

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS**

**“ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA  
DE REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA –RCP-  
CON EL SISTEMA DE AMPLIFICACIÓN  
REFRACTARIO A MUTACIONES –SARM-”**

Estudio descriptivo y reporte de casos de 24 muestras de pacientes con cáncer de cérvix y 24 controles sanos, identificando el perfil inmunológico TH1 en el polimorfismo FNTa-308 y TH2 en el polimorfismo IL-10-1082, Instituto Nacional de Cancerología –INCAN- y el Centro de Salud 2 de Infecciones de Transmisión Sexual, zona 3

abril-agosto 2012

**RODRIGO JAVIER PINTO VILLAR**

**Médico y Cirujano**

Guatemala, septiembre de 2012



**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS**

**“ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA  
DE REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA –RCP-  
CON EL SISTEMA DE AMPLIFICACIÓN  
REFRACTARIO A MUTACIONES –SARM-”**

Estudio descriptivo y reporte de casos de 24 muestras de pacientes con cáncer de cérvix y 24 controles sanos, identificando el perfil inmunológico TH1 en el polimorfismo FNTa-308 y TH2 en el polimorfismo IL-10-1082, Instituto Nacional de Cancerología –INCAN- y el Centro de Salud 2 de Infecciones de Transmisión Sexual, zona 3

abril-agosto 2012

TESIS

Presentada a la Honorable Junta Directiva  
de la Facultad de Ciencias Médicas de la  
Universidad de San Carlos de Guatemala

POR

**RODRIGO JAVIER PINTO VILLAR**

**Médico y Cirujano**

Guatemala, septiembre de 2012



## RESUMEN

**Objetivo:** Estandarizar la técnica para identificar el perfil genético TH1 en el polimorfismo FNT $\alpha$ , -308 y TH2 en el polimorfismo IL-10, -1082 a través del SARM RCP. **Metodología:** Estudio descriptivo y reporte de casos en 24 muestras de pacientes con cáncer del INCAN y en 24 muestras de pacientes sanos del Centro de Salud No.2 de Infecciones de Transmisión Sexual de la zona 3, realizado durante los meses de julio y agosto del 2012. Se realizó la extracción del ADN en las muestras almacenadas en las tarjetas para archivar y almacenar ADN, se midió la concentración y se comprobó la integridad del ADN realizando RCP de Beta Globina. Se estandarizó la técnica para identificar los polimorfismos IL-10-1082 y FNT $\alpha$  -308 y se identificó los genotipos de cada muestra. **Resultados:** Se encontró que, el promedio de concentración de ADN extraído de muestras fue de 72ng/ $\mu$ l. El ADN se debe utilizar a una concentración de entre 50 -100 $\mu$ g/ $\mu$ l al preparar la alícuota para RCP en la identificación de los polimorfismos FNT $\alpha$  -308 e IL-10 -1082. La calidad de todas las muestras de ADN extraídos fue satisfactoria, al haberse comprobado el gen constitutivo  $\beta$  globina por medio de RCP. La temperatura de unión de los cebadores al ADN probó ser más efectiva a los 53°C. Se utilizaron los cebadores a una concentración de 10 $\mu$ mol. En el reporte de casos se describe que las 24 muestras de pacientes con cáncer revelaron un genotipo heterocigoto A/G al igual que las 24 muestras de pacientes sanas revelaron un genotipo heterocigoto A/G. **Conclusiones:** La estandarización del protocolo fue posible mediante modificaciones de un protocolo estándar, de modo que es posible identificar el genotipo FNT $\alpha$  -308 e IL-10 -1082 en muestras de pacientes con cáncer cervical y pacientes sanas, la temperatura de unión de los cebadores que probó ser más eficiente fue de 53°C en 30 ciclos. Se comprobó que se pueden utilizar los cebadores a una concentración de 10 $\mu$ mol ya que se identificaron los productos de reacción en cadena de polimerasa RCP en los polimorfismos FNT $\alpha$  -308 e IL-10 -1082.

**Palabras clave:** Polimorfismos FNT $\alpha$ -308 e IL-10 -1082, Perfil de citoquinas TH1 y TH2, Cáncer de cérvix.



## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	3
3. MARCO TEÓRICO	5
3.1 Contextualización del lugar de estudio	5
3.2 Cáncer cervical	7
3.3 Inmunología del cáncer	9
3.4 Citoquinas y cáncer cervical	10
3.5 Participación del FNT $\alpha$ en cáncer cervical	11
3.6 Perfil TH1 y TH2	12
3.7 Sistema de Amplificación refractario a Mutaciones para detección de los Polimorfismos FNT-308 e L-10 -1082.	15
3.8 Antecedentes de polimorfismos FNT $\alpha$ -308 e IL-10 -1082	16
4. METODOLOGÍA	19
4.1 Tipo y diseño de investigación	19
4.2 Unidad de análisis	19
4.3 Población y muestra	19
4.4 Selección de los sujetos de estudio	20
4.5 Variables	21
4.6 Técnica de extracción e instrumentos a utilizar en la recolección de datos	22
4.7 Plan y procesamiento y análisis de datos	29
4.8 Alcances y límites de la investigación	29
4.9 Limite	30
4.10 Aspectos éticos de la investigación	30
5. RESULTADOS	31
6. DISCUSIÓN	41
7. CONCLUSIONES	45
8. RECOMENDACIONES	47
9. APORTES	49
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
11. ANEXOS	55





## 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer del cérvix es un problema de salud pública en países en subdesarrollo. Se estima que cada año se diagnostican 500,000 casos nuevos en el mundo. Es responsable de 190,000 muertes anuales, de las cuales 78 % ocurren en países en subdesarrollo. (1, 2) El cáncer del cérvix se ha considerado como una enfermedad de transmisión sexual, así mismo diversos factores de riesgo parecen estar involucrados en su desarrollo tales como tabaquismo, edad temprana en el inicio de relaciones sexuales, número de parejas, infecciones bacterianas, etc. Además el cáncer del cérvix se asocia en un 90% con el Virus de Papiloma Humano (VPH) el cual puede infectar epitelios y mucosas del ser humano y se clasifica de acuerdo con su material genético. En la actualidad se reconocen más de 100 serotipos diferentes de VPH. Principalmente los serotipos virales clasificados como alto riesgo están asociados a desarrollar cáncer cervical. (3, 4, 5, 6).

Las citoquinas juegan un papel muy importante en la respuesta inmune debido a que estas modulan dicha respuesta, en el caso del perfil TH1, la producción del factor de necrosis tumoral alfa, juega un papel muy importante en la destrucción de células cancerosas. De la misma forma el perfil TH2 que entre sus citoquinas encontramos la IL-10, que puede suprimir la respuesta efectora TH1.

Las preguntas de investigación fueron dirigidas hacia la estandarización de la técnica de RCP SARM que puede detectar los polimorfismos genéticos FNT-308 y el polimorfismo IL-10-1082 y las modificaciones necesarias para la detección de los polimorfismos antes mencionados. El trabajo de investigación también buscaba dar una descripción en un reporte de casos de los genotipos encontrados en los grupos en el estudio.

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo estandarizar la técnica de RCP SARM para identificar el perfil genético de citoquinas TH1 (FNT $\alpha$  -308) y TH2 (IL-10, -1082), en muestras de pacientes con lesiones invasivas del cérvix que fueron atendidas en INCAN con diagnóstico de cáncer de cérvix, y los controles se realizaron en pacientes evaluadas al Centro de Salud No.2 de Infecciones de Transmisión Sexual de la Zona 3.

Los polimorfismos de nucleótido simple se definen como una variación en la secuencia de ADN que afecta a una sola base (adenina (A), timina (T), citosina (C) o

guanina (G)) de una serie de bases en un gen específico. El presente estudio será un reporte de casos para lo cual se determinará los polimorfismos FNT $\alpha$  -308 e IL-10 -1082, donde se utilizará el SARM (Sistema de amplificación refractario a Mutaciones), que puede detectar un polimorfismo de nucleótido simple (PNS), mediante dos reacciones complementarias: una que contiene un Primer (Cebador) específico para la secuencia de ADN del gen en estudio y dos variantes de Primers (cebador) dependiendo del polimorfismo en estudio.

El genotipo de un individuo puede determinarse por análisis de los segmentos de una serie de ácidos nucleicos o bien de los productos de amplificación de una secuencia específica de ácidos nucleicos donde se corren ambas variantes de un genotipo heterocigotos por RCP SARM que es una técnica de biología molecular que permite amplificar una secuencia específica de un gen. En el caso de los polimorfismos FNT $\alpha$  -308, se utiliza el Primer (cebador) del gen TNF $\alpha$  y se le añade el primer (cebador) de la variante G y en la otra se utiliza la variante A, Ambos productos de RCP se corren de forma paralela en cámara de electroforesis para su interpretación. En el polimorfismo IL-10 -1082 se utilizará la misma técnica.

Los resultados de la estandarización de la técnica permitieron la identificación del los polimorfismos FNT $\alpha$  -308 e IL-10 -1082, esto se obtuvo mediante modificaciones a la técnica estándar, al obtener los productos de reacción en cadena de polimerasa. En el reporte de casos se describe que las 24 muestras de pacientes con cáncer revelaron un genotipo heterocigoto A/G al igual que las 24 muestras de pacientes sanas revelaron un genotipo heterocigoto A/G indicando que ambos son productores intermedios de IL-10 y FNT $\alpha$  -308.

## **2. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

- 2.1 Estandarizar la técnica de RCP SARM para detectar los polimorfismos IL-10 y FNT $\alpha$ , -308 y el, -1082 en muestras de pacientes con cáncer de cérvix del Instituto Nacional de Cancerología y en controles sanos del Centro de Salud de la Zona 3, durante los meses de junio a agosto de 2012.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 2.2 Estandarizar la técnica para determinar el perfil inmunológico del polimorfismo genético FNT $\alpha$  -308 (TH1) en pacientes con cáncer de cérvix invasivo y en pacientes sanas.
- 2.3 Estandarizar la técnica para determinar el perfil inmunológico del polimorfismo genético IL-10 -1082 (TH2) en pacientes con cáncer de cérvix invasivo y en pacientes sanas.
- 2.4 Describir los perfiles genéticos de citoquinas FNT $\alpha$  -308 (TH1) e IL-10 -1082 TH2 respectivamente en mujeres sanas versus pacientes con cáncer de cérvix invasivo, que fueron atendidas en el Instituto Nacional de Cancerología INCAN y Centro de salud de la Zona 3.



### **3. MARCO TEÓRICO**

#### **3.1 Contextualización del lugar de estudio**

##### **3.1.1 Instituto de Cancerología y Hospital "Dr. Bernardo del Valle S". (INCAN)**

El instituto de cancerología es una institución ajena a toda actividad política, religiosa y lucrativa, que tiene por objeto promover la organización y realización en Guatemala de la lucha contra el cáncer y todas sus manifestaciones, actuando por sí mismo en cooperación con los organismos oficiales y privados, cuyos fines sean análogos. (1)

Fue fundado en el año 1,952 por la inquietud del Club Rotario de Guatemala. La comisión de organización fue presidida por el Doctor Bernardo del Valle Samayoa, y sus estatutos y personalidad jurídica fueron aprobados por Acuerdo Gubernativo el 3 de febrero del año 1,953. La primera clínica se inauguró el 28 de agosto de 1,953 en las instalaciones del Hospital San Juan de Dios, su presupuesto fue financiado por la Liga nacional contra el cáncer. (1)

En 1,954 obtuvo del gobierno central, un terreno aledaño al Hospital Roosevelt, en donde se inició la construcción de instalaciones para alojar a pacientes ambulatorios. En 1,969, quedó inaugurado el Hospital de dos plantas para alojar 80 pacientes. Posteriormente se le agregó un nivel más y se le efectuaron algunas modificaciones, teniendo en la actualidad, capacidad para atender 108 pacientes. (1)

Las instalaciones están ubicadas en la 6ª. Avenida 6-58, Zona 11 de la Ciudad de Guatemala. El INCAN realiza más de 3000 colposcopias, 330 criocirugias y 124 conos lleitz al año. El INCAN también realizó en el año 2011 más de 14,000 Papanicolaous. (1)

##### **3.1.2 Centro de Salud No.2 de Infecciones de Transmisión Sexual (ITS) de la Zona 3**

El centro de salud No.2 de ITS se encuentra desde 1998 en la zona 3, siendo de los pocos centros de salud en el país que se dedican al manejo y tratamiento de infecciones de transmisión sexual. Además de brindar educación sexual a la población guatemalteca es un centro de capacitación

para personal médico, paramédico y técnicos de laboratorio clínico y citológico.

