



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Evaluación de marcadores moleculares de la vía
de señalización Notch y tumorigénesis en cáncer
de cérvix**

Tesis que presenta

Rogelio Medina Berlanga

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Director de Tesis:

Dra. Martha Leticia Santos Martínez

San Luis Potosí, S.L.P., Julio de 2015



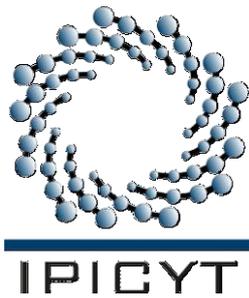
Constancia de aprobación de la tesis

La tesis ***“Evaluación de marcadores moleculares de la vía de señalización Notch y tumorigénesis en cáncer de cérvix”*** presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Rogelio Medina Berlanga** y aprobada el **nueve de julio del dos mil quince** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dra. Martha Leticia Santos Martínez
Directora de la tesis

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont
Miembro del Comité Tutorial

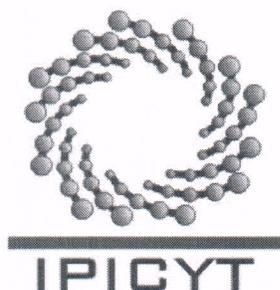


Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología Molecular de la División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. (IPICYT), bajo la dirección de la Dra. Martha Leticia Santos Martínez.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología No. 300170 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C. (IPICYT).

Este trabajo de tesis fue realizado gracias al apoyo del proyecto por convocatoria CONACYT-Fondos sectoriales-SaludSSA/IMSS7ISSSTE 2011-1 no. 160607.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 129 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 9 días del mes de julio del año 2015, se reunió a las 09:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa	Presidenta	IPICYT
Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont	Secretario	IPICYT
Dra. Martha Leticia Santos Martínez	Sinodal	IPICYT
Dr. Rubén Hipólito López Revilla	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Rogelio Medina Berlanga

sobre la Tesis intitulada:

Evaluación de marcadores moleculares de la vía de señalización Notch y tumorigénesis en cáncer de cérvix

que se desarrolló bajo la dirección de

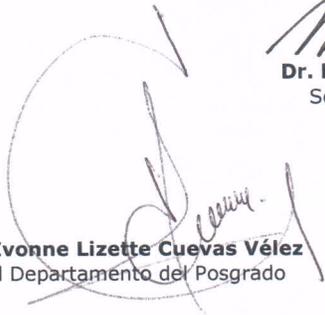
Dra. Martha Leticia Santos Martínez

El Jurado, después de deliberar, determinó

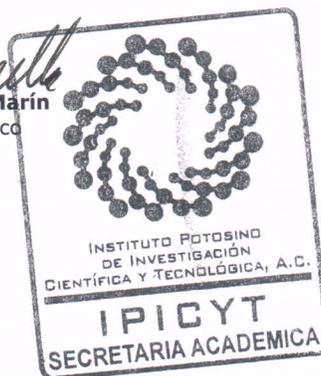
APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 11:00 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 9 días del mes de julio de 2015.


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedicatorias

A mis padres por su gran amor y apoyo incondicional, por enseñarme a luchar en la vida.

A mi esposa Mónica Arredondo por su apoyo, amor y comprensión.

A mi hija Sofía Medina.

A mis hermanos: Ricardo Medina, Alejandra Medina y Berenice Medina.

Agradecimientos

A la Doctora Martha Leticia Santos Martínez por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio.

A la Doctora Ana Paulina Barba de la Rosa y al Doctor Rubén López Revilla por formar parte de mi comité tutorial.

A los doctores de la División de Biología Molecular por sus enseñanzas durante los cursos de maestría.

A mis amigos y compañeros de generación por las agradables experiencias durante la estancia de maestría.

A la Doctora Sugela Blancas

A la Doctora Mabel Rodríguez

A Peter Mandeville por su ayuda en el análisis estadístico de este proyecto.

Al IPICYT por a oportunidad de realizar la maestría en el instituto.

A CONACyT por la beca otorgada durante la maestría.

Contenido

CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE TESIS	II
CRÉDITOS INSTITUCIONALES	III
ACTA DE EXAMEN.	IV
DEDICATORIAS	V
AGRADECIMIENTOS	VI
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
INTRODUCCIÓN.....	1
TABLA I.- PROTEÍNAS UTILIZADAS ACTUALMENTE Y PROTEÍNAS SUGERIDAS COMO MARCADORES MOLECULARES EN EL DIAGNÓSTICO DE CC	5
MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
MICROARREGLOS DE TEJIDO (MATs).....	7
INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)	7
TABLA II. CONDICIONES DE TINCIÓN DE IHQ	8
ANÁLISIS <i>IN SILICO</i>	9
ANÁLISIS ESTADÍSTICO (DR. PETER MANDEVILLE, UASLP).....	9
RESULTADOS	11
EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN NOTCH Y TUMORIGÉNESIS EN EL EPITELIO ESCAMOSO DE TEJIDO CERVICAL.....	11
SOBRE-EXPRESIÓN DE SEL1L Y NOTCH3 EN LESIONES NEOPLÁSICAS CERVICALES Y CÁNCER DE CÉRVIX	11
TABLA III. RESUMEN DE RESULTADOS ESTADÍSTICOS OBTENIDOS A PARTIR DEL ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> EN MATs DE PACIENTES MEXICANAS Y DE US BIOMAX (CR602).....	12
FIG.1. TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LOS MATs.	13
FIG.2. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS MÁS REPRESENTATIVAS EN LOS DISTINTOS ESTADIOS DE LA ENFERMEDAD EN PACIENTES MEXICANAS.	14
FIG.3. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN LOS DISTINTOS ESTADIOS DE LA ENFERMEDAD EN LOS MATs US BIOMAX CR602.	15
DISCUSIÓN	16
REFERENCIAS.....	19
ANEXOS.....	23
ANEXO 1-PREPARACIÓN DE BLOQUES DE PARAFINA.....	23
ANEXO 2-PROCESAMIENTO DE LAMINILLAS, DESPARAFINIZACIÓN, TINCIÓN CON H&E, TINCIÓN POR INMUNOHISTOQUÍMICA.....	24

Resumen

"Evaluación de marcadores moleculares de la vía de señalización Notch y tumorigénesis en cáncer de cérvix"

El cáncer de cérvix es la tercera causa de muerte por cáncer en mujeres y es una enfermedad crónica causada por infección persistente por tipos de virus del papiloma humano. La primera línea de tamiz para el diagnóstico de cáncer de cérvix es el Papanicolaou, sin embargo, su sensibilidad y especificidad es baja y variable. En este contexto el uso de biomarcadores específicos se ha introducido para aumentar la sensibilidad y especificidad en el diagnóstico. Con esta finalidad, construimos microarreglos de tejido, que contienen muestras de las distintas etapas cronológicas de la enfermedad. Se evaluó el nivel de expresión de 22 proteínas que participan en la vía de señalización Notch, tumorigénesis y proteínas actualmente utilizadas como biomarcadores en el diagnóstico de cáncer de cérvix. El nivel de expresión de las proteínas se determinó por inmunohistoquímica sobre los microarreglos, los cuales fueron fotografiados, escaneados y analizados con el software ImageJ. Los datos obtenidos se procesaron estadísticamente por análisis paramétrico. De las 22 proteínas analizadas, SEL1L y Notch3 mostraron una sobre-expresión significativa ($p < 2 \times 10^{-16}$) con un patrón sostenido respecto al tejido normal. Estos resultados sugieren que estas proteínas son biomarcadores potenciales para el diagnóstico de cáncer de cérvix.

Palabras clave: Cáncer de cérvix, biomarcadores, vía de señalización Notch, microarreglos de tejido.

Abstract

“Assessment of molecular markers from the Notch signaling pathway and tumorigénesis in cervical cancer”

Cervical cancer is the third cause of death by cancer among women. It is a chronic disease that requires persistent infection by high-risk human papillomavirus. The primary screening of cervical cancer is the Pap test, however its sensitivity and specificity is variable. In this context, the use of specific biomarkers has been introduced to increase the sensitivity and specificity of the diagnosis. For that purpose, we built tissue microarrays that contain tissue cores of the each chronological stage of the disease. The level expression of 22 proteins from the Notch signaling pathway, tumorigenesis and proteins used as markers in cervical cancer were evaluated. The protein expression level was determined by immunohistochemistry and photographed, scanned and analyzed by using the ImageJ software. The data obtained were processed by parametric analysis. Of the 22 proteins analyzed, Notch3 and SEL1L showed a sustained over-expression pattern compared with the normal tissue ($p < 2 \times 10^{-16}$). Our results suggest these two proteins are potential biomarkers for the diagnosis of cervical cancer.

Keywords: Cervical cancer, biomarkers, Notch signalling pathway, tissue microarrays.

Evaluación de marcadores moleculares de la vía de señalización Notch y tumorigénesis en cáncer de cérvix

Rogelio Medina-Berlanga y Leticia Santos *

División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., San Luis Potosí, SLP, CP 78216, México.

* Corresponsal.

Leticia Santos Martínez

Tel: [+52 (444)8342000];

Fax: [+52(444)8342010];

Email: [lsantos@ipicyt.edu.mx]

Introducción

El cáncer es una enfermedad que presenta un alto índice de mortalidad en el mundo y se desarrolla a partir de la acumulación de mutaciones que pueden ser causadas por agentes externos, ya sean físicos, como la radiación UV, o químicos, como sustancias mutagénicas. También existen factores intrínsecos que pueden desencadenar el desarrollo de cáncer, por ejemplo, el mal plegamiento y pérdida de función de las proteínas que desarrollan un papel fundamental durante el ciclo celular (Boveri 2007).

