



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE MEDICINA

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS E INVESTIGACIÓN
TESIS

**“Determinación de la expresión y concentración
de Galectina-9, Interferón gamma e Interleucina 1 beta
en pacientes con cáncer cervicouterino”**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS E INVESTIGACIÓN

Presenta:

María de los Angeles González Ronquillo

Directoras de Tesis:

D.C. María Alicia Díaz y Orea

D.C. Verónica Vallejo Ruiz

Puebla, Pue.

Noviembre de 2019

DIRECTORAS DE TESIS

D.C. MARÍA ALICIA DÍAZ Y OREA

D.C. VERÓNICA VALLEJO RUIZ

**COORDINACIÓN DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS E
INVESTIGACIÓN**

COMITÉ TUTORAL

D.C. IRMA DEL CARMEN ZAMORA GINEZ

D.C. MARÍA LILIA CEDILLO RAMÍREZ

D.C. ROBERTO BERRA ROMANI

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá y hermanas que siempre han estado para apoyarme y lograr este objetivo.

A mis tutores, por sus invaluable aportaciones a este proyecto para poder ser concretado.

A todos los profesores que imparten la Maestría en Ciencias Médicas e Investigación, por la aportación de conocimientos durante el tiempo que duró la maestría.

A mis amigos y compañeros que conocí durante la maestría, ya que compartieron sus conocimientos para enriquecer mi tesis, y desde luego ampliar mi preparación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado con la beca número 629285 la cual tuvo vigencia de dos años, tal y como se estipula para la maestría perteneciente al Programa Nacional de Posgrados de Calidad de CONACYT.

Al apoyo recibido por CONACYT para financiar el análisis de Galectina-9, a través del proyecto No. 290058 del Fondo Sectorial de Investigación en Salud (FOSIS).

Al apoyo recibido por la BUAP para financiar el análisis de IFN- γ e IL1- β .

DEDICATORIA

A todas las pacientes con cáncer cervicouterino, que otorgaron el permiso para poder utilizar sus muestras en este y otros protocolos de investigación, con la finalidad de continuar en la ardua lucha del cáncer.

Gracias a todas aquellas mujeres, las que aún están, y también a las que ya partieron por causas de la enfermedad.

RESUMEN

Antecedentes. El cáncer cervicouterino (CaCu), es una enfermedad maligna, con una elevada incidencia en nuestro país, actualmente, esta malignidad puede pasar desapercibida, lo cual da lugar a que se detecte en estadios avanzados. Por lo anterior, es importante estudiar moléculas, como la Galectina-9 que puede estar involucrada en la progresión tumoral y en la metástasis. La expresión de Galectina-9 puede ser regulada por citocinas como el IFN- γ e IL1- β , citocinas de la respuesta inmunológica innata y adaptativa. En este estudio se determinó la expresión en tejido de Galectina-9, IFN- γ e IL1- β , y su concentración en suero de pacientes con CaCu.

Hasta el momento no se cuenta con estudios que reporten la expresión de Galectina-9, IFN- γ e IL1- β y su concentración en el suero de las tres proteínas en pacientes con CaCu. Con los resultados obtenidos se establecerá su expresión y concentración en los diferentes estadios de la enfermedad, así como su posible relación con el sistema inmunológico en los estadios estudiados.

Objetivo general. Determinar expresión y concentración de Galectina-9, IL1- β e IFN- γ en pacientes con cáncer cervicouterino.

Material y métodos. Estudio descriptivo, observacional, transversal, ambilectivo, homodémico, en el cual se incluyeron sueros y biopsias de pacientes con carcinoma escamoso de cérvix de mujeres con edades de 18 a 75 años. Las muestras se obtuvieron de la UMAE “Manuel Ávila Camacho” IMSS. Una vez que se otorgó el suero de las pacientes, se determinó la concentración de Galectina-9, IL1- β e IFN- γ por la técnica de ELISA. Posteriormente se solicitaron las biopsias incluidas en bloques de parafina, a las cuales se les determinó la expresión de las tres proteínas, por la técnica de inmunohistoquímica.

Resultados. Se estudiaron 20 sueros y 20 biopsias de pacientes con CaCu, con un rango de edad de 39 a 80 años. Los estadios más avanzados se detectaron entre las edades de 50 a 69 años y en las edades entre 30 a 49 años los estadios iniciales. La concentración media de Galectina-9 en el suero de las pacientes con CaCu fue de 4.36 ng/ml, D.E. 0.75 ng/ml, E.E. 0.17 ng/ml. En el caso de IL1- β la

media fue de 31.81 pg/ml, D.E. 41.65 ng/ml y E.E. 9.31 ng/ml y en el IFN- γ , una media de 59.50 ng/ml, D.E. 15.75 ng/ml y E.E. 3.52 ng/ml. No se obtuvieron diferencias significativas de la concentración de las proteínas con respecto al tipo histológico y estadio en pacientes con CaCu.

En cuanto a la determinación de la expresión de las proteínas en tejido, se procesaron 20 laminillas, de las cuales el 20% fue positiva para Galectina-9, el 10% fue positiva para IL1- β y 0% fue positiva para IFN- γ . Las biopsias positivas para Galectina-9 se expresaron con mayor positividad en estadio III y IV. Las biopsias positivas a IL1- β pertenecían a pacientes con edades de 69 y 70 años, ambas con cáncer epidermoide y distinto estadio. La expresión de IL 1- β se apreció a nivel de macrófagos. La expresión de IFN- γ fue negativa en las biopsias.

Conclusiones. Se determinó que Galectina-9, IL1- β e IFN- γ no se encuentran modulando la respuesta inmunológica en este tipo de cáncer.

Palabras clave. Cáncer cervicouterino, Galectina-9, IL1- β , IFN- γ , concentración, expresión.

ÍNDICE

Resumen

1. Antecedentes	1
1.1 Antecedentes generales	1
1.1.1 Definición de cáncer cervicouterino	1
1.1.2 Epidemiología del cáncer cervicouterino	1
1.1.2.1 Panorama mundial	1
1.1.2.2 México	2
1.1.3 Factores de riesgo asociados con cáncer cervicouterino	4
1.1.4 Clasificación de lesiones cervicales	4
1.1.5 Tipos, diagnóstico y estadificación del cáncer cervicouterino	4
1.1.6 Respuesta inmunológica al cáncer y microambiente tumoral	5
1.1.7 Galectinas	6
1.1.7.1 Galectina-9	8
1.1.8 Citocinas	10
1.1.8.1 Interferón gamma (IFN- γ)	10
1.1.8.2 Interleucina 1 beta (IL1- β)	11
1.2. Antecedentes específicos	12
2. Justificación	15
3. Planteamiento del problema y pregunta de investigación	16
4. Objetivos	16
4.1 Objetivo general	16
4.2 Objetivos específicos	17
5. Material y métodos	17
5.1 Diseño de estudio	17
5.2 Ubicación espacio-temporal	17
5.3 Universo de trabajo	17

5.4 Población de estudio	18
5.5 Tipo de muestreo	18
5.6 Tamaño de la muestra	18
5.7 Criterios de selección de la muestra	18
5.7.1 Criterios de inclusión	18
5.7.2 Criterios de exclusión	19
5.7.3 Criterios de eliminación	19
5.8 Definición de las variables y escalas de medición	19
5.8.1 Definición de las variables	19
5.8.2 Escalas de medición	20
5.9 Estrategia de trabajo	20
5.9.1 Método de recolección de datos	21
5.9.2 Técnicas y procedimientos	21
5.10 Análisis estadístico	22
6. Resultados	23
7. Discusión	44
8. Conclusiones	49
9. Perspectivas del estudio	49
10. Bibliografía	50
11. Anexos	56
11.1 Anexo 1. Sistema de clasificación BETHESDA	56
11.2 Anexo 2. Estadificación del cáncer cervicouterino	58
11.3 Anexo 3. Definición operacional y conceptual de las variables	59
11.4 Anexo 4. Escalas de medición de las variables	61
11.5 Anexo 5. Formato de consentimiento informado	63
11.6 Anexo 6. Bioética	67
11.7 Anexo 7. Descripción de las técnicas de medición	68
11.7.1 Técnica de ELISA	68
11.7.1.1 ELISA para detección de Galectina-9	68
11.7.1.2 ELISA para detección de Interleucina 1- β	70
11.7.1.3 ELISA para detección de Interferón- γ	72

11.7.2 Técnica de Inmunohistoquímica	74
11.7.2.1 Inmunohistoquímica para Interleucina 1- β	74
11.7.2.2 Inmunohistoquímica para Interferón - γ	77
11.7.2.3 Inmunohistoquímica para Galectina-9	79
11.8 Anexo 8. Formato de concentración de datos	82
11.9 Anexo 9. Logística	83

LISTA DE CUADROS

Tabla 1. Concentración de Galectina-9, IL1- β e IFN- γ obtenida en el suero de pacientes con CaCu. Se muestra la Media, Desviación Estándar y Error Estándar.....	25
Tabla 2. Comparación de las concentraciones de Galectina-9, IL1- β e IFN- γ entre los distintos tipos histológicos. Se muestra la Media \pm EE.....	25
Tabla 3. Comparación de las concentraciones de Galectina-9, IL1- β e IFN- γ entre los estadios de CaCu. Se muestra la Media \pm EE.....	26
Tabla 4. Concentraciones de Galectina-9, IL1- β e IFN- γ y características de las pacientes con CaCu.....	27
Tabla 5. Expresión de Galectina-9 y concentración de las proteínas en pacientes con CaCu.....	29
Tabla 6. Expresión de IL 1- β y concentración de las proteínas en pacientes con CaCu.....	33
Tabla 7. Expresión de IFN- γ y concentración de las proteínas en pacientes con CaCu.....	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia de cáncer a nivel Internacional en el sexo femenino.....	2
Figura 2. Incidencia de cáncer en México en 2018, sexo femenino, todas las edades.....	3
Figura 3. Escape inmune tumoral.....	10
Figura 4. Distribución del tipo histológico en pacientes con CaCu.....	23
Figura 5. Número de pacientes por rango de edad y estadio de CaCu.....	24
Figura 6. Expresión de Galectina-9 positiva (40X).....	30
Figura 7. Expresión de Galectina-9 positiva (40X).....	31
Figura 8. Expresión de Galectina-9 positiva (40X).....	31
Figura 9. Expresión de Galectina-9 positiva (40X).....	32

Figura 10. Expresión de IL 1- β positiva (40X).....	34
Figura 11. Expresión de IL 1- β positiva (40X).....	35
Figura 12. Correlación entre la concentración de Galectina-9 e Interleucina 1- β ...	37
Figura 13. Correlación entre la concentración de Galectina-9 e Interferón- γ	38
Figura 14. Concentraciones séricas de Galectina-9 e Interleucina 1- β en pacientes con cáncer cervicouterino.....	39
Figura 15. Concentraciones séricas de Galectina-9 e Interferón- γ en pacientes con cáncer cervicouterino.....	40
Figura 16. Concentraciones séricas de Interleucina 1- β e Interferón- γ en pacientes con cáncer cervicouterino.....	41
Figura 17. Concentración sérica de Galectin-9 y edad en pacientes con cáncer cervicouterino.....	42
Figura 18. Concentración sérica de Interleucina 1- β e Interferón- γ y edad en pacientes con cáncer cervicouterino.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero

BUAP: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

CaCu: Cáncer Cervicouterino

CEVU: Células Endoteliales de la Vena Umbilical

CIBIOR: Centro de Investigación Biomédica de Oriente

CMH: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

CMN: Centro Médico Nacional

DRC: Dominio de Reconocimiento de Carbohidratos

ELISA: Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas

FM: Facultad de Medicina

FNT: Factor de Necrosis Tumoral

HU: Hospital Universitario
IFI: Inmunofluorescencia Indirecta
IFN: interferón
IFN- γ : interferón gamma
IL1- β : interleucina 1 beta
IMSS: Instituto Mexicano del Seguro Social
HE: Hospital de Especialidades
HLA: Antígenos Leucocitarios Humanos
LIEAG: Lesión Intraepitelial Escamosa de Alto Grado
LIE: Lesión Intraepitelial Cervical
LEIBG: Lesión Intraepitelial Escamosa de Bajo Grado
MAC: Manuel Ávila Camacho
 μ M: micrómetros
ml: mililitros
NK: Natural Killer
OMS: Organización Mundial de la Salud
pg: picogramos
SB: Sistema Bethesda
THP-1: Línea Celular Monocítica
UMAE: Unidad Médica de Alta Especialidad
VHS-2: Virus Herpes Simple tipo 2.
VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana.
VPH: Virus del Papiloma Humano.

1. ANTECEDENTES

1.1 ANTECEDENTES GENERALES

1.1.1 DEFINICION DE CÁNCER CERVICOUTERINO.

El Cáncer Cervicouterino (CaCu) es una enfermedad maligna caracterizada por un crecimiento descontrolado y diseminado de células anormales en el cuello del útero, en caso de no detectarse y tratarse a tiempo puede conducir a la muerte (1). La parte del cuello uterino más cercana al cuerpo del útero se llama endocérvix. La parte próxima a la vagina, es el exocérvix (o ectocérvix). Los dos tipos principales de células que cubren el cuello del útero son células escamosas (en el exocérvix) y las células glandulares (en el endocérvix). El punto en el que estos tipos de células se encuentran se llama zona de transformación, en esta zona se origina la mayoría de los cánceres de cuello uterino (2).

1.1.2 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER CERVICOUTERINO

1.1.2.1 PANORAMA MUNDIAL

El CaCu, de acuerdo a las últimas estadísticas del GLOBOCAN 2018, se ubica como el cuarto cáncer más frecuentemente diagnosticado (Figura 1), con un estimado de 570 000 casos y 311 000 muertes en el año 2018 a nivel mundial. El CaCu representa la cuarta causa de muerte por cáncer en las mujeres (3).

En el 2018, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó que las tasas con mayor incidencia por CaCu se presentaron en África del Sur y Sureste de Asia, con una tasa de incidencia de 43.1 y 17.2 x 100 000 mujeres, respectivamente (3).

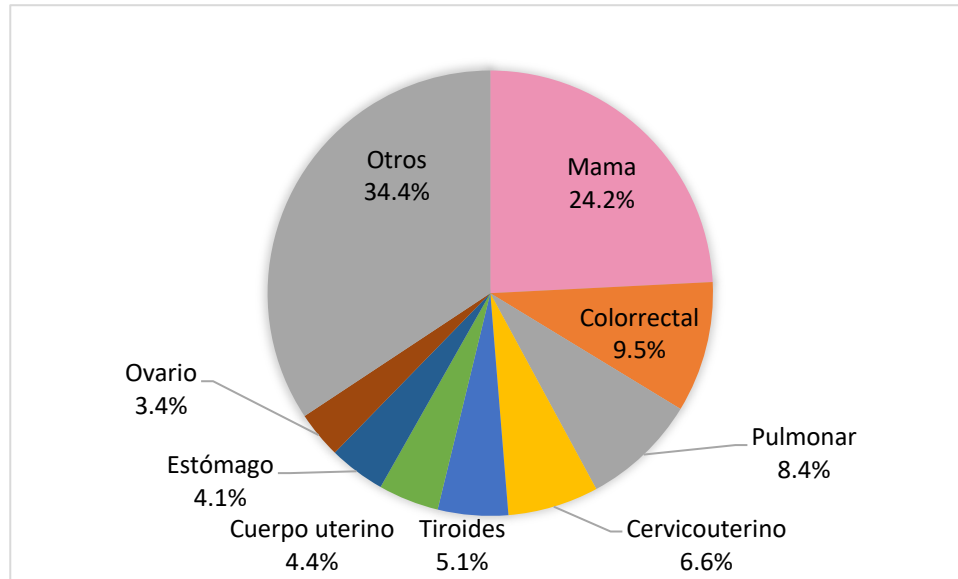


Figura 1. Incidencia de cáncer a nivel internacional en el sexo femenino. Gráfica modificada de Global Cancer Statistics (5).

1.1.2.2 MÉXICO

En México, de acuerdo al reporte del GLOBOCAN 2018, el CaCu ocupa el tercer lugar en incidencia, el cáncer de mama el primer lugar y el de tiroides el segundo (figura 2) (4); comparándolo con el reporté del GLOBOCAN 2012, que situó al CaCu en el segundo lugar en incidencia (5). Actualmente, México tiene una tasa de incidencia de 10.3-14.7 por cada 100 000 habitantes y una tasa de mortalidad de 4.4-7.1 por cada 100 000 habitantes, lo cual coloca al CaCu en segundo lugar de mortalidad por casos de cáncer en el sexo femenino (4).

En el año 2014 se reportaron 259,146 defunciones, de las cuales los tumores malignos representaron el 14.6% de las muertes en mujeres (38,046). El cáncer de mama y el CaCu ocasionaron en conjunto el 26% de todas las defunciones por cáncer en mujeres (6).

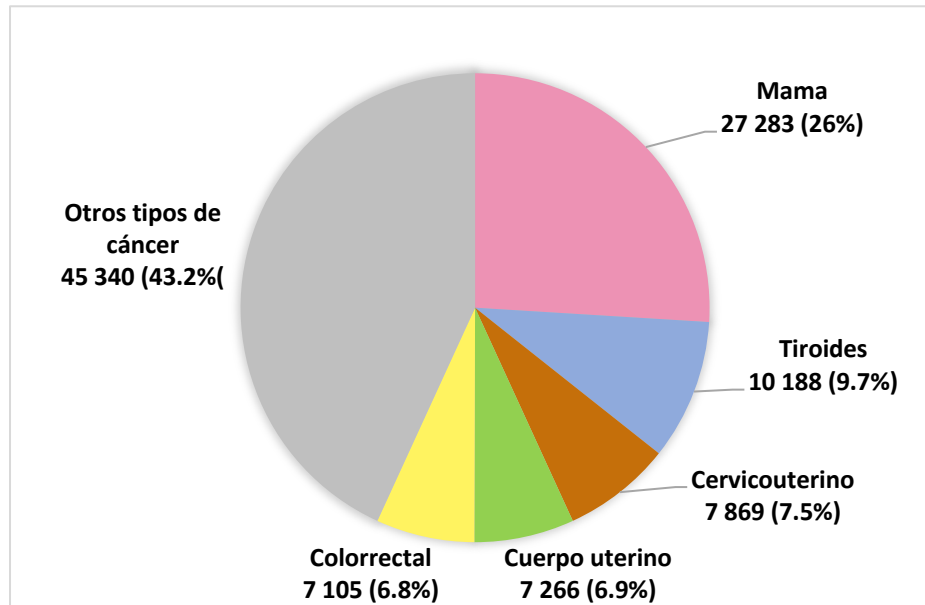


Figura 1. Incidencia de cáncer en México en 2018, sexo femenino, todas las edades. Gráfica modificada de International Agency for Research on Cancer, Globocan 2018.

En el año 2013, en el grupo de mujeres de 25 años y más, se registraron 3771 defunciones por CaCu con una tasa cruda de 11.3 defunciones por 100,000 mujeres (7).

La edad representa un factor de riesgo para el desarrollo de CaCu, mostrando un incremento a partir de los 35 años, siendo el grupo de 50 a 59 años de edad quien registra el mayor porcentaje con alrededor del 30% de todos los casos registrados para el año 2014; la edad promedio de presentación de CaCu es de 49.2 años (6).

En el 2013, las entidades con mayor mortalidad por CaCu fueron: Morelos (18.6), Chiapas (17.2), Veracruz (16.4), Sonora (15.9), Guerrero (14.1), Oaxaca (13.4) y Michoacán (12.9) (6). Durante el mismo año, el estado de Puebla registró una tasa de defunción de 12.7 por 100,000 mujeres de 25 años y más, ocupando el octavo lugar a nivel nacional en esta patología (7).

1.1.3 FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS CON CÁNCER CERVICOUTERINO

Para algunos tipos de cáncer, las causas que dan origen a su desarrollo permanecen desconocidas (1). Diversos estudios epidemiológicos, moleculares y experimentales han demostrado que el Virus del Papiloma Humano (VPH) es el agente etiológico del CaCu (8).

Los cofactores asociados con el desarrollo de CaCu, además de la infección por VPH, se pueden clasificar en tres grupos: (1) cofactores ambientales o exógenos, como uso de anticonceptivos orales (AO), tabaquismo, dieta, traumatismo cervical, coinfección con virus de la inmunodeficiencia humana (VIH); (2) cofactores virales, tales como el VPH y su coinfección con otros tipos de virus o variantes de VPH, carga viral; (3) cofactores del huésped, como factores hormonales, factores genéticos como el antígeno leucocitario humano y los relacionados con la respuesta inmunológica del huésped (9).

1.1.4 CLASIFICACIÓN DE LESIONES CERVICALES

En Estados Unidos y en México se emplea el Sistema Bethesda (SB) para el informe de los resultados de la prueba de Papanicolaou (10), la cual es una técnica de tinción que se lleva a cabo en las células obtenidas del cuello uterino, con el fin de observarlas al microscopio y así detectar si hay alteraciones celulares que indiquen una alteración premaligna o maligna (2).

La clasificación del Sistema Bethesda para el reporte de lesiones intraepiteliales se describe en el Anexo 1 (10).

1.1.5 TIPOS, DIAGNÓSTICO Y ESTADIFICACIÓN DEL CÁNCER CERVICOUTERINO

Existen dos tipos principales de CaCu: el carcinoma de células escamosas y el adenocarcinoma. El carcinoma de células escamosas se origina en las células del exocérnix y representa el 70% de todos los tipos de cáncer de cuello uterino. El adenocarcinoma se origina en las células glandulares del endocérnix y abarca el 25% de los tipos de cáncer (2,11).