El centro de salud cuenta con 30 personas para su funcionamiento y cuenta con:

- Oficinas administrativas.
- Una clínica de colposcopia, cinco clínicas médicas, una clínica de odontología, una clínica de psicología, una clínica de trabajo social, oficinas de consejería y orientación y una oficina de comunicación social.
- El laboratorio clínico ha sido recientemente remodelado y equipado por la estrategia de Vigilancia centinela de ITS (VICITS), lo que ha permitido que se realicen pruebas de biología molecular para el diagnóstico de infecciones por Chlamydia y gonococo, siendo este el centro de referencia para diagnóstico de estas infecciones para los centros VICITS de Guatemala. Cuenta con equipo necesario y capacidad instalada para realizar pruebas tipo ELISA.
- El laboratorio de citología del centro de salud de ITS procesa más 33,000 muestras de Papanicolaou al año con el aval del INCAN.

### **3.1.3 Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Médicas CUM**

Durante el año 2012 se remodeló el laboratorio de biología molecular de la Facultad de Ciencias Médicas en el Centro universitario Metropolitano (CUM). Dicho Laboratorio cuenta con el equipo necesario para realizar pruebas tipo RCP, donde se incluyen un termociclador, un termociclador en tiempo real, un Espectrofotómetro Ependorf®, dos Termomixer de temperatura controlable, una balanza analítica, tres cámaras de electroforesis, cámara de luz ultravioleta para interpretación de geles, una cámara de trabajo de RCP con Luz ultravioleta, un congelador de -20°C y un congelador de -80°C, dos refrigeradores de -4°C. El laboratorio cuenta con reactivos para realizar investigaciones de polimorfismos. En el Laboratorio trabajan dos médicos y un técnico de laboratorio que actualmente tienen trabajos de investigación.

### 3.2 Cáncer cervical

El cáncer del cérvix es un problema de salud pública en países en subdesarrollo. Se estima que cada año se diagnostican 500,000 casos nuevos en el mundo. Es responsable de 190,000 de muertes anuales, de los cuales 78 % ocurren en países en subdesarrollo. (1,2)

El cáncer del cérvix se ha considerado como una enfermedad de transmisión sexual, así mismo diversos factores de riesgo parecen estar involucrados en su desarrollo tales como tabaquismo, edad temprana en el inicio de relaciones sexuales, número de parejas, infecciones bacterianas, entre otros. (7)

El Virus de Papiloma Humano (VPH), puede infectar epitelios y mucosas y se clasifican de acuerdo con homologías en su material genético, En la actualidad se reconocen más de 100 tipos diferentes. Infecciones genitales con papiloma virus con serotipos de alto riesgo a transformación maligna se han asociado a neoplasias intraepiteliales cervicales que pueden convertirse en cáncer invasivo. (8, 9, 10)

#### 3.2.1 Virus del Papiloma Humano y el desarrollo del cáncer cervical

La evolución de lesiones benignas producidas, por VPH a lesiones malignas comparte una serie de características entre las cuales encontramos:

- Sólo algunos de los tipos de virus tienen potencial oncogénico como los serotipos de VPH asociados a neoplasia intraepitelial cervical, serotipos de alto grado 16, 18, 11, 31, 33, 35, 42-44, sin embargo el tener una infección por serotipos de bajo riesgo facilita o predispone a adquirir co-infecciones con los de alto riesgo.
- Hay un periodo de latencia entre la infección y el desarrollo de carcinoma *In Situ*, estimado entre 1 a 4 años.
- En pacientes con cáncer cervical, el tejido afectado con frecuencia presenta áreas de menor grado de malignidad adyacentes a áreas de mayor grado, Estudios de hibridización *In Situ* demuestran que el mismo tipo de VPH se encuentra en lesiones de todos los grados de severidad, indicando cambios secuenciales del mismo proceso. (7)

Las infecciones por VPH son frecuentes, suelen resolver por sí solas, pero si la infección persiste y es causada por serotipos de alto riesgo, pueden originar procesos cancerígenos.

La introducción de un oncogén hace que estas células infectadas se hagan "inmortales". Los dos productos genéticos necesarios para transformar e inmortalizar las células epiteliales humanas son los originados de los genes E6 y E7 del VPH. Las evidencias demuestran que estos oncogenes en el desarrollo de tumores tiene la siguiente función: los oncogenes *E6/E7* se expresan en forma constante en células cancerosas y los mecanismos que regulan la expresión de *E6* y *E7* están ausentes en las células cancerosas. Es por eso que *E6/E7* son capaces de inmortalizar células y promover la inestabilidad del genoma de la célula huésped. (7, 8, 11)

Estas oncoproteínas se unen e interactúan respectivamente con las proteínas celulares p53 y p105Rb que son proteínas reguladoras del ciclo celular.

El p53 es un factor de transcripción celular, es decir, un factor que controla la expresión de genes específicos. Actúa como un guardián del ciclo celular preservando la fidelidad de la replicación del DNA.(11)

El p53 induce apoptosis en células con oncoproteína *E6* del VPH de alto riesgo, pero esta se une a p53 a través de una proteína llamada *E6-AP*, necesaria para la formación del complejo E6 - p53. La formación de este complejo, a través de la activación de la ubiquitina que transporta la p53 al proteosoma que produce la degradación de p53. (11)

La oncoproteína E6 del VPH de bajo riesgo, no inactiva a p53 porque sólo se une a su extremo C-terminal y esta interacción no produce la degradación de p53. La degradación de p53 impide una adecuada reparación del DNA, lo cual lleva a inestabilidad del genoma, mutaciones, alteraciones cromosómicas y formación de tumores. (11)

Los tumores primarios consisten en poblaciones heterogéneas de células con alteraciones genéticas, que permiten a estas células pasar las fronteras físicas de su microambiente, diseminándose y colonizando órganos distantes. El 0.1% de las células cancerosas que entran en la circulación desarrollan metástasis, la integridad del ADN de las células puede ser comprometida por aberrante progresión del ciclo celular provocando crisis telométrica, anormalidades



citogenéticas e inestabilidad cromosómica por la introducción de material genético de algunos virus, como en el caso de algunos serotipos del virus del papiloma humano, inactivando la reparación del ADN. (3)

El 50% de los cánceres tienen pérdida de la proteína supresora del tumor p53 que responde al daño del ADN que induce apoptosis o paro del crecimiento celular. La pérdida del p53 permite la acumulación de células con daño en el ADN. (3)

### 3.3 Inmunología del cáncer

El sistema inmune puede responder a las células cancerosas de dos maneras: reaccionando en contra de antígenos tumorales específicos o a los antígenos asociados tumorales. De igual forma tumores causados por virus expresan antígenos virales específicos, un ejemplo de este caso son los productos de los genes E6 y E7 del papiloma virus humano, agente causal del cáncer de cérvix. (12,13)

El desarrollo de métodos para propagar células T y particularmente células T presentes en los tumores de pacientes con cáncer, llevó al descubrimiento de *MAGE 1*, un antígeno específico del melanoma que puede estimular células T *in vitro*. A través de esto se pudo clonar el gen *MAGE-1*. Estudios del gen *MAGE-1* demostraron que el sistema inmune puede responder a antígenos tumorales, y los resultados incentivaron a descubrir nuevos antígenos tumorales para encontrar nuevos tratamientos contra el cáncer. (13)

Los péptidos de la ciclina B1 son antígenos tumorales, que son detectables en el núcleo de células normales durante la división celular, entre las fases G2 y M del ciclo celular. En contraste con las células cancerosas en las que la ciclina B1 se encuentra sobre expresada en el citoplasma de estas. El sistema inmune de algunos pacientes con cáncer tiene la capacidad de reconocer la ciclina B1 que esta anormalmente expresada. (14)

Las proteínas RET-PET que son el producto de dos oncogenes que conducen al desarrollo del cáncer de tiroides. Las proteínas RET-PET modulan el factor nuclear *kB* que es un factor de transcripción de producción de citoquinas inmunoreguladoras. También incrementan la producción de GM-CSF (granulocyte-

macrophage colony stimulating factor) y de la proteína quimiotáctica monocítica-1 creando un microambiente proinflamatorio. (14)

Los tumores pueden suprimir la inmunidad tanto sistémica como la del microambiente del tumor. Produciendo moléculas inmunosupresoras tales como el factor de transformación y crecimiento  $\beta$ , el ligando soluble Fas y la enzima indolamine-2-3 dioxigenasa (IDO). Esta enzima previamente conocida por su rol en la tolerancia materna frente a los antígenos fetales y más recientemente como regulador de la autoinmunidad que interviene en la activación de las células T activadas. (18)

### 3.4 Citoquinas y cáncer cervical

Algunos factores que modulan la respuesta inmunológica pueden permitir que se desarrolle una neoplasia. Entre estos factores se encuentran las citoquinas. En el microambiente del cáncer e inflamación en algunos tumores establecidos se han aislado macrófagos asociados a tumores (TAM) que tienen fenotipo M2, se caracterizan por producir niveles bajos de IL-12 y niveles elevados de IL-10, así como niveles elevados de factor de transformación y crecimiento  $B$ , además de células dendríticas asociadas a tumores (DCs) con un fenotipo inmaduro. Los TAM producen M-CSF, IL-6 e IL-10 que bloquean la maduración de las células dendríticas estimulando el crecimiento de células supresoras de origen mieloide que se manifiestan en infecciones crónicas y cáncer. Se ha asociado la inflamación inducida por IL-6 y factor de crecimiento y transformación  $B$  en inducir la producción del grupo de linfocitos TH17, el cual promueve la infiltración de los tejidos de neutrófilos y la producción focal de IL-17 e IL-23, también los TAM, estimulan la producción de quimiocinas CXCL5, CXCL12 y de receptores CXCR2 y CXCR4 que resulta en neutrofilia y estimulación de la angiogénesis y el crecimiento endotelial como el factor de crecimiento de células vasculares endoteliales (VEGF) y el factor de crecimiento de células endoteliales derivado de las plaquetas (PDGF). (10, 15)

Se han observado también que los TAM se acumulan en áreas hipóxicas de los tumores que esto estimula la producción de factores pro angiogénesis de estas células que proveen crecimiento del tumor y metástasis.

En el cáncer cervical el factor de crecimiento de células endoteliales vasculares producido por TAM, juega un papel en la linfoangiogénesis peritumoral que permite

que la diseminación de las células cancerosas con formación de metástasis linfáticas. También los TAM promueven la migración de las células endoteliales y neovascularización linfática tumoral. Las citoquinas implicadas en la angiogénesis tumoral son CXCL1, CXCL13, CCL5, CCL17 y CCL22. Se han utilizado agonistas de FNT  $\alpha$  para el tratamiento del cáncer pero no se han observado resultados concluyentes. (15)

### **3.5 Participación del Factor de Necrosis tumoral en Cáncer de Cérvix**

La participación del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  en la inflamación inicial que puede ser inducida por cambios en el epitelio cervical provocado por virus del papiloma humano, puede ser iniciada por las mismas células epiteliales por la producción de quimiocinas especialmente de la familia CCL2, CCL3, CCL4 y CCL8 las que atraen principalmente al sitio de la infección viral a los macrófagos y linfocitos T. Estas quimiocinas inducen la activación de dichas células produciendo FNT  $\alpha$  y expresión de su receptor (FNTR) estimulando la activación de la cascada a través de la molécula TRAF (Factor asociado al factor de necrosis tumoral) esta molécula activa cinasas que inducen la activación de las vías de señalización del factor nuclear *kB* (FN *kB*), el cual se separa de su inactivador pasando al núcleo y desreprimiendo el ADN donde están codificadas las citoquinas inflamatorias, FNT  $\alpha$ , IL-1, IL-6 y así mismo activan otras vías de señalización activando factor nuclear de linfocitos T activados y MAP cinasas que activan el factor nuclear de proteína activada -1 que son necesarias para una buena respuesta inmune adaptativa. (16)

El segundo mecanismo en el que participa el factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , es la activación del “domino de muerte” a través de unirse directamente al receptor Fas de la apoptosis, activando la vía de señalización TRADD y FADD que activan especialmente la caspasa 8 que son proteasas del citoplasma activando el rompimiento de proteínas induciendo la apoptosis. (16)

Cuando hay polimorfismo en el FNT  $\alpha$ , disminuye la afinidad de esta molécula por sus receptores tanto para inducir inflamación como de apoptosis, otra acción que tiene el FNT  $\alpha$ , es activar el grupo de linfocitos TH1 y la producción de citoquinas especialmente el INF $\gamma$  estimulando la presentación de antígenos tumorales captados de células epiteliales tumorales la cual expresan proteínas de shock al calor unidos a estos pequeños péptidos tumorales la cual captura el macrófago a través de

receptores CD 91, procesa los antígenos presentándolos a los linfocitos T CD4 ayudadores y CD8 citotóxicos para montar una respuesta inmune citotóxica contra las células tumorales. (17)