Se ha sugerido que el cáncer puede surgir a partir de una población de Células Madre Cancerosas (Cancer Stem Cells, CSC por sus siglas en inglés) por sus características auto-regenerativas y proliferativas en todo el cuerpo humano, y que una pequeña sub-población de éstas puede iniciar y mantener la tumorigénesis (Dreesen & Brivanlou 2007). Sin embargo, el origen de las CSC no es claro.

En mujeres, el cáncer de cérvix (CC) es una de las principales causas de muerte por cáncer en el mundo que se desarrolla por infección persistente del Virus del Papiloma Humano (VPH), agente etiológico en el 99.7% de los casos de CC (Walboomers et al. 1999). Se conoce una gran variedad de tipos de VPH y se han clasificado de acuerdo a su capacidad oncogénica como de bajo riesgo y alto riesgo. Los tipos asociados con el desarrollo de CC son principalmente virus de alto riesgo, por ejemplo, VPH 16 y 18 (Munoz et al. 2003), los cuales se encuentran en esta clasificación por su alta incidencia en carcinoma *in situ* y cáncer invasor. Sin embargo, el VPH tipo 18 se ha asociado en mayor medida a adenocarcinomas. El CC se desarrolla a partir de la infección persistente del VPH en la zona de transformación del cérvix (Parkin & Bray 2006). Independiente del tipo de VPH, se

ha sugerido que las partículas virales infectan células germinales en la lámina basal, al utilizar como vía desgarres pequeños de la mucosa (Muñoz et al. 2006).

Los genomas de VPH codifican sólo 8 genes (Doorbar 2006). Los genes *E6* y *E7* codifican para las principales oncoproteínas. *E6* y *E7* respectivamente, las cuales tienen múltiples blancos celulares; p53 y la proteína retinoblastoma (pRB) son las más importantes. *E6* inhibe a p53 al bloquear el mecanismo de apoptosis, mientras *E7* inhibe a pRB y evita el arresto del ciclo celular.

El desarrollo de CC requiere de cinco pasos: transmisión de VPH, persistencia del virus, integración del genoma viral, progresión gradual de las células infectadas hasta producir neoplasia, y posteriormente la invasión. La neoplasia es precedida por diferentes estadios pre-cancerosos o displásicos: neoplasia intraepitelial cervical leve (NIC I) o grado I, moderada o grado II (NIC II), severa o grado III (NIC III o carcinoma in situ), y finalmente, cuando las células neoplásicas del epitelio del cérvix atraviesan la membrana basal e invaden el tejido subyacente se presenta un carcinoma invasor (CI). Sin embargo, en la mayoría de las infecciones la inmunidad mediada por células suprime la infección en un periodo de 1-2 años a partir de la exposición (Stanley 2006) y el tiempo entre la infección y la primera evidencia microscópica de lesiones neoplásicas puede ser relativamente corto, frecuentemente en un periodo de 5 años (Woodman et al. 2001). De hecho, las lesiones pre-cancerosas han sido diagnosticadas a los 2 años posteriores al inicio de la vida sexual (Winer 2003; Richardson et al. 2003; Rodriguez et al. 2007).

El diagnóstico preliminar de CC se realiza por la prueba de Papanicolaou, la cual tiene como objetivo identificar células atípicas o displásicas. Sin embargo, dado que esta prueba se basa en la morfología celular, su sensibilidad y especificidad

dependen de la perspectiva del patólogo (Fahey et al. 1995). El CC involucra alteraciones en la proliferación y morfología de las células en comparación a las células originales.

La combinación de métodos de diagnóstico molecular y clínico permite detectar el desarrollo de enfermedades en etapas tempranas para aplicar el tratamiento adecuado. Estas estrategias tendrían como objetivo restaurar los niveles de expresión de las moléculas involucradas en el desarrollo de CC y como consecuencia permitir la regresión de la enfermedad.

Los biomarcadores utilizados actualmente en el diagnóstico de CC son las proteínas p16INK4A (p16) y Ki-67. Sin embargo, estas moléculas no son específicas de CC.

La proteína p16 ha sido ampliamente estudiada y se sabe que juega un papel clave en los procesos de senescencia; guía a las células para entrar en fase G0 de forma permanente y así actúa como supresor de tumores. La inactivación de pRb por la oncoproteína E7 provoca un aumento del factor de transcripción E2F libre en la célula, lo que tiene como consecuencia un incremento en los niveles de p16 y proliferación descontrolada (Khleif et al. 1996) en queratinocitos de cérvix transformados por VPH (Keating et al. 2001).

Ki-67 es un antígeno de proliferación expresado durante la fase G2 y la mitosis en el ciclo celular. Esta proteína se ha detectado en todos los estadios de NIC y se ha observado un aumento en los niveles de expresión conforme avanza el grado de lesión (Sahebali et al. 2003). También se ha utilizado para detectar células de lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado dentro de muestras citológicas atípicas, además de ayudar a distinguir displasia en células atróficas (Dunton et al. 1997).

La inmunohistoquímica de p16 ha sido una herramienta muy importante para mejorar la exactitud, fiabilidad y calidad del diagnóstico histopatológico en lesiones de cérvix (Zhang et al. 2007), así como el uso de microarreglos de tejido (MATs) en la optimización del procesamiento de muestras (Chen et al. 2003). A pesar de la fiabilidad y precisión que ha demostrado esta técnica con p16 en citología (Carozzi et al. 2008), especialmente en referencia a la sobreexpresión en NIC II, se ha observado que estos estudios cuentan con una población de muestras normales (control) muy pequeña en relación al total de muestras que presentan algún grado de lesión o cáncer invasor, lo que podría aumentar el error experimental (Lesnikova et al. 2009). Reuschenbach et al. (2012) observaron que Ki-67 y p16 son co-expresadas de forma particular en displasias de cérvix, lo que sugirió un aumento en la sensibilidad y fiabilidad del método.

En la búsqueda de nuevos marcadores moleculares específicos que apoyen el diagnóstico en etapas tempranas de la enfermedad, se ha observado que la activación de la telomerasa (Hahn et al. 1999), moléculas como el factor de transcripción MYC (Müller et al. 2014), proteínas de la familia CDC y MCM que permiten el proceso de replicación del ADN (Murphy et al. 2005), muestran niveles de expresión anormales en distintos tipos de cáncer, incluido CC. En la Tabla 1 se muestran las proteínas utilizadas actualmente en el diagnóstico de CC y proteínas sugeridas como marcadores. Es poco claro el mecanismo de estas moléculas durante el desarrollo de esta enfermedad, sin embargo, muestran cambios al desarrollarse las lesiones neoplásicas. Estudios recientes realizados en biopsias frescas de cérvix obtenidas de mujeres diagnosticadas con los distintos grados de lesiones pre-cancerosas y cáncer, mostraron un aumento en el nivel de ARNm de moléculas relacionadas a la vía de señalización Notch y tumorigénesis (Santos et al.

2011), lo cual sugiere que esta vía tiene un papel importante en el desarrollo de CC como se describe a continuación.

Tabla I.- Proteínas utilizadas actualmente y proteínas sugeridas como marcadores moleculares en el diagnóstico de CC

Molécula	Función	Referencia
p16	Supresor de tumor	(Volgareva et al. 2004)
Ki-67	Antígeno de proliferación	(Sahebali et al. 2003)
SEL1L	Regulador negativo de la vía de señalización Notch, participa en ERAD como ubiquitina-ligasa	En este estudio
Notch3	Destino celular en el desarrollo	En este estudio
Notch1	Destino celular en el desarrollo	(Daniel et al. 1997)
MCM2	Regulador del ciclo celular en la fase S	(Freeman et al. 1999)
MCM6	Regulador del ciclo celular en la fase S	(Das et al. 2013)
Micro ARNs	Regulan la expresión de proteínas en el nivel de la traducción	(Xu et al. 2012)

El desarrollo de los organismos a partir de la unión de los gametos y la posterior formación de las tres capas germinales del embrión, está regulada por la vía de señalización Notch, por lo que se sugiere que esta vía participa en los procesos de

diferenciación y mantenimiento de células troncales así como en el proceso de apoptosis. Sin embargo se le atribuye la participación en otros procesos importantes como la respuesta inmunológica, el desarrollo vascular y la supervivencia de células troncales (Androutsellis-Theotokis et al. 2006).

La vía de Notch se activa por la interacción entre un ligando (Jagged , Delta Like) de células vecinas y el receptor (Notch1-4) de otra que da como resultado un corte proteolítico por una metaloproteasa de tipo ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase) que libera el dominio intracelular de Notch y es dirigido hacia el núcleo donde forma un complejo activador de la transcripción con factores de unión a ADN y proteínas de la familia MAML (Mastermind-Like) (Brivanlou & Darnell 2002). Se ha demostrado que la vía de Notch está implicada en procesos de citodiferenciación y organogénesis (Artavanis-Tsakonas 1999). La vía de señalización Notch inhibe la expansión de células diferenciadas dentro de un tejido por inhibición lateral o puede promover que células adyacentes se adapten al mismo destino celular por inducción lateral (Ehebauer et al. 2006). Con esto suponemos que Notch es un factor importante en la regulación de la homeostasis dentro de los tejidos y su pérdida de control de función puede provocar el desarrollo de neoplasias, esto se sugiere debido a que se ha observado que sus niveles aumentan en cáncer de mama entre otros (Mittal et al. 2009).

