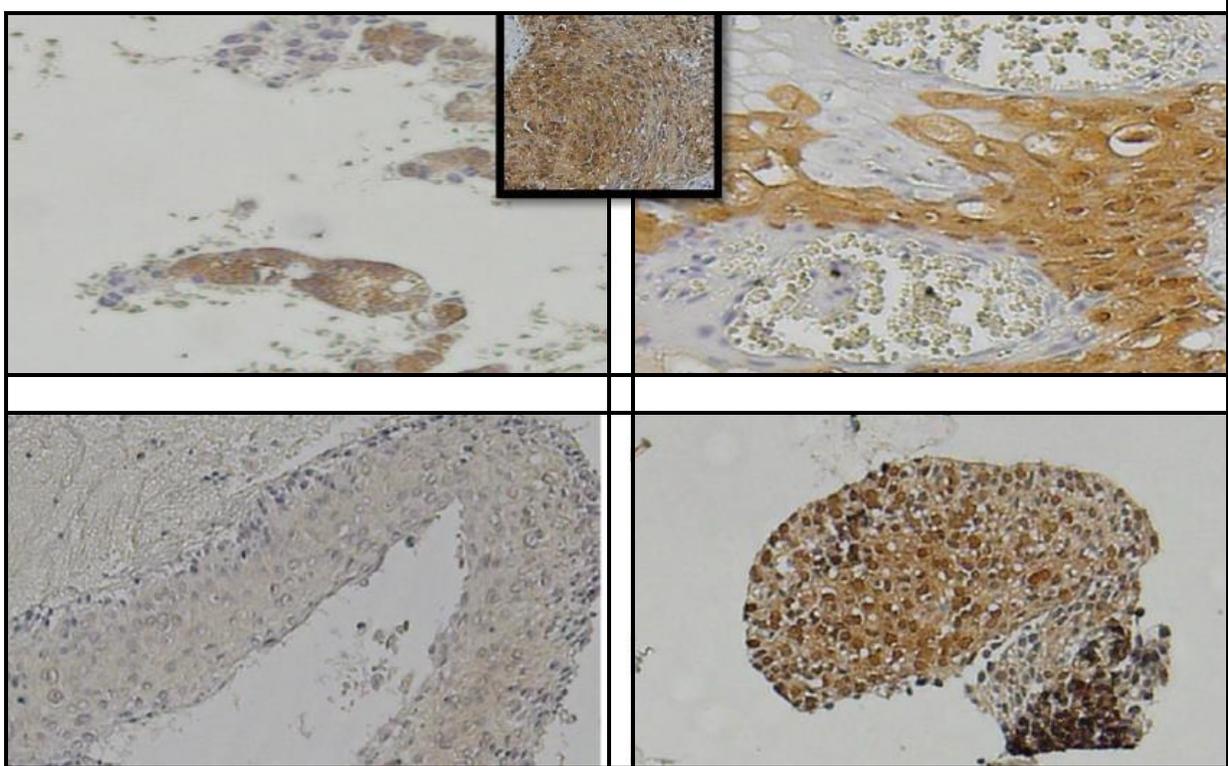


Figura No. -27 Expresión del biomarcador p16 en los diagnósticos histopatológicos de: a) NIC1 b) NIC2 c) NIC3 d) Carcinoma. Las muestras estudiadas fueron reveladas con DAB y contra teñidas con hematoxilina. Las fotografías fueron tomadas en el Microscopio Olympus 1x71 en el objetivo de 40x. En el recuadro de la parte superior se encuentra el control positivo de p16 en un carcinoma de cérvix.

IDENTIFICACIÓN DE P53

Se realizó la técnica de la Inmunohistoquímica para anti p53 como se menciona en el apartado de materiales y métodos. La presencia de p53 en las muestras procesadas con la presencia del Virus del Papiloma Humano, se encuentra disminuida con forme la lesión aumentada, es decir p53 se expresa de forma nuclear en las muestras procesadas con el diagnóstico de NIC1 y NIC2, en NIC3 la expresión de p53 no fue nuclear sino citoplasmática, en carcinomas solo se expresó en aquellas células que no estuvieron del todo transformadas, en cambio en las muestras procesadas con el diagnóstico de pólipos y cervicitis fue negativa la expresión, tal y como se muestra en la Figura No.-28.