### 3.6 Perfil TH1 y TH2

Gran parte de los antígenos microbianos son endocitados por células presentadoras antígenos (APC), la cual incluyen macrófagos, células dendríticas y linfocitos B, procesan y presentan principalmente en asociación con moléculas de Clase II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) a células TH CD4+; restringidas por moléculas de clase II del MHC. Las células TH2 CD4+ colaboran con los linfocitos B para la producción de anticuerpos los cuales son capaces de atacar a los microbios que viven fuera de la célula o neutralizar sus productos tóxicos solubles (exotoxinas). Esta parte de la respuesta inmune específica mediada por células es conocida como "inmunidad humoral". (16, 17)

Algunas bacterias como las micobacterias pueden sobrevivir y multiplicarse dentro de macrófagos a pesar de las condiciones desfavorables para la vida proporcionada por la actividad de las enzimas proteolíticas y otras sustancias tóxicas producidas por estas células. Sin embargo La células TH1 CD4+, activadas por antígenos micobacteriales restringidos por moléculas de clase II del MHC, pueden activar macrófagos para producir productos intermedios del oxígeno reactivo, óxido nítrico (NO) y factor de necrosis tumoral alfa (FNT $\alpha$ ), el cual lleva a la destrucción de Las bacterias. Esta área específica de la respuesta inmune mediada por células TH1 ha sido definida como inmunidad celular o mediada por células (CMI). (17)

Las células de Tipo 1 o TH1 producían interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ), interleuquina-2 (IL-2) y factor de necrosis tumoral- Alfa (FNT- $\alpha$ ), mientras el tipo2 o TH2 producen IL-4, IL-5, IL-6, IL9, IL-10, e IL-13. (17, 21)

Las células TH1 pueden ser consideradas como responsables de las respuestas fagocíticas del huésped a través de la inmunidad mediada por células. Las células TH2 no solamente nos dan óptima ayuda en las respuestas inmunes humorales, que incluyen los cambios de los isotipos IgE e IgG1 sino que también están involucradas en la inmunidad mucosa (Ig A) , a través de la producción de factores de crecimiento y diferenciación de mastocitos y eosinófilos. Además algunas citoquinas derivadas de

TH2, como IL-4, IL-10 e IL-13 inhiben muchas funciones de los macrófagos. Así las células Th2 pueden ser consideradas como responsables para las respuestas del huésped no fagocíticas. (12)

Otras citoquinas, como IL-3 factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), y el factor de necrosis tumoral-alfa (FNT- $\alpha$ ), son producidas tanto por células TH1 como por células TH2. Las células T que expresan citoquinas de ambos patrones se les ha designado como TH0. Las células T que producen altas cantidades de factor transformante de crecimiento beta (TGF-B) han sido designadas como TH3 y patrones adicionales han sido descritos en clonas cultivadas por largo tiempo. Las células TH0 probablemente representan una población heterogénea de células efectoras parcialmente diferenciada, formadas por grupos que pueden secretar tanto citoquinas TH1 como TH2. (12)

Las respuestas por citoquinas como efectoras pueden ser mixtas o pueden inducir a promover la diferenciación por la vía TH1 o TH2 bajo la influencia de señales recibidas del microambiente celular. Algunos estudios sin embargo han mostrado la heterogeneidad en la síntesis de citoquinas a nivel celular en respuestas polarizadas TH1 como TH2.

Cada uno de los genes de citoquinas parece estar bajo un control único con distintas tendencias en su concordancia (como la IL-4 e IL-5) o discordancia (en los casos de la IL-4 y IFN- $\gamma$ ). Así, lo más probable es que los perfiles de citoquinas sean aleatorizados a nivel clonal y que las señales exógenas que parecen dirigir a las células T a la diferenciación en TH1 o TH2 actúen incrementando la probabilidad de expresión de ciertos genes de citoquinas a nivel de poblaciones celulares, antes que por activación de un grupo de genes ligados transcripcionalmente en células individuales. (12)

Las células TH1 y TH2 se adecuan de acuerdo a la necesidad del huésped, ya que pueden adaptarse hacia una respuesta inmune específica que frecuentemente se desarrollan bajo la acción combinada de factores genéticos y ambientales. En el presente la mayoría de autores definen como TH2 a células T CD4+ que se han diferenciado y producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 pero no IFN- $\gamma$ , y como TH1 a células T CD4+ que producen FNT $\alpha$ , IFN- $\gamma$  IL-2 e IL-3 principalmente. (17, 23)

La posibilidad que la diferenciación de las respuestas efectoras TH1 o TH2 están asociadas con la expresión de distintas moléculas en la superficie celular, aunque muchas moléculas muestran asociación preferencial con células TH1 o TH2 como se ha descrito. Esto puede ocurrir porque su expresión es dependiente o su retroalimentación positiva es regulada por la producción de una citoquina dada. Por ejemplo, la expresión de IL-10 es aumentada por el perfil TH2 lo que suprime tanto la producción de FNT $\alpha$  como células del perfil TH1. (13, 18)

### **3.6.1 Mecanismos de la diferenciación TH1 y TH2**

Los factores responsables para la diferenciación de la respuesta inmune en un perfil predominante TH1 o TH2 han sido extensamente investigados. No hay duda que la evidencia sugiere que las células TH1 y TH2 no derivan de linajes distintos, sino más bien se desarrollan a partir del mismo precursor T (TH0) bajo la influencia tanto de factores del ambiente como genéticos que actúan a nivel de la presentación antigénica.

Entre los factores ambientales encontramos, la forma de presentación de antígenos, la forma física del antígeno y la cantidad del antígeno. Los mecanismos genéticos que concurren en el control de la diferenciación de Las células TH juegan un papel muy importante ya que estos pueden promover a través de un gen específico la producción de citoquinas. La mezcla de factores medioambientales y genéticos pueden influir la diferenciación TH1/TH2 principalmente modulando:

- Los sitios de presentación del antígeno
- Moléculas coestimuladoras implicadas en las interacciones celulares análogas.
- La densidad peptídica y la afinidad de unión: una alta densidad peptídica del MHC de clase II favorece la TH1, mientras que bajas densidades favorecen las TH2.
- Las APC y las citoquinas que producen.
- El perfil de citoquinas y el balance de citoquinas evocado por el antígeno.
- La actividad de las moléculas coestimuladoras y hormonas presentes en el ambiente local.
- El fondo genético del huésped.

El balance de citoquinas es uno de los principales estímulos. La IL-12 constituye un potente estímulo para la producción de IFN $\gamma$  por parte de las células T y las células asesinas naturales (NK), por consiguiente regula la diferenciación TH1. El INF $\alpha$ , citoquina producida de forma precoz durante las infecciones virales, induce la IL-12 y puede conmutar las células de un perfil TH2 a otro TH1. Por el contrario la producción precoz de IL-4 favorece la generación de células TH2. (12, 13)

Las citoquinas de las células TH1 inhiben las acciones de las células TH2 y viceversa. Por consiguiente, se ha demostrado la regularización cruzada de subconjuntos TH, según la cual el IFN $\gamma$  secretado por las células TH1 puede inhibir la respuesta de las células TH2, mientras que la IL-10 producida por las células TH2 reduce la expresión de B7 e IL-12 por parte de la APC lo que a su vez inhibe la activación de TH1. (18)

Recientemente se ha descrito el grupo de linfocitos CD4 TH17, que no tiene aparentemente participación en cáncer pero si en enfermedades autoinmunes y por hongos. (19)

### **3.7 SARM-RCP (Sistema de Amplificación Refractario a las Mutaciones- Reacción cadena de polimerasa) para detección de los polimorfismos FNT $\alpha$ -308 e IL-10 -1082.**

Los polimorfismos de nucleótido simple (PNS) del genoma humano son importantes marcadores para la comprensión de la estructura del ADN, la expresión de genes, funciones de los genes normales y el rol que un polimorfismo o varios pueden desarrollar alguna patología específica. Los PNS se definen como una variación en la secuencia de ADN que afecta a una sola base (adenina (A), timina (T), citosina (C) o guanina (G)) de una secuencia del genoma. En la actualidad, existen un gran número de métodos para la detección rápida de PNS, por lo tanto, la elección de uno de ellos para un caso particular, representa todo un reto, debido a que el investigador debe tener en consideración muchos factores: la prueba debe ser fácil de usar y rentable entre los principales factores a tomar en consideración. (20)

Usualmente para la detección de mutaciones de una sola base, amplificar la secuencia de interés por el método RCP, mediante los productos de la RCP para

detectar la presencia de la mutación es posible interpretarlos a través de un gel de Agarosa combinado con bromuro de etidio y su visualización con rayos ultravioleta. La precisión debe estar en 99,9% con el método a utilizar y debe de ser totalmente reproducible. (20)

El sistema de SARM RCP tiene varias ventajas sobre otros sistemas de análisis de RCP, entre sus características encontramos que el método es rápido, fiable, y los resultados pueden obtenerse fácilmente en un día de trabajo. El uso de dos reacciones con los controles internos garantiza que los resultados falsos negativos no sean obtenidos. En principio, la técnica SARM puede ser utilizada para identificar cualquier mutación, y esta ya se ha aplicado a la detección de varios polimorfismos genéticos. Estos incluyen antitripsina (Newton et al. 1989), fenilcetonuria (Sommer et al 1989), la fibrosis quística (FQ) (Ballabio et al 1990;. Wagner et al. 1990) y talasemia (Old et al. 1990). (20, 21)

SARM – como método de RCP fue descrita por primera vez por Newton et al. (1989) como una técnica para el análisis de cualquier mutación puntual o delección pequeña. Una prueba típica SARM, que puede detectar un polimorfismo PNS conocido consiste en dos reacciones complementarias: una que contiene un cebador (Primer) específico para la secuencia de ADN normal y dos variantes de cebadores (Primers) dependiendo del polimorfismo en estudio. En el caso de los polimorfismos FNT $\alpha$  -308 va tener Cebador genérico de estudio y dos variantes; variante G y variante A, del mismo modo el polimorfismo IL-10 -1082. El genotipo de un individuo puede determinarse por análisis de los productos de amplificación obtenidos ya que se corren de forma paralela ambas variantes, en el caso un genotipo heterocigoto los productos de RCP se obtiene en ambas reacciones. (21)

### **3.8 Antecedentes Polimorfismos FNT $\alpha$ -308 y IL-10 -1082**

Actualmente no existen trabajos de polimorfismos en perfiles inmunológicos en cáncer de cérvix en Guatemala. Existen algunos estudios del polimorfismo IL-10 -1082 y FNT $\alpha$  -308 en poblaciones europeas, africanas, norteamericanas en artículos publicados. (18, 22, 23, 24 25)

En un estudio publicado en julio de 2003 en el Reino Unido, buscaba encontrar la frecuencia del polimorfismo FNT $\alpha$  -308 en pacientes con displasia cervical asociada



a HPV. Encontraron en dicho polimorfismo con el genotipo GG que está asociado a bajos niveles de FNT $\alpha$ , se encontró que el grupo de pacientes con diagnóstico de NIC I el 95% de pacientes tenían dicho genotipo. En los grupos NIC 2/3 se encontraba el genotipo GG en el 71%, por lo que concluyeron en el estudio que dicho polimorfismo tenía un efecto pronunciado especialmente en CIN I y de menor forma en el grupo CIN 2/3. (18)

Hausen en el 2002 reportó que respuesta inmune ante lesiones de cáncer del cérvix, estableciendo un desbalance en el patrón de citoquinas producidas por las células T donde se afecta el patrón TH1 (linfocitos T cooperadores) detectando niveles de interferón gamma (INF-g) y FNT $\alpha$  disminuidos y un aumento de la interleuquina 10 (IL-10), que se corresponde con el patrón TH2. Estas alteraciones inducen trastornos en la secuencia de cambios necesarios para que la respuesta inmune, tanto humoral como celular, sea efectiva. (7)

DutaCornesco en Rumania en el 2009, publicó que existe una asociación que el genotipo GG en el polimorfismo IL-10 -1082, a una producción alta de IL-10, y del mismo polimorfismo del genotipo AA, se asocia a una producción baja de IL-10. (21) Vandana en 2003 documentó en una población de mujeres sudafricanas, el polimorfismo FNT $\alpha$  -308, al identificando el genotipo GG es asociado con niveles bajos de FNT $\alpha$ , caso contrario con el genotipo AA que lo asociaban con niveles altos de FNT $\alpha$ . (22)

Vuslat en el 2004 demostró que existe una asociación del genotipo GG con niveles más altos de IL-10 en polimorfismo -1082 de IL-10 de promotor, datos de la investigación publicada sugieren que el alelo A es bajo productor de IL-10, por lo que un productor intermedio podrá tener ambos alelos. (23)



## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 Tipo y diseño de la investigación

Estudio descriptivo prospectivo y reporte de casos.