Materiales y métodos

Microarreglos de tejido (MATs)

Para este estudio se adquirieron MATs comerciales (CR602, US Biomax) los cuales contenían 10 muestras de tejido normal de cérvix, 10 tejido con inflamación, tres lesiones neoplásicas intraepiteliales cervicales (NIC) 1, cuatro NIC2, tres NIC3 y 30 muestras de CC. Para la elaboración de MATs a partir de muestras de pacientes mexicanas (Anexo 1), se utilizaron bloques de parafina procedentes del archivo del Departamento de Patología del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” de la ciudad de San Luis Potosí, México, con diagnóstico confirmado. Los moldes para los MATs se elaboraron con el equipo de centro de inclusión de tejidos (Biomedical Embedding Center KD-BMII, China Jinhua kedi, Co., LTD) y se incluyeron 18 biopsias de tejido de cérvix normal, 83 NIC1, 53 NIC2, 28 NIC3 y 23 de tumores malignos. Se construyeron y distribuyeron en 3 MATs. Cabe señalar que las muestras fueron seleccionadas en base al diagnóstico de 3 patólogos independientes. Los centros de cada biopsia en los MATs fueron seleccionadas a partir de la tinción por hematoxilina y eosina. El área más representativa del exocérvix fue la que se incluyó en el MAT.

Inmunohistoquímica (IHQ)

Antes de realizar el análisis de expresión de proteínas sobre MATs, se realizó la estandarización de las condiciones en que se llevaría a cabo la IHQ para cada proteína. Inicialmente se llevó a cabo 1) la estandarización por ensayos de dilución seriada para dilucidar la concentración adecuada de cada anticuerpo y 2) el método de exposición de antígeno (Tabla 2). Se realizaron cortes de los MATs con un grosor de 5 μ m en un micrótopo (microtopo semiautomático KD-3368, Kedee).

Tabla II. Condiciones de tinción de IHQ

	ANTICUERPO	Fuente (compañía)	Exposición de antígeno	Concentración final de Ac
1	Notch1 (ab52627)	Conejo-monoclonal (Abcam)	Sin Desenmascaramiento	1:50
2	Notch2 (NB600-879)	Conejo-monoclonal	Sin Desenmascaramiento	1:800
3	Notch3 (sc-5593)	Conejo-monoclonal (Santa Cruz)	Sin Desenmascaramiento	1:100
4	Notch4 (ab33163)	Conejo-monoclonal (Abcam)	Sin Desenmascaramiento	1:100
5	HIC 1 (ab55120)	Ratón-monoclonal (Abcam)	80°C, Buffer Tris-EDTA pH 8, 2.5 min	1:100
6	CDC 25 (ab2357)	Ratón-monoclonal (Abcam)	80°C, Buffer Tris-EDTA pH 8, 2.5 min	1:50
7	ASCL 3 (A3620)	Conejo-monoclonal (US Biological)	80°C, Buffer de citrato 2.5 min pH6	1:25
8	n-Myc (ab16898)	Ratón-monoclonal (Abcam)	Temperatura ambiente, Buffer Tris-EDTA pH 8, 2.5 min	NA
9	SEL1L (ab78298)	Conejo-monoclonal (Abcam)	Sin Desenmascaramiento	1:200
10	SNAI 1 (sc-271977)	Ratón-monoclonal (Santa Cruz)	Temperatura ambiente, Buffer Tris-EDTA pH 8, 2.5 min	NA
11	TLE (sc-13373)	Cabra-policlonal (Santa Cruz)	Sin Desenmascaramiento	1:50
12	DLL1 (D2727-75)	Ratón-monoclonal (US Biological)	Sin Desenmascaramiento	25:1000
13	MIB 1 (M3753-01)	Conejo-monoclonal (US Biological)	Sin Desenmascaramiento	1:50
14	MTA 1 (sc-17773)	Ratón-monoclonal (Santa Cruz)	80°C, Buffer Tris-EDTA pH 8, 2.5 min	1:25
15	SOCS 3 (sc-9023)	Conejo-monoclonal (Santa Cruz)	Sin Desenmascaramiento	1:100
16	p16INK4a (ab54210)	Ratón-monoclonal (Abcam)	80°C, Buffer de citratos pH6, 2.5 min	1:500
17	Citoqueratina 13 (ab92551)	Conejo-monoclonal (Abcam)	Sin Desenmascaramiento	1:250
18	Citoqueratina 14 (ab78000)	Ratón-monoclonal (Abcam)	80°C, Buffer de citratos pH6, 2.5 min	1:400
19	BRD 7 (sc-131879)	Cabra-policlonal (Santa Cruz)	Sin Desenmascaramiento	1:50
20	CARP-1 (sc-69263)	Cabra-policlonal (Santa Cruz)	80°C, Buffer de citrato pH6, 2.5 min	1:50
21	DLEC 1 (sc-99867)	Cabra-policlonal (Santa Cruz)	Sin Desenmascaramiento	1:50
22	HES 2 (sc-13846)	Cabra-policlonal (Santa Cruz)	80°C, Buffer de citratopH6, 2.5 min	1:50

Cada corte se montó en portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina (Invitrogen). Las laminillas se desparafinaron en soluciones de xilol y se deshidrataron en soluciones graduales de etanol. La IHQ se realizó de acuerdo a las especificaciones de los kits utilizados (Superpicture 3rd Gen IHQ Detection y SuperPicture Polymer Detection, ambos de Invitrogen, anexo 1). El tiempo total de incubación con el anticuerpo primario fue de 12 h a 4°C. Posterior a la IHC, los MATs se observaron con un microscopio Leica DSM750 y se tomaron fotografías en formato TIFF para cada área seleccionada.

Análisis *in silico*

Las imágenes obtenidas a partir de las muestras fueron analizadas con el software Image J (versión 1.42q) con dos plugs-in para el análisis de los MATs. El primer plug-in *Colour deconvolution*, separa las imágenes del formato TIFF en base a la tinción seleccionada (Hematoxilina y Diaminobenzidina) y se obtiene una imagen que representa la tinción positiva a la diaminobenzidina (DAB). El segundo plug-in *color deconvolution for_TMA*, sigue un algoritmo que toma como base el primer plug-in para trabajar sobre la imagen seleccionada, cuyo objetivo es seleccionar al epitelio como área de interés y procesarlo con el algoritmo. El análisis del área seleccionada, reporta como resultado final la intensidad media de tinción por pixel en esta región, lo que es directamente proporcional al nivel de expresión de la proteína.

Análisis estadístico (Dr. Peter Mandeville, UASLP)

Los datos obtenidos del análisis *in silico* fueron analizados estadísticamente para evaluar si la intensidad media de pixeles era igual para las distintas etapas de la enfermedad. Para ello el análisis se llevó a cabo utilizando el software libre R versión 3.1.1 con un 95% de nivel de confianza.

Un modelo de referencia de los datos en bruto se analizó como un modelo lineal. Se calculó el criterio de información de Akaike (AIC por sus siglas en inglés), para probar la calidad del modelo. La normalidad se evaluó con el procedimiento de Shapiro–Wilk. La homogeneidad de varianza fue evaluada con el procedimiento Levene. Los puntos fuera de lugar fueron identificados de acuerdo a la definición de Tukey y las repeticiones con puntos fuera de lugar se eliminaron. El poder de transformación fue ajustado con la función de Box y Cox. El AIC del modelo con el poder de transformación se comparó con el modelo de referencia; el modelo con el menor AIC es el mejor modelo.

El modelo fue ajustado y evaluado. Se realizó el procedimiento de diferencia significativa de honestidad de Tukey (HSD, por sus siglas en inglés). Posterior a que las probabilidades fueran calculadas, éstas se ajustaron utilizando el procedimiento de Holm.

Resultados

Expresión de proteínas de la vía de señalización Notch y tumorigénesis en el epitelio escamoso de tejido cervical

La expresión de proteínas se evaluó llevando a cabo la técnica de IHQ como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. De las 22 proteínas analizadas, SEL1L y Notch3 mostraron un patrón de expresión diferencial entre tejido sano y lesiones neoplásicas/tumor entre las muestras de pacientes mexicanas (Figura 1a). Por otro lado, los resultados obtenidos de la IHC en el MAT comercial CR602 mostró un patrón de expresión distinto al de los MATs mexicanas con poco valor estadístico (Figura 1b).

Sobre-expresión de SEL1L y Notch3 en lesiones neoplásicas cervicales y cáncer de cérvix

El análisis estadístico para dilucidar la expresión de proteínas entre los grupos (normal, NIC I-III, tumor) en MATs mexicanas y US Biomax se muestra en la tabla 3. Los resultados mostraron un incremento significativo de expresión en lesiones neoplásicas comparado con tejido normal en las proteínas Notch3 ($p < 2 \times 10^{-16}$) y SEL1 ($p < 2 \times 10^{-16}$) en muestras mexicanas (Figura 2). Por otro lado en las muestras de US Biomax, ASCL3 ($p < 2 \times 10^{-16}$) y CDC25 ($p = 3.26 \times 10^{-9}$) mostraron este patrón en su expresión (Figura 3). Fue sorprendente observar que el marcador control p16 utilizado comúnmente en el diagnóstico de CC ($p = 4.40 \times 10^{-3}$ muestras mexicanas, $p = 7.56 \times 10^{-5}$ para US Biomax), no presentó diferencias significativas en el nivel de expresión en las distintas etapas de la enfermedad (Figura 2 y 3 respectivamente). El resto de las proteínas analizadas mostraron una variedad en sus patrones de expresión, sin embargo, estos niveles de expresión y los datos estadísticos mostraron que no es posible diferenciar entre lesiones pre-malignas, cáncer y tejido sano.