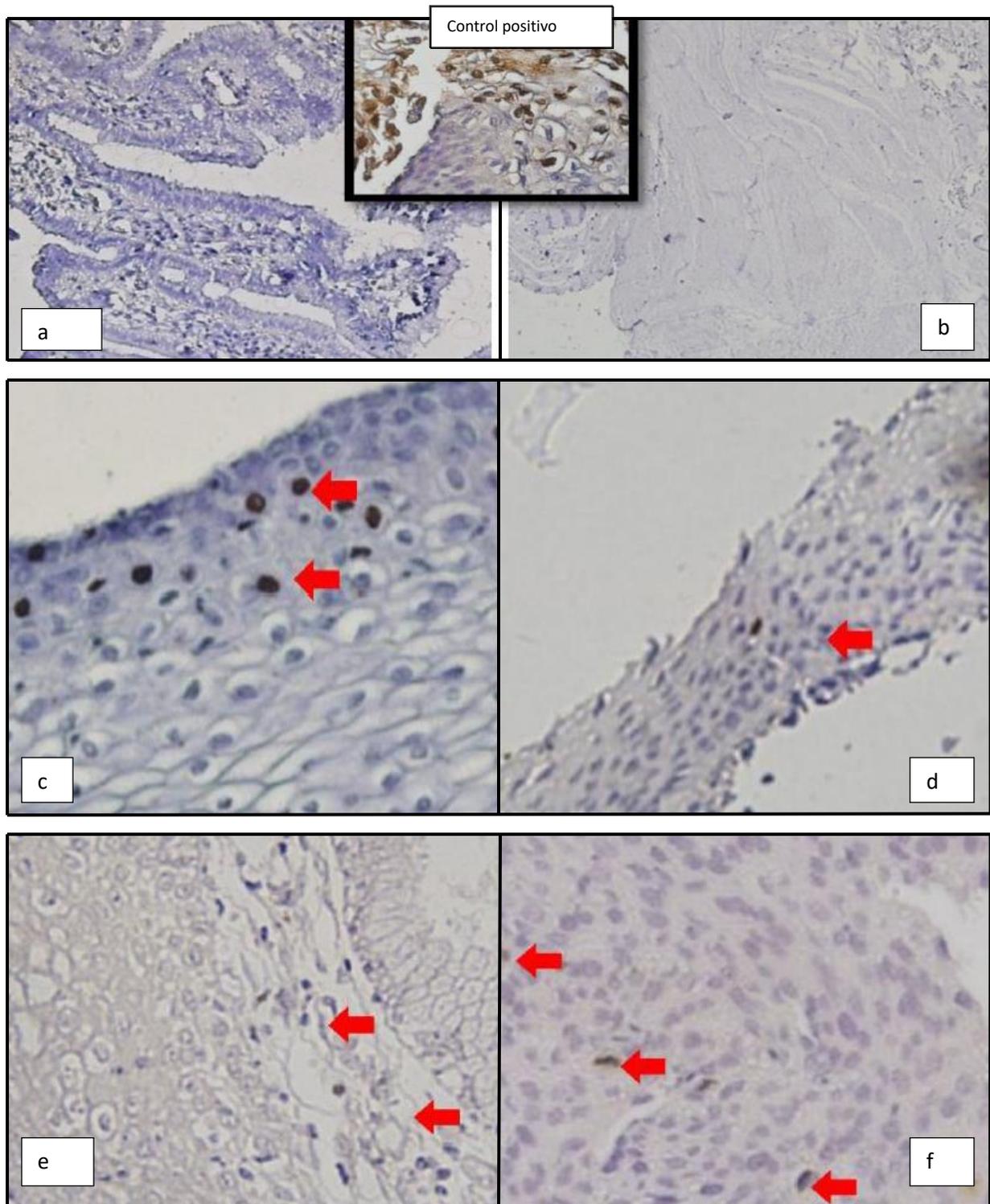


Figura No. - 28 Expresión del biomarcador p53 en los diferentes diagnósticos histopatológicos de: a) Pólipo inflamatorio b) Cervicitis c) NIC1 d) NIC2 e) NIC3 f) Carcinoma, la flecha muestra la reacción positiva. Las muestras estudiadas fueron reveladas con DAB y teñidas con hematoxilina. Las fotografías fueron tomadas en el Microscopio Olympus 1x71 en el objetivo de 20x. En el recuadro de la parte superior se encuentra el control positivo de p53 en un adenocarcinoma de colon.

MUCINAS EN NEOPLASIAS CERVICALES

En este estudio se analizaron y procesaron un total de 109 biopsias de cérvix incluidas en parafina con las metodologías de IHQ, ampliamente descritas en la sección de Material y Métodos, observadas en la Tabla No 7.

CORRELACION DE LA EXPRESION DE MUC1 Y MUC4

La expresión de las proteínas MUC1 y MUC4 se encuentran ausente en las lesiones de tipo inflamatorio. Las proteínas MUC1 y MUC4 se expresan claramente en más del 50% de las muestras procesadas con el diagnóstico de NIC1, sin embargo en NIC2 se observa la diferencia en el número de muestras que expresaron ambas proteínas ya que MUC1 se expresa en más de la mitad de las muestras procesadas, en cambio MUC4 se observa solo en aproximadamente el 30%, no así en las muestras diagnosticadas como NIC3 donde el 100% de las muestras procesadas expresa MUC4 pero solo el 60% presenta MUC1. La expresión de ambas proteínas en las muestras procesadas diagnosticadas como carcinoma se comportan casi de la misma manera que las lesiones de NIC3, tal y como se observa en la figura No. - 29.

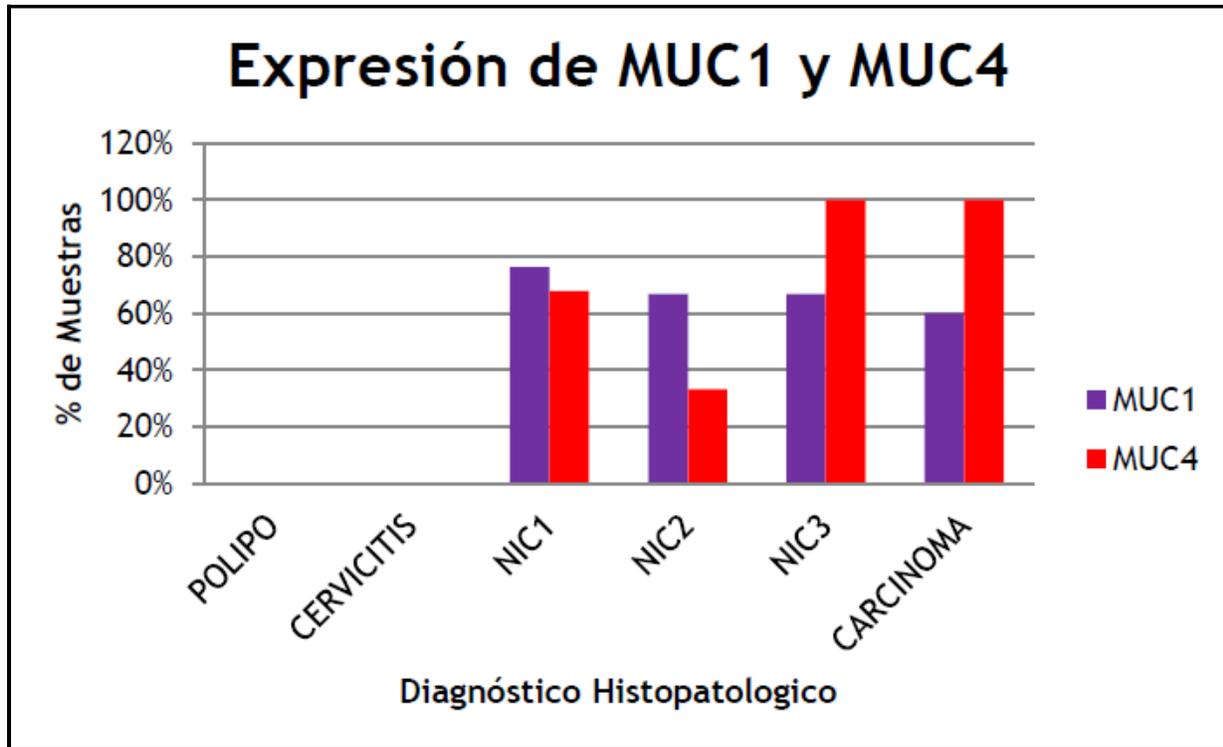


Figura No. - 29 Expresión de las proteínas MUC1 y MUC4 en las muestras procesadas con diferentes diagnósticos histopatológicos.

EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA MUC1

Se realizó la técnica de Inmunohistoquímica para anti MUC1 como se menciona en el apartado de materiales y métodos. La expresión de la proteína MUC1 en las muestras procesadas con el diagnóstico de NIC1 se expresó en el 76.31% de las muestras, en NIC2 y NIC3 se expresó en el 66.66% de las muestras procesadas con estos diagnósticos, en carcinoma solo el 60% de las muestras expresó MUC1, en cambio en los diagnósticos de cervicitis y pólipos la expresión fue negativa. Tal y como se muestra en la Figura No. - 30.