### 4.2 Unidad de análisis

**4.2.1 Unidad primaria de análisis:** 24 muestras de pacientes con diagnóstico de cáncer de cérvix evaluadas en INCAN que consultan a la unidad de colposcopia. Para los controles sanos se tomó 24 muestras de pacientes que consultan al Centro de salud No.2 de Infecciones de Transmisión Sexual (ITS) de la Zona 3.

**4.2.2 Unidad de Información:** Resultados del perfil inmunológico TH1/TH2 que presentan los pacientes a partir de muestras de ADN. Se realizó una bitácora dónde se documentó la estandarización de la técnica SARM – RCP para los polimorfismos FNT $\alpha$  -308 y IL-10 -1082, además que se incluyo el archivo de fotos para evidencia de los resultados obtenidos.

**4.2.3 Unidad de Análisis:** Muestras de ADN obtenidas de sangre en Tarjetas para extraer y archivar ADN, (micro Cards FTA elute Micro cards®)

### 4.3 Población y Muestra

**4.3.1 Población:** Muestras de sangre impregnadas en las tarjetas para extraer y archivar ADN (microcards) obtenidas en INCAN y en el centro de salud de la Zona 3.

**4.3.2 Muestra:** Dos gotas de sangre en las tarjetas para extraer ADN (microcards) obtenidas en la clínica.

**4.3.3 Método y técnica de muestreo:** No probabilístico de conveniencia.

### 4.4 Selección de los sujetos de estudio

#### 4.4.1 Definición de Caso

Muestras de pacientes que tienen cáncer cervical tratado en el INCAN de una investigación previa de tipificación de virus de papiloma humano.

#### **4.4.2 Definición de Control**

Pacientes mayores de 35 años de edad, con 1 resultado de frote cervical con tinción Papanicolaou negativo en último chequeo médico realizado en la clínica de control del Centro de salud No.2 de la Zona 3. Sin antecedentes de cáncer de cérvix.

#### 4.5 Variables

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de Variable	Escala de Medición	Instrumento
Polimorfismo IL-10, -1082	Polimorfismo de nucleótido simple (PNS) - 1082 Polimorfismo que está localizado en la región del promotor, asociado a la producción de IL-10	Alelo A Alelo G Genotipo Homocigoto AA: Bajo productor IL-10 Genotipo Homocigoto GG: Alto Productor IL-10 Genotipo Heterocigoto AG productor intermedio.	Cualitativa	Nominal	Extracción de ADN, RCP (Reacción en cadena de la Polimerasa) Primers específicos, Electroforesis Gel Agarosa 2%.
Polimorfismo FNT $\alpha$ , -308	FNT $\alpha$ Polimorfismo de nucleótido simple que está asociado a la producción de FNT $\alpha$ y esto a su vez modula la respuesta inmune.	Alelo A Alelo G Genotipo Homocigoto GG: Bajo productor de FNT $\alpha$ . AA: Alto productor FNT $\alpha$ Genotipo Heterocigoto AG productor intermedio.	Cualitativa	Nominal	Extracción de ADN, (Reacción en cadena de la Polimerasa), Primers específicos, Electroforesis Gel Agarosa 2%.
Cáncer de Cérvix	Neoplasia que se desarrolla a partir de una infección por papilomavirus en el cérvix de una mujer.	Diagnostico mediante colposcopia o Papanicolaou	Cualitativa	Nominal	Diagnóstico de cáncer de cérvix mediante colposcopia, Papanicolaou. Muestras obtenidas de investigación previa.
Infección por virus del papiloma humano	Virus que se desarrolla en tejido mucoso como piel, agente causal cáncer de cérvix.	Detección mediante multiplex RCP.	Cualitativa	Nominal	Detección mediante multiplex RCP detección de ADN viral.

## 4.6 Técnicas, procedimientos e instrumentos utilizados en la recolección de datos.

### 4.6.1 Materiales utilizados en la estandarización de la técnica de RCP con SARM

#### 4.6.1.1 Materiales utilizados en la extracción de ADN

- 24 tarjetas *WhatmanMicroCards™FTA* para almacenar y extraer ADN.
- 100 puntas Marca ependorff® de 10µl
- 100 puntas marca ependorff® de 200µl
- 20 puntas marca ependorf® de 500µl
- Micropunch® de 2.0mm Marca Harris con su almohadilla de corte, para el corte de las muestras en las tarjetas de almacenamiento y extracción de ADN.
- 50 Tubos eppendorf de 1.5ml
- 1 frasco agua grado molecular

#### 4.6.1.2 Materiales utilizados para RCP en la utilización de los cebadores de β globina, IL-10 -1082, FNTα -308.

- 200 puntas Marca ependorff® de 10µl
- 200 puntas marca ependorff® de 200µl
- 40 puntas marca ependorf® de 500µl
- 200 tubos de RCP ependorf de 0.5µl
- 1 kit marca Promega que incluye: GoTaq® Polimerasa de ADN, 5X Green GoTaq® Reaction Buffer
- 1 kit marca promega para RCP que incluye: 1 frasco de 300µl MgCl, 1 frasco de 150µl dNTPS
- Cebadores utilizados:
- Cebadores β Globina,
  - GH20 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC- 3'
  - PC04 5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC- 3'
- Cebadores IL-10 -1082, preparados en 50µl de agua grado molecular a una concentración de 100pmol/µl.
  - IL-10 GEN -1082: 5'-CAGTGCCAACTGAGAATTTGG-3'
  - IL-10 .1082 variable G: 5'-CTAATAAGGCTTCTTCTTTGGGAG-3'

- IL-10 1082 variable A: 5'-ACTACTAAGGCTTCTTTGGGAAA- 3'
- Cebadores FNT $\alpha$  -308, preparados en 50 $\mu$ l de agua grado molecular a una concentración de 100pmol/ $\mu$ l.
  - FNT $\alpha$  -308 GEN: 5'-TCTCGGTTTCTTTCTCCATCG-3'
  - FNT $\alpha$  -308 variable G: 5'-ATAGGTTTTGAGGGGCAT- 3'
  - FNT $\alpha$  -308 variable A: 5'-AATAGGTTTTGAGGGGCATGA- 3'

#### 4.6.1.3 Materiales utilizados en la electroforesis

- 1 frasco de Agarosa para uso en biología molecular
- Bromuro de Etidio solución preparada
- TBE marca researchlaboratory 10x
- Peines para cámaras de electroforesis de 10, 14 y 56 posos
- Escalera marca Promega de 100 pares de bases y buffer de corrida.
- 200 puntas marca eppendorf® de 200 $\mu$ l

#### 4.6.2 Técnica de extracción de ADN en las muestras de sangre

**Paso 1:** Se utilizó las Tarjetas Whatman Microcards FTA Elute® que tenían 2 gotas de sangre de cada paciente, cada tarjeta estaba adecuadamente identificada. Cada tarjeta contenía muestras de dos pacientes. Se procesa según las indicaciones del fabricante.

**Paso 2:** Se utilizó un cortador Micropunch Harris® de 2.0mm para las micro cards FTA Elute Whatman®, se cortan con el sacabocados dos trozos pequeños de la tarjeta, identificando adecuadamente cada tubo de eppendorf de 1.5ml. Posterior a cada corte se limpia el instrumento con alcohol absoluto.

**Paso 3:** Se le agregó 100 $\mu$ l de agua grado molecular y se le coloca en el vortex durante 2 minutos. El procedimiento descrito anteriormente es útil para limpiar cualquier impureza que pueda existir en las muestras y brindar una mejor calidad de ADN.

**Paso 4:** Se extrajo los 100 $\mu$ l de agua y se le agregan 300 $\mu$ l de agua grado molecular.

**Paso 5:** Se colocó en el termomixereppendor® a 95°C a 300 rpm durante 40 minutos y se dejaron enfriar las muestras a 4°C.

**Paso 6:** Se almacenó las muestras a -20°C.

#### **4.6.3 Cuantificación de ADN**

**Paso 1:** Se procedió a utilizar el EppendorfPhotometer® para cuantificar la cantidad de ADN obtenida por el proceso descrito anteriormente.

**Paso 2:** Se limpió la cubeta plástica del fotómetro con alcohol absoluto previo a utilizarla y entre cada muestra.

**Paso 3:** Se utilizó agua grado molecular para calibrar a 0ng/μl (Blanco)

**Paso 4:** Luego se realizó una dilución de 3μl de ADN de cada muestra añadiéndole 67μl de agua grado molecular, esto se coloca en la cubeta del fotómetro y se le deja medir.

**Paso 5:** Se obtuvo la concentración aproximada de ADN y la pureza de este.

#### **4.6.4 Técnica de RCP de β Globina metodología estándar.**

**Paso 1:** Se procedió a realizar RCP del gen constitutivo β- Globina como control de calidad del ADN obtenido en la extracción.

**Paso 2:** Se preparan los reactivos necesarios para realizar RCP de β-Globina de la siguiente forma:



<b>Reactivos</b>	<b>Vol/Unidad µl</b>	<b>Vol. En 10 muestras µl</b>
<b>H2O</b>	9.57	95.70
<b>Buffer</b>	2.5	25
<b>MgCl</b>	1.8	18
<b>dNTPs</b>	1	10
<b>Primer PC04</b>	0.5	5
<b>Primer GH20</b>	0.5	5
<b>Polimerasa</b>	0.13	1.30
<b>ADN C/muestra</b>	5	
<b>Vol. Total</b>	20	

Cuadro 4.1 ReactivosRCP de  $\beta$  Globina, mezcla de reacción en un volumen total de 20  $\mu$ l, incluye Agua grado molecular, buffer, dntps, cebadores a una concentración de 10 pmol, polimerasa marca Promega a una concentración de 5 UI. Finalmente se agrega ADN de cada muestra de paciente 5  $\mu$ l.

**Paso 3:** Se colocó en cada tubo de RCP 15 $\mu$ l de la alícuota hecha y se le adiciona 5 $\mu$ l de ADN que previamente se obtuvo la extracción por cada muestra que se tiene y se identifican los tubos de acuerdo a la muestra de ADN que se le adiciono a la alícuota.

**Paso 4:** El programa que se utilizó en el termociclador es el siguiente:

- a) 95°C durante 10 minutos
  - b) 95°C durante 50 segundos
  - c) 53°C durante 50 segundos
  - d) 72°C durante 55 segundos
  - e) 72°C durante 10 minutos
- } 30 ciclos

**Paso 5:** Los productos obtenidos después del proceso anterior se corren en una cámara de electroforesis a 100 voltios durante 40 minutos. Se prepara el Gel de agarosa al 1% para correr los productos obtenidos del termociclador. Este gel se prepara con 1 gramo de agarosa diluido en 100ml de agua destilada calentado en el microondas durante 1 minuto, posteriormente se le añade 10 $\mu$ l de bromuro de etidio. Se colocan la escalera de 100 pares de bases en el centro del gel y junto a esta los controles negativos de ambos alelos, se continúan colocando las muestras en orden utilizando de referencia la escalera de 100 pares de bases.

**Paso 6:** Se colocó el gel en una cámara de rayos UV donde se observa, se documenta con fotografías el gel.

#### 4.6.5 Técnica de RCP de Polimorfismo FNT $\alpha$ -308 metodología estándar.

**Paso 1:** Se procedió a realizar RCP del polimorfismo FNT  $\alpha$  -308 evaluando así el perfil inmunológico TH1.

**Paso 2:** Se prepararon los compuestos necesarios para realizar RCP FNT  $\alpha$  -308 de la siguiente forma:

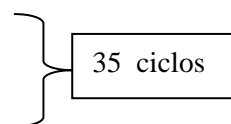
<b>Reactivos</b>	<b>Vol/Unidad <math>\mu</math>l</b>	<b>Vol. En 10 muestras <math>\mu</math>l</b>
<b>H2O</b>	12.37	123.70
<b>Buffer</b>	2.5	25
<b>MgCl</b>	2.0	20
<b>dNTPs</b>	1	10
<b>Primer FNT <math>\alpha</math> Gen</b>	1	10
<b>Primer FNT <math>\alpha</math> Var A-G</b>	1	10
<b>Polimerasa</b>	0.13	1.30
<b>ADN C/muestra</b>	5	
<b>Vol. Total</b>	25	

Cuadro 4.2 Reactivos RCP del polimorfismo FNT  $\alpha$  -308, mezcla de reacción, en un volumen total de 25  $\mu$ l, incluye Agua grado molecular, buffer, dntps, cebadores a una concentración de 10 pmol, polimerasa marca Promega a una concentración de 5 UI. Finalmente se agrega ADN de cada muestra de paciente 5  $\mu$ l.