Esta neoplasia se diagnóstica a través del estudio histopatológico mediante una biopsia dirigida, ya sea mediante colposcopia en caso de observarse una lesión o mediante toma directa si existe tumor visible (12).

El sistema de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) clasifica el cáncer de cuello uterino tomando en cuenta tres factores: el tamaño o el alcance del cáncer (T), si el cáncer se ha propagado a los ganglios (nódulos) linfáticos (N), y si se ha propagado a partes distantes (M) (2). La estadificación continúa siendo clínica, utilizando la última modificación de la FIGO en el año 2009, (Anexo 2) (12,13).

1.1.6 RESPUESTA INMUNOLÓGICA AL CÁNCER Y MICROAMBIENTE TUMORAL

Entre las funciones del sistema inmunológico, además de proteger al hospedero de patógenos, es reconocer y eliminar células disfuncionales a través de un proceso llamado inmuno-supervivencia. Tanto las infecciones virales como el cáncer, tienden a evadir al sistema inmunológico para evitar su detección. Entre los mecanismos de evasión tenemos: la inhibición de las células Natural Killer (NK), de las células dendríticas, y de los macrófagos, lo que lleva a interrupción de la presentación de los antígenos tumorales por células presentadoras de antígeno y a la creación de un microambiente tumoral inmunosupresor (14).

Las vías del sistema inmune innato y de la supresión tumoral comparten algunas similitudes, tales como, la inducción de la expresión de Interferón (INF) por receptores de reconocimiento a infecciones virales o por el daño molecular asociado al cáncer; la activación de receptores del Factor de Necrosis Tumoral (FNT) y subsecuente apoptosis de las células neoplásicas o infectadas. Sin embargo, la evasión de estas vías por una infección viral como la del VPH representa un riesgo elevado para que la célula infectada experimente una transformación maligna (14). Por otra parte, este virus expresa las proteínas E6 y E7 que respectivamente, son capaces de bloquear a las proteínas reguladoras del ciclo celular p53 y Rb, evadiendo la muerte por apoptosis dando lugar a alteraciones en el crecimiento normal y diferenciación del epitelio cervical, seguidas de una acumulación de

errores genéticos (clastogénesis) considerados la base de la transformación tumoral (15).

Se considera que el reconocimiento de células tumorales por el sistema inmunitario y el establecimiento de las mismas ocurre en tres fases. **Fase I, eliminación:** el sistema inmunitario reconoce células cancerosas por medio de sus antígenos tumorales y las establece como objetivo para su destrucción. En el proceso, algunas células adquieren mutaciones que les permiten resistir a la destrucción inmunitaria. **Fase II, equilibrio:** persisten cifras bajas de células anormales, pero la respuesta inmunitaria adaptativa mantiene a raya su proliferación y diseminación. **Fase III, escape:** las mutaciones adicionales en las células tumorales sobrevivientes, favorece su capacidad para el crecimiento inmortal y la metástasis (16).

Se han descrito diversos mecanismos involucrados en el escape inmunológico, entre estos se mencionan: a) alteraciones en la presentación del antígeno; b) activación de señales coestimuladoras negativas, también llamados puntos inhibitorios inmunológicos, los cuales incluyen Antígeno-4 asociado al Linfocito T citotóxico (CTLA-4), ligando 1 de muerte programada (PD-L1), gen de activación linfocítica-3 (LAG-3) y mucina 3-inmunoglobulina del linfocito T (TIM-3); y c) elaboración de variedad de factores inmunosupresores, tales como factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), interleucina (IL)-10, e indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) (17).

Aunado a lo anterior, existen proteínas como las galectinas que han sido implicadas en el control o desarrollo del cáncer. Las galectinas en diversas enfermedades malignas han sido ampliamente estudiadas, hasta el momento se conoce que las funciones de estas proteínas son distintas en cada tipo de cáncer y esto hace complejo su estudio (18).

1.1.7 GALECTINAS

Las Galectinas son una familia de proteínas (19) que reconocen glicanos, fueron aisladas por primera vez en 1976 del tejido muscular de pollo y ternera. Han sido nombradas en orden de su descubrimiento (18), siendo 19 tipos identificados

hasta el momento (20). Galectina-1, -2, -3, -4, -5, -7, -8, -9, -10, -12, -13 y -14 se encuentran presentes en humanos (18).

Estas proteínas son conocidas por su capacidad para unirse a azúcares β -galactósidos, unidos tanto en O-glicanos como en N-glicanos. Las funciones biológicas de una Galectina particular son distintas según el tejido donde se exprese y la disponibilidad de ligando (21). Cada Galectina tiene un Dominio de Reconocimiento de Carbohidratos (DRC) (22) y son clasificadas de acuerdo al número y estructura de este DRC, lo cual ha sido utilizado para dividir las en: prototipo, quimera y repetición en tándem (18). Las Galectinas tipo tándem se caracterizan por la presencia de dos DRC homólogos (22,23), estos DRC están conectados por un pequeño péptido de enlace (24), siendo las Galectinas -4, -5, -8, -9 y -12 las que componen este grupo (18).

Las Galectinas modulan diversas vías de señalización tanto a nivel extracelular como a nivel intracelular. Cuando se encuentra fuera de las células puede interactuar con moléculas de la superficie celular, como glicoproteínas y glicolípidos (24). A este nivel, las galectinas interactúan con receptores glicosilados por medio de interacciones proteína-glicanos y proteína-proteína (23). A nivel intracelular modulan vías de señalización mediante la interacción con proteínas nucleares y citoplásmicas (24). Por otra parte, regulan la supervivencia de linfocitos y su actividad, e incluso interactúan con la maquinaria de *splicing* (corte y ensamblado) del ácido ribonucleico (ARN) (23).

En el momento en que ocurre la unión de una Galectina con un glicolípido o glicoproteína que contiene beta-galactósidos de la membrana plasmática, las balsas lipídicas se agrupan, lo que favorece el recambio de receptores endocíticos, la señalización de vías de transducción, la maduración y la activación de linfocitos y neutrófilos, y la apoptosis. Estos procesos conducen a fagocitosis, estallamiento oxidativo y liberación de proteasas (21).

En general, las Galectinas juegan un papel modulador en la adhesión, proliferación celular, apoptosis, quimioatracción e inmunomodulación de la inflamación (24), y a nivel oncológico tienen un papel fundamental en la progresión o control del cáncer (21).

1.1.7.1 GALECTINA-9

La Galectina-9 está formada por un DRC N-terminal de 148 aminoácidos y un DRC C-terminal de 149 aminoácidos (25).

Estudios recientes han indicado que el DRC C-terminal de Galectina-9 es el determinante primario del reconocimiento del receptor y la señalización en la destrucción de las células T. Por otra parte, el DRC N-terminal ha presentado mayor efectividad en la activación de células dendríticas (26,27).

A nivel inmunológico, Galectina-9 ha sido identificada como un potente quimioatrayente de eosinófilos producido por células T (28), y juega un papel importante en la respuesta inmune y reacciones alérgicas (21). Además, cuenta con un papel multifacético en el desarrollo y homeostasis de las células T (25):

- Se encuentra involucrada en la selección tímica de células T.
- Promueve la diferenciación de las células T nativas en células T reguladoras (Tregs) mediante la potenciación de la expresión de Foxp3, el marcador responsable para la diferenciación de células T reguladoras.
- Induce apoptosis de células T maduras diferenciadas vía TIM-3 en CD4⁺ T cooperadoras 1 (Th1) y células Th 17, y en menor medida en células T citotóxicas CD8⁺/TIM-3⁺ (25,29)(Fig.3).

El efecto de Galectina-9 sobre las células T activadas es dependiente de la concentración. A concentraciones más altas, Galectina-9 induce la apoptosis de las células T activadas (CD8⁺ y CD4⁺), pero en concentraciones menores incrementa la producción de citocinas por activación de células T (30).

Galectina-9 a nivel oncológico exhibe características pro y antitumorales, esto dependerá de su concentración, del tipo de tumor en el que se exprese y del grado de progresión de la enfermedad (30). Los efectos que se han estudiado en relación al cáncer son los siguientes:

1. Transformación celular. A nivel oncológico existe una correlación negativa entre la expresión de Galectina-9 y transformación maligna (30). En cáncer de cérvix, la disminución en su expresión se asocia con un menor grado de diferenciación del tumor (31).

2.Apoptosis. El efecto pro-apoptótico de Galectina 9 es dependiente de la presencia de β -galactósido y la señalización parece ocurrir a través de NF- κ B y la vía calcio-calpain-caspasa-1 en células T (32) esto a su vez dependerá de sus ligandos y del tipo celular (30), como es el caso con el ligando TIM-3 (29).

3.Adhesión, migración y metástasis. Galectina-9 se encuentra involucrada con la matriz celular, lo que lleva a regulación de la adhesión y metástasis (32). Suprime el desprendimiento de células tumorales de sitios primarios y su adhesión a la matriz extracelular (MEC). La agregación celular incrementa con niveles elevados de Galectina-9, mientras que disminuye con concentraciones bajas de Galectina-9. Las lesiones metastásicas presentan baja o nula expresión de Galectina-9 (30). En relación al carcinoma de cérvix de alto grado se han reportado niveles muy bajos (25).

4.Escape inmunológico tumoral. Galectina-9 ha sido caracterizada como un quimioatrayente de eosinófilos (32) y estos han sido asociados con actividad anti-tumoral (30), consecuentemente la presencia de estas células inmunológicas se encuentran asociadas con buen pronóstico (32).

Por otra parte, también se ha demostrado que Galectina-9 induce apoptosis en células inmunológicas como células T CD4⁺ cooperadoras tipo 1 (Th1) y células T CD8⁺ citotóxicas (Tc) (32). Para que Galectina-9 induzca la apoptosis de células CD8⁺ requiere del ligando TIM-3, el cual ha sido caracterizado (30). Por otra parte, este ligando da lugar a células fatigadas, las cuales tienen la capacidad de reconocer antígenos, pero no llevan a cabo la actividad habitual que es la expresión de IFN- γ , esto se ha asociado con la molécula de muerte programada y su ligando (PD-L1) (29) del cual se desconoce la regulación de su expresión (33) (Figura 3).

5. Angiogénesis. A este nivel se especula que Galectina-9 atrae eosinófilos e incrementa las células dendríticas (30), lo cual libera factores de crecimiento angiogénico como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (32).

Tomando en cuenta lo anterior, se puede concluir que la expresión de Galectina-9 inhibe la progresión del cáncer (21) y se encuentra inversamente asociada con diferenciación celular y mayor malignidad en el cáncer de cérvix (18).

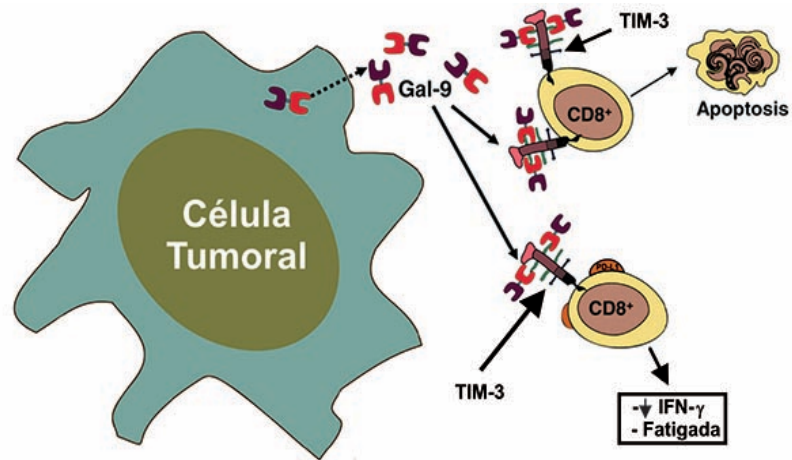


Figura 2. Escape inmune tumoral. Se aprecia la célula tumoral y expresión de Galectina-9, la cual a través del ligando TIM-3 lleva a apoptosis de linfocitos T CD8⁺. Figura modificada de Cedeno y Dimitroff (29)

1.1.8 CITOCINAS

1.1.8.1 INTERFERÓN GAMMA (IFN- γ)

Los IFNs son de tipo 1 (IFN- α , IFN- β) y tipo 2 (IFN- γ) (34). El IFN- γ cuenta con dos receptores, el receptor 1 de interferón- γ (IFNGR1) y el receptor 2 de interferón- γ (IFNGR2) (35). Una de las vías, a través de las cuales actúan los IFNs es a través de la Janus-cinasas-transductores de la señal y activadores de la transcripción (Jak-STAT) (34).

El IFN- γ se encuentra implicado en la respuesta inmune adaptativa y es producido por linfocitos Th1, Tc y por células NK. Además de su efecto antiviral posee una importante actividad inmunomoduladora. Incrementa la expresión de antígenos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) clase I (CMH-I) y clase II (CMHII) en varios tipos celulares (36), lo que facilita su función presentadora de Ag y activación de los macrófagos, incrementando así su capacidad de defensa contra las infecciones (37).

El IFN- γ al actuar sobre las células NK, aumenta su actividad citolítica e incrementa su efecto antitumoral (37). A nivel oncológico los linfocitos y el IFN - γ colaboran para proteger contra el desarrollo de sarcomas inducidos por carcinógenos y carcinomas epiteliales espontáneos, así como para seleccionar células tumorales con inmunogenicidad reducida. Se ha demostrado que el IFN - γ controla la inmunogenicidad de las células tumorales, posiblemente como resultado de su selección en el microambiente tumoral (38).

Imaizumi et al en el año 2002 reportaron que IFN- γ estimuló la expresión de Galectina-9 en Células Endoteliales de la Vena Umbilical (CEVU). Se reportó que Galectina-9 puede jugar algún papel fisiológico sobre la superficie de la membrana en las células endoteliales vasculares, ya que se ha visto que CEVU estimuladas con IFN- γ presentan una mayor adhesión de los eosinófilos EoL-1, que es inhibida cuando se incuba con un anticuerpo antigalectina. El estudio concluyó que Galectina-9 es producida por células endoteliales estimuladas con IFN- γ y es expresada en el endotelio de lesiones inflamatorias (39).

Si bien, los mecanismos de regulación de Galectina-9 sobre la apoptosis y proliferación no se entienden completamente, sí influyen en los efectos diferenciales de Galectina-9 en la proliferación frente a apoptosis de las células cancerosas, como en el caso de las células endoteliales, donde el IFN- γ detiene el ciclo y la proliferación celular (30).

1.1.8.2 INTERLEUCINA 1 BETA (IL-1 β)

La **interleucina 1 (IL-1)** es un mediador inflamatorio y componente importante de la inmunidad innata y adaptativa (40). La IL-1 β es producida por células presentadoras de antígeno (41). Existen dos formas, IL1 alfa (α) e IL1 beta (β), ambas comparten el mismo receptor y ejercen efectos biológicos similares (14). Una vez que la interleucina se une al receptor de la membrana celular, la señal es transferida al núcleo, donde los genes son activados. Esto es paralelo a la modulación de los mecanismos de defensa locales y sistémicos (42).

En el microambiente tumoral, la IL1- β es expresada por células mieloides tales como células dendríticas, macrófagos, monocitos, y neutrófilos, además de diversas células epiteliales (40). La IL1- β , participa en estimular la producción de IL-17 y la generación de células T $\gamma\delta$ antitumorales, las cuales producen IFN- γ , citocinas y favorecen la inmunidad mediada por linfocitos T CD8⁺ (41).

Se ha considerado que la IL1- β tiene efectos sobre la angiogénesis y proliferación celular (42), lo cual facilita el crecimiento tumoral (41). También se ha demostrado que la expresión de IL1 en el sitio de desarrollo tumoral favorece la expresión en las células endoteliales de moléculas de adhesión y tumorales, lo que facilita la invasión de células malignas en la circulación y su diseminación a tejidos lejanos, lo que conocemos como metástasis (43). Al mismo tiempo, se ha reportado que puede desempeñar un papel positivo al activar el sistema inmune y mejorar el reconocimiento y la inmunogenicidad del tumor liberador de IL1, seguido de la activación de la respuesta inmune antitumoral (40).

1.2 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

Matsumoto y cols., en el 2002, reportaron que Galectina-9 exhibe diversas actividades biológicas tales como quimioatracción, agregación celular, inducción de producción de superóxido y aumento en la supervivencia de eosinófilos (44).

Matsuura y cols., en el 2009 realizaron un estudio in vitro en el que se examinó la expresión del ARNm de citocinas inflamatorias tales como IL1- α e IL1- β en monocitos THP-1 (línea celular monocítica) transfectadas transitoriamente con un vector de expresión que contiene el marco de lectura para Galectina-9. Encontraron que los niveles de ARNm de las citocinas (IL1- α , IL1 - β) aumentan. La expresión de Galectina-9 aumentó la actividad de los promotores de genes de IL1- α , IL1- β e INF- γ , lo que sugiere que Galectina-9 intracelular puede inducir genes de citocinas inflamatorias en monocitos (24).

Thijssen y cols., en el 2015, hicieron mención de que en algunos tipos de cáncer Galectina-9 se reporta con expresión disminuida, mientras que otros estudios encuentran un aumento en su expresión, como en cáncer oral, pancreático y linfoma de Hodgkin. Por lo que se requiere profundizar en estudios para comprender el papel de Galectina-9 en la transformación maligna en diferentes tipos de cáncer (45).

Yamauchi A. y cols., en el 2005, evaluaron la expresión de Galectina-9 por técnica de inmunohistoquímica en tejido tumoral de 84 pacientes con cáncer de mama. A las pacientes se les dio seguimiento durante 14 años. Cuarenta y dos tumores de las 84 pacientes fueron positivos a Galectina-9, 19 de 21 pacientes con metástasis a distancia fueron negativos a Galectina-9. La supervivencia libre de enfermedad para pacientes positivos a Galectina-9 fue más favorable, que para el grupo negativo a Galectina-9 ($p < 0.001$). Además, la expresión de Galectina-9 cambió de acuerdo al grado de diferenciación, y tumores poco diferenciados con baja expresión de Galectina-9, exhibieron mayor potencial metastásico (46).

Choi SI y cols., en 2017, examinaron la expresión de Galectina-9 por técnica de inmunohistoquímica en 619 pacientes con cáncer gástrico sometidos a gastrectomía. De 619 pacientes, Galectina-9 se expresó en 327 (52.8%) y fue negativa en 292 pacientes. Se encontraron diferencias significativas con respecto al sexo, diagnóstico, tamaño del tumor, profundidad de invasión, metástasis a ganglios linfáticos y estadio posoperatorio. Los tumores negativos a Galectina-9, se asociaron con elevación en el estadio T y N. Las curvas de supervivencia de enfermedad mostraron que el grupo positivo a Galectina-9 tenían una mortalidad más baja comparada con el grupo negativo a Galectina-9 ($p < 0.001$) (47).

Liang M. y cols., en el 2008, determinaron la concentración de Galectina-9 en suero por medio de la técnica de ELISA en 29 pacientes con CaCu, 45 con Lesión Intraepitelial Escamosa (LIE) y 26 con epitelio normal. Se obtuvo una concentración de Galectina-9 en pacientes con CaCu de 27.15 ng/L, en pacientes con LIE de 21.20

ng/L y en mujeres sanas en 7.43 ng/L. Se realizaron ensayos inmunohistoquímicos para detectar la expresión de Galectina-9 en tejido tumoral en cuatro biopsias, dos de las pacientes con concentración más alta de Galectina-9 en suero mostraron una expresión elevada de Galectina-9. y las otras dos reportaron inmunotinción moderada. Lo anterior sugirió, que parte del suero de Galectina-9 podría ser producido por tejido del cáncer de cérvix (48).

Liang M. y cols., en el 2008, evaluaron la expresión en tejido de Galectina-9 y E-cadherina a través de inmunohistoquímica en 23 muestras con epitelio escamoso normal, 17 con Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) y 38 con Carcinoma de Células Escamosas (CCE). Debido a que E-cadherina participa en la adhesión célula-célula en el epitelio y que la adhesión está involucrada en la transformación maligna, fue importante establecer la correlación entre Galectina-9 y E-Cadherina. En las muestras con NIC y CCE, la tinción de Galectina-9 fue significativamente más baja con respecto al epitelio normal. La expresión de E-cadherina en NIC y CCE fue también significativamente más bajas que en el epitelio normal. La expresión de Galectina-9 y E-cadherina en LIEAG (Lesión Intraepitelial Escamosa de Alto Grado) fue significativamente más baja que en LIEB (Lesión Intraepitelial Escamosa de Bajo Grado), indicando que la disminución en la expresión de ambas proteínas puede ligarse al incremento del potencial maligno. Estableciendo que la pérdida de E-cadherina ha sido involucrada en la transformación maligna (31).

Punt S. y cols., en el 2015, evaluaron la expresión de Galectina-1, -3 y -9 y la asociación con parámetros clínico-patológicos en cáncer de cérvix. Empleando la técnica de inmunofluorescencia se procesaron 160 muestras de CCE. Galectina-9 sólo se expresó en el 11% de las biopsias. Galectina-1 se expresó en el estroma y Galectina-3 en el epitelio. Galectina-1, -3 y -9, presentaron baja expresión en las células del endotelio. La alta expresión de Galectina-1 se correlacionó significativamente con pobre supervivencia libre de enfermedad. La expresión de Galectina-9 mostró tendencia hacia mejorar la supervivencia, pero no fue significativa (49).