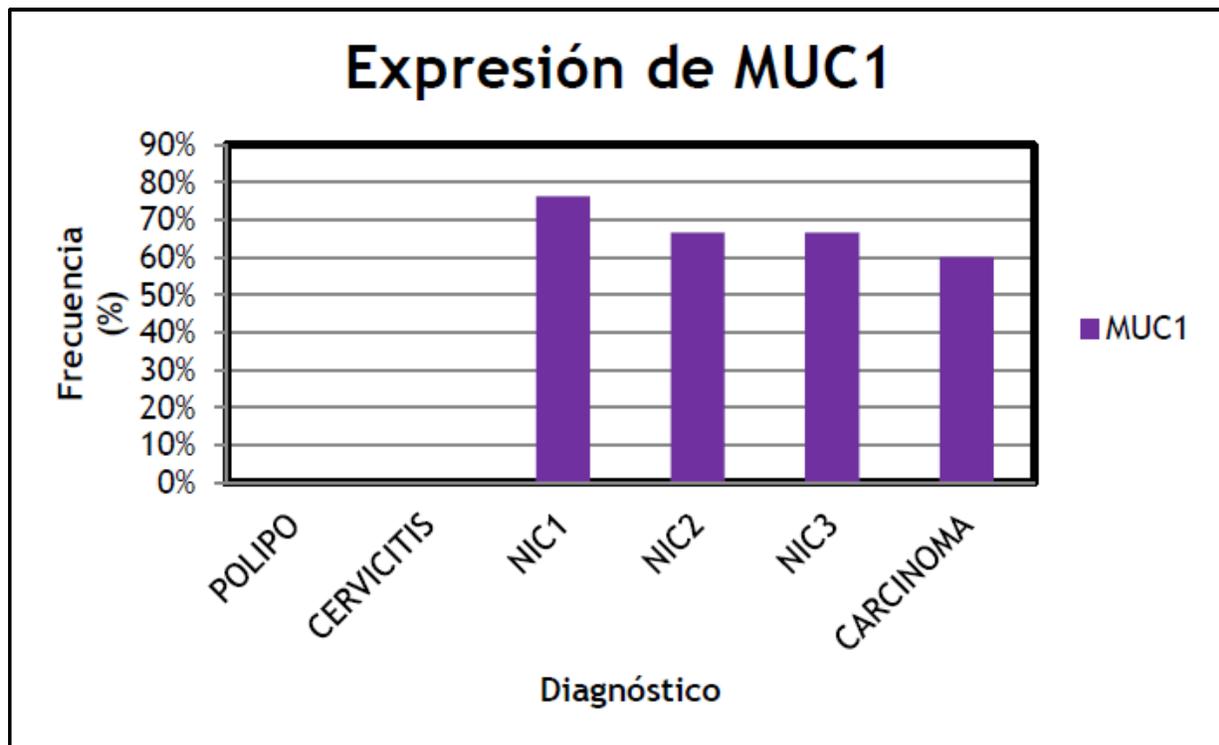


Figura No. - 30 Expresión de la proteína MUC1 en las muestras procesadas con diferentes diagnósticos histopatológicos.

La tabla No. 8 muestra la intensidad de expresión de MUC1 en las diferentes muestras procesadas para este estudio, donde la intensidad se mide por cruces o tachas, desde 0 que indica nada no expresión o negativa y +++ ó xxx que indica una intensidad muy alta. En la figura No 31 podemos observar que el 60% de las muestras procesadas con el diagnóstico de Carcinoma tiene una intensidad de expresión alta y el 40% restante no expresó la mucina, el 33.33% de muestras procesadas de NIC3 tiene una intensidad de expresión de baja y alta respectivamente, el 44.44% de las muestras de NIC2 tienen una intensidad de expresión baja y el 22.22% moderada, en cambio en muestras de NIC1 la intensidad de expresión aumenta teniendo un 53.66% con una intensidad de expresión alta, como se puede observar en la figura No.-32.

INTENSIDAD	MUC1 CARCINOMAS	MUC1 NIC3	MUC1 NIC2	MUC1 NIC1	MUC1 cervicitis	MUC1 Pólipos
0	40%	33.33%	33.33%	23.68%	100%	100%
+	0%	33.33%	44.44%	8.42%	0%	0%
++	0%	0%	22.22%	14.21%	0%	0%
+++	60%	33.33%	0%	53.68%	0%	0%

Tabla8.- Intensidad de Expresión de MUC1 en muestras de cérvix.

Nota: 0 no expresión, + baja expresión, ++ moderada expresión, +++ alta expresión

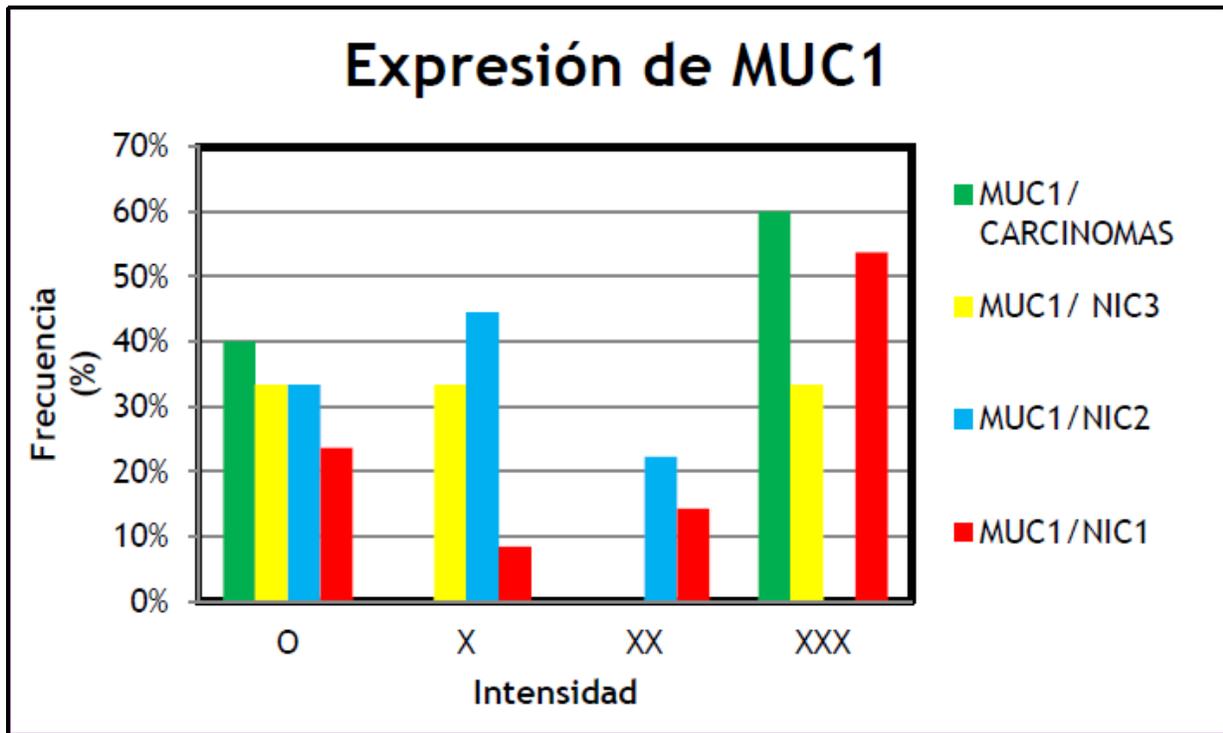


Figura No. -31 Intensidad de Expresión de la proteína MUC1 en muestras procesadas de los diferentes diagnósticos histopatológicos.