Tabla III. Resumen de resultados estadísticos obtenidos a partir del análisis *in silico* en MATs de pacientes mexicanas y de US Biomax (CR602)

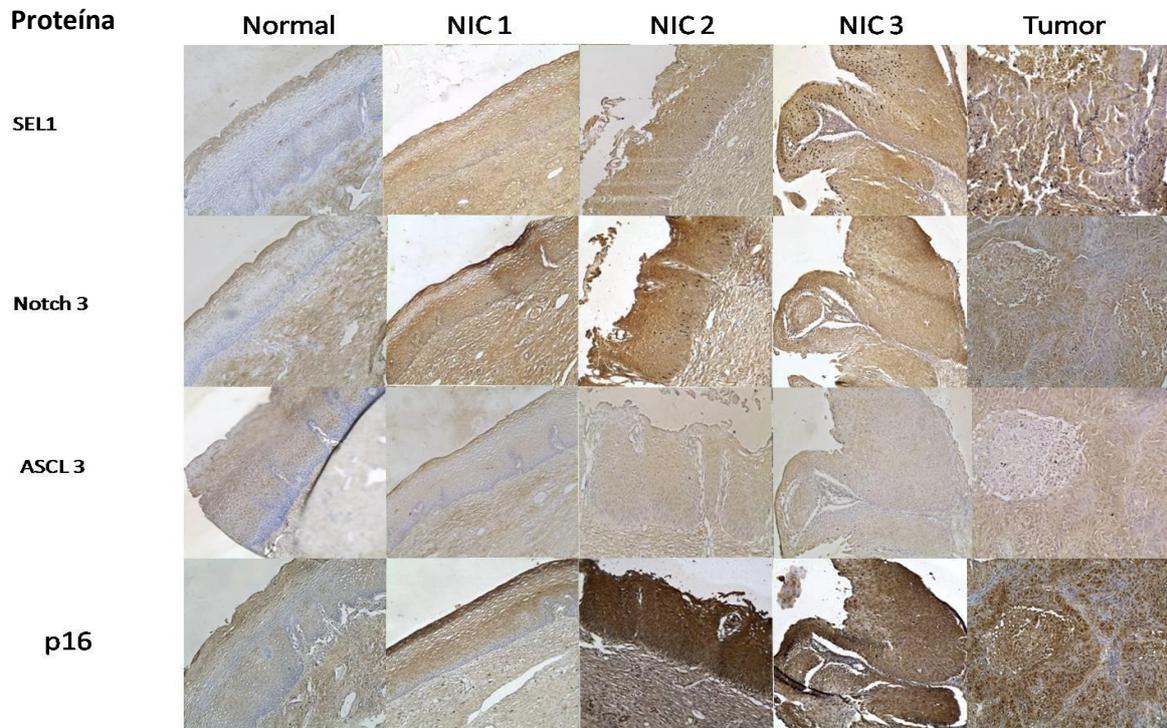
MATs de pacientes mexicanas

Proteína	Outliers	Anova				HSD				
		F	P	Padj	AdjR2	grps	a	b	c	d
SEL1	4	106	<2e-16	3.60E-15	0.717	3	Norm	II	I,III,Tumor	
Notch3	5	65.4	<2e-16	3.60E-15	0.621	3	Norm	II,III,Tumor	I,III	
SOCS3	1	61	<2e-16	3.60E-15	0.599	3	Norm	II,III,Tumor	I,III	
CARP1	2	57.3	<2e-16	3.60E-15	0.594	4	Norm	Tumor	II,III	I,II
MIB1	1	59.8	<2e-16	3.60E-15	0.581	3	Norm	II,III,Tumor	I	
CK14	5	50.6	<2e-16	3.60E-15	0.571	4	Norm	Tumor	II,III	I
CK13	21	49.4	<2e-16	3.60E-15	0.56	4	Tumor	III,Norm	II	I
Notch2	8	45.6	<2e-16	3.60E-15	0.522	3	Norm	II,III,Tumor	I	
BRD7	11	41.4	<2e-16	3.60E-15	0.506	3	Norm	I,Tumor	II,III,Tumor	
ASCL3	5	30.7	<2e-16	3.60E-15	0.415	2	I,Norm	II,III,Tumor		
CDC25	1	25.2	3.03E-16	3.60E-15	0.368	3	Tumor	II,III,Norm	I,II,Norm	
DLL1	5	21	5.26E-14	3.68E-13	0.323	2	Norm,Tumor	I,II,III		
Notch1	5	17.2	7.37E-12	4.42E-11	0.275	2	Norm	I,II,III,Tumor		
MYC	0	12.8	8.50E-09	4.25E-08	0.265	2	I,III,Norm,Tum	I		
HIC1	1	16.2	3.48E-11	1.74E-10	0.264	3	Norm	I	II,III,Tumor	
Notch4	3	14.3	5.80E-10	2.32E-09	0.247	4	Norm,Tumor	III,Tumor	I,III	II,III
HES2	0	9.83	5.94E-07	2.97E-06	0.214	2	I,III,Norm,Tum	I		
DLEC1	3	10.3	2.21E-07	6.63E-07	0.193	3	I,II	II,III	III,Norm,Tumor	
MTA	3	7.85	8.35E-06	1.67E-05	0.142	3	I,Tumor	II,Norm,Tumor	II,III,Norm	
P16	5	3.96	4.40E-03	4.40E-03	0.0722	2	I,II,III,Norm,Tum	I,III,Tumr		
SNAI	0	3.82	5.45E-03	5.45E-03	0.0646	2	I,III,Norm,Tum	I,II,III,Norm		
TLE	2	2.36	0.0571	5.71E-02						

MATs de US Biomax (CR602)

Proteína	Outliers	Anova				HSD			
		F	P	Padj	AdjR2	grps	a	b	c
ASCL3	3	51.2	<2e-16	3.60E-15	0.823	3	III,T	I,II,III	Inf,N
CK13	4	33.8	1.80E-14	3.06E-13	0.759	3	I,III,T	II,III	I,II,Inf,N
CDC25	4	15.8	3.26E-09	5.22E-08	0.582	2	I,II,III,T	Inf,N	
p16	4	8.45	7.56E-05	3.78E-04	0.44	2	II,III,Inf,N	II,T	
HIC1	1	6.06	0.000185	2.78E-03	0.315	2	III,N,T	I,II,III,Inf,N	
BRD7	2	5.37	0.000515	7.21E-03	0.288	2	I,II,III,Inf,N	II,III,Inf,N,T	
SOCS3	1	5.31	0.00054	7.21E-03	0.282	2	III,Inf,N,T	I,II,III,Inf,N	
CK14	2	4.95	0.00093	1.12E-02	0.264	2	I,II,III,Inf,N	II,III,Inf,N,T	
CARP1	1	4.29	0.00246	2.71E-02	0.227	2	II,III,Inf,N,T	I,II,Inf,N	
Notch2	1	4.18	0.00294	2.94E-02	0.221	2	II,III,Inf,N,T	I,II,III,Inf,N	
MTA1	0	3.96	0.00415	3.74E-02	0.209	2	I,II,III,Inf,N	I,II,III,Inf,T	
Notch1	1	3.68	0.00638	5.10E-02	0.193	2	II,III,Inf,N,T	I,II,III,Inf	
SEL1	3	3.4	0.0102	7.14E-03	0.182	1	I,II,III,Inf,N,T		
Notch3	1	3.32	0.0114	7.14E-02	0.171	2	II,III,Inf,N,T	I,II,III,Inf,N	
DLEC1	1	2.55	0.0393	1.97E-01	0.121	2	I,II,III,Inf,N	II,III,Inf,N,T	
DLL1	0	2.38	0.0514	2.06E-01					
MIB1	0	1.59	0.179	5.10E-01					
Notch4	0	1.2	0.32	5.10E-01					
TLE	1	1.62	0.17	5.10E-01					

a)



b)