**Paso 3:** Se colocó en cada tubo de RCP 20  $\mu$ l de la alícuota hecha y se le adiciona 5  $\mu$ l de ADN que previamente se obtuvo la extracción por cada muestra que se tiene y se identifican los tubos de acuerdo a la muestra de ADN que se le adiciono a la alícuota.

**Paso 4:** El Programa que se utilizará en el termociclador es el siguiente:

- a. 95°C durante 10 minutos
- b. 95°C durante 40 segundos
- c. 65°C durante 50 segundos
- d. 72°C durante 40 segundos
- e. 72°C durante 10 minutos



**Paso 5:** Los productos obtenidos después del proceso anterior se corrieron en una cámara de electroforesis a 100 voltios durante 40 minutos. Se prepara el Gel de agarosa al 2% para correr los productos obtenidos del termociclador. Este gel se prepara con 2 gramos de agarosa diluido en 100ml de agua destilada calentado en el microondas durante 90 segundos, posteriormente se le añade 10µl de bromuro de etidio. Se deja solidificar el gel. Se colocan la escalera de 100 pares de bases en el centro del gel y junto a esta los controles negativos y positivos de ambos alelos, se continúan colocando las muestras en orden utilizando de referencia la escalera de 100 pares de bases.

**Paso 6:** Se coloca el gel en una cámara de rayos UV donde se observa, se documenta con fotografías el gel.

#### 4.6.6 Técnica de RCP de Polimorfismo IL -10 -1082 metodología estándar.

**Paso 1:** Se procedió a realizar RCP del polimorfismo IL-10 -1082 evaluando así el perfil inmunológico TH2.

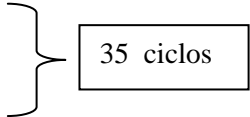
**Paso 2:** Se preparó los compuestos necesarios para realizar RCP IL-10 -1082 de la siguiente forma:

<b>Reactivos</b>	<b>Vol/Unidad µl</b>	<b>Vol. En 10 muestras µl</b>
<b>H2O</b>	12.37	123.70
<b>Buffer</b>	2.5	25
<b>MgCl</b>	2.0	20
<b>dNTPs</b>	1	10
<b>Primer IL-10 - 1082 Gen</b>	1	10
<b>Primer IL-10 - 1082 Var A-G</b>	1	10
<b>Polimerasa</b>	0.13	1.30
<b>ADN C/muestra</b>	5	
<b>Vol. Total</b>	25	

Cuadro 4.3 Reactivos RCP del polimorfismo IL-10 -1082, mezcla re reacción en un volumen total de 25ul, incluye Agua grado molecular, buffer, dntps, cebadores a una concentración de 10 pmol, polimerasa marca Promega a una concentración de 5 UI. Finalmente se agrega ADN de cada muestra de paciente 5 ul.

**Paso 3:** Se colocó en cada tubo de RCP 20µl de la alícuota echa y se le adiciona 5µl de ADN que previamente se obtuvo la extracción por cada muestra que se tiene y se identifican los tubos de acuerdo a la muestra de ADN que se le adiciono a la alícuota.

**Paso 4:** El Programa utilizado en el termociclador fue el siguiente:

- a. 95°C durante 10 minutos
  - b. 95°C durante 40 segundos
  - c. 65°C durante 50 segundos
  - d. 72°C durante 40 segundos
  - e. 72°C durante 10 minutos
- 

**Paso 5:** Los productos obtenidos después del proceso anterior se corren en una cámara de electroforesis a 100 voltios durante 40 minutos. Se prepara el Gel de agarosa al 2% para correr los productos obtenidos del termociclador. Este gel se prepara con 2 gramos de agarosa diluido en 100ml de agua destilada calentado en el microondas durante 90 segundos, posteriormente se le añade 10µl de bromuro de etidio. Se deja solidificar el gel. Se colocan la escalera de 100 pares de bases en el centro del gel y junto a esta los controles negativos y positivos de ambos alelos, se continúan colocando las muestras en orden utilizando de referencia la escalera de 100 pares de bases.

**Paso 6:** Se coloca el gel en una cámara de rayos UV donde se observa, se documenta con fotografías el gel.

## 4.7 Procesamiento y análisis de datos

### 4.7.1 Procesamiento de datos

Se procesó los datos obtenidos realizando los cuadros en el programa Microsoft Excel 2007 para la presentación de dichos cuadros. Se incluyeron imágenes para evidenciar los resultados obtenidos de la estandarización de la técnica.

#### **4.7.2 Análisis de datos**

En el caso del polimorfismo TNF $\alpha$ , -308 se interpreta como genotipo GG cuando se evidencie en el gel de agarosa únicamente del lado de la variante G un producto del RCP. Se interpreta como genotipo AA cuando se evidencie en el gel de agarosa únicamente del lado de la variante A un producto del RCP y heterocigoto si se evidencian en ambas variantes los productos de RCP.

Con el polimorfismo IL-10, -1082 se interpreta como genotipo GG cuando se evidencie en el gel de agarosa únicamente del lado de la variante G un producto del RCP. Se interpreta como genotipo AA cuando se evidencia en el gel de agarosa únicamente del lado de la variante A un producto del RCP y heterocigoto si se evidencian en ambas variantes los productos de RCP.

#### **4.8 Alcances y límites de la investigación**

##### **4.8.1 Alcances:**

La detección de los perfiles genéticos de TH1 y TH2 asociado a un tipo ó tipos de VPH podría aportar al médico y paciente factores pronóstico para tomar decisiones especialmente en lesiones preinvasivas del cérvix pudiendo de esta manera actuar de forma más agresiva en estadios tempranos.

Además a través de la estandarización puede servir de referencia a otros estudios para trabajar los mismos polimorfismos en otras patologías pudiendo así brindar aun más conocimientos.

##### **4.9 Límites:**

El trabajo de investigación va enfocado principalmente a la descripción y estandarización de una técnica para identificar los polimorfismos IL-10 -1082 y el FNT $\alpha$  -308. El estudio es un reporte de casos, se hizo una descripción de los resultados obtenidos.

#### **4.10 Aspectos éticos de la investigación**

Las instituciones que participaron en el desarrollo de este trabajo de investigación se preocuparon por el adecuado desarrollo de la investigación siguiendo los

lineamientos adecuados para desarrollarla satisfactoriamente. No se tendrán intereses de ningún tipo, tanto del investigador como de los asesores que pueda afectar en el desarrollo de la investigación

Se tuvo el cuidado de obtener el consentimiento informado de cada paciente previo al uso del material genético en el estudio accediendo los pacientes a participar voluntariamente. Además se explicará cuidadosamente el estudio a toda persona interesada en colaborar.

## 5. RESULTADOS

Los resultados son expuestos en dos secciones, organizadas de la siguiente forma:

- **Sección I:** Estandarización de la técnica de reacción en cadena de polimerasa (RCP) con el sistema de amplificación refractaria a mutaciones (SARM) para detección de los polimorfismo FNT $\alpha$  -308 y IL-10 -1082 en muestras de pacientes con cáncer de cérvix y en pacientes sanas.
- **Sección II:** Reporte de casos, donde se expondrán los datos obtenidos en las muestras procesadas.

### 5.1 Sección I: Estandarización de la técnica de reacción en cadena de polimerasa (RCP) con el sistema de amplificación refractaria a mutaciones (SARM) para detección de los polimorfismos FNT $\alpha$ -308 y IL-10 -1082 en muestras de pacientes con cáncer de cérvix y en pacientes sanas.

En la estandarización de la técnica de RCP con SARM en los polimorfismos FNT $\alpha$  -308 y IL-10 -1082 en muestras de pacientes con cáncer de cérvix y en pacientes sanas se tomo las indicaciones del fabricante para la utilización de los cebadores (primers) y una forma estándar al trabajar RCP con los polimorfismos FNT $\alpha$  -308 y IL-10 -1082.

#### 5.1.1 Estandarización cuantificación de ADN

En la cuantificación del ADN obtenido mediante la técnica de extracción descrita en la metodología, se utiliza el espectrofotómetro Eppendorf Photometer®. En la realización de este procedimiento es importante utilizar agua grado molecular para calibrar el blanco a 0ng/ $\mu$ l. Posteriormente es indispensable limpiar adecuadamente la cubeta del espectrofotómetro antes de empezar y entre cada muestra ya que cualquier pequeña cantidad de cualquier sustancia puede alterar los resultados obtenidos en la cuantificación de ADN.

Es indispensable preparar las diluciones de acuerdo a lo que se programa en el espectrofotómetro. En este trabajo se utilizó la dilución de 3 $\mu$ l de ADN agregándole 67 $\mu$ l de agua y en esta dilución se cuantifico la cantidad de ADN

extraída de las muestras. En el Cuadro a continuación se expondrán los datos obtenidos de la cuantificación de ADN.

<b>No. de muestra</b> <b>Pacientes con</b> <b>cáncer</b>	<b>Concentración</b> <b>ADN</b> <b>ng/μl</b>	<b>No. de muestra</b> <b>Pacientes</b> <b>Control sanas</b>	<b>Concentración</b> <b>ADN</b> <b>ng/μl</b>
<b>1</b>	18	<b>1C</b>	11.4
<b>2</b>	57.9	<b>2C</b>	50.6
<b>3</b>	30	<b>3C</b>	75.7
<b>4</b>	47.4	<b>4C</b>	51.7
<b>5</b>	140.9	<b>5C</b>	68.9
<b>6</b>	182	<b>6C</b>	75.7
<b>7</b>	177	<b>7C</b>	90.6
<b>8</b>	195	<b>8C</b>	91.1
<b>9</b>	275	<b>9C</b>	103.4
<b>10</b>	68	<b>10C</b>	122.3
<b>11</b>	26.7	<b>11C</b>	111.9
<b>12</b>	48.3	<b>12C</b>	90
<b>13</b>	31	<b>13C</b>	41.7
<b>14</b>	57.6	<b>14C</b>	37.6
<b>15</b>	103.6	<b>15C</b>	69.7
<b>16</b>	17.3	<b>16C</b>	57.8
<b>17</b>	24.9	<b>17C</b>	65.7
<b>18</b>	11.8	<b>18C</b>	88
<b>19</b>	37.2	<b>19C</b>	65.9
<b>20</b>	38.6	<b>20C</b>	83.8
<b>21</b>	46.3	<b>21C</b>	88.4
<b>22</b>	32	<b>22C</b>	62.8
<b>23</b>	46.7	<b>23C</b>	56.9
<b>24</b>	25.9	<b>24C</b>	57.2

**Cuadro 5.1** Cuantificación de la extracción de ADN de las muestras de sangre de pacientes con Cáncer invasivos del cérvix y de pacientes sanas. La cantidad de ADN promedio en todas las muestras es de 72ng/μl.



En el cuadro 5.1 se anotaron las cantidades de ADN extraído en cada muestra de las tarjetas para extraer y archivar ADN. Las concentraciones varían entre 11ng/μl y 195ng/μl, aunque es recomendable utilizar concentraciones entre 50ng/μl y 100ng/μl, debido a que tiene un mejor rendimiento según lo observado en los resultados de RCP y el método SARM. Como se demuestra en la figura 5.1.

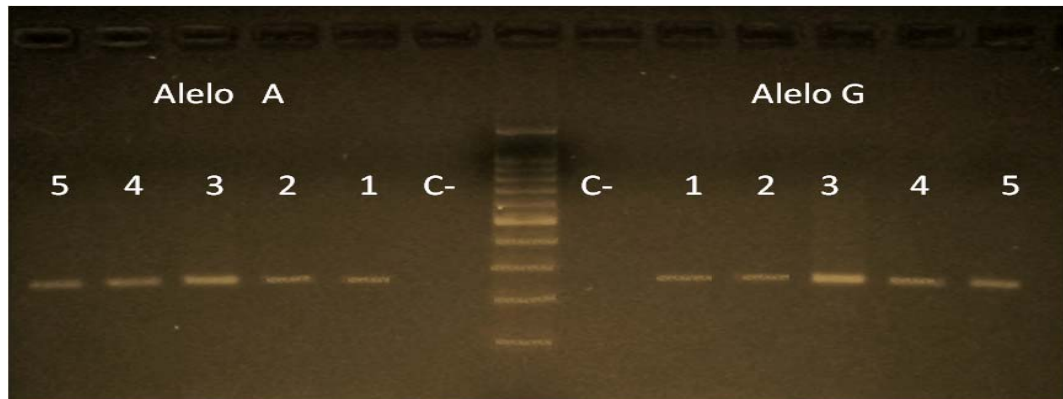


Figura 5.1 Muestras de pacientes sanos en el polimorfismo IL-10, -1082. Electroforesis en gel agarosa al 2% con bromuro de etidio. Se evidencia la presencia del Alelo “A” en las muestras de la 1 a 5 lado izquierdo, en medio se coloca el marcador de ADN de 100 pares de bases marca Promega. Las mismas muestras evidencian el Alelo “G” del lado derecho de la figura por lo que estos casos son heterocigotos ya que contienen ambos alelos A y G

En la figura 5.1 se observa que la muestra 1 que tiene una concentración de ADN de 11.4 ng/μl se define la banda de una forma más débil en comparación con la banda de la muestra 3 que tiene una concentración de 75ng/μl y se define mejor la banda.