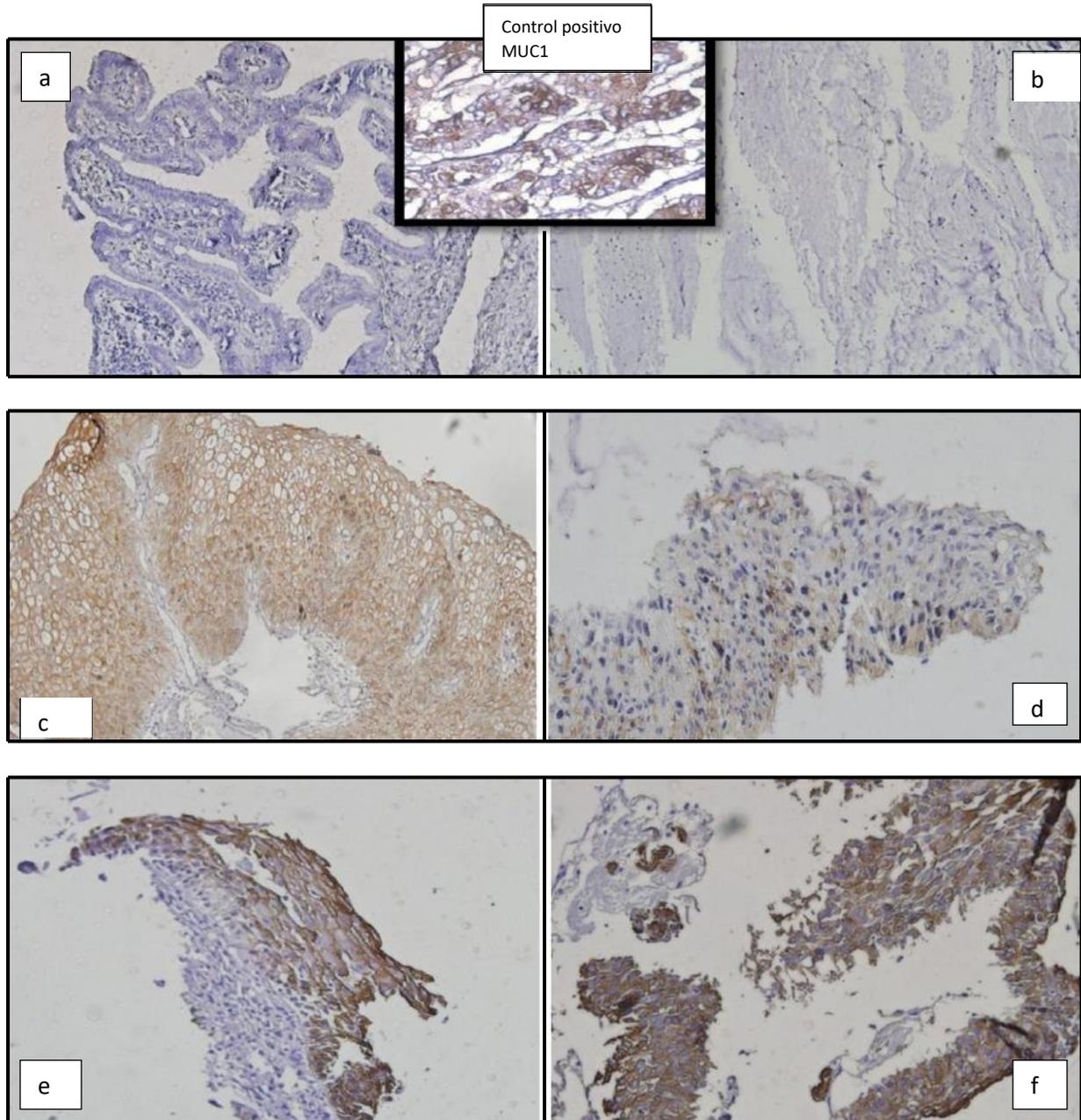


Figura No. - 32 Expresión de la proteína MUC1 en los diferentes diagnósticos histopatológicos a) Pólipo inflamatorio (0) b) Cervicitis (0) c) NIC1 (xxx) d) NIC2 (xx) e) NIC3 (xxx) f) Carcinoma (xxx). Las muestras estudiadas fueron reveladas con DAB y teñidas con hematoxilina. Las fotografías fueron tomadas en el Microscopio Olympus 1x71 en el objetivo de 40x. En el recuadro de la parte superior se encuentra el control positivo de MUC1 en un adenocarcinoma de colón.

IDENTIFICACIÓN DE MUC4

Se realizó la técnica de Inmunohistoquímica para anti MUC4 como se menciona en el apartado de materiales y métodos. La expresión de la proteína MUC4 y MUC1 en las muestras procesadas con el diagnóstico de NIC1 se expresó en el 67.89% de las muestras, en NIC2 se expresó en el 33.33% de las muestras procesadas con estos diagnósticos, en NIC3 y carcinoma se expresó en el 100% de las muestras procesadas, en cambio en los diagnósticos de cervicitis y pólipos la expresión fue negativa, tal y como se muestra en la Figura No. 33.