2. JUSTIFICACIÓN

El CaCu continúa siendo un problema primordial de la salud pública por su elevada morbimortalidad a nivel mundial y en nuestro país. En México, el CaCu ocupa el tercer lugar en incidencia con una tasa de 11 x 100 000 mujeres. A nivel internacional se encuentra en el 4^o lugar en incidencia y mortalidad de casos de cáncer en el sexo femenino.

Se tiene el conocimiento de que un proceso inflamatorio puede asociarse con el desarrollo o progresión del cáncer. Sin embargo, se cuenta con limitada información en cuanto al comportamiento del mecanismo inmunológico y la participación en el cáncer de la Galectina-9, la IL1- β y el IFN- γ en pacientes con CaCu.

Los resultados obtenidos en esta investigación nos permitirán determinar tanto la expresión de Galectina-9, IFN- γ e IL1- β en el tejido de las pacientes con CaCu y su concentración en el suero de las mismas pacientes. Se establecerá su expresión y concentración en las pacientes con CaCu, evaluando si podrían existir cambios que se relacionen con el estado inmunológico de las pacientes o con estadio de la enfermedad.

Actualmente se cuenta con métodos de tamizaje para la detección oportuna del CaCu, sin embargo, no ha sido suficiente para lograr disminuir de manera contundente la incidencia de la enfermedad y en un alto número de casos el diagnóstico se realiza en estadios avanzados. De aquí que se requiere profundizar en el conocimiento de alteraciones moleculares e inmunológicas asociadas con el desarrollo de esta malignidad, con el fin de proponer métodos diagnósticos más sensibles, que nos permitan además establecer el pronóstico de la enfermedad, así como proponer blancos terapéuticos.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se tiene conocimiento de que un proceso inflamatorio crónico se asocia con el desarrollo o progresión del cáncer. Al mismo tiempo, un proceso oncológico genera mecanismos de evasión inmunológica, lo cual limita la activación de la respuesta inmune innata y adaptativa.

Galectina-9 es una proteína que ha sido estudiada en diferentes tipos de cáncer. A nivel oncológico exhibe características pro y antitumorales lo cual depende de su concentración y el tipo de tumor en el que se exprese. Por otra parte, estudios *in vitro* han reportado que el IFN- γ estimula la expresión de Galectina-9 y a su vez Galectina-9 induce la expresión de citocinas como IFN- γ e IL1- β , asociándose esta última con metástasis e invasión tumoral. Todo lo anterior orienta a que el estudio de Galectina-9 y las interleucinas sea complejo en los procesos oncológicos.

De acuerdo a lo mencionado, surge la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuáles son los niveles de expresión y concentración de Galectina-9, IL1- β e IFN- γ en pacientes con cáncer cervicouterino?

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar expresión y concentración de Galectina-9, IL1- β e IFN- γ en pacientes con cáncer cervicouterino.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Medir la concentración de Galectina-9 en suero de pacientes con CaCu.
2. Medir la concentración de IL1- β en suero de pacientes con CaCu.
3. Medir la concentración de IFN- γ en suero de pacientes con CaCu.
4. Determinar expresión de Galectina-9 en biopsias de pacientes con CaCu.
5. Determinar expresión de IL1- β en biopsias de pacientes con CaCu.
6. Determinar expresión de IFN- γ en biopsias de pacientes con CaCu.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 DISEÑO DE ESTUDIO

Es un estudio descriptivo, observacional, transversal, ambilectivo y homodémico.

5.2 UBICACIÓN ESPACIO-TEMPORAL

El estudio se llevó a cabo en las instalaciones de la Facultad de Medicina (FM) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), y en el Centro de Investigación Biomédica de Oriente (CIBIOR) IMSS; en el periodo comprendido entre agosto de 2017 y julio de 2018.

5.3 UNIVERSO DE TRABAJO

El universo de trabajo estuvo conformado por pacientes del Servicio de Radio-Oncología de la UMAE-HE-CMN-MAC-IMSS-Puebla.

5.4 POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población de estudio fueron pacientes del servicio de Radio-Oncología de la UMAE-HE-CMN-MAC-IMSS, con diagnóstico de CaCu que cumplieron con los criterios de selección para ingresar al protocolo de estudio que lleva como nombre “Expresión de Galectina-9 en cáncer cervicouterino: marcador predictivo de respuesta al tratamiento y supervivencia” y que cuenta con el número de registro R-2017-785-119, en el cual se tiene el consentimiento de utilizar las muestras en otros estudios.

5.5 TIPO DE MUESTREO

No probabilístico.

5.6 TAMAÑO DE LA MUESTRA

A conveniencia.

5.7 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LA MUESTRA

5.7.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Pacientes que firmen el Formato de Consentimiento Informado.
- Pacientes mayores de 18 años con recién diagnóstico de CaCu.
- Pacientes con diagnóstico de CaCu y sin tratamiento.
- Pacientes con cualquier estadio de CaCu.
- Pacientes que cuenten con biopsias en buen estado para su procesamiento.

5.7.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Pacientes con diagnóstico de CaCu y cuenten con el antecedente de haber recibido quimioterapia
- Pacientes con diagnóstico de CaCu y cuenten con el antecedente de haber recibido radioterapia.
- Pacientes con diagnóstico de CaCu y tengan el antecedente de haber presentado cualquier otro tipo de cáncer.
- Pacientes con diagnóstico de CaCu y presenten recaída de la enfermedad.
- Pacientes con diagnóstico de CaCu y que presenten cualquier enfermedad autoinmune.

5.7.3 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

- Pacientes que hayan fallecido durante el análisis de las biopsias y que no fuera posible recabar la muestra sérica.
- Pacientes que no hayan acudido a la toma de la muestra sanguínea.

5.8 DEFINICION DE LAS VARIABLES Y ESCALAS DE MEDICION

5.8.1 DEFINICION DE LAS VARIABLES

Las variables de estudio son las siguientes:

- Galectina-9.
- IFN- γ
- IL1- β
- Cáncer cervicouterino.
- Edad.

La definición operacional y conceptual de las variables se establece en el anexo 3.

5.8.2 ESCALAS DE MEDICIÓN.

Las escalas de medición de las variables se establecen en el anexo 4.

5.9 ESTRATEGIA DE TRABAJO

1. Se incluyeron biopsias y sueros de pacientes con cáncer de cérvix, con edades de 18 a 75 años. Dichas muestras se obtuvieron en el Hospital de Especialidades Manuel Ávila Camacho, UMAE del IMSS, mediante el proyecto titulado “Expresión de Galectina-9 en cáncer cervicouterino: marcador predictivo de respuesta al tratamiento y supervivencia” con número de registro R-2017-785-119. En dicho protocolo se estableció que los sueros y biopsias podrían ser empleados en otros protocolos de estudio, tal y como se describe en el Formato de Consentimiento Informado descrito en el anexo 5, el cual se encuentra bajo los parámetros bioéticos que se explican en el anexo 6. Adicionalmente, el presente protocolo fue registrado en el comité local de investigación del IMSS, quedando con el número de registro R-2018-2106-020.
2. Una vez que se nos entregó el suero de la paciente, se guardó en tubos de eppendorf los cuales se refrigeraron a -80° C para procesarlos posteriormente. La concentración de Galectina-9 en suero se realizó por la técnica de ELISA, en el laboratorio de Biología Molecular del CIBIOR- IMSS. La concentración de IL1- β e IFN- γ en suero se realizó por la técnica de ELISA en el laboratorio de inmunología experimental de la FM de la BUAP.
3. Ya que se contó con el número de expediente de la paciente, se solicitaron al servicio de patología las biopsias incluidas en bloques de parafina. En el laboratorio de Biología Molecular del CIBIOR-IMSS de los bloques de parafina se obtuvieron secciones de 5 μ m para posteriormente procesarlos. La expresión de Galectina-9 se obtuvo a través de la técnica de inmunohistoquímica, en el laboratorio de Biología Molecular del CIBIOR-

IMSS. La expresión de IL1- β e IFN- γ se obtuvo a través de la técnica de inmunohistoquímica, en el laboratorio de inmunología experimental de la FM de la BUAP.

4. Se capturaron los resultados obtenidos de la técnica de ELISA para Galectina-9, IL1- β e IFN- γ y los resultados de la técnica de inmunohistoquímica para Galectina-9, IL1- β e IFN- γ .
5. Se llevó a cabo el análisis de los resultados.

5.9.1 MÉTODO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Las pacientes seleccionadas, se obtuvieron de una base de datos que contenía 108 pacientes con CaCu. Posteriormente se solicitaron los sueros y biopsias en bloques de parafina en el Hospital de Especialidades Manuel Ávila Camacho, UMAE del IMSS, tal y como se describe en la estrategia de trabajo. Posterior a ser entregadas las muestras, los sueros se almacenaron a -80^o C hasta su procesamiento y se verificó que el rotulo de las biopsias en bloques de parafina coincidieran con la paciente y el suero respectivo.

5.9.2 TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS

Para medir la concentración de Galectina-9, Interleucina 1 beta (1- β) e Interferón- γ (IFN- γ), se empleó el suero de las pacientes y a través de la técnica de ELISA (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas) se determinó la concentración de las proteínas.

Para determinar la concentración de Galectina-9, se realizó un ELISA tipo sándwich, se empleó el kit con número DGAL90. La placa se encontraba precubierta con un anticuerpo primario monoclonal específico para Galectina-9 humana y el

anticuerpo secundario fue de tipo policlonal ligado a enzima específico para Galectina-9 humana. La técnica se describe en el anexo 7.

Para determinar la concentración de IL1- β , se realizó un ELISA tipo sándwich, se empleó el kit Ready-Set-Go de eBioscience, con número de catálogo 88-7910-29. La placa estaba cubierta con un anticuerpo humano para IL1- β , el anticuerpo de detección fue un anticuerpo humano, conjugado, unido a biotina para IL1- β . La técnica se describe en el anexo 7.

Para determinar la concentración de IFN- γ , se realizó un ELISA tipo sándwich, se empleó el kit Ready-Set-Go de eBioscience, con número de catálogo 88-7916-29. La placa estaba cubierta con un anticuerpo humano para IFN- γ , el anticuerpo de detección fue un anticuerpo humano, conjugado, unido a biotina para IFN- γ . La técnica se describe en el anexo 7.

Para determinar la expresión de Galectina-9, INF- γ e IL1- β , se emplearon las biopsias en bloques de parafina de las pacientes y al aplicarles la técnica de inmunohistoquímica se cuantificó la expresión de las proteínas. Esta técnica se describe en el Anexo 7.

5.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los resultados se recabaron en la base de datos de Excel. El análisis estadístico descriptivo se llevó a cabo con el Software GraphPad Prism 6 y SPSS versión 22. Para las variables sociodemográficas se emplearon gráficos con distribución de frecuencias, y porcentajes para variables categóricas. A las variables numéricas se les determinaron medidas de tendencia central y de dispersión. Para establecer la diferencia de medias, se empleó la prueba de Kruskal Wallis ya que los datos vienen de una muestra que no cumple los criterios para aplicar una prueba paramétrica. Para determinar la correlación entre las proteínas, se aplicó la prueba de correlación de Spearman, ya que las concentraciones tampoco cumplen los criterios para aplicar una prueba paramétrica.

6. RESULTADOS

La muestra está conformada por 20 sueros y 20 biopsias pertenecientes a las pacientes con CaCu. A las muestras séricas se les aplicó la técnica de ELISA para determinar la concentración de Galectina-9, IL1- β e IFN- γ , y a las biopsias se les aplicó la técnica de inmunohistoquímica para determinar la expresión de Galectina-9, IL1- β e IFN- γ .

En la población estudiada se reportaron 15 pacientes con diagnóstico de carcinoma epidermoide (75%), 4 pacientes con adenocarcinoma (20%) y una paciente con carcinoma adenoescamoso (5%) que se ubicó en el grupo otros (figura 4).

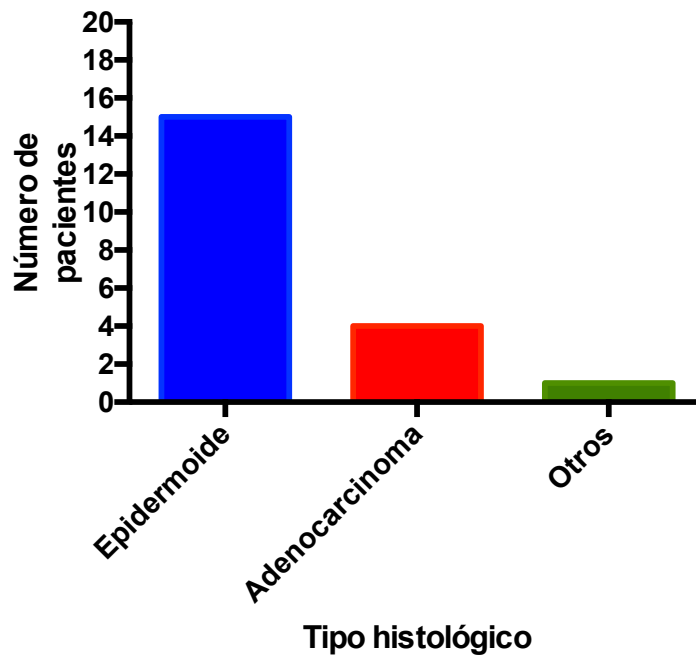


Figura 4. Distribución del tipo histológico en pacientes con CaCu.

La población estudiada presenta un rango de edad de 39-80 años, con una media de 57.9. El rango de 30-39 estuvo conformado por una paciente, el de 40-49 por cinco pacientes, el de 50-59 por cuatro, el de 60-69 por seis, el de 70-79 por tres y el de 80-89 por una paciente (figura 5).

En cuanto al rango de edad y estadio, en el rango de edad de 30-39 años se presentó una paciente en estadio I. En el rango de 40-49 años se presentaron dos pacientes en estadio I, una en estadio II y dos fueron no clasificables (NC). En el rango de 50-59 años una en estadio I, dos en estadio III y una en estadio IV. En el de 60-69 años una en estadio I, dos en estadio II, una en estadio III, una en estadio IV y una NC. En el de 70-79 años dos en estadio II, una NC y en el de 80-89 años una NC (figura 5).

Tomando en cuenta el rango de edad y estadio de CaCu, se observó que en el rango de edad de 30-49 años se presentaron los estadios iniciales, en las edades de 50-69 años se presentaron los estadios más avanzados y de los 60-69 años se encontraron los diversos estadios de CaCu (figura 5).

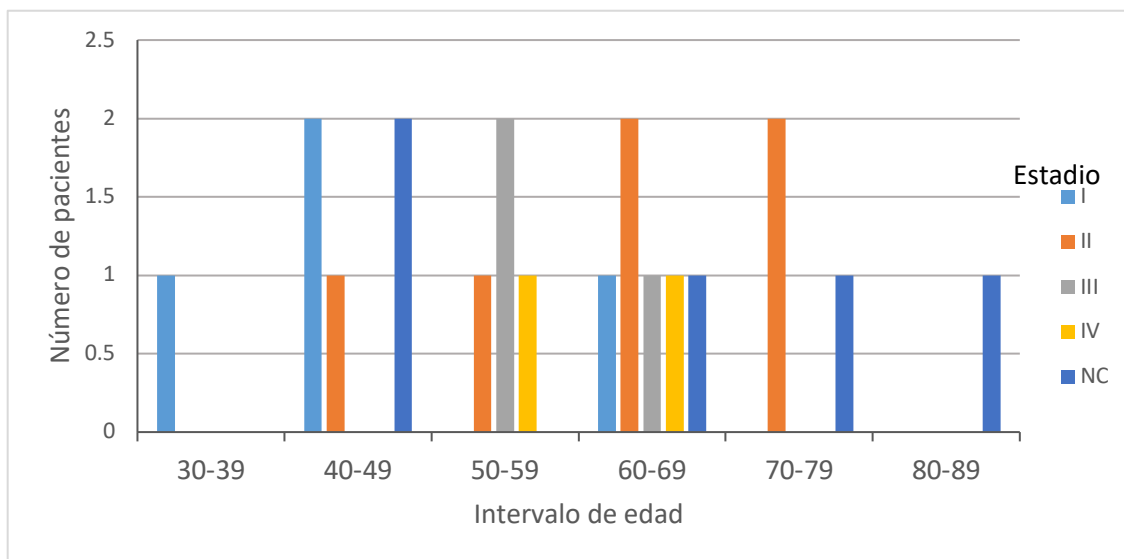


Figura 5. Número de pacientes por rango de edad y estadio de CaCu.

En la siguiente tabla, se reporta la media, desviación y error estándar de las concentraciones de Galectina-9, Interleucina 1- β e Interferón- γ (Tabla 1).

Tabla 1. Concentración de Galectina-9, IL1- β e IFN- γ obtenida en el suero de pacientes con CaCu. Se muestra la Media, Desviación Estándar y Error Estándar.

	Galectina-9 (ng/ml)	IL 1- β (pg/ml)	IFN- γ (pg/ml)
Media	4.36	31.81	59.50
Desviación estándar	0.75	41.65	15.75
Error estándar	0.17	9.31	3.52

Con el objeto de evaluar si la concentración de Galectina-9, IL1- β e IFN- γ se modificaban con respecto a los distintos tipos histológicos de CaCu (carcinoma epidermoide, adenocarcinoma, otros), se empleó el test de Kruskal-Wallis y no se reportaron diferencias significativas entre los tipos histológicos para ninguna de las proteínas en estudio (Tabla 2).

Tabla 2. Comparación de las concentraciones de Galectina-9, IL1- β e IFN- γ entre los distintos tipos histológicos. Se muestra la Media \pm EE.

	Galectina-9	IL1- β	IFN- γ
CE (15)	4.37 \pm 0.20	27.53 \pm 9.16	61.46 \pm 4.50
Adenocarcinoma (4)	4.67 \pm 0.49	64.89 \pm 43.09	52.55 \pm 3.01
Otros (1)	3.87 \pm 0.45	14.34 \pm 5.12	55.24 \pm 8.95
Total n = 20	<i>p</i> = 0.51	<i>p</i> = 0.34	<i>p</i> = 0.66

Con el objeto de evaluar si la concentración de Galectina-9, IL1- β e IFN- γ se modificaban con respecto a los distintos estadios de CaCu (I, II, III, IV, NC), se aplicó una prueba de kruskall-Wallis y no se reportaron diferencias significativas entre los estadios para ninguna de las proteínas en estudio (Tabla 3).

Tabla 3. Comparación de las concentraciones de Galectina-9, IL1- β e IFN- γ entre los estadios de CaCu. Se muestra la Media \pm EE.

	Galectina-9	IL1- β	IFN- γ
Estadio I (4)	3.71 \pm 0.28	32.53 \pm 12.07	54.29 \pm 4.15
Estadio II (6)	4.54 \pm 0.29	33.81 \pm 23.53	63.92 \pm 6.41
Estadio III (3)	4.32 \pm 0.25	51.57 \pm 28.78	54.63 \pm 7.27
Estadio IV (2)	5.46 \pm 0.76	8.71 \pm 3.59	50.85 \pm 0.19
NC (5)	4.27 \pm 0.26	26.23 \pm 18.96	64.75 \pm 10.89
Total n = 20	<i>p</i> = 0.21	<i>p</i> = 0.29	<i>p</i> = 0.41

RESULTADOS DE LA CONCENTRACIÓN SÉRICA DE PROTEÍNAS:

En la tabla número 4 se describen las concentraciones de las proteínas y las características de las pacientes con CaCu, en esta tabla se puede observar si coincide la concentración elevada o disminuida de las proteínas con determinada edad, tipo histológico y estadio.

- Las pacientes con Galectina-9 elevada fueron cuatro, las edades fueron de 65, 47, 53 y 69 años. Las pacientes 1, 11, 15 y 18 presentaron como tipo

histológico carcinoma epidermoide. Las pacientes 1 y 15 se reportaron en estadio IV, la 11 fue NC y la 18 se encontró en estadio IIIB (Tabla 4).

- Las pacientes con menor concentración de Galectina-9 fueron tres, las edades fueron 61, 51 y 65 años. Las pacientes 10, 17 y 19 presentaron como tipo histológico al carcinoma epidermoide. La paciente 10 se reportó en estadio I, la 17 en estadio II y 19 NC (Tabla 4).
- Las pacientes con IL1- β elevada fueron tres, con edades de 72, 47 y 69 años. La paciente 6 presentó como tipo histológico adenocarcinoma; las pacientes 11 y 18 tuvieron carcinoma epidermoide. Las tres pacientes tenían estadio distinto (Tabla 4).
- Las pacientes con IL1- β disminuida fueron cinco, con edades de 65, 70, 70, 51 y 42 años, la paciente 12 fue adenocarcinoma, las pacientes 1, 16, 17 y 20 fueron carcinoma epidermoide. La paciente 1 se encontró en estadio IV, la 12, 17 y 20 fueron estadio II y la paciente 16 NC (Tabla 4).
- De acuerdo a las concentraciones de IFN- γ , las pacientes 3 y 19 tuvieron la concentración más elevada, con edad similar, ya que la primera tenía 67 años y la segunda 65 años, ambas tenían carcinoma epidermoide, la paciente 3 se encontró en estadio IIB y la paciente 19 era NC. El resto de pacientes se reportaron con concentraciones muy similares (Tabla 4).

