



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

BIOMEDICINA

**BÚSQUEDA DE MARCADORES MOLECULARES ASOCIADOS A LA RESPUESTA
CLÍNICA EN CÁNCER CÉRVICO-UTERINO MEDIANTE ANÁLISIS GENÓMICO.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

JORGE FERNÁNDEZ RETANA

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. CARLOS GUADALUPE PÉREZ PLASENCIA, F.E.S. IZTACALA
U.N.A.M.**

**COMITÉ TUTOR: Dra. MARCELA LIZANO SOBERÓN, I.I. BIOMEDICAS U.N.A.M.
Dra. LETICIA MORENO FIERROS, F.E.S. IZTACALA U.N.A.M.**

MÉXICO, D.F.

OCTUBRE, 2015.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

BIOMEDICINA

**BÚSQUEDA DE MARCADORES MOLECULARES ASOCIADOS A LA RESPUESTA
CLÍNICA EN CÁNCER CÉRVICO-UTERINO MEDIANTE ANÁLISIS GENÓMICO.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

JORGE FERNÁNDEZ RETANA

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. CARLOS GUADALUPE PÉREZ PLASENCIA, F.E.S. IZTACALA
U.N.A.M.**

**COMITÉ TUTOR: Dra. MARCELA LIZANO SOBERÓN, I.I. BIOMEDICAS U.N.A.M.
Dra. LETICIA MORENO FIERROS, F.E.S. IZTACALA U.N.A.M.**

MÉXICO, D.F.

OCTUBRE, 2015.



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 8 de junio de 2015, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **FERNÁNDEZ RETANA JORGE**, con número de cuenta **97540908**, con la tesis titulada **"BÚSQUEDA DE MARCADORES MOLECULARES ASOCIADOS A LA RESPUESTA CLÍNICA EN CÁNCER CÉRVICO-UTERINO MEDIANTE ANÁLISIS GENÓMICO"**, realizada bajo la dirección del **DR. CARLOS GUADALUPE PÉREZ PLASENCIA**:

Presidente: DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO
Vocal: DR. JAIME BERUMEN CAMPOS
Secretario: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
Suplente: DRA. LETICIA MORENO FIERROS
Suplente: DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 10 de agosto de 2015.

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por otorgarme la oportunidad de realizar mis estudios de doctorado a través de su programa, tutores, instalaciones y personal administrativo.

Al apoyo económico otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) SALUD-2009-01-113948, SALUD-2010-01-141907 y Beca de posgrado 104639

A los miembros de mi comité tutorial, Dr. Carlos Pérez Plasencia, Dra Marcela Lizano Soberon y Dra. Leticia Moreno Fierros. Por su asesoría, tiempo, comentarios y valiosas aportaciones que permitieron la elaboración de esta tesis doctoral.

La gratitud prepara el camino. Sentíos tan agradecidos a la existencia como os sea posible... por cosas pequeñas, no solo por las grandes... por el simple acto de respirar No tenemos ningún derecho sobre la existencia, de modo que aquello que se recibe es un regalo.

Desarrollad cada vez más la gratitud; dejad que se convierta en vuestro estilo. Estad agradecido a todos.

Si se entiende la gratitud, entonces se agradecen las cosas que se han hecho de forma positiva. Incluso se agradecen las cosas que se han realizado negativamente. Estáis agradecidos de que alguien os ayudara; este es solo el principio. Luego se empieza a agradecer que alguien no os hiciera daño... cuando podría haberlo hecho; fue amable.

Una vez que se entiende el sentimiento de gratitud y se le permite penetrar hondo en el ser, se empieza a sentir gratitud por todo. Y cuanto más agradecidos seáis, menos os quejaréis y gruñiréis.

Cuando desaparecen las quejas, también desaparece la desdicha, ya que esta existe con la queja. Está enganchada a las quejas y a la mente propensa a quejarse. Es imposible que exista con la gratitud. De manera que este es uno de los principales secretos que hay que aprender.

Cuando tu corazón este lleno de gratitud, cualquier puerta que aparece cerrada puede ser una apertura para una bendición aun mayor

Osho

Este trabajo esta dedicado a los y las pacientes que han padecido cáncer.

En memoria de J. R. P. (†)

A mis padres Juan (†) y Rosi, gracias por su apoyo

A mi esposa Gina Mirna TQM, gracias por estar a mi lado

A todas esas personas anónimas, gracias.

INDICE GENERAL

Resumen	i
Abstract	ii
1. Introducción	1
1.1 Epidemiología	4
1.2 Clasificación	6
1.3 Tratamiento	10
1.4 Resistencia celular	12
1.5 Marcadores moleculares	14
2. Capítulo 1		
Transcript Profiling Distinguishes Complete Treatment Responders with Locally Advanced Cervical Cancer	17
3. Capítulo 2		
Método pronóstico de la respuesta al tratamiento estándar en cáncer cervicouterino localmente avanzado	39
4. Capítulo 3		
Gene signature Degradome: An efficient strategy to predict the distal metastasis in cervical cancer patients.	94
5. Capítulo 4		
Expression profiles of major signaling pathways involved in cervical carcinogenesis reveal potential molecular targets	136
6. Discusión general	174
7. Conclusiones generales	183
8. Perspectivas	185
9. Referencias generales	188

Resumen

A pesar de los avances en la detección temprana el cáncer cervicouterino (CC), esta enfermedad continúa siendo una de las principales causas de muerte en la población femenina a nivel mundial y afecta mayoritariamente a los países menos desarrollados, donde es considerado como uno de los más importantes de salud pública. En estas regiones la mayoría de las pacientes llegan a los centros de salud cuando la neoplasia se encuentra en estadios localmente avanzados, por lo que son sometidas a tratamientos sumamente agresivos de forma arbitraria. Sin embargo, las estadísticas demuestran que después de ser sometidas al tratamiento convencional o estándar, aproximadamente el 50% de las pacientes presentan recurrencia y/o metástasis. Aunque se han propuesto varios marcadores de detección temprana, en la actualidad no existe un método pronóstico efectivo de la respuesta al tratamiento administrado a estas pacientes y con ello seleccionar una mejor estrategia clínica. En el presente trabajo se hace un análisis y discusión acerca de los productos obtenidos durante el desarrollo de la tesis doctoral, dentro de los cuales se incluye el establecimiento de dos firmas génicas, una de las cuales tiene la capacidad de identificar y diferenciar entre pacientes sensibles o resistentes al tratamiento convencional; la segunda firma molecular tiene la capacidad de pronosticar de forma temprana el riesgo de metástasis a partir de un grupo de genes que conforman el degradoma. Esto se realizó mediante el empleo de herramientas genómicas como plataformas de microarreglos de alta densidad y análisis por tiempo real qRT-PCR. Finalmente, se realizó una revisión bibliográfica sobre el estado del arte en la carcinogénesis cervical basado en los resultados de publicaciones donde se analizaron los datos globales de expresión obtenidos mediante microarreglos donde se describen como los mecanismos del cáncer cervical dan lugar a la progresión tumoral, hasta la metástasis, particularmente mediante la modificación de genes.

Abstract

Despite advances in early detection, cervical cancer (CC) remains one of the leading causes of death in women worldwide and affects mainly the less developed countries, where it is considered one of the major public health problems. In these regions majority of patients come to health centers when the tumor is in locally advanced stages, which are subjected to aggressive treatments in arbitrarily way. However, statistics show that after being subjected to standard treatment; about half of the patients will relapse and suffer metastases or die. Although it has been tried to use early markers, currently there is not effective method to predict the outcome for the treatment administered to these patients and thus selecting better clinical strategy. This paper describes how two gene signatures were obtained; a first signature have the ability to identify sensitive or resistant to conventional treatment and other patients with early ability to predict the risk of metastasis from a group of genes that comprising the degradome. Those results using genomic tools as platforms for high-density microarray analysis and real-time qRT-PCR did this. In addition a study on the state of the art was performed in cervical carcinogenesis based on the results of publications where global expression data obtained were analyzed by microarrays which describes the mechanisms of cervical cancer lead to tumor progression to metastasis, by modifying genes in particular.

INTRODUCCIÓN

A pesar de los programas de detección temprana, el cáncer cervicouterino (CC) continua siendo una de las primeras causas de muerte por neoplasias en mujeres a nivel mundial y afecta primordialmente a los países en vías de desarrollo (Jemal et al., 2011). Uno de los principales factores de su alta incidencia en estas regiones se debe a las fallas en los programas de detección temprana, por lo que la mayoría de las pacientes son diagnosticadas en estadios localmente avanzados que incluyen los estadios IB2-IVA de acuerdo con la clasificación de la “International Federation of Gynecologists and Obstetricians (FIGO)” al momento de la llegada a los centros hospitalarios (Waggoner, 2003a). El tratamiento estándar recomendado para las pacientes diagnosticadas con cáncer cervicouterino en estadios localmente avanzados (CCLA) es la radioterapia en combinación con quimioterapia basada en cisplatino seguida de braquiterapia (National Comprehensive Cancer Network, 2009; Secretaría de Salud, 2010). Sin embargo, como en otros tumores se puede presentar el fenómeno de resistencia tumoral al tratamiento, lo cual tiene como resultado la progresión tumoral, metástasis y finalmente la muerte. En pacientes con este tipo de neoplasias se ha observado que aproximadamente un 50% presentaran mala respuesta al tratamiento; y de este grupo entre el 80% y el 90% tendrán manifestaciones de enfermedad recurrente en los primeros dos años, por lo que un buen pronóstico de la enfermedad para las pacientes que desarrollan recurrencia es sumamente pobre, con una tasa de supervivencia a un año del 15% y el 20% (Hart et al., 1997). Es importante resaltar que las pacientes que han tenido mala respuesta al tratamiento, generalmente son sometidas a tratamientos adyuvantes más agresivos, no obstante el efecto citotóxico del primer tratamiento disminuye su integridad física por lo que sus posibilidades de supervivencia son menores (Oh et al., 2014). En la actualidad la elección de la mejor alternativa terapéutica para pacientes con CCLA, carece de elementos predictivos suficientes y eficientes. Se ha intentado utilizar diversos marcadores clínicos y/o moleculares que permitan predecir la respuesta al tratamiento en CCLA

antes de iniciar la terapia; sin embargo, estos marcadores no han demostrado una eficacia clínica adecuada, por lo que no resultan útiles para decidir de manera segura sobre la administración del tratamiento en un paciente. Por lo tanto, no ha sido posible determinar si una paciente será beneficiada por el tratamiento estándar o si es probable que presente resistencia, lo que hace imperativo emplear otras alternativas terapéuticas. Es por esta razón que existe una necesidad imperiosa de contar con un método de pronóstico temprano de resistencia al tratamiento y/o metástasis.

Para el desarrollo del presente trabajo, se evaluaron los perfiles de expresión de tumores obtenidos a partir de una población estadísticamente significativa de pacientes diagnosticadas con CCLA y sin tratamiento previo. De forma paralela se colectaron datos de la respuesta al tratamiento mediante el monitoreo clínico de cada paciente durante un periodo no menor a 30 meses. El objetivo principal fue identificar un grupo de marcadores, mediante herramientas genómicas como son microarreglos de alta densidad y tiempo real por qRT-PCR asociados a las características clínicas obtenida después del tratamiento. Como resultado de la presente investigación se obtuvieron tres productos. En el primer trabajo se obtuvo una firma molecular compuesta por 28 genes, con la capacidad de predecir de forma temprana la respuesta clínica al tratamiento convencional, de tal forma que se puede clasificar a las pacientes sensibles o resistentes. Con los resultados de este trabajo se obtuvo una patente que fue sometida a la protección intelectual en el Instituto Mexicano de la Propiedad Intelectual (IMPI) con la finalidad de proponer un método de predicción temprana a la respuesta al tratamiento convencional en CCLA. Este método cuenta con un prototipo que puede ser utilizado en la práctica clínica de manera económica y sencilla.

En el segundo trabajo, se realizó el análisis y evaluación de un grupo de genes que codifican para proteínas con actividad de proteasa, denominado El *Degradoma*. Este grupo de genes están

involucrados en los distintos procesos celulares y tienen un papel relevante durante la carcinogénesis y la metástasis distal debido a su naturaleza proteolítica. En este trabajo se analizaron los perfiles de 85 pacientes y seis muestras de tejido sano. Los resultados demuestran que los genes que codifican para la familia de treonin-proteasas que constituyen la región proteolítica del *proteosoma*, se sobre-expresan consistentemente en los tumores cervicales. Esto los hace candidatos importantes como blancos farmacológicos. Además al correlacionar los datos de expresión con la respuesta clínica de metástasis encontramos 10 genes, que de forma temprana pueden clasificar a aquellas pacientes que a pesar de ser sometidas al tratamiento convencional, tienen alto riesgo de metástasis. Estos resultados pueden proporcionar herramientas predictivas para la selección más adecuada del tratamiento en pacientes con CCLA. Finalmente, durante el desarrollo de estas investigaciones se hizo una revisión bibliográfica sobre el estado del arte en la carcinogénesis cervical basado en los resultados de publicaciones donde se analizaron los datos globales de expresión obtenidos mediante microarreglos donde se describen como los mecanismos del cáncer cervical dan lugar a la progresión tumoral, hasta la metástasis, mediante la modificación de genes en particular.

1.1 Epidemiología

El cáncer cervicouterino (CC) es una neoplasia maligna que se genera a partir de las células tumorales del cérvix. Esta región es localizada en el cuello uterino, la cual corresponde a la parte estrecha del útero donde se une con la parte superior de la vagina. En CC, la mayoría de los tumores está compuesto por carcinomas de células escamosas generados a partir de las células epiteliales escamosas, las cuales son el tipo histológico más común; mientras que, los adenocarcinomas se generan a partir de células del epitelio glandular y son el segundo tipo histológico más común. Desde los trabajos realizados por Zur Hausen (zur Hausen, 2002), se sabe

que el principal factor etiológico para la carcinogénesis es la infección por el virus del papiloma humano (VPH). Actualmente se han identificado más de 100 tipos de VPH y son clasificados de acuerdo a su potencial de inducir lesiones celulares en alto o bajo riesgo. La infección por VPH de alto riesgo en las células epiteliales de cérvix provoca displasias que son definidas como NIC1 ó lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LEI BG) según el esquema de clasificación que se utilice. En la mayoría de los casos se produce la regresión de la enfermedad (Kjaer et al., 2006). Sin embargo, tras un inusual evento de integración viral las lesiones pueden progresar a los precursores malignos del carcinoma cervical escamoso (del 10 al 15%), que incluye varias displasias moderadas definidas respectivamente como neoplasias intraepiteliales cervicales grado 2 (NIC2) y grado 3 (NIC3) en histología ó lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado (LEI AG). Finalmente, solo un 0.3 % de LEI AG pueden progresar a un cáncer cervical invasor (Malinowski, 2005). Aunque actualmente se ha comenzado a implementar vacunas que brindan protección contra la infección de dos de los principales tipos de virus de VPH (16 y 18) que están presentes en aproximadamente el 70% de los casos de tumores cervicales, estas vacunas solo cubren una parte de los virus de VPH de alto riesgo, por lo que es necesario que las mujeres continúen realizándose la prueba del Papanicolaou, incluso después de la vacunación.

De manera global el CC continúa siendo un problema de salud mundial. Ocupa el segundo lugar en frecuencia entre los tumores malignos de la mujer, con más de 500,000 casos cada año. El 75% de los diagnósticos corresponde a países en vías de desarrollo, y representa el 20 a 30% de los cánceres femeninos, en contraste con lo observado en países industrializados, donde la enfermedad constituye únicamente 4 a 6% de los cánceres de la mujer (Bruni et al., 2010; Franceschi et al., 2006). Las mayores tasas de incidencia se encuentran en algunos países de África, Centro y Sudamérica y Asia (Bruni et al., 2010) y es probable que se subestimen la

incidencia y la mortalidad en esos países debido a la escasa información de los datos reales (Franceschi et al., 2006). Así el CC es responsable de más de 250,000 defunciones anuales en el mundo, (afectando principalmente a países subdesarrollados) (Franceschi et al., 2006), es el cuarto tipo de cáncer más común en las mujeres, y el séptimo en general, con un estimado de 528,000 nuevos casos a nivel mundial. En el 2012, aproximadamente 445,000 (85%) de estos casos se reportaron en las regiones menos desarrolladas, donde representó casi el 12% de todos los cánceres femeninos. En ese mismo año se estimaron 266,000 muertes por esta neoplasia en todo el mundo, representando el 7,5% de todas las muertes por cáncer en mujeres. Casi nueve de cada diez (87%) de las muertes por cáncer cervicouterino se produjeron en las regiones menos desarrolladas (Forman et al., 2012). También en 2012, más de 83,100 mujeres fueron diagnosticadas de cáncer cervicouterino en la región de las Américas y casi 35,700 mujeres fallecieron a causa de esta enfermedad. Si se mantienen las tendencias actuales, el número de muertes por este cáncer en las Américas aumentará hasta 51,500 en el 2030 (Lewis, Merle J, 2004).

1.2 Clasificación

La selección del tratamiento para las pacientes diagnosticadas con cáncer cervicouterino depende en gran medida del estado de progresión tumoral y algunas características clínicas (Karin S Kapp et al., 2005). El sistema de clasificación más utilizado para este tipo de cáncer es el sistema de la International Federation of Gynecologists and Obstetricians (FIGO), aunque puede emplearse el sistema de clasificación del American Joint Committee on Cancer (AJCC) denominado TNM.

Desde el establecimiento del diagnóstico de carcinoma invasivo, las pacientes se clasifican de acuerdo a las características de la tabla 1. La estatificación de acuerdo a la FIGO, se determina

desde el primer diagnóstico. La clasificación es determinada clínicamente, al tamaño de tumor dentro del cérvix o su extensión dentro de la pelvis. Para aclarar la descripción de cáncer micro invasivo (estadio IA1 y IA2) y para subdividir el estadio IB en IB1 (Tumor <4 cm) y IB2 (tumor >4 cm) se realizaron modificaciones al sistema de clasificación de la FIGO en 1994 (Waggoner, 2003a).

El sistema FIGO consta de las etapas clínicas I a IVB, las cuales se resumen en la tabla 1: La etapa I, se refiere al tumor confinado solo al cuello uterino, es IA1 cuando existe invasión al estroma de 3 mm de profundidad por 7 mm de extensión horizontal. La etapa IA2 es cuando la invasión tumoral al estroma es mayor a 3 mm hasta un máximo 5 mm de profundidad por 7 mm de extensión horizontal. La etapa IB1, se refiere a un tumor visible macroscópicamente de 4 cm o menos, IB2 es un tumor mayor a 4 cm. La etapa II incluye los tumores que invaden más allá del útero, pero sin afectar pared pélvica o tercio inferior de vagina, así la etapa IIA1 es un tumor visible de 4 cm o menos y la IIA2 es un tumor mayor de 4 cm. La etapa IIB, es un tumor que infiltra parametrios pero sin fijarlos a pared pélvica. La etapa IIIA, se refiere a tumores que infiltran el tercio inferior de la vagina, sin extensión a pared pélvica, en tanto que la etapa IIIB hace referencia tumores que infiltran parametrios y los fija a pared pélvica; la hidronefrosis y/o exclusión renal son también criterios de la etapa IIIB. La etapa IVA, incluye a un tumor que infiltra la mucosa del recto o vejiga urinaria. La etapa IVB implica metástasis a distancia, incluyendo ganglios del retroperitoneo (Hacker, 2009).

Tabla 1 Clasificación de la FIGO para cáncer cervical

Estadio	Descripción
Estadio 0	Carcinoma in situ, carcinoma intraepitelial
Estadio I	Carcinoma invasivo confinado estrictamente al cérvix
Estadio IA	Carcinoma invasivo identificado microscópicamente (toda lesión grave, incluso con invasión superficial puede asignarse al estadio IB)
Estadio IA1	Invasión del estroma de 3 mm o menos de profundidad y no más amplio de 7 mm
Estadio IA2	Invasión del estroma de más de 3 mm pero no más de 5 mm de profundidad y no más amplio de 7 mm
Estadio IB	Lesión pre-clínica mayor al estadio IA o lesión clínica confinada al cérvix
Estadio IB1	Lesión clínica de 4 cm o menos en tamaño
Estadio IB2	Lesión clínica de 4 cm o más en tamaño
Estadio II	Carcinoma extendido más allá del cérvix, pero no a la pared pélvica. El carcinoma involucra la vagina pero no más allá del tercio inferior
Estadio IIA	Involucra más de dos tercios de la vagina, pero no involucra parametrios
Estadio IIB	Involucra parametrios de forma obvia
Estadio III	Carcinoma extendido dentro de la pared pélvica, en examen rectal no hay espacio libre de cáncer entre el tumor y la pared pélvica interna El tumor involucra el tercio inferior de la vagina. Las pacientes con hidronefrosis o sin función renal, son incluidas a menos que se conozca otra causa
Estadio IIIA	Involucra el tercio inferior de la vagina; sin extensión a la pared pélvica interna
Estadio IIIB	Extensión a la pared pélvica interna y/o Hidronefrosis o sin función renal
Estadio IV	Carcinoma extendido más allá de la pelvis o clínicamente involucra las mucosas de la vejiga o recto
Estadio IVA	diseminado y creciendo en órganos adyacentes
Estadio IVB	Diseminado a órganos distantes

En lesiones pequeñas (estadio IA y IB1), la clasificación es definida después de medir la profundidad de la invasión tumoral mediante la examinación pélvica, la cual permite evaluar el tamaño del tumor; por la toma de una biopsia cónica, o ambas. En tumores más avanzados, la

examinación pélvica bajo anestesia es necesaria ocasionalmente para examinar el tejido de los parámetros adyacentes al cérvix y útero. Pruebas adicionales (Tabla 2) pueden ser empleadas de manera complementaria para una mejor clasificación, aunque algunas de estas pruebas pueden estar limitadas en varios países. Los resultados por tomografía computarizada, imagen por resonancia magnética funcional o tomografía por emisión de positrones pueden utilizarse en la clasificación de la FIGO y pueden revelar la extensión que abarca la enfermedad en la cavidad pélvica y/o metástasis a nódulos linfáticos, lo cual puede influir en las recomendaciones del tratamiento (Grigsby et al., 2001; Wagenaar et al., 2001).

Tabla 2. Procedimientos para clasificación del cáncer cervical

Examen Físico
Palpación de nódulos linfáticos (ej. Supraclavicular, inguinal)
Examen vaginal
Examen rectovaginal con o sin anestesia
Estudios radiológicos
Radiografía de pecho
Radiografía de esqueleto
Pielograma intravenoso
Enema de bario
Procedimientos
Biopsia cervical
Conización cervical
Histeroscopia
Colposcopia
Curetaje endocervical
Citoscopia
Proctoscopia
Otros estudios (No permitidos para la asignación de la estadificación clínica)
Tomografía computarizada
Imagen por resonancia magnética funcional
Tomografía por emisión de positrones
Ultrasonografía
Escáner con radionúclidos
Linfangiografía
laparoscopia

Se considera que la clasificación de la FIGO es un indicador confiable para el pronóstico de pacientes diagnosticadas con cáncer cervical. La supervivencia a 5 años se aproxima al 100 % para pacientes con tumores estadificados como IA y alrededor de 70-85 % para aquellas diagnosticadas como IB1 y lesiones menores a IIA. La supervivencia para la mayoría de los tumores localmente

avanzados (estadios 1B2 a IV) varía y está influenciada significativamente por el volumen de la lesión, la edad del paciente, y comorbilidades. La supervivencia a 5 años es del 50-70 % para estadios IB2 y IIB, de 30-50 % para los estadios III y de 5-15 % para los estadios IV (Waggoner, 2003a).

En términos de tratamiento, la enfermedad invasiva puede ser dividida en tres grandes grupos: 1) etapas tempranas, que involucran desde la enfermedad microinvasiva (IA1, IA2) hasta enfermedad microscópica en el cérvix con menos de 4 cm, 1B1; 2) enfermedad localmente avanzada, que son los estadios 1B2- IVA; estadio clínico IVB y enfermedad recurrente (Candelaria et al., 2006).

1.3 TRATAMIENTO

El tratamiento para pacientes diagnosticadas con cáncer de cérvix depende en gran medida del estadio en que se encuentre el tumor; las etapas tempranas tienen mejor pronóstico de respuesta al tratamiento; estas pacientes presentan lesiones tempranas que pueden ser controlados de manera eficiente tanto con cirugía como con radioterapia (Landoni et al., 1997). Para las pacientes diagnosticadas en estadios localmente avanzados, el tratamiento de primera línea recomendado es la radioterapia concomitante con quimioterapia basada en cisplatino (National Comprehensive Cancer Network, 2009). Esto se estableció después de la publicación en 1999 de cinco estudios aleatorizados donde se demostró que la supervivencia con quimioterapia concomitante tenía mejores resultados que la radioterapia sola (Candelaria et al., 2006). La aplicación de la radiación externa radica en dirigir un as de rayos ionizantes por la parte externa del cuerpo hacia el sitio donde se aloja el tumor, generalmente la dosis administrada está cerca de la dosis máxima tolerada de 50 Gys fraccionados en 25 sesiones. La braquiterapia, requiere la colocación precisa de las fuentes de radiación directamente en el lugar del tumor, de manera que sólo ejerza su acción

citotóxica en la región localizada alrededor de la fuente de radiación, y la probabilidad de causar daño a los tejidos sanos circundantes sea mínima (Stewart and Bentzen, 2011). En el caso del CCLA la braquiterapia se puede administrar en baja dosis de radiación (LDR), o alta dosis (HDR) (Haie-Meder et al., 2009; Kim et al., 2009). Sin embargo, la supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global son similares para ambos tratamientos (Hareyama et al., 2002; Lertsanguansinchai et al., 2004). Aunque, la ventaja del tratamiento HDR se refleja en un tiempo de administración más corto (Viswanathan et al., 2007).

La quimioterapia con cisplatino se suministra vía intravenosa de manera concomitante con la radioterapia externa; es decir, ambos procedimientos se administran de manera simultánea. La dosis óptima y el tiempo de administración para el cisplatino no se han establecido por completo. Sin embargo, varias evidencias indican que la dosis semanal de 40 mg/m² durante 5 a 6 ciclos es la más efectiva y con un menor efecto citotóxico (Mitsuhashi et al., 2005; Rose et al., 1999). Aunque, la administración del cisplatino diaria ha mostrado mejoría potencial en el tratamiento, pero, tiene muchas limitaciones prácticas, por lo cual su aplicación debe ser muy supervisada.

A nivel sub-celular el blanco principal de la radiación ionizante y el cisplatino, es la molécula del material genético (ADN) (Powell and McMillan, 1990). El efecto de la radioterapia es la ruptura de la doble cadena del DNA; mientras que el cisplatino después de sufrir una reacción de acuasión en el citoplasma se une activamente al DNA con una predilección por los sitios nucleofílicos en las purinas (adeninas y guaninas), lo que lleva a la formación de complejos de DNA-proteína así como aductos inter e intra-cadena (Eastman, 1987). Durante el proceso de división celular – mayor en células tumorales- el material genético queda expuesto a la agresión tanto física como química de la radiación y el cisplatino, Por lo que el tratamiento es ligeramente más tóxico para las células que tienen alta tasa de proliferación (Nias, 1998). Así el objetivo de la quimioterapia concomitante es la reducción del volumen tumoral mediante la acción concurrente del cisplatino con la

radioterapia. Sin embargo, el volumen residual, tras la quimioterapia, puede estar compuesto por células quimio y radio-resistentes (Ismail et al., 2004).

1.4 RESISTENCIA CELULAR

Uno de los mayores obstáculos para el tratamiento efectivo del cáncer cervicouterino es la resistencia al tratamiento, la cual se ve reflejada en los altos índices de enfermedad recurrente. La resistencia a la terapia en los tumores se presenta de manera innata; es decir, las células tumorales tienen mecanismos intrínsecos que les permiten sobrevivir a las estrategias empleadas en la práctica médica; a diferencia de la resistencia adquirida, que sólo se presenta en un pequeño porcentaje de tumores después de las primeras terapias (Grem, 1998; Therasse et al., 2000). Hay al menos dos mecanismos descritos que se pueden clasificar como de pre-resistencia, mediante los cuales las células cancerosas evaden el efecto citotóxico de fármacos como el cisplatino, antes de unirse a sus blancos citoplásmicos y/o al DNA; 1) reducir la acumulación intra-celular de la droga farmacológica y 2) Incrementar el secuestro del fármaco mediante proteínas como el glutatión (GSH), metalotioneínas (MTs) y otros elementos con propiedades nucleofílicas del tipo “scavengers” (Galluzzi et al., 2012). Por ejemplo transportadores ABC, topoisomerasa, BCL2, MDR, glutatión-S-transferasa, sólo por mencionar algunos; que les permite sobrevivir al nuevo entorno agresor (Johnston et al., 1995; Perez-Plasencia and Duenas-Gonzalez, 2006; Snyder and Morgan, 2004). Un ejemplo de como la célula utiliza los mecanismos para reducir la acumulación intracelular de un fármaco; es mediante la disminución de la transcripción del gen *CTR1*, que codifica para la proteína transmembranal **transportador de Cobre 1** involucrada en la homeostasis del cobre y que tiene un papel primordial en la adquisición del cisplatino (Galluzzi et al., 2012). Otro mecanismo utilizado por las células tumorales es mediante los anteriormente mencionados transportadores del tipo ABC y proteínas de resistencia a múltiples drogas (MRP) MRP1, 2, 3 y 5

que actúan exportando el cisplatino del citoplasma (Borst et al., 2000). Cuando la acción del agente citotóxico ha causado daño por la interacción con su blanco terapéutico, las células resistentes tienen la capacidad de activar mecanismos de reparación que les permite sobrevivir. Por ejemplo, en condiciones de sensibilidad a algún fármaco que genere daño al DNA; como el cisplatino, el cual provoca que se formen los aductos inter e intra-cadena en el DNA, induce la activación de la cascada apoptótica. Sin embargo las células resistentes tienen la capacidad para reparar los aductos o bien sobrevivir a pesar del daño sin repararlo (Galluzzi et al., 2012). La mayoría de los daños al DNA provocados por el cisplatino son reparados por el sistema de reparación por escisión de nucleótidos (NER) (Shuck et al., 2008; Wood et al., 2000). En este proceso los nucleótidos dañados son escindidos del DNA por una incisión en ambos lados del daño, seguido por la síntesis para reconstituir la integridad genética (Gillet and Schärer, 2006). En algunos casos se puede presentar el fenómeno de la tolerancia a las lesiones del DNA, gracias a un grupo particular de DNA polimerasas que regulan la síntesis denominada trans-lesión. Como la DNA polimerasa POLH que sustituye a las polimerasas replicativas paralizadas e incluye nucleótidos opuestos a la lesión de DNA. O por la participación de la sub-unidad catalítica REV3 y la sub unidad estructural REV7 de la DNA polimerasa ζ (Galluzzi et al., 2012). En el daño al DNA provocado por la agresión física de la radiación, las células activan una compleja red de señalización que detiene el ciclo celular para llevar a cabo la reparación (Zhang et al., 2002). Hasta el momento se ha observado que los sensores del daño transducen su señal a un grupo de cinasas relacionada al fosfoinositol-3 (PIKKs) los cuales incluyen ATM, la proteína RAD 3 relacionada a ATM (ATR) y la protein-cinasa dependiente del DNA (DNA-PK). El efector de ATM es la proteína Chk2, mientras que para ATR lo hace a través de Chk1 (Abraham, 2003; Bakkenist and Kastan, 2003). En el fenotipo de resistencia se ha observado que están involucradas vías de señalización además de ATM/ATR como la de la recombinación no homóloga regulada por DNA-PK que participan en el

reconocimiento y reparación al daño a DNA de manera coordinada. No obstante, aunque hasta el momento se han descrito estos mecanismos celulares en la resistencia todavía se desconoce el mecanismo exacto por el cual son regulados.

1.5 MARCADORES MOLECULARES EN CÁNCER CERVICAL

Un biomarcador es una molécula o característica que puede ser medida y evaluada objetivamente como un indicador de un proceso tanto fisiológico como patológico o en respuesta a una intervención terapéutica. Un ejemplo de biomarcadores clásicos son las alteraciones medibles en la presión sanguíneas, los niveles de lactato en sangre después del ejercicio, y la glucosa sanguínea en diabetes mellitus. También la alteración molecular específica de una célula en el DNA, RNA, metabolitos, o niveles de proteína puede ser referido como marcador molecular (The Handbook of Biomarkers, Kewall).

En la actualidad no existe un biomarcador eficiente para el pronóstico temprano de respuesta al tratamiento en CC. Se ha intentado utilizar factores clínicos de riesgo asociados a la recurrencia; tales como la presencia de metástasis en ganglios linfáticos, tamaño del tumor, profundidad de la invasión hacia el estroma cervical, invasión en el parametrio, tipo histológico, grado de diferenciación, diámetro del tumor, volumen del tumor, cantidad de hemoglobina en sangre, entre otros; no obstante, estos marcadores clínicos no han sido eficientes en la práctica clínica para predecir la respuesta al tratamiento o el riesgo de recurrencia (Grigiene et al., 2007; Hart et al., 1997; Karin S. Kapp et al., 2005; Wagenaar et al., 2001). Debido a la falta de marcadores a nivel clínico efectivos, se ha optado por explotar el uso de marcadores moleculares, ya que los tumores con resistencia *innata*, tienen mecanismos celulares y moleculares regulados por la sobre-expresión ó sub-expresión de ciertos genes. En este escenario se ha intentado relacionar la

expresión de diferentes genes con la respuesta clínica y/o el índice de supervivencia, entre ellos p53, BCL-2, BAX, COX-2, etc; sin embargo los resultados han sido contradictorios, y en general la utilidad clínica de estos marcadores no es clara (Haffty and Glazer, 2003). Una de las observaciones es que el fenotipo de resistencia presente en las células tumorales no podría de ninguna manera ser el resultado de una sola alteración ó del cambio en el nivel de expresión de un solo gen; por lo que el fenómeno debe ser estudiado a un nivel genómico.

Con base en lo antes expuesto, el uso de tecnologías capaces de analizar en un solo experimento todos los elementos identificados en el genoma ha permitido desarrollar plataformas de microarreglos de alta densidad, los cuales son una poderosa herramienta para el estudio de la expresión de miles de genes y/o sus transcritos simultáneamente, formando un detallado retrato del perfil de expresión génica de células que pueden formar parte de una muestra al momento del estudio. El cáncer de mama es uno de los mejores ejemplos de cómo el análisis de los perfiles de expresión génica pueden pronosticar eficientemente el curso de una enfermedad (Clarke et al., 2001). El trabajo realizado por el grupo de la Dra. Laura Van't Veer, se basó en el análisis de datos obtenidos por microarreglos (de 25,000 oligonucleótidos) a partir de 98 muestras de tumores primarios de mama (obtenidos de pacientes con ganglios linfáticos negativos), en este trabajo se identificaron 70 genes, donde de acuerdo a su nivel de expresión puede clasificar a las pacientes con una elevada probabilidad de metástasis (van 't Veer et al., 2002; Weigelt et al., 2005). Con la implementación de esta firma génica se pudo seleccionar a las pacientes que eran aptas para recibir la terapia complementaria con tamoxifeno. Posteriormente, en otro estudio que incluyó 217 muestras nuevas que validaron y confirmaron la utilidad de la firma de 70 genes para decidir si una paciente se podría beneficiar con la terapia complementaria o no (van de Vijver et al., 2002). De esta forma se puede cuantificar el riesgo de recurrencia con mayor precisión, a diferencia de

los métodos tradicionales; además, evita tratamientos innecesarios o poco efectivos, que incluyen quimioterapia cito-tóxica que debilitan a las pacientes (Jemal et al., 2011). Este tipo de metodología se ha utilizado en distintos tipos de neoplasias como en leucemias (Yeoh et al., 2002), cáncer de colon (Barrier et al., 2006), linfoma de células B (Alizadeh et al., 2000), cáncer de cabeza y cuello (Roepman et al., 2005). Aunque, hasta la fecha solo se han podido aplicar de manera práctica en cáncer de mama mediante el MammaPrint (www.agendia.com) y en cáncer de próstata mediante el Oncotype DX.

En CC, se han reportado grupos de genes o firmas moleculares asociadas a la respuesta clínica del tratamiento, sin embargo, hasta el momento no existen trabajos donde se allá logrado estandarizar el uso de algún marcador o firma molecular como predictor de la respuesta al tratamiento con resultados reproducibles. Los trabajos de Kitahara, Wong Y, Wong YF y Rajkumar (Kitahara et al., 2002a; Rajkumar et al., 2009a; Wong et al., 2006a, 2003a), describen genes asociados a la resistencia al tratamiento en cáncer cervicouterino; pero estos estudios se basan en el tratamiento únicamente con radioterapia y no en el tratamiento con quimio-radioterapia que es el tratamiento estándar actual para este padecimiento.

Otro trabajo describe que la disminución de la carga genética y el número de copias en el DNA de los genes GBE1, RYBP, MED4 y FAM48A se pueden asociar con una mala respuesta clínica en cáncer cervicouterino, lo que indicaría que estos genes están asociados con la resistencia del tumor a la quimio-radioterapia (Lando et al., 2009). Sin embargo la firma se basa únicamente en el análisis de genes involucrados en el proceso de reparación de daños en el ADN por lo cual su poder predictivo será menor al de una firma de genes basada no sólo en este proceso.

Todos los genes o firmas de genes descritos hasta el momento para predecir la respuesta a la quimio y/o radioterapia en cáncer cervicouterino son distintos entre ellos, además que ninguna ha sido

validada clínicamente con resultados reproducibles y útiles, por lo que actualmente persiste la necesidad de desarrollar un método eficaz para predecir la respuesta a la quimio-radioterapia en cáncer cervicouterino localmente avanzado.

A la fecha, no se cuenta con una forma efectiva para el pronóstico al tratamiento estándar en pacientes con cáncer cervicouterino en estadios localmente avanzados, por lo tanto la mayoría de las pacientes diagnosticadas con esta patología son tratadas de manera indiscriminatoria con el mismo tratamiento sin poder conocer la respuesta. Con el uso adecuado de las técnicas de alta eficiencia en el pronóstico temprano de cáncer cervical localmente avanzado puede ayudar a aquellas pacientes que no responderán al tratamiento convencional a ser tratadas con una terapia adyuvante individualizada. Por ese motivo el tiempo y precisión del pronóstico es crucial.

Capítulo 1

Transcript Profiling Distinguishes Complete Treatment Responders with Locally Advanced Cervical Cancer

Artículo original enviado el 01 de noviembre de 2014, aceptado el 29 de enero de 2015 y publicado en Abril del 2015 en la revista Translational Oncology. (Fl. 3.4)

Fernandez-Retana J, Lasa-Gonsebatt F, Lopez-Urrutia E, Coronel-Martínez J, Cantu De Leon D, Jacobo-Herrera N, Peralta-Zaragoza O, Perez-Montiel D, Reynoso-Noveron N, Vazquez-Romo R, Perez-Plasencia C. Transl Oncol. 2015 Apr;8(2):77-84. doi: 10.1016/j.tranon.2015.01.003.

Transcript Profiling Distinguishes Complete Treatment Responders With Locally Advanced Cervical Cancer^{1,2,3,4}

Jorge Fernandez-Retana^{*,†}, Federico Lasag-Gonsebatt[†], Eduardo Lopez-Urrutia^{*}, Jaime Coronel-Martínez[‡], David Cantu De Leon[‡], Nadia Jacobo-Herrera[§], Oscar Peralta-Zaragoza[¶], Delia Perez-Montiel[#], Nancy Reynoso-Noveron^{**}, Rafael Vazquez-Romo^{††} and Carlos Perez-Plasencia^{*,†}

*Laboratorio de Genómica, UBIMED, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Tlalnepantla, México; †Laboratorio de Oncogenómica, Instituto Nacional de Cancerología, Tlalpan, México; ‡Unidad de Investigaciones Biomédicas en Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Tlalpan, México; §Unidad de Bioquímica, Instituto Nacional de Nutrición (INCMNSZ), Tlalpan, México; ¶Dirección de Infecciones Crónicas y Cáncer, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, México; #Departamento de Anatomía Patológica, Instituto Nacional de Cancerología, Tlalpan, México; **Unidad de Epidemiología, Instituto Nacional de Cancerología, Tlalpan, México; ††Servicio de Tumores de Mama, Subdirección de Cirugía, Instituto Nacional de Cancerología, Tlalpan, México

Abstract

Cervical cancer (CC) mortality is a major public health concern since it is the second cause of cancer-related deaths among women. Patients diagnosed with locally advanced CC (LACC) have an important rate of recurrence and treatment failure. Conventional treatment for LACC is based on chemotherapy and radiotherapy; however, up to 40% of patients will not respond to conventional treatment; hence, we searched for a prognostic gene signature able to discriminate patients who do not respond to the conventional treatment employed to treat LACC. Tumor biopsies were profiled with genome-wide high-density expression microarrays. Class prediction was performed in tumor tissues and the resultant gene signature was validated by quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction. A 27-predictive gene profile was identified through its association with pathologic response. The 27-gene profile was validated in an independent set of

Address all correspondence to: Carlos Perez-Plasencia, PhD, Av. San Fernando No. 22, Col. Sección XVI, 14080 Mexico. E-mail: carlos.pplas@gmail.com

¹This work was supported in part by the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM; grant IACOD-TB200111) and by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (grants SALUD-2009-01-113948, SALUD-2010-01-141907 and CONACYT-Catedras-2425-Genómica Integral del Cáncer) and National Cancer Institute of México (INCAN) scientific research funds. J.F.-R. received a CONACYT fellowship (104639).

²Conflicts of interest: The Cervical Cancer Conventional Treatment Response Profile (CC-CTRP) consisting in 27 genes has been protected by the Mexican Patent Office. The referral number is MX-E-2014-015826.

³Author contributions: J.F.-R. and F.L.-G. contributed equally to this work. C.P.-P. planned, organized, and conceived the original idea. O.P.-Z., E.L.-U., J.C.-M., and D.C.L. monitored the patients who participated in this project. R.V.-R. and D.P.-M.

did histopathologic analysis. J.F.-R. and F.L.-G. carried out the processing of microarrays, acquisition of data and analysis, and interpretation of data. J.F.-R., F.L.-G., E.L.-U., and C.P.-P. planned and draw all figures and discussed the manuscript. J.F.-R., F.L.-G., N.J.-H., N.R.-N., and C.P.-P. wrote and revised the manuscript.

⁴This article refers to supplementary materials, which are designated by Supplementary Tables S1 and S2 and Supplementary Figures S1 to S3 and are available online at www.transonc.com.

Received 1 October 2014; Revised 21 January 2015; Accepted 30 January 2015

© 2015 The Authors. Published by Elsevier Inc. on behalf of Neoplasia Press, Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1936-5233/15
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tranon.2015.01.003>

patients and was able to distinguish between patients diagnosed as no response *versus* complete response. Gene expression analysis revealed two distinct groups of tumors diagnosed as LACC. Our findings could provide a strategy to select patients who would benefit from neoadjuvant radiochemotherapy-based treatment.

Translational Oncology (2015) 8, 77–84

Introduction

Cervical cancer (CC) is the second leading cause of cancer-related deaths among women worldwide with an estimated 275,000 deaths in 2008; about 88% of them occur in developing countries. More than 80% of patients affected by CC have large tumors of advanced stage mainly those classified as locally advanced cervical cancer (LACC), for whom the mortality/incidence ratio is about 50% [1,2]. As with other cancers, treatment depends mainly on progression stage and some clinical characteristics such as tumor size [3,4]. LACC is defined by tumors confined to the pelvic wall; therefore, those patients have no distant metastasis. The standard treatment for patients diagnosed with LACC with International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) stages from IB2 to IVA [5] consists of radiotherapy in combination with cisplatin-based chemotherapy (40 mg/m²) followed by brachytherapy [5,6]; regrettably, the number of deceased patients due to disease progression after 5 years is as high as 50% [1].

Concomitant treatment based on chemotherapy and radiotherapy (CRT) has provided clinical benefits for pelvic control of CC; however, it has important toxicity in several patients, and some studies have shown that it could not significantly extend the overall survival in at least 40% of patients [7,8]; in addition, up to 35% of patients experience disease progression after CRT [9]. This scenario highlights the need for early detection of innate resistance to conventional or standard therapy, which would allow physicians to provide tailored treatment alternatives as early as possible. The advent of high-throughput technologies enables us to define patients' tumors as a function of their gene expression profile and use this information to improve identification of patients that would benefit with conventional treatment and those in need of adjuvant therapy. Such an approach has been developed for breast cancer [10], leukemia [11], colon cancer [12], and B cell lymphoma [13]. Nevertheless, this approach is only currently applied in the clinic to breast cancer in the form of MammaPrint (www.agendia.com) and to prostate and colon cancers through Oncotype DX [14] (www.oncotypedx.com).

Patients who do not respond to conventional treatment could require other chemotherapy-based treatment schemes; therefore, their timely detection is crucial. To contribute to this aim, we searched for a gene expression signature able to predict the clinical outcome for LACC patients who receive conventional treatment as soon as at the time of diagnosis.

Thus far, there are no reports showing the use of microarrays to identify gene signatures associated with clinical response to CRT in LACC; here, by means of transcriptome profiling and machine learning algorithm, we identified a group of genes that can be used as molecular markers to predict the clinical outcome in those patients. Our rationale is that primary tumors that have not received any conventional treatment (virgin to treatment) carry expression patterns capable of predicting the potential tumor progression; hence, accurate identification of genes involved in the innate resistance could be

employed as a prognosis signature associated with CRT treatment-derived clinical response. In this study, we analyzed the genome-wide expression profiles in a discovery group consisting of 89 LACC patients receiving conventional or standard treatment (CRT) by means of genome-wide high-density arrays, covering 45,000 expressed sequences. A nearest-mean classifier was trained for probe selection in a leave-one-out cross-validation process. We obtained a 27-gene signature capable of predicting with high significance the clinical response as complete response (CR) *versus* no response (NR). Next, gene expression values were confirmed by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) on an independent validation group of 30 patients, confirming the gene expression signature.

Material and Methods

Tumor Samples

The population under this study included 119 patients prospectively enrolled into the National Cancer Institute of Mexico

Table 1. Clinical-Pathologic Status of CCLA Patients (*n* = 119)

Characteristics	Patients	
	N	Percentage
Age		
Median	48	
Range	29-69	
Histologic type		
Squamous cell carcinoma	109	92.59%
Adenocarcinoma	10	8.41%
Tumor size		
≤4 cm	41	34.45%
≥4 cm	71	59.66%
Without data	7	5.88%
Clinical stage (FIGO)		
IB2	14	11.76%
IIA	1	0.84%
IIB	76	63.86%
IIIA	1	0.84%
IIIB	27	22.68%
HPV genotyping (frequency)		
Type 16	57	37.74%
Type 18	28	18.54%
Type 45	16	10.59%
Type 33	8	6.72%
Others	33	21.85%
Not determined	9	5.96%
Patients with HPV co-infection	33	27.73%
Patients without HPV co-infection	77	64.70%
Not determined	9	7.56%
Treatment outcome		
CR	79	66.38%
NR	36	30.25%
Without date for desertion	4	3.36%

All patients received radiotherapy and cisplatin as coadjuvant (50-Gy external radiation, 35-Gy intracavitary brachytherapy, and six cycles of 40 mg/m²-cis-diamminedichloroplatinum(II)).

(INCAN) tumor-banking protocol at the time of diagnosis (April 2010 through August 2012). All patients included accept and signed informed consent; institutional ethics and scientific board committees approved the protocol. Immediately after punch biopsy, tumor samples were split into three pieces, one for pathologic confirmation of at least 80% of tumor cells that is mandatory for this type of molecular profiles and the remaining two for RNA and DNA isolation. RNA and DNA biopsies were frozen in liquid nitrogen until nucleic acid extraction. Eligibility criteria were 1) patients with a confirmed pathologic diagnosis of CC staged IB2 up to IIIB (LACC); 2) biopsies with pathology report with more than 80% of tumors cells; hence, the genomic analysis is mainly addressed for tumor cells; 3) age greater to 20 and less than 60 years; 4) high-quality DNA and RNA; 5) no presence of comorbidities; 6) without previous oncological treatment; and 7) patients able to receive standard or conventional therapy based on concurrent CRT. Chemotherapy was based on weekly *cis*-diamminedichloroplatinum(II) at 40 mg/m² during five to six cycles. Radiotherapy consisted of external radiation and intracavitary brachytherapy, for a total dose of 64 to 66 Gy over 67 days [6]. Hence, all patients received the same conventional treatment. Clinical characteristics of patients are summarized in Table 1.

Clinical Definitions

Staging was assessed according to the FIGO classification [15]. Clinical responses were evaluated by RECIST 1.1 criteria and computed axial tomography scan and were assigned as CR, defined as the disappearance of all signs of cancer in response to treatment, and NR, defined as patients with partial, progressive, or stable disease [16].

HPV Genotyping

DNA was obtained from cervical tumor biopsies by means of MagNAPure Compact Instrument following the manufacturer's recommendations (Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Germany). HPV genotyping was assessed by two approaches, linear array HPV genotyping (Roche Diagnostics GmbH, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim Germany) and nested multiplex PCR (MY/GP primers) with subsequent PCR-fragment direct sequencing [17].

RNA Purification and Microarray Hybridization

Eighty-nine samples obtained at the time of diagnoses were used to discover a gene expression signature associated with clinical response. We compared gene expression signatures from patients with CR against patients diagnosed as NR. The quality of RNA was assessed by means of 18S:28S ratio. Hybridization targets were prepared from 250 ng of total RNA and amplified with whole transcriptome amplification kit 2 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Four micrograms of amplified and Cy3-labeled cDNA was used to hybridize onto high-density arrays containing 45,000 features according to the recommended protocol of Nimblegen Roche (Mannheim, Germany). After standard washes, arrays were scanned on the Nimblegen MS200 microarray scanner. Images were stored for further analyses.