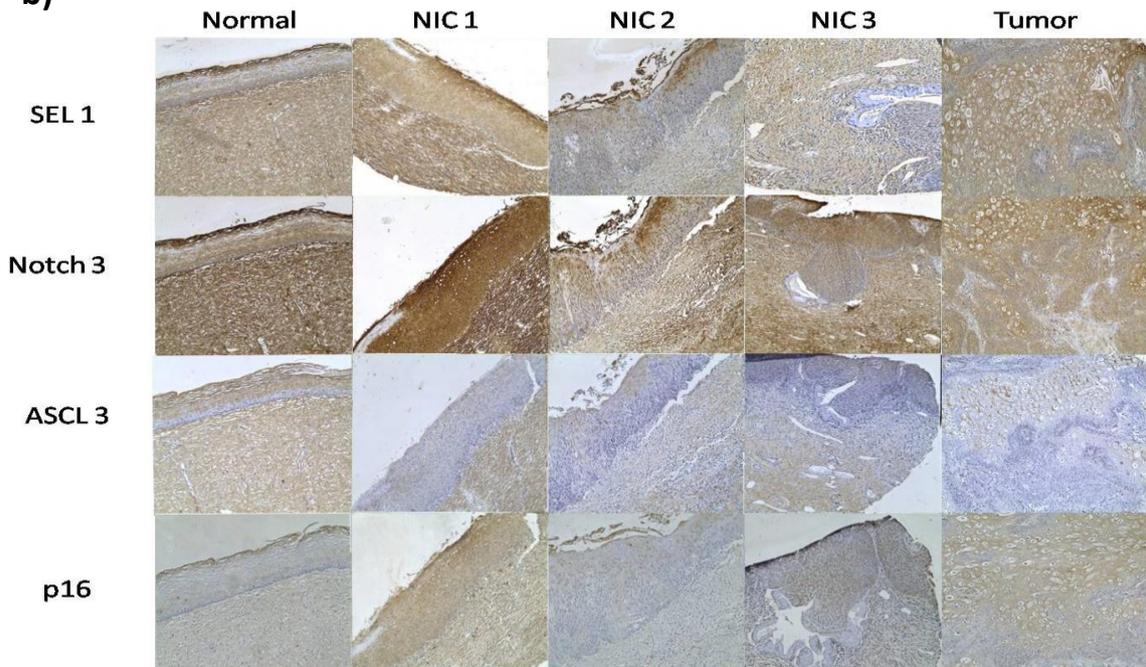


Fig.1. Tinción inmunohistoquímica de los MATs.

En la figura se observan imágenes representativas de los MATs en tejido normal y los distintos estadios de la enfermedad (NIC1-3 y Tumor). Además se incluyó en el análisis la proteína p16 que se ha utilizado como marcador molecular en clínica para detección de CC. **(a)** Tinción DAB/Hematoxilina en los MATs de muestras de pacientes mexicanas, en las cuales se observa una diferencia en el nivel de expresión en tejido sano y lesiones neoplásicas/tumor. **(b)** Se muestran los resultados obtenidos a partir de las tinciones realizadas en los MAT comerciales US Biomax CR602.

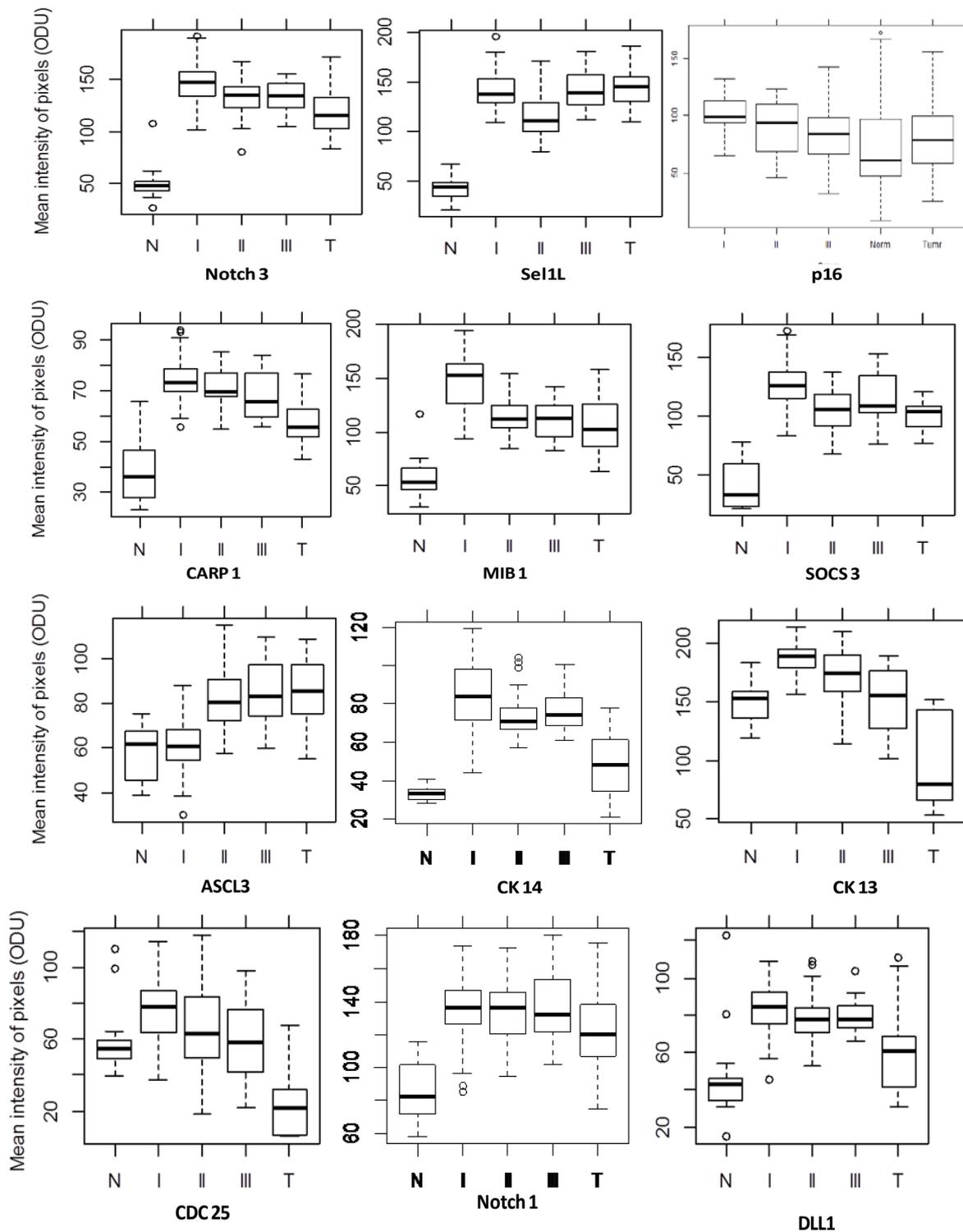


Fig.2. Expresión de las proteínas más representativas en los distintos estadios de la enfermedad en pacientes mexicanas.

Las gráficas muestran la media de intensidad de píxeles en cada estadio de la enfermedad (N-Normal, I-NIC I, II-NIC II, III-NIC III, T-Tumor), lo que es proporcional al nivel de expresión de la proteína en el epitelio. Las gráficas muestran una clara separación del nivel de expresión en tejido normal vs. lesiones pre-malignas y cáncer tanto para Notch3 y SEL1L. El resto de las proteínas muestran cambios que no son estadísticamente significativos.

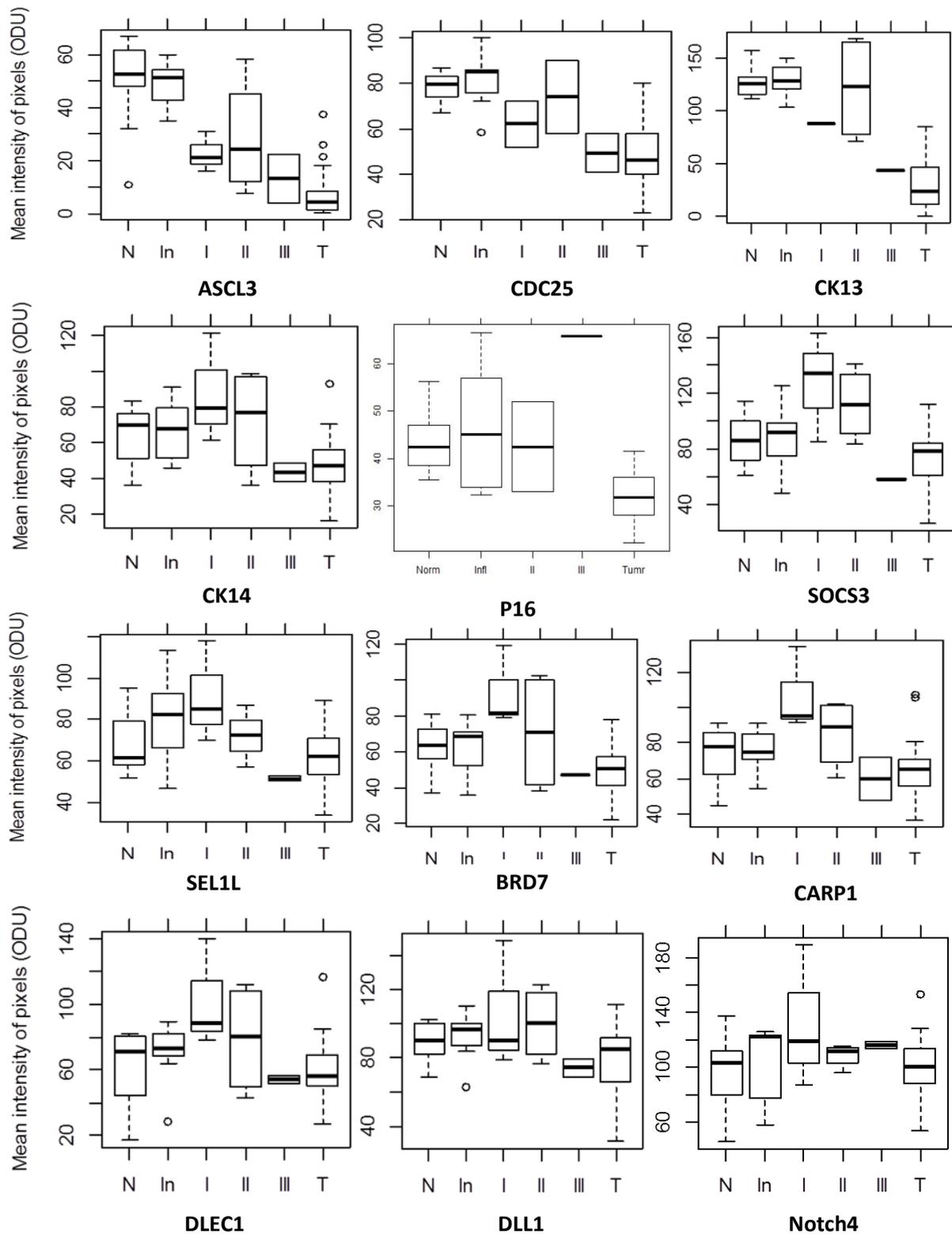


Fig.3. Expresión de proteínas en los distintos estadios de la enfermedad en los MATs US Biomax CR602.