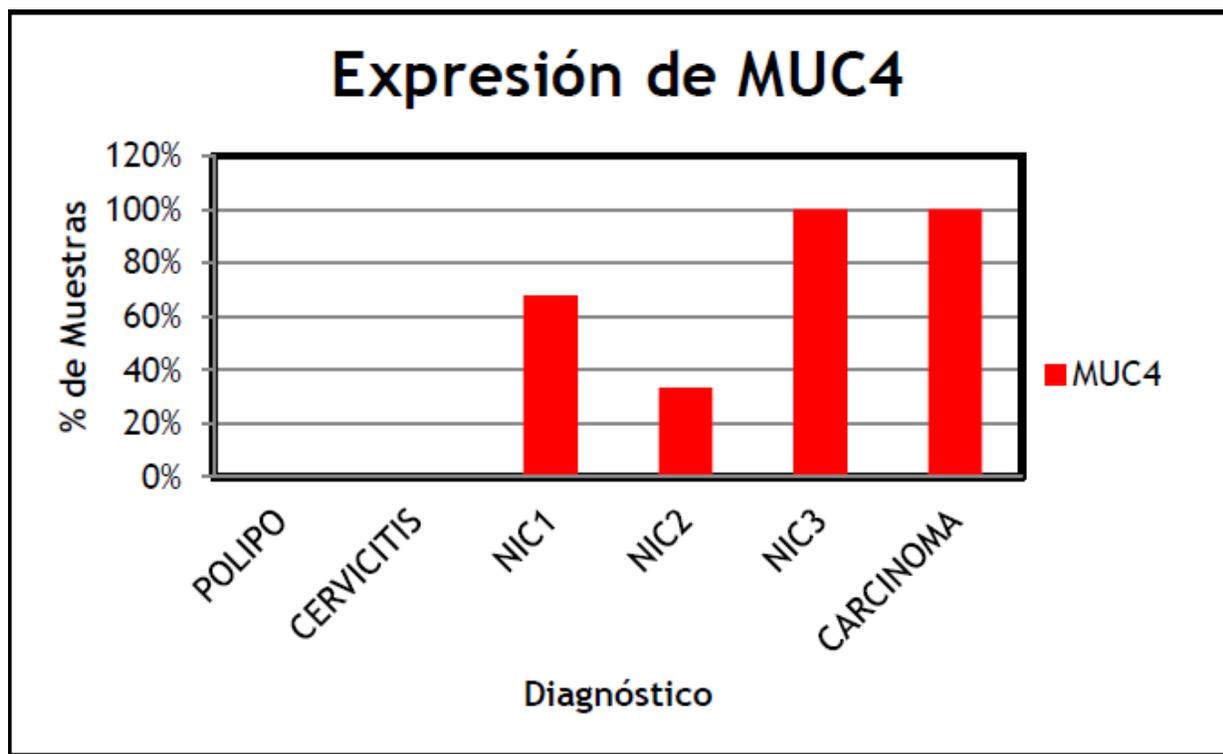


Figura No. -33 Expresión de la proteína MUC4 en las muestras procesadas con diferentes diagnósticos histopatológicos.

La tabla No. -9 muestra la intensidad de expresión de MUC1 en las diferentes muestras procesadas para este estudio, donde la intensidad se mide por cruces o tachas, desde 0 que indican nada de intensidad o negativa y +++ o xxx que indican una intensidad muy grande. En la figura No.-34 podemos observar que el 40% de las muestras de Carcinoma tienen una intensidad de expresión alta y baja, el 20% tienen una intensidad de expresión de moderada, el 33.33% de muestras de NIC3 tienen una intensidad de expresión baja y el 66.66% alta respectivamente, el 11.11% de las muestras de NIC2 tienen una intensidad de expresión de baja, moderadas y alta respectivamente, en cambio en muestras de NIC1 la intensidad de expresión baja y moderada es de 28% y una intensidad de expresión alta en el 11% de las muestras respectivamente, como se puede observar en la Figura No.- 35.

INTENSIDAD	MUC4 CARCINOMAS	MUC4 NIC3	MUC4 NIC2	MUC4 NIC1	MUC4 Cervicitis	MUC4 Pólipos
0	0	0	66.66%	31.57%	1005	100%
+	40%	33.33%	11.11%	28.94%	0%	0%
++	20%	66.66%	11.11%	28.42%	0%	0%
+++	40%	0	11.11%	11.05%	0%	0%

Tabla 9.- Intensidad de Expresión de MUC4 en muestras de cérvix.

Nota: 0 no expresión, + baja expresión, ++ moderada expresión, +++ alta expresión.

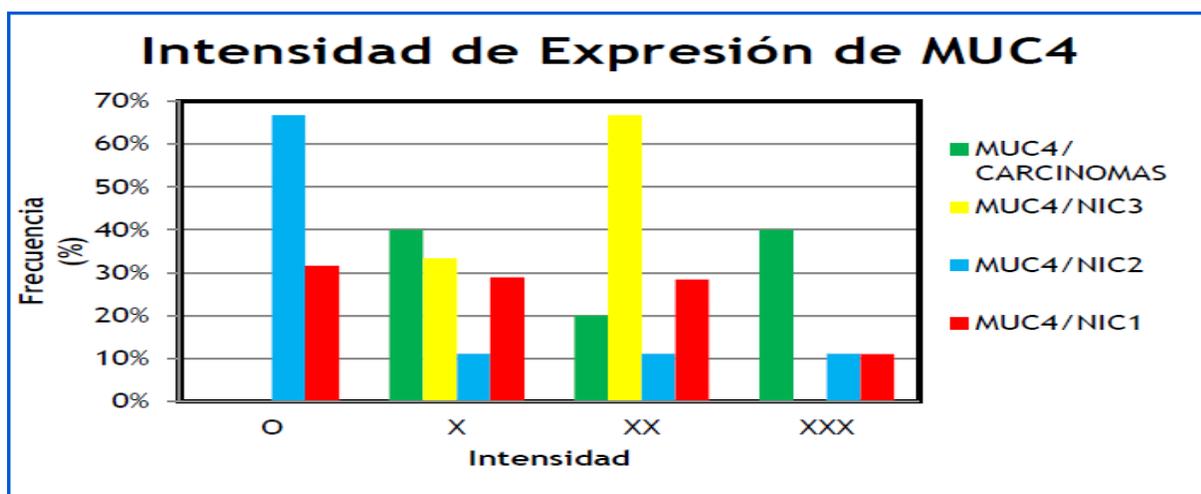


Figura No. - 34 Intensidad de Expresión de la proteína MUC4 en muestras procesadas de los diferentes diagnósticos histopatológicos.