Microarray Preprocessing and Statistical Analysis

Scanned images were gridded by using the NimbleScan v2.6 Software (Nimblegen Roche). Then, robust multi-array analysis background normalization and quantile normalization were performed for intra-array and inter-array normalization, respectively. Genes with signal intensities above a 95% random threshold were

chosen [18]. Differential expression between clinical outcomes was assessed by moderated *t* tests and significance statistics for each gene were obtained by the empirical Bayes method implemented in limma package from Bioconductor [19]. Global differential expression was also examined by random sampling of class labels. We selected gene subsets on the basis of classifier optimal performance ranking, as in previous approaches [20,21]. A nearest mean classifier was trained for feature selection in a leave-one-out cross-validation process and feature selection was further tested by another leave-one-out cross-validation procedure to select the profile with the strongest association with clinical response. Graphics were generated using Genesis 2.1 software [22]. The total microarray raw and normalized data of this study are public available at the Gene Expression Omnibus database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) with accession number GSE56303.

Validation of Gene Expression Profile by qRT-PCR

We employed the remaining 30 samples to validate the gene expression profile identified in the discovery tumor set. Twenty-seven differentially expressed genes were subjected to qRT-PCR. Each primer set was designed by an experimentally verified computer algorithm and then tested in a quality control assay to guarantee that they yield a single band of the predicted size by agarose gel electrophoresis. The sequence of primers and PCR conditions are shown in Supplemental Table S1. RT reactions were performed according to the MMLV protocol from Promega (Madison, WI) following the vendor's recommendations. Real-time PCR was performed using FastStart SYBR Green Master in Light Cycler 480 Instrument II (Roche, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's protocol. Duplicate RT samples were used in each assay, data were normalized with β -actin housekeeping gene, and in a parallel way, *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) was used. The comparative Ct method ($\Delta\Delta C_t$) was used to quantify gene expression, and relative quantification was calculated as $2^{-\Delta\Delta C_t}$ for both housekeeping genes.

Disease-Free Survival

Disease-free survival (DFS) of the resulting patient groups was evaluated using the Kaplan-Meier method, and the statistical significance of survival differences was determined with the log-rank test. Multivariate analysis for confounding factors was performed with the Fisher exact test.

Results

Patient Characteristics

Relevant clinical information of 119 recruited patients in this study is shown in Table 1. The median age at diagnosis was 48 years (range 29 to 59 years). The majority of patients were diagnosed as IIB (63.8%) and IIIB stages (22.7%); 92.6% were squamous cell carcinomas, while 8.4% were adenocarcinoma histologic type. The main HPV types were 18 (18.5%) and 16 (37.7%); an important number of patients (27.7%) were infected with two or more HPV types. The median clinical follow-up was 24 months. Thirty-six (30.2%) patients had NR, while seventy-nine (66.4%) were diagnosed as complete responders (CR), and four patients (3.3%) withdrew from the protocol.

Gene Expression Profile from 89 Tumors

To identify genes differentially expressed in pretreatment biopsies of responders (CR) and non-responders (NR), we applied a supervised

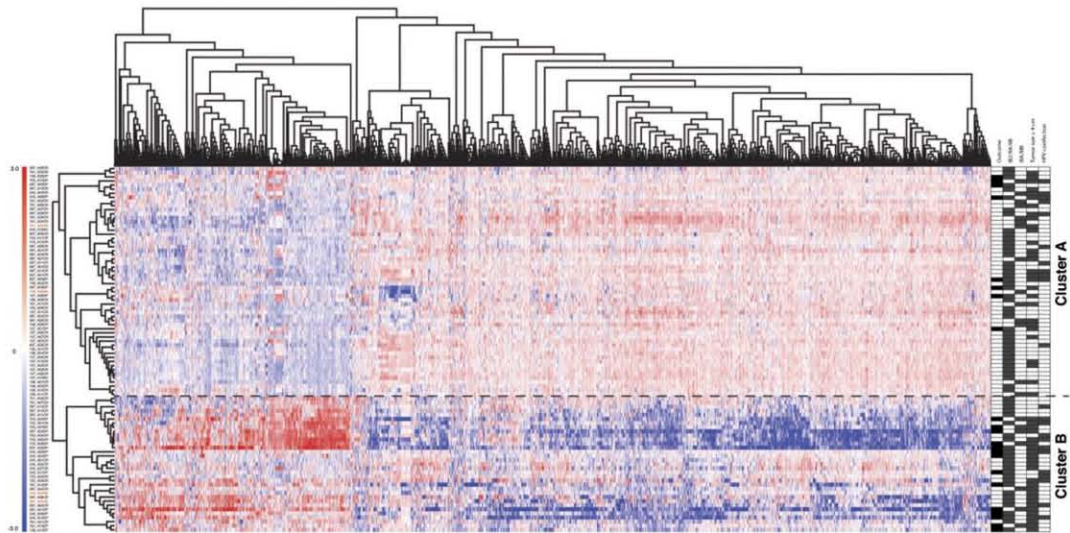


Figure 1. Supervised two-dimensional cluster analysis of 89 CC tumor profiles. Two-dimensional presentation of transcript ratios for 89 CC tumors. We selected 2133 genes with fold change >1.5 and P value $<.02$. In the right panel, each individual's response diagnosis status after 2.5-year follow-up period is indicated as black squares for NR and white squares for CR. Clinical characteristics such as stage (FIGO classification), tumor size >4 cm, and co-infection by two of more HPV types are shown as gray squares.

classification based on moderated t tests and significance statistics obtained by the empirical Bayes method. We obtained a list of 2133 genes with significant differential expression ($P < .02$). Figure 1 shows a two-dimensional hierarchical clustering using Pearson correlation distance and complete linkage clustering obtained from Genesis 2.1 software [22]. Dendrograms shown in Figure 1 represent the similarity between clinical samples based on gene expression profiles; the length and subdivision of the branches show the similarity between CC tumors (left) and the gene expression profiles (top). The four patients who withdrew from the protocol are represented in red in the left dendrogram. Two tumor groups are clearly observed; the dashed line indicates the subdivision of these two main groups. In the top group (cluster A), there are 56 tumor samples, from which 46 responded favorably (CR group), which represents 82.1% of tumors contained in cluster A. While the bottom group (cluster B) contains 33 samples, from which 14 (42.4%) had no response (NR group), this feature suggests that LACC tumors can be divided with respect to their clinical outcome based on the differential expression pattern of 2133 genes (fold change >1.5 and $P < .02$). Information explaining clinical outcome and the relationship between both clusters to some relevant clinical features is shown in Table 2. To have a complete clinical perspective, we associated tumor

Table 2. Clinical Features Associated with Supervised Two-Dimensional Cluster Analysis of 89 CC Tumor Profiles

	N	Patients Who Withdrew	CR	NR	IB2	IIA	IIB	IIIA	IIIB	Tumor Size ≥ 4	HPV Co-Infection
Cluster A	56	2	46	8	5	1	36	1	13	29	11
Cluster B	33	2	17	14	5	0	21	0	7	25	12
Overall	89	4	63	22	10	1	57	1	20	54	23

gene expression profiles with informative clinical features: FIGO stage, tumor size, and co-infections by two or more HPV types. Of 68 tumors classified as IB2 to IIB stages, 42 were grouped in cluster A and 26 in cluster B; from 21 tumors classified IIIA to IIIB, 14 and 7 were grouped in clusters A and B, respectively. Tumor size is a clinical marker frequently used as a clinical response predictor [3,4]; from 54 biopsies with an initial tumor size greater than four centimeters, 29 (53.7%) belonged to cluster A and 25 (46.2%) were grouped in cluster B. Regarding HPV co-infection, of 23 samples with two or more HPV types, cluster A had 11 samples and the rest were grouped in cluster B; therefore, tumor samples with HPV co-infection grouped in cluster B represent 36.3% of the samples. The multivariate significance analysis of clinical

Table 3. Multivariate Significance Analysis

Clinical Feature		CR	NR	P Value	
Multivariate analysis of cluster A with CR and NR ($n = 56$)					
FIGO stage	IB2/IIA/IIB	35	7	$P = .664$	Not significantly
	IIIA/IIIB	13	1		
Tumor size	<4 cm	26	1	$P = .052$	Not significantly
	≥ 4 cm	22	7		
HPV infection	Single	40	5	$P = .181$	Not significantly
	Co-infection	8	3		
Multivariate analysis of cluster B with CR and NR ($n = 33$)					
FIGO stage	IB2/IIA/IIB	18	8	$P = 0.026$	Significantly
	IIIA/IIIB	1	6		
Tumor size	<4 cm	7	1	$P \leq .098$	Not significantly
	≥ 4 cm	12	13		
HPV infection	Single	12	9	$P = 1.000$	Not significantly
	Co-infection	7	5		

P Values for stage, tumor size, and HPV co-infection were calculated by Fisher exact test.

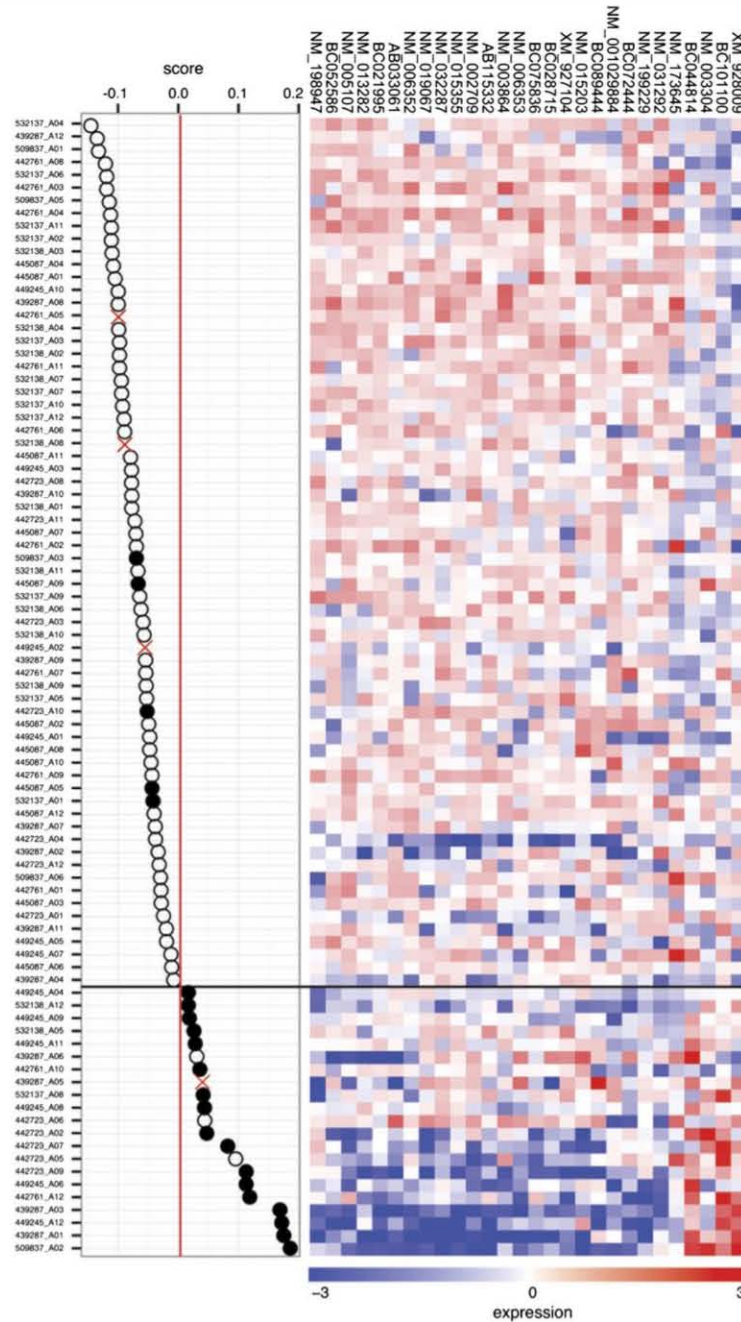


Figure 2. CC-CTRP. The predictor genes are clustered based on their similarities across the 89 tumors. The left panel shows tumors ordered according to their CC-CTRP score; the red line divides positive and negative values. White circles indicate CR tumors, and black circles indicate NR cases. The heat map (right) shows the expression of the 27-gene signature.

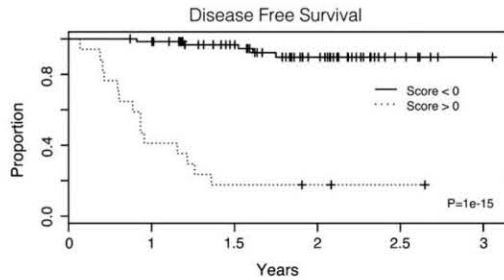


Figure 3. Kaplan-Meier DFS analysis based on 27-gene predictor stratification. The behavior of CC-CTRP for patients with NR to conventional treatment is shown by a dotted line and that for patients with CR is shown by a continuous line; both groups are clearly separated within the first months. Clinical response was assessed according to RECIST 1.1 criteria.

characteristics summarized in Table 3 showed that only FIGO stage had a slight significant association to clinical response ($P = .026$).

Prediction Model for the Prognostic Profile in LACC

To identify genes with scores capable of discriminating between CR and NR clinical outcomes, we employed a supervised classification approach that has shown success in previous studies [20,21]. Genes ranked by significance of differential expression were used and a nearest mean classifier was trained in a leave-one-out cross-validation process to select genes with the best classifier performance. Using the predictive algorithm, a 27-gene signature was developed with maximum accuracy in predicting clinical response status (sensitivity: 74%, that is the capacity to predict patients with NR; specificity: 91.3%, that predict the patients with CR; and overall accuracy of 90%); Figure Supplementary S1 shows the classifier performance, while the description of the 27-gene signature is summarized in Supplementary Table S2. The expression pattern of genes present in this 27-gene signature panel is shown in Figure 2. The left panel shows the classifier itself, clinical outcome is represented with black circles for patients with NR and white circles for CR, and the score for each one is indicated in the x-axis. According to this score, patients were divided in two groups delimited by a red line: 17 of 21 (80%) patients with NR and 62 of 68 (91%) patients with CR were assigned the expected score (lying to the right and left of the red line, respectively) showing the high sensitivity and specificity of our predictor. Each patient's 27-gene profile is displayed in the heat map at the right, where contrasting patterns can be observed at the top and bottom, suggesting an expression profile gradient between patients with the best (top) and worst (bottom) prognoses. Interestingly, the apparent threshold indicated by a horizontal black line corresponds to the actual disease outcome of the patients represented by black or white circles in the classifier at the left. Moreover, Kaplan-Meier analysis showed a statistically significant difference in DFS between the NR and CR groups (Figure 3). The NR group had a mean DFS of 16 months, whereas the CR had a median survival that had not yet been reached ($\log\text{-rank } P = 1 \times 10^{-16}$).

Validation by qRT-PCR

To confirm the discrimination capability of the Cervical Cancer Conventional Treatment Response Profile (CC-CTRP) gene signa-

ture, we searched for gene expression levels of all 27 genes that were validated by qRT-PCR in an independent group formed by 30 independent patients with LACC diagnosis. Total RNA was isolated from biopsies taken before treatment; diagnosis-wise 16 of these patients were classified as CR and 14 as NR. For the sake of clarity, we analyzed the qRT-PCR results as $\Delta\Delta\text{Ct}(\log_2)$, which represents the fold change relative to the $\beta\text{-actin}$ housekeeping gene (Figure 4A); in a parallel analysis, we used another housekeeping gene ($GAPDH$) to confirm the consistency of results (Figure 4B). Although $GAPDH$ and $\beta\text{-actin}$ housekeeping genes showed slight differences in expression levels (Supplementary Figure S2), the ability to discriminate both clinical responses (CR vs NR) does not show significant differences (Supplementary Figure S3, A and B). Hence, the RT-PCR results were evaluated as $\Delta\Delta\text{Ct}(\log_2)$ grouped patients in accordance with the initial 27-gene classifier, regardless of the source of the data, qRT-PCR, or microarrays.

Discussion

Despite of the increase in early detection programs, CC still remains one of the principal neoplasms causing death of women throughout the world since most patients are diagnosed only when they arrive to health centers and the disease has often reached locally advanced stages. Thus far, no generally accepted molecular marker for CC has been reported [23] and clinical parameters are the only strategy currently used in the prediction of disease outcome.

In this work, we aimed to find a molecular signature associated with chemo-radioresistance of LACC; tumor biopsies were carefully selected to fulfill inclusion criteria, which included that each biopsy had more than 80% of tumor cells. We obtained the differentially expressed gene profiles and their correlation with the clinical outcome of 89 tumors and used these data to build a predictor algorithm to identify chemoradiotherapy-resistant individuals. The data were later validated by assessing 30 additional samples in an independent group, for a total of 119 LACC analyzed patients.

We identified a 27-gene molecular signature with high prognostic value, which proved to be more effective than tumor size in predicting disease outcome that is currently the main clinical approach used as predictive marker [3] (Table 3). Our predictor sorted correctly 17 of 22 patient diagnoses; this figure represents 80% of effectiveness. The Kaplan-Meier graph in Figure 3 shows that disease outcome can be identified as early as 4 months by using our approach.

Several works have used microarray technologies in the search for CC molecular signatures associated with different conditions such as radioresistance [24–26], early stage lymph node metastasis [27], and resistance to angiocidin and darapladib-based anti-tumoral and anti-inflammatory treatment [28]. However, despite assessing the same tumor type, these molecular signatures lack consistency, mainly because treatment selection is not based on NCI standards, which could affect the reported genes. In addition, this may result from the diverseness of the experimental designs or intrinsic bias of the different microarray platforms [23]. However, the populations that these authors have analyzed, while seemingly similar, are actually very diverging when observed from the perspective of the therapy. Thus, we find it reasonable to speculate that different treatments elicit variable but specific gene expression profiles. Moreover, intra-tumor source heterogeneity is an important but seldom considered point. Bachtiary and co-workers suggest that increasing sample size can serve as a remedial measure, based on variance-component analysis of the genetic properties of replicate cancer biopsies [29]. Currently, there is

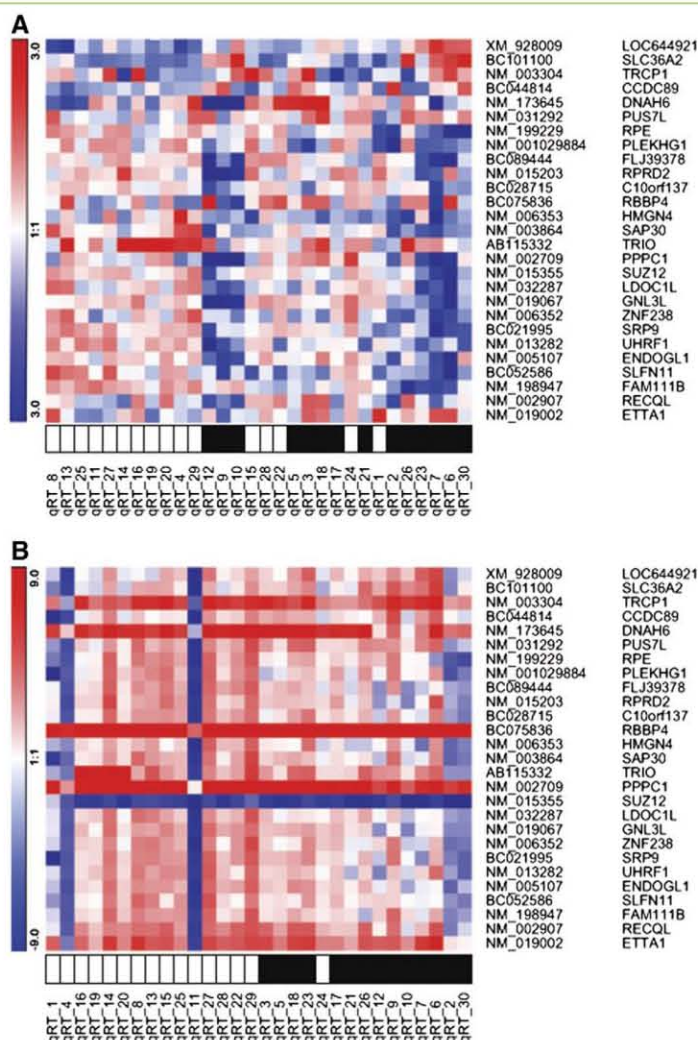


Figure 4. qRT-PCR validation. The cluster illustrates a comparison of data from real-time qRT-PCR of 30 patient analyses of each of the CC-CTRP signature. Clustering was obtained by means of their similarities (Pearson correlation and complete linkage clustering). Black squares represent non-responders; white squares represent complete responders. Gene expression levels were normalized to (A) *β-actin* and (B) *GAPDH*.

no previous report of a molecular signature associated with conventional treatment response. To our knowledge, this work is the first transcriptome-based molecular signature associated with conventional treatment based on chemoradiotherapy resistance and the largest LACC sample number assessed in such a study.

Conclusion

Patients diagnosed with LACC are submitted to conventional treatment, without certainty of a CR, due to tumor chemoradiotherapy resistance. The CC-CTRP gene signature, obtained in this work, is a novel prognosis tool aimed at sorting patients with regard to their sensibility to conventional treatment; consequently, it would be possible to give those with a bad prognosis the opportunity

to undertake alternative or complementary treatment without prior exposition to conventional treatment, avoiding unnecessary weakening and thus increasing their survival possibilities. However, more studies would be necessary to increase evidence about the utility of the current molecular signature.

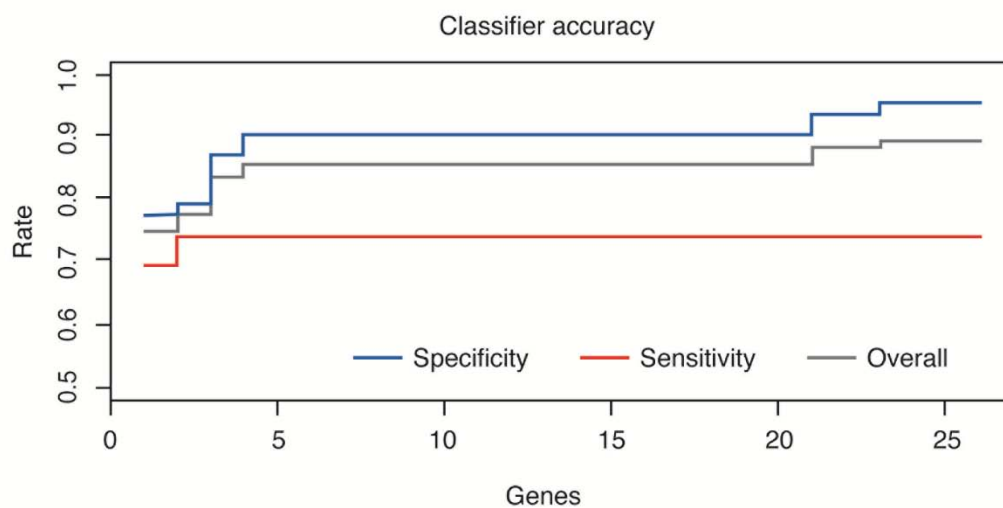
Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.tranon.2015.01.003>.

Acknowledgements

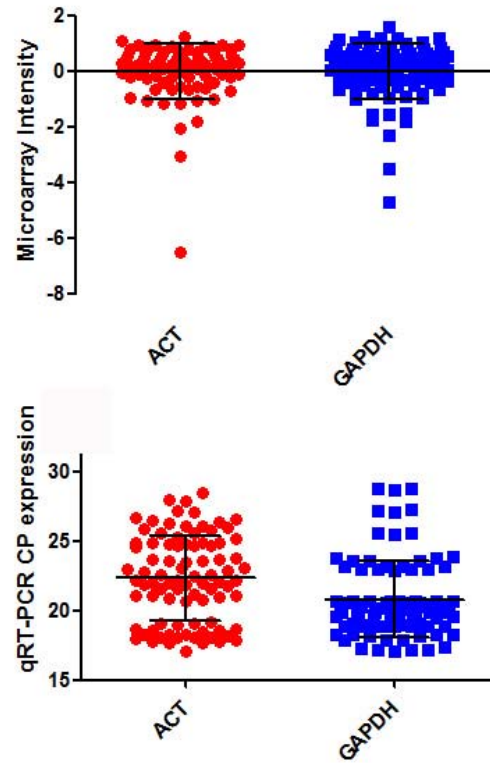
This manuscript was submitted in partial fulfillment of J.F.-R.'s requirements for a PhD degree in Posgrado en Ciencias Biologicas, Universidad Nacional Autonoma de Mexico. We want to acknowledge the technical support of Abraham Pedroza for housekeeping gene experiments.

References

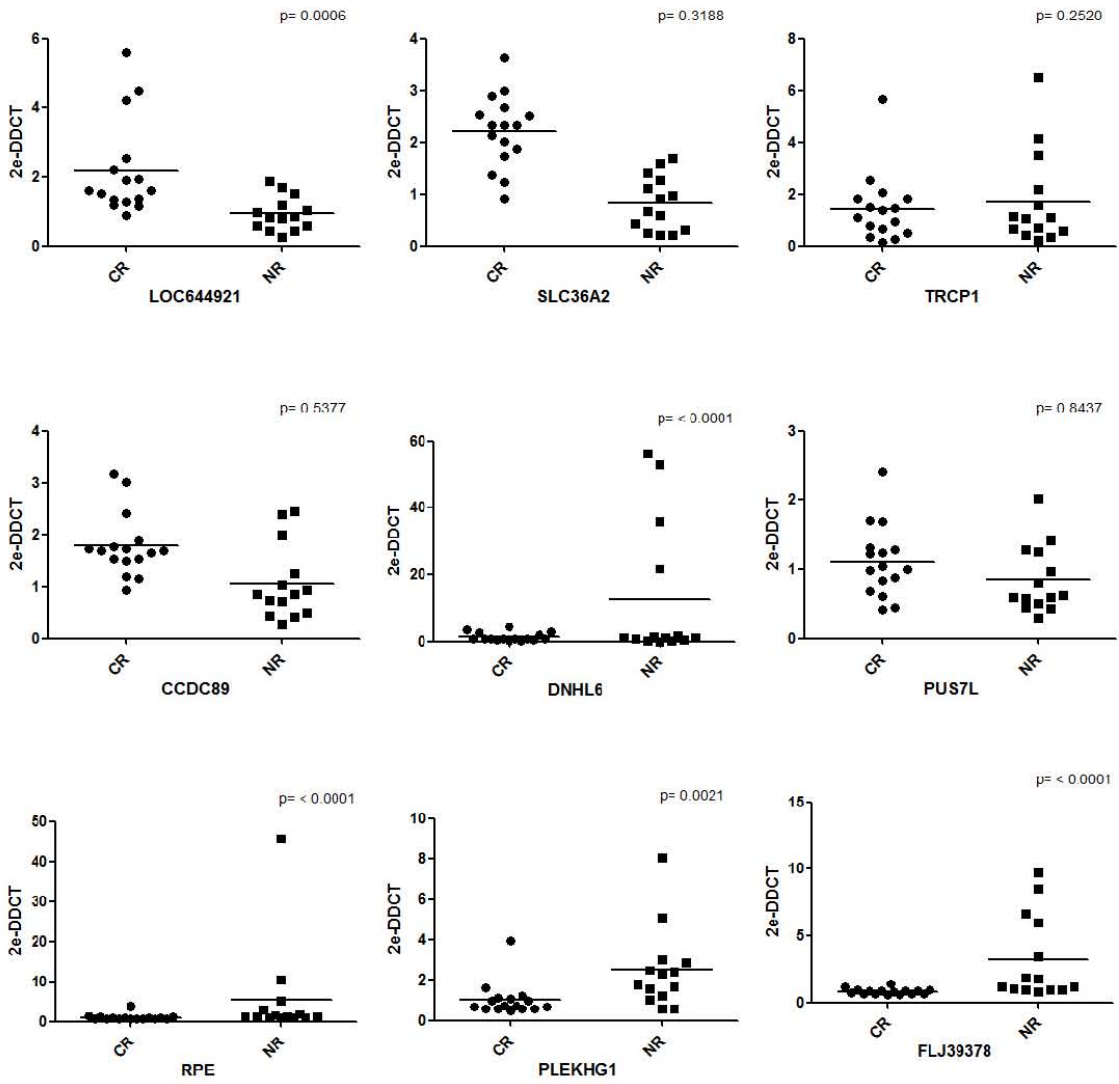
- [1] Green JA, Kirwan JM, Tierney JF, Symonds P, Fresco L, and Collingwood M, et al (2001). Survival and recurrence after concomitant chemotherapy and radiotherapy for cancer of the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* **358**, 781–786. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)05965-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(01)05965-7).
- [2] Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, and Forman D (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* **61**, 69–90. <http://dx.doi.org/10.3322/caac.20107>.
- [3] Kapp KS, Poschauko J, Tauss J, Berghold A, Oechs A, and Lahousen M, et al (2005). Analysis of the prognostic impact of tumor embolization before definitive radiotherapy for cervical carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **62**, 1399–1404. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijrobp.2004.12.037>.
- [4] Kapp KS, Stueckschweiger GF, Kapp DS, Poschauko J, Pickel H, and Lahousen M, et al (1998). Prognostic factors in patients with carcinoma of the uterine cervix treated with external beam irradiation and IR-192 high-dose-rate brachytherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **42**, 531–540.
- [5] Waggoner SE (2003). Cervical cancer. *Lancet* **361**, 2217–2225. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13778-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13778-6).
- [6] National Comprehensive Cancer Network (NCCN) (2009). Clinical Practice Guidelines in Oncology Cervical cancer. V. 1.2009. <http://www.nccn.org>; 2009.
- [7] Kirwan JM, Symonds P, Green JA, Tierney J, Collingwood M, and Williams CJ (2003). A systematic review of acute and late toxicity of concomitant chemoradiation for cervical cancer. *Radiother Oncol* **68**, 217–226.
- [8] Pearcey R, Brundage M, Drouin P, Jeffrey J, Johnston D, and Lukka H, et al (2002). Phase III trial comparing radical radiotherapy with and without cisplatin chemotherapy in patients with advanced squamous cell cancer of the cervix. *J Clin Oncol* **20**, 966–972.
- [9] Chemoradiotherapy for Cervical Cancer Meta-Analysis Collaboration (2008). Reducing uncertainties about the effects of chemoradiotherapy for cervical cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 18 randomized trials. *J Clin Oncol* **26**, 5802–5812. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2008.16.4368>.
- [10] van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AAM, and Voskuil DW, et al (2002). A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* **347**, 1999–2009. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa021967>.
- [11] Yeoh E-J, Ross ME, Shurtleff SA, Williams WK, Patel D, and Mahfouz R, et al (2002). Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell* **1**, 133–143.
- [12] Barrier A, Boelle P-Y, Roser F, Gregg J, Tse C, and Brault D, et al (2006). Stage II colon cancer prognosis prediction by tumor gene expression profiling. *J Clin Oncol* **24**, 4685–4691. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2005.05.0229>.
- [13] Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, and Rosenwald A, et al (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* **403**, 503–511. <http://dx.doi.org/10.1038/35000501>.
- [14] Kittaneh M, Montero AJ, and Glück S (2013). Molecular profiling for breast cancer: a comprehensive review. *Biomark Cancer* **5**, 61–70. <http://dx.doi.org/10.4137/BIC.S9455>.
- [15] Hirschowitz L, Nucci M, and Zaino RJ (2013). Problematic issues in the staging of endometrial, cervical and vulval carcinomas. *Histopathology* **62**, 176–202. <http://dx.doi.org/10.1111/his.12058>.
- [16] Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, and Ford R, et al (2009). New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* **45**, 228–247. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2008.10.026>.
- [17] Sotlar K, Diemer D, Dethleffs A, Hack Y, Stubner A, and Vollmer N, et al (2004). Detection and typing of human papillomavirus by c6 nested multiplex PCR. *J Clin Microbiol* **42**, 3176–3184. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.7.3176-3184.2004>.
- [18] Simon A and Bior E (2010). ANAIS: analysis of NimbleGen arrays interface. *Bioinformatics* **26**, 2468–2469. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btq410>.
- [19] Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, and Dudoit S, et al (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* **5**, R80. <http://dx.doi.org/10.1186/gb-2004-5-10-r80>.
- [20] van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AAM, and Mao M, et al (2002). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* **415**, 530–536. <http://dx.doi.org/10.1038/415530a>.
- [21] Roepman P, Wessels LFA, Kettelarij N, Kemmeren P, Miles AJ, and Lijnzaad P, et al (2005). An expression profile for diagnosis of lymph node metastases from primary head and neck squamous cell carcinomas. *Nat Genet* **37**, 182–186. <http://dx.doi.org/10.1038/ng1502>.
- [22] Sturm A, Quackenbush J, and Trajanoski Z (2002). Genesis: cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics* **18**, 207–208.
- [23] Harima Y, Togashi A, Horikoshi K, Imamura M, Sougawa M, and Sawada S, et al (2004). Prediction of outcome of advanced cervical cancer to thermoradiotherapy according to expression profiles of 35 genes selected by cDNA microarray analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **60**, 237–248. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijrobp.2004.02.047>.
- [24] Kitahara O, Katagiri T, Tsunoda T, Harima Y, and Nakamura Y (2002). Classification of sensitivity or resistance of cervical cancers to ionizing radiation according to expression profiles of 62 genes selected by cDNA microarray analysis. *Neoplasia* **4**, 295–303. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.neo.7900251>.
- [25] Rajkumar T, Vijayalakshmi N, Sabitha K, Shirley S, Selvaluxmy G, and Bose MV, et al (2009). A 7 gene expression score predicts for radiation response in cancer cervix. *BMC Cancer* **9**, 365. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-9-365>.
- [26] Wong YF, Selvanayagam ZE, Wei N, Porter J, Vittal R, and Hu R, et al (2003). Expression genomics of cervical cancer: molecular classification and prediction of radiotherapy response by DNA microarray. *Clin Cancer Res* **9**, 5486–5492.
- [27] Huang L, Zheng M, Zhou Q-M, Zhang M-Y, Jia W-H, and Yun J-P, et al (2011). Identification of a gene-expression signature for predicting lymph node metastasis in patients with early stage cervical carcinoma. *Cancer* **117**, 3363–3373. <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.25870>.
- [28] Koch M and Wiese M (2013). Gene expression signatures of angiocidin and darapladib treatment connect to therapy options in cervical cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* **139**, 259–267. <http://dx.doi.org/10.1007/s00432-012-1317-9>.
- [29] Bachtary B, Boutros PC, Pintilie M, Shi W, Bastianuto C, and Li J-H, et al (2006). Gene expression profiling in cervical cancer: an exploration of intratumor heterogeneity. *Clin Cancer Res* **12**, 5632–5640. <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0357>.

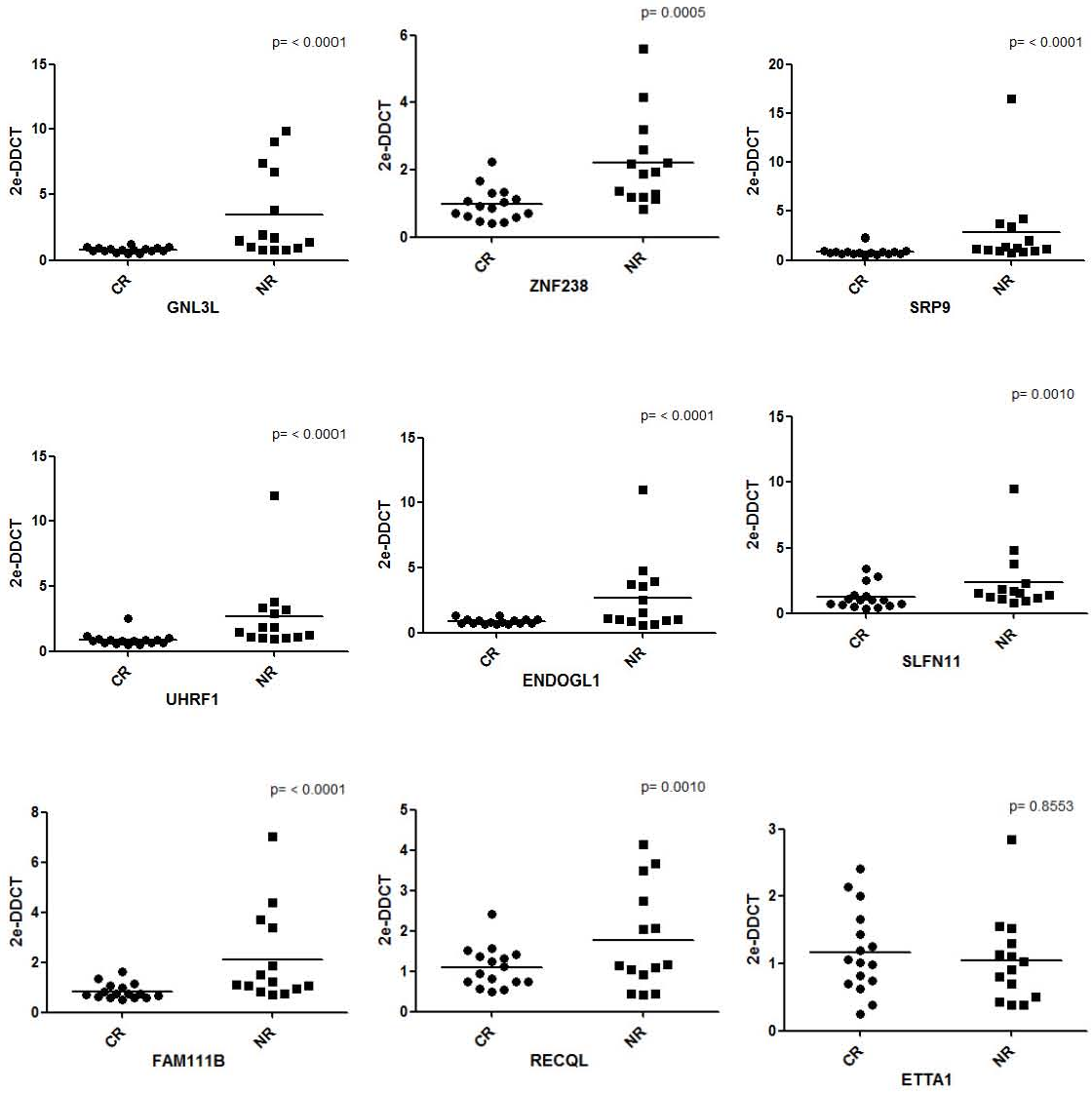


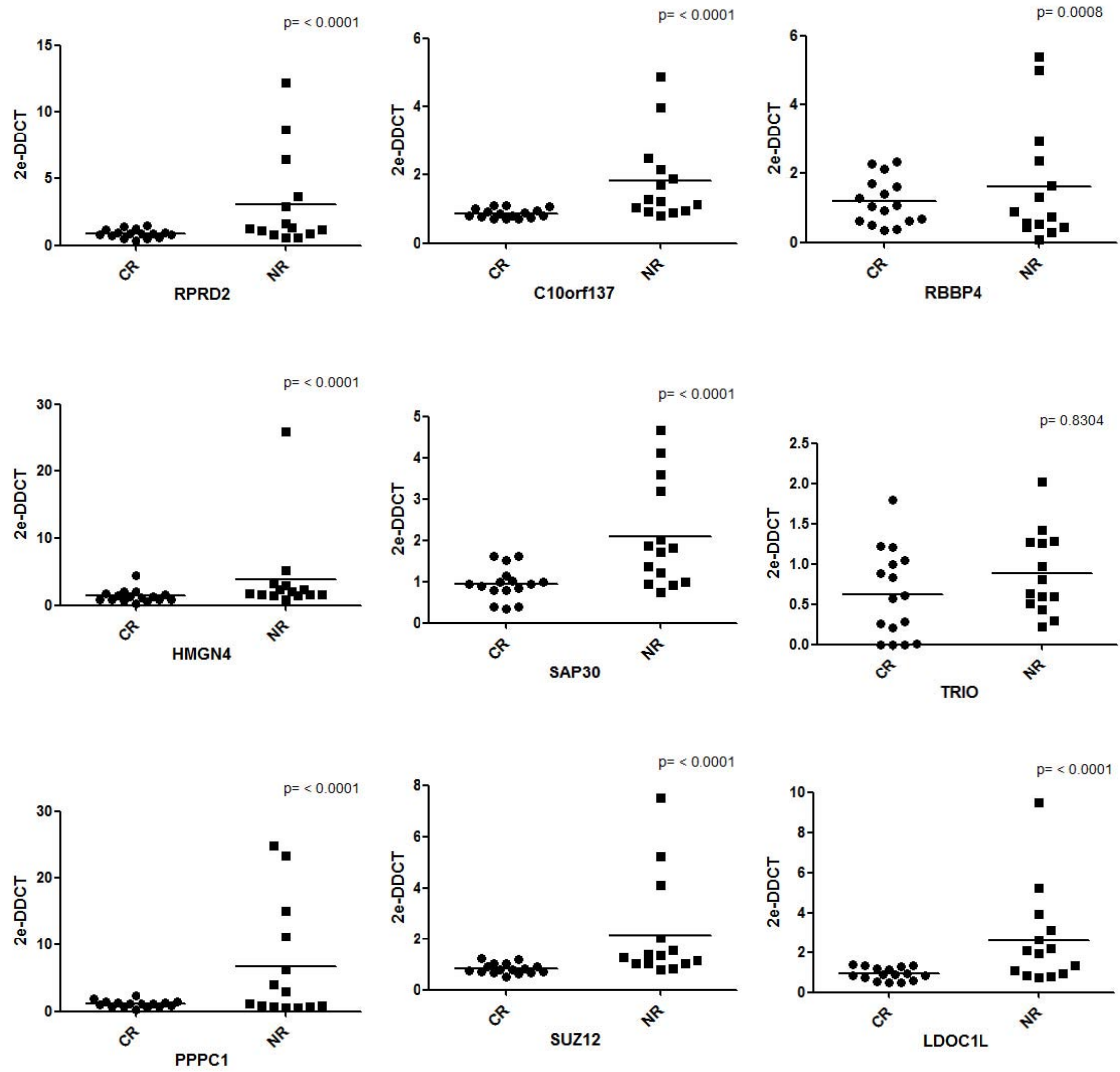
Supplementary figure S1. Predictor performance. A genomic average profile capable of discriminating favorable outcome or poor prognosis in LACC was obtained. The genomic average profile used 27 genes and performed with 74% sensitivity, 91.3% specificity and 90% overall accuracy.



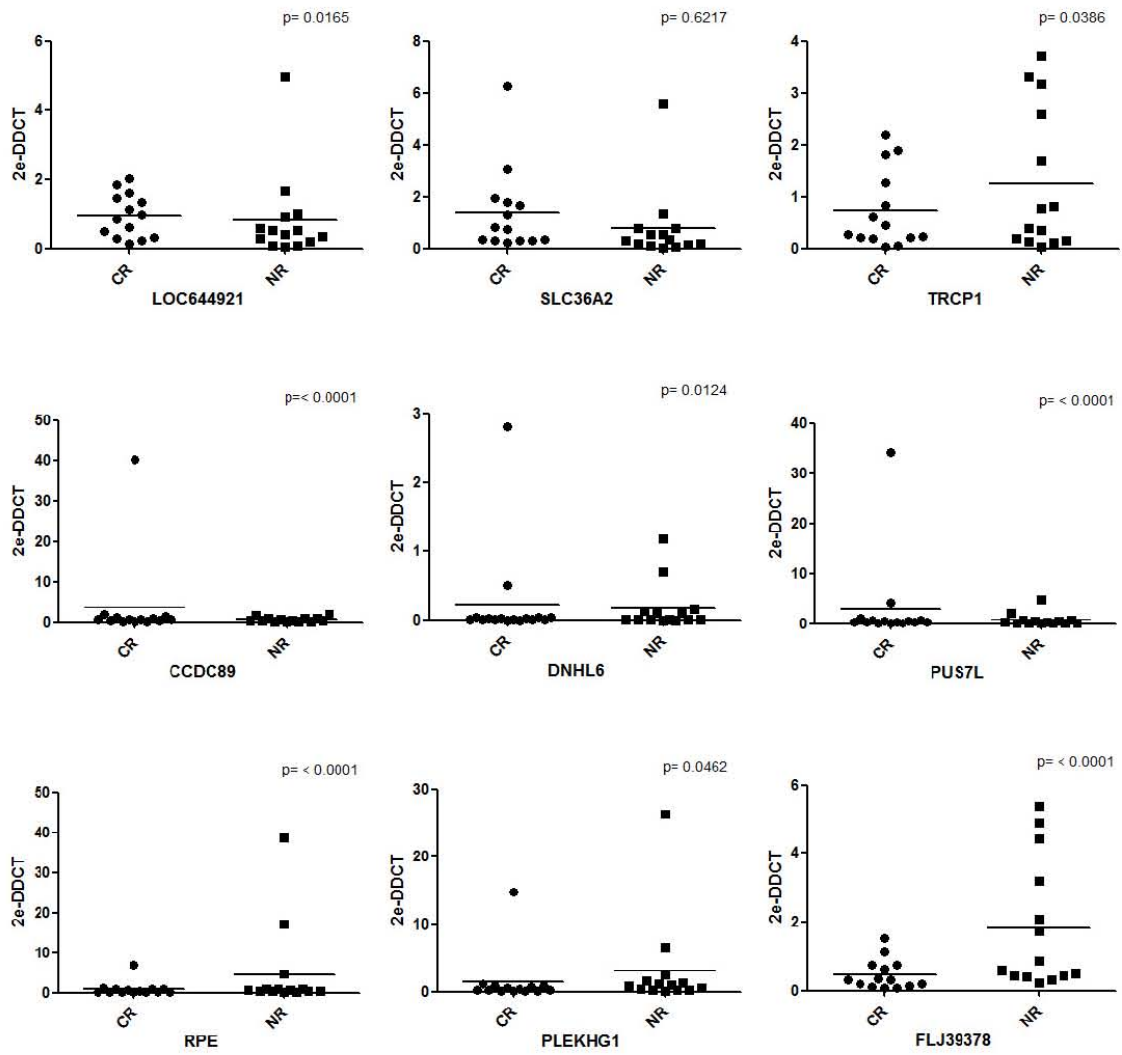
Supplementary figure S2. Relative expression of two house-keeping genes. Relative intensity for β -actin (ACT) and Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) house-keeping genes, obtained from microarray analysis of 89 tumor biopsies (up-panel) and by qRT PCR from 30 independent tumor samples (down-panel).