Las gráficas muestran la media de intensidad de píxeles en cada estadio de la enfermedad (N-Normal, I-NIC I, II-NIC II, III-NIC III, T-Tumor), proporcionales al nivel de expresión de la proteína en el epitelio. En las gráficas se puede observar una diferencia clara en comparación con los resultados de muestras mexicanas. En ningún caso se observan cambios estadísticamente significativos.

Discusión

Entre las muestras analizadas, la molécula que presenta el cambio más significativo en su expresión diferencial es la proteína SEL1L ($p < 2 \times 10^{-16}$). Se ha descrito como una proteína transmembranal de retículo endoplasmático, cuya participación está involucrada en la degradación de proteínas asociada a retículo endoplasmático (ERAD, por sus siglas en inglés) (Cattaneo et al. 2009). La vía ERAD es un sistema de control de calidad, su función principal es reconocer proteínas mal plegadas, etiquetarlas con ubiquitinas y traslocarlas al citoplasma para que sea degradada por el proteasoma. Este sistema es sumamente importante y su mal funcionamiento se ha asociado a enfermedades en humanos, por ejemplo, la fibrosis quística y la enfermedad de Parkinson (Meusser et al. 2005). En esta vía la participación de SEL1L está directamente relacionada con su actividad como ubiquitina ligasa; forma complejos con otras enzimas como Hrd1, otra ubiquitina ligasa. Estos complejos funcionan principalmente como medio para transportar proteínas mal plegadas del lumen del retículo endoplasmático al citoplasma, para que la proteína finalmente sea degradada vía proteasoma. Además, también se ha observado la participación de SEL1L en la vía de señalización Notch, como una proteína de membrana que actúa como regulador negativo de la vía Notch reprimiendo la interacción receptor-ligando (Grant & Greenwald 1996). Francisco et al. (2010) y Li et al. (2010) observaron que SEL1L transporta los precursores de Notch del retículo endoplasmático a Golgi para su maduración y previniendo el transporte de proteínas mal plegadas, por lo que también se le atribuye una importante función en el control de calidad del retículo endoplasmático (Kim et al. 2015). La expresión de esta proteína se ha observado en adenocarcinoma ductal pancreático y se propuso como un marcador de diagnóstico (Liu et al. 2013; Liu et al. 2012), al igual que en cáncer de colon (Ashktorab et al.

2012). Sin embargo nuestro grupo de trabajo es el primero en reportarlo para su posible uso como marcador de diagnóstico en CC.

La vía de señalización Notch tiene una participación importante en el desarrollo de cáncer, entre ellos el cáncer de cérvix. En este estudio observamos que moléculas importantes de la vía Notch como el receptor Notch3 muestran alteraciones en sus patrones de expresión, en las muestras mexicanas. Un estudio similar comparó el nivel de expresión de Notch1 contra Notch3 en las distintas etapas de la enfermedad y observó que la expresión de Notch1 disminuye conforme avanza la enfermedad, mientras Notch3 presentaba un aumento en el nivel de expresión (Tripathi et al. 2014). Esto concuerda además con los hallazgos de sobre-expresión de Notch3 en lesiones pre-malignas reportadas por Yeasmin et al. (2010). Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio son consistentes con la sobre-expresión de Notch3 en lesiones neoplásicas y cáncer invasor en comparación al tejido sano, sin embargo no existen diferencias significativas entre los distintos estadios de la enfermedad. Nosotros sugerimos que Notch3 es un candidato como marcador molecular en CC, al apoyar en la detección de las primeras apariciones de lesiones neoplásicas, ya que permite diferenciar claramente tejido sano de lesiones neoplásicas/cáncer invasor. De manera histórica, el papel de Notch en cáncer de cérvix fue propuesto por primera vez por Zagouras et al. (1995), basado en su observación de sobre-expresión en cáncer de cérvix. Daniel et al. (1997) observaron que la expresión de Notch1 incrementaba en relación a la severidad de las lesiones neoplásicas brindando más información para ayudar a definir la función de Notch1 en el desarrollo de cáncer de cérvix, sugiriendo que esta molécula tenía potencial como marcador de diagnóstico. Sin embargo, otros investigadores (Talora et al. 2002; Lathion et al. 2003; Sakamoto et al. 2012) obtuvieron resultados que

mostraban lo opuesto a lo que se proponía con anterioridad. En sus estudios mostraron que el nivel de expresión de Notch1 estaba reducido o ausente en CC. Los resultados que nosotros obtuvimos de Notch1 ($p=7.73 \times 10^{-12}$), muestran un incremento en el nivel de expresión, consistente con lo reportado en los años 90's. Sin embargo las pruebas estadísticas (nivel de confianza 95%) mostraron que la diferencia estadística de su expresión no es suficientemente significativa.

Como se mencionó en la introducción, uno de los biomarcadores utilizados en la actualidad es la proteína p16, nosotros observamos expresión incluso en tejido sano, contrario a lo que se menciona en la literatura. Además no presentó una diferencia significativa de expresión en las distintas etapas de la enfermedad. Sin embargo, fue interesante observar que en la mayoría de las muestras de tejido sano; la expresión de p16 en el epitelio se restringe al citoplasma de células de las capas intermedias y superficiales, mientras que en muestras de lesiones neoplásicas se localizó tanto en el núcleo como en el citoplasma de células en todas las capas del epitelio.

La sobre-expresión de Notch3 y SEL1L es prometedora para el posible diagnóstico de CC dados los resultados diferenciales con respecto a tejido normal.

Referencias

1. Androutsellis-Theotokis, A. et al., 2006. Notch signalling regulates stem cell numbers in vitro and in vivo. *Nature*, 442(7104), pp.823–826.
2. Artavanis-Tsakonas, S., 1999. Notch Signaling: Cell Fate Control and Signal Integration in Development. *Science*, 284(5415), pp.770–776.
3. Ashktorab, H. et al., 2012. SEL1L, an UPR response protein, a potential marker of colonic cell transformation. *Digestive Diseases and Sciences*, 57(4), pp.905–912.
4. Boveri, T., 2007. Chapter 2_The Nature of Cancer. *The biology of Cancer*, pp.25–56.
5. Brivanlou, A.H. & Darnell, J.E., 2002. Signal transduction and the control of gene expression. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5556), pp.813–818.
6. Carozzi, F. et al., 2008. Use of p16-INK4A overexpression to increase the specificity of human papillomavirus testing: a nested substudy of the NTCC randomised controlled trial. *The Lancet Oncology*, 9(10), pp.937–945.
7. Cattaneo, M. et al., 2009. Functional characterization of two secreted SEL1L isoforms capable of exporting unassembled substrate. *Journal of Biological Chemistry*, 284(17), pp.11405–11415.
8. Chen, Y. et al., 2003. Identification of Cervical Cancer Markers by cDNA and Tissue Microarrays Identification of Cervical Cancer Markers by cDNA and Tissue Microarrays. , pp.1927–1935.
9. Daniel, B. et al., 1997. The link between integration and expression of human papillomavirus type 16 genomes and cellular changes in the evolution of cervical intraepithelial neoplastic lesions. *Journal of General Virology*, 78(5), pp.1095–1101.
10. Das, M. et al., 2013. Over Expression of Minichromosome Maintenance Genes is Clinically Correlated to Cervical Carcinogenesis. *PLoS ONE*, 8(7).
11. Doorbar, J., 2006. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical science (London, England : 1979)*, 110(5), pp.525–541.
12. Dreesen, O. & Brivanlou, A.H., 2007. Signaling Pathways in Cancer and Embryonic Stem Cells. *Stem Cell Reviews*, 3(1), pp.7–17.
13. Dunton, C.J. et al., 1997. Ki-67 antigen staining as an adjunct to identifying cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecologic oncology*, 64(3), pp.451–455.
14. Ehebauer, M., Hayward, P. & Arias, A.M., 2006. Notch, a universal arbiter of cell fate decisions. *Science (New York, N.Y.)*, 314(5804), pp.1414–1415.
15. Fahey, M.T., Irwig, L. & Macaskill, P., 1995. Meta-analysis of Pap test accuracy. *American journal of epidemiology*, 141(7), pp.680–689.
16. Francisco, A.B. et al., 2010. Deficiency of suppressor enhancer Lin12 1 like (SEL1L) in mice leads to systemic endoplasmic reticulum stress and embryonic lethality. *Journal of Biological Chemistry*, 285(18), pp.13694–13703.
17. Freeman, A. et al., 1999. Minichromosome maintenance proteins as biological markers of dysplasia and malignancy. *Clinical Cancer Research*, 5(8), pp.2121–2132.
18. Grant, B. & Greenwald, I., 1996. The *Caenorhabditis elegans* sel-1 gene, a negative regulator of lin-12 and glp-1, encodes a predicted extracellular protein. *Genetics*, 143(1), pp.237–247.
19. Hahn, W.C. et al., 1999. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*, 400(6743), pp.464–8.