## 5.2 Técnica de RCP β- Globina

Se utilizó la β-globina como gen constitutivo, de modo que se puede evaluar la calidad de ADN que se tiene. Para esta técnica de RCP se utiliza un protocolo estándar, utilizando los cebadores GH20 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC- 3' y PC04 5'-CAACTTCATCCACGTTACC- 3', se utilizó las siguientes cantidades de reactivos para el RCP descritas en el cuadro 5.2, obteniendo así un producto de RCP de 268 pares de bases.

<b>Reactivos</b>	<b>Vol/Unidad µl</b>	<b>Vol. En 10 muestras µl</b>
<b>H2O</b>	8.57	85.70
<b>Buffer</b>	2.5	25
<b>MgCl</b>	1.8	18
<b>dNTPs</b>	1	10
<b>Cebador GH20</b>	0.5	5
<b>Cebador PC04</b>	0.5	5
<b>Polimerasa</b>	0.13	1.30
<b>ADN C/muestra</b>	5	
<b>Vol sub Total</b>	15	
<b>Vol. Total</b>	20	

Cuadro 5.2 Reactivos RCP β- Globina, mezcla de reacción en un volumen total de 20 µl, incluye Agua grado molecular, buffer, dntps, cebadores a una concentración de 10 pmol, polimerasa marca Promega a una concentración de 5 UI. Finalmente se agrega ADN de cada muestra de paciente 5 µl.

Se utilizó el siguiente programa de RCP en el termociclador Applied Biosystems, (gene amp® PCR system 9700),

- a) 95°C durante 10 minutos
  - b) 95°C durante 50 segundos
  - c) 53°C durante 50 segundos
  - d) 72°C durante 55 segundos
  - e) 72°C durante 10 minutos
- } 30 ciclos

Para identificar los productos de RCP obtenidos es necesario colocar en un gel de agarosa al 1% con 10 µl de bromuro de etidio los productos obtenidos. En la Figura 5.2 se evidencian los productos de RCP de 268 pares de bases.

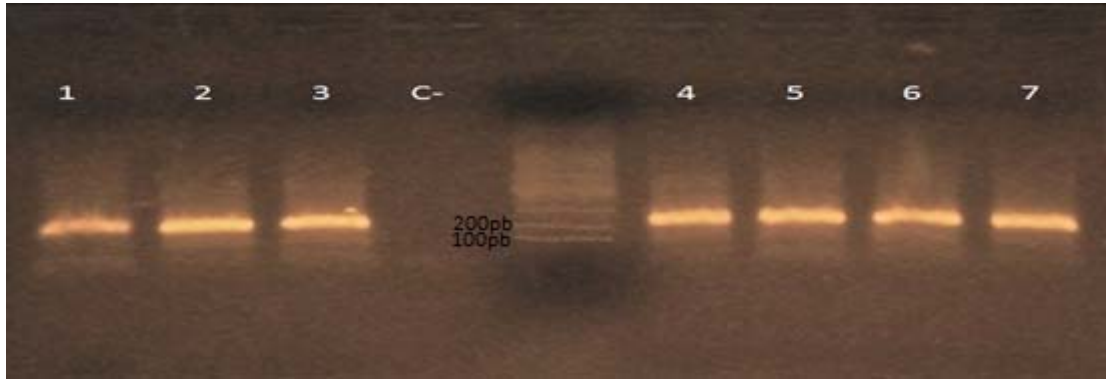


Figura 5.2 RCP productos  $\beta$ -globina de 268 pares de bases muestras de pacientes sanos. Las bandas corresponden a la presencia de este gen como control y calidad del ADN en este gel se incluyeron 7 muestras, el control negativo asegura que no hubo contaminación a la mezcla de reactivos.

Se realizó RCP con los cebadores de  $\beta$  Globina con todas las muestras en el estudio para verificar que la calidad del ADN obteniendo resultados positivos para todas las muestras, indicando que la calidad de ADN es adecuada.

### 5.3 Estandarización de la técnica RCP con SARM del polimorfismo IL-10 -1082 y FNT $\alpha$ -308.

En la estandarización de la técnica RCP con SARM del polimorfismo FNT  $\alpha$  -308, se realizaron modificaciones sobre la técnica estándar de RCP en la cantidad de cebadores a utilizar y la temperatura a la cual se adhieren los cebadores. En la primera prueba se siguieron las siguientes directrices:

<b>Reactivos</b>	<b>Vol/Unidad <math>\mu</math>l</b>	<b>Vol. En 10 muestras <math>\mu</math>l</b>
<b>H2O</b>	12.37	123.70
<b>Buffer</b>	2.5	25
<b>MgCl</b>	2.0	20
<b>dNTPs</b>	1	10
<b>Primer FNT <math>\alpha</math> Gen</b>	1	10
<b>Primer FNT <math>\alpha</math> Var A-G</b>	1	10
<b>Polimerasa</b>	0.13	1.30
<b>ADN C/muestra</b>	5	
<b>Vol. Total</b>	25	

Cuadro 5.3 Reactivos RCP FNT  $\alpha$  -308 mezcla de reacción, en un volumen total de 25ul, incluye Agua grado molecular, buffer, dntps, cebadores a una concentración de 10 pmol, polimerasa marca Promega a una concentración de 5 UI. Finalmente se agrega ADN de cada muestra de paciente 5 ul.

<b>Reactivos</b>	<b>Vol/Unidad µl</b>	<b>Vol. En 10 muestras µl</b>
<b>H2O</b>	12.37	123.70
<b>Buffer</b>	2.5	25
<b>MgCl</b>	2.0	20
<b>dNTPs</b>	1	10
<b>Primer IL-10 - 1082 Gen</b>	1	10
<b>Primer IL-10 - 1082 Var A-G</b>	1	10
<b>Polimerasa</b>	0.13	1.30
<b>ADN C/muestra</b>	5	
<b>Vol. Total</b>	25	

Cuadro 5.4 Reactivos RCP IL-10,-1082 mezcla de reacción en un volumen total de 25 µl, incluye Agua grado molecular, buffer, dntps, cebadores a una concentración de 10 pmol, polimerasa marca Promega a una concentración de 5 UI. Finalmente se agrega ADN de cada muestra de paciente 5 µl.

Los cuadros 5.3 y 5.4 muestran los reactivos y las cantidades utilizados en las pruebas iniciales para estandarizar la técnica de RCP para los polimorfismos IL-10 - 1082 y FNT α -308.

En la primera prueba se utilizaron las cantidades descritas en el cuadro 5.3 y 5.4 y con el siguiente programa en el termociclador:

- a) 95°C durante 10 minutos
  - b) 95°C durante 40 segundos
  - c) 53°C durante 50 segundos
  - d) 72°C durante 50 segundos
  - e) 72°C durante 10 minutos
- } 35 ciclos

Se probaron diversas temperaturas para la unión (annealing) de los cebadores con el ADN (inciso C del programa en el termociclador) donde se demostró mediante algunas pruebas que la temperatura con la que mejor se unían los cebadores fue a 53°C, no mejorando los resultados a 56°C ni a 59°C según las pruebas realizadas. Se obtuvieron los siguientes productos de RCP tras este protocolo (Figuras 5.2 y 5.3)

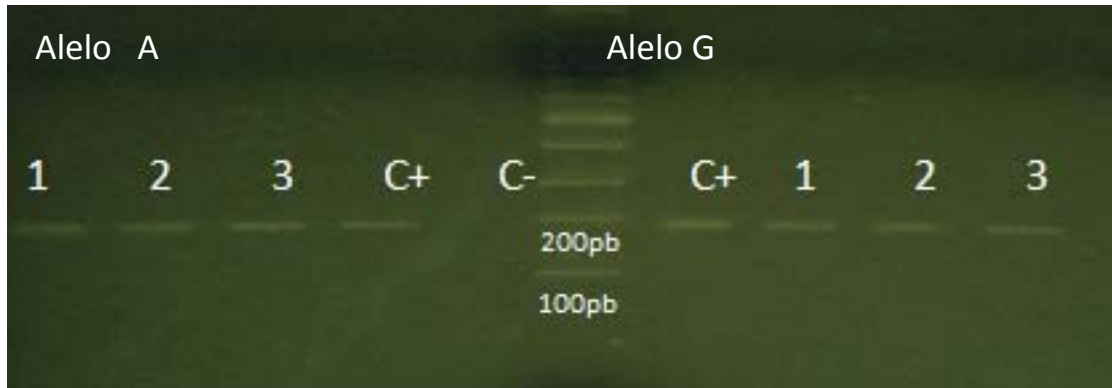


Figura 5.3 Productos de RCP polimorfismo TNF $\alpha$ -308, tamaño del producto 184 pares de bases. Muestras de pacientes con cáncer. Se colocan de lado izquierdo de la imagen los productos obtenidos con los cebadores de la variante A y del lado derecho los productos con los cebadores de la variante G. Se utiliza na escalera de 100 pares de bases para cuantificar el peso del producto obtenido. Se interpreta esta imagen como muestras heterocigotos 1 - 5 con genotipo A/G ya que las dos variantes están presentes en ambos lados.

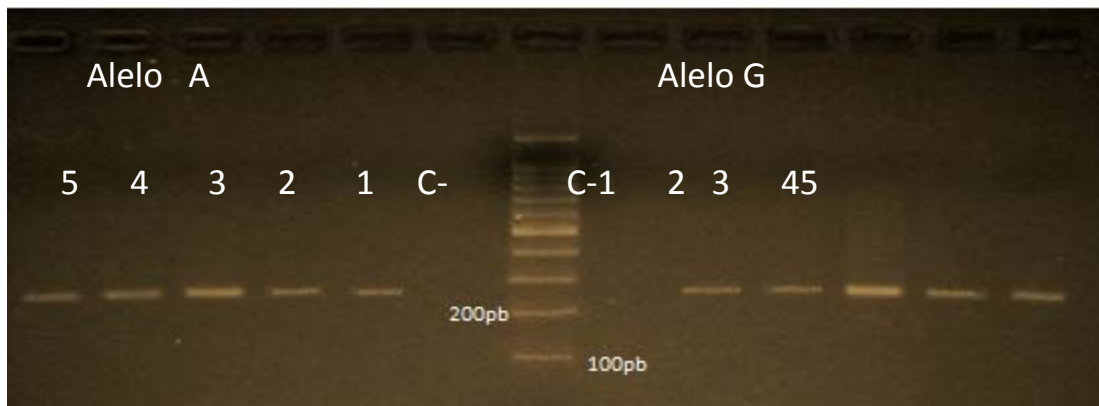


Figura 5.4 Productos de RCP polimorfismo IL-10 -1082, tamaño del producto 258 pares de bases. Muestras de pacientes sanas. El número indica el número de muestra asignado a cada paciente. Se colocan de lado izquierdo de la imagen los productos obtenidos con los cebadores de la variante A y del lado derecho los productos con los cebadores de la variante G. Se utiliza na escalera de 100 pares de bases para cuantificar el peso del producto obtenido. Se interpreta esta imagen como muestras heterocigotos 1 - 5 con genotipo A/G ya que las dos variantes están presentes en ambos lados.

En los protocolos de RCP presentados anteriormente se utilizaron los cebadores a una concentración de 10 $\mu$ mol, posteriormente se realizo una prueba donde se utilizo los cebadores a una concentración de 5 $\mu$ mol (figura 5.5) demostrando que no es necesario usar los cebadores a una concentración de 10.0 $\mu$ mol.



Figura 5.5RCP Polimorfismo FNT $\alpha$  -308. Prueba de Cebadores a una concentración de 10 $\mu$ mol. Se utilizó un control interno (C1) del gen de Hormona de Crecimiento Humano, producto de RCP de 429 pares de bases, positivo pozo 8. Las siglas A y G corresponden alélelo A (A), alelo G (G). No hubo amplificación de producto de RCP en los posos 1,4, 5, 6,7, 11 y 12.