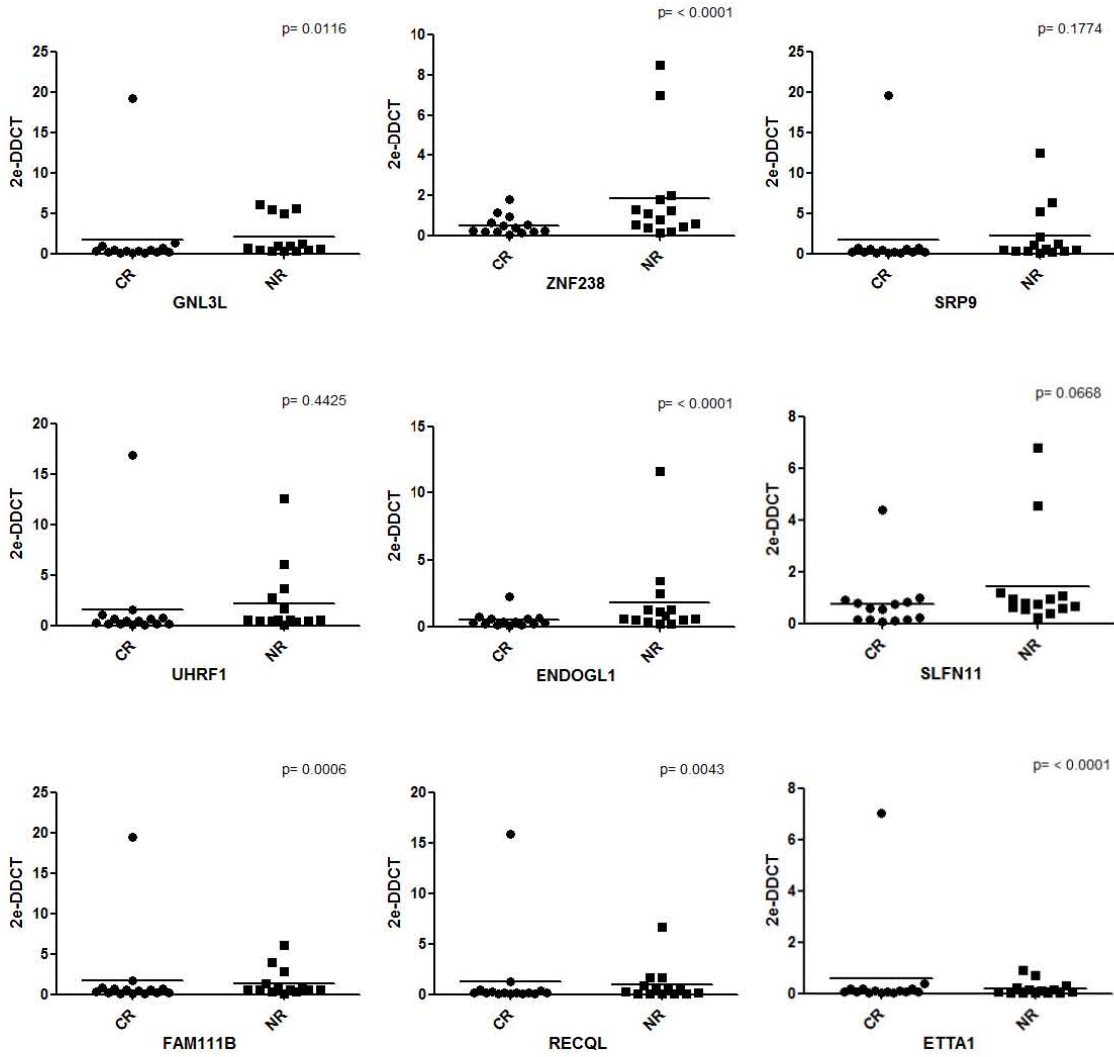


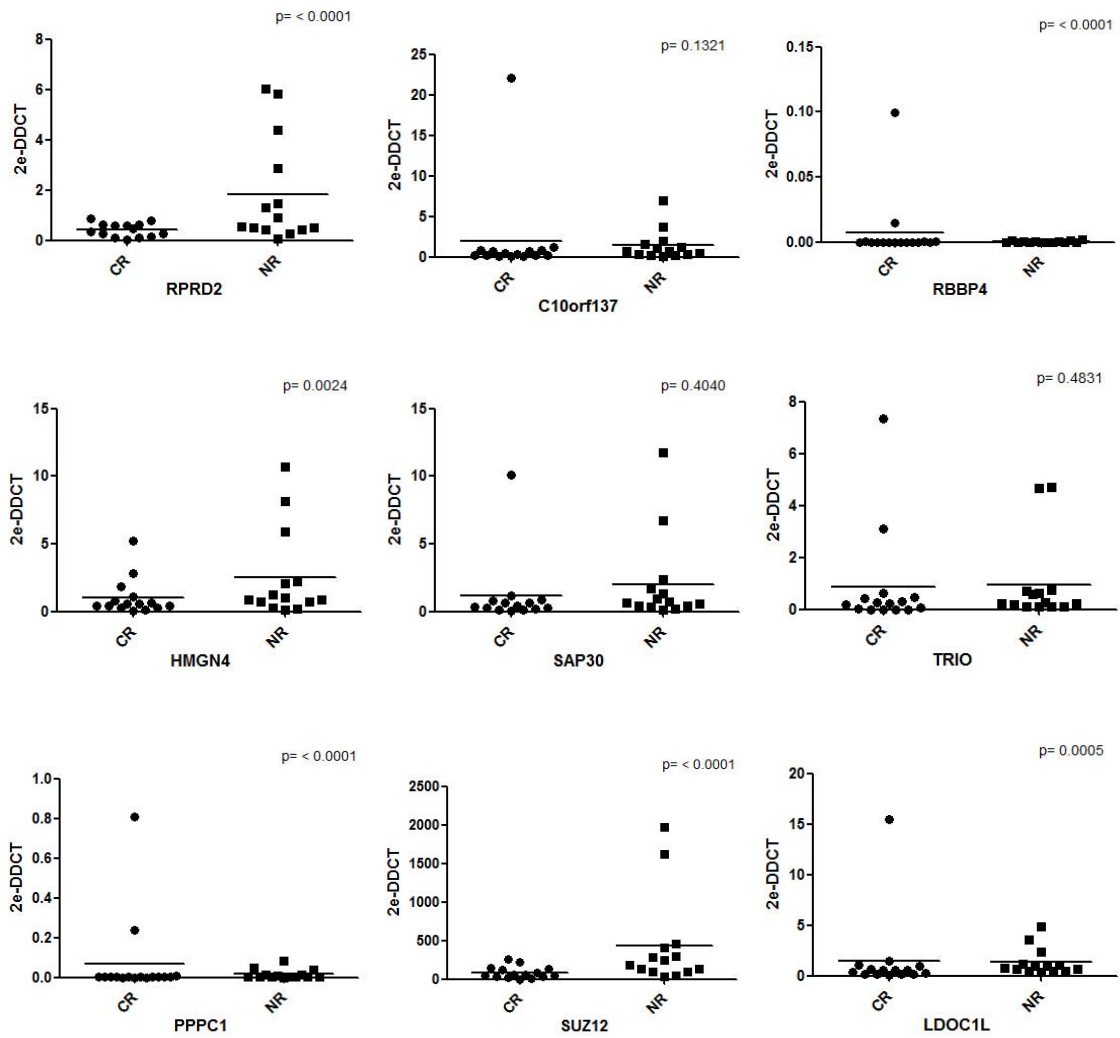




Supplementary Figure S3a. qRT-PCR validation. Expression of 27 CC-CTRP genes in 30 independent LACC patients, using β -actin house-keeping gene as reference gene. $2^{\text{-DDCT}}$ values were plotted in non responders (NR) and complete responders (CR) patients. The median values are shown by horizontal bars. pValue for individual genes were calculated by unpaired t test one-tailed.







Supplementary Figure S3b. qRT-PCR validation. Expression of 27 CC-CTRP genes in 30 independent LACC patients, using GAPDH house-keeping gene as reference gene. 2^{-DDCT} values were plotted in the two sets of patients. The median values are shown by horizontal bars. pValue for individual genes were calculated by unpaired t test one-tailed.

Supplementary Table S1. Primer pairs used for relative quantification by qRT-PCR

Name	5'-3' sequence	GeneID	TM	Amplicon Size
ACTB_F	ATGACTTAGTTGCGTTACACCT	NM_001101	59°C	156
ACTB_R	TGCTCGCTCCAACCGACTG			
GAPDH_F	CCTCAAGATCATCAGCAATGCCT	NM_002046	59°C	146
GAPDH_R	TCACGCCACAGTTCCCGGAG			
ZNF238_F	TGCTTTCTAAGCACAGTCAGGT	NM_006352	59°C	127
ZNF238_R	TGTCCCACAAAACCTACAAAATAGC			
SAP30_F	GGATAAGAGCGCAAGGCATC	NM_003864	59°C	85
SAP30_R	TCACCTCCATCATCATCACTCC			
C10orf137_F	AACCGCGACTCTTCTGGAAA	BC028715	59°C	140
C10orf137_R	CTGTTCTTGATCAACGGCTCC			
UHRF1_F	GTTTTTGCTGTCCCTCCCTC	NM_013282	59°C	180
UHRF1_R	TGGCCGTCTCCATCTGTTT			
SUZ12_F	GGGCTGCGGTGTTACC	NM_015355	58	129
SUZ12_R	CTGTGCAAAAATATTGGTGCTATGA			
HMGN4_F	CACGAGACTCGGACATCTTTC	NM_006353	59°C	89
HMGN4_R	TGCCTTTCTCTTGGGCATGG			
RBBP4_F	AAATGAGGTAGGTGTCTGAGCC	BC075836	58°C	102
RBBP4_R	TGTGCATCCTGAAAGTCAGATT			
PPP1CB_F	TATTTCCGTGGGTGCCTCC	NM_002709	59°C	117
PPP1CB_R	CTCGGCGTTCTCTCACCTAC			
SLFN11_F	GAGTTGCGTTTCTACCCGTG	BC052586	59°C	89
SLFN11_R	GCACTGATTTGCCTCCATGT			
FLJ39378_F	CTCTCCACAAGGATGTCAAC	BC089444	59°C	54
FLJ39378_R	TCCTTCAGCTTCTTCATCACC			
ENDOGL1_F	CCAAAGGCATTTAGCATTCC	NM_005107	59°C	55
ENDOGL1_R	CCGTGTAAACCCAAATCAAGA			
RECQL_F	GGAGATCCGAGAGTCGGAGA	NM_002907	58°C	153
RECQL_R	CAAAAAGCGCACACCCTTGA			
TRPC1_F	TGGACTACGGTTGTCAGAAACT	NM_003304	58°C	174
TRPC1_R	GTGCATTACAGCCAACTGC			
TRIO_F	AAAAGCCGATTAAGCACTGG	AB115332	58°C	63
TRIO_R	TGCTGCCACAGTGACTCG			
DNAH6_F	CCATCCATTGTTGCTGTTCCGG	NM_173645	58°C	148
DNAH6_R	TAGCTTACCTGTGCTTGCAGT			
GNL3L_F	ACAAGTTCATCCGGCTTTG	NM_019067	60°C	64
GNL3L_R	GACGCAGTTACGCAGGATG			
SLC32A2_F	CTCAGCTCACCACAACCTCG	BC101100	59°C	72
SLC32A2_R	CGTGCTGGACTATGCCTCTA			

SRP9_F	AGCGGTCTCTTGCTTCAG	BC021995	60°C	77
SRP9_R	ACATCTTGAGCTTGGTCTGTTTT			
RPE_F	AGCACAGACTAGAGCTTGCTTG	NM_199229	60°C	70
RPE_R	CAAAGCTTTCCCAAGCTGAA			
LDOC1L_F	GCCAATCTCACCAACATGC	NM_032287	60°C	59
LDOC1L_R	CCTGGTGCGTAACAAGGTC			
PUS7L_F	CCACTGAACCGAGGCACTG	NM_031292	58°C	106
PUS7L_R	AGTGCCATGAAATCCAACGTGA			
CCDC89_F	CTGAAGCGGAGGTGAGATG	BC044814	59°C	73
CCDC89_R	TTCTCCTCCAGCTCTGCATT			
LOC644921_F	GACATTCAATCCATCCTGTGA	XM_928009	59°C	69
LOC644921_R	GCAGTTCTGTCCCTATGGATTT			
PLEKHG1_F	GGAGTGCAATCTTGGCTCAC	NM_001029884	60°C	67
PLEKHG1_R	AGAGGCTGAGGCAGGAGAAT			
FAM111B_F	TTGGCCAGAAATCAAGACAT	NM_198947	59°C	67
FAM111B_R	CTCGATAAGATGGAGAAACAAGG			
RPRD2_F	TGTTAGGGAAAAGCATAAGAGAAAA	NM_015203	59°C	104
RPRD2_R	AACATCCCATTAAATTTCTGCAA			
ETAA1_F	GAGCGCTGAAAATGGACTCAC	NM_019002	59°C	178
ETAA1_R	GTTGGTTTTTCATCCTGAGGAGC			

qRT-PCR condition were 40 cycles for all samples.

Supplementary table S2. Genes Showing Different Expression between CR and NR groups.

Category	RefSec	Gene Symbol	Gene Name	Fold Change Log	Average Expression	t (CR/NR)	pValue	Adjust pValue	Cancer related
Transcription	NM_006352	ZNF238	Zinc finger protein 238	-1.0667	9.3131	-3.7130	0.00035909	0.361	Oropharyngeal squamous carcinoma and rhabdomyosarcoma
Transcription	NM_003864	SAP30	Sin3A-associated protein	-0.7546	9.2213	-3.7505	0.0003158	0.361	Basal cell carcinoma
Transcription	BC028715	C10orf137	Chromosome 10 open reading frame 137	-0.9202	9.9069	-3.7795	0.00028582	0.361	Squamous cell lung cancer
Transcription	NM_013282	UHRF1	Ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1	-1.2503	10.4516	-3.7430	0.0003241	0.361	Colorectal, prostate and breast cancer
Transcription	NM_015355	SUZ12	Suppressor of zeste 12	-0.8487	10.0006	-3.3935	0.00103706	0.369	Gastric cancer
Cromatin remodeling	NM_006353	HMGN4	High mobility group nucleosomal binding domain 4	-0.8800	10.5987	-4.3577	3.55E-05	0.266	Not reported
Cromatin remodeling	BC075836	RBBP4	Retinoblastoma binding protein 4	-0.6796	10.3779	-3.6953	0.00038143	0.361	Acute myelogenous leukemia, rectal carcinoma, etc
Cell cycle control	NM_002709	PPP1CB	Pprotein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isozyme	-0.9939	9.9062	-3.9138	0.00017895	0.361	Chronic lymphocytic leukemia and melanoma
Immune system	BC052586	SLFN11	Schlafen family member 11	-0.7933	9.9698	-3.6535	0.00043946	0.366	Ovarian and colorectal cancers
Apoptosis	BC089444	FLJ39378	Rab interacting lysosomal protein-like 1	-0.7329	7.7065	-3.6514	0.00044258	0.366	Not reported
DNA repair	NM_005107	ENDOGL1	Endo/exonuclease (5'-3'), endonuclease G-like	-0.8452	8.9972	-3.5058	0.00071932	0.368	Colorectal cancer
DNA repair	NM_002907	RECQL	RecQ protein-like	-0.8992	8.5789	-3.3198	0.00131316	0.369	Colorectal cancer and glioblastoma
Calcium regulation	NM_003304	TRPC1	Transient receptor potential cation channel, subfamily C	1.1014	5.8474	3.4212	0.00094825	0.369	Lung, breast and ovarian cancer
Cytoskeleton	AB115332	TRIO	Trio Rho guanine nucleotide exchange factor	-1.1684	10.9033	-3.9119	0.00018016	0.361	Melanoma
Cytoskeleton	NM_173645	DNAH6	Dynein, axonemal, heavy chain 6	-0.9498	5.3365	-3.1050	0.00256152	0.374	Not reported

Protein degradation	NM_019067	GNL3L	Guanine nucleotide binding protein-like 3	-0.9932	9.7138	-4.0126	0.00012599	0.361	Cancer radio-resistance
Aminoacid transport	BC101100	SLC36A2	Solute carrier family 36	1.3730	6.2133	4.4298	2.71E-05	0.266	Not reported
Secretion	BC021995	SRP9	Signal recognition particle 9kDa	-0.9394	11.0036	-3.9825	0.00014029	0.361	Colon cancer and hepatocellular carcinoma
Metabolism	NM_199229	RPE	Ribulose-5-phosphate-3-epimerase	-0.9561	9.9416	-4.3803	3.27E-05	0.266	Not reported
No known function	NM_032287	LDOC1L	Leucine zipper, down-regulated in cancer 1-like	-0.7657	9.8220	-3.7827	0.0002827	0.361	Not reported
No known function	NM_031292	PUS7L	Pseudouridylate synthase 7 homolog -like	-1.0463	5.9431	-4.3170	4.14E-05	0.266	Not reported
No known function	BC044814	CCDC89	Coiled-coil domain containing 89	1.2135	5.7392	4.0676	0.00010338	0.361	Not reported
No known function	XM_928009	LOC644921	No name	1.1601	6.5671	3.6322	0.00047217	0.366	Not reported
No known function	NM_001029884	PLEKHG1	Pleckstrin homology domain containing, family G	-1.0499	7.7350	-3.3939	0.00103574	0.369	Not reported
No known function	NM_198947	FAM111B	Family with sequence similarity 111, member B	-0.8997	10.1106	-3.7276	0.00034164	0.361	Prostate cancer
No known function	NM_015203	RPRD2	Regulation of nuclear pre-mRNA domain containing 2	-0.9036	9.9979	-3.8449	0.00022785	0.361	Not reported
No known function	NM_019002	ETAA1	Ewing tumor-associated antigen 1	-1.1030	7.6966	-4.0975	9.28E-05	0.361	Not reported

Capítulo 2

Método pronóstico de la respuesta al tratamiento estándar en cáncer cervicouterino localmente avanzado

*Los resultados del análisis del transcriptoma se utilizaron para proponer un prototipo de diagnóstico temprano de respuesta para pacientes diagnosticadas con cáncer cervical, el cual se encuentra en proceso de patente con el número **MX/A/2014/015826**, ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Intelectual (IMPI).*

MÉTODO PRONÓSTICO DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO ESTÁNDAR
EN CÁNCER CERVICOUTERINO LOCALMENTE AVANZADO

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se inserta dentro del campo de la salud humana.

De manera general la presente invención se refiere a métodos útiles para predecir la respuesta de un individuo diagnosticado con cáncer cervicouterino, al tratamiento con cisplatino/radioterapia/braquiterapia (tratamiento estándar).

De forma específica la presente invención se refiere a métodos útiles para pronosticar si un individuo diagnosticado con cáncer cervicouterino en estadios clínicos localmente avanzados, podría presentar una buena respuesta o una mala respuesta al tratamiento estándar. Los métodos descritos en la presente solicitud se basan en la determinación del nivel de expresión de un conjunto de genes asociados a la respuesta al tratamiento estándar en pacientes con cáncer cervicouterino localmente avanzado.

Particularmente la presente invención se refiere a métodos de pronóstico basados en la determinación del nivel de expresión de los genes ZNF238; SAP30; C10orf137; UHRF1; SUZ12; HMGN4; RBBP4; ARID1B; PPP1CB; SLFN11; FLJ39378; ENDOGL1; RECQL; TRPC1; TRIO; DNAH6; GNL3L; SLC36A2; SRP9; RPE; LDOC1L; PUS7L; CCDC89; LOC644921; PLEKHG1; FAM111B; RPRD2 y ETAA16 asociados con la respuesta al

tratamiento estándar en cáncer cervicouterino localmente avanzado CCLA. Este método permite estratificar a un paciente diagnosticado con cáncer cervicouterino localmente avanzado como un individuo que podría presentar una buena respuesta o una mala respuesta al tratamiento estándar.

La presente solicitud se refiere además a kits y dispositivos útiles para pronosticar la respuesta al tratamiento estándar en un individuo diagnosticado con CCLA.

Por lo tanto, el objetivo de la presente invención es proveer nuevos métodos de pronóstico, kits y dispositivos, útiles para pronosticar la respuesta al tratamiento con cisplatino/radioterapia/braquiterapia (tratamiento estándar) en individuos diagnosticados con CCLA, esto con base en la determinación del perfil de expresión de una firma de 28 genes asociados a la respuesta al tratamiento.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El cáncer cervicouterino es el cuarto tipo de cáncer más común en las mujeres, y el séptimo en general, con un estimado de 528,000 nuevos casos a nivel mundial en 2012, de los cuales aproximadamente 445,000 (85%) se producen en las regiones menos desarrolladas, en donde representa casi el 12% de todos los cánceres femeninos.

En 2012 se estimaron 266,000 muertes por cáncer cervicouterino en todo el mundo, representando el 7,5% de todas las muertes por cáncer en mujeres. Casi nueve de cada diez (87%) de las muertes por cáncer cervicouterino

se produjeron en las regiones menos desarrolladas. (GLOBOCAN 2012 (IARC), Section of Cancer Information).

En el 2012, más de 83,100 mujeres fueron diagnosticadas de cáncer cervicouterino en la región de las Américas y casi 35,700 mujeres fallecieron a causa de esta enfermedad. Si se mantienen las tendencias actuales, el número de muertes por este cáncer en las Américas aumentará hasta 51,500 en el 2030.

Al igual que con otros tipos de cáncer, el tratamiento del cáncer cervicouterino depende principalmente de la etapa de progresión en donde se encuentra y algunas características clínicas tales como el tamaño tumoral (Kapp et al., 2005. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 62 (5): 1399–1404). En este sentido, el sistema de clasificación más ampliamente utilizado para este tipo de cáncer es el sistema de la International Federation of Gynecologists and Obstetricians (FIGO), aunque puede emplearse el sistema de clasificación del American Joint Committee on Cancer (AJCC) denominado TNM.

El sistema FIGO consta de las etapas clínicas I a IVB, las cuales se describen a continuación: La etapa I, se refiere a tumor confinado solo al cuello uterino, es IA1 cuando existe invasión al estroma de 3 mm de profundidad por 7mm de extensión horizontal. La etapa IA2 es cuando la invasión tumoral al estroma es mayor a 3 mm hasta máximo 5 mm de profundidad por 7 mm de extensión horizontal. La etapa IB1, se refiere a un tumor visible macroscópicamente de 4 cm o menos, IB2 es un tumor mayor a 4 cm.

La etapa II incluye los tumores que invaden más allá del útero, pero sin afectar pared pélvica o tercio inferior de vagina, así la etapa IIA1 es un tumor

visible de 4 cm o menos y la IIA2 es un tumor mayor de 4 cm. La etapa IIB, es un tumor que infiltra parametrios pero sin fijarlos a pared pélvica.

La etapa IIIA, se refiere a tumores que infiltran el tercio inferior de la vagina, sin extensión a pared pélvica, en tanto que la etapa IIIB hace referencia tumores que infiltran parametrios y los fija a pared pélvica; la hidronefrosis y/o exclusión renal son también criterios de la etapa IIIB.

La etapa IVA, incluye a un tumor que infiltra la mucosa del recto o vejiga urinaria. La etapa IVB implica metástasis a distancia, incluyendo ganglios del retroperitoneo. (Hacker, Neville F. 2009. International Journal of Gynaecology and Obstetrics: The Official Organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics 105 (2): 105–6).

La cirugía o la radioterapia (RT) pueden ser el tratamiento primario para el cáncer cervicouterino en sus etapas iniciales. La cirugía se reserva principalmente para las primeras etapas con lesiones menores tales como el estadio IA y IB1.

El cáncer cervicouterino localmente avanzado (CCLA) se refiere a un tumor confinado a la pelvis, y por lo tanto, sin metástasis a distancia. El CCLA comprende de la etapa IB2 hasta la etapa IVA en la clasificación FIGO. La quimioterapia con cisplatino concurrente con radioterapia externa, seguida de braquiterapia, es el tratamiento estándar para las pacientes con CCLA de acuerdo a lo que se describe en Clinical Practice Guidelines in Oncology Cervical Cancer, National Comprehensive Cancer Network, (NCCN), 2009 y en las Guías de

Práctica Clínica. Diagnóstico y Tratamiento de Cáncer Cervicouterino. México: Secretaría de Salud 2010.

Uno de los principales obstáculos para el tratamiento efectivo del cáncer cervicouterino es la aparición de resistencia al tratamiento, la cual se observa en los elevados índices de enfermedad recurrente o persistencia de la enfermedad que en promedio alcanzan hasta un 50%.

La resistencia a la terapia en los tumores en general se presenta de manera innata; es decir, las células tumorales tienen mecanismos intrínsecos que les permiten sobrevivir a las estrategias empleadas en la práctica médica; a diferencia de la resistencia adquirida, que sólo se presenta en un pequeño porcentaje de tumores después de las primeras terapias (Therasse P J Natl Cancer Inst 2000 Feb 2;92(3):205-16; y Grem JL. Cancer Treat Res 1998, 98: 293-338).

Se han descrito numerosos factores clínicos de riesgo asociados a la recurrencia en cáncer cervicouterino tales como la presencia de metástasis en ganglios linfáticos, tamaño del tumor, profundidad de la invasión hacia el estroma cervical, invasión en el parametrio, tipo histológico, grado de diferenciación, diámetro del tumor, volumen del tumor, cantidad de hemoglobina en sangre, entre otros; sin embargo, estos marcadores clínicos no han demostrado eficacia en la práctica clínica para predecir la respuesta al tratamiento o el riesgo de recurrencia.

Se sabe que las alteraciones genéticas y epigenéticas son un factor determinante para la evolución de un tumor hacia un fenotipo de mayor malignidad o de resistencia al tratamiento y, se ha observado que en las etapas localmente

avanzadas de cáncer cervicouterino se presentan numerosas alteraciones de dosis génica y aneuploidía severa (Lando M. et al. PLoS Genet. 2009 Nov;5(11)), sin embargo, hasta el momento se desconoce el mecanismo exacto de estos procesos y los genes involucrados.

Existen diversas descripciones de genes o firmas de genes asociados a la respuesta al tratamiento en cáncer cervicouterino, pero hasta el momento no se ha logrado estandarizar el uso el uso de algún biomarcador o firma de biomarcadores como predictor de la respuesta al tratamiento con resultados reproducibles.

Kitahara O. et al. *Neoplasia* 2002, 4:295-303; Wong Y. et al. *Cancer J* 2006, 12:189-193; Wong YF. *Clinical Cancer Research* 2003, 9:5486-5492 y Rajkumar, T. et al. 2009, BMC Cancer 9:365, describen genes asociados a resistencia al tratamiento en cáncer cervicouterino; pero estos estudios se basan en el tratamiento únicamente con radioterapia y no en el tratamiento con quimio-radioterapia que es el tratamiento estándar actual para este padecimiento.

En Lando M. et al. PLoS Genet. 2009; Nov 5:11, se describe que la disminución de la carga genética y de la expresión de los genes GBE1, RYBP, MED4 y FAM48A se pueden asociar con una mala respuesta clínica en cáncer cervicouterino, lo que indicaría que estos genes están asociados con la resistencia del tumor a la quimioradioterapia.

La solicitud de patente US20110224088, describe un método para predecir la predisposición de un individuo a presentar resistencia a la quimio-radioterapia en cáncer cervicouterino mediante la determinación del número de

copias de ciertas regiones en los cromosomas y el nivel de expresión de al menos un gen de una serie de genes, en donde la alteración del número de copias de dichas regiones o del nivel de expresión de dichos genes es indicativo de una predisposición a resistencia a la quimioradioterapia.

El método descrito en la solicitud de patente US20110224088 se basa en la determinación del número de copias y del nivel de expresión de un conjunto de genes, pero el método considera a cada una de las regiones cromosómicas y los genes de manera independiente, de tal suerte que el hecho de que al menos uno de los genes o regiones se encuentre alterado es indicativo de la predisposición a la resistencia, por lo que no alcanza a consolidar una firma molecular bien establecida para estos fines y el poder de predicción será menor al de una firma bien consolidada.

Por otra parte la solicitud de patente RO128780, describe un método para predecir la respuesta a la quimioradioterapia con cisplatino en cáncer cervicouterino, basado en el nivel de expresión de un conjunto de genes, sin embargo la firma se basa únicamente en el análisis de genes involucrados en el proceso de reparación de daños en el ADN por lo cual su poder predictivo será menor al de una firma de genes basada no sólo en este proceso.

Adicionalmente, todos los genes o firmas de genes descritos hasta el momento para predecir la respuesta a la quimio-radioterapia en cáncer cervicouterino son distintos entre ellos y, ninguno ha sido validado clínicamente para obtener resultados reproducibles y clínicamente útiles, por lo que

actualmente persiste la necesidad de desarrollar un método eficaz para predecir la respuesta a la quimio-radioterapia en cáncer cervicouterino localmente avanzado.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se basa en el hecho inesperado de que el perfil de expresión de una firma que comprende los genes ZNF238; SAP30; C10orf137; UHRF1; SUZ12; HMGN4; RBBP4; ARID1B; PPP1CB; SLFN11; FLJ39378; ENDOGL1; RECQL; TRPC1; TRIO; DNAH6; GNL3L; SLC36A2; SRP9; RPE; LDOC1L; PUS7L; CCDC89; LOC644921; PLEKHG1; FAM111B; RPRD2 y ETAA16, está asociado a la respuesta al tratamiento con cisplatino/radioterapia concurrente seguida de braquiterapia (tratamiento estándar) en pacientes con cáncer cervicouterino localmente avanzado (CCLA).

La determinación del nivel de expresión de estos 28 genes y su comparación con los perfiles de expresión tipo asociados a una buena respuesta al tratamiento estándar, definida como Respuesta Completa (RC) de acuerdo con los criterios RECIST 1.1 a 2.5 años como se describe en Eisenhauer, E.A. et. al. Eur J Cancer. 2009 Jan;45(2):228-47 y a una mala respuesta al tratamiento estándar definida como una Respuesta Parcial (RP), Enfermedad Estable (EE) o Progresión de la Enfermedad (PE), de acuerdo con los criterios RECIST 1.1 a 2.5 años como se describe en Eisenhauer, E.A. et. al. Eur J Cancer. 2009 Jan;45(2):228-47, permite pronosticar si un individuo diagnosticado con CCLA podría presentar resistencia al tratamiento estándar.

La presente invención supera las deficiencias del estado de la técnica al proveer una nueva firma de expresión genética y métodos útiles para pronosticar si un individuo diagnosticado con CCLA podría presentar resistencia al tratamiento estándar.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a kits útiles para determinar si un individuo diagnosticado con CCLA podría presentar resistencia innata al tratamiento estándar, los cuales comprenden los medios necesarios para determinar el perfil de expresión de esta firma de 28 genes, medios necesarios para calcular la correlación del perfil de expresión genética de una muestra con los perfiles de expresión tipo asociados a una buena respuesta al tratamiento estándar y a una mala respuesta al tratamiento estándar y las instrucciones necesarias para clasificar a un individuo con posibilidades de presentar una buena respuesta o una mala respuesta al tratamiento.

Otra de las modalidades de la presente invención se refiere a un microarreglo de ácidos nucleicos útil para pronosticar la respuesta al tratamiento estándar en un individuo diagnosticado con CCLA, el cual contiene sondas complementarias e hibridables con los 28 genes que componen la firma descrita en la presente solicitud.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra el análisis de agrupamiento supervisado en dos dimensiones del perfil de expresión de 89 muestras de cáncer cervicouterino (eje Y) considerando 2,133 genes (eje X) con expresión diferencial significativa

(variación > 1.5 y $p < 0.02$). En la primer columna del panel derecho, se representa la respuesta clínica de cada individuo después de un período de seguimiento de 2.5 años, indicando con cuadros negros a los pacientes que presentaron una mala respuesta al tratamiento estándar y con cuadros blancos a los pacientes que presentaron una buena respuesta al tratamiento estándar. En el resto de las columnas del panel derecho se describen las características clínicas de cada uno de los pacientes, marcando con color gris aquellos que concuerdan con cada una de las siguientes características: etapa del tumor de acuerdo con la clasificación FIGO, tamaño del tumor mayor a 4 cm y coinfección por dos o más tipos de virus del papiloma humano (VPH). Cuatro de los pacientes abandonaron el protocolo de tratamiento, mismos que se señalan con letras en color rojo. El inciso (a) muestra una ampliación de la imagen sobre el eje X, para observar mejor el número de identificación de las pacientes.

La Figura 2 muestra el desempeño del método de pronóstico basado en la firma de 28 genes que se describe en la presente solicitud. La precisión general del método fue de 90%, con una sensibilidad del 91% y una especificidad del 74%.

La Figura 3 ejemplifica el predictor de la respuesta al tratamiento estándar en pacientes con CCLA. La guía de color del panel derecho muestra los perfiles de expresión de los 28 genes que conforman la firma, en 89 biopsias derivadas de pacientes diagnosticados con CCLA. Los genes se encuentran agrupados con base en la similitud de su nivel de expresión. El panel izquierdo muestra los tumores ordenados según la puntuación que obtuvieron en el predictor de la respuesta al tratamiento estándar. La línea roja divide los valores positivos

de los negativos. Los círculos blancos indican pacientes que presentaron una buena respuesta al tratamiento estándar y los círculos negros indican pacientes que presentaron una mala respuesta al tratamiento estándar. La línea negra marca el umbral aparente entre los perfiles de expresión de los dos grupos de pacientes los que presentaron una buena respuesta y los que presentaron una mala respuesta. Las cruces de color rojo indican los pacientes que abandonaron el protocolo de tratamiento. La gráfica muestra la precisión para discriminar a los pacientes sin tratamiento previo que presentarán una buena respuesta de los que presentarán una mala respuesta; es decir, para identificar por medio de los perfiles de expresión de 28 genes aquellos pacientes que presentarán una buena respuesta o una mala respuesta, antes de comenzar el tratamiento estándar.

La Figura 4 muestra el análisis de la supervivencia libre de enfermedad entre los dos grupos de pacientes estratificados con base en su calificación en el predictor. Se observa una clara separación entre el comportamiento de los pacientes con una mala respuesta (línea punteada) y los pacientes con una buena respuesta (línea continua) desde los primeros meses, demostrando con ello la validez del predictor.

La Figura 5 expone la validación del perfil de expresión genética mediante RT-qPCR en un grupo de 30 pacientes. La guía de color muestra los patrones de expresión de 27 de los 28 genes que componen la firma molecular, agrupados con base en su similitud. El agrupamiento fue obtenido mediante la correlación de Pearson y agrupación de ligamiento completo. Los recuadros en negro representan a las pacientes con una mala respuesta al tratamiento y los

recuadros blancos representan a las pacientes con una buena respuesta al tratamiento. La validación mediante RT-qPCR en 27 de los 28 genes de la firma, demuestra la representatividad de los datos obtenidos por medio de microarreglos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Pese a la creciente penetración de los programas de detección precoz, el cáncer cervicouterino sigue siendo una de las principales causas de muerte por neoplasias en mujeres de todo el mundo, esto debido a que la mayoría de las pacientes son diagnosticadas en estadios localmente avanzados que incluyen los estadios IB2-IVA de acuerdo con la clasificación de la International Federation of Gynecologists and Obstetricians (FIGO) en Waggoner, Steven E. 2003. Lancet 361 (9376): 2217–25.

El tratamiento primario de elección para las pacientes con CCLA, de acuerdo a lo que se describe en Clinical Practice Guidelines in Oncology Cervical Cancer, National Comprehensive Cancer Network (NCCN) 2009 es la quimiorradioterapia concurrente basada en cisplatino seguida de braquiterapia. Sin embargo, el cáncer cervicouterino presenta índices de resistencia a este tratamiento de hasta el 50%, de los cuales entre el 80% y el 90% de los pacientes tendrán manifestaciones de enfermedad recurrente en los primeros dos años.

El pronóstico para los pacientes que desarrollan recurrencia es sumamente pobre, con una tasa de supervivencia a un año de sólo entre el 15% y el 20%, por lo que la presente invención adquiere una elevada importancia al brindar mecanismos que permiten diferenciar a los individuos que podrían presentar una buena respuesta al tratamiento estándar, de aquellos que podrían

presentar resistencia a dicho tratamiento, lo cual resulta útil para decidir de una manera más adecuada si se administra o no este tratamiento para cada uno de los pacientes.

Hasta el momento se han descrito diversos marcadores clínicos y moleculares que pretenden predecir la respuesta a la quimiorradioterapia en cáncer cervicouterino; sin embargo, estos marcadores no han demostrado una eficacia clínica adecuada, por lo que no resultan útiles para decidir de manera efectiva sobre la administración del tratamiento en un paciente.

La presente invención supera las deficiencias del estado de la técnica al proporcionar nuevos métodos moleculares útiles para predecir la respuesta clínica al tratamiento estándar en un individuo con CCLA, esto mediante la determinación del perfil de expresión de una firma que comprende los genes ZNF238; SAP30; C10orf137; UHRF1; SUZ12; HMGN4; RBBP4; ARID1B; PPP1CB; SLFN11; FLJ39378; ENDOGL1; RECQL; TRPC1; TRIO; DNAH6; GNL3L; SLC36A2; SRP9; RPE; LDOC1L; PUS7L; CCDC89; LOC644921; PLEKHG1; FAM111B; RPRD2 y ETAA16 asociados a la resistencia tumoral innata y su comparación con los perfiles de expresión tipo asociados a una buena respuesta al tratamiento estándar y a una mala respuesta al tratamiento estándar.

Al determinar el nivel de expresión de esta firma de 28 genes en un individuo diagnosticado con CCLA y comparar su perfil de expresión contra los perfiles de expresión tipo, se puede determinar con una precisión clínicamente adecuada si dicho individuo podría presentar una buena respuesta o una mala respuesta al tratamiento estándar.

Por lo tanto, los métodos descritos en la presente solicitud son útiles en la toma de decisiones clínicas para la administración del tratamiento estándar en individuos diagnosticados con CCLA. Más específicamente, los métodos descritos en la presente solicitud permiten pronosticar la respuesta al tratamiento estándar que podría presentar un individuo diagnosticado con CCLA y por lo tanto, determinar si dicho individuo será beneficiado por el tratamiento estándar o si es probable que el individuo presente resistencia innata al tratamiento y por lo tanto sea necesario emplear otras alternativas terapéuticas.

Los métodos descritos en la presente solicitud se basan en el hecho inesperado de que la determinación del perfil de expresión de la firma que comprende los genes ZNF238; SAP30; C10orf137; UHRF1; SUZ12; HMGN4; RBBP4; ARID1B; PPP1CB; SLFN11; FLJ39378; ENDOGL1; RECQL; TRPC1; TRIO; DNAH6; GNL3L; SLC36A2; SRP9; RPE; LDOC1L; PUS7L; CCDC89; LOC644921; PLEKHG1; FAM111B; RPRD2 y ETAA16 puede pronosticar la respuesta al tratamiento estándar en individuos con CCLA. Esta firma de 28 genes asociados a la resistencia innata al tratamiento estándar en CCLA, se obtuvo mediante un análisis sistematizado del cáncer cervicouterino en humanos, por lo que tiene una aplicación directa en el ámbito clínico.

Como se usa en la descripción de la presente invención, el término “cáncer cervicouterino localmente avanzado” (CCLA) se refiere a aquellas neoplasias malignas que se desarrollan en la porción fibromuscular inferior del útero, que presentan un grado de desarrollo definido entre los estadios IB2 hasta

IVA de acuerdo con la clasificación FIGO y que se encuentran confinados a la pared de la pelvis sin presentar metástasis a distancia.

Como se usa en la descripción de la presente invención, el término “tratamiento estándar” se refiere a el tratamiento primario de elección que se recomienda administrar a individuos diagnosticados con cáncer cervicouterino localmente avanzado y que de acuerdo con la Clinical Practice Guidelines in Oncology Cervical Cancer, National Comprehensive Cancer Network (NCCN) 2009, consiste en quimiorradioterapia concurrente basada en cisplatino (ya sea cisplatino solo o cisplatino/5-FU) seguida de braquiterapia.

Como se usa en la descripción de la presente invención, el término “buena respuesta al tratamiento estándar” se refiere a un curso clínico favorable con desaparición de todos los signos del cáncer en respuesta al tratamiento estándar en un individuo diagnosticado con CCLA, indicando que el individuo es sensible al tratamiento. Este curso clínico favorable se manifiesta como una Respuesta Completa (RC) de acuerdo con los criterios RECIST 1.1 a 2.5 años como se describe en Eisenhauer, E.A. et. al. Eur J Cancer. 2009 Jan;45(2):228-47). Una buena respuesta está asociada a un buen pronóstico, por lo que en la presente invención se emplean ambos términos de manera indistinta.

Como se usa en la descripción de la presente invención, el término “mala respuesta al tratamiento estándar” se refiere a la Progresión de la Enfermedad (PE), definida como: un aumento de al menos el 20% en la suma de los diámetros más largos (sum LD, por sus siglas en inglés) de las lesiones blanco, tomando como referencia a la suma de LD más pequeña registrada desde

el inicio del tratamiento; o la aparición de una o más lesiones nuevas, después de la administración del tratamiento estándar en un individuo diagnosticado con CCLA de acuerdo con los criterios RECIST 1.1, indicando que el individuo es resistente al tratamiento. La Enfermedad Estable (EE) (lesiones blanco sin aumento ni disminución) y la Respuesta Parcial (RP) (disminución de menos del 30% de la suma de los diámetros de las lesiones diana, en relación a estado basal), de acuerdo con los criterios RECIST 1.1, se consideran también como una mala respuesta. Una mala respuesta está asociada a un mal pronóstico, por lo que en la presente invención se emplean ambos términos de manera indistinta.

Como se usa en la descripción de la presente invención, el término “firma de expresión genética” se refiere a un conjunto de genes cuyo nivel de expresión está relacionado a un fenómeno fisiológico determinado y que por lo tanto pueden ser utilizados con fines diagnósticos y/o pronósticos.

Como se usa en la descripción de la presente invención, el término “perfil de expresión” se refiere a la determinación del nivel de expresión de un gen o conjunto de genes determinado en una muestra biológica de un individuo. La expresión de un gene puede medirse mediante la determinación del ARN mensajero (ARNm) o mediante la determinación de la proteína para la que codifica dicho gen, empleando cualquiera de las técnicas descritas en el estado de la técnica.

Como se usa en la descripción de la presente invención, el término “perfil de expresión tipo” se refiere a la determinación del nivel de expresión de un gen o conjunto de genes en una población de características conocidas y bien

definidas. Una persona con pericia y conocimientos medios en el campo de la presente invención, podrá reconocer que los perfiles de expresión tipo, suelen conocerse como centroides, por lo que ambos términos podrán emplearse indistintamente en la descripción de esta invención. En el contexto de la presente invención, los perfiles de expresión tipo se refieren a los perfiles de expresión de los 28 genes que conforman la firma de expresión genética, de grupos de pacientes diagnosticados con CCLA que presentaron una buena respuesta al tratamiento estándar o una mala respuesta al tratamiento estándar bajo condiciones controladas.

Para obtener la firma de expresión genética descrita en la presente solicitud que comprende los 28 genes asociados a la respuesta al tratamiento estándar en CCLA, primero se identificaron los genes expresados de manera diferencial entre individuos sensibles al tratamiento estándar, que presentaron una buena respuesta al tratamiento, respecto de individuos resistentes al tratamiento estándar, que presentaron una mala respuesta al tratamiento. La tabla 1 resume la información clínica de todas las pacientes. El perfil de expresión se determinó a partir de biopsias tumorales de pacientes vírgenes al tratamiento empleando microarreglos de expresión de alta densidad NimbleGen Homo sapiens Expression Array HG18 090828 opt expr y HG18 100718 opt expr.

Para determinar los genes que se encontraban diferencialmente expresados entre ambos grupos, se empleó una clasificación supervisada basada en pruebas t-Student moderadas y la significancia estadística obtenida por el método de Bayes empírico. De estas pruebas se obtuvo una lista de 2,133 genes

con expresión diferencial significativa (variación > 1.5 y $p < 0.02$) entre individuos que presentaron una buena respuesta al tratamiento o una mala respuesta al tratamiento.

La Figura 1 muestra una agrupación jerárquica de dos dimensiones usando el coeficiente de correlación de Pearson y agrupación de ligamiento completo obtenida mediante el software Génesis 2.1 como se describe en Sturn, A., et. al. *Bioinformatics*. 2002 Jan;18(1):207-8. Los dendrogramas de la Figura 1 representan la similitud de 89 muestras clínicas con base en sus perfiles de expresión génica. La longitud y la subdivisión de las ramas muestran la similitud entre los tumores de cáncer cervicouterino (izquierda) y los perfiles de expresión genética (arriba).

Con base en el patrón de expresión de los 2,133 genes expresados diferencialmente en CCLA, se logró separar las muestras clínicas en dos grupos de tumores; los que presentaron una buena respuesta al tratamiento y los que presentaron una mala respuesta al tratamiento. El Grupo A comprende 56 muestras de tumores, de las cuales el 82,1% (46 muestras) presentaron una buena respuesta al tratamiento. El Grupo B comprende 33 muestras, de las cuales el 42,4% (14 muestras) presentaron una mala respuesta (Figura 1).

Para comparar el poder predictivo de los patrones de expresión genética con el poder de predicción basado en las características clínicas del tumor, se determinó la significancia estadística de las características clínicas informativas para predecir la respuesta al tratamiento mediante un análisis multivariante de la varianza. Las características clínicas que se consideraron

fueron la clasificación FIGO, el tamaño del tumor y la coinfección por dos o más tipos del Virus del Papiloma Humano (VPH) (Figura 1).

De 68 tumores clasificados como etapas IB2/IIA/IIB, 42 quedaron comprendidos en el grupo A y 26 en el grupo B; de 21 tumores clasificados como IIIA-IIIB, 14 quedaron comprendidos en el grupo A y 7 en el grupo B. En cuanto al tamaño del tumor, de 54 biopsias con un tamaño inicial del tumor mayor de cuatro centímetros, 29 (53,7%) quedaron comprendidos en el grupo A y 25 (46,2%) en el B. En cuanto a la coinfección por VPH, de 23 muestras con dos o más tipos de VPH, 11 muestras quedaron comprendidas en el grupo A y el resto en el B.

Tabla 1. Características clínico-patológicas de los tumores.

Características	Pacientes	
	N=	(%)
Edad		
Mediana	48	
Rango	29-69	
Tipo histológico		
Carcinoma de células escamosas	109	92.59%
Adenocarcinoma	10	8.41%
Tamaño del Tumor		
≤ 4cm	41	34.45%
≥ 4cm	71	59.66%
Sin datos	7	5.88%
Estadio clínico (FIGO)		
IB2	14	11.76%
IIA	1	0.84%
IIB	76	63.86%
IIIA	1	0.84%
IIIB	27	22.68%
Genotipificación para VPH (Frecuencia)		
Tipo 16	57	37.74%
Tipo 18	28	18.54%
Tipo 45	16	10.59%
Tipo 33	8	6.72%
Otros	33	21.85%
No determinado	9	5.96%
Pacientes con múltiples co-infecciones	33	27.73%
Respuesta al tratamiento*		
Respuesta completa (RC)	79	66.38%
Progresión tumoral (PT)	36	30.25%
Sin datos por deserción	4	3.36%
*Todos los pacientes recibieron radioterapia y cisplatino como coadyuvante (50Gys radiación externa, 35 Gys Intracavitaria braquiterapia y 6 ciclos de 40 mg/m ² CDDP)		

El análisis de la significancia estadística de los datos clínicos como predictores de la respuesta al tratamiento no presentó resultados significativos como se muestra en la Tabla 2; lo que indica que las características clínicas del tumor poseen un bajo poder predictivo para la respuesta al tratamiento, en

cambio, los perfiles de expresión genética mostraron una buena significancia estadística como herramienta para predecir la evolución clínica del CCLA ante el tratamiento estándar.

Tabla 2. Análisis de la significancia estadística de los datos clínicos como predictores de la respuesta al tratamiento

Análisis Multivariado del Grupo A de RC; PT Correlación de Pearson (n=56)

Características clínicas		RC	PT	Valor de p	
Estadio FIGO	IB2/IIA/IIB	35	7	(P = 0.664)	No significativo
	IIIA/IIIB	13	1		
Tamaño del tumor	< 4 cm	26	1	(P = 0.052)	No significativo
	≥ 4 cm	22	7		
Coinfección por VPH	Simple	40	5	(P = 0.181)	No significativo
	Co-infección	8	3		

El valor de p para estadio, tamaño del tumor y coinfección por VPH fue calculado por la prueba exacta de Fisher.

Análisis Multivariado del Grupo B de RC; PT Correlación de Pearson (n=33)

Características clínicas		RC	PT	Valor de p	
Estadio FIGO	IB2/IIA/IIB	18	8	(P = 0.026)	No significativo
	IIIA/IIIB	1	6		
Tamaño del tumor	< 4 cm	7	1	(P = <0.098)	No significativo
	≥ 4 cm	12	13		
Coinfección por VPH	Simple	12	9	(P = 1.000)	No significativo
	Co-infección	7	5		

El valor de p para estadio, tamaño del tumor y coinfección por VPH fue calculado mediante la prueba exacta de Fisher.

La firma de expresión de 2,133 genes que se desarrolló en primera instancia presenta niveles de precisión inadecuados para brindar una utilidad clínica considerable, es por ello que se empleó un enfoque de clasificación supervisada como el que se describe en Roepman, P. *et al. Nat. Genet.* **37**, 182–186 (2005), para identificar los genes con una calificación capaz de discriminar entre los resultados clínicos de una buena respuesta al tratamiento y una mala respuesta al tratamiento. Empleando los 2,133 genes clasificados según su significancia de expresión diferencial, se entrenó un clasificador de media cercana (nearest mean classifier, en inglés) en un proceso de validación cruzada dejando uno fuera (*LOOCV Leave-one-out cross-validation*, en inglés) para obtener una firma de genes con el mejor rendimiento de clasificación.

El algoritmo de predicción consiste en dos procesos; un criterio de clasificación basado en una medida de similitud y en un proceso de selección de variables para optimizar la predicción.

El modelo de clasificación depende de un criterio de similitud con perfiles tipo (centroides) de los grupos a clasificar; teniendo las mediciones de un número fijo de variables se establece el centroide para cada grupo como el promedio de los valores observados de esa variable en cada grupo. Una observación nueva de las mismas variables se clasifica o predice como perteneciente al grupo con el que tiene más similitud a su centroide.

La medida de similitud usada es la correlación de Spearman, de modo que una observación nueva de las mismas variables se clasifica como perteneciente al grupo con el que la correlación con su centroide es más grande.

Los experimentos de microarreglos resultan en mediciones de miles de variables, donde la mayoría de estas variables no necesariamente estarán relacionadas con el objetivo de discriminar entre los grupos de interés, es importante entonces seleccionar de entre éstas cuáles son las más adecuadas para el objetivo. Este proceso se realizó en dos etapas:

1) Se ordenaron las variables por su potencial para discriminar entre una buena respuesta al tratamiento y una mala respuesta al tratamiento. De entre todas las variables se creó una lista ordenada por un criterio de expresión diferencial, es decir, cuales son las variables cuyos valores en promedio son más distintos entre los grupos. Se usó el valor p de una prueba de t de student para ordenar las variables por su importancia.

2) Se seleccionaron las variables por validación cruzada. Se procedió a elegir de entre las primeras variables de la lista ordenada, a aquellas variables que mejor ayudan a distinguir entre los grupos según el modelo de similitud. El proceso de selección depende exclusivamente del número de casos acertadamente clasificados en un proceso de validación cruzada donde se excluye a cada observación del cálculo de centroide, de modo que la propia observación no haga parecido el centroide a si misma. Se incluyeron o excluyeron variables que no mejoraron la cantidad de aciertos ya sea para sensibilidad o especificidad.

Más detalladamente, se inició con las dos primeras variables de la lista ordenada por los valores de p , y para cada observación, se calcularon los centroides de las muestras restantes excluyendo a la observación a predecir, se calculó la similitud de la observación con estos centroides y se clasificó

correspondientemente, esto se realizó para cada observación y se tomó nota de los números de clasificación correcta o incorrecta. Después se incluyó la siguiente variable de la lista y se repitió el proceso, si la eficacia aumentaba, esta nueva variable se agregaba al modelo, si no, se excluía y no se volvía a considerar. Se procedió de esta manera agregando o excluyendo variables hasta que se agotó el número de variables o era evidente que se llegaba a un tope de efectividad.

El modelo final consistió en una lista de variables y de los centroides de esas variables para cada grupo. Para evaluar la efectividad real del método fue necesario validarlo en observaciones independientes que no participaron en el proceso anterior, desde la priorización de variables candidatas hasta el cálculo de centroides. Se usaron los centroides calculados en los pasos de construcción del modelo con la misma medida de similitud.