Tabla 4. Concentraciones de Galectina-9, IL1- β e IFN- γ y características de las pacientes con

No. PACIENTE	EDAD	TIPO HISTOLÓGICO	ESTADIO CLINICA	GALECTINA-9 ng/ml	IL 1- β pg/ml	IFN- γ pg/ml
1	65	CARCINOMA EPIDERMOIDE	IV	6.221	5.123	50.669
2	61	CARCINOMA EPIDERMOIDE	IIB	4.740	21.517	52.823
3	67	CARCINOMA EPIDERMOIDE	IIB	4.942	12.295	93.462
4	41	ADENOCARCINOMA	NC	4.336	14.344	51.783
5	80	CARCINOMA EPIDERMOIDE	NC	4.402	21.517	51.114
6	72	ADENOCARCINOMA	IIB	5.631	150.616	58.098
7	61	CARCINOMA EPIDERMOIDE	IIIB	4.123	16.394	69.168
8	48	CARCINOMA EPIDERMOIDE	IB1	4.346	67.624	64.785

9	53	ADENOCARCINOMA	IIIB	4.030	29.713	47.771
10	61	CARCINOMA EPIDERMÓIDE	IB	3.103	28.689	49.183
11	47	CARCINOMA EPIDERMÓIDE	NC	5.042	99.386	54.755
12	70	ADENOCARCINOMA	IIA2	4.316	9.221	64.19
13	43	CARCINOMA EPIDERMÓIDE	IB2	3.958	14.344	56.909
14	39	CARCINOMA ADENOESCAMOSO	IB2	3.423	19.467	46.285
15	53	CARCINOMA EPIDERMÓIDE	IVB	4.699	12.295	51.04
16	70	CARCINOMA EPIDERMÓIDE	NC	4.114	4.098	58.098
17	51	CARCINOMA EPIDERMÓIDE	IIB	3.749	0.008	49.703
18	69	CARCINOMA EPIDERMÓIDE	IIIB	4.811	108.608	46.954
19	65	CARCINOMA EPIDERMÓIDE	NC	3.447	0.000	108.024
20	42	CARCINOMA EPIDERMÓIDE	IIB	3.853	9.221	65.23

RESULTADOS DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS

Galectina-9

Se determinó la expresión de Galectina-9, con la finalidad de observar si se modificaba con la expresión de IL 1- β e IFN- γ , además de determinar si era positiva o negativa con respecto a una edad específica, tipo histológico o estadio.

- De las 20 pacientes a quienes se determinó la expresión de Galectina-9, cuatro pacientes las 7, 14, 15, 17 (Tabla 5) tuvieron expresión positiva (Figs. 6-9), las edades de las pacientes fueron variables 61, 39, 53 y 51 años respectivamente. En cuanto al tipo histológico, tres tuvieron carcinoma epidermoide y una paciente, carcinoma adenoescamoso. El estadio en el que se encontraron fue III B, IB2, IV B y II B, respectivamente (Tabla 4).
- Al observar la expresión y concentración de Galectina-9 de las cuatro pacientes, se aprecia que las concentraciones de Galectina-9 son de las más bajas, es decir, se aprecia una relación inversamente proporcional de la expresión y concentración (Tabla 5).

- Al analizar la expresión positiva de Galectina-9 de las cuatro pacientes con la concentración de IL 1- β , se apreció que los niveles de IL 1- β de las pacientes son de los más bajos, se encuentran en 16.39, 19.47, 12.30 y 0.01 pg/ml (Tabla 5).
- Al observar la expresión positiva de Galectina-9 de las cuatro pacientes con la concentración de IFN- γ , se apreció que los niveles de IFN- γ son muy similares, se encuentran en 69.17, 46.29, 51.04 y 49.70 pg/ml (Tabla 5).

Tabla 5. Expresión de Galectina-9 y concentración de las proteínas en pacientes con CaCu.

NO.PACIENTE	EXPRESIÓN DE GALECTINA-9				CONCENTRACIÓN		
	BAJA	MEDIA	ALTA	NULA	GALECTINA-9 NG/ML	IL 1- β PG/ML	IFN- γ PG/ML
1				✓	6.22	5.12	50.67
2				✓	4.74	21.52	52.82
3				✓	4.94	12.30	93.46
4				✓	4.34	14.34	51.78
5				✓	4.40	21.52	51.11
6				✓	5.63	150.62	58.10
7			✓		4.12	16.39	69.17
8				✓	4.35	67.62	64.79
9				✓	4.03	29.71	47.77
10				✓	3.10	28.69	49.18
11				✓	5.04	99.39	54.76
12				✓	4.32	9.22	64.19
13				✓	3.96	14.34	56.91
14		✓			3.42	19.47	46.29
15			✓		4.70	12.30	51.04
16				✓	4.11	4.10	58.10
17	✓				3.75	0.01	49.70
18				✓	4.81	108.61	46.95
19				✓	3.45	0.00	108.02
20				✓	3.85	9.22	65.23

- En la figura 6 y 7 se aprecia expresión alta de Galectina-9, llamando la atención que las pacientes se encontraron en estadio IIIB y IVB, respectivamente, no así en la figura 8 y 9 donde la expresión es media y baja en estadio IB y IIB, respectivamente. Lo anterior orienta a que la expresión alta de Galectina-9 en estadios avanzados puede considerarse como un marcador del grado de malignidad.

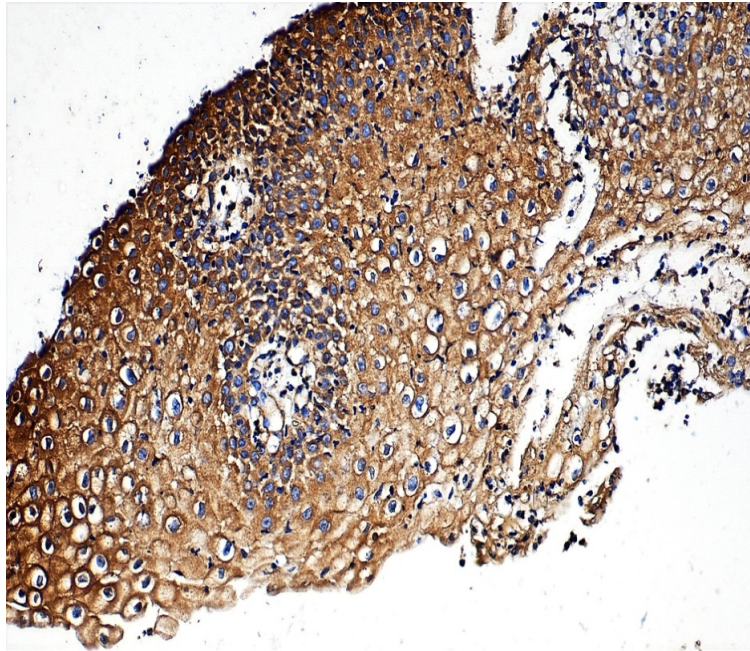


Figura 6. Expresión de Galectina-9 positiva (40X), paciente de 61 años, con carcinoma epidermoide, estadio IIIB. Se aprecia Galectina-9 con expresión alta a nivel de epitelio, en citoplasma. Concentración Galectina-9, 4.12 ng/ml.

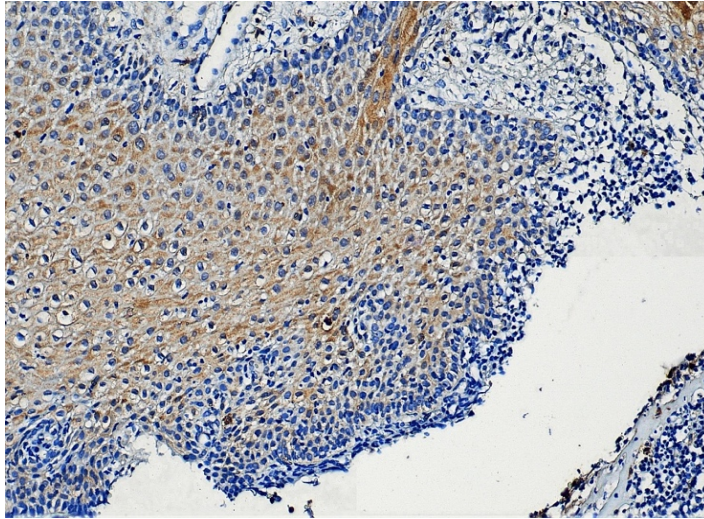


Figura 7. Expresión de Galectina-9 positiva (40X), paciente de 53 años, carcinoma epidermoide, estadio IVB. Se aprecia Galectina-9 con expresión alta a nivel de epitelio, en el citoplasma. Concentración Galectina-9, 4.69 ng/ml.

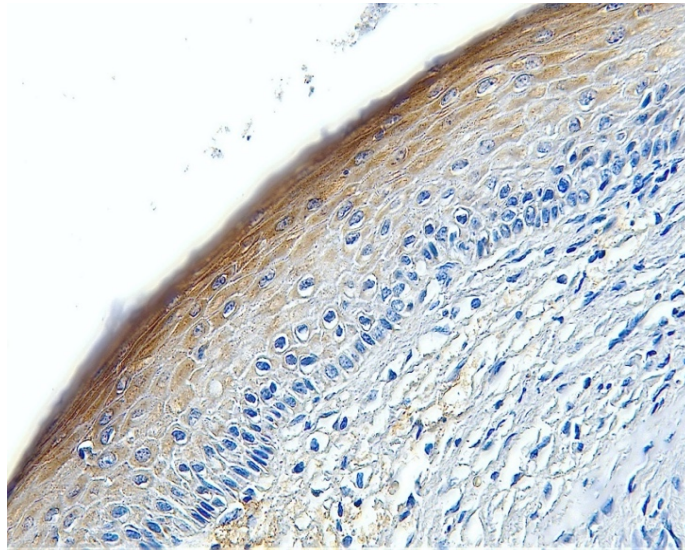


Figura 8. Expresión de Galectina-9 positiva (40X). Paciente de 39 años, con carcinoma adenoescamoso, estadio IB2. Se aprecia Galectina-9 con expresión media a nivel de epitelio, en el citoplasma. Concentración de Galectina-9, 3.42 ng/ml.

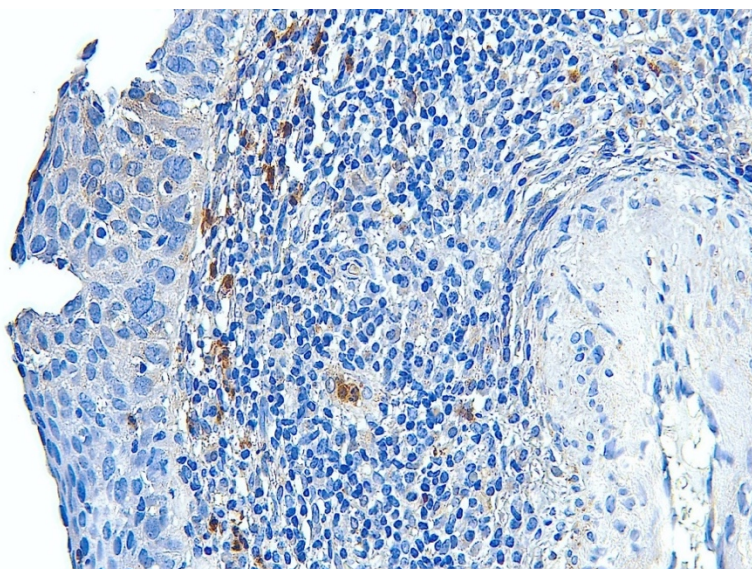


Figura 9. Expresión de Galectina-9 positiva (40X). Paciente de 51 años, con carcinoma epidermoide, estadio IIB. Se aprecia Galectina-9 con expresión baja a nivel de epitelio, en el citoplasma. Concentración de Galectina-9, 3.74 ng/ml.

Expresión de Interleucina 1- β

Se determinó la expresión de IL 1- β , con la finalidad de observar si se modificaba con la expresión de Galectina-9 e IFN- γ , además de observar si era positiva o negativa con respecto a una edad determinada, tipo histológico o estadio específico.

- De las 20 biopsias de las pacientes a quienes se les determinó la expresión de IL 1- β , dos fueron positivas (paciente 16 y 18) (Figs. 10 y 11). La primera tenía 70 años, se encontró en estadio NC. La segunda tenía 69 años, en estadio III B. Ambas pacientes tenían carcinoma epidermoide .
- Al observar la expresión positiva y concentración de IL 1- β de las dos pacientes, se apreció que una se encontró con la concentración más baja y la otra tiene la concentración más alta (Tabla 6).

- Las dos biopsias con expresión positiva a IL 1- β , no coinciden con las mismas biopsias positivas a Galectina-9.
- Al observar la expresión positiva de IL 1- β , con la concentración de Galectina-9, se apreció que una paciente se encuentra en 4.11 ng/ml y la otra en 4.81 ng/ml (Tabla 6).
- Al apreciar la expresión positiva de IL 1- β , con la concentración de IFN- γ , se observó que ambas pacientes tenían concentraciones muy parecidas de IFN- γ , una se encontró en 58.10 pg/ml y la otra en 46.95 pg/ml (Tabla 6).

Tabla 6. Expresión de IL 1- β y concentración de las proteínas en pacientes con CaCu.

No.PACIENTE	EXPRESIÓN DE IL 1- β		CONCENTRACIÓN		
	POSITIVA	NEGATIVA	IL 1- β pg/ml	Galectina-9 ng/ml	IFN- γ pg/ml
1		✓	5.12	6.22	50.67
2		✓	21.52	4.74	52.82
3		✓	12.30	4.94	93.46
4		✓	14.34	4.34	51.78
5		✓	21.52	4.40	51.11
6		✓	150.62	5.63	58.10
7		✓	16.39	4.12	69.17
8		✓	67.62	4.35	64.79
9		✓	29.71	4.03	47.77
10		✓	28.69	3.10	49.18
11		✓	99.39	5.04	54.76
12		✓	9.22	4.32	64.19
13		✓	14.34	3.96	56.91
14		✓	19.47	3.42	46.29
15		✓	12.30	4.70	51.04
16	✓		4.10	4.11	58.10
17		✓	0.01	3.75	49.70
18	✓		108.61	4.81	46.95
19		✓	0.00	3.45	108.02
20		✓	9.22	3.85	65.23

- En la figura 10, en la biopsia de la pacientes en estadio NC se expresa IL 1- β a nivel del núcleo, observamos que el macrófago es quien la está expresando. Es decir, se observa un infiltrado inflamatorio con macrófagos positivos a IL 1- β . En la figura 10, aún podemos observar infiltrado inflamatorio, en comparación con la figura 11, que se encuentra en estadio III, donde casi no hay infiltrado inflamatorio.

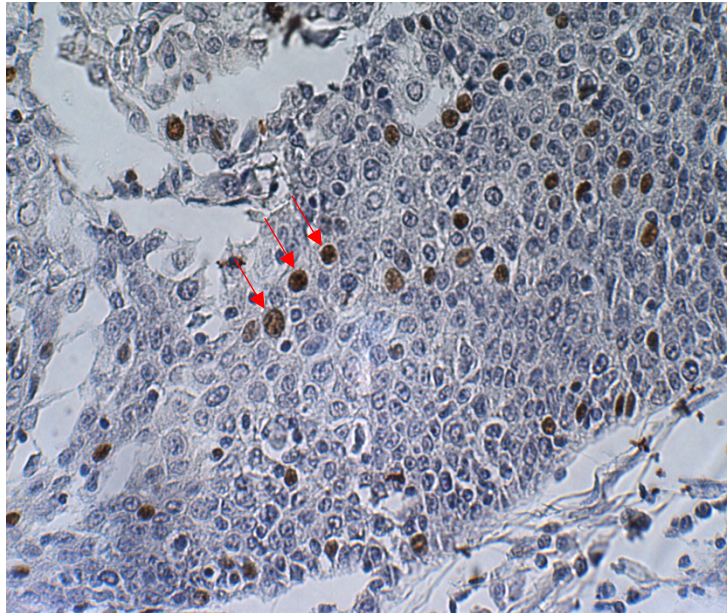


Figura 10. Expresión de IL 1- β positiva (40X). Paciente de 70 años, con carcinoma epidermoide, estadio NC. Podemos observar escasos macrófagos (↓) que expresan IL 1- β , los macrófagos pueden ser M2, los cuales inducen malignidad y metástasis, se aprecia infiltrado inflamatorio. Concentración de IL 1- β , 4.10 ng/ml.

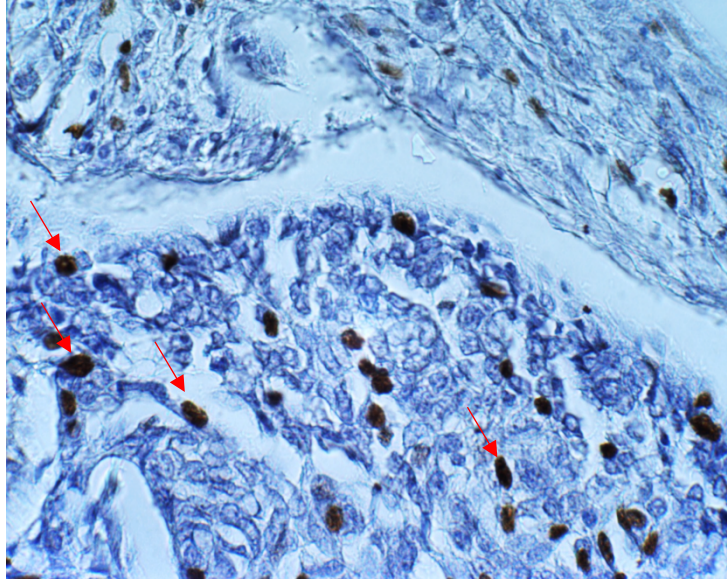


Figura 11. Expresión de IL 1- β positiva (40X). Paciente de 69 años, con carcinoma epidermoide, estadio IIIB. Podemos observar escasos macrófagos (\blacktriangledown), que expresan IL 1- β , los macrófagos pueden ser M2, los cuales inducen malignidad y metástasis, casi no se aprecia infiltrado inflamatorio. Concentración de IL 1- β , 108.60 ng/ml.

Expresión de interferón- γ

Se determinó la expresión de IFN- γ , con la finalidad de observar si se modificaba con la expresión de Galectina-9 e IL 1- β , además de establecer si la expresión era positiva o negativa con respecto a una edad determinada, tipo histológico o estadio específico.

- De las biopsias de pacientes a quienes se les determinó la expresión de IFN- γ , todas fueron negativas (Tabla 7).
- Al observar la expresión negativa de IFN- γ con la concentración de IFN- γ , los resultados de la concentración son muy similares, sólo se reportan dos pacientes con concentración de IFN- γ elevado, una en 93.46 y la otra en 108.02 pg/ml (Tabla 7). Las 20 pacientes abarcaron todos los rangos de edad, así como distintos tipos histológicos y estadios.

- Al observar la expresión negativa de IFN- γ con la concentración de Galectina-9 e IL 1- β (Tabla 7), las 20 pacientes abarcaron todos los rangos de edad, distintos tipos histológicos y estadios.

Tabla 7. Expresión de IFN- γ y concentración de las proteínas en pacientes con CaCu.

No.PACIENTE	EXPRESIÓN IFN- γ		CONCENTRACIÓN		
	POSITIVA	NEGATIVA	IFN- γ pg/ml	GALECTINA-9 ng/ml	IL 1- β pg/ml
1		✓	50.67	6.22	5.12
2		✓	52.82	4.74	21.52
3		✓	93.46	4.94	12.30
4		✓	51.78	4.34	14.34
5		✓	51.11	4.40	21.52
6		✓	58.10	5.63	150.62
7		✓	69.17	4.12	16.39
8		✓	64.79	4.35	67.62
9		✓	47.77	4.03	29.71
10		✓	49.18	3.10	28.69
11		✓	54.76	5.04	99.39
12		✓	64.19	4.32	9.22
13		✓	56.91	3.96	14.34
14		✓	46.29	3.42	19.47
15		✓	51.04	4.70	12.30
16		✓	58.10	4.11	4.10
17		✓	49.70	3.75	0.01
18		✓	46.95	4.81	108.61
19		✓	108.02	3.45	0.00
20		✓	65.23	3.85	9.22

Correlación entre las concentraciones de Galectina-9 con las interleucinas.

Para determinar si existía una correlación entre la concentración de Galectina-9 con las interleucinas, se aplicó la prueba de Correlación de Spearman, obteniendo que la correlación entre Galectina-9 e Interleucina 1- β fue $r = 0.34$ (débil) ($p = 0.14$) (figura 12) y la correlación entre Galectina-9 e Interferón- γ fue $r = 0.07$ (nula) ($p = 0.74$), es decir, no se encontró correlación entre las proteínas (figura 13). La falta de correlación se debió al número de muestra, la cual fue muy pequeña.