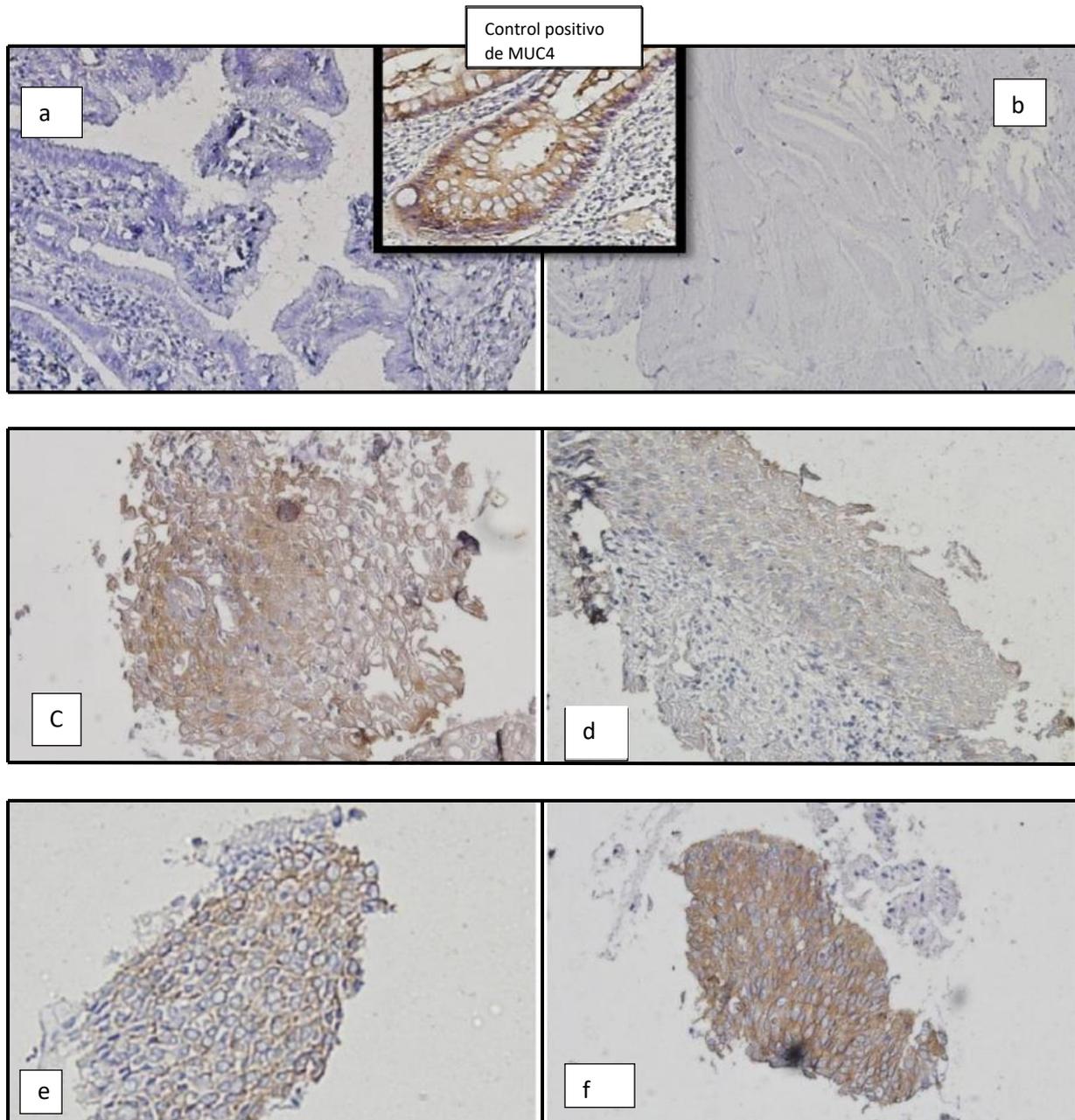


Figura No. -35 Expresión de la proteína MUC4 en los diferentes diagnósticos histopatológicos a) Pólipos inflamatorios, (0) b) Cervicitis (0), c) NIC1 (xxx) d) NIC2 (xx) e) NIC3 (xxx) f) carcinoma (xxx). Las muestras estudiadas fueron reveladas con DAB y teñidas con hematoxilina. Las fotografías fueron tomadas en el Microscopio Olympus 1X71 en el objetivo de 40x. En el recuadro de la parte superior se encuentra el control positivo de MUC4 en el pólipo de colon.

DISCUSIÓN

En este estudio, se descartaron un total de 146 muestras respecto al número inicial, ya que la mayoría de ellas no estaban en buen estado físico para entrar en el estudio y no se contaba con la edad de las pacientes, por lo que fue imposible incluirlas en el análisis de este estudio.

Alguno de los problemas que enfrentamos fue el momento de recolectar las muestras, debido a que es un estudio retrospectivo, no todas las muestras se encontraron físicamente en el consultorio de Patología, incluso al estado físico inadecuado de las muestras.

Los reportes histopatológicos se encuentran dentro del grupo de edad con mayor riesgo coincidiendo con los reportes, indicado que el 80% y el 90% de los casos confirmados de CaCu tienen lugar en mujeres mayores de 35 años (1).

Debido a que el CaCu progresa lentamente, de estados preneoplásicas a un nivel avanzado, la incidencia de cáncer en la mayoría de los países es muy baja entre las mujeres menores de 25 años, pero se eleva alrededor de los 35 a los 40 años, y llega a su punto máximo entre las edades de 50 y 60 años. En los estudios histológicos realizados por investigadores cubanos en el 2012. Los diagnósticos de NIC1 el mayor número de mujeres estuvo en el grupo de 25 y 39 años. Las que tuvieron un NIC3, se distribuyeron por orden de frecuencia con 45% de 25 a 29 años, y de 36% de 40 a 49 años, no hubo con 50 años o más. En general en los tres grados de lesión predominaron las mujeres de 25 y 49 años, lo que representa el 88.7% del total.

Los reportes histopatológicos en este estudio muestran un registro mayor en el diagnóstico de NIC1 donde la edad más joven reportada con este diagnóstico fue a los 16 años y la última a los 60 años, en comparación con NIC2 donde la edad más joven reportada fue a los 28 años y la última a los 67 años, en cambio el NIC3 siendo el caso aún más sobresaliente donde se reportó el primer caso a los 19 años y el último a los 30 años. Estos resultados apoyan los datos reportados donde las incidencias se encuentran en estos rangos de edad, debido a que estas lesiones se consideran precursoras del cáncer cervicouterino invasivo, por esta razón su diagnóstico y tratamiento es de vital importancia.

Estas lesiones (NIC), no son perceptibles a simple vista y no presentan sintomatología específica, existen considerables diferencias entre las estimaciones de las tasas de progresión y regresión de NIC, varios estudios han concluido que NIC puede progresar a cáncer invasivo e incluso el carcinoma *in situ* en ciertos casos puede retroceder.

La identificación de la proteína L1 del virus del papiloma humano de alto riesgo entra en lo ya reportado donde en el 90% de los casos de NIC1 es encontrada la proteína y va disminuyendo conforme progresa la lesión por el VPH, siendo así poco evidente en carcinoma invasor ya que solo presentan esta proteína aquellas células que no están transformadas por completo, por esto la identificación del DNA viral es más sensible para poder corroborar si está presente en verdad en VPH de alto riesgo, comprobando que casi en la totalidad de las muestras de este estudio fueron positivas en la identificación del DNA viral integrado en el núcleo de la célula huésped.