Utilizando el procedimiento descrito anteriormente, se obtuvo la firma de expresión genética que comprende los 28 genes ZNF238; SAP30; C10orf137; UHRF1; SUZ12; HMGN4; RBBP4; ARID1B; PPP1CB; SLFN11; FLJ39378; ENDOGL1; RECQL; TRPC1; TRIO; DNAH6; GNL3L; SLC36A2; SRP9; RPE; LDOC1L; PUS7L; CCDC89; LOC644921; PLEKHG1; FAM111B; RPRD2 y ETAA16 , la cual presentó una precisión global de 90% con una sensibilidad del 91% y una especificidad del 74% en la predicción de la respuesta clínica al tratamiento estándar en CCLA, precisión que supera a la de cualquier método descrito en el estado de la técnica para estos fines.

De esta misma forma se obtuvieron los perfiles de expresión tipo (centroides) que sirven en primera instancia como punto de comparación para

determinar si una muestra correlaciona con el perfil de expresión asociado a una buena respuesta al tratamiento o con el perfil de expresión asociado a una mala respuesta al tratamiento. Para el desarrollo de los perfiles de expresión tipo se emplearon los datos de expresión genética de 89 biopsias de tumor de pacientes con cáncer cervicouterino localmente avanzado, depositados en el Gene Expression Omnibus del National Center for Biotechnology Information con el número de acceso GSE56303. Estos perfiles de expresión tipo se pueden continuar entrenando con datos clínicos obtenidos durante la aplicación clínica de la presente invención.

La Tabla 3 describe las características de los 28 genes que conforman la firma de expresión genética útil para pronosticar la respuesta clínica al tratamiento estándar en un individuo diagnosticado con CCLA.

Tabla 3. Características de los 28 genes de la firma genética

Actividad celular	RefSecID	Identificación	Nombre	Relacionado a cáncer
Reparación del DNA	NM_005107	ENDOGL1	Endo/exonucleasa (5'-3'), endonucleasa G-like	Cáncer colorectal
Reparación del DNA	NM_002907	RECQL	RecQ protein-like	Cáncer colorectal y glioblastoma
Regulador de calcio	NM_003304	TRPC1	Transient receptor potential cation channel, subfamily C	Cáncer de pulmón, mama y ovario
Citoesqueleto	AB115332	TRIO	Trio Rho guanine nucleotide exchange factor	Melanoma
Citoesqueleto	NM_173645	DNAH6	Dynein, axonemal, heavy chain 6	No reportado
			Guanine	

Actividad celular	RefSecID	Identificación	Nombre	Relacionado a cáncer
Función no conocida	XM_928009	LOC644921	No name	No reportado
Función no conocida	NM_001029884	PLEKHG1	Pleckstrin homology domain containing, family G	No reportado
Función no conocida	NM_198947	FAM111B	Family with sequence similarity 111, member B	Cáncer de próstata
Función no conocida	NM_015203	RPRD2	Regulation of nuclear pre-mRNA domain containing 2	No reportado
Función no conocida	NM_019002	ETAA16	Ewing tumor-associated antigen 1	No reportado

La Tabla 4 muestra los valores de expresión genética que se obtuvo para cada uno de los genes que conforman la firma de expresión genética dentro de los perfiles de expresión tipo y su significancia estadística.

Tabla 4. Valores de expresión de los 28 genes de la firma genética

Identificación	Logaritmo del cambio	Promedio de expresión	tasa (RC/PT)	Valor de p	Valor de p ajustado
ZNF238	-1.0667	9.3131	-3.7130	0.00035909	0.361
SAP30	-0.7546	9.2213	-3.7505	0.0003158	0.361
C10orf137	-0.9202	9.9069	-3.7795	0.00028582	0.361
UHRF1	-1.2503	10.4516	-3.7430	0.0003241	0.361
SUZ12	-0.8487	10.0006	-3.3935	0.00103706	0.369
HMG4	-0.8800	10.5987	-4.3577	3.55E-05	0.266
RBBP4	-0.6796	10.3779	-3.6953	0.00038143	0.361
ARID1B	-0.7757	10.6111	-3.6389	0.00046173	0.366

PPP1CB	-0.9939	9.9062	-3.9138	0.00017895	0.361
SLFN11	-0.7933	9.9698	-3.6535	0.00043946	0.366
FLJ39378	-0.7329	7.7065	-3.6514	0.00044258	0.366
ENDOGL1	-0.8452	8.9972	-3.5058	0.00071932	0.368
RECQL	-0.8992	8.5789	-3.3198	0.00131316	0.369
TRPC1	1.1014	5.8474	3.4212	0.00094825	0.369
TRIO	-1.1684	10.9033	-3.9119	0.00018016	0.361
DNAH6	-0.9498	5.3365	-3.1050	0.00256152	0.374
GNL3L	-0.9932	9.7138	-4.0126	0.00012599	0.361
SLC36A2	1.3730	6.2133	4.4298	2.71E-05	0.266
SRP9	-0.9394	11.0036	-3.9825	0.00014029	0.361
RPE	-0.9561	9.9416	-4.3803	3.27E-05	0.266
LDOC1L	-0.7657	9.8220	-3.7827	0.0002827	0.361
PUS7L	-1.0463	5.9431	-4.3170	4.14E-05	0.266
CCDC89	1.2135	5.7392	4.0676	0.00010338	0.361
LOC644921	1.1601	6.5671	3.6322	0.00047217	0.366
PLEKHG1	-1.0499	7.7350	-3.3939	0.00103574	0.369
FAM111B	-0.8997	10.1106	-3.7276	0.00034164	0.361
RPRD2	-0.9036	9.9979	-3.8449	0.00022785	0.361
ETAA16	-1.1030	7.6966	-4.0975	9.28E-05	0.361

De igual forma se desarrolló una fórmula matemática que correlaciona el nivel de expresión de cada uno de los genes de la firma molecular. Esa fórmula da como resultado un valor, positivo o negativo, que sirve para predecir el riesgo de resistencia al tratamiento en un paciente diagnosticado con CCLA.

Para poder interpretar el resultado de cada paciente, es necesario obtener la intensidad de expresión de cada uno de los 28 genes analizados. Posteriormente se calcula la correlación de Pearson de estos valores con valores previamente establecidos para perfiles de buen pronóstico y mal pronóstico, utilizando la siguiente fórmula:

$$s = \text{Corr}(PsMP, N) - \text{Corr}(PsBP, N)$$

en donde: *s* (*score* en inglés) es la puntuación asignada por el clasificador; PsMP es el perfil de expresión de los 28 genes de la firma con los valores correspondientes a un mal pronóstico; PsBP es el perfil de expresión de los 28 genes de la firma con los valores correspondientes a un buen pronóstico; N es el conjunto de valores a ser evaluado; Corr es la correlación de Pearson definida para dos conjuntos de *n* valores $X = (X_1, \dots, X_n)$ y $Y = (Y_1, \dots, Y_n)$ de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Corr}(X, Y) = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sigma_X \sigma_Y}$$

en donde \bar{X} y \bar{Y} son el promedio de los valores de *X* y de *Y* respectivamente, y σ_X y σ_Y representan la desviación estándar de los valores de *X* y de *Y* respectivamente.

El valor de *s* se obtiene mediante la resta de la correlación del perfil estándar para un mal pronóstico (PsMP) y la muestra (N) a analizar, con la correlación del perfil estándar para un buen pronóstico (PsBP) y la muestra (N) a

analizar. Si el valor de s calculado es mayor a cero el pronóstico es que el individuo podría presentar una mala respuesta debido a su similitud con el perfil tipo para una mala respuesta, recíprocamente, si el valor de s es menor a cero el pronóstico es que el individuo podría presentar una buena respuesta debido a su similitud con el perfil tipo para una buena respuesta.

La Figura 2 muestra el desempeño del clasificador. En el eje X se representa la escala del desempeño del predictor mientras que en el eje Y, se señala el número de genes utilizados por el predictor para alcanzar su máximo nivel de eficiencia. La línea azul representa la especificidad del predictor, es decir la capacidad del predictor para clasificar correctamente a las pacientes con buena respuesta, que es de 91%. La línea roja muestra la sensibilidad; que es la capacidad del predictor de clasificar correctamente a las pacientes con riesgo de resistencia al tratamiento con un valor de 74%. La línea gris muestra la eficiencia total del predictor tomando en cuenta los valores de especificidad y sensibilidad, que en total es de 90%. Cabe resaltar que la máxima capacidad del predictor se obtuvo con 28 genes.

La Figura 3 muestra el patrón de expresión de los 28 genes que componen la firma de expresión genética. El panel izquierdo representa el clasificador y la puntuación de cada muestra dentro del mismo se indica en el eje X. El resultado clínico se representa con círculos negros para los pacientes con una mala respuesta al tratamiento y con círculos blancos para los pacientes con una buena respuesta al tratamiento. De acuerdo con el resultado del clasificador, los pacientes se pueden estratificar claramente en dos grupos, los cuales están separados por una línea roja vertical.

El panel derecho de la Figura 3 muestra una guía de color que representa el perfil de expresión de los 28 genes que conforman la firma, en cada una de las pacientes. En el perfil de expresión determinado por la guía de color; se pueden observar patrones contrastantes entre la parte superior e inferior de la figura, lo que demuestra la existencia de un gradiente en el perfil de expresión de estos genes entre los pacientes con el mejor pronóstico (parte superior) y el peor pronóstico (parte inferior). El umbral aparente entre ambos grupos de perfiles de expresión se indica con una línea horizontal de color negro, la cual corresponde además con el resultado clínico real del tratamiento en los pacientes, representado por círculos negros para una mala respuesta al tratamiento y por círculos blancos para una buena respuesta al tratamiento en el clasificador de la izquierda.

De los 21 pacientes que obtuvieron una calificación mayor de 0.0 por el clasificador 17 presentaron una mala respuesta al tratamiento, lo que representa el 81% de precisión, mientras que de los 68 pacientes que obtuvieron una calificación menor de 0.0 en el clasificador 60 presentaron una respuesta completa al tratamiento, lo que representa el 88% de precisión para estos pacientes. La determinación del nivel de expresión de esta firma de 28 genes permite, por lo tanto, predecir la respuesta al tratamiento estándar en un paciente con CCLA con una precisión de hasta el 88%.

El análisis de Kaplan-Meier, cuyos resultados se presentan en la Figura 4, mostró además una diferencia estadísticamente significativa para determinar la Supervivencia Libre de Enfermedad (SLE) entre los grupos de pacientes que presentaron una buena respuesta al tratamiento o una mala respuesta al tratamiento. El grupo de individuos con una mala respuesta al tratamiento obtuvo

una SLE media de 16 meses, mientras que el grupo con una buena respuesta al tratamiento obtuvo una SLE media que aún no se había alcanzado (valor de $p=1 \times 10^{-16}$).

Para confirmar los niveles de expresión de los genes detectados en el análisis de microarreglos, se determinó la expresión mediante PCR cuantitativa de transcripción reversa (RT-qPCR por sus siglas en inglés), de 27 de los 28 genes que componen la firma (ZNF238; SAP30; C10orf137; UHRF1; SUZ12; HMG4; RBBP4; PPP1CB; SLFN11; FLJ39378; ENDOGL1; RECQL; TRPC1; TRIO; DNAH6; GNL3L; SLC36A2; SRP9; RPE; LDOC1L; PUS7L; CCDC89; LOC644921; PLEKHG1; FAM111B; RPRD2 y ETAA16), en un grupo de individuos formado por 30 pacientes con diagnóstico de CCLA. El análisis se realizó a partir de ARN total aislado de biopsias obtenidas antes del tratamiento, 16 de estos pacientes fueron clasificados con un pronóstico de buena respuesta y 14 con un pronóstico de mala respuesta.

Los resultados de RT-qPCR se analizaron como $\Delta\Delta CT$, lo que representa la proporción de cambio relativa al gen constitutivo de β -actina. La guía de color de la Figura 5 se generó empleando el software Génesis. Los resultados de los 27 genes validados mediante RT-qPCR, fueron capaces de agrupar a los pacientes en una manera similar a la observada en el análisis de agrupamiento supervisado que se realizó utilizando las 89 muestras del grupo de entrenamiento principal.

Al comparar los resultados de la clasificación obtenida por la firma de expresión de 27 de los 28 genes de la firma mediante RT-qPCR, contra la clasificación obtenida por la firma de expresión de 28 genes mediante

microarreglos, se observa una consistencia en el poder pronóstico de la firma de expresión, confirmando la validez del método.

Los métodos objeto de la presente invención consisten en determinar el nivel de expresión de los 28 genes que conforman la firma de expresión en una muestra biológica previamente obtenida, calcular la correlación entre la expresión de la muestra y el nivel de expresión de los centroides asociados a una buena respuesta al tratamiento y a una mala respuesta al tratamiento, obteniendo así la calificación de la muestra en el clasificador, en donde una calificación mayor de cero es indicativa de que el individuo presentará una mala respuesta al tratamiento estándar, mientras que una calificación menor que cero es indicativa de que el individuo presentará una buena respuesta al tratamiento estándar.

Para la puesta en práctica de la presente invención, se puede emplear cualquier metodología descrita en el estado de la técnica que sea útil para determinar el nivel de expresión de un gen o la proteína para la que codifica, incluyendo métodos basados en análisis de hibridación de polinucleótidos, métodos basados en la secuenciación de polinucleótidos, métodos de inmunohistoquímica y métodos basados en determinación de proteínas.

El perfil de expresión de la firma de 28 genes descrita en la presente invención puede determinarse al medir ya sea su ARN mensajero (ARNm) o la proteína para la que codifica. La determinación del ARNm puede realizarse con técnicas moleculares que incluyen sin limitar: RT-qPCR, hibridación *in situ*, hibridación con sondas específicas (incluyendo microarreglos de ácidos nucleicos), ensayos tipo Northern blot, ensayos de protección a endonucleasas y secuenciación de transcritos, entre otros. La determinación de proteínas puede

realizarse con técnicas inmunoenzimáticas que incluyen sin limitar: inmunohistoquímica, ensayos tipo Western blot, ELISA, inmunofluorescencia e inmunoprecipitación, entre otros. Un experto en la técnica puede adaptar fácilmente los métodos de detección de ARNm conocidos en el estado de la técnica para usarlos en la detección del nivel de expresión de la firma de 28 genes de la presente invención.

La determinación del nivel de expresión de la firma de 28 genes descrita en la presente invención puede llevarse a cabo en diversas muestras biológicas incluyendo sin limitar: muestras congeladas de tumor y muestras de tumor incluidas en parafina.

En una modalidad preferida de la invención, el perfil de expresión de la firma de 28 genes se determina mediante RT-qPCR en muestras de tejido tumoral incluido en parafina.

En una modalidad preferida de la invención, el perfil de expresión de la firma de 28 genes se determina mediante microarreglos de ácidos nucleicos en muestras de tejido tumoral incluido en parafina.

En otra modalidad, la presente invención se refiere a kits útiles para pronosticar la respuesta al tratamiento estándar en un individuo diagnosticado con CCLA, en donde el kit comprende: los medios necesarios para determinar el nivel de expresión de la firma genética que comprende los genes ZNF238; SAP30; C10orf137; UHRF1; SUZ12; HMGN4; RBBP4; ARID1B; PPP1CB; SLFN11; FLJ39378; ENDOGL1; RECQL; TRPC1; TRIO; DNAH6; GNL3L; SLC36A2; SRP9; RPE; LDOC1L; PUS7L; CCDC89; LOC644921; PLEKHG1; FAM111B; RPRD2 y ETAA16, asociados a la resistencia al tratamiento estándar en CCLA en una

muestra biológica; los perfiles de expresión tipo (centroides) asociados a una buena respuesta al tratamiento estándar o a una mala respuesta al tratamiento estándar; los medios para calcular la correlación del perfil de expresión genética de la muestra con los perfiles de expresión tipo (centroides) asociados a una buena respuesta al tratamiento estándar o a una mala respuesta al tratamiento estándar y las instrucciones necesarias para clasificar al individuo como un individuo con posibilidades de presentar una buena respuesta al tratamiento estándar o como un individuo con posibilidades de presentar una mala respuesta al tratamiento estándar de acuerdo con la similitud del perfil de expresión de la muestra respecto de los perfiles de expresión tipo (centroides) asociados a una buena respuesta al tratamiento estándar o a una mala respuesta al tratamiento estándar en CCLA.

En este sentido, los kits descritos en la presente solicitud comprenden medios para determinar ya sea el ARNm o la proteína para la que codifican cada uno de los 28 genes que conforman la firma de expresión genética de la presente invención en una muestra biológica.

Los medios para determinar el ARNm o proteínas que comprenden los kits descritos en la presente solicitud se pueden seleccionar del grupo que comprende: secuencias de ácidos nucleicos de complementariedad o reconocimiento específicos y anticuerpos ya sea policlonales, monoclonales o humanizados, entre otros. Estos medios se pueden adaptar para el desarrollo de las diversas técnicas de laboratorio conocidas en el estado de la técnica para la detección de ARNm específicos tales como RT-qPCR, hibridación *in situ*, hibridación con sondas específicas tipo Northern blot y ensayos de protección a endonucleasas, entre otros.

Asimismo, estos medios se pueden adaptar para el desarrollo de técnicas conocidas para la detección de proteínas específicas tales como inmunohistoquímica, ensayos tipo Western blot, ELISA y sus variantes, inmunofluorescencia e inmunoprecipitación, entre otros.

Los perfiles de expresión tipo (centroides) contra los cuales se determina la correlación de los perfiles de expresión de una muestra, se refieren a los niveles de expresión normalizados o estandarizados de un conjunto de individuos que presentaron una buena respuesta al tratamiento estándar o una mala respuesta al tratamiento estándar bajo condiciones estandarizadas.

Los medios para calcular la correlación del perfil de expresión genética de la muestra con los perfiles de expresión tipo (centroides) asociados a una buena respuesta al tratamiento estándar o a una mala respuesta al tratamiento estándar, se refieren a medio legible por computadora con las instrucciones necesarias para calcular la correlación entre el perfil de expresión de una muestra y los perfiles de expresión tipo asociados a una buena respuesta o a una mala respuesta.

Para el desarrollo de los perfiles de expresión tipo (centroides) se emplearon los datos de expresión genética de 89 biopsias de tumor de pacientes con cáncer cervicouterino localmente avanzado, depositados en el Gene Expression Omnibus del National Center for Biotechnology Information con el número de acceso GSE56303. Estos datos se emplearon para entrenar un clasificador de media cercana (nearest mean classifier, en inglés) en un proceso de validación cruzada dejando uno fuera (*LOOCV Leave-one-out cross-validation*, en inglés). Estos perfiles de expresión tipo se pueden continuar entrenando con datos clínicos obtenidos durante la aplicación clínica de la presente invención.

En otra modalidad, la presente invención se refiere a microarreglos de ADN útiles para determinar la respuesta al tratamiento estándar en un individuo diagnosticado con CCLA, en donde el microarreglo comprende ácidos nucleicos de complementariedad que permiten determinar el perfil de expresión de cada uno de los 28 genes que conforman la firma descrita en la presente solicitud.

Un experto en la técnica puede diseñar fácilmente los ácidos nucleicos de complementariedad necesarios para detectar ya sea el ARNm o el ADN copia (ADNc) de cada uno de los 28 genes que conforman la firma descrita en la presente solicitud, de acuerdo con los métodos descritos en el estado de la técnica.

Esta invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos, que no se consideran en ningún sentido como limitaciones impuestas sobre el alcance de las mismas. Por el contrario, éstos son para entender claramente que se puede recurrir a varias otras modalidades, modificaciones y equivalentes de las mismas.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Muestras y datos clínicos

La población de estudio incluyó 119 pacientes matriculados prospectivamente en el protocolo de banco de tumores del Instituto Nacional de Cancerología de México (INCan) entre abril de 2010 y agosto de 2012. Todos los pacientes incluidos en el estudio firmaron el consentimiento informado y el protocolo fue aprobado por los comités institucionales científico y de ética. Inmediatamente después de la escisión quirúrgica, las biopsias de tumor se dividieron en tres piezas, una para la confirmación patológica y dos para el

aislamiento de ARN y ADN. Las piezas empleadas para la extracción de ácidos nucleicos fueron congeladas en nitrógeno líquido hasta la extracción.

Los criterios de elegibilidad para los pacientes fueron: a) diagnóstico patológico confirmado de cáncer cervicouterino localmente avanzado (CCLA) con estadiaje entre IB2 a IIIB según la escala de FIGO; b) edad mayor a 18 y menor a 70 años; c) elevada calidad del ADN y ARN; d) sin tratamiento oncológico previo y e) en posibilidades de recibir el tratamiento estándar. La quimioterapia consistió en una dosis semanal de *cis*-diaminodicloroplatino(II) (CDDP o cisplatino) a 40 mg/m² durante el tiempo de la radioterapia. La mayoría de pacientes recibieron en promedio cinco ciclos de quimioterapia. La Radioterapia consistió en radiación externa y braquiterapia intracavitaria, para una dosis total de 64-66 Gy durante 67 días. Las características clínicas de los pacientes se muestran en la Tabla 1.

El grado de desarrollo del tumor se evaluó de acuerdo con lo que se describe en Hirschowitz et. al. *Histopathology*. 2013 Jan;62(1):176-202 para la clasificación de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO). La respuesta clínica se evaluó como una buena respuesta o Respuesta Completa (RC) cuando desaparecieron todos los signos del cáncer en respuesta al tratamiento; y como una mala respuesta cuando se presentó Progresión de la Enfermedad (PE) con un aumento de al menos el 20% en la suma de los diámetros más largos (sum LD, por sus siglas en inglés) de las lesiones blanco, tomando como referencia a la suma de LD más pequeña registrada desde el inicio del tratamiento o la aparición de una o más lesiones nuevas o cuando se presentó una Respuesta Parcial (RP) o Enfermedad Estable (EE) de acuerdo con los criterios

RECIST 1.1 a 2.5 años como se describe en Eisenhauer, E.A. et. al. Eur J Cancer. 2009 Jan;45(2):228-47.

Las muestras fueron analizadas para determinar la infección por Virus del Papiloma Humano (VPH) y el genotipo del virus presente. Para este fin se obtuvo el ADN a partir de biopsias tumorales por medio del sistema MagNAPure siguiendo las recomendaciones del fabricante (Roche Diagnostics). La genotipificación del VPH fue evaluada mediante dos enfoques, la prueba de genotipificación Linear Array HPV de Roche Diagnostics, y mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa múltiple anidada (Nested Multiplex PCR) (iniciadores NMPCR MY/GP) con posterior secuenciación directa de los fragmentos de PCR, de acuerdo a lo que se describe en Soltar K. et. al. J Clin Microbiol. Jul 2004; 42(7): 3176–3184.

Determinación de perfiles de expresión mediante microarreglos

Para obtener una firma expresión genética asociada con la respuesta clínica al tratamiento estándar en CCLA se comparó el nivel de expresión entre pacientes que presentaron una buena respuesta al tratamiento estándar y pacientes que presentaron una mala respuesta al tratamiento estándar. Se obtuvo el ARN de 89 muestras obtenidas en el periodo de análisis, por medio del sistema MagNAPure, Roche Diagnostics, y se evaluó su calidad por medio de relación de ARN ribosomal 18S:28S. Se prepararon los blancos de hibridación a partir de 500 ng de ARN total y se amplificaron con el kit de amplificación de transcriptoma completo 2 (Whole Transcriptome Amplification Kit, Sigma Aldrich). Se utilizaron 4 microgramos de ADNc amplificado y marcado con Cy3 para hibridar en los microarreglos de expresión de alta densidad NimbleGen Homo sapiens Expression

Array HG18 090828 opt expr y HG18 100718 opt expr, de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. Después de los lavados estándar, los microarreglos fueron examinados en el escáner de microarreglos Nimblegen MS200.

Procesamiento de datos y análisis estadístico

Las imágenes escaneadas fueron cuadrículadas usando el Software NimbleScan v2.6 (Nimblegen Roche). A continuación, se realizó una normalización del fondo intra microarreglos mediante Análisis Robusto de Multi-arreglos (Robust Multi-Array Analysis) e inter microarreglos mediante normalización por cuantiles. Se seleccionaron los genes con intensidades de señal por encima de un umbral de aleatoriedad del 95% de acuerdo a lo que se describe en Simon A y Biot E. *Bioinformatics*. 2010 Oct 1;26(19):2468-9.

La expresión diferencial entre los dos grupos de resultados clínicos se evaluó mediante pruebas t moderadas y la significancia estadística para cada gen se obtuvo por el método empírico de Bayes aplicado mediante el programa Linear Models for Microarray Data (LIMMA) de Bioconductor de acuerdo a lo que se describe en Gentleman RC. *Genome Biol*. 2004;5(10):R80. La expresión diferencial global se examinó adicionalmente por muestreo aleatorio de marcas de clase, seleccionando los subconjuntos de genes con base en su calificación de desempeño óptimo dentro del clasificador, como se describe en van 't Veer LJ, *Nature*. 2002 Jan 31;415(6871):530-6 y Roepman P, *Nat Genet*. 2005 Feb;37(2):182-6. Se entrenó un clasificador de media cercana (nearest mean classifier) para la selección de características en un proceso de validación cruzada dejando uno fuera (*LOOCV Leave-one-out cross-validation*). La selección de características se probó nuevamente mediante por otro proceso de validación

cruzada dejando uno fuera para seleccionar el perfil de genes que presenta la asociación más fuerte con la respuesta clínica. Los gráficos se generaron utilizando el software Génesis 2.1 de acuerdo a lo que se describe en Sturn, A. et. al. Bioinformatics. 2002 Jan;18(1):207-8.

Validación del perfil de expresión genética mediante RT-qPCR

Se emplearon 30 muestras para validar el perfil de expresión genética identificado en el conjunto de tumores de entrenamiento. Se sometieron 27 de los 28 genes expresados diferencialmente (ZNF238; SAP30; C10orf137; UHRF1; SUZ12; HMGN4; RBBP4; PPP1CB; SLFN11; FLJ39378; ENDOGL1; RECQL; TRPC1; TRIO; DNAH6; GNL3L; SLC36A2; SRP9; RPE; LDOC1L; PUS7L; CCDC89; LOC644921; PLEKHG1; FAM111B; RPRD2 y ETAA16) a PCR cuantitativa de transcripción reversa (RT-qPCR). Cada grupo de iniciadores se diseñó empleando un algoritmo de cómputo verificado experimentalmente y luego probado en un ensayo de control de calidad para garantizar que generan una sola banda del tamaño predicho en electroforesis en gel de agarosa. La secuencia de los iniciadores y las condiciones de PCR se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Iniciadores empleados para la cuantificación relativa mediante RT-qPCR.

Nombre	Secuencia 5'-3'	GeneID	TM	Tamaño del amplicón
ACTB_F	ATGACTTAGTTGCGTTACACCCT	NM_001101	59°C	156
ACTB_R	TGCTCGCTCCAACCGACTG			
ZNF238_F	TGCTTTCTAAGCACAGTCAGGT	NM_006352	59°C	127
ZNF238_R	TGTCCCAAAAACCTACAAAATAGC			
SAP30_F	GGATAAGAGCGCAAGGCATC	NM_003864	59°C	85
SAP30_R	TCACCTCCATCATCACTCC			
C10orf137_F	AACCGCGACTCTTCTGGAAA	BC028715	59°C	140
C10orf137_R	CTGTTCTTGATCAACGGCTCC			
UHRF1_F	GTTTTGCTGTCCCTCCCCTC	NM_013282	59°C	180
UHRF1_R	TGGCCGTCTCCATCTGTTT			
SUZ12_F	GGGCTGCGGTGTTACC	NM_015355	58	129
SUZ12_R	CTGTGCAAAAATATTGGTGCTATGA			
HMGN4_F	CACGAGACTCGGACATCTTTC	NM_006353	59°C	89
HMGN4_R	TGCCTTTCTCTTGGGCATGG			

FLJ39378_F	CTCTCCCACAAGGATGTCAAC	BC089444	59°C	54
FLJ39378_R	TCCTTCAGCTTCTTCATCACC			
ENDOGL1_F	CCAAAGGCATTTAGCATTCC	NM_005107	59°C	55
ENDOGL1_R	CCGTGTAACCCAAATCAAGA			
RECQL_F	GGAGATCCGAGAGTCGGAGA	NM_002907	58°C	153
RECQL_R	CAAAAAGCGCACACCCTTGA			
TRPC1_F	TGGACTACGGTTGTCAGAACT	NM_003304	58°C	174
TRPC1_R	GTGCATTCACAGCCAATGC			
TRIO_F	AAAAGCCGATTAAGCACTGG	AB115332	58°C	63
TRIO_R	TGCTGCCACAGTGACTCG			
DNAH6_F	CCATCCATTGTTGCTGTTCCGG	NM_173645	58°C	148
DNAH6_R	TAGCTTACCTGTGCTTGCACT			
GNL3L_F	ACAAGTTCATCCGGCTCTTG	NM_019067	60°C	64
GNL3L_R	GACGCAGTTACGCAGGATG			
SLC32A2_F	CTCAGCTCACCACAACCTCG	BC101100	59°C	72
SLC32A2_R	CGTGCTGGACTATGCCTCTA			
SRP9_F	AGCGGTCCTTGTCTCAG	BC021995	60°C	77
SRP9_R	ACATCTTGAGCTTGGTCTGTTTT			
RPE_F	AGCACAGACTAGAGCTTGCTTG	NM_199229	60°C	70
RPE_R	CAAAGCTTTCCAAGCTGAA			
LDOC1L_F	GCCAATCTACCAACATGC	NM_032287	60°C	59
LDOC1L_R	CCTGGTGC GTAACAAGGTC			
PUS7L_F	CCACTGAACCGAGGCACTG	NM_031292	58°C	106
PUS7L_R	AGTGCCATGAAATCCAACGTGA			
CCDC89_F	CTGAAGCGGAGGTCAGATG	BC044814	59°C	73
CCDC89_R	TTCTCTCCAGCTCTGCATT			
LOC644921_F	GACATTCAATTCATCCTGTGA	XM_928009	59°C	69
LOC644921_R	GCAGTTCTGTCCCTATGGATTT			
PLEKHG1_F	GGAGTGCAATCTTGCTCAC	NM_001029884	60°C	67
PLEKHG1_R	AGAGGCTGAGGCAGGAGAAT			
FAM111B_F	TTGGCCAGAAATCAAGACAT	NM_198947	59°C	67
FAM111B_R	CTCGATAAGATGGAGAAACAAGG			
RPRD2_F	TGTTAGGGAAAAGCATAAGAGAAAA	NM_015203	59°C	104
RPRD2_R	AACATCCCATTTAATTTCTGCAA			
ETAA1_F	GAGCGCTGAAAATGGACTCAC	NM_019002	59°C	178
ETAA1_R	GTTGGTTTTTCATCCTGAGGAGC			
Todas las muestras fueron sometidas a 40 ciclos y por duplicado.				

Las reacciones de transcripción reversa se realizaron de acuerdo con el protocolo MMLV de Promega siguiendo las recomendaciones del proveedor. El

PCR en tiempo real se realizó empleando la mezcla de reacción FastStart SYBR Green master de Roche en el equipo Light Cycler 480 II de Roche, según el protocolo del fabricante. Se utilizaron muestras duplicadas de la transcripción reversa en cada uno de los ensayos y los datos se normalizaron contra el gen constitutivo de β -actina (ACTB).

Para cuantificar la expresión genética se utilizó el método comparativo Ct ($\Delta\Delta$ Ct) (*Cycle threshold* en inglés) o Cp (*Crossing point* en inglés) conocidos como ciclo umbral o punto de cruce respectivamente y la cuantificación relativa se calculó como $2^{-\Delta\Delta$ Ct}. La Supervivencia Libre de Enfermedad (SLE) de los grupos de pacientes resultantes se evaluó mediante el método de Kaplan-Meier y la significancia estadística de las diferencias de supervivencia se determinó con la prueba de logaritmo-rango. El análisis multivariado se realizó mediante la prueba exacta de Fisher.

EJEMPLO 2

Análisis de expresión

Se obtuvo el ARN de una biopsia de tumor por medio del sistema MagNAPure, Roche Diagnostics, y se evaluó su calidad por medio de relación de ARN ribosomal 18S:28S. Se prepararon los blancos de hibridación a partir de 500 ng de ARN total y se amplificaron con el kit de amplificación de transcriptoma completo 2 (Whole Transcriptome Amplification Kit, Sigma Aldrich). Se utilizaron 4 microgramos de ADNc amplificado y marcado con Cy3 para hibridar en los

microarreglos de expresión de alta densidad NimbleGen, de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. Después de los lavados estándar, los microarreglos fueron examinados en el escáner de microarreglos Nimblegen MS200. Las imágenes escaneadas fueron cuadrículadas usando el Software NimbleScan v2.6 (Nimblegen Roche).

Obtención de la puntuación de pronóstico.

Se calculó la puntuación asignada por el clasificador para la muestra a partir de los valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ obtenidos para cada gen, mediante el uso de un medio legible en computadora que contiene los perfiles de expresión tipo (centroides) relacionados a una buena respuesta al tratamiento estándar y a una mala respuesta al tratamiento estándar y que permite aplicar la fórmula $s = \text{Corr}(PsMP, N) - \text{Corr}(PsBP, N)$ con los datos obtenidos. Para esta muestra se obtuvo una puntuación de 1.25, el cual al ser mayor de cero indica que el paciente podría presentar una mala respuesta al tratamiento estándar. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Cálculo de la puntuación de pronóstico en el clasificador.

Gene_ID	Nombre	Referencia Mala Respuesta	Referencia Buena respuesta	DDCTs Muestra	Puntuación
NM_019002	ETAA1	-0.70145623	0.230328911	-0.932167823	1.250128077
AB115332	TRIO	-0.676197084	0.222034863	-0.873130725	
BC028715	C10orf137	-0.523380885	0.17185641	-0.903543961	
NM_003304	TRPC1	0.568462958	-0.186659479	4.910809373	
NM_006353	HMG4	-0.770498535	0.252999519	-0.23377006	
NM_006352	ZNF238	-0.636593139	0.209030583	-0.038663352	
NM_015355	SUZ12	-0.612557162	0.201138173	-0.240185475	
BC089444	RILPL1	-0.660509675	0.216883774	-0.649548136	

AB033061	ARID1B	-0.561848018	0.184487409	-0.585520106
XM_928009	LOC644921	0.607591493	-0.199507655	-0.408181455
NM_032287	LDOC1L	-0.687582446	0.22577334	-1.618913953
NM_005107	ENDOGL1	-0.579240042	0.190198223	-2.555925929
BC101100	SLC36A2	0.759691184	-0.249450837	1.235934247
BC052586	SLFN11	-0.633266835	0.207938364	-2.081356756
NM_002907	RECQL	-0.604185779	0.19838936	-1.013444417
NM_031292	PUS7L	-0.738307485	0.242429324	-0.914216803
NM_199229	RPE	-0.750797751	0.246530605	-0.139423069
NM_015203	KIAA0460	-0.67687458	0.222257325	-3.31125927
BC021995	SRP9	-0.678457997	0.222777253	0.029305735
NM_173645	FLJ37357	-0.544967669	0.178944608	-0.160386391
NM_002709	PPP1CB	-0.669936649	0.219979198	0.59764993
NM_001029884	PLEKHG1	-0.579451384	0.190267619	-0.095803687
NM_003864	SAP30	-0.682181945	0.224000041	0.325431154
BC003092	RBBP4	-0.708210829	0.232546839	-1.941736577
NM_019067	GNL3L	-0.709676143	0.233027987	-2.568445986
BC044814	CCDC89	0.684115793	-0.224635036	1.895409687
NM_013282	UHRF1	-0.659870338	0.216673842	-1.6389987
NM_198947	FAM111B	-0.543623864	0.178503358	0.520513653

A partir de aproximadamente 80 a 100 mg de tejido obtenido de una biopsia, se obtuvo el ARN mediante el protocolo de trizol como se describe en Wilfinger, W. et. al. 1997 BioTechniques 22, 474. A partir del ARN total se generó una biblioteca genómica, cuidando mantener la relación equimolar para cada molécula de ARN.

A partir del ARN se generó el ADNc y se evaluó la expresión de los 28 genes de la firma mediante una reacción diseñada para PCR en tiempo real (RT-qPCR) empleando una solución amortiguadora de pH, desoxinucleótidos trifosfato (dNTPS), una polimerasa termoestable, SYBER Green como molécula reveladora y los iniciadores de amplificación correspondientes a cada fragmento específico. Las características del diseño de los iniciadores se especifican en la tabla 5. Se incluyeron además cuatro controles; tres de ellos positivos que amplifican

fragmentos de los genes beta 2 mioglobina (B2M), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y beta Actina (ACTB) y un control negativo.

Obtención de los valores $2^{-\Delta\Delta Ct}$

A partir de los datos de Cp obtenidos en el RT-qPCR se calcularon los valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para cada gen mediante el procedimiento y algoritmo que se describe en Livak, K. J., y Schmittgen, T. D. Methods. 2001 Dec;25(4):402-8. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Cálculo de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ a partir de los datos de expresión obtenidos mediante RT-qPCR.

Gene	Cp			Dct gene	DDCT (Log2)
	Cp gene	HouseKeeping (HK)	PROM Actina		
ETAA1	28.1717	15.7941	14.2126	12.3776	2.0021
TRIO	23.1091	15.7941	14.2126	7.3150	-0.8419
C10orf137	24.4267	15.7941	14.2126	8.6326	0.4757
TRCP1	27.5154	15.7941	14.2126	11.7213	-0.1308
HMGN4	23.2371	15.7941	14.2126	7.4430	-0.7139
ZNF238	23.9142	15.7941	14.2126	8.1201	-0.0368
SUZ12	23.7264	15.7941	14.2126	7.9323	-0.2246
FLI39378	24.5569	15.7941	14.2126	8.7628	0.6059
ARID1B	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
LOC644921	23.7239	15.7941	14.2126	7.9298	-0.2271
LDOC1L	24.2104	15.7941	14.2126	8.4164	0.2594
ENDOGL1	23.5627	15.7941	14.2126	7.7686	-0.3883
SLC36A2	22.0905	15.7941	14.2126	6.2965	-1.8605
SLFN11	22.6059	15.7941	14.2126	6.8118	-1.3451
RECQL	24.3740	15.7941	14.2126	8.5800	-0.6056
PUS7L	22.6822	15.7941	14.2126	6.8881	-1.2688
RPE	21.9619	15.7941	14.2126	6.1678	-1.9891
RPRD2	24.9582	15.7941	14.2126	9.1641	1.0072
SRP9	22.7745	15.7941	14.2126	6.9804	-1.1765
DNHL6	29.7179	15.7941	14.2126	13.9239	0.4109
PPPC1	31.7974	15.7941	14.2126	16.0033	-0.1224
PLEKHG1	21.9695	15.7941	14.2126	6.1754	-1.9815
SAP30	24.2184	15.7941	14.2126	8.4243	0.2674
RBBP4	35.5031	15.7941	14.2126	19.7090	-0.4807
GNL3L	24.3069	15.7941	14.2126	8.5128	0.3559
CCDC89	22.6744	15.7941	14.2126	6.8804	-1.2766
UHRF1	24.1259	15.7941	14.2126	8.3318	0.1749
FAM111B	23.9730	15.7941	14.2126	8.1789	0.0220

Obtención de la puntuación de pronóstico.

Se calculó la puntuación asignada por el clasificador para la muestra a partir de los valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ obtenidos para cada gen, mediante el uso de un medio legible en computadora que contiene los perfiles de expresión tipo (centroides) relacionados a una buena respuesta al tratamiento estándar y a una mala respuesta al tratamiento estándar y que permite aplicar la fórmula $s=Corr(PsMP,N)-Corr(PsBP,N)$ con los datos obtenidos. Para esta muestra se obtuvo una puntuación de -0.06, el cual al ser menor de cero indica que el paciente podría presentar una buena respuesta al tratamiento estándar. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Cálculo de la puntuación de pronóstico en el clasificador.

Gene_ID	Nombre	Perfil asociado a mala respuesta	Perfil asociado a buena respuesta	DDCTs Muestra	Puntuación
NM_019002	ETAA1	-0.70145623	0.230328911	-0.227125922	-0.067657311
AB115332	TRIO	-0.676197084	0.222034863	-1.860454756	
BC028715	C10orf137	-0.523380885	0.17185641	-0.130848081	
NM_003304	TRPC1	0.568462958	-0.186659479	-1.276567823	
NM_006353	HMGN4	-0.770498535	0.252999519	0.4109339	
NM_006352	ZNF238	-0.636593139	0.209030583	-1.268805595	
NM_015355	SUZ12	-0.612557162	0.201138173	-1.989124092	
BC089444	RILPL1	-0.660509675	0.216883774	-1.981542503	
AB033061	ARID1B	-0.561848018	0.184487409	0.605875661	
XM_928009	LOC644921	0.607591493	-0.199507655	1.007167014	
NM_032287	LDOC1L	-0.687582446	0.22577334	0.475668185	

NM_005107	ENDOGL1	-0.579240042	0.190198223	-0.480698167
BC101100	SLC36A2	0.759691184	-0.249450837	-0.713883018
BC052586	SLFN11	-0.633266835	0.207938364	0.267371392
NM_002907	RECQL	-0.604185779	0.19838936	-0.84190838
NM_031292	PUS7L	-0.738307485	0.242429324	-0.122366457
NM_199229	RPE	-0.750797751	0.246530605	-0.224597994
NM_015203	KIAA0460	-0.67687458	0.222257325	0.259448693
BC021995	SRP9	-0.678457997	0.222777253	0.355917322
NM_173645	FLJ37357	-0.544967669	0.178944608	-0.036790035
NM_002709	PPP1CB	-0.669936649	0.219979198	-1.176512071
NM_001029884	PLEKHG1	-0.579451384	0.190267619	0.174874822
NM_003864	SAP30	-0.682181945	0.224000041	-0.388341002
BC003092	RBBP4	-0.708210829	0.232546839	-1.345091139
NM_019067	GNL3L	-0.709676143	0.233027987	0.021967658
BC044814	CCDC89	0.684115793	-0.224635036	-0.605589807
NM_013282	UHRF1	-0.659870338	0.216673842	2.002098163
NM_198947	FAM111B	-0.543623864	0.178503358	0

1.- Un método *in vitro* útil para pronosticar la respuesta al tratamiento estándar en un individuo diagnosticado con Cáncer Cervicouterino Localmente Avanzado, dicho método caracterizado porque comprende: (a) determinar el perfil de expresión genética de una firma que comprende los genes ZNF238; SAP30; C10orf137; UHRF1; SUZ12; HMG4; RBBP4; ARID1B; PPP1CB; SLFN11; FLJ39378; ENDOGL1; RECQL; TRPC1; TRIO; DNAH6; GNL3L; SLC36A2; SRP9; RPE; LDOC1L; PUS7L; CCDC89; LOC644921; PLEKHG1; FAM111B; RPRD2 y ETAA16, en una muestra biológica previamente obtenida; (b) calcular la correlación del perfil de expresión genética de la muestra con los perfiles de expresión tipo (centroides) asociados a una buena respuesta al tratamiento estándar y con los perfiles de expresión tipo (centroides) asociados a una mala respuesta al tratamiento estándar y (c) clasificar al individuo como un individuo con posibilidades de presentar una buena respuesta al tratamiento estándar o como un individuo con posibilidades de presentar una mala respuesta al tratamiento estándar de acuerdo

con la similitud del perfil de expresión de la muestra respecto de los perfiles de expresión tipo (centroides).

2.- El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque la correlación entre el perfil de expresión de la muestra y los perfiles de expresión tipo (centroides) asociados a una buena respuesta al tratamiento estándar y a una mala respuesta al tratamiento estándar se realiza mediante la fórmula: $s = Corr(PsMP, N) - Corr(PsBP, N)$ en donde: PsMP es el perfil de expresión tipo (centroide) asociado a una mala respuesta al tratamiento estándar; PsBP es el perfil de expresión tipo (centroide) asociado a una buena respuesta al tratamiento estándar; N es el conjunto de valores a ser evaluado y *Corr* es la correlación de Pearson definida para dos conjuntos de n valores $X = (X_1, \dots, X_n)$ y $Y = (Y_1, \dots, Y_n)$ de acuerdo con la siguiente fórmula: $Corr(X, Y) = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sigma_X \sigma_Y}$ en donde \bar{X} y \bar{Y} son el promedio de los valores de X y de Y respectivamente, y σ_X y σ_Y representan la desviación estándar de los valores de X y de Y respectivamente.

3.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado además porque los perfiles de expresión tipo (centroides) asociados a una buena respuesta al tratamiento estándar o a una mala respuesta al tratamiento estándar se obtienen de los datos de expresión genética depositados en el Gene Expression Omnibus del National Center for Biotechnology Information con el número de acceso GSE56303.

4.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado además porque el perfil de expresión de dicha firma en la muestra biológica se determina mediante la medición del ARNm.

5.- El método de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado además porque el ARNm se determina mediante cualquiera de las metodologías seleccionadas del grupo que comprende: RT-qPCR, hibridación *in situ*, hibridación con sondas específicas (incluyendo microarreglos de ácidos nucleicos), ensayos tipo Northern blot, ensayos de protección a endonucleasas y secuenciación de transcritos.

6.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado además porque el perfil de expresión de dicha firma en la muestra biológica se determina mediante la medición de las proteínas para las que codifican los genes que componen la firma.

7.- El método de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado además porque la medición de las proteínas para las que codifican los genes que componen la firma se realiza mediante cualquiera de las metodologías seleccionadas del grupo que comprende: inmunohistoquímica, ensayos tipo Western blot, ELISA, inmunofluorescencia e inmunoprecipitación.

8.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado además porque la muestra biológica se selecciona del grupo que comprende: muestras congeladas de tumor y muestras de tumor incluidas en parafina.

9.- Un kit útil para pronosticar la respuesta al tratamiento estándar en un individuo diagnosticado con Cáncer Cervicouterino Localmente Avanzado

caracterizado porque comprende al menos: a) medios para determinar el perfil de expresión genética de una firma que comprende los genes ZNF238; SAP30; C10orf137; UHRF1; SUZ12; HMGN4; RBBP4; ARID1B; PPP1CB; SLFN11; FLJ39378; ENDOGL1; RECQL; TRPC1; TRIO; DNAH6; GNL3L; SLC36A2; SRP9; RPE; LDOC1L; PUS7L; CCDC89; LOC644921; PLEKHG1; FAM111B; RPRD2 y ETAA16, en una muestra biológica previamente obtenida, b) perfiles de expresión tipo (centroides) asociados a una buena respuesta al tratamiento estándar o a una mala respuesta al tratamiento estándar, c) medios para calcular la correlación del perfil de expresión genética de la muestra con los perfiles de expresión tipo (centroides) asociados a una buena respuesta al tratamiento estándar y a una mala respuesta al tratamiento estándar y d) instrucciones para clasificar al individuo como un individuo con posibilidades de presentar una buena respuesta al tratamiento estándar o como un individuo con posibilidades de presentar una mala respuesta al tratamiento estándar de acuerdo con la similitud del perfil de expresión de la muestra respecto de los perfiles de expresión tipo (centroides).

10.- El kit de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado además porque los medios para determinar el perfil de expresión genética son los medios necesarios para determinar el ARNm de los 28 genes que componen la firma, mediante cualquiera de las metodologías seleccionadas del grupo que comprende: RT-qPCR, hibridación *in situ*, hibridación con sondas específicas (incluyendo microarreglos de ácidos nucleicos), ensayos tipo Northern blot, ensayos de protección a endonucleasas y secuenciación de transcritos.

11.- El kit de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado además porque los medios para determinar el perfil de expresión genética son los medios

necesarios para determinar las proteínas para las que codifican los 28 genes que componen la firma, mediante cualquiera de las metodologías seleccionadas del grupo que comprende: inmunohistoquímica, ensayos tipo Western blot, ELISA, inmunofluorescencia e inmunoprecipitación.

12.- El kit de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, caracterizado además porque los perfiles de expresión tipo (centroides) asociados a una buena respuesta al tratamiento estándar o a una mala respuesta al tratamiento estándar se obtienen de los datos de expresión genética depositados en el Gene Expression Omnibus del National Center for Biotechnology Information con el número de acceso GSE56303.

13.- El kit de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, caracterizado además porque los medios para calcular la correlación del perfil de expresión genética de la muestra con los perfiles de expresión tipo (centroides) comprenden un medio legible por computadora con las instrucciones necesarias para calcular la correlación.

14.- El kit de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13 caracterizado además porque los medios están adaptados para el análisis de una muestra biológica seleccionada del grupo que comprende: muestras congeladas de tumor y muestras de tumor incluidas en parafina.

15.- Un microarreglo de ácidos nucleicos útil para determinar la respuesta al tratamiento estándar en un individuo diagnosticado con Cáncer Cervicouterino Localmente Avanzado caracterizado porque comprende una matriz de sondas de polinucleótidos unidas a un soporte, en donde dichas sondas de

polinucleótidos presentan secuencias complementarias e hibridables, bajo condiciones de astringencia adecuada, a cada uno de los genes ZNF238; SAP30; C10orf137; UHRF1; SUZ12; HMGN4; RBBP4; ARID1B; PPP1CB; SLFN11; FLJ39378; ENDOGL1; RECQL; TRPC1; TRIO; DNAH6; GNL3L; SLC36A2; SRP9; RPE; LDOC1L; PUS7L; CCDC89; LOC644921; PLEKHG1; FAM111B; RPRD2 y ETAA16 que componen la firma genética.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a métodos útiles para pronosticar si un individuo diagnosticado con cáncer cervicouterino localmente avanzado, podría presentar una buena respuesta o una mala respuesta al tratamiento estándar. Los métodos se basan en la determinación del perfil de expresión genética de una firma que comprende los genes ZNF238; SAP30; C10orf137; UHRF1; SUZ12; HMGN4; RBBP4; ARID1B; PPP1CB; SLFN11; FLJ39378; ENDOGL1; RECQL; TRPC1; TRIO; DNAH6; GNL3L; SLC36A2; SRP9; RPE; LDOC1L; PUS7L; CCDC89; LOC644921; PLEKHG1; FAM111B; RPRD2 y ETAA16 y su comparación con los perfiles de expresión tipo.