20. Keating, J.T. et al., 2001. Ki-67, cyclin E, and p16INK4 are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. *The American journal of surgical pathology*, 25(7), pp.884–891.
21. Khleif, S.N. et al., 1996. Inhibition of cyclin D-CDK4 / CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. , 93(April), pp.4350–4354.
22. Kim, H., Bhattacharya, A. & Qi, L., 2015. Endoplasmic reticulum quality control in cancer: Friend or foe. *Seminars in Cancer Biology*, pp.1–9.
23. Lathion, S. et al., 2003. Notch1 Can Contribute to Viral-Induced Transformation of Primary Human Keratinocytes. *Cancer Research*, 63(24), pp.8687–8694.
24. Lesnikova, I. et al., 2009. p16 as a diagnostic marker of cervical neoplasia: a tissue microarray study of 796 archival specimens. *Diagnostic pathology*, 4, p.22.
25. Li, S. et al., 2010. SEL1L deficiency impairs growth and differentiation of pancreatic epithelial cells. *BMC developmental biology*, 10, p.19.
26. Liu, Q. et al., 2012. A single-nucleotide polymorphism in tumor suppressor gene SEL1L as a predictive and prognostic marker for pancreatic ductal adenocarcinoma in caucasians. *Molecular Carcinogenesis*, 51(5), pp.433–438.
27. Liu, Q. et al., 2013. Putative tumor suppressor gene SEL1L was downregulated by aberrantly upregulated hsa-mir-155 in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Molecular Carcinogenesis*.
28. Meusser, B. et al., 2005. ERAD: the long road to destruction. *Nature cell biology*, 7(8), pp.766–772.
29. Mittal, S. et al., 2009. Cooperation of Notch and Ras/MAPK signaling pathways in human breast carcinogenesis. *Molecular cancer*, 8, p.128.
30. Müller, I. et al., 2014. Targeting of the MYCN protein with small molecule c-MYC inhibitors. *PLoS ONE*, 9(5).
31. Munoz, N. et al., 2003. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 348, pp.518–527.
32. Muñoz, N. et al., 2006. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, 24(SUPPL. 3).
33. Murphy, N. et al., 2005. Quantitation of CDC6 and MCM5 mRNA in cervical intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the cervix. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 18(6), pp.844–9.
34. Parkin, D.M. & Bray, F., 2006. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine*, 24(SUPPL. 3).
35. Reuschenbach, M. et al., 2012. Evaluation of cervical cone biopsies for coexpression of p16INK4a and Ki-67 in epithelial cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 130(2), pp.388–94.
36. Richardson, H. et al., 2003. The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 12(6), pp.485–490.
37. Rodriguez, A.C. et al., 2007. The natural history of human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia among young women in the Guanacaste cohort shortly after initiation of sexual life. *Sexually transmitted diseases*, 34(7), pp.494–502.

38. Sahebali, S. et al., 2003. Ki-67 immunocytochemistry in liquid based cervical cytology: useful as an adjunctive tool? *Journal of clinical pathology*, 56(9), pp.681–686.
39. Sakamoto, K. et al., 2012. Reduction of NOTCH1 expression pertains to maturation abnormalities of keratinocytes in squamous neoplasms. *Laboratory Investigation*, 92(5), pp.688–702.
40. Santos, L. et al., 2011. Identification of differential expressed transcripts in cervical cancer of Mexican patients. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 32(3), pp.561–8.
41. Stanley, M., 2006. Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine*, 24(SUPPL. 1).
42. Talora, C. et al., 2002. Specific down-modulation of Notch1 signaling in cervical cancer cells is required for sustained HPV-E6/E7 expression and late steps of malignant transformation. *Genes and Development*, 16(17), pp.2252–2263.
43. Tripathi, R. et al., 2014. Clinical impact of de-regulated Notch-1 and Notch-3 in the development and progression of HPV-associated different histological subtypes of precancerous and cancerous lesions of human uterine cervix. *PLoS ONE*, 9(6).
44. Volgareva, G. et al., 2004. Protein p16 as a marker of dysplastic and neoplastic alterations in cervical epithelial cells. *BMC cancer*, 4, p.58.
45. Walboomers, J.M.M. et al., 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology*, 189(1), pp.12–19.
46. Winer, R.L., 2003. Genital Human Papillomavirus Infection: Incidence and Risk Factors in a Cohort of Female University Students. *American Journal of Epidemiology*, 157(3), pp.218–226.
47. Woodman, C.B. et al., 2001. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet*, 357(9271), pp.1831–1836.
48. Xu, J. et al., 2012. Suppressed miR-424 expression via upregulation of target gene Chk1 contributes to the progression of cervical cancer. *Oncogene*.
49. Yeasmin, S. et al., 2010. Expression of nuclear Notch3 in cervical squamous cell carcinomas and its association with adverse clinical outcomes. *Gynecologic Oncology*, 117(3), pp.409–416.
50. Zagouras, P. et al., 1995. Alterations in Notch signaling in neoplastic lesions of the human cervix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(14), pp.6414–6418.
51. Zhang, Q. et al., 2007. Impact of utilizing p16INK4A immunohistochemistry on estimated performance of three cervical cancer screening tests. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 120(2), pp.351–6.

**Presentación de cartel: 4th Regional International Gynecologic Cancer society Meeting.
Santiago, Chile, 2015**

International Journal of Gynecological Cancer:

May 2015 - Volume 25 - Issue - p 20

Articles

BIOMARKER ASSESSMENT IN CERVICAL UTERINE CANCER: IGCS-0055 Cervical Cancer

Medina-Berlanga, R.; Blancas, S.; Santos, L.

CONTENT NOT FOR REUSE

IGCS-0055
Cervical Cancer

BIOMARKER ASSESSMENT IN CERVICAL UTERINE CANCER

R. Medina-Berlanga, S. Blancas, L. Santos
Molecular Biology, Instituto Potosino de Investigacion Cientifica y Tecnologica,
San Luis Potosi, Mexico

Background and aims:

Cervical uterine cancer (CC) is the third cause of death from cancer in women. CC requires persistent infection with human papillomavirus. The primary screening of CC is the Pap test, but its sensitivity and specificity is variable. The use of specific biomarkers has been a challenge to increase the sensitivity of the diagnosis. In this sense, we built tissue microarrays (TMAs) and assessed the protein expression level of 20 molecules from the Notch signaling pathway and tumorigenesis for the evaluation of early biomarkers.

Methods:

TMAs contained cores of 18 cervical normal tissue, 83 cervical intraepithelial neoplastic lesion (CIN)1, 53 CIN2, 28 CIN3 and 23 malignant tumors. Immunohistochemistry was performed with monoclonal/polyclonal antibodies and the SuperPicture 3rd Gen IHC kits from Invitrogen. Cores were examined and photographed with a Leica-DM750 microscope. Images were processed with the free *ImageJ* software and data analyzed by using the R software.

Results:

Statistical analysis showed SEL1 and Notch3 proteins to have a key sustained expression pattern (HSD groups, Table 1) against normal tissues (Figure 1).

Conclusions:

The Notch-3 receptor is a key component in the control of cell fate during development while SEL1 is a negative regulator of these receptor family, hence alterations in this pathway can contribute to tumorigenesis. We suggest SEL1 and Notch-3 proteins are potential biomarkers in CC.

20

Vol 25, Supplement 1, May 2015

ANEXOS

Anexo 1-Preparación de bloques de parafina

1. Colocar el molde de parafina en horno seco a 70-80°C por 30 min.
2. Poner lentamente (para evitar la formación de burbujas alrededor de las barras) parafina líquida (60-65°C) al molde hasta cubrir las barras. Si se forman burbujas, removerlas con unas pinzas calientes.
3. Poner sobre el molde un cassette para embeber.
4. Agregar la suficiente parafina líquida dentro del casete.
5. Solidificar la parafina en el molde y casete a temperatura ambiente o a 4°C por 30-60 min. Si se solidifica a temperaturas más bajas el bloque se puede quebrar.
6. Separar lenta y delicadamente el molde del casete.
7. Quitar exceso de parafina de la periferia del casete del bloque.
8. Extraer el tejido marcado del bloque donador:

Colocar el bloque donador en una superficie plana y horizontal, colocar perpendicularmente la punta e insertarla lentamente a una profundidad de 5 mm.

9. Liberar lentamente el tejido extraído en el hoyo correspondiente del bloque receptor. Presionar ligeramente todos los núcleos de tejido para que queden al nivel.
10. Poner el bloque bocabajo sobre un portaobjetos y meter a horno a 45-50°C por 2h. Lo anterior, para que los núcleos se adhieran a los hoyos del bloque, haciéndolos más fácil de cortar en el microtomo.
11. Colocar el bloque en una superficie fría para que solidifique y cortar.