La expresión de mucopolisacáridos secretores ya sea ácida o neutra en este estudio solo dio positivo en los pólipos endocervicales inflamatorios y no en las neoplasias intraepiteliales cervicales, esto no quiere decir que las muestras estudiadas no tengan mucopolisacáridos transmembranales. Las mucinas MUC1 y MUC4 que anteriormente han sido descritas son utilizadas en el diagnóstico para ver algunas neoplasias da un pronóstico malo el cual lleva a predecir metástasis, en algunos casos la sobre expresión de estas mucinas puede predecir el avance en el grado de malignidad. Estas proteínas no se expresan de manera normal en el tejido cervical, la sobre expresión de la proteína MUC1 y MUC4 en NIC1 están presentes en más del 60% de las muestras analizadas.

CONCLUSIÓN

A partir de los datos obtenidos en este estudio sobre la edad de las pacientes, confirmamos que la edad es un factor de riesgo para desarrollar una lesión de alto grado en la población de estudio, donde un carcinoma in situ se puede desarrollar en edades tempranas (19 años), debido a una vida sexual de riesgo.

Los resultados obtenidos en el presente estudio sustentan que la expresión de las proteínas MUC1 y MUC4 en tejidos de cérvix, se pueden correlacionar directamente con las neoplasias intraepiteliales de bajo y alto grado, pudiendo observar que las proteínas MUC1 y MUC4, se sobre expresan en as neoplasias estudiadas, teniendo en cuenta que conforme al grado de NIC avanza la expresión de estas proteínas es más evidente. Con los resultados obtenidos referente a estas proteínas (MUC1 y MUC4) podemos afirmar que son útiles como biomarcadores en la progresión hacia una Neoplasia Maligna Cervical.

PERSPECTIVAS AL FUTURO.

Las neoplasias escamosas cervicales como ya se ha descrito en el segundo cáncer reportado a nivel mundial que afecta a las mujeres, por ellos las propuestas a futuro complementando esta investigación sería, identificar algunos marcadores del ciclo celular como p16 y p53, para evaluar la malignidad.

Estudio de cmyc y hTERC como posible marcador predictivo que puedan aumentar la tasa de supervivencia y mejorar el tratamiento de las pacientes con cáncer.

REFERENCIAS

1. OMS. CERVICAL CANCER. 2014 (updated 2014); Available from.
2. INEGI. Infecciones de Transmisión Sexual. México; 2011 (updated 2011; cited); Available from.
3. SINGER JAJAA. THE CERVIX. PUBLISHING B, editor.; 2006.
4. ORGANIZATION WH. ESTIMAD CANCER INCIDENCE, MORTALITY AND PREVALENCE WORLDWIDE IN 2012. 2012 (updated 2012; cited); Available from: http://globocan.iarc.fr/pages/fact_sheets_cancer.aspx.
5. Sciencie. Wlo. The Gene Cards Huma. 1996-20145 (updated 1996-2015; cited); Available from: <http://www.genecards.org/>.
6. FRAZER IH. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. NUTURE REVIWS IMMUNOLOGY. 2004; 4:46-55.
7. M. APLEH. CANCER CERVICO-UTERINO. 2TA, editor. MEXICO: PANAMERICANA; 2005.
8. Jonckheere N, Skrypek N, Frenois F, Van Seuningen I. Membrane-bound mucin modular domains: from structure to function. Biochimie. Jun;95(6):1077-86.
9. Senapati S, Das S, Batra SK. Mucin-interacting proteins: from function to therapeutics. Trends Biochem Sci. Apr;35(4):236-45.

10. Desseyen JL, Tetaert D, Gouyer V. Architecture of the large membrane-bound mucins. *Gene*. 2008 mar 15;410(2):215-22.
11. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*. 2002 Apr;55(4):244-65.
12. Andrianifahanana M, Moniaux N, Batra SK. Regulation of mucin expresión: mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Apr; 1765(2):189-222.
13. Albrecht H, Carraway KI, 3rd. MUC1 and MUC4: switching the emphasis from large to small. *Cancer Biother Radio pharm*. Jun;26 (3):261-71.
14. Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR, et al. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst*. 2005 Jul 20;97 (14):1072-9.
15. Cáncer IAfRo. Cervical Cáncer. 2008-2012 (updated 2008-2012; cited); Available from.
16. De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004 jun 20;324(1):17-27.
17. Lozano-Ponce E, Herrero R, Munoz N, Cruz A, Shah KV, Alonso P, et al, Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology. *Int J Cancer*. 2001 feb 1;91(3):412-20.
18. Vera-Uehara C, Sanchez-Aleman MA, Uribe-Salas FJ, Ramos-Castaneda J, Olamendi-Portugal ML, Conde-Glez CJ. HPV infection, risk factors and viral load among Mexican male college students. *Braz J Infect Dis*. Jan-feb;18(1):71-6.

19. Franco EL, Harper DM. Vaccination against human papillomavirus infection: a new paradigm in cervical cancer control. *Vaccine* 2005 Mar 18;23(17-18):2388-94.
20. Hernández-Girón C, Smith Js, Lorincz A. Arreola Cháidez E, Lazcano E, Hernández-Ávila M, et al. Prevalencia de infección por virus de papiloma humano (VPH) de alto riesgo y factores asociados en embarazadas derechohabientes del IMSS en el estado de Zacatecas. *Salud Pública de México*. 2005; 47:423-9.
21. Hernández-Girón C, Smith Js, Lorincz A. Arreola Cháidez E, Lazcano E, Hernández-Ávila M, et al. (The prevalence of high-risk HPV infection in pregnant women from Morelos, Mexico). *Salud Pública Mex*. 2005 Nov-Dec;47(6):423-9.
22. Miguel Castaño Ignacio GHE. TEST DE VPH (CAPTURACIÓN DE HÍBRIDOS II) EN PACIENTES TRATADOS CON RADIOFRECUENCIA. *INVESTIGACION MATERNO INFANTIL* 2012; IV:13-21.
23. Zur Hausen H. Papillomavirus infections major cause of human cancers. *Biochimica et biophysica acta*. 1996 Oct 9;1288(2): F55-78.
24. Hengstermann A, Linares LK, Ciechanover A, Whitaker NJ, Scheffner M. Complete switch from Mdm2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001 Jan 30;98(3):1218-23.
25. Mantovani F, Banks L. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene*. 2001 nov 26;20(54):7874-87.
26. Stubenrauch F, Laimins LA. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Seminars in cancer biology*. 1999 Dec;9(6):379-86.