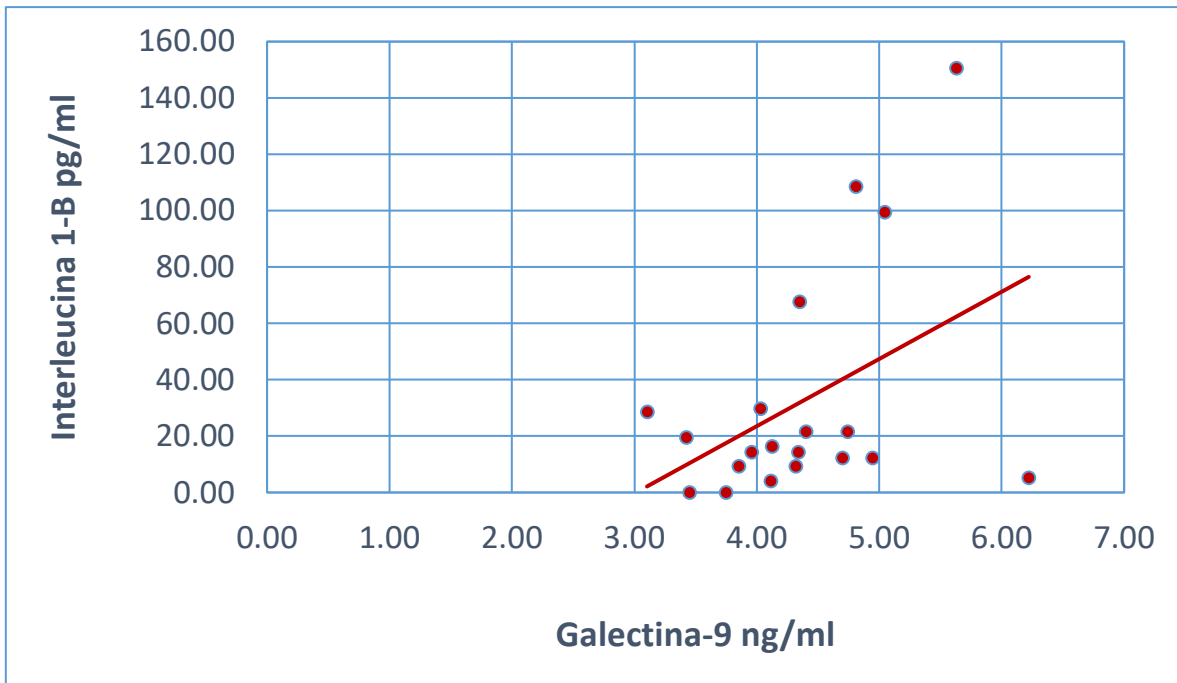


Figura 12. Correlación entre la concentración de Galectina-9 e Interleucina 1-B. Se aprecia que no hay relación lineal entre ambas variables, los puntos no se encuentran cercanos a la recta o sobre la recta. La correlación es débil, $r = 0.34$ ($p = 0.14$).

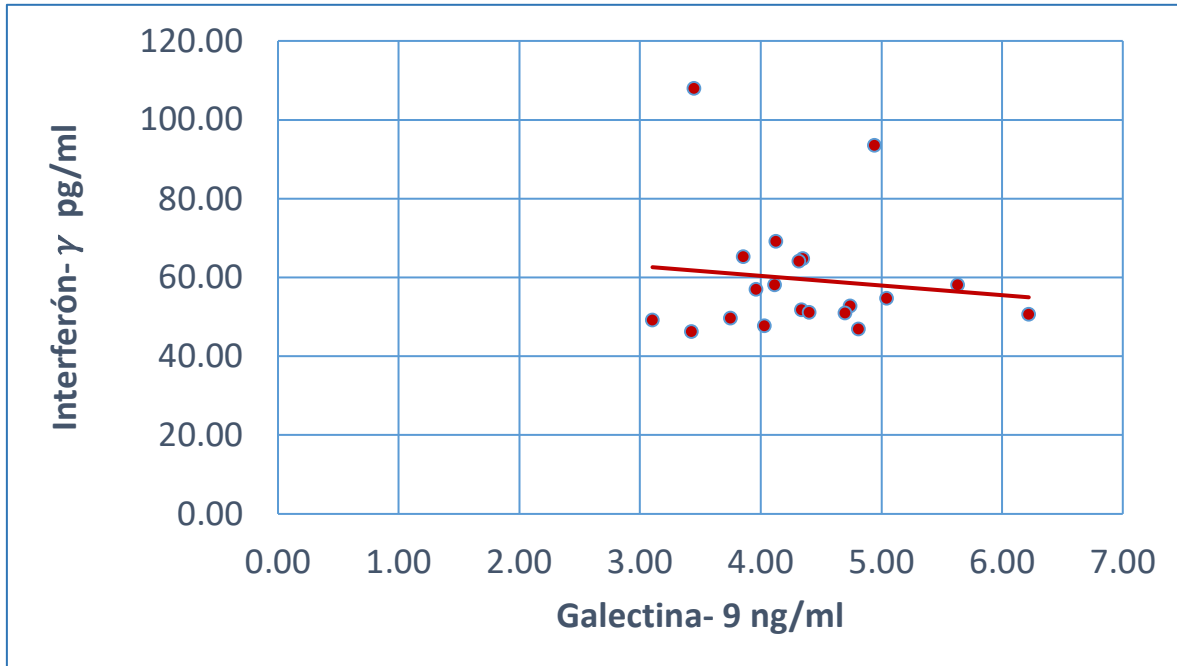


Figura 13. Correlación entre la concentración de Galectina-9 e Interferón- γ . Se aprecia que no hay relación lineal entre ambas variables, los puntos no se encuentran cercanos a la recta o sobre la recta. La correlación es nula, $r = 0.07$ ($p = 0.74$).

Relación entre las concentraciones de Galectina-9 e Interleucina 1- β

Debido a que la correlación no fue significativa, se analizó si la concentración de Galectina-9 se relacionaba con la de IL 1- β , es decir, si las pacientes con concentración elevada de Galectina-9 tenían alta concentración de IL 1- β y viceversa.

Graficamos las concentraciones de ambas proteínas con el número respectivo de cada paciente, y analizamos los puntos elevados y disminuidos en los que coincidían las dos proteínas (figura 14) y las características de las pacientes.

- Se observa que los puntos en que coinciden la elevación de Galectina-9 e IL 1- β fueron tres, las pacientes 6, 11 y 18 (figura 14). La 6 tenía 72 años, la 11 tenía 47 años y la 18 tenía 69 años. En cuanto al tipo histológico, la de 72 años tuvo adenocarcinoma y las otras dos carcinoma epidermoide. En cuanto al estadio, la paciente 6 se encontró en estadio IIB, la 11 fue NC y la 18 se

ubicó en IIIB. No se encontró relación con respecto al tipo histológico y estadio.

- En cuanto a los puntos en que coinciden las disminuciones de Galectina-9 con IL 1- β fueron cuatro, las pacientes 7, 12, 17 y 19 (figura 14). Las cuatro tenían edad variable. En cuanto al tipo histológico, la paciente 12 tenía adenocarcinoma y las otras tres CE. En cuanto al estadio, la paciente 7 estaba en estadio IIIB y las otras tres en estadio II.

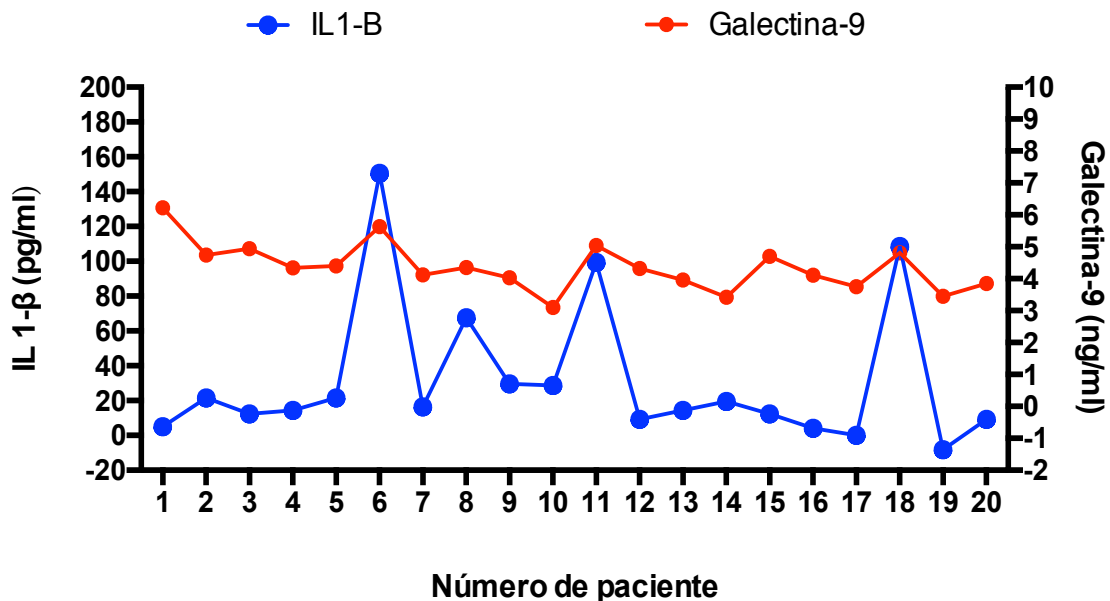


Figura 14. Concentraciones séricas de Galectina-9 e Interleucina 1- β en pacientes con cáncer cervicouterino.

Relación entre las concentraciones de Galectina-9 e Interferón γ

Con la finalidad de determinar si la concentración de Galectina-9 se relacionaba con la de IFN- γ , es decir, si las pacientes con concentración elevada de Galectina-9 tenían alta concentración de IFN- γ y viceversa, graficamos las concentraciones de ambas proteínas con el número respectivo de cada paciente

(figura 15), y analizamos los puntos elevados y disminuidos en los que coincidían las dos proteínas y las características de las pacientes.

- Como se puede apreciar en la figura 15, Galectina-9 e IFN- γ al incrementar su concentración coincidieron sólo con la paciente 3, la cual tenía 67 años, carcinoma epidermoide y se encontró en estadio IIB.
- Los puntos en que coinciden las disminuciones de ambas proteínas, corresponden a dos pacientes, las pacientes 14 y 17 (figura 15). Las dos tienen edades variables, una tuvo carcinoma adenoescamoso y la otra carcinoma epidermoide, ambas con estadio distinto.
- No existen otros puntos en la gráfica en donde ambas proteínas se relacionen (Figura 15).

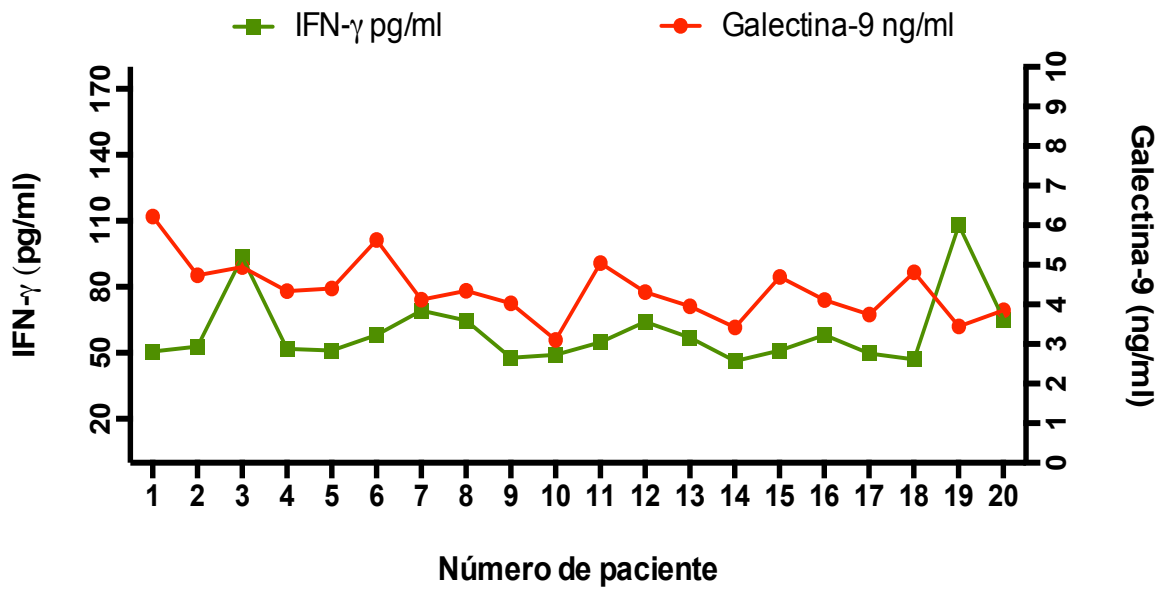


Figura 15. Concentraciones séricas de Galectina-9 e Interferón γ en pacientes con cáncer cervicouterino.

Relación entre las concentraciones de Interleucina 1- β e Interferón γ

Con la finalidad de determinar si la concentración de IL1- β se relacionaba con la de IFN- γ , es decir, si las pacientes con concentración elevada de IL1- β tenían alta concentración de IFN- γ y viceversa, graficamos las concentraciones de ambas proteínas con el número respectivo de cada paciente (figura 16), y analizamos los puntos en que coincidían ambas proteínas, así como las características de las pacientes.

- No se encontraron puntos de relación en cuanto a elevación de ambas proteínas (figura 16).
- Los puntos con concentraciones disminuidas de IL1- β e IFN- γ , pertenecieron a las pacientes 9 y 17 (figura 16), la primera tenía 53 años y la segunda 51 años, una con adenocarcinoma y la otra con CE, ambas con distinto estadio (figura 16).

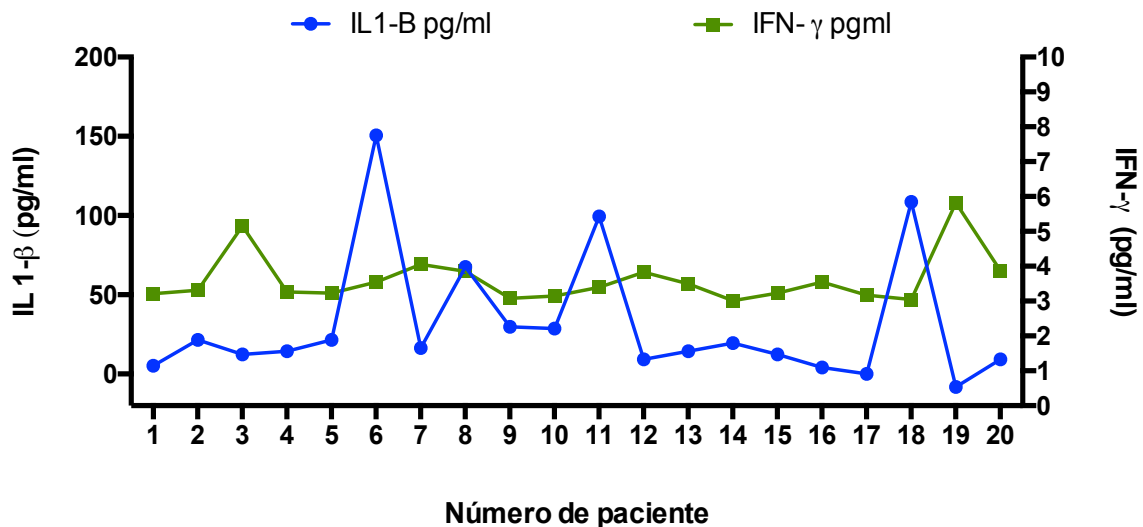


Figura 16. Concentraciones séricas de Interleucina 1- β e Interferón γ en pacientes con cáncer cervicouterino.

Relación entre la concentración de Galectina-9 y la edad.

- Con el objetivo de determinar si existe relación entre la concentración de las proteínas y la edad, gráficamos la concentración de Galectina-9 con la edad. Esperabamos observar que la concentración siguiera un patrón similar con la edad, es decir, que al incrementar la edad fueran elevándose las concentraciones o viceversa. Sin embargo, esto no se aprecia en la figura 17, ya que las concentraciones son muy dispersas con respecto a la edad, es decir no hay relación entre la edad y concentración de Galectina-9 (figura 17).

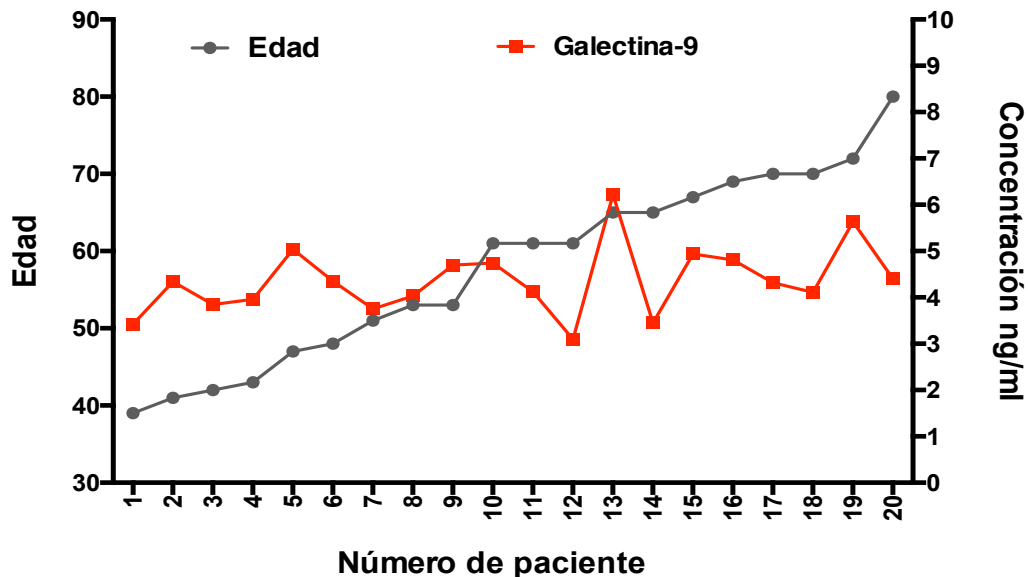


Figura 17. Concentración sérica de Galectina-9 y edad en pacientes con cáncer cervicouterino.

Relación entre las concentraciones de IL1- β e IFN- γ y la edad.

- Con el objetivo de determinar si existe relación entre la concentración de las proteínas y la edad, gráficamos las concentraciones de IL1- β e IFN- γ con la edad. Esperabamos observar que las concentraciones siguieran un patrón

similar con la edad, es decir, que al incrementar la edad fueran elevandose las concentraciones o viceversa. Sin embargo, esto no se aprecia en la figura 18, ya que las concentraciones de ambas proteínas son muy dispersas con respecto a la edad, es decir, no hay relación entre la edad y concentración de IL1- β e IFN- γ . Sólo se puede apreciar en esta muestra, que en pacientes a partir de los 75 años declinan las concentraciones de IFN- γ (Figura 18).

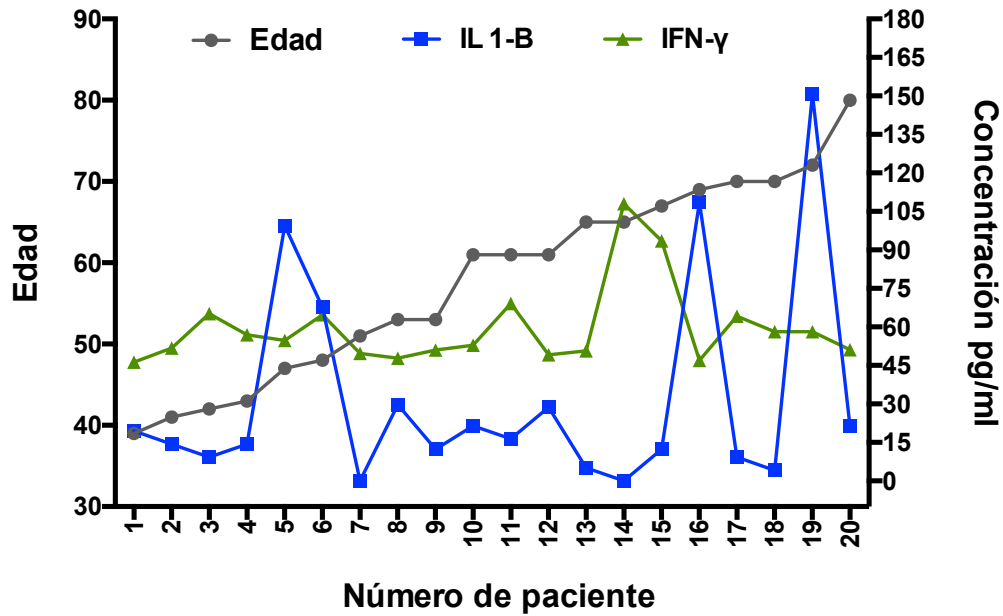


Figura 18. Concentración sérica de Interleucina 1- β e Interferón γ y edad en pacientes con cáncer cervicouterino.

7. DISCUSIÓN

Se tiene conocimiento qué, ante la presencia de un cuerpo extraño en el organismo, se desencadenan mecanismos de defensa para eliminar a cualquier agente que afecte la integridad de nuestro cuerpo, como es la liberación de citocinas que participan en la respuesta inmunológica. Sin embargo, las asociaciones entre los niveles de citocinas a nivel local y la severidad de la neoplasia cervical son pobremente entendibles, debido a que se carece de la historia natural del efecto de los microorganismos como el VPH (principal agente para desarrollar CaCu), de la respuesta inmunológica del huésped, así como de otros factores (50).

Existe una proteína llamada Galectina-9 que ha sido estudiada en el cáncer, y estudios *in vitro* han mostrado que Galectina-9 estimula la expresión de IL1- β e IFN- γ , por otro lado también se ha mostrado que IFN- γ estimula la expresión de Galectina-9, sin embargo, se desconoce si este efecto se presenta en pacientes, de tal manera que la expresión de Galectina-9 aumente o se relacione con alta expresión de IL1- β e IFN- γ en pacientes con CaCu o algún otro tipo de cáncer. En los resultados de este estudio, se da a conocer cuál fue la concentración en el suero y como fue la expresión de Galectina-9, IL1- β e IFN- γ en biopsias de pacientes en los distintos estadios de CaCu.