<input checked="" type="checkbox"/> Solicitud de Patente <input type="checkbox"/> Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad <input type="checkbox"/> Solicitud de Registro de Diseño Industrial, especifique cuál: <input type="checkbox"/> Modelo Industrial <input type="checkbox"/> Dibujo Industrial	Uso exclusivo Delegaciones y Subdelegaciones de la Secretaría de Economía y Oficinas Regionales del IMPI Sello Folio de entrada Fecha y hora de recepción	INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL Dirección Divisional de Patentes Solicitud Expediente: MX/a/2014/015826 Fecha: 18/DIC/2014 Hora: 13:38:49 Folio: MX/E/2014/091798 88325
---	--	--

Antes de llenar la forma lea las consideraciones generales al reverso

I DATOS DEL (DE LOS) SOLICITANTE(S)	
El solicitante es el inventor <input type="checkbox"/>	El solicitante es el causahabiente <input checked="" type="checkbox"/>
1) Nombre (s): INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA	
2) Nacionalidad (es): MEXICANA	
3) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: Avenida San Fernando No. 22 Colonia Sección XVI, Delegación Tlalpan, México, D.F. C.P. 14080 Población, Estado y País: Distrito Federal, México	
4) Teléfono (clave): 56280411	5) Fax (clave):

II DATOS DEL (DE LOS) INVENTOR(ES)	
6) Nombre (s): Carlos Pérez Plasencia, Jaime Coronel Martínez, Federico Lasa Gonsebat, David Cantú De León y Jorge Fernández Retana	
7) Nacionalidad (es): Todos de nacionalidad Mexicana	
8) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: Retorno Pergoleros No. 176 Edificio C6 Depto. 503, U. Hab. ISSSFAM, Tlalpan, CP 14620; Avenida coyocacán 1120, int 6, Colonia del Valle, Benito Juárez, CP 03100; Avenida cúpulas No. 52, Jardines del Sur, Xochimilco CP 16050; Calzada México-Xochimilco No. 75 Ed. B-101, Col. San Lorenzo Huipulco, Tlalpan CP14370 y Boulevard Coacalco No. 618, Col. Villa de las Flores, Coacalco CP 55710. Población, Estado y País: Distrito Federal, México y Estado de México, México	
9) Teléfono (clave): 56280411	10) Fax (clave):

III DATOS DEL (DE LOS) APODERADO(S)	
11) Nombre (s): Victor Ramón Morales Peña	12) R G P:
13) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: Avenida San Fernando No. 22 Colonia Sección XVI Delegación Tlalpan, México, D.F. C.P. 14080 Población, Estado y País: Distrito Federal, México	
14) Teléfono (clave): 56280411	15) Fax (clave):
16) Personas Autorizadas para oír y recibir notificaciones:	

17) Denominación o Título de la Invención:
MÉTODO PRONÓSTICO DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO ESTÁNDAR EN CÁNCER CERVICOUTERINO LOCALMENTE AVANZADO

18) Fecha de divulgación previa Día Mes Año	19) Clasificación Internacional uso exclusivo del IMPI
--	---

20) Divisional de la solicitud Número	21) Fecha de presentación Día Mes Año
--	--

22) Prioridad Reclamada: País	Día Mes Año	No. de serie
-------------------------------	-------------	--------------

Lista de verificación (uso interno)	
No. Hojas	No. Hojas
<input checked="" type="checkbox"/> 1 Comprobante de pago de la tarifa	<input checked="" type="checkbox"/> 5 Documento de cesión de derechos
<input checked="" type="checkbox"/> 56 Descripción y reivindicación (es) de la invención	<input type="checkbox"/> -- Constancia de depósito de material biológico
<input checked="" type="checkbox"/> 5 Dibujo (s) en su caso	<input type="checkbox"/> -- Documento (s) comprobatorio(s) de divulgación previa
<input checked="" type="checkbox"/> 1 Resumen de la descripción de la invención	<input type="checkbox"/> -- Documento (s) de prioridad
<input checked="" type="checkbox"/> 9 Documento que acredita la personalidad del apoderado	<input type="checkbox"/> -- Traducción
	77 TOTAL DE HOJAS

Observaciones:
 Se anexa escrito por el que se solicita el 50% de descuento de la tarifa establecida en el artículo 1a del Acuerdo por el que se da a conocer la tarifa por los servicios que presta el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial
 Bajo protesta de decir verdad, manifiesto que los datos asentados en esta solicitud son ciertos.

Victor Ramón Morales Peña
 Nombre y firma del solicitante o su apoderado

México, Distrito Federal
 17 de diciembre de 2014
 Lugar y fecha

"2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón"

Abril 01, 2015.

Dr. Carlos Guadalupe Pérez Plasencia
Subdirección de Investigación Básica.

S.A.J.286/2015.

En relación al proceso de registro de la patente de la invención denominada "METODO PRONÓSTICO DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO ESTÁNDAR EN CÁNCER CERVICOUTERINO LOCALMENTE AVANZADO", de su autoría intelectual, entre otros; informo a Usted, que el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, notificó, que tuvo por satisfecho el examen de forma señalado por la Ley de la Propiedad Industrial y su Reglamento.

También informo que a petición escrita del solicitante, la solicitud de patente podrá ser publicada de manera anticipada, siempre y cuando la solicitud haya aprobado el examen de forma y el solicitante entere la Instituto el pago de la tarifa correspondiente.

Una vez, publicada la solicitud, cualquier persona podrá dentro de un plazo de 6 meses, presentar ante el IMPI, la información concerniente a los requisitos de patentabilidad y sus excepciones, por lo que el IMPI, dará inicio al examen de fondo, hasta haber transcurrido los plazos especificados.

Atentamente



M. en D. Víctor Ramón Morales Peña.
Subdirector de Asuntos Jurídicos.

C.c.p. DR. ANELMO ABELARDO MENESES GARCÍA/DIRECTOR GENERAL
DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO/DIRECTOR DE INVESTIGACIÓN.

Capítulo 3

Gene signature Degradome: An efficient strategy to predict the distal metastasis in cervical cancer patients.

Segundo artículo original (en revision para publicación)

Gene signature Degradome: An efficient strategy to predict distal metastasis in cervical cancer patients.

Running Head: Locally advanced cervical cancer (LACC) degradome profile for metastasis

Authors: Fernandez-Retana Jorge^{1,2}; Zamudio-Meza Horacio²; Lasa-Gonsebatt Federico^{2,6}; Cantú De León David³; Jacobo-Herrera Nadia⁴; Perez-Montiel Delia⁵; Luis A. Herrera³, Pérez-Plasencia Carlos^{1,7}

Authors' affiliations:

¹Laboratorio de Genómica, UBIMED, Facultad de estudios superiores Iztacala, UNAM. Tlalnepantla, México.

²Laboratorio de Oncogenómica, Instituto Nacional de Cancerología, Tlalpan, México D.F.

³Unidad de Investigaciones Biomédicas en Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Tlalpan, México.

⁴Unidad de Bioquímica, Instituto Nacional de Nutrición (INCMNSZ), Tlalpan, México D.F.

⁵Departamento de Anatomía Patológica, Instituto Nacional de Cancerología, Tlalpan, México D.F.

⁶Unidad de Epidemiología, Instituto Nacional de Cancerología, Tlalpan, México D.F.

⁷Laboratorio de Genómica UNAM/INCan, México.

Keywords: Degradome, Cervical cancer, Metastasis, Inhibitor proteases.

Corresponding author

Name: Carlos Perez-Plasencia, PhD

Address: Av. San Fernando No 22, Col. Sección XVI México, D.F., zip code 14080 Telephone: 52(55) 56280400, Ext. 33025

Fax:

e-mail address: carlos.pplas@gmail.com

Acknowledgments:

FRJ was recipient of COMECyT scholarship 12BCD0054-I. This work was partially supported by CONACyT (SALUD-2010-01-141907) and INCAN basic research funds. This manuscript was submitted in partial fulfillments author requirements for PhD degree for FRJ at Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México (U.N.A.M.), México. Acknowledgments to MD. García-Arriaga Alejandro Ariel by grammatical edition support.

Disclaimer

The authors declare that they have no competing interests.

ABSTRACT:

Cervical cancer is a major cause of death in women worldwide; that mainly affects developing countries. Overall survival prognosis for patients with chemo- and radiotherapy treatment is approximately 50%. The patients that suffer recurrence and/or progression disease have a higher risk of developing distal metastases. Proteases comprising the degradome given its ability to promote cell growth, migration and invasion of tissues play an important role during tumor development and progression. In the present study, we used high-density microarrays system and qRT-PCR to evaluate the degradome profile and their inhibitors in 112 samples of patients diagnosed with locally advanced cervical cancer. Clinical follow-up was done during a period of three years; we included six samples of normal cervical tissues as controls. In our results found 33 degradome genes sub-expressed in tumor samples. In contrast, we observed an over-expression of isoforms of the catalytic subunit beta 1-9 of the proteasome (PSMB1-9), these belong to the family of threonine proteases. Interestingly, using a correlation analysis between the response to treatment and the development of metastasis, we established a molecular signature comprising 10 genes (*FAM111B*, *FAM111A*, *CFB*, *PSMB9*, *CASP7*, *BRCC3*, *PRSS16*, *CD74*, *PSMB8* and *CASP10*) with capacity to classify patients at risk of distal metastases or not by Kaplan Meier analysis. Eight genes of this signature, were used to test their ability to classify patients with metastases (MD) or complete response (CR) in a group of 27 patients by real-time PCR. In conclusion, the results of sub-expressed genes suggest that they have a function as tumor suppressors, as well as for over-expressed genes we propose a important function during cervical carcinogenesis. Finally, the results show that the molecular signature obtained from degradome genes can predict the risk of metastasis in patients before starting treatment.

Introduction

Cervical Cancer (CC) is the second most common cancer in women worldwide with an estimated of 275,000 deaths in 2008; almost 88% of affected women are diagnosed in developing countries (Jemal et al., 2011). CC is detected by simple cytological screening methods such as “Pap smear”, which are successfully employed in developed countries. However in less developed regions, most patients are diagnosed in locally advanced stages associated with the presence of large tumors whose mortality/incidence ratio is about 50% (Green et al., 2001; Jemal et al., 2011). The standard or conventional treatment for patients with locally advanced cervical tumors classified as IB2-IVA is based on radiotherapy in combination with Cisplatin chemotherapy (40 mg/m²), followed by brachytherapy (Waggoner, 2003; National Comprehensive Cancer Network, 2009); despite conventional treatment, approximately 50 % of patients develop distal recurrence that is a clinical manifestation of metastatic disease.

The conventional treatment in LACC offers clinical benefits by controlling pelvic tumor growth, however these benefits are controversial, since different studies have revealed that it has not extended significantly the overall survival in at least 40% of patients (Kirwan et al., 2003; Pearcey et al., 2002). It has also been shown that more than 35% of patients can develop a distal recurrence after conventional treatment (Chemoradiotherapy for Cervical Cancer Meta-Analysis Collaboration, 2008). The most common organs affected by distal metastatic growth in CC are liver, lungs, paraaortic lymph nodes and bones (Webb and Symmonds, 1980). Therefore it is imperative the discovery and validation of molecular biomarkers which may be used for an early detection of distal recurrence which is

considered as a therapy failure- allowing physicians to provide individual alternative treatments as soon as possible. The advent of high-throughput technologies enables us to define tumors as a function of gene expression profiles and use this information to improve identification of patients that would benefit with the conventional treatment and those that develop distal recurrence.

In spite of clinical significance of metastasis in cancer patients, the molecular processes involved in migration and invasion of cancer cells are poor understood; however it is clear that a crucial mechanism is activated by metastatic cancer cells, producing degradation of extracellular matrix (ECM) (Egeblad and Werb, 2002; Kessenbrock et al., 2010). Many groups have focused on showing the participation of multiple ECM proteases and their inhibitors as regulators and mediators of metastatic behavior in cervical cancer tumors and the derived cell lines (Brummer et al., 2002; Maity et al., 2011; Cardeal et al., 2012; Roomi et al., 2012). We reasoned that degradome associated genes have an important role in cancer metastasis and cellular migration process in LACC patients.

The human degradome encompasses the total genes that encode proteases (also recognized as peptidases and proteases) and their endogenous inhibitors, known as proteases inhibitors (López-Otín and Bond, 2008; López-Otín and Overall, 2002; Overall and López-Otín, 2002); the biological and physiological meaning of the degradome is clear in several key processes such as embryonic development, cellular differentiation, proliferation, apoptosis, migration, angiogenesis and malignant invasion (López-Otín and Bond, 2008; Turk et al., 2012). At present, several studies have analyzed the expression of specific proteases and their inhibitors in the context of clinical information in CC patients,

particularly it has been shown in different studies that MMP-2 and -9 are overexpressed in CC specimens, in contrast to normal counterparts (Sheu et al., 2003; Nasr et al., 2005; Rauvala et al., 2006; Ghosh et al., 2014). However, the degradome-related genes have not been analyzed yet by a global and systematic approach in CC and their association to clinical response.

In this article we aimed to evaluate expression levels of the entire Protease family consisting of cysteine, aspartyl, threonine, metallo and serine proteases and their inhibitors in a cohort of 112 patients diagnosed as LACC by means of genome-wide high-density microarrays. We found that 562 genes were aberrantly expressed in tumor tissues (373 genes were overexpressed and 189 down regulated in tumors respect to normal tissues). Interestingly, all members of threonine proteases were consistently overexpressed in tumor tissue. After conventional treatment, patients were followed up by Computerized Axial Tomography Scan (CT) and then assigned as complete responders (CR) or metastatic disease patients (MD) who developed new target lesions on distal organs; according to RECIST 1.1 criteria. Our findings revealed 10 degradome-related genes with the ability to predict distal metastasis in patients with locally advanced cervical cancer.

Materials and methods

Patients

Patients diagnosed with Locally Advanced Cervical Cancer (LACC) were enrolled after accepting and signing an informed consent; institutional ethics and scientific committees approved the protocol. Hence, a total of 112 patients were prospectively enrolled in

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA- National Cancer Institute- of Mexico (INCan) tumor-banking protocol at the time of diagnosis (April 2010 through August 2012). Immediately after punch biopsy, tumor samples were split into three pieces, one for pathological confirmation of at least 80% of tumor cells, and the remaining two for RNA and DNA isolation. It is very important for this kind of protocols to confirm that the molecular studies are obtained from tumor cells. RNA and DNA biopsies were frozen in liquid nitrogen until nucleic acid extraction. Patient eligibility criteria were: a) confirmed pathologic diagnosis of cervical cancer staged IIB and IIIB (LACC); b) biopsies with Pathology report with more than 80% of tumors cells; c) age older than 20 and younger than 70 years; d) high quality DNA and RNA samples; e) no other comorbidity; f) no previous oncological treatment; and finally g) patients able to receive the standard or conventional therapy based on concurrent chemo and radio-therapy. Chemotherapy was based on weekly CDDP [cis-diamminedichloroplatinum (II)] at $40\text{mg}/\text{m}^2$ during five-six cycles. Radiotherapy consisted in external radiation and intracavitary brachytherapy, for a total dose of 64-66 Gy over 67 days (National Comprehensive Cancer Network, 2009). Hence, all patients received the same conventional treatment. Clinical characteristics of patients are summarized in Table 1. Healthy cervical tissues were obtained from patients who had undergone hysterectomy by uterine myomatosis. Inclusion criteria were: a) no previous cervical surgery (such as the loop electrosurgical excision procedure or cone biopsy); b) no HPV infection; c) no hormonal treatment, and d) at last three previous negative Pap smears.

Clinical Definitions

Staging was assessed according to the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) classification (Hirschowitz et al., 2013) . Clinical response was evaluated by RECIST 1.1 criteria and computed axial tomography (CT scan); and were assigned as Complete Response (CR), defined as the disappearance of all signs of cancer in response to treatment and Metastatic Disease (MD) the appearance of one or more new lesions after treatment is considered as Metastatic Disease. New lesion identified on a follow-up study in an anatomical location that was not scanned at baseline is considered a new lesion and will indicate Metastatic Disease (Eisenhauer et al., 2009).

HPV genotyping

DNA was obtained from cervical tumor biopsies by means of MagNAPure Compact Instrument following manufacturer recommendations (Roche Diagnostics GmbH Roche Applied Science Mannheim, Germany). HPV genotyping was assessed by two approaches, Linear Array HPV Genotyping (Roche Diagnostics GmbH, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim Germany), and Nested Multiplex Polymerase Chain Reaction (NMPCR MY/GP primers) with subsequent PCR-fragment direct sequencing (Sotlar et al., 2004)

RNA Purification and Microarray Hybridization

Eighty-five samples were obtained at the time of diagnoses and were used to discover a gene degradome-related expression profile. We compared gene expression signatures of patients with complete response (CR) with gene expression signatures of patients

diagnosed as Metastatic Disease (MD). Quality of RNA was assessed by means of 18S:28S ratio. Hybridization targets were prepared from 250 ng of total RNA and amplified with whole transcriptome amplification kit 2 (Sigma Aldrich, St Louis, MO). Four micrograms of amplified and Cy3 labeled cDNA were used to hybridize into high-density microarrays containing 45,000 features according to recommended protocol of Nimblegen (Nimblegen Roche, Mannheim, Germany). After standard washes, the arrays were scanned on the Nimblegen MS200 microarray scanner. Digitalized images were stored for further analyses. The microarray raw data of this study is public available at GEO database (Gene Expression Omnibus, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) with the accession number GSE56303.

Microarray Preprocessing and Statistical Analysis

Digitalized images were gridded by using the NimbleScan v2.6 Software (Nimblegen Roche, Mannheim, Germany). Then, Robust Multi-Array Analysis background normalization and quantile normalization were performed for intra- and inter-array normalization, respectively. Genes with signal intensities above 95% of random threshold were filtered (Simon and Biot, 2010). Differential expression between normal and tumor tissues and between clinical outcomes was assessed by ANOVA tests and significance statistics for each gene were obtained by Genesis 2.1 software (Sturn et al., 2002). Graphics were generated by using the same software.

Expression of degradome-related genes

To evaluate the expression levels of 584 degradome associated-genes (from which we analyzed 562 genes) and 117 protease inhibitors (679 analyzed genes represented in the degradome database <http://degradome.uniovi.es/dindex.html>), we search for their expression levels in our microarray data set.

Assessment of Protein expression on tissue microarray

Genes that significantly altered their expression level between normal and tumor tissues were evaluated by means of protein expression; we made the analysis based on Human Protein Atlas database (HPA), which is a public available database containing images that show the spatial distribution of proteins in tissue microarrays by immunohistochemical staining (IHC) (Uhlen et al., 2010). The generated tissue microarrays included samples from 46 different normal tissue types from 138 individuals and 20 different types of cancer from 216 patients (<http://www.proteinatlas.org/>). Hence, selected genes were searched for their protein expression on cervical tissue microarray samples. We examined the expression levels of PSMB2, CAST, CTSB, USP50 and CST9 proteins on HPA database. The selected antibodies reported on [http:// www.proteinatlas.org/](http://www.proteinatlas.org/) were HPA026324 for PSMB2, CAB009491 for CAST, CAB000457 for CTSB, HPA039470 for USP50, and HPA029190 for CST9. Protein expression analyzed on cervical tissue samples (normal cervical epithelia and cervical cancer tissues) was reported according to the intensity of immune staining (negative, weak, moderate and strong); moreover, subcellular localization (nuclear and/or cytoplasmic/membranous) was indicated.

Disease free Survival Analysis.

Disease Free Survival (DFS) of the resulting patient groups was evaluated using the Kaplan-Meier analysis, and the statistical significance of survival differences was determined with log-rank test (Mantel-Cox) test.

Validation of Gene Expression Profile by qRT-PCR.

We searched for the most representative genes of patients with complete response that could differentiate into metastatic tumors; to achieve this objective, we employed the remaining 27 samples to validate the gene expression profile identified in the discovered tumor set. Eight differentially expressed genes (*FAM111B*, *FAM111A*, *CFB*, *PSMB9*, *CASP7*, *PRSS16*, *CD74* and *PSMB8*) were subjected to quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR). Each primer set was designed by an experimentally verified computer algorithm and then tested in a quality control assay to guarantee that they yield a single band of the predicted size by agarose gel electrophoresis. The sequence of primers and PCR conditions are shown in supplemental table S1. Reverse transcriptase reactions were performed according to the MMLV protocol from Promega (Madison WI, USA) following vendor recommendations. Real time PCR was performed using FastStart SYBR Green master. In Light Cycler 480 instrument II (Roche, Mannheim, Germany) according to manufacturer's protocol. Duplicate RT samples were used in each assay and data were normalized with β -actin "housekeeping gene". The comparative Ct method ($\Delta\Delta Ct$) was used to quantify gene expression, and relative quantification was calculated as $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Results

Clinical Characteristics of cervical cancer patients

We recruited a total of 112 patients from (INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA- National Cancer Institute- of Mexico (INCan) between April 2010 and August 2012. The range of age of the recruited patients varied between 29 and 69 years with a median of 48 years. The majority of patients were classified according to FIGO as IIB (63.3%) and IIIB (22.3%) stages. The histological type found was mostly squamous cell carcinomas with 101 patients (90.1%); while 11 patients were adenocarcinoma (9.8%). As expected, the major HPV types found were type-16 (46 patients), 18 (22 patients), 45 (13 patients) and others not relevant for this paper. The median clinical follow-up was 36 months. Eighty of the patients (71.48%) were diagnosed as complete responders during the whole follow-up. Thirty-two patients (28.5%) were diagnosed with new target lesions (MD); the main organs with distal metastases were lungs, and retroperitoneum with 29.4% for each one, followed by liver, and regional lymph with 8.8 % for each one. The clinical-pathological characteristics are shown in Table 1.

Expression of Degradome-related genes clearly discriminate cervical cancer tissues from their normal counterparts.

The crucial mechanism that has to be activated by metastatic cancer cells is the degradation of extracellular matrix by the action of a group of proteases that are known as

degradome. To obtain a comprehensive picture of degradome-related genes between normal and tumor tissues derived from CCLA biopsies, we evaluated the expression levels of the degradome-associated genes and their inhibitors (Quesada et al., 2009). Our database contains information of 562 proteases grouped into five families (Aspartyl, Cysteine, Serine, Threonine and Metallo-proteases) and 117 inhibitors (Figure 1A). The analysis of the degradome-related gene expression levels in 85 tumors and six normal samples shows two groups of genes differentially expressed clearly defined between tumor tissues and their normal counterparts, which can be observed in Figure 1B.

By means of unsupervised clustering, we found that 189 genes belonging the human degradome are consistently expressed in normal tissues, while 373 genes are underexpressed. Genes that consistently affected their expression between normal and tumor samples included 18 Aspartyl proteases (from 23 genes), e.g. cathepsin D (CTSD); 122 metalloproteases (from 190), e.g. metalloprotease 2 and 9; 118 serine proteases (from 182), e.g. tripeptidyl peptidase II (TPP2); 12 threonine proteases (from 15), e.g. proteasome subunit alpha, and finally 103 cystein proteases (from 152), e.g. caspases 1, 3 and 8. Respecting to inhibitor proteases, 85 genes out of 117, belonging to metalloproteinase (TIMPs 1,2,3 and 4) showed altered expression levels between normal and tumor tissues.

Interestingly, among the genes whose expression was altered, we found that all proteasome catalytic-subunit beta type 1-9 isoforms (*PSMB1-9*) belonging to threonine proteases genes were overexpressed in tumor tissues in comparison to normal samples. Together, these results showed that degradome-related gene expression pattern could clearly distinguish tumor samples from their normal counterparts (Figure 2).

Following a significant one-way analysis of variance ANOVA ($p < 0.01$; Log₂ fold change > 2), we found that 183 genes showed noteworthy differences between normal and tumor samples, 47 genes were underexpressed in tumor tissue, while 136 were overexpressed (Supplementary Table 2). The finding of several proteases acting as Tumor suppressors such as Cystein Proteases USP33, that was reported as cancer suppressor in colorectal cancer cells (Huang et al., 2014) or the serine proteases ST14 in colon carcinogenesis (Kosa et al., 2012), allows us to suggest the possibility that the overexpressed proteases of tumor samples of cervical cancer could also have tumor-suppressing properties (Supplementary Table 2).

For further confirmation of gene expression levels obtained by microarray experiments, we performed an immunohistochemical analysis of normal and tumor cervical sections to evaluate the expression of the top five differential expressed genes (Table 2). Therefore, we accessed the Human Protein Atlas database (<http://www.proteinatlas.org/>), which has information on protein expression. Thus, in agreement to microarray analysis positive immunostaining in tumor specimens was observed as follows: PSMB2 (22 positive out of 24 analyzed tissues), CAST (18/22) and CTSB (20/20). On the other hand, the protein expression levels of USP50 (0 out of 22 tumor samples analyzed) and CST9 (6 out of 24) are low compared to non-tumor tissue (Figure 3). Protein expression showed a predominant cytoplasmic/membranous presence mainly on CC epithelial cells.

Degradome-related genes are associated to CCLA metastasis

Proteases play a crucial role in the onset and spreading of cancer, mainly in the steps leading to the progression from cellular transformation to tumor invasion and metastasis. Therefore, it has been postulated a "dependency to proteases" by tumor cells (Fraile et al., 2012). This increases the probability of finding early biomarkers of metastasis by measuring the expression levels of genes encoding proteases and their inhibitors. In CCLA, majority of patients who look for medical care, usually suffer already of metastases in distant tissues and nowadays there is no reliable method for predicting metastases early.

Interestingly, in order to test the hypothesis that degradome-related genes are associated with Cervical Cancer metastases, we correlate clinical data to gene expression profiles that were obtained at time of diagnosis before patients undergo the conventional treatment. Thus, the expression levels of degradome-related genes were employed to discriminate patients with metastasis or distal recurrence (MD) and patients who had complete response (CR) to treatment (36 months median follow-up). After ANOVA test we obtained ten degradome-related genes (*FAM111B*, *FAM111A*, *CFB*, *PSMB9*, *CASP7*, *BRCC3*, *PRSS16*, *CD74*, *PSMB8* and *CASP10*; $p < 0.0$). Given their characteristics and significant values obtained in the ANOVA test, these data were used to conform a genomic signature associated to metastasis and propose it to be used as a set of molecular biomarkers for early diagnosis, and thereby classify patients at risk for metastasis or complete response. Figure 4, shows hierarchical clustering of expression profiles of each one of the patients and the molecular signature associated with metastasis (Euclidean distance, and the

method of grouping complete linkage clustering). In this clustering we also included the expression of normal samples, however, for the ANOVA test, they were not taken into account. In the image, we can see that patients with good response who overexpressed the 10 genes in an interesting way, patients who presented metastasis have low expression levels similar to the expression levels of normal samples, for this reason these genes are part of what we called the molecular signature of the degradome. Interestingly, the expression levels between normal samples and patients with metastasis are very similar, these data suggest that small changes in the expression levels of these genes result in establishing a complete response to treatment or developing metastasis, we then can say that our molecular signature is sufficiently sensitive to detect these changes.

Metastasis-free survival analysis.

Significantly, during the validation of a molecular signature it should prove their predictive efficiency by an analysis of disease-free survival, in this case we used our proposed molecular signature and this was assessed by Kaplan-Meier analysis (Figure 5). Consistently, data obtained showed that the poor prognosis group (positive score) is clearly separated from the good prognosis group (negative score) four months after treatment end. These results revealed the capacity of the 10 genes to classify patients into groups of good and poor prognosis. The survival curve was performed using the Log-rank test (Mantel-Cox), P value = 0.0002.

To validate these results in a group of patients, we performed an analysis by qRT-PCR of the following eight genes *FAM111B*, *FAM111A*, *CFB*, *PSMB9*, *CASP7*, *PRSS16*, *CD74* and

PSMB8 from the molecular signature reported in a group of 27 samples of patients with LACC subjected to conventional treatment (Table 1). In the figure 5, we show the scatter plots of $2e^{-\Delta\Delta CT}$ values obtained from CTs of each eight tested genes in the 27 samples. Each graph shows the expression levels of each gene in both groups (CR) and (MD). Our results are consistent with previous analysis tested in this work, showing a lower level of expression in MD group compared with CR group, indicating that the molecular signature genes have the ability to classified LACC patients with high risk of metastasis despite being subjected to conventional treatment. For all the above exposed, we propose the molecular signature of degradome as early biomarkers of metastasis.

Discussion

In developing countries nearly 88% of women are diagnosed with CC (Jemal et al., 2011) in locally advanced stages (LACC) associated to the presence of large tumors with a mortality/incidence ratio about 50% (Green et al., 2001; Jemal et al., 2011). The Conventional treatment for these patients is based on radiotherapy concomitant with chemotherapy based with Cisplatin, followed by brachytherapy (Waggoner, 2003). Despite conventional treatment, approximately 50% of patients will develop progression or recurrence, which is a clinical manifestation of metastatic disease.

A better understanding of the molecular mechanisms that promote metastasis in cervical cancer is a major challenge because the current knowledge about it is controversial and scarce (Yates and Campbell, 2012). According to Kashiwazaki and co-workers, multiple genes are involved during acquisition of invasiveness and tumor progression (Kashiwazaki

et al., 2008). Thus, genetic analysis with microarray systems is a better approach to understand these mechanisms. Added to this, proteases have a key role during different stages of carcinogenesis, mainly in tumor progression and metastasis. In this context, the degradome genes and associated inhibitors play a key role related with malignancy and metastases (López-Otín and Overall, 2002; Kessenbrock et al., 2010; Mason and Joyce, 2011). During the establishment of expression profiles by microarray systems it is very important to consider the number of the samples included to obtain reliable data about the process to be studied, in this sense, a recent investigation reported a gene expression signature associated to the treatment with Angiocidin and Darapladib in cervical cancer; this study included 126 samples obtained from four public available microarray studies (Koch and Wiese, 2013). Unlike these authors, in this study we included 112 samples of patients recruited and processed in the same place (INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA- National Cancer Institute- of Mexico, INCan). This is an important consideration, because this way, we had a better control over the clinical information and the processing of samples. The results obtained in this investigation demonstrate conclusively the data analysis made by high-resolution microarray system and their behavior respect to proteins that make up the degradome and their inhibitors in samples of patients diagnosed with Locally Advanced Cervical Cancer (LACC) and healthy cervical tissues (Figure 1). This technology has allowed us to evaluate many genes simultaneously to establish expression profiles and correlations between clinical phenotypes and genes expressions. As expected, many overexpressed genes found in tumor samples in this investigation, have been reported in cervical cancer. *CTSD* (Cathepsin D) is an example of

these genes; this is an Aspartyl protease reported in uterus, ovary and lung cancer. It has been observed a correlation between its cytosolic overexpression and a poor-prognosis in breast cancer. Also, it has been used as a breast cancer biomarker (Wolf et al., 2003). Interestingly, other overexpressed gene that we found is *CSTB*, which encodes to Cathepsin B, a protein belonging to the family of Cysteine proteases characterized as protease with high metastatic potential in brain, colon, prostate and thyroid tumors (Murnane et al., 1991). In these tumors, overexpression is associated to premalignant injuries, suggesting that this enzyme plays an important role during cellular transformation in early stages of malignancy (Hughes et al., 1998). In contrast, we found a decreased expression of these genes in health tissues, indicating their potential involvement during malignancy progression.

Regarding to MMP-2 and -9 metalloproteases, whose expression levels have been correlated to tumor progression; we found that are overexpressed in tumor tissues compared with normal tissues, as reported by Rauvala et al., 2006. These data suggest that these proteases are synthesized by tumor cells in LACC patients, there are as well other reports on head and neck squamous cell carcinoma using quantitative real-time reverse transcription-PCR analysis (Stokes et al., 2010).

We have observed that MMPs is another large family of proteases that presents significant changes in cervical cancer. Generally, in normal conditions these proteases are produced in moderate to low expression levels; however, during pathological conditions the expression profile change by extracellular matrix remodeling, inducing an increase in the expression levels of these enzymes.

We found that 122 MMPs are differentially expressed between normal and tumor cervical tissues. These data establish a correlation with data already reported, related to the association between increased of expression levels of MMPs and tumor progression and invasion processes (Stokes et al., 2010). Interestingly, we found a series of MMP genes down-regulated in tumor tissues, these genes are *XRCC6BP1*, *XPNPEP1*, *SNX3*, *UQCRC2*, *TFRC*, *STAMBP*, *RNPEPL1* y *SLC25A10* (Table 3). In contrast, we found that these genes are up-regulated in normal tissues, suggesting a possible role as tumor suppressors as described for other genes in colorectal carcinoma and cervical cancer (Fraile et al., 2013; Koch and Wiese, 2013). In dissimilarity with previous reports about the association between up-regulation of MMP-21 and cancer prognosis in gastric and colon cancer (Wu et al., 2013, 2011), we observed a down-regulation in tumor samples in comparison with normal tissues. For this reason, we could not establish a correlation between expression of this metalloprotease and the metastatic process in cervical cancer.

Although, overexpression of genes as *PSMB2* has been reported in ovarian and cervical cancer; significantly, in our results, we found widespread overexpression of genes belonging to the Threonine protease family called T01, whose expression profile changes radically in tumor tissue in comparison to healthy tissues, mainly genes such as *PSMB1 to 9*. These genes encode to proteins that are part of the proteasome, these group of proteins have an important role during the process of carcinogenesis and are very important for metastases development, suggesting that this structure plays a relevant role in tumor progression in patients diagnosed with Locally Advanced Cervical Cancer (LACC).

With the data obtained in this study, we established the profile of degradome in cervical

cancer, considering as well the healthy tissue samples. The purpose of this study is to use this profile to identify a differential expression of proteases with anti-tumor function associated to metastases and most important the establishment of a molecular signature called the degradome. The molecular signature of degradome established in this study is composed of 10 genes with statistically significant expression levels to differentiate two well-defined patient groups, one with complete response to treatment and two, patients with recurrence and metastases (Figure 4). Many authors have reported molecular signatures of genes associated to different cancer types, although these signatures provide an interesting insight in the research of biomarkers in cancer (Stokes et al., 2010; Huang et al., 2011; Fraile et al., 2013), including cervical cancer (Koch and Wiese, 2013; Peng et al., 2015), they are not efficient enough since the number of samples is statistically limited, and have been established based on data obtained after treatment, there is also a lack of statistical analysis to validate genes as predictors of metastases, these considerations were included in this study.

The clinical follow-up of each patient, together with the molecular data obtained in this study allow us to obtain a practical clinical application. In this regard, one of the major problems in the treatment of patients with LACC is the resistance to chemo- and radiotherapy, which results in the recurrence/progression of the disease. In addition, patients who are in this condition generally are subjected to alternative treatments, which deplete their quality of life that has already been compromised by disease evolution and/or the conventional treatment, all this reduces their chances of survival. In this work, we found a group of genes with ability to classify early patients with cervical cancer that could

metastasize despite conventional treatment (Figure 5). The molecular signature of degradome is composed of nine genes and one protease inhibitor. Our results allow us to propose this signature as a potent tool to classify patients with high and low risk of developing metastases and in this way select a more appropriate treatment.

Conclusions.

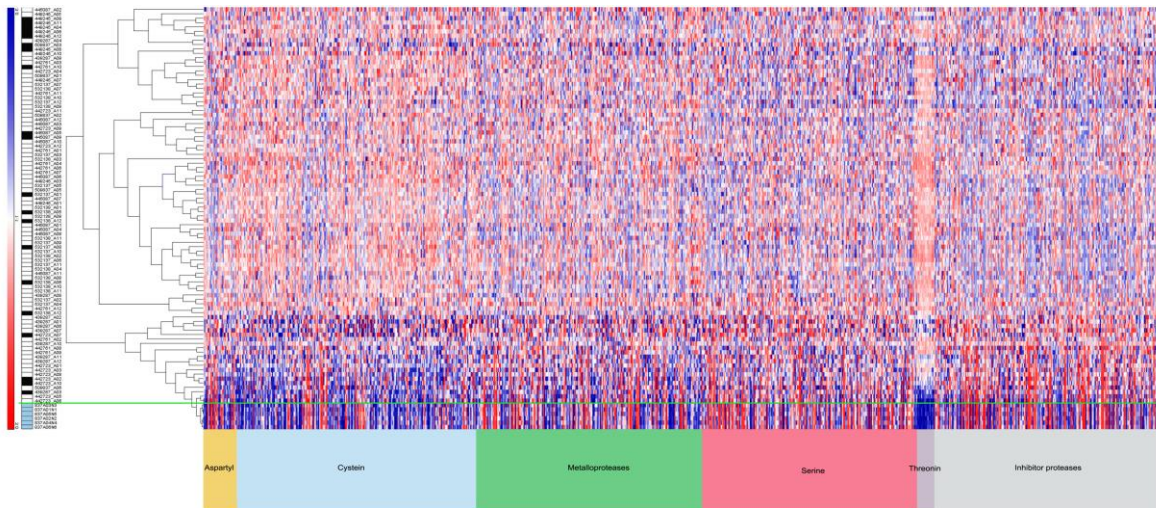
The degradome genes and their inhibitors suffer changes in expression level during carcinogenesis development which have remarkable effect on the tumor progression and to be closely related to the processes of degradation of ECM, addressing a major part of the invasion and migration. Our results reveal that there are significant differences between expression profiles of healthy cervical tissue and tumor biopsies of LACC, comprising since 64.2% metallo-proteases; 64.8% of serine-proteases; 67.7% of cysteine-proteases; 78.2 of Aspartyl-proteases and 80% Threonine-proteases. The threonine-proteases are over-expressed in convincing way LACC. The importance of this result is that part of the sub-unit of the catalytic core of the proteasome. Given the importance of this complex in LACC, this result makes it clear that over-expression of the threonine protease plays an important role in this disease.

Other remarkable result was proteases sub-expression profile in tumors relative to healthy tissues profiles, and that this behavior makes tumor suppressor candidates. Although these results need to be validated in further functionally studies. The most important

contribution in this paper was to establishment of the molecular signature derived from degradome genes and associated with clinical response to predict metastases early way. This work offerings a significantly large population to obtain reliable results. We report nine genes of degradoma, which could predict prematurely the risk of suffered metastases in patients with LACC.

Figure 1

A)



B)

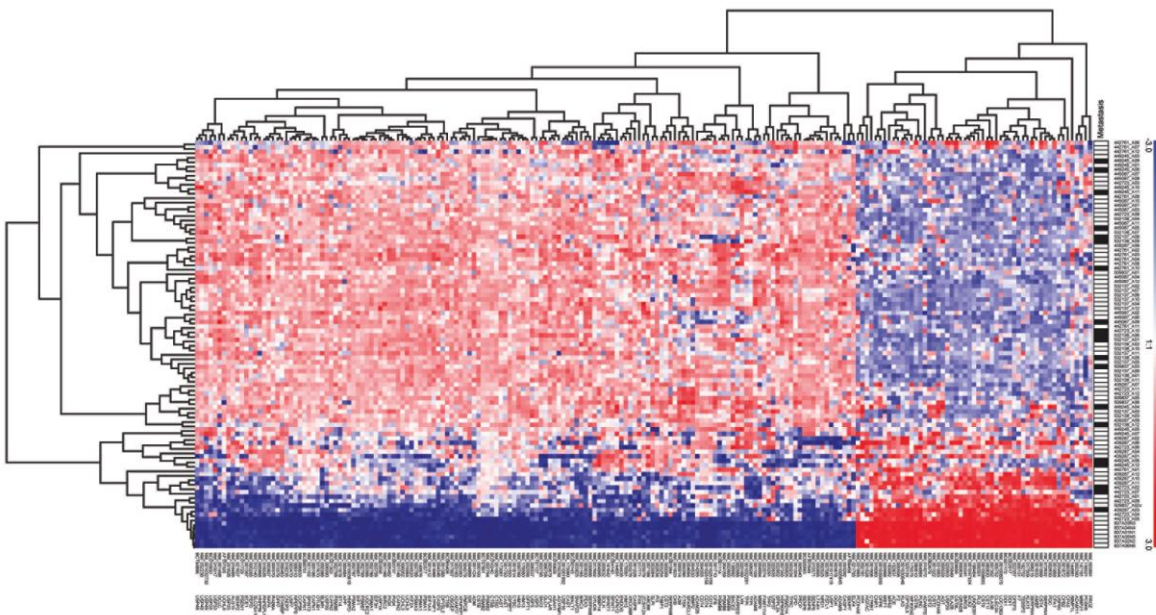


Figure 1. Global analysis of the expression profile in cervical degradome. A) The graph shows the global expression profile of the degradome and protease inhibitors through an unsupervised analysis of 679 genes. At the bottom of the image are shown the genes that codify for proteases according to the class they belong to and protease inhibitors. The left column shows the patients with a complete response (white boxes) and the patients with metastasis (black boxes), the normal cervical samples are indicated with the blue boxes. B) Supervised analysis of global expression profile of cervical degradome. 183 differentially expressed genes of the degradome and protease inhibitors are shown (Fold change >2 and p value >0.01) both between normal tissue and locally advanced cervical cancer tumors. Genes with greater expression are shown in red (see thermal map at right) underexpressed genes appear in blue.

Figure 2

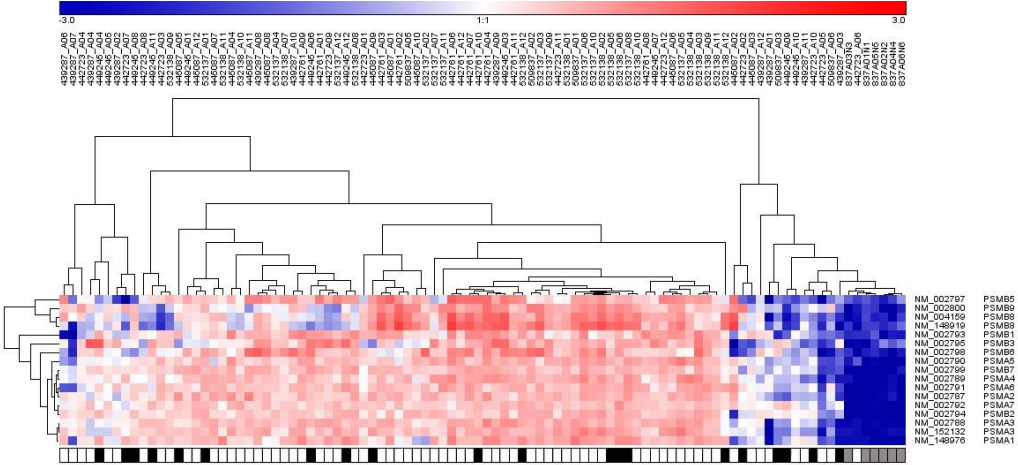


Figure 2. The hierarchical clustering of threonine proteases in both healthy and tumor cervical tissues. The graph shows the expression of 17 genes belonging to threonine proteases, which shows that expression in normal tissues (gray boxes) is lower compared to tumor tissues profiles (white and black boxes). Clinical response of patients to the conventional treatment is shown with the boxes at the bottom, white boxes, complete response (CR), black squares; patients with metastatic disease (MD). The expression levels is indicated in red for the overexpressed genes and in blue for underexpressed genes (see temperature scale at the top).

Figure 3

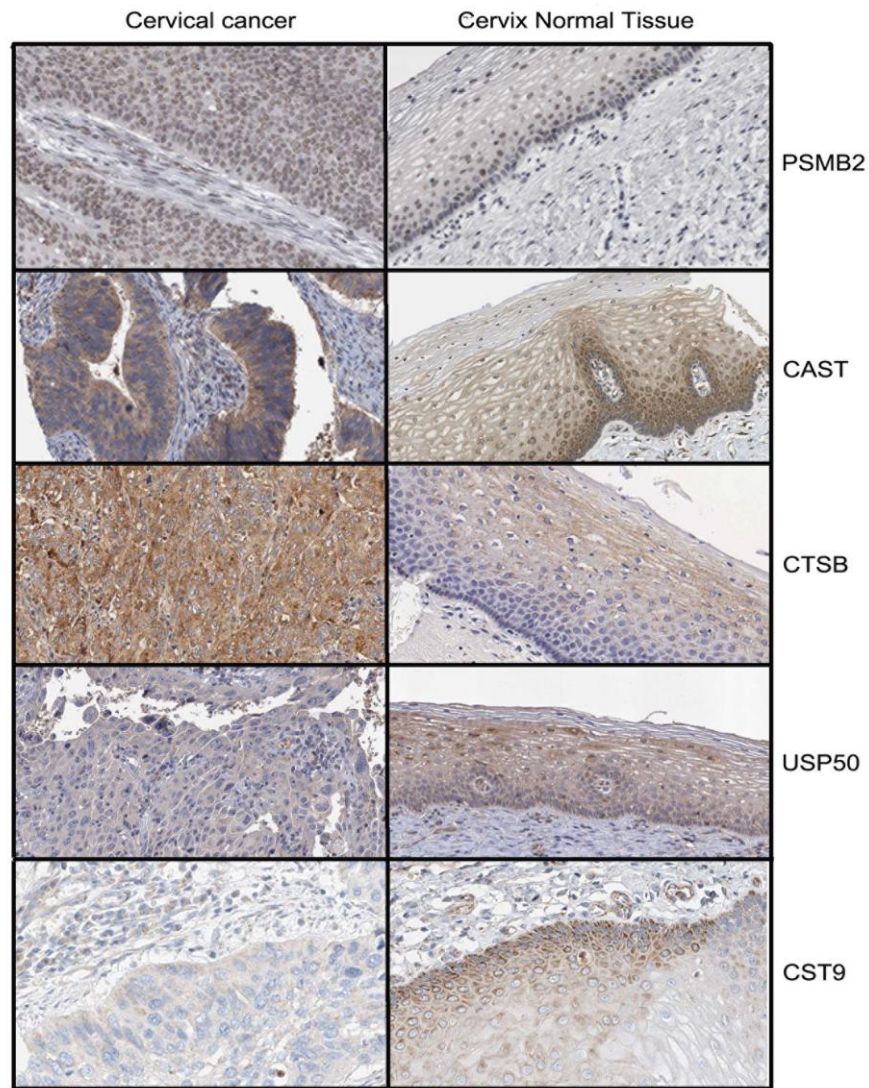


Figure 3. Validation of differentially expressed proteins between cervical cancer and normal cervical tissues by immunohistochemistry. The Immunodetection was observed in brown on the tissue surface. The image shows the overexpression of PSMB2, CAST and CTSD proteins in tumor tissue and underexpressed on normal cervical tissue, while for USP50 and CST9 proteins it is observed that they are underexpressed in tumors and overexpressed in normal tissue. These data are consistent with the differential expression of genes obtained by microarray analysis.

Figure 4

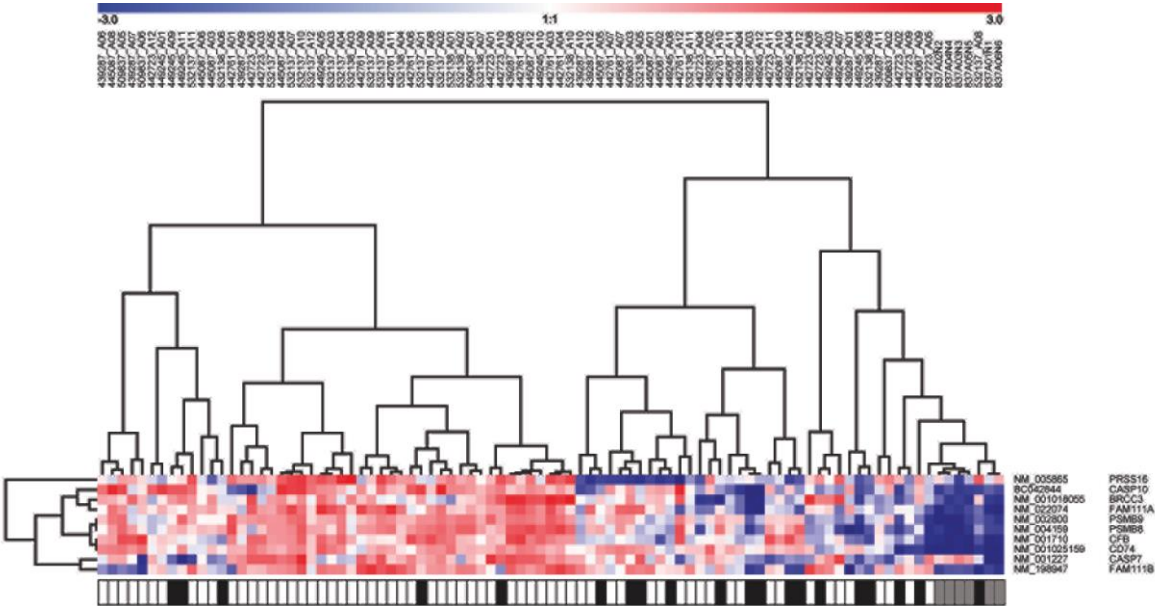


Figure 4. The Genes differentially expressed between patients with metastasis and complete response. The graph shows the grouping of the patients based on their clinical response. The analysis identified 10 genes differentially expressed of the degradome and protease inhibitors. The grouping shows that these genes are underexpressed in normal tissue and that apparently there is a transition that makes them to be overexpressed in tumors of locally advanced cervical cancer. The intermediate profiles are associated with metastasis. The overexpressed genes are indicated in red (see right thermal map) while underexpressed genes are shown in blue.