## 5.2 Sección II: Reporte de Casos

### 5.2.1 Resultados muestras de pacientes con cáncer cervical

Las 24 muestras de pacientes con cáncer cervical fueron analizadas a través de los productos de RCP en el polimorfismo IL-10 -1082 y en el polimorfismo FNT $\alpha$  -308, identificando a través de los geles de agarosa al 2% y bromuro de etidio el producto de RCP de 184 pares de bases en el polimorfismo FNT $\alpha$  -308 y en el polimorfismo IL.-10 -1082 un producto de 258 pares de bases. Se exponen los resultados en el cuadro 5.5.

### 5.2.2 Resultados muestras de pacientes sanas

Entre las 24 muestras de pacientes sanas fueron analizadas a través de los productos de RCP en el polimorfismo IL-10 -1082 y en el polimorfismo FNT $\alpha$  -308, identificando a través de los geles de agarosa al 2% y bromuro de etidio el producto de RCP de 258 pares de bases para el polimorfismo del FNT $\alpha$  -308 y en el polimorfismo IL.-10 -1082 un producto de 258 pares de bases. Se exponen los resultados en el cuadro 5.5.

No. De muestra Grupo pacientes con cáncer	Resultado Genotipo	No. De Muestra Grupo de pacientes sanos	Resultado Genotipo
1	A/G	1C	A/G
2	A/G	2C	A/G
3	A/G	3C	A/G
4	A/G	4C	A/G
5	A/G	5C	A/G
6	A/G	6C	A/G
7	A/G	7C	A/G
8	A/G	8C	A/G
9	A/G	9C	A/G
10	A/G	10C	A/G
11	A/G	11C	A/G
12	A/G	12C	A/G
13	A/G	13C	A/G
14	A/G	14C	A/G
15	A/G	15C	A/G
16	A/G	16C	A/G
17	A/G	17C	A/G
18	A/G	18C	A/G
19	A/G	19C	A/G
20	A/G	20C	A/G
21	A/G	21C	A/G
22	A/G	22C	A/G
23	A/G	23C	A/G
24	A/G	24C	A/G

Cuadro 5.5 Resultados genotipos, genotipos a identificar Homocigotos A/A y G/G; Genotipo heterocigotos A/G. Muestras de pacientes con cáncer de cérvix se describen en la primera y segunda columna, y pacientes sanos se describe en las columnas 3 y 4. Todos los genotipos en este estudio revelan un genotipo A/G (heterocigotos).





## 6. DISCUSIÓN

El cáncer de cérvix es un problema de salud pública en países subdesarrollados como Guatemala, ya que ocupa el cuarto lugar de incidencia por 100,000 habitantes dentro de los países de América Latina y el segundo entre los diagnósticos de cáncer en Guatemala. (1, 2)

El cáncer de cérvix es considerado como una enfermedad de transmisión sexual en donde los factores de riesgo como tabaquismo, inicio temprano de relaciones sexuales, múltiples parejas sexuales, e infecciones de transmisión sexual juegan un papel importante en la génesis del cáncer cervical y por ser considerado una infección de transmisión sexual este tipo de cáncer puede ser prevenible.

El virus del papiloma humano (VPH) puede infectar epitelios de las mucosas de los órganos sexuales del ser humano, se conocen más de 100 serotipos diferentes de los cuales hay algunos considerados como de alto riesgo de producir una lesión invasiva cervical, entre estos encontramos los serotipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58. Estos serotipos debido a su potencial riesgo de transformación de las células epiteliales a células malignas debido a que estos serotipos afectan algunos mecanismos normales de las células que detectan mutaciones en el ADN como P53, facilitando así el desarrollo de cáncer cervical. (1, 2)

El cáncer de cérvix afecta a los países de alto riesgo como Guatemala, a número importante de mujeres en edad reproductiva y laboralmente activas, con acceso limitado a asistencia sanitaria de detección precoz y de tratamiento. (1)

Por diversos factores en Guatemala se realizan diagnósticos tardíamente entre ellos el poco acceso a servicios de salud en regiones del área rural, la extrema pobreza, y el bajo nivel educativo; sumando a esto en todo el país se encuentra únicamente un centro especializado de referencia como el Instituto Nacional de Cancerología "Bernardo del Valle" el cual no se da abasto para diagnosticar, captar y tratar todos los casos de cáncer de cérvix.

En este contexto además del conocimiento que este trabajo puede aportar en la participación de la respuesta inmune en el cáncer de cérvix, es pionero en la caracterización genética de citoquinas inflamatorias como el FNT $\alpha$  e inmunosupresoras como es la IL-10. La descripción detallada de la técnica de

biología molecular como es la participación de polimorfismos en el cáncer de cérvix es de gran valor para el desarrollo de técnicas modernas en el estudio de enfermedades no solo oncogénicas si no que también en le campo de la microbiología,

Los resultados de evaluación en las 24 muestras de pacientes con cáncer cervical y en las 24 muestras de pacientes sanas evidenciaron el genotipo heterocigoto A/G FNT $\alpha$  -308 que caracteriza una respuesta de citoquinas inflamatorias moderada. De igual manera IL-10 -1082 presento el genotipo A/G que caracteriza una respuesta de citoquinas intermedia a diferencia lo reportado por Hausen en 2002 (7) que la respuesta inmune ante lesiones de cáncer del cérvix hay un desbalance en el patrón de citoquinas, producidas por las células T donde se afecta el patrón TH1(linfocitos cooperadores), productores de gama interferón y FNT $\alpha$  encontrándolo disminuido, además de la producción de IL-10 aumentada.

DutaCornescu en Rumania en 2009 (21) reportó que existe una asociación en relación con el genotipo G/G, en el polimorfismo IL-10 -1082 que condiciona a un perfil inmunológico supresor ya que identificaron niveles altos de IL-10, y el polimorfismo A/A fue asociado a una producción baja de IL-10 y por lo tanto una respuesta TH1 con una respuesta inmune celular e inflamatoria aumentada. Difiere de los resultados de nuestro estudio, que no se encontró una diferencia entre las pacientes con cáncer y los controles, posiblemente influenciado por el número de muestras estudiadas que fueron 24 que es un número relativamente pequeño cuando se trata de estudiar polimorfismos de citoquinas predominantemente en el perfil inmunológico de los pacientes con cáncer que es muy importante el grado de desarrollo de la enfermedad y la invasión metastásica de las misma

Vandana en Sudafrica en el 2003 (22) documento que existe relación del genotipo G/G a niveles bajos de FNT $\alpha$  y el caso contrario con el genotipo A/A asociado a unos niveles elevados de FNT $\alpha$  y posiblemente asociado a una respuesta inmune TH1 fuerte.

Vuslat en el 2004 (23) demostró la asociación del genotipo G/G con niveles elevados de IL-10 en el polimorfismo -1082 en la región del promotor de IL-10 y una respuesta inmune con un perfil TH1, que puede proteger a la mujer de una infección por papiloma virus.

También un posible estudio en los casos de cáncer de cervix o cambios iniciales metaplásicos podrían hacerse estudios polimorfismos de FNT $\alpha$  e IL-10 en linfocitos obtenidos en las biopsias del tejido y utilizarse como pronóstico y tratamiento de pacientes, además de la posibilidad de tomar decisiones más drásticas en estadios de lesiones preinvasivas.

No hay que olvidar los factores ambientales que pueden modificar y modular la diferenciación TH1/TH2, ya que intervienen en la forma de presentación de antígenos la forma física del antígeno y la cantidad del mismo, que será de gran utilidad en el futuro cuya manipulación podría abrir nuevas líneas de investigación y tratamiento frente al cáncer. (12, 13)



## 7. CONCLUSIONES

- 7.1 La estandarización de la técnica fue posible mediante modificaciones de un protocolo estándar, de modo que es posible identificar el genotipo FNT $\alpha$  -308 en muestras de pacientes con cáncer cervical y pacientes sanas. La temperatura de unión de los cebadores que probó ser más eficiente fueron los 53°C en 30 ciclos. Se comprobó que se pueden utilizar los cebadores a una concentración de 10 $\mu$ mol ya que se observó resultados aceptables en los productos de RCP en el polimorfismo FNT $\alpha$  -308.
- 7.2 De una manera similar la estandarización de la técnica en el caso del polimorfismo IL-10-1082, fue posible mediante modificaciones de un protocolo estándar, de modo que es posible identificar el genotipo IL-10 -1082 en muestras de pacientes con cáncer cervical y pacientes sanas. La temperatura de unión de los cebadores que probó ser más eficiente al igual que en polimorfismo FNT-308, fueron a los 53°C en 30 ciclos. Se comprobó que se pueden utilizar los cebadores a una concentración de 10 $\mu$ mol ya que se observó resultados aceptables en los productos de RCP en el polimorfismo IL-10 -1082.
- 7.3 El genotipo de las 24 muestras de pacientes con cáncer cervical y las 24 muestras de pacientes sanas es un genotipo heterocigoto A/G. No se encontró diferencias entre los perfiles de las pacientes con cáncer cervical y las pacientes sanas debido a que el tamaño de la muestra no es estadísticamente significativo.
- 7.4 Existen numerosos polimorfismos que podrían afectar la producción de FNT $\alpha$  e IL-10 por lo que es necesario correlacionar con los niveles de citoquinas con los polimorfismos a estudiar y relacionarlos con cáncer cervical.



## 8. Recomendaciones

- 8.1 A la Facultad de Ciencias Médicas se les recomienda promover las investigaciones en el área de biología molecular enfocada siempre en la detección temprana de cáncer cervical que afecta a la mujer, por lo que es necesario apoyar más proyectos de este tipo y lograr así brindar a las pacientes tratamientos preventivos más oportunos y obteniendo así la reducción de la incidencia de esta patología de interés nacional.
- 8.2 En estudios de polimorfismos es necesario hacerlo con muestras estadísticamente significativas por lo que este estudio pionero podría ser útil para sentar las bases de un estudio de más casos.
- 8.3 Al Centro de Investigaciones Biomédicas continuar el desarrollo de la línea de investigación de cáncer cervical en el laboratorio de la facultad de ciencias médicas para promover así el desarrollo de la en el campo de la Biología Molecular e Inmunología tratando siempre de generar conocimientos para mejorar la salud de las pacientes.
- 8.4 Buscar apoyo de más instituciones como el INCAN y Centro de Salud de la Zona 3 de Infecciones de transmisión Sexual, donde apoyen el desarrollo de investigación como en este trabajo, con el objetivo de brindar nuevos conocimientos sobre polimorfismos en cáncer cervical o asociados a otros tipos de cáncer siempre con el objetivo de evitar las consecuencias de estas patologías en etapa terminal.





## **9. Aportes**

Por el carácter pionero de esta investigación que es útil para la producción de conocimiento, abrir campos de investigación en el área de Biología Molecular, Inmunología y genética en Guatemala generando conocimiento y experiencia en el desarrollo de este tipo de investigaciones en cáncer cervical y predisposiciones genéticas de la población guatemalteca.