En este estudio descriptivo, en cuanto al tipo histológico, el carcinoma epidermoide se reportó en el 75% de las pacientes, seguido del adenocarcinoma en el 20% y carcinoma adenoescamoso correspondió al 5%. Esto coincide con lo reportado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la cual divide a los carcinomas cervicouterinos en tres grupos principales: carcinomas epidermoides (80-90%), adenocarcinomas y otros tumores (10-20%) (51). Algunos autores consideran que, pacientes con adenocarcinoma tienen una tasa de supervivencia menor que pacientes con carcinoma de células escamosas (52).

En el estudio realizado, la media de edad de las pacientes fue de 57.9 años, comparado con otros estudios extranjeros en donde la media de edad la reportaron en 42 y 46 años (42,31), considerando que el pronóstico puede ser más favorable en pacientes más jóvenes. En el rango de 30-39 y 40-49 años, se encontraron la

mayor parte de pacientes en estadio I y II, y en el rango de 50-59 y 60-69 años se presentaron los estadios más avanzados de pacientes con CaCu. Esto puede asociarse con la inmunosenescencia, el cual es un concepto que refleja los cambios inmunológicos asociados con la edad. Dentro de estos cambios, se mencionan a las células dendríticas, ya que, con la edad, parecen alterarse funcionalmente, lo cual altera la ingesta de antígenos, fagocitosis de células apoptóticas y migración. Las células NK regulan la respuesta inmunológica al producir citocinas y quimiocinas, reportándose que en pacientes mayores las células NK liberan menor cantidad de IFN- γ (53). De aquí que podemos considerar que, la mayor parte de las pacientes en estadios iniciales, se encuentran en el rango de edad de 30-49 años y los estadios avanzados se encuentran en edades mayores a ese rango.

En un estudio se evaluó la concentración de Galectina-9 en el suero de 26 mujeres con cervix normal, 45 con lesión intraepitelial cervical o premaligna (LIC) y 29 con CaCu. Se reportó que la concentración de Galectina-9 en el grupo con CaCu fue significativamente mayor (27.15 ng/ml) comparada con el de pacientes con LIC (21.20 ng/ml) y el grupo de mujeres con cervix normal (17.43 ng/ml) (48)(41). En nuestro estudio se encontraron cifras más bajas (3.10 ng/ml, 3.42 ng/ml, 3.74 ng/ml) de esta proteína, pertenecientes a pacientes con estadio I y II de CaCu, esto probablemente se explica por la variabilidad poblacional y el tipo de Kit empleado en nuestro estudio.

En nuestros resultados también se apreció, que tres pacientes tuvieron baja concentración de Galectina-9 y cifras elevadas de IL1- β . Esto coincide con lo establecido por Kashio et al 2003, en donde hizo mención que el efecto de Galectina-9 sobre las células T activadas es dependiente de concentración, ya que a concentraciones elevadas, Galectina-9 induce apoptosis de células T activadas (CD8 y CD4) y a concentraciones menores incrementa la producción de citocinas por activación de las células T (54).

En cuanto a la concentración de IL1- β , se encontró que las cifras más bajas se reportaron en pacientes con estadios iniciales de la enfermedad, es decir estadio I y estadio II. Esto no concuerda con los resultados de otros estudios como el de Gening et al, en los cuales se reportan cifras más altas de IL1- β en el estadio I, y

las cifras van disminuyendo a medida que se incrementa el estadio de CaCu, es decir, que tienen una relación inversamente proporcional (42). Estos resultados son variables en nuestra población y población extranjera, de aquí que podemos considerar que la genética juega un papel importante en estos resultados. Por otra parte, esta aparente discrepancia puede deberse a diferencias entre los estudios refiriéndonos a la metodología que cada uno de ellos aplica, la presencia de lesiones precursoras al CaCu o la etapa clínica que se esté considerando al aplicar el estudio (50).

En cuanto a la concentración de IFN- γ , las cifras no se reportan con asociaciones específicas en cuanto a edad, estadio de CaCu o tipo histológico. Por otra parte, en el estudio de Gening et al, hacen mención de que IFN- γ presenta una distribución muy irregular, ya que en estadio Ia, IFN- γ se encuentra disminuido y en estadio Ib-IIa tiende a incrementar, para volver a descender en el estadio IIb-IV(42). Sin embargo, sería importante ampliar la muestra para verificar el comportamiento de esta citocina en los distintos estadios de CaCu.

Se observó que las concentraciones de IL1- β se encuentran más dispersas en comparación con Galectina-9 e IFN- γ , esto puede estar asociado con la especificidad de cada individuo, ya que todos los organismos responden de forma distinta ante estímulos extraños, como lo es en el cáncer, en donde ningún organismo reacciona de la misma forma.

En cuanto a la expresión de Galectina-9, cuatro biopsias fueron positivas, las edades de las pacientes correspondientes a las biopsias fueron 39, 51, 61 y 53 años. Los estadios comprendidos fueron I B2, II B, III B2 y IV B, la paciente en estadio I B2 tenía el tipo histológico menos frecuente (carcinoma adenoescamoso), el resto fueron epidermoide. En base a estos resultados, no podemos decir que la expresión de Galectina-9 sea específica de edad, estadio o tipo histológico en pacientes con CaCu, para determinar si existe diferencia en cuanto a expresión de Galectina-9 en estadios iniciales o avanzados (31). Consideramos importante ampliar la muestra, ya que al realizar esto, probablemente podamos demostrar estadísticamente que al incrementar la expresión de Galectina-9 las pacientes

presentan mayor supervivencia que aquellas con menor expresión, y así también si el nivel de expresión se asocia con un determinado tipo histológico.

La expresión de IL 1- β se reportó positiva en dos pacientes, de 69 y 70 años, ambas con carcinoma epidermoide, estadio IIIB y NC, respectivamente. Con respecto a este resultado, no se puede establecer un comportamiento específico de esta proteína con edad, tipo histológico o estadio del CaCu. El resultado de la expresión de IL 1- β probablemente se encuentra asociado con las bajas concentraciones de esta interleucina en pg/ml, ya que la cantidad puede ser mínima a nivel intracelular y extracelular. Por otra parte, las citocinas incrementan en el proceso inflamatorio agudo, pero tienen una vida media muy corta y como se puede ver en la figura 11 no hay infiltrado, por lo tanto la concentración de IL 1- β puede estar en concentraciones normales en el suero. Además, en las dos pacientes con expresión positiva a IL 1- β no se detectó un microambiente con población linfocitaria, sólo macrófagos, lo cual puede estar asociado con malignidad. Los macrófagos positivos a IL 1- β , no podemos confirmar que sean macrófagos benignos (M1) o malignos (M2), sin embargo, pareciera más relacionarse a macrófagos M2, ya que son los que inducen malignidad y metástasis.

En cuanto a la expresión de IFN- γ en las biopsias, fue negativa en las 20 muestras. Se ha reportado que, existen muy pocos estudios que asocien los niveles de expresión de las citocinas, como IL 1- β e IFN- γ y la severidad de la enfermedad (50). Peghini et al reportaron que IFN- γ incrementó con la severidad de la enfermedad, pero no de forma significativa ($P = 0.09$), posiblemente reflejado por el tamaño de muestra que fue de 25 pacientes con CaCu (55) y en nuestro estudio la muestra es de 20 biopsias. Cobayashi et al demostraron que, los niveles de IFN- γ incrementaban de tejido normal a NIC, pero volvían a disminuir de NIC a cáncer (56), lo cual se relaciona con nuestras pacientes que tienen CaCu. Los estudios previos apoyan lo establecido por Otani et al, en donde de cuatro citocinas, siendo una de ellas el IFN- γ , fue excluida del análisis de su estudio, debido a que en la muestra obtenida del moco cervical fue indetectable (50).

La literatura ha promovido la idea de que la respuesta inmunológica celular a nivel local, *in situ*, es esencial para guiar la evolución y el pronóstico del cáncer (57).

Posiblemente, la expresión y concentración de los niveles de las citocinas, podría emplearse en los distintos estadios de CaCu y emplearse como marcadores biológicos para el pronóstico de pacientes con CaCu, ya que en nuestros resultados se apreció una tendencia a aumentar la concentración de Galectina-9 respecto al estadio de la enfermedad, como en el caso de dos pacientes en estadio IV, una con concentración de Galectina-9 en 6.22 ng/ml y la otra con concentración en 4.69 ng/ml, comparándolas con las pacientes en estadio I, con concentraciones en 4.34, 3.10, 3.95 y 4.42 ng/ml.

8. CONCLUSIONES

- No se detectaron en las pacientes estudiadas, diferencias significativas de las concentraciones de Galectina-9, IL 1- β e IFN- γ , con respecto al estadio y tipo histológico en pacientes con CaCu. Por lo tanto, podemos concluir que no se pudo determinar si estas variables están involucradas con este tipo de cáncer, debido a que fueron muy pocas pacientes de los diferentes estadios.
- Dentro del microambiente tumoral de las biopsias estudiadas, la población que predominó fueron los macrófagos y posiblemente al no obtener expresión de IL 1- β , los macrófagos son de la estirpe M2 que están muy relacionados con este tipo de malignidad. Además, pensamos que esto está muy relacionado con los estadios estudiados.
- Dentro de los objetivos de nuestro estudio, al determinar la concentración y expresión de las proteínas, queríamos establecer si Galectina-9 podía modular la respuesta inmunológica en estas pacientes, sin embargo, los resultados fueron negativos y concluimos que Galectina-9 no se encuentra modulando la respuesta inmunológica, al menos con nuestro número de pacientes.

9. PERSPECTIVAS DEL ESTUDIO

- Se recomienda ampliar el tamaño de la muestra para realizar otro tipo de estudios, ya sea de comparación o correlación.
- Con una muestra mayor, se pueden considerar grupos (estadio I, II, III y IV) y el mismo número de pacientes en cada grupo, para observar el comportamiento de las proteínas en cada estadio.
- Posiblemente, al conocer el comportamiento de la expresión y concentración de las proteínas en el CaCu, podrían emplearse como marcadores para el diagnóstico oportuno y pronóstico de esta malignidad.
- La limitación más importante en este estudio fue el tamaño de muestra, la cual fue muy pequeña y no se pudo realizar el análisis estadístico adecuado.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Alteri R, Brooks D, Chambers W, Chang E, Cotter J, Desantis C. Cancer facts & figures 2018; 1-71.
2. American Cancer Society. Detección temprana, diagnóstico y clasificación por etapas. Prevención y detección temprana del cancer de cuello uterino. (Internet) July 19 2016. Available from:
<https://www.cancer.org/es/cancer.html>
3. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *Ca Cancer j Clin* 2018; 0: 1-31.
4. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. Globocan 2018. Estimated cervical cancer, incidence, mortality and prevalence Mexico in 2018:
Available from:
<http://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-populations>
5. International Agency for Research on Cancer. Globocan 2012. Globocan 2012-Home. Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Available from:
<http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>
6. CNEGSR-SSA. Centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva (Internet). Cáncer de mama y cervicouterino 2014. Available from:
<https://www.gob.mx/salud%7Ccnegsr/acciones-y-programas/cancer-de-cuello-uterino-132755>
7. Secretaria de Salud. Estadísticas cáncer cervicouterino 2015. Defunciones de mujeres de 25 años y más por tumor maligno de cuello uterino (C53), 2000-2013. Available from:
<https://www.gob.mx/salud/documentos/estadisticas-cancer-cervico-uterino?state=published>
8. Hernández HDM, Apresa GT, Patlán PRM. Panorama epidemiológico del cáncer cervicouterino. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2015; 53 (2): 154-161.

9. Fonseca-Moutinho JA. Smoking and cervical cancer. *ISRN Obstet Gynecol* 2011; 1-6.
10. Instituto Nacional de Cáncer de EEUU. Pruebas de Papanicolaou y de VPH- National Cancer Institute (Internet). 2014. Available from: <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/cuello-uterino/hoja-informativa-prueba-pap-vph>
11. Cohen PA, Jhingran A, Oaknin A, Denny L. Cervical cancer. *Lancet* 2019; 393: 169-182.
12. Montalvo et al. Onco guía. Cáncer Cervicouterino. *Cancerología* 6. 2011; 61-69.
13. Belhadj H, et al. FIGO staging for carcinoma of the vulva, cérvix, and corpus uteri. *Int J Gynaecol Obstet*. 2014; 125 (2): 97-98.
14. Davila RS, Bhatia Sh, Chow LQM. Harnessing the immune System as a Therapeutic Tool in Virus-Associated Cancers. *Jama Oncology*. 2017; 3 (1): 106-112.
15. Rincón OL, Pareja LR, Jaramillo S, Aristizábal BH. Virus del Papiloma Humano, Respuesta Inmune y cáncer cervical: una relación compleja. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. 2007; 58 (3): 202-212.
16. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. *Annu Rev Immunol* 2011; 29: 235-271.
17. Rabinovich GA, Conejo GJR. Shaping the immune landscape in cancer by galectin-driven regulatory pathways. *J Mol Biol* 2016; 428 (16): 1-36.
18. Hasan AE, et al. Galectins in cancer: carcinogenesis, diagnosis and therapy. *Ann Transl Med* 2014; 2 (9): 1-7.
19. Zheng Y, Feng W, Wang YJ, Sun Y, Shi G and Yu Q. Galectins as potential emerging key targets in different types of Leukemia. *Eur J of Pharmacol* 2018; 844: 73-78.
20. Martínez MP, Milflores FL, Vallejo RV. La Galectina-9 y sus efectos protectores contra el cáncer. *Alianzas y tendencias-BUAP* 2018; 3(9): 1-8.
21. González SAG, Nava A. Galectinas. *El residente*. 2014; 9(1): 9-14.
22. Yang RY, Rabinovich GA and Liu FT. Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev Mol Med* 2008; 13: 1-24.

23. Pinto NA, Morosi LG, Maller SM and Rabinovich GA. Circuitos inmunológicos y vasculares mediados por lectinas y glicanos: implicancias en el desarrollo de nuevas terapias en cáncer y enfermedades autoinmunes. *Revista Química Viva* 2017; 1(16): 1-18.
24. Matsuura Ai, Tsukada J, Mizobe T, Higashi T, Mouri F, Tanikawa R et al. Intracellular galectin-9 activates inflammatory cytokines in monocytes. *Genes to Cells* 2009; 14: 511-521.
25. Wiersma VR, De Bruyn M, Helfrich W, Bremer E. Therapeutic Potential of Galectin-9 in Human Disease. *Medicinal Research Reviews* 2011; 1-25.
26. Bi S, Earl LA, Jacobs L, Baum LG. Structural features of galectin-9 and galectin-1 that determine distinct T cell death pathways. *J Biol Chem* 2008; 283: 12248-12258.
27. Li Y, Feng J, Geng S, Geng S, Wei H, Chen G, Li X, et al. The N- and C-terminal carbohydrate recognition domains of galectin-9 contribute differently to its multiple functions in innate immunity and adaptive immunity. *Mol Immunol* 2011; 48: 670-677.
28. Ortiz OJ, Alarcón RLC, Jiménez LMA, Garzón BVH, Calleja MI, Barrera SHA. Association of human papillomavirus 16 E6 variants with cervical carcinoma and precursor lesions in women from Southern Mexico. *Virology Journal*. 2015; 12 (29): 1-14.
29. Cedeno LF, Dimitroff CH J. Galectins and their ligands: negative regulators of anti-tumor immunity. *Glycoconj J*. 2012; 29: 1-10.
30. John S, Mishra R. Galectin-9: From cell Biology to complex disease dynamics. *J. Biosci* 2016; 41(3): 507-534.
31. Liang MY, Ueno M, Oomizu S, Arikawa T, Shinonaga R et al. Galectin-9 expression links to malignant potential of cervical squamous cell carcinoma. *Cancer Res Clin Oncol*, 2008; 134 (8): 899-907.
32. Heusschen R, Griffioen AW et Thijssen VL. Galectin-9 in tumor biology: A jack of multiple trades. *Biochim Biohys Acta* 2013; 1836 (1): 177-85.

33. Mu L, Yu W, Su H, Lin Y, Sui W, Yu X and Qin Ch. Relationship between the expressions of PD-L1 and tumour-associated fibroblasts in gastric cancer. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2019; 47 (1): 1036-1042.
34. Paradkar PH, Joshi JV, Mertia PN, Agashe SV, Vaidya RA. Role of Cytokines in Genesis, Progression and Prognosis of Cervical Cancer. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2014; 15 (9): 3851-3864.
35. Akdis M, Aab A, Altunbulakli C, Azkur K, Costa RA, Cramer R et al. Fundamentals of allergy and immunology. Interleukins (From IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β , and TNF- α : Receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2016; 138 (4): 984-1010.
36. Vega RGB. Complejo Mayor de Histocompatibilidad. *Rev. Fac. Med UNAM*. 2009; 52(2): 86-89.
37. Asociación para el progreso de la inmunología. Universidad de Córdoba. 2014. Available from:
<http://www.inmunologiaenlinea.es/index.php/inmunologia>
38. Ma D, Jiang C, Hu X, Li Q, Li T, Yang Y, Li Ou. Methylation patterns of the IFN- γ gene in cervical cancer tissues. *Scientific Reports* 2014; 4(6331): 1-5.
39. Imaizumi T, Kumagai M, Sasaki N, Kurotaki H, Mori F, Seki M, Nishi N et al. Interferón γ stimulates the expression of galectin-9 in cultured human endothelial cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 2002; 72: 486-491.
40. Dmitrieva OS, Shilovskiy IP, Khaitov MR, Grivennikov. Interleukins 1 and 6 as main mediators of inflammation and cancer. *Biochemistry* 2016; 81(2): 80-90.
41. Chow MT, Moller A, Smyth MJ. Inflammation and immune surveillance in cancer. *Semin Cancer Biol*. 2012; 22 (1): 23-32.
42. Gening TP, Antoneeva II, Abakumova TV, Peskov AB, Sidorenko EG, Gening SO et al. Dynamics of Proinflammatory Cytokine Levels and Their Role in the Development of Local and Systemic Effects during Progressing Cervical Cancer. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2014; 57(6): 776-780.
43. Voronov E, Shouval DS, Krelin Y, Cagnano E, Benharroch D, Iwakura Y et al. IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100 (5): 2645-2650.

44. Matsumoto R, Hirashima M, Kita H, Gleich GJ. Biological Activities of Ecalectin: A Novel Eosinophil-Activating Factor. *J Immunol* 2002; 168: 1961-1967.
45. Thijssen VL, Heusschen R, Caers J, Griffioen AW. Galectin expression in cancer diagnosis and prognosis: A systematic review. *Biochimica et Biophysica Acta* 1855, 2015; 235-247.
46. Irie A, Yamauchi A, Kontani K, Kihara M, N Liu D, Shirato Y, Seki M, et al. Galectin-9, a Novel Prognostic Factor with Antimetastatic Potential in Breast Cancer. *The breast journal* 2005; 12 (5): S196-S200.
47. Choi SI, et al. Prognostic value of tumoral expression of galectin-9 in gastric cancer. *Turk J Gastroenterol* 2017; 28; 166-70.
48. Liang MY, LU Yan-mig, SHANG Yao, ZHANG Shulan. Serum galectin-9 in cervical cancer. *Nat Med J China* 2008; 88 (39).
49. Punt S, Thijssen VL, Vrolijk J, D. De Kroon C, Gorter A, Jordanova ES. Galectin-1, -3 y -9 expression and clinical significance in squamous cervical cancer. *Plos ONE* 2015; 12: 1-13.
50. Otani S, Fujii T, Kukimoto I, Yamamoto N, Tsukamoto T, Ichikawa R et al. Cytokine expression profiles in cervical mucus from patients with cervical cancer and its precursor lesions. *Cytokine* 2019; 210-219.
51. Pérez MD, Alvarado CI, Chablé MF, Arrazola GJA, Vilches CN et al. Patología del cáncer cervicouterino. *GAMO*. 2014; 13 (4): 33-38.
52. Marijine HA, Punt S, Bleeker MCG, Gaarenstroom KN, Van der Velden J et al. Prognostic effect of different PD-L1 expression patterns in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix. *Mod Pathol* 2016; 29 (7): 753-763
53. Fuentes E, Fuentes M, Alarcón M and Palomo I. Immune System Dysfunction in the Elderly. *An Acad Bras Cienc* 2017; 89 (1): 285-299.
54. Kashio Y, Nakamura K, Abedin MJ, Seki M, Nishi N et al. Galectin-9 Induces Apoptosis Through the Calcium-Calpain-Caspase-1 Pathway. *J Immunol* 2003; 170: 3631-3636.
55. Peghini BC, Reis AD, Macedo BAC, Teodoro Ld, Candido MEF, Antoniazi MM. Local cytokine profiles of patients with cervical intraepithelial and invasive neoplasia. *Hum Immunol*. 2012; 73 (9): 920-6.

56. Kobayashi A, Weinberg V, Darragh T and McCune S. Evolving immunosuppressive microenvironment during human cervical carcinogenesis. 2008; 1(5): 412-20.

57. Ancuta E, Ancuta C, Zugun EF, Iordache C, Chirieac R, Carasevici E. Predictive value of cellular immune response in cervical cancer. Rom J Morphol Embryol 2009; 50 (4): 651-655.