Figure 5

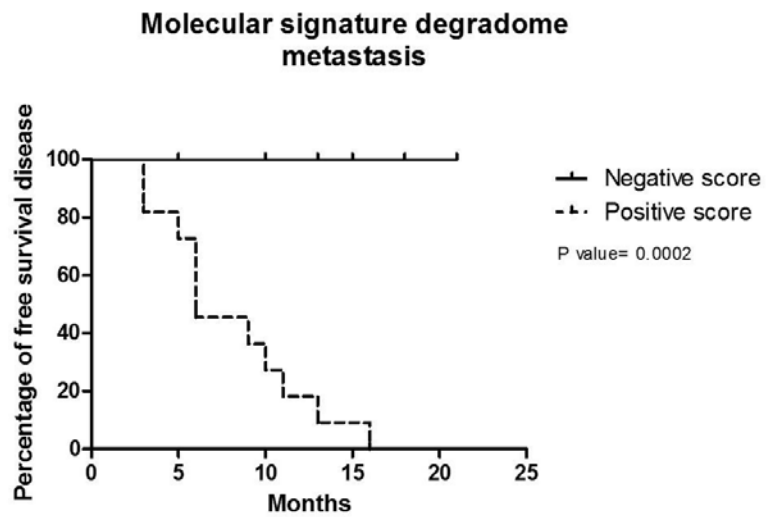


Figure 5. Disease-free survival analysis. The Graph of Kaplan Meyer analysis displays the data of metastasis-free survival and the correlation with the molecular signature predictive of metastasis (10 genes). Negative values are correlated with a good prognosis while a positive score with bad prognosis. The survival curve was calculated using the log-rank test (Mantel-Cox) test. *P* Value = 0.0002

Figure 6

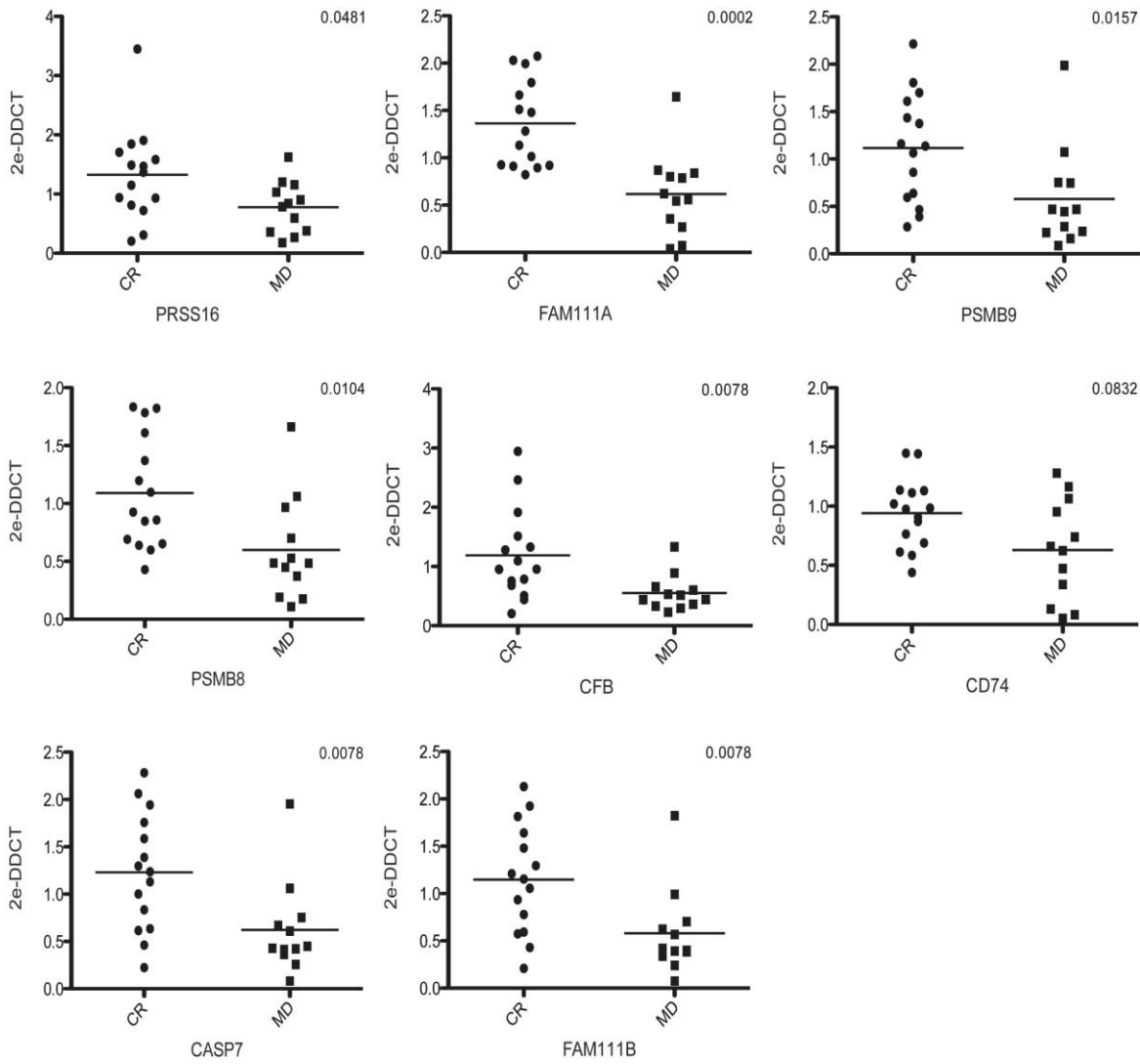


Figure 6. **Validation of the metastasis signature of LACC.** The Scatter plots illustrate the individual comparison of data from quantitative real-time-polymerase chain reaction (qRT-PCR) of 27 patients analysis and 8 genes selected out of 10 with a metastatic prognosis belonging to the degradome b. (2-DDCT values were plotted in the two sets of patients, complete response (C) and metastatic disease patients (MD). Horizontal bars show the median values. P Value for individual genes was calculated by Mann Whitney test.). The black square shows the patients diagnosed with distal metastasis.

Tables

Table 1. Clinical pathological status of patients (n=112)

Characteristics	Patients	
	N=	(%)
Age		
Median	48	
Range	29-69	
Histological type		
Squamous cell Carcinoma	101	90.1%
Adenocarcinoma	11	9.8%
Clinical stage (FIGO)		
IB2	12	10.7%
IIA	2	1.7%
IIB	71	63.3%
IIIA	2	1.7%
IIIB	25	22.3%
VPH genotypification (Frequency)*		
Type 16	46	
Type 18	22	
Type 33	3	
Type 45	13	
Others	24	
Not determinate	28	
Distal Metastasis**		
Lungs	10	29.4%
Kidneys	1	2.9%
Bones	1	2.9%
Liver	3	8.8%
Retroperitoneum	10	29.4%
Central nervous system	1	2.9%
Regional lymph nodes	3	8.8%
Paraaortic lymph nodes	1	2.9%
Bladder	2	5.8%
Vulva	1	2.9%
Pleural	1	2.9%
Treatment outcome***		
Complete response (CR)	80	71.4%
Metastatic disease (MD)	32	28.5%

*Frequency represent single and coinfection number

**Data represent all invaded organs

***All the patients received radiotherapy and cisplatin as coadjuvant (50Gys external radiation, 35 Gys Intracavitary braquitherapy and 6 cycles of 40 mg/m² CDDP)

Table2. The top ten differentially expressed genes between in tumor and normal cervical tissues.

Class protease	Unique ID	Gene Name	P value	Normal tissue expression	Cancer related
Threonine proteases	BC107901	PSMB2	0*	-3.5304444	Ovarian and Pancreatic cancer
Protease inhibitor	NM_004355	CD74	0	-3.2385461	Head and neck, Lung and Pancreatic cancer
Protease inhibitor	NM_001025158	CD74	0	-3.3279352	Head and neck, Lung and Pancreatic cancer
Cysteine proteases	BC010240	CTSB	0	-3.4768603	Endometrial, Melanoma, Breast and Colorectal cancer
Metalloproteases	NM_003756	EIF3H	0	-3.4129493	Breast, Colorectal, and Lung cancer
Cysteine proteases	BC016828	ASAH1	0	-2.8341002	Prostate and Pancreatic cancer
Cysteine proteases	NM_002056	GFPT1	0	-3.3372374	Pancreatic cancer
Threonine proteases	NM_002794	PSMB2	0	-3.3662217	Ovarian and Pancreatic cancer
Cysteine proteases	NM_017670	OTUB1	0	-3.2754836	Ovarian cancer
Metalloproteases	NM_005805	PSMD14	0	-2.6835728	Neuroblastoma
Aspartyl proteases	NM_001909	CTSD	0	-3.1947339	Breast cancer
Protease inhibitor	NM_173061	CAST	0	-3.2491024	Breast cancer
Cysteine proteases	NM_203494	USP50	1.25E-09	2.12928	No reporter
Protease inhibitor	BC062679	CST2	2.62E-10	2.25578	Bone metastasis
Cysteine proteases	NM_020903	USP29	8.82E-11	2.2994497	No reporter
Protease inhibitor	NM_175575	WFIKKN2	6.30E-09	2.092897	No reporter
Protease inhibitor	NM_033341	BIRC8	2.28E-11	2.3237448	Hepatic cancer
Serine proteases	NM_001030048	KLK3	1.53E-12	2.4789324	Prostate cancer.
Metalloproteases	NM_002390	ADAM11	2.62E-14	2.670062	Breast, Prostate cancer
Protease inhibitor	NM_001008693	CST9	3.62E-12	2.458716	No reporter
Protease inhibitor	NM_080610	CST9L	4.22E-15	2.7024367	Pancreatic cancer
Metalloproteases	NM_147191	MMP-21	1.18E-14	2.6113539	Gastric, colorectal and Pancreatic cancer

*0 represent P value $\leq E-17$.

Table3. Selection of the proteases proposed as tumor suppressors in LACC

Protease class	Unique ID	Gene Name	P value
Aspartyl Proteases	NM_032802	SPPL2A	7.97E-10
Cystein Proteases	NM_015017	USP33	1.48E-14
	NM_003470	USP7	2.62E-14
	BC107137	USP3	1.20E-13
	NM_025079	ZC3H12A	1.18E-14
	NM_203494	USP50	1.53E-12
	NM_006002	UCHL3	2.21E-11
	NM_032236	USP48	2.28E-11
	AF157320	UCHL5	5.88E-10
	NM_001017415	USP1	8.92E-10
	NM_006590	USP39	2.62E-10
	NM_001001992	USP16	7.43E-10
	BC028583	SENP6	4.24E-10
	AF199458	SENP7	4.46E-09
	BC015930	USP25	3.62E-09
	NM_020935	USP37	1.25E-09
	NM_005632	CAPN15	3.21E-08
	NM_003825	SNAP23	1.91E-08
	NM_020903	USP29	3.53E-08
NM_021627	SENP2	4.95E-08	
BC003556	USP14	2.29E-08	
Metalloproteases	NM_033276	XRCC6BP1	4.22E-15
	NM_020383	XPNPEP1	4.02E-12
	NM_003795	SNX3	3.77E-10
	NM_003366	UQCRC2	1.15E-09
	NM_003234	TFRC	2.57E-09
	NM_006463	STAMPB	4.63E-09
	NM_018226	RNPEPL1	3.13E-08
NM_012140	SLC25A10	3.59E-08	
Serine Proteases	NM_021978	ST14	3.97E-11
	NM_198464	UNQ9391	1.89E-10
	NM_003291	TPP2	1.48E-09
	NM_182702	TESSP2	1.00E-08

Table 4. Degradome markers associated to distal metastasis in LACC.

Protease class	Unique ID	Gene Name	<i>P</i> value	Metastasis (n=20)	Complete respond (n=61)
Serine Proteases	NM_198947	FAM111B	2.13E-04	-0.3698766	0.38607234
Serine Proteases	NM_022074	FAM111A	7.44E-04	-0.32289827	0.35814327
Serine Proteases	NM_001710	CFB	0.00128042	-0.23036823	0.33178642
Threonin Protease	NM_002800	PSMB9	0.00169618	-0.17461756	0.31378213
Cystein Proteases	NM_001227	CASP7	0.00247091	-0.33585915	0.27287108
Metalloproteases	NM_001018055	BRCC3	0.00493586	-0.37924066	0.29270148
Serine Proteases	NM_005865	PRSS16	0.00562596	-0.4479072	0.22495453
Inhibitor proteases	NM_001025159	CD74	0.00577284	-0.12062164	0.34139398
Threonin Protease	NM_004159	PSMB8	0.00586903	-0.23646922	0.30809698
Cystein Proteases	BC042844	CASP10	0.00649584	-0.4387596	0.23349372

References

- Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D., 2011. Global cancer statistics. *CA. Cancer J. Clin.* 61, 69–90. doi:10.3322/caac.20107
- Brummer, O., Böhmer, G., Hollwitz, B., Flemming, P., Petry, K.-U., Kühnle, H., 2002. MMP-1 and MMP-2 in the cervix uteri in different steps of malignant transformation--an immunohistochemical study. *Gynecol. Oncol.* 84, 222–227. doi:10.1006/gyno.2001.6413
- Cardeal, L.B. da S., Boccardo, E., Termini, L., Rabachini, T., Andreoli, M.A., di Loreto, C., Longatto Filho, A., Villa, L.L., Maria-Engler, S.S., 2012. HPV16 oncoproteins induce MMPs/RECK-TIMP-2 imbalance in primary keratinocytes: possible implications in cervical carcinogenesis. *PLoS One* 7, e33585. doi:10.1371/journal.pone.0033585
- Chemoradiotherapy for Cervical Cancer Meta-Analysis Collaboration, 2008. Reducing uncertainties about the effects of chemoradiotherapy for cervical cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 18 randomized trials. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 26, 5802–5812. doi:10.1200/JCO.2008.16.4368
- Egeblad, M., Werb, Z., 2002. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* 2, 161–174. doi:10.1038/nrc745
- Eisenhauer, E.A., Therasse, P., Bogaerts, J., Schwartz, L.H., Sargent, D., Ford, R., Dancey, J., Arbuck, S., Gwyther, S., Mooney, M., Rubinstein, L., Shankar, L., Dodd, L., Kaplan, R., Lacombe, D., Verweij, J., 2009. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 45, 228–247. doi:10.1016/j.ejca.2008.10.026
- Fraile, J.M., Ordóñez, G.R., Quirós, P.M., Astudillo, A., Galván, J.A., Colomer, D., López-Otín, C., Freije, J.M.P., Puente, X.S., 2013. Identification of novel tumor suppressor proteases by degradome profiling of colorectal carcinomas. *Oncotarget* 4, 1931–1932.
- Ghosh, A., Moirangthem, A., Dalui, R., Ghosh, T., Bandyopadhyay, A., Dasgupta, A., Banerjee, U., Jana, N., Basu, A., 2014. Expression of matrix metalloproteinase-2 and 9 in cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma among different age groups of premenopausal and postmenopausal women. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 140, 1585–1593. doi:10.1007/s00432-014-1695-2
- Green, J.A., Kirwan, J.M., Tierney, J.F., Symonds, P., Fresco, L., Collingwood, M., Williams, C.J., 2001. Survival and recurrence after concomitant chemotherapy and radiotherapy for cancer of the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 358, 781–786. doi:10.1016/S0140-6736(01)05965-7
- Hirschowitz, L., Nucci, M., Zaino, R.J., 2013. Problematic issues in the staging of endometrial, cervical and vulval carcinomas. *Histopathology* 62, 176–202. doi:10.1111/his.12058
- Huang, L., Zheng, M., Zhou, Q.-M., Zhang, M.-Y., Jia, W.-H., Yun, J.-P., Wang, H.-Y., 2011. Identification of a gene-expression signature for predicting lymph node metastasis in patients with early stage cervical carcinoma. *Cancer* 117, 3363–3373. doi:10.1002/cncr.25870
- Huang, Z., Wen, P., Kong, R., Cheng, H., Zhang, B., Quan, C., Bian, Z., Chen, M., Zhang, Z., Chen, X., Du, X., Liu, J., Zhu, L., Fushimi, K., Hua, D., Wu, J.Y., 2014. USP33 mediates Slit-Robo signaling in inhibiting colorectal cancer cell migration. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer.* doi:10.1002/ijc.29226
- Hughes, S.J., Glover, T.W., Zhu, X.X., Kuick, R., Thoraval, D., Orringer, M.B., Beer, D.G., Hanash, S., 1998. A novel amplicon at 8p22-23 results in overexpression of cathepsin B in esophageal adenocarcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 12410–12415.

- Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D., 2011. Global cancer statistics. *CA. Cancer J. Clin.* 61, 69–90. doi:10.3322/caac.20107
- Kashiwazaki, H., Hassan, N.M.M., Hamada, J., Moriuchi, T., Yamazaki, Y., Tei, K., Totsuka, Y., Inoue, N., 2008. Gene expression profile changes correlated with lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Odontology* 96, 38–43. doi:10.1007/s10266-008-0084-1
- Kessenbrock, K., Plaks, V., Werb, Z., 2010. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 141, 52–67. doi:10.1016/j.cell.2010.03.015
- Kirwan, J.M., Symonds, P., Green, J.A., Tierney, J., Collingwood, M., Williams, C.J., 2003. A systematic review of acute and late toxicity of concomitant chemoradiation for cervical cancer. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* 68, 217–226.
- Koch, M., Wiese, M., 2013. Gene expression signatures of angiocidin and darapladib treatment connect to therapy options in cervical cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 139, 259–267. doi:10.1007/s00432-012-1317-9
- Kosa, P., Szabo, R., Molinolo, A.A., Bugge, T.H., 2012. Suppression of Tumorigenicity-14, encoding matriptase, is a critical suppressor of colitis and colitis-associated colon carcinogenesis. *Oncogene* 31, 3679–3695. doi:10.1038/onc.2011.545
- López-Otín, C., Bond, J.S., 2008. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *J. Biol. Chem.* 283, 30433–30437. doi:10.1074/jbc.R800035200
- López-Otín, C., Overall, C.M., 2002. Protease degradomics: a new challenge for proteomics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 509–519. doi:10.1038/nrm858
- Maity, G., Sen, T., Chatterjee, A., 2011. Laminin induces matrix metalloproteinase-9 expression and activation in human cervical cancer cell line (SiHa). *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 137, 347–357. doi:10.1007/s00432-010-0892-x
- Mason, S.D., Joyce, J.A., 2011. Proteolytic networks in cancer. *Trends Cell Biol.* 21, 228–237. doi:10.1016/j.tcb.2010.12.002
- Murnane, M.J., Sheahan, K., Ozdemirli, M., Shuja, S., 1991. Stage-specific increases in cathepsin B messenger RNA content in human colorectal carcinoma. *Cancer Res.* 51, 1137–1142.
- Nasr, M., Ayyad, S.B., El-Lamie, I.K.I., Mikhail, M.Y., 2005. Expression of matrix metalloproteinase-2 in preinvasive and invasive carcinoma of the uterine cervix. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 26, 199–202.
- National Comprehensive Cancer Network, (NCCN), 2009a. Clinical Practice Guidelines in Oncology Cervical cancer. V.1.2009.
- Overall, C.M., López-Otín, C., 2002. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat. Rev. Cancer* 2, 657–672. doi:10.1038/nrc884
- Pearcey, R., Brundage, M., Drouin, P., Jeffrey, J., Johnston, D., Lukka, H., MacLean, G., Souhami, L., Stuart, G., Tu, D., 2002. Phase III trial comparing radical radiotherapy with and without cisplatin chemotherapy in patients with advanced squamous cell cancer of the cervix. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 20, 966–972.
- Peng, G., Dan, W., Jun, W., Junjun, Y., Tong, R., Baoli, Z., Yang, X., 2015. Transcriptome profiling of the cancer and adjacent nontumor tissues from cervical squamous cell carcinoma patients by RNA sequencing. *Tumor Biol.* 36, 3309–3317. doi:10.1007/s13277-014-2963-0
- Quesada, V., Ordóñez, G.R., Sánchez, L.M., Puente, X.S., López-Otín, C., 2009. The Degradome database: mammalian proteases and diseases of proteolysis. *Nucleic Acids Res.* 37, D239–243. doi:10.1093/nar/gkn570
- Rauvala, M., Aglund, K., Puistola, U., Turpeenniemi-Hujanen, T., Horvath, G., Willén, R., Stendahl, U., 2006. Matrix metalloproteinases-2 and -9 in cervical cancer: different roles in tumor progression. *Int. J. Gynecol. Cancer Off. J. Int. Gynecol. Cancer Soc.* 16, 1297–1302. doi:10.1111/j.1525-1438.2006.00448.x

- Roomi, M.W., Kalinovsky, T., Rath, M., Niedzwiecki, A., 2012. Modulation of u-PA, MMPs and their inhibitors by a novel nutrient mixture in human female cancer cell lines. *Oncol. Rep.* 28, 768–776. doi:10.3892/or.2012.1879
- Sheu, B.-C., Lien, H.-C., Ho, H.-N., Lin, H.-H., Chow, S.-N., Huang, S.-C., Hsu, S.-M., 2003. Increased expression and activation of gelatinolytic matrix metalloproteinases is associated with the progression and recurrence of human cervical cancer. *Cancer Res.* 63, 6537–6542.
- Simon, A., Biot, E., 2010. ANAIS: analysis of NimbleGen arrays interface. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 26, 2468–2469. doi:10.1093/bioinformatics/btq410
- Sotlar, K., Diemer, D., Dethleffs, A., Hack, Y., Stubner, A., Vollmer, N., Menton, S., Menton, M., Dietz, K., Wallwiener, D., Kandolf, R., Bültmann, B., 2004. Detection and typing of human papillomavirus by e6 nested multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 42, 3176–3184. doi:10.1128/JCM.42.7.3176-3184.2004
- Stokes, A., Joutsa, J., Ala-aho R., Pitchers, M., Pennington, C.J., Martin, C., Premachandra, D.J., Okada, Y., Peltonen, J., Grenman, R., James, H.A., Edwards, D.R., Kahari, V.M., 2010. Expression Profiles and Clinical Correlations of Degradome Components in the Tumor Microenvironment of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 16, 2022–2035. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2525
- Sturn, A., Quackenbush, J., Trajanoski, Z., 2002. Genesis: cluster analysis of microarray data. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 18, 207–208.
- Turk, B., Turk, D., Turk, V., 2012. Protease signalling: the cutting edge. *EMBO J.* 31, 1630–1643. doi:10.1038/emboj.2012.42
- Uhlen, M., Oksvold, P., Fagerberg, L., Lundberg, E., Jonasson, K., Forsberg, M., Zwahlen, M., Kampf, C., Wester, K., Hober, S., Wernerus, H., Björling, L., Ponten, F., 2010. Towards a knowledge-based Human Protein Atlas. *Nat. Biotechnol.* 28, 1248–1250. doi:10.1038/nbt1210-1248
- Waggoner, S.E., 2003. Cervical cancer. *Lancet* 361, 2217–2225. doi:10.1016/S0140-6736(03)13778-6
- Webb, M.J., Symmonds, R.E., 1980. Site of recurrence of cervical cancer after radical hysterectomy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 138, 813–817.
- Wolf, M., Clark-Lewis, I., Buri, C., Langen, H., Lis, M., Mazzucchelli, L., 2003. Cathepsin D specifically cleaves the chemokines macrophage inflammatory protein-1 alpha, macrophage inflammatory protein-1 beta, and SLC that are expressed in human breast cancer. *Am. J. Pathol.* 162, 1183–1190.
- Wu, T., Li, Y., Liu, X., Lu, J., He, X., Wang, Q., Li, J., Du, X., 2011. Identification of high-risk stage II and stage III colorectal cancer by analysis of MMP-21 expression. *J. Surg. Oncol.* 104, 787–791. doi:10.1002/jso.21970
- Wu, T., Li, Y., Lu, J., Qiao, Q., Bao, G., Wang, N., He, X., Du, X., 2013. Increased MMP-21 expression is associated with poor overall survival of patients with gastric cancer. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* 30, 323. doi:10.1007/s12032-012-0323-8
- Yates, L.R., Campbell, P.J., 2012. Evolution of the cancer genome. *Nat. Rev. Genet.* 13, 795–806. doi:10.1038/nrg3317

Table S1. Primer sequences employed in the validation by qRT-PCR

Name	5'-3' sequence	GeneID	Nt position
FAM111B_F	ATCAAGACATTTCAAGTGGCAG	NM_198947	151-173
FAM111B_R	CCTCTGGTCATCTCCATAGCG		303-282
FAM111A_F*	CCCTGTGCTTTGAAGATACTGC	NM_022074	142-163
FAM111A_R*	TGTTGCTCTTAGAGACCGGAG		322-301
CFB_F	AAGGCAGAGTGCAGAGCAAT	NM_001710	561-580
CFB_R	CACTCCATCGGCCATCACT		735-716
PSMB9_F	TCCATGGGATAGAACTGGAGGA	NM_002800	323-344
PSMB9_R	ATGGCAAAGGCTGTCGAGT		506-487
CASP7_F	GAGCGCACTACCCCGAG	NM_001227	135-150
CASP7_R	TCATCTGCCATCGTTCCAC		324-304
PRSS16_F	GGCACTTCCCGCCTCTTTA	NM_005865	510-529
PRSS16_R	GCTTCGGGATACCACGTCAT		699-680
CD74_F	TTCCCGGAGAACCTGAGACA	NM_001025159	671-690
CD74_R	TGGTCAGTACTTTCGGTGGAG		821-801
PSMB8_F**	GATGCTCATAGGAACCCAC	NM_004159	522-542
PSMB8_R**	AAGAATTCTGTGGGCTCCAGGC		671-650

qRT-PCR condition TM= 60°C 35 cycles for all samples. The values were obtained in duplicate.

*TM=59

**TM=61

Supplementary table S2. Genes differentially expressed between normal cervix tissue and cervical cancer tumor.

Protease class	Unique ID	Gene Name	P value	Cervical Cancer Tumor	Normal Cervix Tissue
Aspartyl Proteases	NM_001909	CTSD	0*	0.17423886	-2.879532
Aspartyl Proteases	BC021172	DDI1	0	0.17247616	-2.9678192
Aspartyl Proteases	NM_138992	BACE2	0	0.20244119	-3.099071
Aspartyl Proteases	NM_178581	HM13	7.79E-14	0.1543972	-2.6330562
Aspartyl Proteases	BC022017	DDI1	4.13E-13	0.17193693	-2.5120249
Aspartyl Proteases	BC011729	PSEN1	9.62E-12	0.13508838	-2.4583747
Aspartyl Proteases	NM_032802	SPPL2A	7.97E-10	-0.14077696	2.271917
Aspartyl Proteases	NM_003827	NAPA	2.96E-09	0.14442943	-2.200315
Aspartyl Proteases	NM_002630	PGC	1.25E-08	0.13949461	-2.12957
Cystein Proteases	NM_018466	ALG13	0	0.20633933	-3.1293166
Cystein Proteases	BC016828	ASAH1	0	0.2031161	-2.9727244
Cystein Proteases	NM_001688	ATP5F1	0	0.20247672	-3.1873834
Cystein Proteases	NM_000386	BLMH	0	0.19812572	-2.9803543
Cystein Proteases	BC008751	CAPN1	0	0.19775344	-2.895078
Cystein Proteases	NM_005186	CAPN1	0	0.19774102	-3.055015
Cystein Proteases	NM_144691	CAPN12	0	0.19536452	-2.8333943
Cystein Proteases	BC021303	CAPN2	0	0.19354324	-2.916087
Cystein Proteases	NM_001748	CAPN2	0	0.19472411	-3.0051937
Cystein Proteases	NM_033292	CASP1	0	0.19340906	-3.1792817
Cystein Proteases	NM_004346	CASP3	0	0.19222516	-3.0008967
Cystein Proteases	NM_001750	CAST	0	0.19186728	-2.8932104
Cystein Proteases	NM_000100	CSTB	0	0.17633608	-2.9108434
Cystein Proteases	NM_173061	CAST	1.11E-16	0.1918723	-2.833799
Cystein Proteases	BC095408	CTSB	3.33E-16	0.17571913	-2.7982998
Cystein Proteases	NM_003879	CFLAR	4.44E-16	0.18882123	-2.7864132
Cystein Proteases	NM_025079	ZC3H12A	1.18E-14	-0.19441164	2.6113539
Cystein Proteases	NM_001814	CTSC	1.28E-14	0.17518908	-2.6621678
Cystein Proteases	NM_015017	USP33	1.48E-14	-0.1645915	2.676838
Cystein Proteases	BC010240	CTSB	2.03E-14	0.17589067	-2.6714284
Cystein Proteases	NM_003470	USP7	2.62E-14	-0.17352179	2.670062
Cystein Proteases	BC107137	USP3	1.20E-13	-0.16082291	2.6117249
Cystein Proteases	NM_000396	CTSK	2.10E-13	0.17332716	-2.531732
Cystein Proteases	NM_201626	USP33	1.33E-12	-0.1646582	2.5263627
Cystein Proteases	NM_203494	USP50	1.53E-12	-0.17281651	2.4789324
Cystein Proteases	NM_173060	CAST	2.11E-12	0.19164735	-2.183066
Cystein Proteases	NM_001228	CASP8	4.15E-12	0.19198722	-2.3768883
Cystein Proteases	NM_003878	GGH	6.27E-12	0.1582167	-2.457582
Cystein Proteases	NM_017670	OTUB1	1.69E-11	0.14292842	-2.4427822

Cystein Proteases	NM_006002	UCHL3	2.21E-11	-0.14987661	2.4251406
Cystein Proteases	NM_032236	USP48	2.28E-11	-0.16978346	2.3237448
Cystein Proteases	NM_002181	IHH	2.42E-11	0.15061383	-2.4274766
Cystein Proteases	NM_001032730	USP48	8.82E-11	-0.16840066	2.2994497
Cystein Proteases	NM_006537	USP3	1.07E-10	-0.16137491	2.2591062
Cystein Proteases	NM_002056	GFPT1	2.13E-10	0.15856288	-2.315814
Cystein Proteases	NM_006590	USP39	2.62E-10	-0.16796418	2.25578
Cystein Proteases	BC028583	SEN6	4.24E-10	-0.119870804	2.2145445
Cystein Proteases	AF157320	UCHL5	5.88E-10	-0.15128274	2.2789233
Cystein Proteases	BC030143	MALT1	6.58E-10	0.14752446	-2.2536843
Cystein Proteases	NM_001001992	USP16	7.43E-10	-0.15812443	2.2410555
Cystein Proteases	NM_001017415	USP1	8.92E-10	-0.15426502	2.2563157
Cystein Proteases	NM_005482	PIGK	1.05E-09	0.13904834	-2.2271328
Cystein Proteases	NM_020935	USP37	1.25E-09	-0.1670083	2.12928
Cystein Proteases	AF307849	SEN6	3.42E-09	-0.12201869	2.1907527
Cystein Proteases	BC015930	USP25	3.62E-09	-0.15863618	2.1738691
Cystein Proteases	AF199458	SEN7	4.46E-09	-0.12536268	2.175302
Cystein Proteases	NM_015984	UCHL5	5.41E-09	-0.15211381	2.1562617
Cystein Proteases	BC104896	USP48	6.30E-09	-0.16845196	2.092897
Cystein Proteases	BC020737	PIGK	6.55E-09	0.13865224	-2.1547918
Cystein Proteases	NM_015571	SEN6	1.16E-08	-0.11806291	2.130398
Cystein Proteases	NM_017602	OTUD5	1.35E-08	0.14256315	-2.124436
Cystein Proteases	NM_003825	SNAP23	1.91E-08	-0.1368777	2.0701284
Cystein Proteases	BC003556	USP14	2.29E-08	-0.15649168	2.0161645
Cystein Proteases	NM_005632	SOLH	3.21E-08	-0.13796164	2.0817292
Cystein Proteases	NM_020903	USP29	3.53E-08	-0.1589771	2.0541556
Cystein Proteases	NM_004884	PUNC	3.68E-08	0.12001757	-2.0733376
Cystein Proteases	NM_017771	PXK	3.92E-08	0.11564044	-2.0660396
Cystein Proteases	NM_021627	SEN2	4.95E-08	-0.11733683	2.0476608
Metalloproteases	NM_002390	ADAM11	0	0.21959768	-3.4129493
Metalloproteases	NM_003183	ADAM17	0	0.21924438	-2.8341002
Metalloproteases	NM_014265	ADAM28	0	0.21826808	-3.3372374
Metalloproteases	NM_001109	ADAM8	0	0.21668293	-3.3662217
Metalloproteases	NM_001005845	ADAM9	0	0.21611829	-3.2754836
Metalloproteases	NM_014272	ADAMTS7	0	0.21545726	-2.6835728
Metalloproteases	NM_015239	AGTPBP1	0	0.20729186	-3.2128923
Metalloproteases	NM_001872	CPB2	0	0.1838219	-2.8527298
Metalloproteases	NM_080385	CPA5	1.11E-16	0.18432985	-2.8192952
Metalloproteases	NM_001304	CPD	1.11E-16	0.18374994	-2.8479922
Metalloproteases	NM_001868	CPA1	2.22E-16	0.18466744	-2.8130558
Metalloproteases	NM_001037324	ECE2	2.22E-16	0.16792698	-2.8123574
Metalloproteases	NM_022357	DPEP3	1.22E-15	0.17180327	-2.7685103
Metalloproteases	NM_003756	EIF3H	1.89E-15	0.16300362	-2.7463663

Metalloproteases	NM_006833	COPS6	5.44E-13	0.18486844	-2.4066076
Metalloproteases	NM_006708	GLO1	1.33E-12	0.15741864	-2.5291872
Metalloproteases	NM_001386	DPYSL2	2.47E-12	0.17123777	-2.5097427
Metalloproteases	NM_004995	MMP14	5.61E-12	0.14750218	-2.4829595
Metalloproteases	NM_004994	MMP9	1.13E-11	0.14596063	-2.455937
Metalloproteases	NM_004969	IDE	1.92E-11	0.15175863	-2.4315724
Metalloproteases	NM_000895	LTA4H	4.83E-11	0.14868951	-2.4005349
Metalloproteases	NM_018235	CNDP2	6.68E-11	0.18681629	-2.1910844
Metalloproteases	NM_020134	DPYSL5	6.78E-11	0.16796102	-2.3567202
Metalloproteases	NM_002525	NRD1	7.74E-11	0.14342543	-2.366038
Metalloproteases	NM_031883	PCDHA6	9.12E-11	0.14194374	-2.349183
Metalloproteases	NM_001498	GCLC	1.11E-10	0.15864353	-2.350514
Metalloproteases	NM_147191	MMP21	1.50E-10	0.1468882	-2.336966
Metalloproteases	NM_000285	PEPD	3.80E-10	0.13975698	-2.2938864
Metalloproteases	NM_006310	NPEPPS	9.85E-10	0.1441491	-2.2194972
Metalloproteases	NM_004530	MMP2	1.49E-09	0.14733988	-2.2142477
Metalloproteases	NM_001003810	HNRPD	1.66E-09	0.15338995	-2.2032897
Metalloproteases	NM_004279	PMPCB	2.49E-09	0.13807721	-2.206503
Metalloproteases	NM_003234	TFRC	2.57E-09	-0.14575638	2.2066612
Metalloproteases	NM_006463	STAMBP	4.63E-09	-0.1412125	2.1532893
Metalloproteases	NM_001397	ECE1	7.43E-09	0.167944	-2.0760674
Metalloproteases	NM_017807	OSGEP	8.26E-09	0.14311685	-2.129521
Metalloproteases	NM_018226	RNPEPL1	3.13E-08	-0.11199044	2.0793993
Metalloproteases	NM_012140	SLC25A10	3.59E-08	-0.1354996	2.071644
Metalloproteases	NM_005805	PSMD14	6.17E-08	0.12006091	-2.0058372
Serine Proteases	NM_001008270	TRYX2	0	0.2284298	-3.5304444
Serine Proteases	NM_007188	ABC88	0	0.22529802	-3.3279352
Serine Proteases	NM_001823	CKB	0	0.1887208	-2.9395683
Serine Proteases	NM_005752	CLEC3A	0	0.18785742	-2.8826227
Serine Proteases	NM_001039350	DPP6	0	0.17179833	-2.9802365
Serine Proteases	NM_016083	CNR1	1.11E-16	0.18605378	-2.8287394
Serine Proteases	NM_013379	DPP7	2.22E-16	0.17178263	-2.8160949
Serine Proteases	NM_001906	CTRB1	3.00E-15	0.17627287	-2.740006
Serine Proteases	NM_144981	IMMP1L	1.07E-14	0.15039064	-2.669322
Serine Proteases	NM_000506	F2	3.11E-14	0.16014875	-2.6619961
Serine Proteases	NM_007355	HSP90AB1	1.47E-13	0.15264268	-2.61414
Serine Proteases	NM_001710	CFB	8.15E-13	0.18922447	-2.4461741
Serine Proteases	NM_017509	KLK15	3.82E-12	0.1489625	-2.485344
Serine Proteases	NM_005801	EIF1	3.90E-12	0.16786693	-2.4799442
Serine Proteases	NM_015849	ELA2B	5.57E-12	0.16189633	-2.4730744
Serine Proteases	NM_022074	FAM111A	7.78E-12	0.15992992	-2.4572372
Serine Proteases	NM_001528	HGFAC	1.31E-11	0.15606686	-2.4399762
Serine Proteases	NM_021978	ST14	3.97E-11	-0.14103363	2.3945065

Serine Proteases	NM_183062	MPN2	5.65E-11	0.14531928	-2.3910375
Serine Proteases	NM_000131	F7	5.78E-11	0.16013719	-2.3843985
Serine Proteases	NM_001030048	KLK3	1.03E-10	0.14869006	-2.3677206
Serine Proteases	NM_021795	ELK4	1.40E-10	0.1610899	-2.2418413
Serine Proteases	NM_198464	UNQ9391	1.89E-10	-0.15310009	2.3013465
Serine Proteases	NM_001412	EIF1AX	2.44E-10	0.16564578	-2.314396
Serine Proteases	NM_003891	PROZ	2.84E-10	0.13669907	-2.3185344
Serine Proteases	NM_020998	MST1	3.40E-10	0.14513235	-2.2751827
Serine Proteases	NM_138321	PCSK6	7.01E-10	0.14092584	-2.270369
Serine Proteases	NM_005968	HNRPM	8.67E-10	0.15317237	-2.2570214
Serine Proteases	NM_003291	TPP2	1.48E-09	-0.14868127	2.237063
Serine Proteases	NM_007352	ELA3B	2.56E-09	0.16168645	-2.1546993
Serine Proteases	NM_182702	TESSP2	1.00E-08	-0.1430278	2.1267228
Serine Proteases	NM_000301	PLG	1.30E-08	0.13831218	-2.0856717
Serine Proteases	NM_005040	PRCP	2.28E-08	0.13710432	-2.0586581
Serine Proteases	NM_003630	PEX3	3.69E-08	0.13956314	-2.053088
Threonin Proteases	NM_002788	PSMA3	4.17E-12	0.13199541	-2.482205
Threonin Proteases	NM_002786	PSMA1	2.55E-11	0.13419949	-2.4156773
Threonin Proteases	NM_002798	PSMB6	3.13E-09	0.12450845	-2.1972995
Threonin Proteases	NM_004159	PSMB8	3.28E-09	0.12020451	-2.201624
Threonin Proteases	BC107901	PSMB2	9.97E-09	0.12804	-2.1317737
Threonin Proteases	NM_002799	PSMB7	1.24E-08	0.12316947	-2.1331258
Threonin Proteases	NM_002787	PSMA2	1.51E-08	0.13217689	-2.1225111
Threonin Proteases	NM_002800	PSMB9	4.39E-08	0.12016458	-2.0668359
Inhibitor proteases	NM_000014	A2M	0	0.22607267	-3.2385461
Inhibitor proteases	NM_001124	ADM	0	0.20914479	-3.1947339
Inhibitor proteases	NM_000029	AGT	0	0.20759214	-3.2491024
Inhibitor proteases	NM_001633	AMBP	0	0.20504498	-3.2440133
Inhibitor proteases	NM_000484	APP	0	0.20313132	-2.8844407
Inhibitor proteases	NM_001166	BIRC2	0	0.20083779	-3.255525
Inhibitor proteases	NM_001165	BIRC3	0	0.20019625	-3.163464
Inhibitor proteases	NM_033341	BIRC8	0	0.19885798	-3.1754055
Inhibitor proteases	NM_001025159	CD74	0	0.18942167	-3.0363507
Inhibitor proteases	NM_001899	CST4	0	0.1809919	-2.9939063
Inhibitor proteases	NM_080830	CST11	1.11E-16	0.1833414	-2.8315222
Inhibitor proteases	NM_001008693	CST9	1.55E-15	0.18060447	-2.7456791
Inhibitor proteases	NM_080610	CST9L	4.44E-15	0.17770156	-2.7246332
Inhibitor proteases	NM_001322	CST2	6.11E-15	0.18273933	-2.698861
Inhibitor proteases	NM_000099	CST3	6.43E-14	0.18137342	-2.6182225
Inhibitor proteases	NM_004520	KIF2A	2.25E-12	0.14933158	-2.5192666
Inhibitor proteases	NM_175575	WFIKKN2	3.62E-12	-0.17645429	2.458716
Inhibitor proteases	NM_002638	PI3	3.01E-11	0.13948733	-2.4190512
Inhibitor proteases	NM_004435	ENDOG	4.29E-11	0.16036303	-2.3464584

Inhibitor proteases	NM_001553	IGFBP7	7.65E-11	0.1514706	-2.36389
Inhibitor proteases	NM_003254	TIMP1	3.48E-10	-0.14719385	2.2483985
Inhibitor proteases	NM_030666	SERPINB1	5.65E-10	-0.13519494	2.2570486
Inhibitor proteases	NM_181642	SPINT1	7.57E-10	-0.13837682	2.2623925
Inhibitor proteases	NM_007085	FSTL1	8.87E-10	0.15926568	-2.2280765
Inhibitor proteases	NM_000834	GRIN2B	1.00E-09	0.15656441	-2.1724114
Inhibitor proteases	NM_001032281	TFPI	1.09E-09	-0.14515273	2.2302246
Inhibitor proteases	NM_006215	SERPINA4	1.78E-09	-0.13025865	2.2274742
Inhibitor proteases	NM_004684	SPARCL1	2.66E-09	-0.13818282	2.1725302
Inhibitor proteases	NM_020169	LXN	5.53E-09	0.14785296	-2.1619031
Inhibitor proteases	XM_372532	SERPINA2	4.81E-08	-0.12666717	2.053976
Inhibitor proteases	NM_021102	SPINT2	5.55E-08	-0.1399523	2.0068681
Inhibitor proteases	NM_005370	RAB8A	5.75E-08	0.10610471	-2.0433104
Inhibitor proteases	BC001394	SERPINB6	6.19E-08	-0.13528802	2.0145154
Inhibitor proteases	NM_002888	RARRES1	7.53E-08	0.10265204	-2.0297515
Inhibitor proteases	NM_003064	SLPI	1.12E-07	-0.13603705	2.002514

*0 represent P value $\leq E-17$.

Capítulo 4

**Expression profiles of major signaling pathways involved in cervical carcinogenesis
reveal potential molecular targets**

Artículo de revision (en revision para su publicación)

EXPRESSION PROFILES OF MAJOR SIGNALING PATHWAYS INVOLVED IN CERVICAL CARCINOGENESIS REVEAL POTENTIAL MOLECULAR TARGETS

Authors

Fernández-Retana Jorge^{1,2}; Zamudio-Meza Horacio³; López-Urrutia Eduardo²; Peralta-Zaragoza Oscar⁵; Jacobo-Herrera Nadia⁶; Cantú De León David⁴; Coronel-Martínez Jaime⁴; Pérez-Plasencia Carlos^{2,3}

Author affiliations:

¹Posgrado en Ciencias Biológicas, Facultad de estudios superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

²Laboratorio de Genómica Funcional. Unidad de Biomedicina, FES-IZTACALA, UNAM, Tlalnepantla, México.

³Laboratorio de Genómica, Instituto Nacional de Cancerología, Tlalpan, México.

⁴**Unidad de Investigaciones Biomédicas en Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Tlalpan, México.**

⁵Centro de Investigaciones en Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Morelos, México.

⁶INCMNSZ, Unidad de Bioquímica, Tlalpan, D. F. Vasco de Quiroga 15, Colonia Seccion XVI, Tlalpan C.P. 14080, D.F., Mexico.

Acknowledgments:

FRJ was recipient of CONACyT scholarship 104639 and COMECyT 12BCD0054-I. This work was partially supported by CONACyT (SALUD-2010-01-141907) and INCAN basic research funds. This manuscript was submitted in partial fulfillments author requirements for PhD degree for FRJ at Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México (U.N.A.M.), México. Acknowledgments to MD. Alejandro Ariel García-Arriaga by grammatical edition support.

Corresponding author:

Name: Carlos Perez-Plasencia PhD.

Address: Av. San Fernando No 22, Col. Sección XVI México, D.F., zip code 14080

Telephone: 52(55) 5628 0400 ext 176

Fax numbers:

e-mail address: carlos.pplas@gmail.com

Disclaimer

The authors declare that they have no competing interests.

Abstract

Molecular approaches allow analysis of the expression of thousands of genes at a time under similar conditions. Their application in cervical cancer has provided a better understanding of the cellular processes entailed in tumorigenesis and tumor drug resistance, leading to better classification and diagnosis. However, despite the great advances on the treatment some cancers, the disease remains an important public health problem. Cervical cancer is one of the most frequent tumors among women worldwide. Recently, a lot information about this cancer has been generated by a number of groups employing microarray technology from different perspectives, such as tumor progression, classification, prognosis and treatment, etc. As a whole, these works have revealed alteration in the expression of many genes that participate in the NF- κ B, TGF- β , WNT, MAPK and ATM/ATR pathways. In this review, we summarize available information about cervical carcinogenesis, tumor establishment and metastasis, obtained mainly from microarrays reports.

INTRODUCTION

Cervical cancer (CC) is the fourth leading cause of death in women worldwide, considered one of the most important problems of public health in the world; Annually about 500,000 cases and 270,000 deaths (1) are presented. In Mexico it is the third most prevalent cancer. The main etiological factor in cervical carcinogenesis is infection by human papillomavirus (HPV) (Fig. 1), and more than 100 types of HPV have been identify and classified according to their potential to cause damage at the cellular level, into low and high-risk subtypes (2). After viral integration into the genome of the host cells, E6 and E7 oncogenic proteins increasing their expression levels. These onco-proteins form co-regulatory complexes with cellular proteins, modifying overall genomic expression by interaction with transcription factors, chromatin remodeling molecules, DNA methyl transferases, among others, these complexes together with E5 onco-protein activity influence the cellular processes towards tumor phenotype and disease progression (3).

Carcinogenesis is a set complex processes that involve accumulative genomic alterations such as point mutations, chromosomal instability, among others, these are reflected in changes of gene expression profiles, resulting in the deregulation of cellular mechanisms that control growth and cell differentiation (4-6). Although currently has been described different molecular mechanisms involved in cervical carcinogenesis, the expression profile analysis of multiple genes through the implementation of high performance tools such as microarray expression systems, have enable the global analysis of genes that are positive and negative regulated during different stages of cell development, emerging as an excellent alternative that contribute to elucidate the participation of groups genes at the same time, then establish the networks of signaling involved in many carcinogenic processes (7). Using the expression microarrays systems have been identified molecular signatures composed of groups of genes to develop molecular tools which complement clinical and histopathologic data (8-10), which allows defining tumor subtypes (11-13), predict recurrent disease (14-15) and the type of clinical response to specific therapies in many types of tumors such as, breast, head and neck, colon, among others (16,17–21). Another important advantage offered by microarrays is the correlation with clinical data such as outcome, disease free survival, pathological clinical response among others, and discover of molecular processes and signaling pathways involved in those clinical features (22,23).

Respect to CC, there is a growing body of research based on the use of microarrays system, although relatively few reports have been performed in CC patients pre- and post-treatment of chemo-radiation and thermochemo-radiotherapy (24–26). These results have allowed us to contribute to the knowledge of the molecular mechanisms involved in tumorigenesis as a study model of high-risk human papillomavirus after infection (HPV). Together with the growing number of investigations using the microarrays platforms to study the expression profiles in CC, it has been possible obtain information about key signaling pathways such as NF- κ B, TGF- β /Smads, WNT/ β -catenin, MAP kinases (MAPK) and ATM/ATR involved during different stages of carcinogenesis. These studies are highly relevant, because despite research advances in diagnosis and treatment, the CC remains one of the major causes of cancer death worldwide (27). The present review has focused on summarize the state-of-art research of ones of the principal signaling pathways involved during carcinogenesis, tumor progression and drug resistance in the CC.

Activation of the transcriptional factor Nuclear Factor kappa B.

The Nuclear Factor kappa B (NF- κ B) signaling pathway is ubiquitous and evolutionarily conserved in many cell types, in normal conditions plays an important role during regulation of immune response. This transcriptional factor not only controls the expression of genes involved in multiple physiological processes involved in cell development, cytoskeleton reorganization, cell adhesion, survival and apoptosis; also leads constitutively immune response acute and chronic inflammation which is essential for the development and maintenance of different diseases such as arteriosclerosis, arthritis and cancer as well as plays a key role in cellular apoptosis (28). In cancer, NF- κ B β signaling pathway has been linked to the promotion and progression, as well as chemo and radio-resistance treatments, so it can be postulated as a potential therapeutic target. Furthermore, activation of transcriptional factor is a clear example of how HPV infection can modified gene expression involved during cervical carcinogenesis.