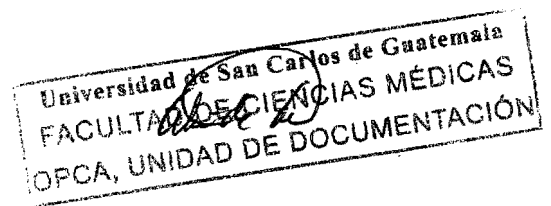
## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Liga Nacional Contra el Cáncer de Guatemala. Guatemala: INCAN; 2012 [accesado 10 ene 2012].Mynor R. Villeda E. Registro de pacientes atendidos, datos de mortalidad y mortandad.Disponible en: <http://regcangua.zzi.org/>.
2. Alonso P. Incidencia y mortalidad del cáncer cervicouterino en América Latina. Cáncer cervicouterino diagnóstico, prevención y control. 2 ed. México: Panamericana; 2005.
3. Chiang A, Massagué J.Molecular basis of metastasis. N Engl J Med. 2008; 359 (28): 14-23.
4. Kamradt T, Mitchison A.Tolerance and autoimmunity. N Engl J Med. 2001 Mar; 344 (9): 655- 664.
5. Aagje G, Beckmann I, Ewing P, Eijkemans M.Cytokine release in HR-HPV(+) women without and with cervical dysplasia (CIN II and III) or carcinoma, compared with HR-HPV(-) Controls. Mediators of inflammation.Hindawi: Publishing Corporation; 2007.
6. Helmerhorst TJ, Bais AG, Beckmann I, Lindemans J, Ewing P, SnijdersPJ , et. al. Becomes manifest in CIN III lesions during the carcinogenesis of cervical cancer A shift to a peripheral Th2-type cytokine pattern. *J ClinPathol*. 2005;58:1096-1100.
7. Hausen H. Papillomavirus and cancer: from basic studies to clinical application. Nat Rev Cancer. 2002; 2:342-350.
8. Carrillo A. Utilidad en la combinación de oligonucleótidos universales para la detección del virus del papiloma humano en cáncer cervicouterino y lesiones premalignas. Salud Pública de México. 2004; 46 (1): 7-15.
9. López SA, Lizano M. Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. Cancerología (México) 2006;(1):31-55

10. Sotlar K, Diemer D, Dethleffs A, Hack Y, Stubner A, Vollmer N. et al. Detection and typing of human papillomavirus by E6 Nested Multiplex RCP2. *J ClinMicrobiol.* 2004 Jul; 42(7): 3176–3184.
11. León G, Faxas ME. Cáncer de cuello uterino. Aspectos inmunológicos y genéticos de mayor relevancia. *Rev Cubana Med* 2004; 43(1): 1-8.
12. Olivera JF. Cancer immunology. *N Engl J Med* 2008 June 19; 358 (25): 2704-2712.
13. Male D, Brostoff J, Roth D, Roitt T. Regulación de la respuesta inmunitaria. *Inmunología.* 7 ed. España: ElsevierMosby; 2007.
14. Vandana A, Constant D, Hoffman M, Williamson AL. The allelic distribution of -308 tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism in South African women with cervical cancer and control women. *BMC Cancer*[en línea]2006. [accesado 4 Abr 2012] 6: 24. Disponible en:<http://www.biomedcentral.com/1471-2407/6/24>.
15. Clerici M, Merola M, Ferrario E, Trabattoni D, Villa ML, Stefanon B. et. al. Cytokine production patterns in cervical intraepitelia neoplasia: Association with human papilloma virus infection. *Journal National Cancer Institute.* 1997;89 (3):245-249.
16. Giovanni G, Allavena P, Mantovani A. Cytokines as key component of cancer-related inflammation. *Cytokine.*[en línea] 2008 [accesado 12 Abr 2012]; 43: 374-379. Disponible en: [www.elsevier.com/locate/issn/10434666](http://www.elsevier.com/locate/issn/10434666).
17. Garra A, Viera P. TH1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nature Reviews Immunology.* 2007 June; 7: 425- 428.

18. Abbas A, Lichtman A. Inmunidad frente a los tumores. Inmunología celular y molecular. 5 ed. España: Elsevier Saunders; 2003: 391-410.
19. Ghjng J, Yang YI, Yea SS, Lee YJ, Chun JH, Kim HI, et al. The -238 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism is associated with decreased susceptibility to cancers. *Cancer Lett* 2001; 166(1):41– 46.
20. Perrey C, Turner S, Pravica V, Howell WM, Hutchinsong I. ARMS-PCR methodologies to determine IL-10, FNT $\alpha$ , FNT- $\beta$  and TGF- $\beta$ 1 gene polymorphisms. *Transplant immunology*. 1999. 7: 127-128.
21. Duta-Cornescu G. A comparative study of SARM – RCP and RFLP – RCP as methods for rapid PNS identification. *Romanian Biotechnological Letters. Rumanian Society of Biological Sciences.* [enlinea] 2009 [accesado 4 Abr 2012]; 14(6): 4845-4850. Disponible en: <http://ebooks.unibuc.ro/biologie/RBL/rbl6vol14/Lucr%2011%20Duta-Cornescu.pdf>.
22. Vandana A, Carrara H, Sachs J. Ethnic differences in allelic distribution of IFN-g in South African women but no link with cervical cancer. *Journal of Carcinogenesis* 2003;2:3
23. Yilmaz V, Yentur SP, Saruhan-Direskeneli G. IL-12 and IL-10 polymorphisms and their effects on cytokine production. *Cytokine*. 2005; 30: 188-194.
24. Kristina S, IL-10 promoter nt -1082 A/G Polymorphism and Human Papillomavirus infection in cytologic abnormalities of the uterine cervix. *Journal of Interferon and Cytokine Research*. 2004; 24: 245-251.
25. Perrey C. Genotyping for polymorphisms in interferon- $\gamma$ , interleukin-10, transforming growth factor- $\beta$ 1 and tumor necrosis Factor-  $\alpha$  genes: a technical report. *Transplant Immunology*. 1998; 6: 193-197.

26. Kirkpatrick A, Bidwell J, Van den Brule AJ, Meijer CJ, Pawade J, Glewet S. FNT $\alpha$  polimorfism frequencies in HPV- asociated cervical dysplasia. Gynecologic Oncology [en linea] 2004 [accesado 4 Abr 2012]; 92: 675-679. Disponible en: [http://www.ihgpharmaco.com/test/web-content/downloads\\_files/31.pdf](http://www.ihgpharmaco.com/test/web-content/downloads_files/31.pdf)
27. Miossec P, Korn T, Vijay K. Interleukin -17 and Type17 helper cells. N Eng J Med. 2009; 361: 888-898.



## 11. ANEXO

### Anexo1

### **BOLETA DE INFORMACIÓN A LAS PACIENTES**

#### **Objetivo de la Investigación**

Como parte de la evolución de la medicina, es necesaria la búsqueda de nuevos conocimientos para el tratamiento de las enfermedades que afectan a las personas. En este estudio se necesita obtener una muestra de sangre utilizando instrumentos descartables y estériles. A partir de esa muestra la investigación busca realizar una prueba genética donde se podría detectar una debilidad para desarrollar cáncer de cérvix. Esta es una investigación preliminar que servirá de base para otras investigaciones que puedan definir algunas de las debilidades en las personas para desarrollar cáncer cervical. Dentro de los casos positivos, se podrá indicar que se debe llevar un control más seguido para evitar el desarrollo de cáncer cervical.

El estudio está aprobado por La Facultad de Medicina de la Universidad de San Carlos de Guatemala y por las instituciones donde están siendo tratadas actualmente.

El estudio es realizado por Rodrigo Pinto que es estudiante de séptimo año de la carrera de medicina de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

#### **Propósito**

Describir una técnica para que el laboratorio pueda detectar un defecto que pueda contribuir a que desarrolle cáncer cervical en las mujeres.

- 1) El procesamiento de las muestras de sangre obtenidas se utilizarán en la investigación llamada:  
“Estandarización de la técnica de Reacción en Cadena de Polimerasa (RCP) con el Sistema de Amplificación Refractario a Mutaciones (SARM) **que detecta polimorfismos del perfil inmunológico TH1 y TH2**, en muestras de pacientes con cáncer de cérvix y en pacientes sanas”
- 2) El investigador dará los resultados al ó los médicos a cargo de su caso y si usted lo solicita será notificada a través de ellos.
- 3) No serán entregadas los resultados a terceras personas.
- 4) La muestra y su procesamiento podrá conservarse hasta que sea de utilidad en el estudio. La investigación dura 24 meses a partir de junio 2012.
- 5) Los científicos investigadores no entregarán las muestras a ninguna tercera parte, cumpliendo con esto privacidad y confidencialidad.

#### **Procedimiento**

- 1) Se extraerá una sola muestra de sangre la cual se realizará con material completamente descartable y desinfectado (estéril). Esta extracción constará de 4

- gotas de sangre, por lo que no produce ninguna complicación ni efectos secundarios, es dolorosa levemente en el sitio donde se extrajo.
- 2) Con éstas muestras se realizarán las pruebas del perfil inmune, las cuales se llevarán a cabo en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de medicina de la Universidad de San Carlos de Guatemala, lo que avala la calidad de las mismas.
  - 3) Esta muestra será enviada al laboratorio del Centro Universitario Metropolitano, Facultad de Medicina, Universidad de San Carlos de Guatemala, zona 11 Ciudad Capital. El procesamiento de la muestra dura 10 días hábiles y el resultado por escrito se enviará en 3 semanas.

### **Riesgos e incomodidades**

Los riesgos del estudio son casi nulos en la paciente, ya que solamente se obtendrá una muestra de sangre con material estéril y descartable.

### **Quienes pueden participar**

Mujeres mayores de 35 años, último papanicolaou negativo, sin tener cáncer de cérvix o antecedentes de cáncer cervical.

### **Beneficios potenciales**

Ya que se busca comparar el perfil inmunológico (defensa) de las pacientes con cáncer cervical y las pacientes sanas como es el caso de usted, se busca describir el perfil y las diferencias entre ambas muestras y dar una consejería dependiendo si el perfil puede favorecer o no a desarrollar cáncer, informando que si usted tiene un perfil que favorece al cáncer, se le indicaran a los médicos tomar medidas preventivas y/o controles periódicos más frecuentemente de lo usual.

### **Alternativas**

La única alternativa es no participar en el estudio. Al negarse a colaborar con el estudio no afecta la atención médica en la institución donde es tratada.

### **Costos financieros**

No hay gastos para usted por participar en este estudio.

**Dudas pueden realizarla con el investigador Rodrigo Javier Pinto.**

**Tel. 56463367**

***Si está interesada en participar favor leer y llenar la boleta que se le presenta a continuación. A las pacientes analfabetas se les leerá por el personal médico ó por algún familiar que le acompañe.***



**Anexo 2**



**CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Nombre de la paciente \_\_\_\_\_

Fecha \_\_\_\_\_ No de registro Médico \_\_\_\_\_

Institución a que pertenece \_\_\_\_\_

Con la firma de este documento, dejo constancia, yo \_\_\_\_\_, que he sido informada acerca del estudio que se realizará en las muestras que me tomaron previamente. He recibido además una copia de la información al paciente, sobre la investigación. El médico ha resuelto personalmente las dudas que he planteado con respecto a la investigación.

Además he sido informado del derecho que tengo de retirarme de este estudio, sin que afecte la atención médica dada por esta institución.

Autorizo al médico y equipo de investigación a recabar la información que requiere la ficha del estudio, manteniendo la confidencialidad de los datos. Acepto voluntaria y libremente participar en esta investigación.

\_\_\_\_\_  
Firma o huella paciente

\_\_\_\_\_  
Testigo/ enfermera(o) ò médico

No.

**INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS**

***“Estandarización de la técnica de RCPSARM que detecta los polimorfismos genéticos  $FNT\alpha$ , -308 y el polimorfismo IL-10, -1082 en muestras de pacientes con cáncer de cérvix y en pacientes sanas”***

Identificación de la muestra: \_\_\_\_\_

Edad del Paciente: \_\_\_\_\_

Papanicolaou negativo: Si \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_

Antecedentes Cáncer de Cérvix o lesiones invasivas (NIC I, II, III):

Si \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_

Genotipo  $TNF\alpha$ : \_\_\_\_\_

Genotipo IL- 10: \_\_\_\_\_

Imágenes No. \_\_\_\_\_

## Glosario

1. SARM: Sistema de amplificación refractario a las mutaciones. Sistema que es capaz de detectar polimorfismos de nucleótidos simples, a través de reacciones en cadena de polimerasa RCP y tres primers específicos, del polimorfismo que se está estudiando. Presenta algunas ventajas en comparación con otros métodos de RCP como son el caso de RFLPS y STRS.
2. ADN: (Ácido Desoxirribonucleico) secuencia de ácidos nucleídos que forma parte de todas las células, contenida dentro del núcleo de una célula, el ADN es toda la información genética usada para el desarrollo de funcionamiento de un organismo vivo.
3. RCP: Reacción en cadena de polimerasa; junto con otros reactivos es útil para amplificar una secuencia específica, millones de veces, que desea estudiar.
4. Polimorfismos de nucleótido Simples: Los PNS se definen como una variación en la secuencia de ADN que afecta a una sola base (adenina (A), timina (T), citosina (C) o guanina (G)) de una secuencia del genoma.
5. Primer: (cebador) secuencia de bases específicas para la determinación de polimorfismos.
6. Citocinas: ( Quimiocinas o citoquinas) Proteínas producidas por los linfocitos que son intercomunicadores celulares, que modulan la respuesta inmune e inflamatoria.
7. Perfil TH1: Grupo de citoquinas pro inflamatorias que suprime el perfil TH2, entre las cuales encontramos citoquinas como FNT alfa, IL-1, INF $\gamma$ , TFN  $\beta$  y la IL-2.
8. Perfil TH2: Grupo de citoquinas inmunoreguladoras que suprimen el perfil TH1, entre las cuales encontramos IL-4, IL-5, IL-6. IL-9, IL-10, IL-13. Se dice que estas citoquinas en especial IL-10 es inmunosupresora.