11. ANEXOS

11.1 ANEXO 1. SISTEMA DE CLASIFICACIÓN BETHESDA

SISTEMA BETHESDA (10)	
Células Escamosas Atípicas (CEA)	CEA-SI (Células Escamosas Atípicas de Significancia Indeterminada). Las células escamosas no son completamente normales, pero los médicos no están seguros de los cambios celulares. Pueden estar relacionados con una infección por VPH o por otros factores.
	CEA-H (Células Escamosas Atípicas-H), en estas células no se pueden excluir una Lesión Intraepitelial Escamosa de Alto Grado. Las células no parecen normales, pero los médicos no están seguros del significado de los cambios celulares. Es posible que exista un riesgo mayor de que las lesiones CEA-H sean precancerosas en comparación con las lesiones CEA-SI.
Lesiones Intraepiteliales Escamosas (LIE)	De Bajo Grado (LIE-BG), se incluyen infecciones por VPH. De bajo grado significa que se han observado los primeros cambios en el tamaño y en la forma de las células. Intraepitelial se refiere a la capa de células que forma la superficie del cérvix. Cuando las células se analizan por biopsia, se encuentra que las LIE-BG tienen cambios celulares leves que pueden clasificarse como displasias leves o neoplasias intraepiteliales de cérvix de grado 1 (NIC-1).
	De Alto Grado (LIE-AG), alteraciones con una probabilidad mayor de convertirse en cáncer. Alto grado se relaciona con cambios marcados en el tamaño y en la forma de las células anormales (precancerosas) y que las células se ven muy diferentes de las células normales. Estas lesiones tienen cambios más extensos que se clasifican como displasia moderada o grave o como categorías NIC-2, NIC-3, o NIC-2/3 (en orden de mayor gravedad). También puede revelar

	carcinoma in situ (CIS), el cual se incluye en la categoría NIC-3.
Carcinoma de Células Escamosas (CCE)	Se define como cáncer de cérvix. Las células escamosas anormales han invadido profundamente el cérvix, así como otros tejidos u órganos dependiendo de su estadificación.
Células Glandulares Atípicas (CGA)	Hace referencia a que las células no parecen normales, pero los médicos no están seguros del significado de los cambios celulares.
Adenocarcinoma endocervical in situ	Significa que se han encontrado células con graves anomalías pero que no se han diseminado más allá del tejido glandular del cérvix.
Adenocarcinoma	Incluye el cáncer del canal endocervical, el cáncer endometrial, el cáncer extrauterino y otros cánceres.

11.2 ANEXO 2. ESTADIFICACIÓN DEL CÁNCER CERVICOUTERINO

ESTADIFICACIÓN DE CÁNCER CERVICOUTERINO DE ACUERDO A LA FEDERACIÓN INTERNACIONAL DE GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA (FIGO) (12,13)		
Estadio		Descripción
I		Carcinoma confinado al cuello uterino
	IA	Tumor con invasión diagnosticado por patología. Con una profundidad máxima de 5 mm medida desde la capa basal y una extensión horizontal no > a 7 mm.
	IA1	Invasión estromal \leq 3 mm en profundidad y \leq a 7 mm de ancho
	IA2	Invasión estromal > 3 mm y < 5 mm en profundidad y \leq 7 mm de ancho
	IB	Tumor clínicamente visible confinado al cérvix o etapas pre-clínicas mayores al estadio IA
	IB1	Lesión clínicamente visible \leq 4 cm en su dimensión mayor.
	IB2	Lesión clínicamente visible > 4 cm en su dimensión mayor.
II		Tumor que se extiende más allá del cuello uterino sin llegar a la pared pélvica o el tercio inferior de la vagina.
	IIA	Tumor que invade fondos de saco vaginal sin invasión parametrial.
	IIA1	Tumor < 4 cm.
	IIA2	Tumor > 4 cm.
	IIB	Tumor con invasión parametrial, sin llegar a la pared pélvica.
III		El tumor se extiende a la pared pélvica y/o involucra el tercio inferior de vagina y/o causa hidronefrosis, riñón excluido o disfunción renal.
	IIIA	El tumor involucra el tercio inferior de la vagina y no se extiende a la pared pélvica.
	IIIB	El tumor se extiende a la pared pélvica y/o causa hidronefrosis, riñón excluido o disfunción renal.
IV		El tumor se extiende fuera de la pelvis o presenta involucro comprobado por biopsia de la mucosa vesical o rectal.
	IVA	Extensión a órganos pélvicos adyacentes.
	IVB	Metástasis a distancia.

11.3 ANEXO 3. DEFINICIÓN OPERACIONAL Y CONCEPTUAL DE LAS VARIABLES.

Galectina 9

Definición conceptual: proteína perteneciente a la familia de las galectinas.

Definición operacional: galectina asociada con la liberación de INF γ e IL-1 β en CaCu.

Interferón gamma (INF- γ)

Definición conceptual: glicoproteína de bajo PM que interviene en la respuesta inmune adaptativa y es producido por linfocitos Th1, Tc y por células NK.

Definición operacional: citocina liberada por galectina-9 en CaCu.

Interleucina 1 beta (IL1- β)

Definición conceptual: citocina que interviene en la respuesta inmune innata. Es producida por monocitos y macrófagos.

Definición operacional: citocina liberada por galectina-9 en CaCu.

Cáncer cervicouterino:

Definición conceptual: crecimiento, desarrollo y multiplicación de manera desordenada y sin control de las células del cuello del útero.

Definición operacional: diagnóstico oncológico establecido por el patólogo.

Estadio de CaCu

Definición conceptual: etapa oncológica de la enfermedad en la que se encuentra la paciente.

Definición operacional: etapa específica de la enfermedad establecida por el patólogo.

Edad

Definición conceptual: tiempo transcurrido entre la fecha de nacimiento y la fecha actual.

Definición operacional: se calculará la edad tomando en cuenta la fecha de nacimiento del expediente clínico. Se contará en años.

11.4 ANEXO 4. ESCALAS DE MEDICION DE LAS VARIABLES

VARIABLE DEPENDIENTE				
CONCENTRACIÓN				
VARIABLE DE ESTUDIO	TIPO DE VARIABLE		INSTRUMENTO DE MEDICIÓN	VALOR
Galectina-9	Cuantitativa	Continua	ELISA	3.10-10.4 ng/ml
INF- γ	Cuantitativa	Continua	ELISA	1.09-422.55 pg/ml
IL1- β	Cuantitativa	Continua	ELISA	1.69-12.71 pg/ml

VARIABLE DEPENDIENTE				
EXPRESIÓN				
VARIABLE DE ESTUDIO	TIPO DE VARIABLE		INSTRUMENTO DE MEDICIÓN	VALOR
Galectina-9	Cuantitativa	Discreta	Inmunohistoquímica	% de células positivas/tres campos
INF- γ	Cuantitativa	Discreta	Inmunohistoquímica	% de células positivas/tres campos
IL1- β	Cuantitativa	Discreta	Inmunohistoquímica	% de células positivas/tres campos

VARIABLE INDEPENDIENTE			
VARIABLE DE ESTUDIO	TIPO DE VARIABLE		VALOR
Diagnóstico	Cualitativa	Nominal/Politómica	1.Carcinoma de Células Escamosas 2.Adenocarcinoma 3.Otros
Estadio de CaCu	Cualitativa	Nominal/politómica	1.I 2.II 3. III 4. IV
VARIABLE SOCIODEMOGRÁFICA			
Edad	Numérica	Continua	Años

11.5 ANEXO 5. FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

Coordinación de Investigación en Salud
Comisión Nacional de Investigación Científica

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN:

Expresión de Galectina 9 en cáncer cervicouterino: marcador predictivo de respuesta al tratamiento y supervivencia

Patrocinador externo: NO APLICA

Lugar y Fecha: _____

No. de registro: R-2017-785-119 _____

Justificación y objeto del estudio

Estimada Paciente, se le invita a participar en el estudio de investigación, **Expresión de Galectina 9 en cáncer cervicouterino: marcador predictivo de respuesta al tratamiento y supervivencia**, registrado ante la Comisión Nacional de Investigación Científica del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Dicho proyecto se llevará a cabo en Unidad Médica de Alta Especialidad, CMN Manuel Ávila Camacho del IMSS, y en el Centro de Investigación Biomédica de Oriente, ubicado en la ciudad de Metepec, Puebla. El objetivo de la investigación es: Evaluar la expresión de galectina-9 en cáncer cervicouterino como un marcador predictivo de respuesta al tratamiento y supervivencia.

La galectina-9 es una proteína que participa en muchas funciones de la célula, como controlar la velocidad a la que se divide, o la capacidad que tiene de invadir otros tejidos.

Cuando una célula normal se transforma en una célula tumoral o cancerosa se presentan muchas alteraciones, una de ellas es la disminución en la cantidad de esta proteína, estos cambios le permiten a la célula cancerosa dividirse sin control lo que favorece el crecimiento del tumor.

Este proyecto en particular está dedicado al estudio de una región del cuerpo de las mujeres llamada cervix o cuello del útero (matriz), que es el sitio en el que se unen la matriz y la vagina. En este sitio se desarrolla un tipo de cáncer llamado cervicouterino (cáncer del cuello del útero).

Tal vez usted ya sabe que el cáncer cervicouterino es una enfermedad grave que afecta a muchas mujeres mexicanas, por lo que el presente proyecto busca determinar si analizar la cantidad de galectina 9 puede ayudar a determinar el pronóstico del tumor, o dar seguimiento a las pacientes para identificar si existe una recaída, lo cual podría ser utilizado para identificar la presencia de cáncer lo más pronto posible. La cantidad de esta proteína en el tejido del cuello del útero puede modificarse en relación a la presencia y el tipo de virus del papiloma humano.

Usted ha sido elegida para participar en este proyecto de investigación porque al realizarle estudios de patología el reporte indicó que usted tiene cáncer cervicouterino.

Al igual que usted, serán invitadas a participar otras pacientes que, de forma voluntaria y sin ninguna presión, acepten participar en el estudio. Por favor lea la información que le estamos proporcionando y si tiene alguna pregunta, con gusto le aclararemos sus dudas.

Su participación es voluntaria y su decisión de participar o no en este proyecto no afecta en nada su relación con el IMSS, es decir que Usted seguirá recibiendo la atención médica requerida para mejorar su salud independientemente de que decida o no participar en este estudio.

Procedimientos

Como parte de la atención que normalmente le brinda el IMSS, Usted se le realizan algunas preguntas sobre su estado de salud y sus antecedentes clínicos, se le realizará una exploración física minuciosa y los estudios de laboratorio que su médico juzgue convenientes, así como los procedimientos clínicos o quirúrgicos necesarios para tratar su enfermedad, en caso de tenerla. En este sentido el participar en el estudio no hará ningún cambio respecto a la atención que le brinda su médico en esta unidad, si es que fuera necesario.

Dependiendo de la etapa en que se encuentre su enfermedad (cáncer), se le realizarán diferentes tipos de tratamiento, los cuales incluyen cirugía, radioterapia y/o quimioterapia, su médico oncólogo, determinará cuál es el tratamiento más adecuado para tratar su enfermedad, para esto tomará en cuenta su edad, el número de hijos que haya tenido, su condición en general y el grado de avance de su enfermedad.

En ciertos casos de cáncer el médico decide retirar la parte del cuello de la matriz que está lesionada, mediante un tratamiento quirúrgico que se llama conización o simplemente cono (ya que la parte removida tiene dicha forma). En otros casos el médico puede decidir por retirarle quirúrgicamente toda la matriz (o útero), los ovarios y ganglios, si estuvieran comprometidos. Recuerde que esto dependerá de la gravedad de su enfermedad y las decisiones que tome el médico oncólogo que la está tratando, y en ningún caso se hace con el fin de aportar muestras a este proyecto de investigación.

Como parte de este estudio se le pedirá responder a un cuestionario que le aplicará una enfermera o un auxiliar del proyecto. El tiempo requerido para completar el cuestionario será de máximo 15 minutos.

Se le tomará una muestra del cuello del útero, siguiendo el mismo procedimiento utilizado para el estudio de Papanicolaou (raspado cervical); esta muestra se utilizará para conocer mediante procedimientos de laboratorio el tipo de virus de papiloma humano presente en las células.

Se le tomará una muestra de 3 ml sangre, que equivalente a media cucharadita cafetera, para evaluar la concentración de galectina-9 y determinar si está asociada con la presencia de la enfermedad.

Se le solicita su autorización para poder utilizar parte del tejido que le haya sido retirado, ya sea como cono, biopsia o útero completo, para realizar otras pruebas de laboratorio que nos ayuden a identificar la cantidad de galectina 9. También le pedimos su autorización para conservar y almacenar las partes de las muestras de tejido no utilizadas en este estudio, para ser utilizadas en otros proyectos de investigación futuros que ayuden a detectar, prevenir y tratar el cáncer cervicouterino.

Así mismo, se le pedirá una muestra de sangre al concluir el tratamiento y aproximadamente cada seis meses durante su seguimiento hasta que sea dada de alta (a los 5 años), en este momento, termina su participación en el estudio.

Por ningún motivo se solicitará que usted asista al Hospital para la toma de muestra, esta se hará durante las citas de revisión que usted tenga programadas. Al respecto cuando se haga la toma de muestras de sangre de seguimiento, se tomarán algunos datos clínicos con respecto a la evolución de la enfermedad, tipo de tratamientos aplicados, resultados de laboratorio, estos datos serán tomados de su expediente concluyendo la consulta, lo que tomará máximo 5 min.

Los investigadores analizaremos los resultados y los publicaremos en Foros y revistas especializadas, sin que sea posible identificar a ninguna participante.

Posibles riesgos y molestias.

La toma de las muestras de laboratorio no implica riesgo para usted porque será realizada por personal médico capacitado.

El raspado cervical se realiza con un cepillo desechable (solo se usa una vez) que raspa suavemente la superficie del cuello de la matriz. Las molestias que usted podría presentar son las mismas que usted ha sentido cuando le toman muestras para el Papanicolaou. En algunas ocasiones se puede presentar ligero dolor, pero éste desaparece en poco tiempo sin necesidad de recibir medicamentos.

La toma de sangre le ocasionará molestias mínimas, como el leve dolor por el piquete con la aguja en el antebrazo al tomar la muestra de sangre, existiendo la posibilidad de formarse un moretón en el lugar de la toma de muestra de sangre.

Las muestras de tejido serán tomadas de las de la biopsia que le fue tomada para realizar el diagnóstico de su enfermedad.

Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio.

Por su participación en el estudio usted no tendrá que hacer ningún gasto y tampoco recibirá ningún pago. La atención médica, medicamentos, exámenes, tratamientos y cirugías, etc. que requiera para su enfermedad será proporcionados por el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), gracias a que usted es derechohabiente.

Su participación en el estudio no tendrá ningún beneficio inmediato para usted, sin embargo, será importante ya que ayudará a que esta enfermedad se conozca mejor y podamos proponer mejores métodos de diagnóstico; esto beneficiará en el futuro a otras personas que sufran de la misma enfermedad.

Información sobre resultados y alternativas de tratamiento,

Ya que los resultados de este estudio no cambiarían el pronóstico, la evolución, ni el tratamiento de su enfermedad, no se considera necesario entregarle ningún reporte del mismo. Pero si usted está interesada en conocer los resultados del proyecto, tiene el derecho de solicitarlos al investigador responsable.

Participación o retiro. Su participación en este estudio es completamente voluntaria; si usted decide no participar en el estudio, seguirá recibiendo la atención brindada por el IMSS y se le ofrecerán los procedimientos y tratamientos habituales. De la misma forma, usted podrá abandonar el estudio en el momento que así lo decida, sin que eso afecte el seguimiento o la atención que se le proporciona en el IMSS.

Privacidad y confidencialidad. La información será guardada de manera confidencial y por separado para garantizar su privacidad. Cuando se conjunten los datos de todos los participantes en el estudio y se realice el análisis, su nombre permanecerá oculto, al igual que al presentar los resultados en una publicación o conferencia.

Solo cuando el médico tratante lo solicite se le proporcionarán los resultados obtenidos de este estudio, o bien cuando por alguna situación especial lo requiera la ley.

En caso de colección de material biológico:

- No autorizo que se tome la muestra.
- Si autorizo que se tome la muestra solo para este estudio.
- Si autorizo que se tome la muestra para este estudio y estudios futuros. Las muestras serán almacenadas por un periodo de 10 años.

Beneficios al término del estudio:

Al término del estudio, los resultados generados permitirán evaluar si la determinación de galectina-9 puede ser utilizada como un marcador para dar seguimiento a las pacientes con CaCu y determinar de manera más temprana su exista una recaída o persistencia de la enfermedad.

Si tiene usted preguntas o desea hablar con alguien del equipo médico, puede comunicarse con el Responsable Médico del Proyecto en su Unidad:

Dr. _____ Teléfono: _____ correo: _____

En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse con su médico o con la investigadora responsable del estudio la Dra. Verónica Vallejo Ruiz al teléfono (244) 444 01 22 de lunes a viernes de las 8:00 a las 16:00 horas o cualquier día de la semana al celular 22 21 60 21 54, con sede en la Ciudad de Puebla México. En caso de requerir mayor y más detallada información, puede escribir al correo veronica.vallejor@imss.gob.mx

En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a la Comisión de Ética de la Comisión Nacional de Investigación Científica del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos, Col. Doctores. México, D.F., CP 06720. Teléfono (55) 56276900 extensión 21230, Correo electrónico: comiteeticainv.imss@gmail.com

DECLARACION DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

Se me ha explicado con claridad en qué consiste el estudio, además he leído el contenido de este formato de consentimiento; se me ha dado la oportunidad de hacer preguntas y todas mis dudas han sido aclaradas; consta en esta carta con mi firma mi participación voluntaria.

Nombre y firma del participante

Firma del encargado de obtener el consentimiento informado

Le he explicado el estudio de investigación ala participante y he contestado todas sus preguntas. Creo que ella entiende la información descrita en este documento y libremente da su consentimiento a participar en este estudio de investigación.

Nombre del encargado de obtener el consentimiento informado

Firma del encargado de obtener el Consentimiento Informado Fecha

Testigo 1

Nombre, dirección, relación con el paciente y firma

Testigo 2

Nombre, dirección, relación con el paciente y firma

11.6 ANEXO 6. BIOÉTICA

Las personas que participaron en la investigación tienen garantía de respeto a los principios de autonomía, beneficencia, no maleficencia y justicia, se incluirán en el estudio sólo aquellas que aceptaron que su muestra fuera utilizada para otros estudios, firmando la carta de consentimiento informado correspondiente (Anexo 5), en el entendido de que podrán retirarse del estudio si sus intereses así lo convienen.

Además, se mantendrá en el anonimato la identidad de dichos participantes y se pondrán a la disposición de estos últimos los datos obtenidos.

De acuerdo al REGLAMENTO de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, en el artículo 17 se considera sin riesgo ya que no se volverá a tomar muestra de sangre y sólo se incluirán las que se tienen almacenadas. Por otra parte, ya se cuenta con las biopsias que se obtuvieron para el diagnóstico patológico.

El estudio cumplirá con las pautas de la declaración de Helsinki, además del instructivo para la operación de la Comisión de Investigación Científica y de los Comités locales de Investigación de la FM de la BUAP, de la UMAE-HE-CMN-MAC-IMSS y del CIBIOR-IMSS.

11.7 ANEXO 7. DESCRIPCIÓN DE LAS TÉCNICAS DE MEDICIÓN.

11.7.1 TÉCNICA DE ELISA (ENSAYO POR INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS)

11.7.1.1 ELISA PARA DETECCIÓN DE GALECTINA-9

COLECCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LA MUESTRA.

Se empleó un Tubo Separador Sérico (TSS) y se permitió que las muestras se coagularán por 30 minutos a temperatura ambiente antes de la centrifugación durante 15 minutos a 1000 x g. Se retiró el suero, se alicuotaron y se almacenaron las muestras a ≤ -20 °C.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.

Las muestras séricas se diluyeron cuatro veces. La dilución fue 60 μ L de muestra + 180 μ L de Diluyente Calibrador RD6-35, dando un total de 240 μ L.

Wash Buffer. Se añadieron 20 ml de Concentrado de Solución de Lavado a 480 ml de agua desionizada o destilada, con lo cual se prepararon 500 ml de tampón de Solución de Lavado.

Solución de sustrato. Los reactivos de peróxido de hidrógeno y cromógeno se mezclaron juntos en igual volumen dentro de los 15 minutos de su uso. Se protegieron de la luz. Se emplearon 200 μ L de la mezcla resultante por pozo.

- 1) **Galectina-9 Standard.** Se reconstituyo Galectina-9 Standard con agua desionizada o destilada, de acuerdo a lo referido en la etiqueta del vial para ver el volumen. Se mezcló el standard para asegurar la reconstitución completa, permitiendo que el standard se sentara por un mínimo de 15 minutos, con agitación gentil antes de realizar las diluciones. Esta reconstitución produjo una solución de reserva de 100 ng/ml. De esta reconstitución se tomaron 60 μ L y se vaciaron en el tubo de 10 ng/ml.