It has been described that NF- κ B activation occurs through two main signaling pathways

denominated as classical/canonical or alternative/non-classical pathways. The classical pathway can be activated by several types of receptors such as Tumor Necrosis Factor Receptors (TNFRs), Toll-like receptors and Interleukin-1 β receptor (IL-1 β R) involved in inflammatory processes, while the non-canonical pathway is activated by a sub-group of TNFR family that includes CD40, Lymphotoxin-b (LTBR) and B cell activating factor (BAFF) related with innate and inflammatory responses including a T cell-dependent immunoglobulin class switching, memory B cell development, and formation (28,29).

The HPV infection induces NF- κ B altered activation.

The global cDNA microarrays analysis of the cell line derived from vaginal intraepithelial neoplasia expressing human papillomavirus HPV-33 (UT-DEC-1), it shows that the viral infection with high-risk HPV causes aberrant activation of molecules upstream of the TNFR/NF- κ B signaling pathway related with apoptotic processes. These include, TRAIL and CD27 ligand (CD27L) as up-regulated genes (cut-off 2-fold), among others; these proteins belong to TNFR family receptors and interact with CD27. It has been suggested that CD27 initiates signaling to NF- κ B by specific binding to TRAF-2, which promotes cell proliferation, and increases the expression inhibitors of apoptosis genes such as cIAP-1 and cIAP-2. These proteins can regulate signaling of NF- κ B in response to TNF- α , allowing to block apoptosis and cell proliferation. Alteration of NF- κ B activity is one of the mechanisms of resistance to apoptosis employed by other viruses such as Epstein-Barr virus, hepatitis B virus and SV40 virus (30,31). In cervical cancer, tissues have been reported that two genes could activate the NF- κ B pathway (32). In human SAA1 is a kind of acute-phase Serum amyloid A (SAA) that would increase in concentration approximately several hundred fold changes under inflammatory stimulation (33). The activation of NF- κ B by SAA suppress apoptosis (34), and SAA is involved in the local inflammation microenvironment of the malignant tissue by induction of Tumoral Necrosis Factor- α (TNF- α), Interleukin-1 β (IL-1 β), and/or CCL1, CCL3, CCL40 chemokines (35). In addition, SAA regulates tumor invasion and metastasis by the increase of activity of matrix-degrading enzymes (MMP/TIMP-1) and TNF- α production (36). UBD gene, also known as HLA-F-adjacent transcript 10 (FAT10), this is a small ubiquitin-like modifier. UBD plays an important role in transformation and cell survival, including proliferation, invasion, and migration. The carcinogenic properties of this gene in non-tumor or tumor cells are mediated by NF- κ B-CXCR4/7 receptors (32,37).

In summary, HPV infection and malignant neoplasm, utilize the same regulatory mechanisms led by NF- κ B to evade the immune response and to control of the cell cycle of infected and tumor cells.

Tumor Growth Factor- β (TGF- β): Modulation in cervical cancer.

TGF- β is a multifunctional family of cytokines, which are essential in survival processes, its autocrine and paracrine effects can be divided into following major groups: First, cell proliferation, growth, differentiation and cellular movement. Second, as immunomodulatory factor, and Third, profibrogenic effects (38–41), angiogenesis, wound healing, inhibition of epithelial cell growth and apoptosis, although there are several studies where have demonstrated the important role of TGF- β in cervical oncogenesis, particularly to promote progression and metastasis (42). During carcinogenesis, tumor cells can be partially or completely resistant to inhibition of cellular growth and activation of apoptotic response induced by TGF- β , this phenomenon is called as TGF- β paradox; although this topic is still under investigation, it has been reported the differential activation of ERK in tumor cells, proposing this as a molecular mechanism for this phenomenon (38,39,43).

There are three isoforms of TGF- β known in mammalian, which have significant structural and functional similarity (TGF- β 1-3). TGF- β 1 is expressed in hematopoietic cells and connective tissue; meanwhile TGF- β 2 is expressed in epithelial and neuronal cells, while TGF- β 3 is expressed in mesenchymal cells (44,45). The physiological effect of TGF- β is mainly regulated by a complex of two transmembrane receptors type I (TGF- β RI), and II (TGF- β RII), which have functions of serine/threonine kinase. Upon binding with its ligand TGF- β RII together with TGF- β RI forms a heterodimeric receptor complex that activates the function of serine/threonine kinase, which in turn phosphorylates Smad2 or Smad3. The complex of Smad2 or 3 with Smad4 is translocated to the nucleus to bind to their targets in the DNA sequence (46–48) (Fig. 2). As transcription factors, Smads proteins regulate cell cycle inhibition, beside the expression of the proteins p15, p21 and p27. TGF- β acts in two different ways during carcinogenesis: First, as a tumor suppressor by inhibition of epithelial cell proliferation and angiogenic growth factor that results in suppression of anti-tumorigenic immune responses (49,50). Second,

TGF- β activates non-Smad signaling pathways such as PI3K, mTOR, the small GTPases Rho, Rac and Cdc42, and Ras-ERK-MAPK signaling pathways (51).

Differential expression profiles in TGF- β signaling pathway.

During cervical carcinogenesis, the molecular changes caused by HPV infection may have different results those depend on whether infection is caused by a high or low risk virus. This was observed by comparing the expression profiles using microarrays analysis from cell lines and primary cultures of keratinocytes infected with HPV of low or high risk, these results have shown that infection with low-risk HPV (types 6 and 11) induces overexpression of genes belonging to the TGF- β family in infected cells, but does not suppress interferon-inducible genes (52), while with high-risk type HPV infection induces the decrease of the expression of multiple genes in response to TGF- β (53,54). These findings indicated that the signaling pathway of TGF β acts to suppress tumor formation, while the action of the interferons help counteract low risk of viral infections. However the dual role as a suppressor or a promoter of TGF- β in the progression of HPV infection by high-risk types has been clearly demonstrated in different studies.

During the onset of tumor progression, TGF- β loses its ability as a tumor suppressor, apparently because when the viral genome is in episomal form, the viral protein E5 down-regulates the TGF- β RII receptor (55), which causes that the signaling initiated by the TGF- β ligand 1 can not be directed to Smad3/4 complex (Fig. 3a). While in advanced stages, changes in cell cycle including loss regulation caused by E5 and concomitant action by E6 and E7 viral proteins promote tumorigenesis (56). In addition to the selective advantage of cell growth after integration of the viral genome (57), the inhibitory action of E7 oncoprotein blocks TGF- β signal by binding to Smad2, Smad3 and Smad4 and prevents anti-tumoral function (Fig. 3b). The results obtained by microarray analysis showed a low expression of Smad2, 3 and 4, this leads to down-regulation of TGF- β pathway, which turns to an important mechanism that contributes to cellular immortalization and proliferation (58,59). On the other hand, the Kloths group evaluated the expression profiles related to cell growth and apoptosis induced by TGF- β 1 in

cervical cancer lines with different sensitivity levels for TGF- β ligand. These data revealed alterations in the expression levels of several genes, including Smad2, 3 and 4, TNF α , MAPK and interestingly some molecules of the Wnt signaling pathway (60). These results highlight the importance of TGF- β as an oncogenic suppressor/activator and its ability to interact with other signaling pathways that promote tumor phenotype. In addition, in cervical cancer has been reported high levels of TGF- β in more advanced stages (61,62), which contribute to the phenomena of migration, invasion and metastasis, at the same time that inhibit the immune response of the host (63,64). In this context, due the large number of genes deregulated during and after infection, it is demonstrated the important role of TGF- β as part of the protective mechanism against viral infection. Thus, this signaling pathway is one of the main targets of viral proteins to control the cell cycle. The inactivation of TGF- β allows the establishment of tumor phenotype and subsequently activates angiogenesis processes regulated by VEGF and IL-8 (65), and cytokines with a strong angiogenic potential.

The global analysis of the expression profiles allows us to better understanding about the behavior of many signaling pathways and at the same time the interaction among them. In this regard, it has been reported that TGF- β regulation also has an effect on other signaling pathways as Wnt, whose aberrant activation in cancer contributes to epithelia-mesenchymal transition (EMT), which is characterized by the set of cellular events that allows conversion of epithelial cells to mesenchymal cells features, mainly a high migratory ability (66).

Aberrant activation of Wnt signaling pathways in cervical cancer.

Wnt signaling pathway has an important role in the control of cellular growth, differentiation and cellular homeostasis (67), including processes like embryogenesis, maintenance of stem cells, polarity, cell migration, and very importantly during pathological conditions such as carcinogenesis (68–70). Historically, with investigations done by Nusse and Varmus in 1982, it was established the relationship between Wnt signaling pathway and regulation of proliferation by identification of Int1 (Wnt1a) as an associated locus in the mouse

mammary tumor virus (MMTV, Murine Mammary tumor Virus) involved in the development of this tumor (71,72). Subsequent studies showed that one example of genes activated by Wnt signaling cascade is Cyclin D, this protein modulates serine/threonine kinase activity of Cdk4 and Cdk6 and is responsible to regulate cell growth through the progression towards G1 phase in cell cycle and induction of tumor proliferation (73,74). Although Cyclin D is a key element in the regulation of progression towards G1 phase, it is not the only element that participates in the modulation of the cell cycle triggered by Wnt ligands, finding agonists and antagonists in multiples levels as receptors, effectors and negative-regulators (Fig. 4). For this reason, possibly, there are a lot of negative regulators of this pathway, which generally are under-expressed in several tumor types. The effects triggered by Wnt ligands stimulation can be spread in three well-known different pathways, which magnify the pleiotropic effect of this signaling cascade in tumor progression. First, the most studied pathway is the Wnt/ β -catenin, also known as "The canonical Wnt pathway", activation of this pathway leads to accumulation and stabilization of β -catenin protein in the cytoplasm and its subsequent translocation to the nucleus, where it acts as a transcription factor involved in cell proliferation. Second, the planar cell polarity pathway (Wnt/PCP), is involved in the processes of differentiation of epithelia planes, reorganization of cytoskeleton, finally the calcium dependent pathway, it is the third pathway whose role is not fully understood its role in tumorigenesis; the last two are known as "non-canonical Wnt" pathways (Fig. 5) (75).

During cervical carcinogenesis, aberrant activation of the canonical Wnt pathway is an event that apparently is related to inhibition of TGF- β signaling. In the research made by Kloths group shown an increase of genes expression encoding receptors of Wnt ligands, FZD2 frizzled and FZD4, the WISP2- gene that is part of this signaling pathway, while negative regulatory genes as the protein Secreted Frizzled Related Protein 4 (SFRP4) and Dickkopf 1 (DKK1) are sub-expressed via TGF- β 1-dependent signaling (60). Furthermore, in other papers it has been observed that there is a regulation at the epigenetic level mediated by human papilloma virus proteins, which indirectly causes aberrant hypermethylation of CpG islands in

promoter regions of tumor suppressor genes as sFRPs, Axin, Dickkopf, Klotho and APC, which are negative regulators of Wnt signaling pathways (60,76). Thus, it is possible that the inactivation of these genes allows aberrant activation of the canonical Wnt pathway and thereby establishing cervical carcinogenesis.

Differential expression of genes involved in Wnt signaling pathway.

Aberrant activation of signaling pathways during cervical carcinogenesis could be related with many factors acting at the same time, for this reason the study of expression profiles give us a better understanding of these processes. In this sense, the non-canonical pathways have begun to have more interest due to their possible involvement in tumor progression. In this context, there are reports that show differences in expression profiles from patients biopsies with cervical cancer positives for HPV 16 in clinical stage IIB in compare with normal samples (FIGO classification). The differences are meanly in genes involved in important pathways that participate in cellular homeostasis and significant genes in non-canonical pathways (59). On the other hand, in the human genome are described 19 Wnt ligands, 10 different members of seven transmembrane domains Fzd family and two co-receptors (66,77). Consequently, the pleiotropic effect initiated by ligand-receptor binding Wnt/Fzd and co-receptor LRP5/6 or ROR2, mainly activates canonical or non-canonical signaling pathways respectively (75).

In addition to this, in tumors from early cervical cancer associated with lymph node metastasis, 5 genes involved in the Wnt pathway were found: p120 (CTNND1 or catenin delta 1), CTNNAL1 (alpha catenin 1), DKK3 (homologous to Dickkopf 3), WNT5a ligand and TCF4 transcription factor. However, in these results β -catenin as a key protein of canonical pathway is not mentioned, suggesting that the canonical Wnt/ β -catenin pathway could not be involved in the regulation of invasion CC phenomenon. Also, it is known that p120, a member of sub-family of armadillo-domains protein, regulates the activity of small GTPases of the Rho family Rho, Rac and Cdc42 (78,66), proteins that are part of the Wnt/PCP pathway and regulates the cytoskeleton organization during the phenomena of cell motility, migration and invasion (Fig. 5a). These evidences suggested that Wnt/PCP promotes cell motility

and invasion during metastatic process through the activation of small GTPases of the Rho family (79–81). Other studies have shown that the activation of Wnt/Ca²⁺ inhibits the Wnt/β-catenin pathway (Fig. 5b), there is further evidence of the involvement of non-canonical pathway in tumor progression pathway (82).

Together with the proliferative effect of Wnt pathways, it has been reported that the binding of ROR2/WNT5a enables the activation of survival pathways SRC/ERK and AKT/PKB (82–84), revealing a crosslinking point with other pathways, which collaborate in tumor progression. Due to the pleiotropic ability of the Wnt canonical and non-canonical pathways, their participation during tumorigenesis has been proposed as a second "hit" (tumorigenic event in classical Knudson hypothesis) in a sequential model where HPV infection triggers a series of events (85), leading infected cells to carcinogenesis. In this respect, our working group has contributed to several investigations, including the association between viral aggressivity and the risk to develop cervical cancer, in this work we found that E6 oncoprotein from non-European variants are able to differentially altered the expression of 2236 genes associated to carcinogenesis, among which we can mention transcripts belonging to Wnt signaling pathway (86).

The coordinated action of inhibiting TGF-β and the aberrant activation of the Wnt/β-catenin pathway by infection with high-risk HPV causes changes that promote aberrant proliferation, and chromosomal instability, specific features during carcinogenesis (87). A proposal that emerges from the findings described above, is that tumor development generates a physiological stress, consequently the increase in tumor volume is directly proportional to cellular stress, and then, stressed cells activate genes of non-canonical pathways, allowing them to migrate and invade new physiological niches (84). Therefore, the study of non-canonical pathways may offer new therapeutic targets that establish new horizons in clinical treatment (88).

In summary, It known that aberrant Wnt activation is a required step for establishment of tumor phenotype, while apparently the activation of non-canonical Wnt pathways Wnt/Ca²⁺ and Wnt/PCP are related with the acquisition of a highly aggressive tumor phenotype with invasive and metastatic potential (80).

Role of Mitogen-activated protein kinases (MAPK) in cervical cancer.

The effect of high risk HPV infection in cervical cancer, as well as causing alteration of different signaling pathways during the establishment of the tumor phenotype also causes deregulation of many elements of the Mitogen-activated protein kinases (MAPKs), one of the key signaling pathway in cell homeostasis. The MAPKs signaling pathway regulates communication between extracellular signals and cellular machinery that controls essential cellular processes such as cellular growth, proliferation, differentiation, migration and apoptosis (89). This pathway is modulated by three levels of phosphorylation cascades (Fig. 6), in which a MAP kinase is activated by phosphorylation by another kinase of the same family (MAPKK), which is activated by other kinase MAPKKK. So far it have been described six distinct groups of MAPKs, which are extracellular signal-regulating kinase 1/2 (ERK1/2), ERK3/4, ERK5, ERK7/8, the amino terminal kinase JUN (JNK) 1/2/3 and the p38 isoforms (ERK6) (90–92). The differential activation of MAPK pathway confers many properties to cells during malignant transformation; this confers advantages for tumor establishment. For example, activation of Ras/ERK, one of the signaling pathways responsible to control cell survival, differentiation, proliferation, metabolism and motility in response to extracellular cues, confers proliferative capacity, whereas the JNK and p38 pathways that focus on the cellular stress response confer protection against the use of the drugs employed in therapy (93). In this sense, some authors have considered drug resistance and evasion of oncogenic senescence regulated by MAPKs as potential "hallmarks" of cancer, this was proposed by Hananhan, since abnormalities in MAPK signaling affects a lot, if not all cellular processes that play a critical role in resistance and progression of cancer (89).

In the context to drug resistance and evasion of oncogenic senescence, the interaction between TGF- β and MAPK signaling pathways has been reported in several studies. In cell lines HeLa and SiHa, which are resistant to growth inhibition and apoptosis induced by TGF- β 1 ligand, was observed over-expression of MEF2C (target gene of p38), MEK6 (upstream regulator of p38 kinase) and ATF4, a transcription factor involved in the MAPK signaling, as well as other target genes of Smads/MAPK, particularly the p38 pathway as AFT3, CDKN1A and GADD45B

(60,92). This indicates that cells respond to stress factors coordinated with the TGF- β pathway. These are clinically important at the level of response to treatment, because in locally advanced stages of CC the recommended treatment is radiation therapy in combination with cisplatin-based chemotherapy (94–97). The action mechanism of radiation therapy causes damage to the DNA molecule by fragmentation, while cisplatin exerts its anticancer effect by generation of adducts between DNA strands. Both treatments in the cytoplasm generate reactive oxygen species, which damage the membranes of the organelles (98,99).

MAPK signaling pathways and expression profiles.

Several studies suggest that the activation of these members of the MAPK signaling pathway contribute to the cellular resistance phenotype through to cross-talk with others signaling pathways (100,101). A proposed mechanism is through a limited signal between FAS/FASL (an inducer of apoptosis by the extrinsic pathway), which confers cyto-protection (102). However, no correlation was found between levels of MAPK protein or MAPK-related proteins and expression profiles of cisplatin-sensitive patients in different types of tumors (98). This was reported by Iwakawa, where compared the expression profiles of tumors in 39 patients with CC before and during therapy based alone and/or radio-chemotherapy combination with cisplatin treatment without finding alteration in gene expression of the MAPKs pathway (103–105). Only in one of the studies was observed over-expression of MAP3K2 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2) in radiosensitive tumors. This kinase is involved in the activation of transcription factor NF- κ B (104). These results show that the possible mechanisms of resistance to treatment regulated by elements of MAPKs are activated in general, and there is not a different expression that distinguishes cervical tumors resistant or sensitive to radiation and chemotherapy or both. That suggests, that the resistant phenotype is regulated by other factors not yet described. However, although currently there is little information about changes in expression profiles that clearly indicate alteration in MAPK signaling pathway, the aberrant activation of this pathway is a necessary step for the initiation of carcinogenesis and its deregulation is a synergistic process

where interact signaling pathways of TGF- β , Wnt and MAPKs, which are coordinated by the viral proteins. As mentioned above, E5 viral protein stimulates cell growth by forming a complex with the TGF- β receptor, but it has also been observed that prevents apoptosis triggered by DNA damage in early stages (105,106). So that the deregulation of TGF- β and Wnt promotes TEM while the participation of members of MAPKs establish a cyto-protective global environment that helps tumor survival.

Role of Ataxia telangiectasia mutated (ATM) in cervical cancer.

An inevitable event during carcinogenesis is damage to DNA molecule, in response to damage, cells activate a complex signaling network (Fig.7), arresting the cell cycle in the G₀ phase to allow repair (107,108). So far, it has been observed that the damage sensors transduce the signal to family members related to the phosphoinositide kinase-3 (PIKKs), among these include the DNA-dependent protein-kinase (DNA-PK) included ataxia telangiectasia mutated (ATM) and ATR 3 ATM related protein (ATR) (109), these latter two are directly associated with the detection of DNA damage (110,111). ATM carries out the monitoring through its effector Chk2, while ATR makes it through Chk1 (112,113). During these processes, there is a crosstalk between both pathways, particularly when one is partially or completely deficient (112). ATM/Chk2 damage is primarily due to rupture of the double stranded DNA, whereas ATR/Chk1 is activated by small abnormalities during the formation of DNA replication fork during S phase in the cellular cycle (108). DNA-PK is a complex that consists of a large subunit DNA-PKcs and two small subunits, Ku70 and Ku80 involved in a non-homologous end, which joins of DNA (114). The tumor suppressor protein p53 is the major downstream effector from these pathways (115). Under normal conditions, the p53-dependent signaling in a cell arrest generates mainly a regulation by overexpression of p21 protein (116,117). If DNA damage is too severe, the dependent p53 pathways activates the system of programmed cell death by intrinsic or extrinsic pathway (118,119). However, cervical cancer action of the onco-protein E6 leads to inactivation and degradation of p53 (116), which causes a selective loss in the G₁ checkpoint so

these cells are dependent on the point S and G2 Control/M to maintain genomic integrity in DNA damage response. It has also been observed that the viral proteins have induced chromosome instability and increase the capacity of heterologous DNA recombination into the host genome. Therefore DNA damage leads to activation of ATM/ATR pathway. In some tumors where p53 is inactivated has been observed that the specific activation of Chk1 and Chk2 by DNA damage is particularly via MAPKs p38 protein generally activated in response to cellular stress (120,121). In a recent paper by Hagemann, it was searched for genes involved in metastasis to lymph nodes in early stages of CC and found that ATM has no significant expression in resistant tumors (122), suggesting that other mechanisms may exist to repair tumor CC allowing progression and metastatic phenotype (123). In this sense, the path that seems related to the resistance is DNA-PK. The large subunit (DNA-PKcs) can bind weakly to the fragmented DNA, but its binding is stabilized by the binding of Ku subunits (124,125).

The data suggest that Ku subunits can structurally withstand the DNA breakage and DNA-PKcs subsequently be recruited to the site of rupture bridge to generate, activate or/and recruit the necessary factors for the non-homologous end join (114). Other researchers, which have been searched molecular signatures of resistance to radiation, drugs or metastasis, found a different overexpression of XRCC4 and XRCC5 (Ku80) (98,126), which highlights the importance of non-homologous end recombination as a mechanism of resistance, both the radio and chemotherapy. Repair mechanisms are vital for tumor survival. CC activation in these pathways may be mediated by viral proteins, and thus allow viral integration into the host genome. The protective action of p53 on DNA integrity is disrupted by E6 protein. However, in the absence of p53 pathway seems that the p38MAPK/MK2, through MK2 kinase (121) can activate repair mechanisms mediated by ATM/ATR helping tumor progression. The efficiency of the repair mechanisms of DNA damage increases resistance to radiation and chemotherapy treatments used in the CC, acting in a complementary manner. Overexpression of Ku genes in resistant tumors reveals that the non-homologous recombination increases this phenotype.

Conclusions.

During cervical carcinogenesis the changes in global expression profiles are generated after HPV infection in the host cells. These changes occur gradually in a coordinated manner, which causes the transition of intra-epithelial injuries to the establishment of carcinogenesis. Consequently, the crosstalk is blocked between signaling pathways, which are associated with processes like tumor progression, chemo- and radio-resistance and metastatic behavior. Through the global analysis of transcriptome using the microarrays system, it has been established how the elements of these signaling pathways are integrated in a coordinated manner. In several studies of cervical carcinogenesis, it was observed that the genes of TGF- β , WNT (canonical and non-canonical), MAPKs, ATM/ATR pathways are often altered. The analysis of expression profiles using microarrays shown the over- or under-expression of key genes in these signaling pathways, this has also been observed simultaneously under stimulation such as tumor progression. This allows us to propose a space/temporal model that represents the key points of these events (Fig. 8). In this model, participation of viral protein E5 has a more relevance than previously recognized, because its action is vital during early infection. HPV infection causes an increase in the gene expression of TGF- β /Smad pathway. However, the interaction of the viral protein E5 with TGF- β RII receptor prevents proper signaling pathway and therefore the infected cell is not eliminated by apoptosis. The pathological effect of E5 is eliminated during progression of intraepithelial lesions, due to the integration of viral genome in the host cell, this result in a substantial part of the open reading frame of E5 that is truncated.

During progression of cervical lesions to carcinomas *in situ*, some components of Wnt and MAPKs signaling pathway modify their expression levels. In the case of Wnt pathway, there is a negative regulation of several tumor suppressor genes induced by viral proteins, by which the interaction with DNA remodeling proteins cause hypermethylation of gene promoter regions as Cerverus, Kremen Dkk3 and APC. This induces activation of canonical pathway Wnt/ β -catenin and starts the epithelial-mesenchymal transformation process as important part of the carcinogenesis.

Although there is evidence showing that viral proteins regulate MAPKs pathway, it appears that activation of this pathway is TGF- β -dependent, and its main targets are JNK and p38 signaling pathways that respond to cellular stress. Activation of these pathways is important because provide a global cyto-protective tumor environment, they also activate ATM/ATR pathway but without the regulatory capacity caused by p53 degradation. Activation of ATM/ATR by p38/MAPK/MK2 possibly promotes DNA repair and thus tumor progression. Another major event during carcinogenesis is the participation of Wnt-non-canonical pathways that includes the Ca²⁺-dependent pathway of the polarity pathway: these pathways appear to be activated when environmental conditions (such as available space and nutrients) are not optimal and promote cell migration and invasion. This was observed in work whose purpose was to find metastasis prognostic genes and found the Wnt5a, which once it binds to FZD7 receptor it activates the polarity pathway (no-canonical), noteworthy is that in this point lipoproteic co-receptor LRP5/6 participation decreases and increases the kinase ROR2. When the Wnt5a/11-FZD7-ROR2 trimeric complex is formed, small GTPases of Rho family are activated, which have the ability to regulate cytoskeletal reorganization and induce migration and invasion, as well as activating the JNK pathway. While the non-canonical pathway (Ca⁺-dependent, Wnt/Ca²⁺) helps achieve the tumor cells can be detached from tissue. In the radio-drug resistance phenotype are involved other pathways besides ATM/ATR and DNA-PK, that regulates heterologous recombination and processes involved in the recognition and repair of DNA damage in a coordinated manner. These genes can be expressed differentially in resistant tumors. Coordination of signaling pathways appear to respond to different stimuli generated during tumors progression.

Prospects.

The microarray analysis have helped us to get an overview of the changes that are generated in multiple genes and thus to a better understanding of their participation during carcinogenesis. However, these results are only partial, because there are several regulatory mechanisms that have not been widely explored such as regulation of gene expression by microRNAs or the post-translational modifications, which may alter the

effector function of genes identified in the transcriptome. This is a first approach and it is possible to focus future research on these results, so they are known in more details the mechanisms and how these elements act. It is also necessary to find points of convergence of these pathways, since new data are obtained on genes that alter their expression through the process of carcinogenesis, is getting a better understanding of the biological process that may be reflected in clinical practice, to develop better strategies for diagnosis and treatment of patients with CC.

Figure Legends

Figure 1. Viral cycle of Human Papilloma virus and carcinogenic development.

Figure 2. Signaling pathway of TGF- β /Smad. The binding of TGF- β to membrane receptors TGF- β RI and II induces activation of the kinase domains, which enables formation of the complex between Smad2 or Smad3 with Smad4. These complexes function as transcription factors to genes involved in the cell cycle inhibition of epithelial cells.

Figure 3. Inactivation of TGF- β by HPV viral oncoproteins. a) During the late stage of infection the viral DNA in episomal form let the E5 protein expression. E5 blocks the kinases domain by the union with receptor TGF-BRII and TGF-BRI, which interrupt thereby the signaling cascade of TGF-B/Smad. b) In the latter stage the integration of viral genome to the protein E7 is expressed and binds with the protein Smad4, which recruits and blocked the Smad2/3 complex with Smad4. This mechanism let the cell cycle progression and immune response evasion in carcinogenesis.

Figure 4. Signaling Pathway cascade regulated by Wnt/ β -catenin. No active form. When the Wnt signaling pathway is off by extracellular negative regulators such as CER1, WIF1 and SFRP and membrane regulators as DKK and KRM cause that the cytoplasmic protein β -catenin binds to the degradation complex conformed by APC,

Axin and CK1 γ and GSK3 proteins (serine/threonine kinases), to be phosphorylated for the ubiquitin ligase β -TRPC1, and finally sent to the proteasome for its degradation. Signaling pathway activation by the action of viral proteins of HPV. E7 viral protein can bind to DNA methyltransferase 1 (DNMT1) and thus methylate the promoter region of suppressor genes of Wnt signaling pathway. This allows binding of the Wnt ligand to its receptor and co-receptor maintaining inactive kinases of the destruction complex, allowing the accumulation of β -catenin in the cytoplasm. β -catenin is transported to the nucleus by the Pygopus protein, where Groucho LEF/TCF transcriptional receptor complex is displaced, resulting in the transcription of genes such as c-Myc and cyclinD1, which participate in the proliferation and progression of the cellular cycle.

Figure 5. Wnt Non-canonical signaling pathways. Wnt/PCP signaling pathway. PCP pathway activation depends on the interaction of the ligand Wnt5a or 11, FZD7 kinase receptor and ROR2 co-receptor which transduces the signal to Dvl protein, which can activate the small Rho GTPase sub-family like RhoA, Rac1, and Cdc42, that regulates cytoskeleton rearrangements and may also activate JNK. In addition, activation of Wnt/PCP pathway induces changes in cell polarity, stimulates epithelial-mesenchymal transition and helps further tumor metastasis. Wnt/Ca²⁺ signaling pathway. Activation of this pathway is regulated by the G protein heterodimer which is activated by the complex Wnt/Fzd/Dvl. G protein increases intracellular Ca²⁺ levels which subsequently activates the protein kinase Ca²⁺-dependent (CAMKII), protein kinase C (PKC) and the transcriptional factor NF κ B. Activation of this pathway inhibits the activation of Wnt/ β -catenin pathway and leads to cell disintegration.

Figure 6. Schematic summary of the main elements involved in the MAPK signaling pathway. For a more detailed explanation, see the text.

Figure 7. General diagram of key genes involved in the response to DNA damage.

Figure 8. Model interaction of TGF- β , Wnt, MAPK and ATM/ATR pathways. At the beginning of high-risk HPV infection, genes of TGF- β and MAPK/p38 pathways are over-expressed to activate mechanisms against virus infection. However, the viral protein E5 blocks signal transduction of TGF- β , it also stimulates aberrant activation of components from stress response via p38. Thus, they can also activate mechanisms that allow DNA recombination mediated by ATM/ATR. After viral DNA integration, the canonical Wnt/ β -catenin pathway is activated in response to sub-expression of tumor suppressor genes CER1, Krm, Wif1, Dkk3, etc, which favors β -catenin to be transported to the nucleus and together with TCF induces the overexpression of genes such as c-Jun, CCND1 and Myc, involved in epithelial-mesenchymal transition. Apparently, stress factors can cause aberrant activation of Non-canonical Wnt pathways. Activation of Wnt/ Ca^{2+} inhibits Wnt/ β -catenin and causes the breakdown of intercellular junctions while cellular Wnt/PCP signaling, appears to be involved in the migration and invasion.

Figures

Figure 1

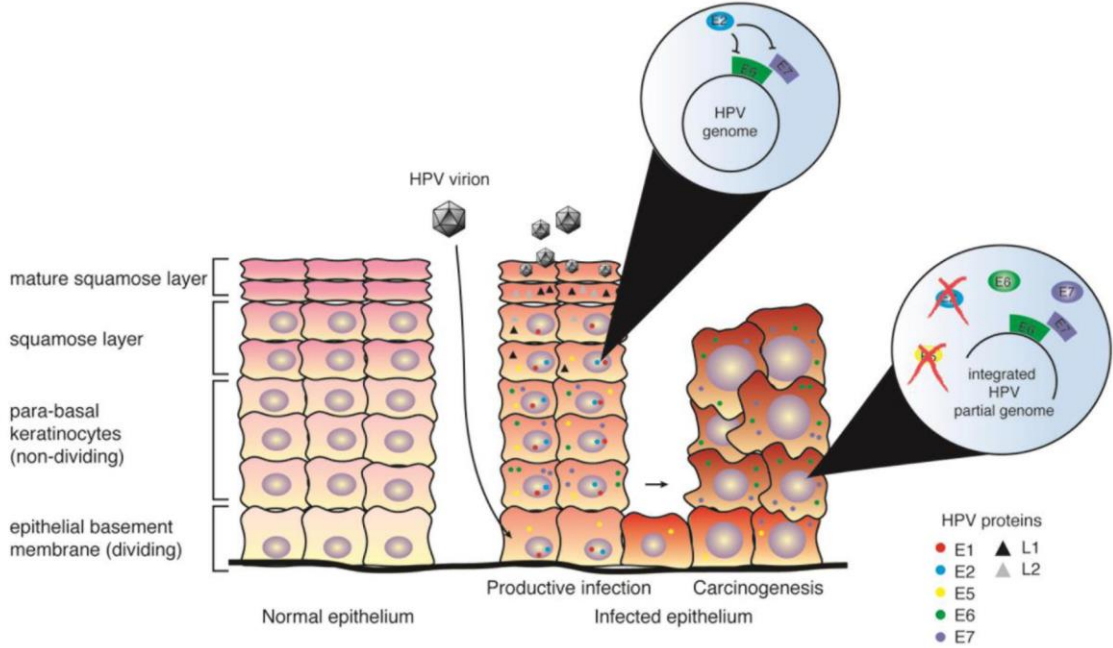


Figure 2

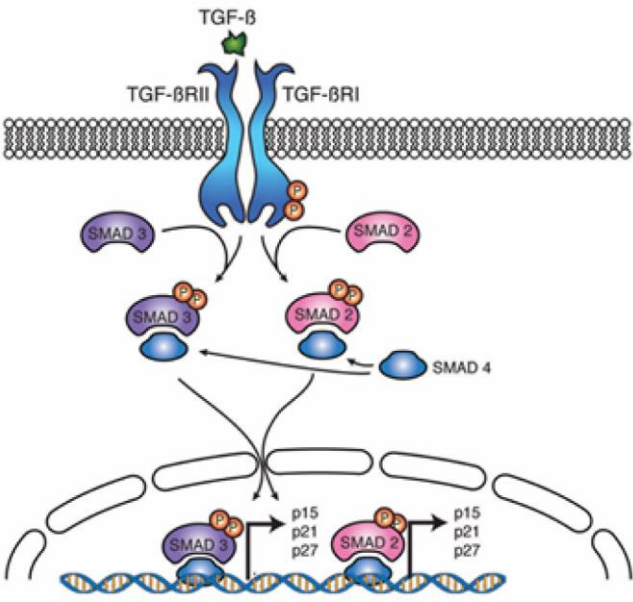


Figure 3

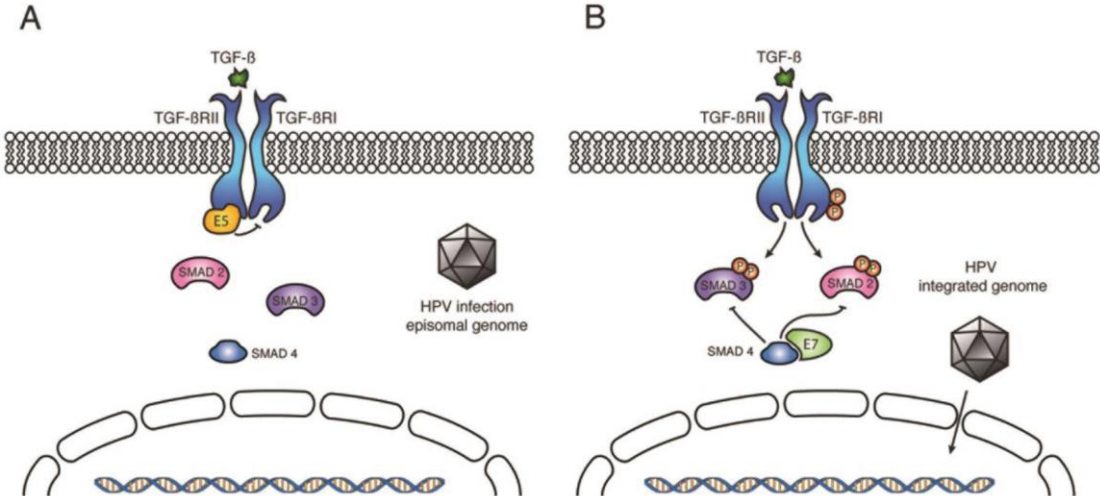


Figure 4

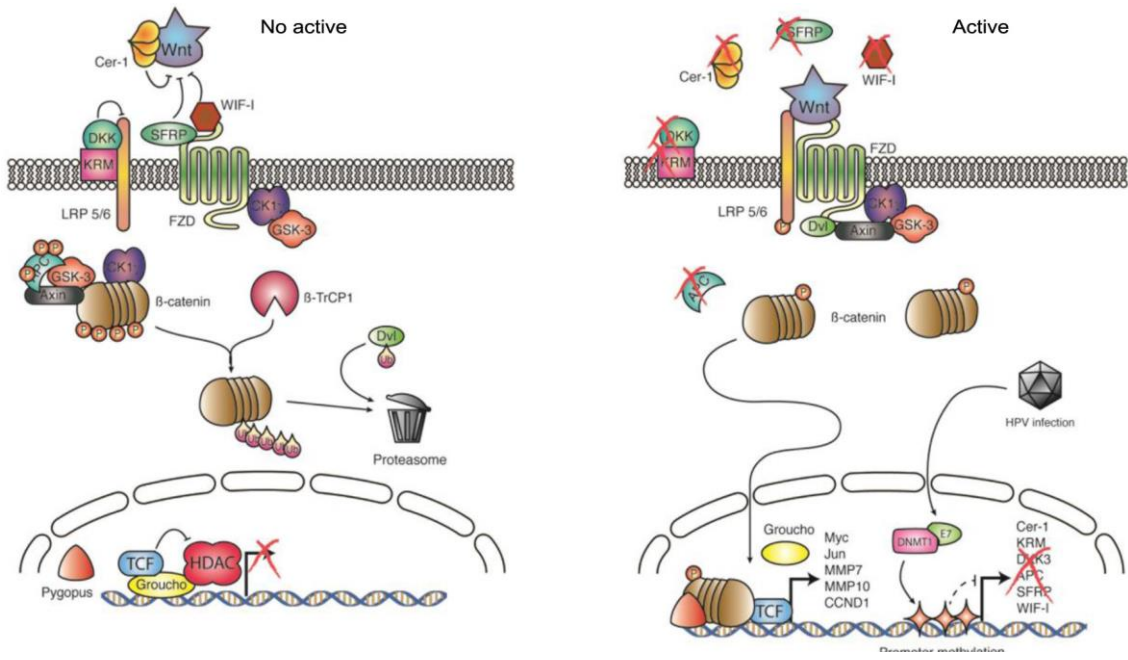


Figure 5

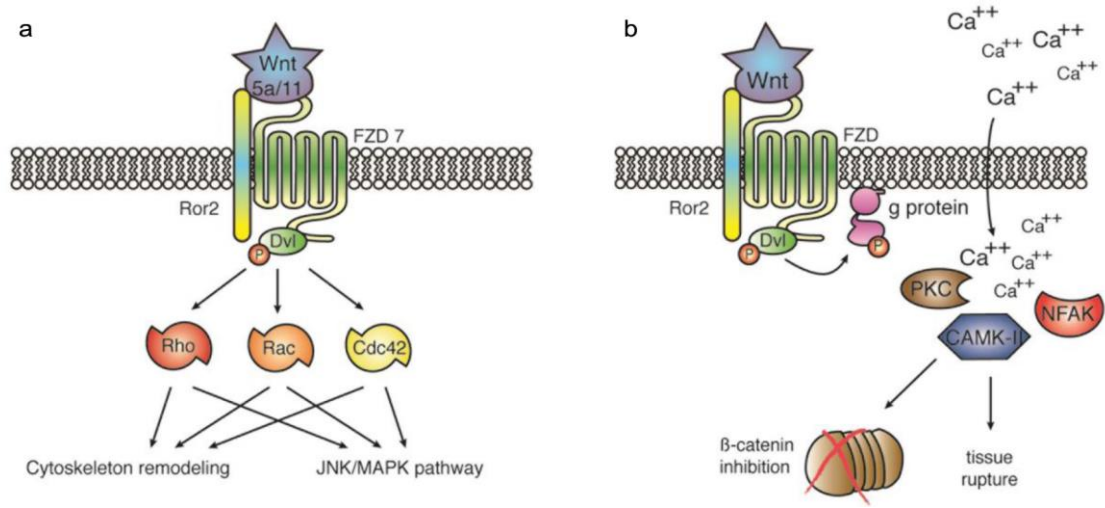


Figure 6

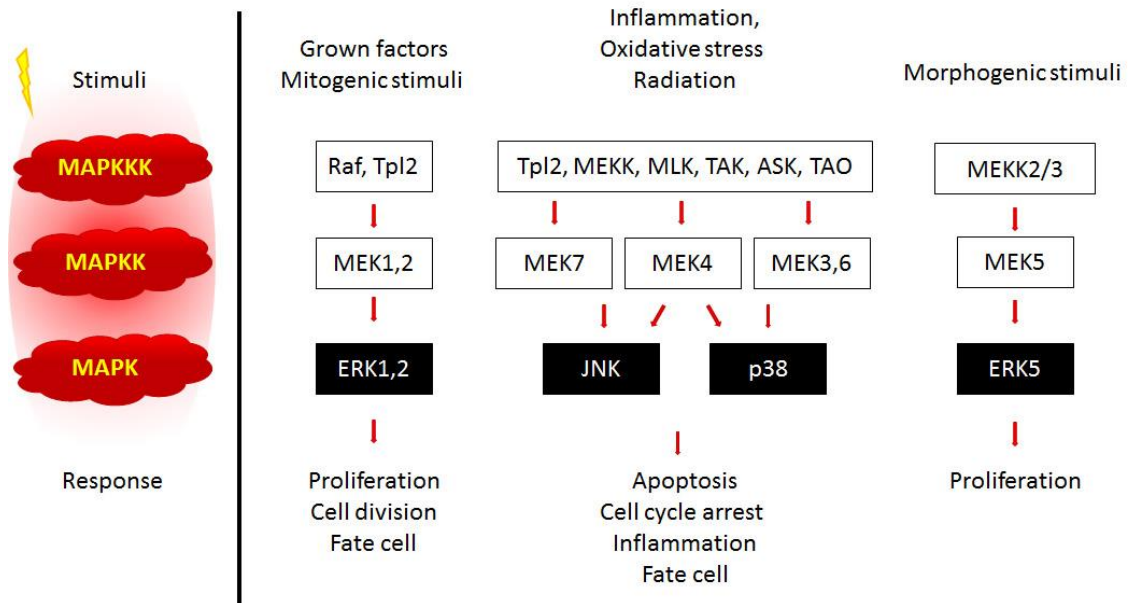


Figure 7

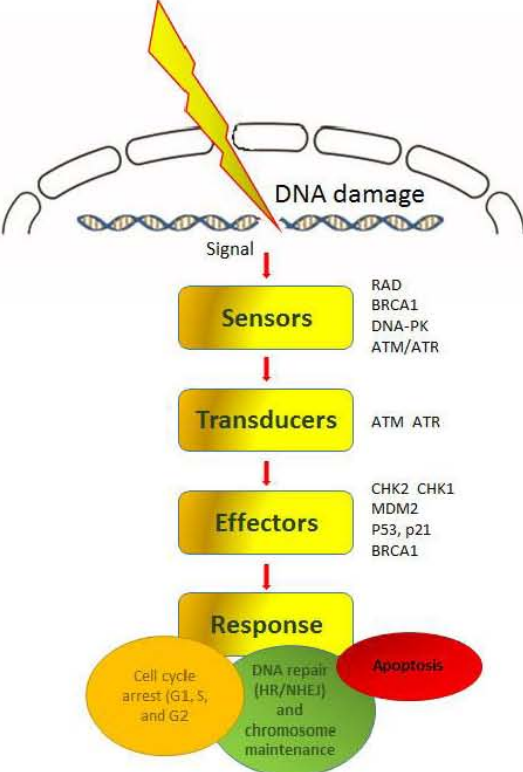
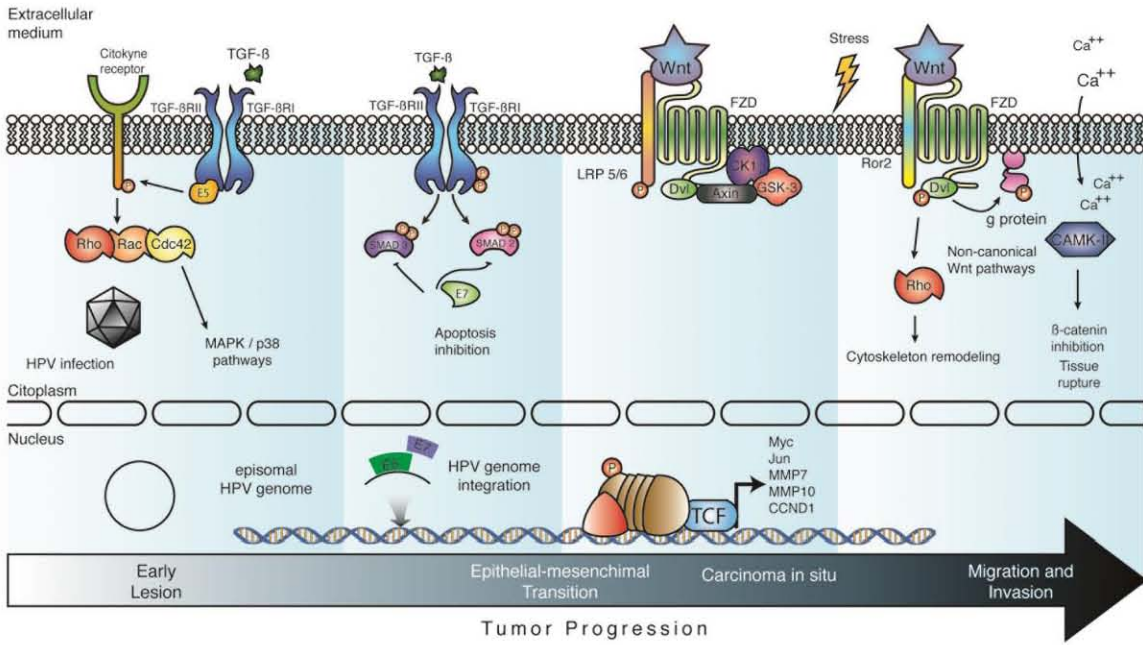


Figure 8



References

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015 Mar;65(2).
2. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2002 May;2(5):342–50.
3. Carlos Pérez-Plasencia, Patricia Piña-Sánchez, Felipe Vaca-Paniagua, Verónica Fragoso-Ontiveros, Nadia Jacobo-Herrera, César López-Camarillo, et al. Molecular Events Towards Wnt Pathway Activation in Cervical Cancer: Changing the Balance on NKD/DVL Signals. Davy Vanden Broeck. Croatia: Bench to Bedside; 2012.
4. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990 Jun 1;61(5):759–67.
5. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar 4;144(5):646–74.
6. Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science.* 1996 Dec 6;274(5293):1672–7.
7. Clarke PA, te Poele R, Wooster R, Workman P. Gene expression microarray analysis in cancer biology, pharmacology, and drug development: progress and potential. *Biochem Pharmacol.* 2001 Nov 15;62(10):1311–36.
8. Chen J, Zhang D, Zhang W, Tang Y, Yan W, Guo L, et al. Clear cell renal cell carcinoma associated microRNA expression signatures identified by an integrated bioinformatics analysis. *J Transl Med.* 2013;11.
9. Xu L, Geman D, Winslow RL. Large-scale integration of cancer microarray data identifies a robust common cancer signature. *BMC Bioinformatics.* 2007;8.
10. Tan BKT, Tan LK, Yu K, Tan PH, Lee M, Sii LH, et al. Clinical validation of a customized multiple signature microarray for breast cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2008 Jan 15;14(2):461–9.
11. Perou CM, Sørliie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000 Aug 17;406(6797):747–52.
12. Wilkerson MD, Yin X, Hoadley KA, Liu Y, Hayward MC, Cabanski CR, et al. Lung squamous cell carcinoma mRNA expression subtypes are reproducible, clinically important, and correspond to normal cell types. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2010 Oct 1;16(19):4864–75.