27. Lehoux M, D'Abramo CM, Archambault J. Molecular mechanisms of human papillomavirus-induced carcinogenesis. *Public Health Genomics*. 2009;12(5-6):268-80.
28. Cronje HS. Screening for cervical cancer in the developing world, *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2005 Aug;19(4):517-29.
29. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Munoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2003 Jan 13;88(1):63-73.
30. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodríguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. 2007 Sep 8;370(9590): 890-907.
31. Zuna RE, Allen RA, Moore WE, Mattu R, Dunn ST. Comparison of human papillomavirus genotypes in high-grade squamous intraepithelial lesions and invasive cervical carcinoma: evidence for differences in biologic potential of precursor lesions. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2004 Nov;17(11):1314-22.
32. Krawczyk E, Supryniewicz FA, Lui X, Dai Y, Hartmann DP, Hanover J, et al. Koilocytosis: a cooperative interaction between the human papillomavirus E5 and E6 oncoproteins. *The American journal of pathology*. 2008 Sep;173(3):682-8.
33. Walts AE, Bose S. p16, Ki-67, and BD ProExC immunostaining: a practical approach for diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Hum Pathol*. 2009 Jul;40(7):957-64.
34. Aishenawy HA. Evaluation of p16, human papillomavirus capsid protein L1 and Ki-67 in cervical intraepithelial lesions: potential utility in diagnosis and prognosis. *Pathol Res Pract*. Jul 30.

35. Omori M, Hashi A, Kondo T, Kato R, Hirata S. Dysregulation of CDK Inhibitors and p53 in HPV-negative Endocervical Adenocarcinoma. *Int J Gynecol Pathol.* Mar;34(2):196-203.
36. Dekker J, Rossen JW, Buller HA, Einerhand AW. The MUC family: an obituary *Trends Biochem Sci.* 2002 Mar;27(3):126-31.
37. Marin F, Luquet G, Marie B, Medakovic D. Molluscan shell proteins: primary structure, origin, and evolution. *Current topics in developmental biology.* 2008; 80:209.
38. Perez-Vilar J, Hill RL. The structure and assembly of secreted mucins. *The Journal of biological chemistry.* 1999 Nov 5;274 (45):31751-4.
39. Perez-Vilar J. Mucin granule intraluminal organization. *American journal of respiratory cell and molecular biology.* 2007 Feb;36(2):183-90.
40. Itandehui Belem Gallegos Velasco RC, Gisela Martínez y Pedro Hernández Cruz. MARCADORES GLICOSILADOS EN CANCER DE MAMA.2008:52-9.
41. Jonckheere N, Van Seuning I. The membrane-bound mucins: how large oglycoproteins play key roles in epithelial cancers and hold promise as biological tools for gene-based and immunotherapies. *Crit Rev Oncog.* 2008;14(2-3):177-96.
42. Jonckheere N, Van Seuning I. The membrane-bound mucins: From cell signaling to transcriptional regulation and expression in epithelial cancers. *Biochimie.* Jan;92(1):1-11.
43. Kim KC. Role of epithelial mucins during airway infection. *Pulm Pharmacol Ther.* 2012 Dec;25(6):415-9.

44. Thorpe D, Stringer A, Butler R. Chemotherapy-induced mucositis: the role of mucin secretion and regulation, and the enteric nervous system. *Neurotoxicology*. 2013 Sep, 38:101-5.
45. Duraisamy S, Ramasamy S, Kharbanda S, Kufe D. Distinct evolution of the human carcinoma-associated transmembrane mucins, MUC1, MUC4 AND MUC16. *Gene*. 2006 May 24;373:28-34.
46. Hattrup CL, Gendler SJ. MUC1 alters oncogenic events and transcription in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res*. 2006;8(4): R37.
47. Horm TM, Schroeder JA. MUC1 and metastatic cancer: expression, function and therapeutic targeting. *Cell Adh Migr*. Mar-Apr;7(2):187-98.
48. Hanisch FG, Muller S. MUC1: the polymorphic appearance of a human mucin *Glycobiology*. 2000 May;10(5):439-49.
49. Singh AP, Chaturvedi P, Batra SK. Emerging roles of MUC4 in cancer: a novel target for diagnosis and therapy. *Cancer Res*. 2007 Jan 15;67(2):433-6.
50. Chang CY, Chang HW, Chen CM, Lin CY, Chen CP, Lai CH, et al. MUC4 gene polymorphisms associate with endometriosis development and endometriosis-related infertility. *BMC Med*. 9:19.
51. Carraway KL, Theodoropoulos G, Kozloski GA, Carothers Carraway CA. Muc4/MUC4 functions and regulation in cancer. *Future Oncol*. 2009 Dec;(10):1631-40.
52. Ponnusamy MP, Singh AP, Jain M, Chakraborty S, Moniaux N, Batra SK. MUC4 activates HER2 signalling and enhances the motility of human ovarian cancer cells. *Br J Cancer*. 2008 Aug 5;99(3):520-6.

53. Baker AC, Eltoun I, Curry RO, Stockard CR, Manne U, Grizzle WE, et al. Mucin expression in benign and neoplastic glandular lesions of the uterine cervix. *Arch Pathol Lab Med.* 2006 Oct;130(10):1510-5.
54. Awaya H, Takeshima Y, Yamasaki M, Inai K. Expression of MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6 in atypical adenomatous hyperplasia, bronchioloalveolar carcinoma, adenocarcinoma with mixed subtypes, and mucinous bronchioloalveolar carcinoma of the lung. *Am J Clin Pathol.* 2004 May; 121(5): 644-53.
55. Gillem P, Billeret V, Busine MP, Flejou JF, Lecomte-Houcke M, Degand P, et al. Mucin gene expression and cell differentiation in human normal, premalignant and malignant esophagus. *Int J Cancer.* 2000 Dec 15;88(6):856-61.
56. Wang JY, Chang CT, Hsieh JS, Lee LW, Hung TJ, Chai CY, et al. Role of MUC1 and MUC5AC expressions as prognostic indicators in gastric carcinomas. *J Surg Oncol.* 2003 Aug;83(4):253-60.
57. Tang W, Inagaki Y, Kokudo N, Guo Q, Seuama Y, Nakata M, et al. KL-6 mucin expression in carcinoma of the ampulla of Vater: association with cancer progression. *World J Gastroenterol.* 2005 Sep 21;11(35):5450-4.
58. Packer LM, Williams SJ, Callaghan S, Gotley DC, McGuckin MA. Expression of the cell surface mucin gene family in adenocarcinomas. *Int J Oncol.* 2004 Oct;25(4):1119-26.
59. Swartz MJ, Batra SK, Varshney GC, Hollingsworth MA, Yeo CJ, Cameron JL, et al. MUC4 expression increases progressively in pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am J Clin Pathol.* 2002 May;117(5):791-6
60. Conlon KC. Intraductal papillary mucinous tumors of the pancreas. *J Clin Oncol.* 2005 Jul 10;23(20):4518-23.

61. Sasaki M, Ikeda H, Nakanuma Y. Expression profiles of MUC mucins and trefoil factor family (TFF) peptides in the intrahepatic biliary system: physiological distribution and pathological significance. *Prog Histochem Cytochem.* 2007;42(2):61-110.

62. Lopez-Ferrer A, Alameda F, Barranco C, Garrido M, de Bolos C. MUC4 expression in increased in dysplastic cervical disorders. *Hum Pathol.* 2001 Nov;32(11):1197-202.