- 2) De los 21 ml de Diluyente Calibrador RD6-35 se pipetearon 540 μ L y se vaciaron a un tubo de 10 ng/ml. Del tubo de 10 ng/ml se pipetearon 300 μ L del estándar de 10 ng/ml en los tubos restantes. Se emplearon la solución de reserva para producir seis diluciones. Se mezcló cada tubo completamente antes de transferir al siguiente. Los 10 ng/ml standard sirvieron como el estándar alto. El Calibrador Diluyente apropiado sirvió como el standard zero (0 ng/ml).
- 3) Se prepararon todos los reactivos, estándares de trabajo y muestras.
- 4) Se añadieron 100 μ L del diluyente de ensayo RD1-9 (11 ml de una proteína buffer base con preservativos) a cada pozo. Debido a que el diluyente de ensayo RD1-9 podía contener precipitado, se mezcló bien antes y durante su uso.
- 5) Se añadieron 100 μ L de Standard, control o muestra por pozo. Se cubrió con la tira adhesiva. Se incubó por dos horas a temperatura ambiente sobre un agitador de microplacas orbital (0.12" orbit), se estableció en 500 +- 50 rpm.
- 6) Se aspiró y lavó cada pozo, se repitió el proceso tres veces para un total de cuatro lavados. Se lavó llenando cada pozo con Solución de Lavado (400 μ L). Se eliminó en forma completa el líquido en cada paso para una buena ejecución. Después del último lavado, se retiró cualquier remanente de Solución de Lavado por aspiración o decantación. Se invirtió la placa sobre una toalla de papel.
- 7) Se añadieron 200 μ L de Galectina-9 conjugada a cada pozo. Se cubrió con una nueva tira adhesiva. Se incubó por 2 horas a temperatura ambiente sobre el agitador.
- 8) Se repitió la aspiración y se lavó como en el paso 6.
- 9) Se añadieron 200 μ L de Solución Substrato a cada pozo y se protegieron de la luz. Se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente sobre la mesa de trabajo.

- 10) Se añadieron 50 μ L de solución de paro a cada pozo. El color de los pozos cambió de azul a amarillo. Se golpeo gentilmente la placa para asegurar la mezcla completa.
- 11) Se determinó la densidad óptica de cada pozo dentro de los 30 minutos, se empleó una microplaca lectora ajustada para 450 nm. Se restaron a las lecturas de 450 nm las de 570 nm. Esta resta corrigió las imperfecciones ópticas de la placa. Se consideró que las lecturas realizadas directamente en 450 nm sin corrección podrían ser más altas y menos precisas.

11.7.1.2 ELISA PARA DETECCIÓN DE INTERLEUCINA1- β

- 1) Preparación del diluyente de ensayo:** del frasco del diluyente de ensayo que contenía 30 ml, se tomaron 10 ml y se agregaron a 40 ml de agua desionizada, quedando así la solución de trabajo.
- 2) Preparación del estándar:** se añadieron 5 μ l del estándar y se llevaron a 10 ml de diluyente de ensayo (5 μ l del estándar + 9995 μ l de diluyente de ensayo), se agitó suavemente.
- 3)** A cada tubo eppendorf se le añadieron 500 μ l de diluyente de ensayo.
- 4)** De la preparación del estándar (5 μ l del estándar + 9995 μ l de diluyente de ensayo), se tomó 1 ml y se vació en un tubo de eppendorf, de este ml se tomaron 500 μ l para realizar las diluciones posteriores, quedando 500 μ l del estándar + 500 μ l de diluyente ensayo en cada eppendorf hasta realizar 8 diluciones, el último estándar sirvió como el estándar cero.
- 5)** Una vez realizadas las diluciones de los estándar, se colocaron 100 μ l a cada pozo de su respectiva dilución estándar, por duplicado.
- 6)** Se añadieron 100 μ l/pozo de las muestras problema (120 μ l de suero + 120 μ l de diluyente= 240 μ l). Se colocó la placa en la cámara húmeda y se mantuvo en el agitador por dos horas.
- 7) Preparación del anticuerpo primario de detección (Anti IL 1- β humano conjugado) (dilución 1X):** de acuerdo a lo establecido por el inserto, la dilución correspondió a 48 μ l de solución del anticuerpo en 12 ml de diluyente

de ensayo (preparación en el paso 1). Debido a que se tenían que aplicar 100 μ l por pozo de anticuerpo y ocupamos 56 pozos, se requirieron 5600 μ l de diluyente, para que no faltara solución, en lugar de preparar 5600 μ l se prepararon 6 000 μ l (6 ml), lo que correspondió por regla de tres a 24 μ l. La preparación quedó 24 μ l de anticuerpo de detección + 5976 μ l de diluyente de ensayo, dando un total de 6 000 μ l de toda la dilución.

- 8) Preparación solución buffer:** se diluyó el contenido del sobre en un litro de agua desionizada.
- 9)** Posterior a las dos horas de incubación de las muestras problema y el estándar, se sacudió el contenido de la placa, se colocaron 250 μ l de solución buffer en cada pozo, se colocó la placa en la cámara húmeda y se mantuvo en el agitador por 3 minutos. Después de este tiempo se retiró el sobrante y se continuó con los lavados, este proceso se realizó 5 veces (5 lavados).
- 10)** Una vez preparado el anticuerpo primario de detección, con la placa vacía después de los lavados, se aplicaron 100 μ l del anticuerpo a cada pozo y se dejó incubar por dos horas.
- 11)** Posterior a la incubación, se retiró el sobrante y se procedió a lavar los pozos, se realizaron 5 lavados en total, como en el paso 9.
- 12) Preparación del anticuerpo secundario de detección (Avidin-HRP).** De acuerdo a lo establecido por el inserto, la dilución correspondió a 48 μ l de solución del anticuerpo en 12 ml de diluyente de ensayo (de acuerdo a la preparación en el paso 1). Debido a que se tenían que aplicar 100 μ l por pozo de anticuerpo y ocupamos 56 pozos, se requirieron 5600 μ l de diluyente, para que no faltara solución, en lugar de preparar 5600 μ l se prepararon 6 000 μ l (6 ml), lo que correspondió por regla de tres a 24 μ l. La preparación quedó 24 μ l de anticuerpo de detección + 5976 μ l de diluyente de ensayo, dando un total de 6 000 μ l de toda la dilución.
- 13)** De la preparación previa de avidina, con la placa vacía, se colocaron 100 μ l a cada pozo con la luz apagada, posteriormente se colocó en la cámara húmeda y se mantuvo en agitación tenue por 40 minutos.

- 14) Se retiró el sobrante, se lavó con solución buffer y se colocó en el agitador, se siguieron los pasos como en el punto 9 para un total de 7 lavados.
- 15) Después del último lavado, se retiró la placa del agitador, se tiró el sobrante y se colocaron 100 μ l de solución sustrato (sin dilución). Se colocó la placa en la cámara húmeda y se mantuvo en agitación por 15 minutos. Se observó el cambio de coloración de cada pozo.
- 16) Posterior a lo anterior, se añadieron 50 μ l de solución de paro (sin dilución) a cada pozo, quedando este pozo con 150 μ l (100 μ l de solución sustrato + 50 μ l de solución de paro).
- 17) Finalmente se llevó a cabo la lectura de la placa a 450 y se analizaron los resultados obtenidos.

11.7.1.3 ELISA PARA DETECCIÓN DE INTERFERÓN- γ

- 1) **Preparación del diluyente de ensayo:** del frasco del diluyente de ensayo que contenía 30 ml, se tomaron 10 ml y se agregaron a 40 ml de agua desionizada, quedando así la solución de trabajo.
- 2) **Preparación del estándar:** se añadieron 5 μ l del estándar y se llevaron a 10 ml de diluyente de ensayo (5 μ l del estándar + 9995 μ l de diluyente de ensayo), se agitó suavemente.
- 3) A cada tubo eppendorf se le añadieron 500 μ l de diluyente de ensayo.
- 4) De la preparación del estándar (5 μ l del estándar + 9995 μ l de diluyente de ensayo), se tomó 1 ml y se vació en un tubo de eppendorf, de este ml se tomaron 500 μ l para realizar las diluciones posteriores, quedando 500 μ l del estándar + 500 μ l de diluyente de ensayo en cada eppendorf hasta realizar 8 diluciones, el último estándar sirvió como el estándar cero.
- 5) Una vez realizadas las diluciones de los estándar, se colocaron 100 μ l a cada pozo de su respectiva dilución estándar, por duplicado.

- 6) Se añadieron 100 μ l/pozo de las muestras problema (120 μ l de suero + 120 μ l de diluyente= 240 μ l). Se colocó la placa en la cámara húmeda y se mantuvo en el agitador por dos horas.
- 7) **Preparación del anticuerpo primario de detección (Anti IFN- γ humano conjugado con biotina)(dilución 1X):** de acuerdo a lo establecido por el inserto, la dilución correspondió a 48 μ l de solución del anticuerpo en 12 ml de diluyente de ensayo (preparación en el paso 1). Debido a que se tenían que aplicar 100 μ l por pozo de anticuerpo y ocupamos 56 pozos, se requirieron 5600 μ l de diluyente, para que no faltara solución, en lugar de preparar 5600 μ l se prepararon 6 000 μ l (6 ml), lo que correspondió por regla de tres a 24 μ l. La preparación quedó 24 μ l de anticuerpo de detección + 5976 μ l de diluyente de ensayo, dando un total de 6 000 μ l de toda la dilución.
- 8) **Preparación solución buffer:** se diluyó el contenido del sobre en un litro de agua desionizada.
- 9) Posterior a las dos horas de incubación de las muestras problema y el estándar, se sacudió el contenido de la placa, se colocaron 250 μ l de solución buffer en cada pozo, se colocó la placa en la cámara húmeda y se mantuvo en el agitador por 3 minutos. Después de este tiempo, se retiró el sobrante y se continuó con los lavados, este proceso se realizó 5 veces (5 lavados).
- 10) Una vez preparado el anticuerpo primario de detección, con la placa vacía después de los lavados, se aplicaron 100 μ l del anticuerpo a cada pozo y se dejó incubar por dos horas.
- 11) Posterior a la incubación, se retiró el sobrante y se procedió a lavar los pozos, se realizaron 5 lavados en total, como en el paso 9.
- 12) **Preparación del anticuerpo secundario de detección (Avidina-HRP).** De acuerdo a lo establecido por el inserto, la dilución correspondió a 48 μ l de solución del anticuerpo en 12 ml de diluyente de ensayo (de acuerdo a la preparación en el paso 1). Debido a que se tenían que aplicar 100 μ l por pozo de anticuerpo y ocupamos 56 pozos, se requirieron 5600 μ l de diluyente, para que no faltara solución, en lugar de preparar 5600 μ l se prepararon 6 000 μ l

(6 ml), lo que correspondió por regla de tres a 24 μ l. La preparación quedó 24 μ l de anticuerpo de detección + 5976 μ l de diluyente de ensayo, dando un total de 6 000 μ l de toda la dilución.

- 13)** De la preparación previa de avidina, con la placa vacía, se colocaron 100 μ l a cada pozo con la luz apagada, posteriormente se colocó en la cámara húmeda y se mantuvo en agitación tenue por 40 minutos.
- 14)** Se retiró el sobrante, se lavó con solución buffer y se colocó en el agitador, se siguieron los pasos como en el punto 9 para un total de 7 lavados.
- 15)** Después del último lavado, se retiró la placa del agitador, se tiró el sobrante y se colocaron 100 μ l de solución sustrato (sin dilución). Se colocó la placa en la cámara húmeda y se mantuvo en agitación por 15 minutos. Se observó el cambio de coloración de cada pozo.
- 16)** Posterior a lo anterior, se añadieron 50 μ l de solución de paro (sin dilución) a cada pozo, quedando este pozo con 150 μ l (100 μ l de solución sustrato + 50 μ l de solución de paro).
- 17)** Finalmente se llevo a cabo la lectura de la placa a 450 y se analizaron los resultados obtenidos.

11.7.2 TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA

11.7.2.1 TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA PARA IL 1- β

- 1) Se colocaron las laminillas en estufa bacteriológica a 60 $^{\circ}$ C por una hora.
- 2) Se desparafinó el tejido con Xilol
Xilol 1 por 5 minutos
Xilol 2 por 5 minutos
- 3) Se hidrató la sección de tejido en una serie de gradientes de etanol por 5 minutos.
Etanol al 100% por 5 minutos

- Etanol al 100% por 5 minutos
- Etanol al 96% por 5 minutos
- Etanol al 80% por 5 minutos
- Etanol al 70% por 5 minutos

- 4) Se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno.
- 5) Se retiró el exceso de agua con una toalla alrededor del tejido, sin que el tejido quedara seco y se aplicaron 20 μ l de tripsina al 0.25% pH 7.2-8.0 (Gibco 15050065) quedando cubierto todo el tejido.
- 6) Se colocó el tejido en cámara húmeda por 30 minutos a 37 °C en estufa. Se colocó el filtro en cámara húmeda y se agregó agua desionizada o destilada.
- 7) Se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno.
- 8) Se aplicó el anticuerpo primario monoclonal anti-IL 1- β (dilución 1:1000) 20, 30, 40 μ l (en función del tamaño del tejido) sin que se secase el tejido. Se colocó en cámara húmeda y se deja en refrigeración toda la noche (24 horas).

AL SIGUIENTE DÍA:

- 9) Se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno.
- 10) Se apagó la peroxidasa con una solución que contenía 50 ml metanol + 150 ml de peróxido de hidrógeno (agua oxigenada), se colocaron solución y laminillas en el coplin por 30 minutos.
- 11) Se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno.

- 12) Se aplicó el anticuerpo secundario, de tipo policlonal anti-IgG de ratón en chivo, acoplado a peroxidasa (dilución 1:100) (el diluyente empleado fue PBS 2.5%) en cantidad de 20,30,40 μ l (en función del tamaño del tejido) sin que secase el tejido, se dejó en cámara húmeda durante 1 hora.
- 13) Se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno.
- 14) Se aplicó DAB (Diaminobencidina) 10, 20 μ l sobre el tejido (tinción inmunohistoquímica) y se colocan en cámara húmeda por 30 minutos.
- 15) Se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno.
- 16) Se tiñó laminilla con hematoxilina en coplin por 25-30 segundos.
- 17) Se lavó laminilla con agua de llave, teniendo cuidado que el chorro de agua no cayera directo en el tejido.
- 18) Se deshidrató el tejido:
 - Alcohol 70% 5 minutos
 - Alcohol 80% 5 minutos
 - Alcohol 96% 5 minutos
 - Alcohol 100% 5 minutos
 - Alcohol 100% 5 minutos

 - Xilol 2do. baño 5 minutos
 - Xilol 1er. baño 5 minutos
- 19) Se colocó una gota de resina y se cubrió laminilla con un portaobjetos, una vez que quedó fijo el portaobjetos, se observó la expresión de IL 1- β .

11.7.2.2 TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA PARA INTERFERÓN- γ

- 1) Se colocaron las laminillas en estufa bacteriológica a 60 °C por una hora.
- 2) Se desparafinó el tejido con Xilol.
Xilol 1 por 5 minutos
Xilol 2 por 5 minutos
- 3) Se hidrató la sección de tejido en una serie de gradientes de etanol por 5 minutos.
Etanol al 100% por 5 minutos
Etanol al 100% por 5 minutos
Etanol al 96% por 5 minutos
Etanol al 80% por 5 minutos
Etanol al 70% por 5 minutos
- 4) Se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno.
- 5) Se retiró el exceso de agua con una toalla alrededor del tejido, sin que el tejido quedara seco y se aplicaron 20 μ l de tripsina al 0.25% pH 7.2-8.0 (Gibco 15050065) quedando cubierto todo el tejido, de ser necesario se aplicó más.
- 6) Se colocó el tejido en cámara húmeda por 30 minutos a 37 °C en estufa. Se colocó el filtro en cámara húmeda y se agregó agua desionizada o destilada.
- 7) Se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno.
- 8) Se aplicó el anticuerpo primario monoclonal anti-IFN- γ (dilución 1:10) 20, 30, 40 μ l (en función del tamaño del tejido) sin que se secase el tejido. Se colocó en cámara húmeda y se deja en refrigeración toda la noche (24 horas).

AL SIGUIENTE DÍA:

- 9) Se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno.
- 10) Se apagó la peroxidasa con una solución que contenía 50 ml metanol + 150 ml de peróxido de hidrógeno (agua oxigenada), se colocaron solución y laminillas en el coplin por 30 minutos.
- 11) Se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno.
- 12) Se aplicó el anticuerpo secundario, de tipo policlonal, anti-IgG de ratón en chivo, acoplado a peroxidasa, dilución 1:100 (el diluyente empleado fue PBS 2.5%) en cantidad de 20,30,40 μ l (en función del tamaño del tejido) sin que secase el tejido, se dejó en cámara húmeda durante 1 hora.
- 13) Se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno.
- 14) Se aplicó DAB (Diaminobencidina) 10, 20 μ l sobre el tejido (tinción inmunohistoquímica) y se colocan en cámara húmeda por 30 minutos.
- 15) Se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno.
- 16) Se tiñó laminilla con hematoxilina en coplin por 25-30 segundos.
- 17) Se lavó laminilla con agua de llave, teniendo cuidado que el chorro de agua no cayera directo en el tejido.
- 18) Se deshidrató el tejido:
 - Alcohol 70% 5 minutos
 - Alcohol 80% 5 minutos
 - Alcohol 96% 5 minutos

Alcohol 100% 5 minutos

Alcohol 100% 5 minutos

Xilol 2do. baño 5 minutos

Xilol 1er. baño 5 minutos

19) Se colocó una gota de resina y se cubrió laminilla con un portaobjetos, una vez que quedó fijo el portaobjetos, se observó la expresión de IL 1- β .

11.7.2.3 *TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA PARA GALECTINA-9.*

1) Se colocaron las laminillas en estufa bacteriológica a 60 °C por una hora.

2) Se desparafinó el tejido con Xilol

Xilol 1 por 5 minutos

Xilol 2 por 5 minutos

3) Se hidrató la sección de tejido en una serie de gradientes de etanol por 5 minutos.

Etanol al 100% por 5 minutos

Etanol al 100% por 5 minutos

Etanol al 96% por 5 minutos

Etanol al 80% por 5 minutos

Etanol al 70% por 5 minutos

4) Se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno.

5) Se aplicaron 20 μ l de tripsina, quedando cubierto todo el tejido, de ser necesario se aplicó más.

- 6) Se colocó el tejido en cámara húmeda por 30 minutos a 37 °C en estufa. Se colocó el filtro en cámara húmeda y se agregó agua desionizada o destilada.
- 7) Se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno.
- 8) Se aplicó el anticuerpo primario monoclonal específico para Galectina-9 humana (dilución 1:250), 20, 30, 40 μ l sin que se seque el tejido. Se colocó en cámara húmeda y se deja en refrigeración toda la noche (24 horas).

AL SIGUIENTE DÍA:

- 9) Se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno.
- 10) Se apagó la peroxidasa con una solución que contenía 50 ml metanol + 150 ml de peróxido de hidrógeno (agua oxigenada), se colocaron laminillas y solución en el coplin por 30 minutos, no se eliminó la solución.
- 11) Se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno.
- 12) Se aplicó el anticuerpo secundario, de tipo policlonal anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa (dilución 1:1000) 20,30,40 μ l (en función del tamaño del tejido) sin que seque el tejido, se dejó en cámara húmeda durante 1 hora.
- 13) Se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno.
- 14) Se aplicó DAB (Diaminobencidina) 10, 20 μ l sobre el tejido (tinción inmunohistoquímica) y se colocan en cámara húmeda por 30 minutos.
- 15) Se realizaron 3 lavados con PBS por 5 minutos cada uno.

- 16) Se tiñó laminilla con hematoxilina en coplin por 25-30 segundos.

- 17) Se lavó laminilla con agua de llave, teniendo cuidado que el chorro de agua no cayera directo en el tejido.

- 18) Se deshidrató el tejido:
 - Alcohol 70% 5 minutos
 - Alcohol 80% 5 minutos
 - Alcohol 96% 5 minutos
 - Alcohol 100% 5 minutos
 - Alcohol 100% 5 minutos

 - Xilol 2do. baño 5 minutos
 - Xilol 1er. baño 5 minutos

- 20) Se colocó una gota de resina y se cubrió la laminilla con un portaobjetos, una vez que quedó fijo el portaobjetos, se observó la expresión de Galectina-9.

11.8 ANEXO 8. HOJA DE CONCENTRACIÓN DE DATOS

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA		
BUAP		
FACULTAD DE MEDICINA		
HOJA DE CONCENTRACIÓN DE DATOS DEL PROTOCOLO:		
<i>"Determinación de la expresión y concentración de Galectina-9, interferón gamma e interleucina 1 beta en pacientes con cáncer cervicouterino"</i>		
No. de registro del protocolo:		
No. de registro del paciente:		
Fecha de realización de biopsia:		
Diagnóstico de la biopsia:		
Estadificación de CaCu:		
Tratamiento al diagnóstico: Sí () No ()		
Quimioterapia:	Radioterapia:	
Diagnóstico de enfermedad inmunológica:		
Antecedente de cáncer en otra parte del organismo:		
Fecha de toma de muestra sanguínea:		
Edad:		
	Fecha de análisis de la biopsia:	Fecha de análisis de la muestra:
	Expresión	Concentración
Galectina-9		
INF- γ		
IL1- β		
Interpretación de resultados:		

11.9 ANEXO 9. LOGÍSTICA

RECURSOS HUMANOS

Asesores metodológicos:

D.C. María Alicia Díaz y Orea

D.C. Verónica Vallejo Ruiz

Alumna de la Maestría en Ciencias Médicas e Investigación:

María de los Angeles González Ronquillo.

RECURSOS MATERIALES:

Se contó con los recursos materiales del Laboratorio de Inmunología Experimental de la FM de la BUAP, del laboratorio de Biología Molecular y Celular del CIBIOR IMSS y de la UMAE-HE-CMN-MAC-IMSS.

RECURSOS FINANCIEROS:

Se contó con los recursos financieros del Laboratorio de Inmunología Experimental de la FM de la BUAP, del laboratorio de Biología Molecular y Celular del CIBIOR IMSS, de la UMAE-HE-CMN-MAC-IMSS, así como el apoyo recibido por CONACYT para financiar el análisis de Galectina-9, a través del proyecto No. 290058 del Fondo Sectorial de Investigación en Salud (FOSIS).