Anexo 2-Procesamiento de Laminillas, Desparafinización, Tinción con H&E, Tinción por Inmunohistoquímica
Cortar con micrótomo (microtomo semiautomático KD-3368, Kede)

1. Colocar el molde con la muestra de parafina
2. Ajustar las micras de espesor del corte en la pantalla LSD, las muestras deberán tener un grosor de entre 4 y 7 micras.
3. Verificar que la navaja se encuentra en posición, y bien fija; si se ha terminado el filo de un lado de la navaja moverla hacia la derecha teniendo cuidado de no rosar el filo
4. Antes de iniciar el corte, cerciorarse siempre de que todos los mecanismos de sujeción están apretados con seguridad.
5. Pulir la cara del bloque cortando suavemente unas pocas secciones finas
6. Con una gasa húmeda en etanol a 50 % colocar y dar un masaje (sin empujar la muestra) al tejido para que la parafina se endurezca.
7. Iniciar con una carrera de corte uniforme y lenta; no pare ni reinicie durante una carrera de corte ya que esto produciría franjas de diferentes grosores a lo largo de la sección. (3 o 4 cortes por carrera).
8. Cuando se haya terminado la carrera si hay residuos, elimínelos, volver a enfriar el bloque masajeando con etanol 50% y comenzar de nuevo.
9. Los cortes realizados se colocan en un porta objetos con etanol al 50% para expandirlos ligeramente, se separaran las diferentes muestras con una navaja, se elimina el resto de etanol inclinando ligeramente el portaobjetos, sin dejar que las muestras resbalen.
10. Con un movimiento de barrido suave, coloque las secciones con el lado liso (brillante) hacia abajo.

Las secciones se pueden dañar con mucha facilidad al quitar las arrugas o burbujas con un cepillo o pinzas.

Examine cada sección mientras flota en la superficie del agua, ya que las imperfecciones se pueden ver fácilmente.

11. Deje la muestra seccionada en la superficie del agua el tiempo suficiente para que se alise. Una expansión excesiva puede estropear la morfología en secciones sensibles. Deje flotar las secciones con cuidado en agua limpia que no tenga burbujas ni residuos de la sección (para evitar una contaminación entre sí).

Supervise la temperatura con cuidado. La temperatura deberá oscilar entre 43°C por debajo del punto de fusión de la parafina.

La flotación debería expandir la sección a sus dimensiones originales y garantizar que es completamente plana.

12. Con un porta objetos limpio, sin grasa ni polvo introducirlo de forma vertical y con la inercia del agua colocar la muestra de tejido con la mejor orientación que se requiera, teniendo cuidado de tratar de no cortar la muestra en el agua porque esta puede dañarse.

Los portaobjetos siempre deben estar limpios, sin grasa ni polvo, y deben guardarse y manipularse correctamente y siempre deben estar etiquetados de manera adecuada y con precisión, de forma que cumplan las regulaciones locales. Elimine la espuma de la superficie del agua con un tejido sin pelusas entre las muestras, para evitar cualquier posibilidad de una contaminación entre sí. Para evitar cualquier posibilidad de mezcla, haga flotar las secciones de un bloque simultáneamente.

13. Antes de colocar los portaobjetos en un horno o secador de portaobjetos, escúrralos en posición vertical brevemente para quitar el exceso de agua. Los portaobjetos pueden ser almacenados en estantes en posición vertical.

14. Las laminillas serán secadas en un horno a una temperatura de 60°C.

(Generalmente, las temperaturas de secado no deberían superar los 65 °C.

Un calor excesivo puede ocasionar gotas de agua debajo de una sección que se va a hervir y esto provocaría daños).

Seque las secciones durante un tiempo de entre 10 y 30 minutos.

*Es importante eliminar la parafina y los residuos de tejido acumulados después de su uso. Es importante efectuar un mantenimiento preventivo de forma regular.

*Realizar el procedimiento para desparafinar

*Realizar la tinción Requerida

Procedimiento para Desparafinar

Sumergir las laminillas preparadas en las siguientes soluciones:

1. 15 x Xileno (15x = 15 veces)
2. 15 x Xileno
3. 15 x Alcohol absoluto
4. 15 x Alcohol absoluto
5. 15 x Alcohol 96°
6. 15 x Alcohol 96°
7. 15 x Alcohol 70°
8. 15 x Alcohol 70°
9. 15 x en agua destilada

Tinción con hematoxilina y Eosina

1. Sumergir la laminilla en Hematoxilina por 5 minutos
2. Lavar en agua destilada hasta que desaparezca el colorante
3. Sumergir en alcohol de 96° C 15 x inmersiones
4. Sumergir en Eosina 2 minutos
5. Lavar en alcohol de 96°C 15 x
6. Lavar en alcohol de 96°C 15 x
7. Lavar en alcohol Absoluto 15 x
8. Lavar en alcohol Absoluto 15 x
9. Lavar en Xileno
10. Lavar en Xileno

Fijación de la muestra

1. Después del secado en el horno y la tinción, colocar sobre el tejido una gota de resina sintética.
2. Colocar el cubreobjetos en un ángulo de 45° grados para evitar la formación de burbujas, presione ligeramente la laminilla hasta que la resina se disperse a lo largo del cubreobjetos y porta objetos, asegurando de que cubra el residuo.

Si es necesario el aire de las orillas se puede quitar, esto rodeando los bordes con un aplicador de madera mojado previamente en xileno.

3. Limpie y rotule correcta y precisamente las laminillas para observar al microscópio.

Técnica de Inmunohistoquímica

SuperPicture™

3rd Gen IHC

Reactivo A **Peroxidase Quenching Solution**

Reactivo B **HRP Polymer Conjugate**

Reactivo C1 **DAB Substrate Buffer**

Reactivo C2 **DAB Chromogen**

PROTOCOLO DE TINCIÓN

A. PREPARACIÓN PRELIMINAR DE PORTAOBJETOS

1. DESPARAFINACIÓN Y REHIDRATACIÓN

Los cortes de parafina se desparafinan con xileno y se rehidratan con series graduales de etanol.

Lavar las extensiones celulares o el tejido en un baño de PBS durante 10 minutos antes de empezar con el procedimiento de tinción.

*Desenmascaramiento: 5 minutos a 98° C, 10 minutos en agua del grifo, PBS,

Reactivo A

2. PORTAOBJETOS DE CONTROL Y MUESTRA

- **Control Tisular Positivo:** un espécimen, procesado de la misma manera que el desconocido, contiene el antígeno que debe teñirse.

**Para obtener muestra control se utiliza el anticuerpo primario sobre el tejido normal 100µl por cada corte.*

- **Reactivo Control/Control Negativo-1:** un portaobjetos adicional, que se tratará con un suero no-inmune en lugar de tratarse con la misma concentración de anticuerpo primario.

Cualquier tinción observada en el espécimen es probablemente debida a la unión no-específica de proteína o a la unión no-específica de otros agentes.

**Se utilizó suero de conejo 100 µl por cada corte.*

- **Control Negativo-2:** un espécimen, procesado de la misma manera que el desconocido, no contiene el antígeno que se debe teñir [opcional]

**Se utilizó solución PBS, 100 µl lo suficiente como para cubrir completamente el tejido.*

B. PROTOCOLO DE TINCIÓN

1. Añadir 2 gotas (100 µl) de PEROXIDASE QUENCHING SOLUTION (reactivo A) a cada corte, o lo suficiente como para cubrir completamente el tejido.
 - b. Incubar durante 5 minutos.
 - c. Enjuagar con agua destilada.
 - d. Enjuagar con PBS (2 minutos, 2 veces).
2. Añadir 2 gotas (100 µl) de PRIMARY ANTIBODY a cada corte, o lo suficiente como para cubrir completamente el tejido.
 - b. Incubar en una cámara de humedad durante toda la noche a 4°C.
 - c. Enjuagar con PBS (2 minutos, 5 veces).
3. Añadir 2 gotas (100 µl) de HRP POLYMER CONJUGATE a cada corte, o lo suficiente como para cubrir completamente el tejido.
 - b. Incubar durante 10 minutos.
 - c. Enjuagar con PBS (2 minutos, 3 veces).
4. Añadir 1 gota (~26.5 µl) del **DAB Chromogen** (Reactivo C2) a 1 mL de **DAB Substrate Buffer (Reactivo C1)**. Mezclar bien. (Proteger de la luz y usar durante dos horas siguiente.)
 - b. Añadir 2 gotas (100 µl) a cada corte, o lo suficiente como para cubrir completamente el tejido.
 - c. Incubar durante 5 minutos.
 - d. Enjuagar bien con agua de grifo 2 minutos.
5. Realizar una contra tinción con Hematoxilina
6. Realizar la fijación de la muestra

Contra tinción con Hematoxilina

1. Sumergir la laminilla en Hematoxilina por 5 minutos
2. Lavar en agua destilada hasta que desaparezca el colorante
3. Sumergir en alcohol de 96° C 15 x inmersiones
4. Lavar en alcohol de 96°C 15 x
5. Lavar en alcohol Absoluto 15 x
6. Lavar en alcohol Absoluto 15 x
7. Lavar en Xileno
8. Lavar en Xileno

Fijación de la muestra

1. Después del secado en el horno y la tinción, colocar sobre el tejido una gota de resina sintética.
2. Colocar el cubreobjetos en un ángulo de 45° grados para evitar la formación de burbujas, presione ligeramente la laminilla hasta que la resina se disperse a lo largo del cubreobjetos y porta objetos, asegurando de que cubra el residuo.

Si es necesario el aire de las orillas se puede quitar, esto rodeando los bordes con un aplicador de madera mojado previamente en xileno.

3. Limpie y rotule correcta y precisamente las laminillas para observar al microscopio.