13. Osunkoya AO, Yin-Goen Q, Phan JH, Moffitt RA, Stokes TH, Wang MD, et al. Diagnostic biomarkers for renal cell carcinoma: selection using novel bioinformatics systems for microarray data analysis. *Hum Pathol.* 2009 Dec;40(12):1671–8.
14. Gyorffy B, Benke Z, Lanczky A, Balazs B, Szallasi Z, Timar J, et al. RecurrenceOnline: an online analysis tool to determine breast cancer recurrence and hormone receptor status using microarray data. *Breast Cancer Res Treat.* 2012 Apr;132(3):1025–34.
15. Perner S, Hofer MD, Kim R, Shah RB, Li H, Moller P, et al. Prostate-specific membrane antigen expression as a predictor of prostate cancer progression. *Hum Pathol.* 2007 May;38(5).
16. Nannini M, Pantaleo MA, Maleddu A, Astolfi A, Formica S, Biasco G. Gene expression profiling in colorectal cancer using microarray technologies: results and perspectives. *Cancer Treat Rev.* 2009 May;35(3):201–9.
17. Van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AAM, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature.* 2002 Jan 31;415(6871):530–6.
18. Van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AAM, Voskuil DW, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med.* 2002 Dec 19;347(25):1999–2009.
19. Bertucci F, Salas S, Eysteries S, Nasser V, Finetti P, Ginestier C, et al. Gene expression profiling of colon cancer by DNA microarrays and correlation with histoclinical parameters. *Oncogene.* 2004 Feb 19;23(7):1377–91.
20. Weigelt B, Hu Z, He X, Livasy C, Carey LA, Ewend MG, et al. Molecular portraits and 70-gene prognosis signature are preserved throughout the metastatic process of breast cancer. *Cancer Res.* 2005 Oct 15;65(20):9155–8.
21. Roepman P, Wessels LFA, Kettelarij N, Kemmeren P, Miles AJ, Lijnzaad P, et al. An expression profile for diagnosis of lymph node metastases from primary head and neck squamous cell carcinomas. *Nat Genet.* 2005 Feb;37(2):182–6.
22. Accetturo M, Pontrelli P, Gesualdo L. The microarray-based approach for the analysis of the transcriptome. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2014;1186:131–99.
23. Del Valle PR, Milani C, Brentani MM, Katayama MLH, de Lyra EC, Carraro DM, et al. Transcriptional profile of fibroblasts obtained from the

- primary site, lymph node and bone marrow of breast cancer patients. *Genet Mol Biol*. 2014 Sep;37(3):480–9.
24. Wong YF, Selvanayagam ZE, Wei N, Porter J, Vittal R, Hu R, et al. Expression genomics of cervical cancer: molecular classification and prediction of radiotherapy response by DNA microarray. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2003 Nov 15;9(15):5486–92.
 25. Zempolich K, Fuhrman C, Milash B, Flinner R, Greven K, Ryu J, et al. Changes in gene expression induced by chemoradiation in advanced cervical carcinoma: a microarray study of RTOG C-0128. *Gynecol Oncol*. 2008 May;109(2):275–9.
 26. Borkamo ED, Schem B-C, Fluge O, Bruland O, Dahl O, Mella O. cDNA microarray analysis of serially sampled cervical cancer specimens from patients treated with thermochemoradiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2009 Dec 1;75(5):1562–9.
 27. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011 Apr;61(2):69–90.
 28. Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol*. 2005 Oct;5(10):749–59.
 29. Erstad DJ, Cusack JCJ. Targeting the NF-kappaB pathway in cancer therapy. *Surg Oncol Clin N Am*. 2013 Oct;22(4):705–46.
 30. Ruutu M, Peitsaro P, Johansson B, Syrjänen S. Transcriptional profiling of a human papillomavirus 33-positive squamous epithelial cell line which acquired a selective growth advantage after viral integration. *Int J Cancer J Int Cancer*. 2002 Jul 20;100(3):318–26.
 31. Mahoney DJ, Cheung HH, Mrad RL, Plenchette S, Simard C, Enwere E, et al. Both cIAP1 and cIAP2 regulate TNFalpha-mediated NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Aug 19;105(33):11778–83.
 32. Peng G, Dan W, Jun W, Junjun Y, Tong R, Baoli Z, et al. Transcriptome profiling of the cancer and adjacent nontumor tissues from cervical squamous cell carcinoma patients by RNA sequencing. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med*. 2015 Jan 14;
 33. Uhlar CM, Whitehead AS. The kinetics and magnitude of the synergistic activation of the serum amyloid A promoter by IL-1 beta and IL-6 is determined by the order of cytokine addition. *Scand J Immunol*. 1999 Apr;49(4).

34. Lu SY, Rodriguez M, Liao WS. YY1 represses rat serum amyloid A1 gene transcription and is antagonized by. *Mol Cell Biol.* 1994 Sep;14(9):6253–63.
35. Connolly M, Marrelli A, Blades M, McCormick J, Maderna P, Godson C, et al. Acute serum amyloid A induces migration, angiogenesis, and inflammation in synovial cells in vitro and in a human rheumatoid arthritis/SCID mouse chimera model. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2010 Jun 1;184(11):6427–37.
36. Lee HY, Kim M-K, Park KS, Bae YH, Yun J, Park J-I, et al. Serum amyloid A stimulates matrix-metalloproteinase-9 upregulation via formyl peptide receptor like-1-mediated signaling in human monocytic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 May 13;330(3):989–98.
37. Gao Y, Theng SS, Zhuo J, Teo WB, Ren J, Lee CGL. FAT10, an ubiquitin-like protein, confers malignant properties in non-tumorigenic and tumorigenic cells. *Carcinogenesis.* 2014 Apr;35(4):923–34.
38. De Geest K, Bergman CA, Turyk ME, Frank BS, Wilbanks GD. Differential response of cervical intraepithelial and cervical carcinoma cell lines to transforming growth factor-beta 1. *Gynecol Oncol.* 1994 Dec;55(3 Pt 1):376–85.
39. Creek KE, Geslani G, Batova A, Pirisi L. Progressive loss of sensitivity to growth control by retinoic acid and transforming growth factor-beta at late stages of human papillomavirus type 16-initiated transformation of human keratinocytes. *Adv Exp Med Biol.* 1995;375:117–35.
40. Clark DA, Coker R. Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Int J Biochem Cell Biol.* 1998 Mar;30(3):293–8.
41. Kajdaniuk D, Marek B, Borgiel-Marek H, Kos-Kudla B. Transforming growth factor beta1 (TGFbeta1) in physiology and pathology. *Endokrynol Pol.* 2013;64(5):384–96.
42. Inman GJ. Switching TGFbeta from a tumor suppressor to a tumor promoter. *Curr Opin Genet Dev.* 2011 Feb;21(1):93–9.
43. Zhang Q, Yu N, Lee C. Vicious cycle of TGF-beta signaling in tumor progression and metastasis. *Am J Clin Exp Urol.* 2014;2(2):149–55.
44. Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature.* 1997 Dec 4;390(6659):465–71.
45. Torng P-L, Chan W-Y, Lin C-T, Huang S-C. Decreased expression of human papillomavirus E2 protein and transforming growth factor-beta1 in

- human cervical neoplasia as an early marker in carcinogenesis. *J Surg Oncol*. 2003 Sep;84(1):17–23.
46. Dumont N, Arteaga CL. Transforming growth factor-beta and breast cancer: Tumor promoting effects of transforming growth factor-beta. *Breast Cancer Res BCR*. 2000;2(2):125–32.
 47. Wakefield LM, Piek E, Böttinger EP. TGF-beta signaling in mammary gland development and tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2001 Jan;6(1):67–82.
 48. Chang C-F, Westbrook R, Ma J, Cao D. Transforming growth factor-beta signaling in breast cancer. *Front Biosci J Virtual Libr*. 2007;12:4393–401.
 49. Blobel GA, Schiemann WP, Lodish HF. Role of Transforming Growth Factor (beta) in Human Disease. *N Engl J Med*. 2000 Jul 20;343(3):228.
 50. Pardoll K, Kowanetz M, Heldin CH, Moustakas A. Smad pathway-specific transcriptional regulation of the cell cycle inhibitor p21(WAF1/Cip1). *J Cell Physiol*. 2005 Jul;204(1):260–72.
 51. Mu Y, Gudey SK, Landstrom M. Non-Smad signaling pathways. *Cell Tissue Res*. 2012 Jan;347(1).
 52. Thomas JT, Oh ST, Terhune SS, Laimins LA. Cellular changes induced by low-risk human papillomavirus type 11 in keratinocytes that stably maintain viral episomes. *J Virol*. 2001 Aug;75(16):7564–71.
 53. Nees M, Geoghegan JM, Munson P, Prabhu V, Liu Y, Androphy E, et al. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins inhibit differentiation-dependent expression of transforming growth factor-beta2 in cervical keratinocytes. *Cancer Res*. 2000 Aug 1;60(15):4289–98.
 54. Duffy CL, Phillips SL, Klingelhutz AJ. Microarray analysis identifies differentiation-associated genes regulated by human papillomavirus type 16 E6. *Virology*. 2003 Sep 15;314(1):196–205.
 55. French D, Belleudi F, Mauro MV, Mazzetta F, Raffa S, Fabiano V, et al. Expression of HPV16 E5 down-modulates the TGFbeta signaling pathway. *Mol Cancer*. 2013;12:38.
 56. Iancu IV, Botezatu A, Goia-Ruşanu CD, Stănescu A, Huică I, Nistor E, et al. TGF-beta signalling pathway factors in HPV-induced cervical lesions. *Roum Arch Microbiol Immunol*. 2010 Sep;69(3):113–8.
 57. Wan F, Miao X, Quraishi I, Kennedy V, Creek KE, Pirisi L. Gene expression changes during HPV-mediated carcinogenesis: a comparison

- between an in vitro cell model and cervical cancer. *Int J Cancer J Int Cancer*. 2008 Jul 1;123(1):32–40.
58. Jakowlew SB. Transforming growth factor-beta in cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2006 Sep;25(3):435–57.
 59. Pérez-Plasencia C, Vázquez-Ortiz G, López-Romero R, Piña-Sanchez P, Moreno J, Salcedo M. Genome wide expression analysis in HPV16 cervical cancer: identification of altered metabolic pathways. *Infect Agent Cancer*. 2007;2:16.
 60. Kloth JN, Fleuren GJ, Oosting J, de Menezes RX, Eilers PHC, Kenter GG, et al. Substantial changes in gene expression of Wnt, MAPK and TNFalpha pathways induced by TGF-beta1 in cervical cancer cell lines. *Carcinogenesis*. 2005 Sep;26(9):1493–502.
 61. Chopra V, Dinh TV, Hannigan EV. Circulating serum levels of cytokines and angiogenic factors in patients with cervical cancer. *Cancer Invest*. 1998;16(3):152–9.
 62. Comerci JT Jr, Runowicz CD, Flanders KC, De Victoria C, Fields AL, Kadish AS, et al. Altered expression of transforming growth factor-beta 1 in cervical neoplasia as an early biomarker in carcinogenesis of the uterine cervix. *Cancer*. 1996 Mar 15;77(6):1107–14.
 63. Yi JY, Hur KC, Lee E, Jin YJ, Arteaga CL, Son YS. TGFbeta1 -mediated epithelial to mesenchymal transition is accompanied by invasion in the SiHa cell line. *Eur J Cell Biol*. 2002 Aug;81(8):457–68.
 64. Hazelbag S, Gorter A, Kenter GG, van den Broek L, Fleuren G. Transforming growth factor-beta1 induces tumor stroma and reduces tumor infiltrate in cervical cancer. *Hum Pathol*. 2002 Dec;33(12):1193–9.
 65. Toussaint-Smith E, Donner DB, Roman A. Expression of human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins in primary foreskin keratinocytes is sufficient to alter the expression of angiogenic factors. *Oncogene*. 2004 Apr 15;23(17):2988–95.
 66. Noordhuis MG, Fehrmann RSN, Wisman GBA, Nijhuis ER, van Zanden JJ, Moerland PD, et al. Involvement of the TGF-beta and beta-catenin pathways in pelvic lymph node metastasis in early-stage cervical cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2011 Mar 15;17(6):1317–30.
 67. Pang K, Ryan JF, NISC Comparative Sequencing Program, Mullikin JC, Baxeavanis AD, Martindale MQ. Genomic insights into Wnt signaling in an early diverging metazoan, the ctenophore *Mnemiopsis leidyi*. *EvoDevo*. 2010;1(1):10.

68. Van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, et al. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell*. 2002 Oct 18;111(2):241–50.
69. Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*. 2005 Apr 14;434(7035):843–50.
70. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*. 2006 Nov 3;127(3):469–80.
71. Nusse R, Varmus H. Three decades of Wnts: a personal perspective on how a scientific field developed. *EMBO J*. 2012 Jun 13;31(12):2670–84.
72. Nusse R, Varmus HE. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell*. 1982 Nov;31(1):99–109.
73. Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, et al. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 May 11;96(10):5522–7.
74. Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*. 1999 Apr 1;398(6726):422–6.
75. Janssens N, Janicot M, Perera T. The Wnt-dependent signaling pathways as target in oncology drug discovery. *Invest New Drugs*. 2006 Jul;24(4):263–80.
76. Perez-Plasencia C, Duenas-Gonzalez A, Alatorre-Tavera B. Second hit in cervical carcinogenesis process: involvement of wnt/beta catenin pathway. *Int Arch Med*. 2008;1(1):10.
77. Mikels AJ, Nusse R. Wnts as ligands: processing, secretion and reception. *Oncogene*. 2006 Dec 4;25(57):7461–8.
78. Anastasiadis PZ, Reynolds AB. The p120 catenin family: complex roles in adhesion, signaling and cancer. *J Cell Sci*. 2000 Apr;113 (Pt 8):1319–34.
79. Reynolds AB, Roczniak-Ferguson A. Emerging roles for p120-catenin in cell adhesion and cancer. *Oncogene*. 2004 Oct 18;23(48):7947–56.
80. Katoh M. WNT/PCP signaling pathway and human cancer (review). *Oncol Rep*. 2005 Dec;14(6):1583–8.
81. Yanagisawa M, Huvelde D, Kreinest P, Lohse CM, Cheville JC, Parker AS, et al. A p120 catenin isoform switch affects Rho activity, induces tumor cell invasion, and predicts metastatic disease. *J Biol Chem*. 2008 Jun 27;283(26):18344–54.

82. Ishitani T, Ninomiya-Tsuji J, Nagai S, Nishita M, Meneghini M, Barker N, et al. The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between beta-catenin and transcription factor TCF. *Nature*. 1999 Jun 24;399(6738):798–802.
83. Almeida M, Han L, Bellido T, Manolagas SC, Kousteni S. Wnt proteins prevent apoptosis of both uncommitted osteoblast progenitors and differentiated osteoblasts by beta-catenin-dependent and -independent signaling cascades involving Src/ERK and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT. *J Biol Chem*. 2005 Dec 16;280(50):41342–51.
84. Bordonaro M, Tewari S, Cicco CE, Atamna W, Lazarova DL. A switch from canonical to noncanonical Wnt signaling mediates drug resistance in colon cancer cells. *PLoS One*. 2011;6(11):e27308.
85. Uren A, Fallen S, Yuan H, Usubütün A, Küçükali T, Schlegel R, et al. Activation of the canonical Wnt pathway during genital keratinocyte transformation: a model for cervical cancer progression. *Cancer Res*. 2005 Jul 15;65(14):6199–206.
86. Fragoso-Ontiveros V, Maria Alvarez-Garcia R, Contreras-Paredes A, Vaca-Paniagua F, Alonso Herrera L, Lopez-Camarillo C, et al. Gene expression profiles induced by E6 from non-European HPV18 variants reveals a differential activation on cellular processes driving to carcinogenesis. *Virology*. 2012 Oct 10;432(1).
87. Niehrs C, Acebron SP. Mitotic and mitogenic Wnt signalling. *EMBO J*. 2012 Jun 13;31(12):2705–13.
88. King TD, Zhang W, Suto MJ, Li Y. Frizzled7 as an emerging target for cancer therapy. *Cell Signal*. 2012 Apr;24(4):846–51.
89. Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*. 2007 May 14;26(22):3279–90.
90. Schaeffer HJ, Weber MJ. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol*. 1999 Apr;19(4):2435–44.
91. Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev*. 2001 Apr;81(2):807–69.
92. Krens SFG, Spaink HP, Snaar-Jagalska BE. Functions of the MAPK family in vertebrate-development. *FEBS Lett*. 2006 Sep 18;580(21):4984–90.
93. Mendoza MC, Er EE, Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem Sci*. 2011 Jun;36(6):320–8.

94. Waggoner SE. Cervical cancer. *Lancet*. 2003 Jun 28;361(9376):2217–25.
95. Whitney CW, Sause W, Bundy BN, Malfetano JH, Hannigan EV, Fowler WC Jr, et al. Randomized comparison of fluorouracil plus cisplatin versus hydroxyurea as an adjunct to radiation therapy in stage IIB-IVA carcinoma of the cervix with negative para-aortic lymph nodes: a Gynecologic Oncology Group and Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1999 May;17(5):1339–48.
96. Morris M, Eifel PJ, Lu J, Grigsby PW, Levenback C, Stevens RE, et al. Pelvic radiation with concurrent chemotherapy compared with pelvic and para-aortic radiation for high-risk cervical cancer. *N Engl J Med*. 1999 Apr 15;340(15):1137–43.
97. Peters WA 3rd, Liu PY, Barrett RJ 2nd, Stock RJ, Monk BJ, Berek JS, et al. Concurrent chemotherapy and pelvic radiation therapy compared with pelvic radiation therapy alone as adjuvant therapy after radical surgery in high-risk early-stage cancer of the cervix. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2000 Apr;18(8):1606–13.
98. Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*. 2012 Apr 12;31(15):1869–83.
99. Snyder AR, Morgan WF. Gene expression profiling after irradiation: clues to understanding acute and persistent responses? *Cancer Metastasis Rev*. 2004 Dec;23(3-4):259–68.
100. Mansouri A, Ridgway LD, Korapati AL, Zhang Q, Tian L, Wang Y, et al. Sustained activation of JNK/p38 MAPK pathways in response to cisplatin leads to Fas ligand induction and cell death in ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem*. 2003 May 23;278(21):19245–56.
101. Brozovic A, Fritz G, Christmann M, Zisowsky J, Jaehde U, Osmak M, et al. Long-term activation of SAPK/JNK, p38 kinase and fas-L expression by cisplatin is attenuated in human carcinoma cells that acquired drug resistance. *Int J Cancer J Int Cancer*. 2004 Dec 20;112(6):974–85.
102. Spierings DCJ, de Vries EGE, Vellenga E, de Jong S. Loss of drug-induced activation of the CD95 apoptotic pathway in a cisplatin-resistant testicular germ cell tumor cell line. *Cell Death Differ*. 2003 Jul;10(7):808–22.
103. Iwakawa M, Ohno T, Imadome K, Nakawatari M, Ishikawa K, Sakai M, et al. The radiation-induced cell-death signaling pathway is activated by concurrent use of cisplatin in sequential biopsy specimens from patients with cervical cancer. *Cancer Biol Ther*. 2007 Jun;6(6):905–11.

104. Kitahara O, Katagiri T, Tsunoda T, Harima Y, Nakamura Y. Classification of sensitivity or resistance of cervical cancers to ionizing radiation according to expression profiles of 62 genes selected by cDNA microarray analysis. *Neoplasia N Y N*. 2002 Aug;4(4):295–303.
105. Rajkumar T, Vijayalakshmi N, Sabitha K, Shirley S, Selvaluxmy G, Bose MV, et al. A 7 gene expression score predicts for radiation response in cancer cervix. *BMC Cancer*. 2009;9:365.
106. Zhang B, Spandau DF, Roman A. E5 protein of human papillomavirus type 16 protects human foreskin keratinocytes from UV B-irradiation-induced apoptosis. *J Virol*. 2002 Jan;76(1):220–31.
107. Zhou BB, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*. 2000 Nov 23;408(6811):433–9.
108. Kastan MB, Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*. 2004 Nov 18;432(7015):316–23.
109. Wilson GD. Radiation and the cell cycle, revisited. *Cancer Metastasis Rev*. 2004 Dec;23(3-4):209–25.
110. Abraham RT. Checkpoint signaling: epigenetic events sound the DNA strand-breaks alarm to the ATM protein kinase. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol*. 2003 Jul;25(7):627–30.
111. Bakkenist CJ, Kastan MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*. 2003 Jan 30;421(6922):499–506.
112. Bartek J, Lukas J. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell*. 2003 May;3(5):421–9.
113. Shiloh Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer*. 2003 Mar;3(3):155–68.
114. Bradbury JM, Jackson SP. The complex matter of DNA double-strand break detection. *Biochem Soc Trans*. 2003 Feb;31(Pt 1):40–4.
115. Harris SL, Levine AJ. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*. 2005 Apr 18;24(17):2899–908.
116. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000 Nov 16;408(6810):307–10.
117. Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, et al. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science*. 1998 Nov 20;282(5393):1497–501.

118. Fridman JS, Lowe SW. Control of apoptosis by p53. *Oncogene*. 2003 Dec 8;22(56):9030–40.
119. Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer*. 2002 Aug;2(8):594–604.
120. Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR*. 2004 Jun;68(2):320–44.
121. Reinhardt HC, Aslanian AS, Lees JA, Yaffe MB. p53-deficient cells rely on ATM- and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage. *Cancer Cell*. 2007 Feb;11(2):175–89.
122. Hagemann T, Bozanovic T, Hooper S, Ljubic A, Slettenaar VIF, Wilson JL, et al. Molecular profiling of cervical cancer progression. *Br J Cancer*. 2007 Jan 29;96(2):321–8.
123. Mora N, Rosales R, Rosales C. R-Ras promotes metastasis of cervical cancer epithelial cells. *Cancer Immunol Immunother Cll*. 2007 Apr;56(4):535–44.
124. Smith GC, Jackson SP. The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev*. 1999 Apr 15;13(8):916–34.
125. Walker JR, Corpina RA, Goldberg J. Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature*. 2001 Aug 9;412(6847):607–14.
126. Huang L, Zheng M, Zhou Q-M, Zhang M-Y, Jia W-H, Yun J-P, et al. Identification of a gene-expression signature for predicting lymph node metastasis in patients with early stage cervical carcinoma. *Cancer*. 2011 Aug 1;117(15):3363–73.

6. Discusión general

A pesar que el cáncer cervical es una enfermedad que se puede prevenir y tratar oportunamente con un pronóstico de sobrevida elevado en las primeras etapas de la enfermedad, este continúa siendo una de las principales causas de muerte de un número significativo de mujeres, principalmente en países como el nuestro. Algunos de los principales factores que provocan este hecho, es que la gran mayoría de las pacientes son diagnosticadas en estadios avanzados que abarcan los estadios IIB–IVA (Waggoner, 2003), Las estadísticas muestran que estas pacientes al ser sometidas al tratamiento estándar sugerido de radiación y quimioterapia basada en cisplatino, aproximadamente solo el 50% de las pacientes responderán de manera satisfactoria al tratamiento, por lo que el 50% restante no tendrá resultados favorables. Con el objetivo de poder tener un mejor entendimiento sobre los mecanismos alterados que promueven esta condición, en nuestra hipótesis de trabajo proponemos que la resistencia al tratamiento es el resultado de alteraciones en la expresión génica, dado que de forma intrínseca existe una expresión diferencial de una serie de transcritos entre los grupos de pacientes sensibles y resistentes al tratamiento, los cuales pueden ser identificados al hacer una asociación con la respuesta clínica. Para poder encontrar y establecer grupos de genes con una mayor capacidad de pronóstico, utilizamos el sistema de análisis de microarreglos de alta densidad, el cual nos permitió evaluar la totalidad de los transcritos del genoma humano. Este sistema nos brinda la ventaja de encontrar grupos de genes blanco óptimos para la predicción, ya que con un panel con menor número de transcritos se corre el riesgo de discriminar genes con potencial. En un trabajo donde se buscó identificar una firma molecular asociada a la metástasis en cáncer cervical (Huang et al., 2011) utilizaron plataformas de microarreglos con un número muy limitado de sondas (1440 genes asociados al cáncer) lo cual limita su potencial predictivo, a diferencia de los microarreglos de alta densidad que se contemplaron para este trabajo de investigación el cual incluyó 45,000 sondas, las cuales

corresponden a los transcritos del todo el genoma humano, que de forma importante, incluyendo las diferentes isoformas de cada gen.

Es importante hacer resaltar que factores como este tiene gran inferencia en los resultados, lo cual se ve reflejado en las discrepancias entre las firmas moleculares reportadas. La carencia de consistencia entre los genes propuestos, puede deberse a la variabilidad. La variabilidad en los resultados se puede explicar por las diferencias en el diseño de las estrategias y/o a las plataformas de microarreglos. Sin embargo, otra razón que puede alterar los resultados del estudio por microarreglos, es la heterogeneidad intratumoral en la expresión de los. Particularmente en cáncer cervical la heterogeneidad intratumoral ocurre a múltiples niveles. En el nivel genómico se presentan ploidias genómicas, aberraciones cromosomales y mutaciones en genes específicos que varían considerablemente entre células de un solo individuo (Chang et al., 1994; Guo et al., 2001; Hu et al., 2002; Koopman et al., 2000; Lyng et al., 2004). Para exentar la heterogeneidad intratumoral, en nuestro trabajo se calculó una muestra poblacional lo suficientemente grande para obtener un resultado confiable. En ese sentido, el análisis realizado en este trabajo se realizó con la población más grande reportada hasta el momento en cáncer cervical que nuestros resultados altamente reproducibles.

Por otro lado, en CC existen trabajos donde se proponen firmas moleculares asociadas a la respuesta a la terapia, pero basándose únicamente en radioterapia, lo cual limita el poder predictivo de los resultados obtenidos para considerar un grupo de genes como parte de una firma molecular (Kitahara et al., 2002; Rajkumar et al., 2009; Wong et al., 2006, 2003). En estos trabajos el objetivo fue obtener una firma génica con la capacidad de predecir que pacientes se pueden beneficiar con un solo tratamiento como lo la radioterapia sin necesidad de quimioterapia basada en cisplatino, sin embargo, los resultados de estos trabajos son poco compatibles y comparables entre si, lo cual disminuye la confiabilidad de la firma para sub-categorización. Estas discrepancias

pueden explicarse debido al tamaño de la muestra poblacional utilizada fue muy pequeña, y por lo tanto disminuye la confiabilidad de los resultados.

También, es importante resaltar que el tratamiento concomitante utiliza mecanismos (físicos y químicos) dirigidos contra el mismo blanco (el DNA genómico), por lo que los mecanismos celulares que confieren la resistencia son prácticamente los mismo con una sutil diferencia en la vía de señalización de la muerte celular (Iwakawa et al., 2007). Por ello en este trabajo tomamos en cuenta la importancia de establecer una firma molecular que permita predecir la respuesta al tratamiento estándar considerando una muestra poblacional mayor y así disminuir las variaciones debidas al tamaño de muestra y de las sondas utilizadas.

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral forman parte del primer reporte que establece firmas moleculares asociadas al tratamiento concomitante en CC con un número de muestras estadísticamente significativas. En países como el nuestro es imperativo el desarrollo de este tipo de investigaciones, ya que en la actualidad no existen métodos de predicción temprana eficientes que permitan mejorar la esperanza de vida de las pacientes diagnosticadas en estadios localmente avanzados.

Con el propósito de emplear y validar los resultados obtenidos por medio del sistema de microarreglos, en este trabajo trasladamos los resultados a una plataforma de menor costo para su fácil aplicación e interpretación con el grupo de genes seleccionados. Uno de los principales retos fue desarrollar una estrategia para la normalización estándar, ya que frecuentemente al cambiar de una plataforma como los microarreglos de expresión a una de qRT-PCR, los datos suelen no ser concurrentes si no se toman las consideraciones requeridas (Vandesompele et al., 2002). En el análisis por qRT-PCR, el nivel de expresión de los genes obtenidos mediante microarreglos dependen en gran medida de la normalización de los datos mediante los genes constitutivos

(housekeeping), los cuales se consideran como genes que se expresan de manera constante en diferentes tejidos. Para nuestros análisis seleccionamos los transcritos de beta actina (ACTB) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Aunque ambos genes se han empleado de forma tradicional, en distintos trabajos se ha reportado que pueden variar considerablemente bajo ciertas condiciones particulares (Spanakis, 1993; Thellin et al., 1999). Con nuestros resultados demostramos que para las muestras de CC la normalización por GAPDH es un mejor control de normalización de datos, permitiendo una mejor clasificación de las pacientes. Aunque este resultado muestra que la normalización de los datos con GAPDH tiene resultados más consistentes que con beta-actina, es recomendable evaluar otros genes constitutivos para mejorar la eficiencia de pronóstico de las firmas descritas en este trabajo.

Finalmente, para cumplir con el objetivo de hacer accesibles los resultados de este trabajo en la práctica clínica, desarrollamos un prototipo basado en la técnica de PCR en tiempo real (qRT-PCR), el cual se propone ser usado para la aplicación de la firma molecular de pronóstico de la respuesta al tratamiento convencional. Para ello, se desarrolló un algoritmo que permite correlacionar los datos obtenidos de cada paciente con los perfiles tipo de mala o buena respuesta. El resultado permite obtener un "score" ó valor categórico con el cual los médicos podrán calcular el riesgo potencial de recurrencia y/o progresión, y de esta forma seleccionar el tratamiento más óptimo. Este prototipo debe ser aplicado en un nuevo grupo de pacientes, para poder certificar su eficiencia como predictor de la respuesta al tratamiento.

A pesar que en los productos obtenidos de esta tesis doctoral no se mostró como un resultado primordial sobre la clasificación en CC, en el artículo "Transcript profiling distinguishes complete treatment responders with locally advanced cervical cancer"; se muestra en la figura 1, que existen dos sub-grupos constituidos por 2133 genes claramente delimitados. Esto es muy relevante dado que actualmente en CC el tratamiento para cada paciente depende de la clasificación exacta del

tumor. Aunque la herramienta principal para el diagnóstico sigue siendo el análisis de las características morfológicas de las biopsias, el uso de microarreglos de expresión ha permitido mejorar la clasificación de algunos tipos de tumores. Debido a que la acumulación y el efecto combinatorio de las anormalidades que dirigen el inicio y la progresión tumoral, son el resultado de alteraciones en el nivel de expresión (Clarke, te Poele et al. 2001), en su conjunto forman un retrato molecular, que puede ser utilizado para completar de manera más precisa la clasificación. No obstante, es importante resaltar que el gran poder del análisis por microarreglos se genera al comparar un número importante de muestras hibridadas donde se pueden identificar patrones de la expresión génica diferencialmente expresados. Con ello es posible establecer nuevos sub-grupos dentro de esta población. Además, la información obtenida a partir de microarreglos puede ser integrada con otros métodos de diagnóstico clínico y mejorar el diagnóstico; debido a que no solo clasifica las muestras tumorales en categorías taxonómicas conocidas sino que permite identificar nuevos sub-grupos. En cáncer cervical se han hecho pocos trabajos para la clasificación. En el estudio de Wong y colaboradores (Wong, Selvanayagam et al. 2003) se comparó el perfil de expresión de 16 pacientes con cáncer cervicouterino en estadios IB y IIB y ocho muestras de tejido normal de cérvix, e identificaron 40 genes expresados diferencialmente entre tejido normal y tumoral; pero interesantemente, proponen que los estadios IB y IIB pueden ser clasificados mediante los perfiles de expresión mediante la expresión diferencial de 300 genes. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo en pacientes con cáncer cervicouterino localmente avanzado revelaron un perfil molecular, que permitió el descubrimiento de dos clases o sub-grupos de tumores asociados a este fenómeno. Este descubrimiento tiene gran relevancia porque refuerza de forma muy clara la actual clasificación (mayoritariamente basada en características clínicas) pudiendo ser optimizada mediante estos métodos moleculares. En trabajos previos se ha demostrado el potencial para el establecimiento de clases o sub-grupos tumorales, mediante el

análisis molecular; por ejemplo, en la leucemia aguda se distinguieron; la leucemia mieloide aguda de la linfoblástica aguda. Esta nueva clasificación de leucemias, mediante perfiles de expresión, permitió perfeccionar el diagnóstico, lo cual es fundamental para proporcionar un tratamiento efectivo (Golub et al., 1999). Otro trabajo donde se demostró como el establecimiento de grupos basados en perfiles moleculares puede generar una nueva sub-clasificación taxonómica; fue el de Alizadeh y colaboradores (Alizadeh et al., 2000) donde estudiaron el linfoma difuso de células B grandes (DLBCL, por sus siglas en Ingles), el subtipo más común de linfoma de no Hodgkin, para el cual no hay marcadores de diagnóstico morfológicos, clínicos, inmunohistoquímico ó genéticos confiables (Harris et al., 1999). Sin embargo, mediante el uso de microarreglos, fueron capaces de distinguir dos grupos anteriormente desconocidos de DLBCL. Los nuevos sub-grupos se denominaron; linfoma difuso de centro germinal de células tipo B y linfoma difuso de células B grandes activado, donde la principal diferencia entre ellos son los genes expresados diferencialmente involucrados en la activación de células B y la formación de centros germinales. Así, nuestros resultados demuestran la existencia de dos sub-grupos de tumores cervicales en estadio localmente avanzados; un sub-grupo formado principalmente por tumores con la capacidad de resistir las agresiones del tratamiento convencional, además de tener la capacidad de proliferar extensamente; mientras que el otro sub-grupo esta constituido en su mayoría por tumores sensibles al mismo tratamiento. Estos Hallazgos tienen relevancia dado que, las pacientes en estadios localmente avanzados son sometidas de manera indiscriminada al tratamiento convencional, donde las células resistentes, son favorecidas por el tratamiento convencional, de tal manera que el tratamiento para las pacientes puede actuar como un mecanismo de selección clonal; es decir, las alternativas terapéuticas (radiación y/o quimioterapia) pueden eliminar un tipo células tumorales sensibles, pero al mismo tiempo favorece la proliferación de las células resistentes (Yates and Campbell, 2012). Por ello el conocimiento exacto de porque las pacientes

sometidas al tratamiento pueden manifestar distintas respuestas al tratamiento como es la recurrencia, progresión y/o metástasis distal, permitirá una mejor aplicación de las terapias concomitantes o adyuvantes.

Finalmente, para concluir este trabajo, se realizó un estudio retrospectivo de las distintas publicaciones donde se han utilizado microarreglos para analizar los cambios en los perfiles de expresión en respuesta a distintos estímulos en CC. Esta revisión bibliográfica nos permitió proponer un modelo teórico que describe como los procesos celulares interactúan y se van activando durante la carcinogénesis cervical. Lo cual es uno de los objetivos del programa, el poder hacer propuestas congruentes a un problema específico.

En resumen, en este trabajo se realizó un estudio molecular de los perfiles de expresión de pacientes diagnosticadas con cáncer cervical localmente avanzado y su correlación con la respuesta clínica, utilizando herramientas moleculares. La innovación de esta tesis doctoral se puede hallar porque este trabajo es el único asociado al tratamiento estándar (radio más quimioterapia basada en cisplatino), y también es el trabajo con la mayor muestra poblacional analizada por microarreglos. Los resultados obtenidos en la predicción de la respuesta al tratamiento fueron patentados, para su protección intelectual. El siguiente objetivo es la validación de la firma en una nueva población mayor, lo cual certificara la eficiencia de la firma y podrá ser propuesta para la aplicación en la práctica clínica.

Utilizando los genes que codifican para proteasas denominados como el degradoma analizamos un grupo específico de genes que por su naturaleza proteolítica están muy relacionados con el proceso de metástasis, por ello los resultados obtenidos tienen mayor reproducibilidad y capacidad para pronosticar de manera anticipada la metástasis distal en pacientes con cáncer cervicouterino.

La ventaja directa de estos resultados es su aplicación en la práctica clínica en un futuro no muy lejano, Las firmas moleculares obtenidas serán una herramienta genómica que se aplicará a cada paciente dando lugar a la era de la medicina personalizada desde el diagnóstico.

7. Conclusiones generales

Existen dos sub-grupos de tumores en pacientes diagnosticadas con cáncer cervical localmente avanzados

1. Se ha identificado un perfil genético compuesto por 28 genes cuya expresión se asocia a una buena respuesta a la radio-quimioterapia en el cáncer cervicouterino localmente avanzado.
2. Se desarrolló un prototipo basado en el análisis por qRT-PCR para poder predecir la respuesta al tratamiento convencional en pacientes con cáncer cervical localmente avanzado.
3. El análisis por microarreglos permitió comprender la participación de los genes que codifican para proteínas del degradoma y sus inhibidores en la carcinogénesis tumoral.
4. Se encontraron diez genes del degradoma que pueden pronosticar la metástasis en pacientes diagnosticadas con cáncer cervicouterino localmente avanzado.
5. Mediante el análisis por microarreglos es posible comprender la forma en la que elementos de diversas vías de señalización pueden interactuar, en el presente trabajo se describió el estado del arte de las principales vías de señalización involucradas en la carcinogénesis cervical.

8. Perspectivas generales

A pesar de que se han hecho grandes esfuerzos en la prevención del cáncer cervicouterino a nivel mundial; estos se han centrado en el tamizaje de las mujeres mediante la prueba de Papanicolaou y el tratamiento de las lesiones precancerosas; sin embargo no se puede ignorar que en los países en desarrollo, donde se registran 80% de todos los casos nuevos, estas medidas de prevención no han sido efectivas. En estas regiones se ha estimado que aproximadamente sólo un 5% de las mujeres se realizan la prueba de Papanicolaou, aunado a esto se presentan otros factores como las condiciones precarias, la baja calidad de vida y la escasa concientización de la importancia de la prevención; lo cual hace a las mujeres de estas poblaciones más propensas a la infección por VPH y por ende; el riesgo de padecer cáncer cervicouterino.

Es una realidad que durante los próximos años el cáncer cervicouterino continuará siendo un problema de salud pública serio, en países como el nuestro. Es por ello que existe una evidente necesidad de continuar robusteciendo los programas de investigación científica multidisciplinarios con tendencia a identificar alternativas mediante la medicina personalizada en poblaciones como la mexicana, ya que, se desconocen aspectos fundamentales.

Actualmente la aplicación de la medicina genómica ofrece mejores oportunidades en el diagnóstico y la estrategia terapéutica para cada paciente. Un ejemplo de ello son las pruebas de mamaprint y oncotype, las cuales se aplican en el diagnóstico temprano en cáncer de mama y pueden ayudar a seleccionar la mejor estrategia en el tratamiento para cada paciente.

Para las pacientes con cáncer cervical el tratamiento se aplica de forma indiscriminada, sin tomar en cuenta las características moleculares de cada paciente, lo cual ha demostrado que no es una alternativa eficiente. Los resultados obtenidos durante este trabajo doctoral han generado las bases que permitieron el desarrollo de prototipos que distinguen de manera temprana a las pacientes con poco o alto riesgo de falla en el tratamiento o bien de riesgo de metástasis de

acuerdo a su perfil molecular. Nuestro objetivo a futuro es concretar una prueba molecular económica que pueda ser fácilmente aplicada en la práctica clínica, para el pronóstico temprano. No obstante, es necesario evaluar la capacidad de pronóstico de estos prototipos en una población nueva y nutrida; que permita certificar su potencial en la práctica clínica. Para ello es necesario continuar con la investigación que se desarrollo durante este periodo doctoral. Es importante resaltar que nuestra estrategia se seguirá llevando a cabo a través de la correlación de la información clínica y los hallazgos genómicos.

Consideramos que la aplicación en un futuro no lejano tendrá importantes repercusiones en la calidad de vida de las mujeres que son afectadas por este tipo de neoplasias mejorando las condiciones de vida de ellas y sus familias, al contribuir en la aplicación de tratamientos individualizados y, en su caso, con mayor eficacia terapéutica.

9. Referencias generales

1. Abraham, R.T., 2003. Checkpoint signaling: epigenetic events sound the DNA strand-breaks alarm to the ATM protein kinase. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 25, 627–630. doi:10.1002/bies.10310
2. Alizadeh, A.A., Eisen, M.B., Davis, R.E., Ma, C., Lossos, I.S., Rosenwald, A., Boldrick, J.C., Sabet, H., Tran, T., Yu, X., Powell, J.I., Yang, L., Marti, G.E., Moore, T., Hudson, J., Jr, Lu, L., Lewis, D.B., Tibshirani, R., Sherlock, G., Chan, W.C., Greiner, T.C., Weisenburger, D.D., Armitage, J.O., Warnke, R., Levy, R., Wilson, W., Grever, M.R., Byrd, J.C., Botstein, D., Brown, P.O., Staudt, L.M., 2000. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403, 503–511. doi:10.1038/35000501
3. Bakkenist, C.J., Kastan, M.B., 2003. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421, 499–506. doi:10.1038/nature01368
4. Barrier, A., Boelle, P.-Y., Roser, F., Gregg, J., Tse, C., Brault, D., Lacaine, F., Houry, S., Huguier, M., Franc, B., Flahault, A., Lemoine, A., Dudoit, S., 2006. Stage II colon cancer prognosis prediction by tumor gene expression profiling. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 24, 4685–4691. doi:10.1200/JCO.2005.05.0229
5. Borst, P., Evers, R., Kool, M., Wijnholds, J., 2000. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 1295–1302.
6. Bruni, L., Diaz, M., Castellsagué, X., Ferrer, E., Bosch, F.X., de Sanjosé, S., 2010. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J. Infect. Dis.* 202, 1789–1799. doi:10.1086/657321
7. Candelaria, M., Garcia-Arias, A., Cetina, L., Dueñas-Gonzalez, A., 2006. Radiosensitizers in cervical cancer. Cisplatin and beyond. *Radiat. Oncol. Lond. Engl.* 1, 15. doi:10.1186/1748-717X-1-15
8. Chang, A.R., Grignon, D.J., Keeney, M.M., Koster, J.L., Kirk, M.E., 1994. DNA content in cervical carcinoma: a flow cytometric assessment of DNA heterogeneity. *Int. J. Gynecol. Pathol. Off. J. Int. Soc. Gynecol. Pathol.* 13, 330–336.
9. Clarke, P.A., te Poele, R., Wooster, R., Workman, P., 2001. Gene expression microarray analysis in cancer biology, pharmacology, and drug development: progress and potential. *Biochem. Pharmacol.* 62, 1311–1336.
10. Eastman, A., 1987. The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes. *Pharmacol. Ther.* 34, 155–166.
11. Forman, D., de Martel, C., Lacey, C.J., Soerjomataram, I., Lortet-Tieulent, J., Bruni, L., Vignat, J., Ferlay, J., Bray, F., Plummer, M., Franceschi, S., 2012. Global burden of human papillomavirus and related diseases. *Vaccine* 30 Suppl 5, F12–23. doi:10.1016/j.vaccine.2012.07.055
12. Franceschi, S., Herrero, R., Clifford, G.M., Snijders, P.J.F., Arslan, A., Anh, P.T.H., Bosch, F.X., Ferreccio, C., Hieu, N.T., Lazcano-Ponce, E., Matos, E., Molano, M., Qiao, Y.-L., Rajkumar, R., Ronco, G., de Sanjosé, S., Shin, H.-R., Sukvirach, S., Thomas, J.O., Meijer, C.J.L.M., Muñoz, N., 2006. Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 119, 2677–2684. doi:10.1002/ijc.22241

13. Galluzzi, L., Senovilla, L., Vitale, I., Michels, J., Martins, I., Kepp, O., Castedo, M., Kroemer, G., 2012. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* 31, 1869–1883. doi:10.1038/onc.2011.384
14. Gillet, L.C.J., Schäfer, O.D., 2006. Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chem. Rev.* 106, 253–276. doi:10.1021/cr040483f
15. Golub, T.R., Slonim, D.K., Tamayo, P., Huard, C., Gaasenbeek, M., Mesirov, J.P., Coller, H., Loh, M.L., Downing, J.R., Caligiuri, M.A., Bloomfield, C.D., Lander, E.S., 1999. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 286, 531–537.
16. Grem, J.L., 1998. Recent insights into the molecular basis of intrinsic resistance of colorectal cancer: new challenges for systemic therapeutic approaches. *Cancer Treat. Res.* 98, 293–338.
17. Grigiene, R., Valuckas, K.P., Aleknavicius, E., Kurtinaitis, J., Letautiene, S.R., 2007. The value of prognostic factors for uterine cervical cancer patients treated with irradiation alone. *BMC Cancer* 7, 234. doi:10.1186/1471-2407-7-234
18. Grigsby, P.W., Siegel, B.A., Dehdashti, F., 2001. Lymph node staging by positron emission tomography in patients with carcinoma of the cervix. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 19, 3745–3749.
19. Guo, Z., Wu, F., Asplund, A., Hu, X., Mazurenko, N., Kisseljev, F., Pontén, J., Wilander, E., 2001. Analysis of intratumoral heterogeneity of chromosome 3p deletions and genetic evidence of polyclonal origin of cervical squamous carcinoma. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* 14, 54–61. doi:10.1038/modpathol.3880256
20. Hacker, N.F., 2009. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva. *Int. J. Gynecol. Obstet.* 105, 105–106. doi:10.1016/j.ijgo.2009.02.011
21. Haffty, B.G., Glazer, P.M., 2003. Molecular markers in clinical radiation oncology. *Oncogene* 22, 5915–5925. doi:10.1038/sj.onc.1206704
22. Haie-Meder, C., Chargari, C., Rey, A., Dumas, I., Morice, P., Magné, N., 2009. DVH parameters and outcome for patients with early-stage cervical cancer treated with preoperative MRI-based low dose rate brachytherapy followed by surgery. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* 93, 316–321. doi:10.1016/j.radonc.2009.05.004
23. Hareyama, M., Sakata, K., Oouchi, A., Nagakura, H., Shido, M., Someya, M., Koito, K., 2002. High-dose-rate versus low-dose-rate intracavitary therapy for carcinoma of the uterine cervix: a randomized trial. *Cancer* 94, 117–124.
24. Harris, N.L., Jaffe, E.S., Diebold, J., Flandrin, G., Muller-Hermelink, H.K., Vardiman, J., Lister, T.A., Bloomfield, C.D., 1999. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 17, 3835–3849.
25. Hart, K., Han, I., Deppe, G., Malviya, V., Malone, J., Christensen, C., Chuba, P., Porter, A., 1997. Postoperative radiation for cervical cancer with pathologic risk factors. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 37, 833–838.
26. Hu, X., Pang, T., Asplund, A., Pontén, J., Nistér, M., 2002. Clonality analysis of synchronous lesions of cervical carcinoma based on X chromosome inactivation polymorphism, human papillomavirus type 16 genome mutations, and loss of heterozygosity. *J. Exp. Med.* 195, 845–854.
27. Huang, L., Zheng, M., Zhou, Q.-M., Zhang, M.-Y., Jia, W.-H., Yun, J.-P., Wang, H.-Y., 2011. Identification of a gene-expression signature for predicting lymph node metastasis in

- patients with early stage cervical carcinoma. *Cancer* 117, 3363–3373. doi:10.1002/cncr.25870
28. Ismail, I.H., Mårtensson, S., Moshinsky, D., Rice, A., Tang, C., Howlett, A., McMahon, G., Hammarsten, O., 2004. SU11752 inhibits the DNA-dependent protein kinase and DNA double-strand break repair resulting in ionizing radiation sensitization. *Oncogene* 23, 873–882. doi:10.1038/sj.onc.1207303
 29. Iwakawa, M., Ohno, T., Imadome, K., Nakawatari, M., Ishikawa, K., Sakai, M., Katoh, S., Ishikawa, H., Tsujii, H., Imai, T., 2007. The radiation-induced cell-death signaling pathway is activated by concurrent use of cisplatin in sequential biopsy specimens from patients with cervical cancer. *Cancer Biol. Ther.* 6, 905–911.
 30. Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D., 2011. Global cancer statistics. *CA. Cancer J. Clin.* 61, 69–90. doi:10.3322/caac.20107
 31. Johnston, P.G., Lenz, H.J., Leichman, C.G., Danenberg, K.D., Allegra, C.J., Danenberg, P.V., Leichman, L., 1995. Thymidylate synthase gene and protein expression correlate and are associated with response to 5-fluorouracil in human colorectal and gastric tumors. *Cancer Res.* 55, 1407–1412.
 32. Kapp, K.S., Poschauko, J., Taus, J., Berghold, A., Oechs, A., Lahousen, M., Petru, E., Winter, R., Kapp, D.S., 2005. Analysis of the prognostic impact of tumor embolization before definitive radiotherapy for cervical carcinoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 62, 1399–1404. doi:10.1016/j.ijrobp.2004.12.037
 33. Kim, D.H., Wang-Chesebro, A., Weinberg, V., Pouliot, J., Chen, L.-M., Speight, J., Littell, R., Hsu, I.-C., 2009. High-dose rate brachytherapy using inverse planning simulated annealing for locoregionally advanced cervical cancer: a clinical report with 2-year follow-up. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 75, 1329–1334. doi:10.1016/j.ijrobp.2009.01.002
 34. Kitahara, O., Katagiri, T., Tsunoda, T., Harima, Y., Nakamura, Y., 2002a. Classification of sensitivity or resistance of cervical cancers to ionizing radiation according to expression profiles of 62 genes selected by cDNA microarray analysis. *Neoplasia N. Y.* 4, 295–303. doi:10.1038/sj.neo.7900251
 35. Kjaer, S., Høgdall, E., Frederiksen, K., Munk, C., van den Brule, A., Svare, E., Meijer, C., Lorincz, A., Iftner, T., 2006. The absolute risk of cervical abnormalities in high-risk human papillomavirus-positive, cytologically normal women over a 10-year period. *Cancer Res.* 66, 10630–10636. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1057
 36. Koopman, L.A., Corver, W.E., van der Slik, A.R., Giphart, M.J., Fleuren, G.J., 2000. Multiple genetic alterations cause frequent and heterogeneous human histocompatibility leukocyte antigen class I loss in cervical cancer. *J. Exp. Med.* 191, 961–976.
 37. Lando, M., Holden, M., Bergersen, L.C., Svendsrud, D.H., Stokke, T., Sundfjør, K., Glad, I.K., Kristensen, G.B., Lyng, H., 2009. Gene dosage, expression, and ontology analysis identifies driver genes in the carcinogenesis and chemoradioresistance of cervical cancer. *PLoS Genet.* 5, e1000719. doi:10.1371/journal.pgen.1000719
 38. Landoni, F., Maneo, A., Colombo, A., Placa, F., Milani, R., Perego, P., Favini, G., Ferri, L., Mangioni, C., 1997. Randomised study of radical surgery versus radiotherapy for stage Ib-IIa cervical cancer. *Lancet* 350, 535–540. doi:10.1016/S0140-6736(97)02250-2
 39. Lertsanguansinchai, P., Lertbutsayanukul, C., Shotelersuk, K., Khorprasert, C., Rojpornpradit, P., Chottetanaprasith, T., Srisuthep, A., Suriyapee, S., Jumpangern, C., Tresukosol, D., Charoonsantikul, C., 2004. Phase III randomized trial comparing LDR and HDR brachytherapy in treatment of cervical carcinoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 59, 1424–1431. doi:10.1016/j.ijrobp.2004.01.034

40. Lewis, Merle J, 2004. Análisis de la situación del cáncer cervicouterino en América Latina y el Caribe. *Pan Am. Health Organ.*
41. Lyng, H., Beigi, M., Svendsrud, D.H., Brustugun, O.T., Stokke, T., Kristensen, G.B., Sundfjør, K., Skjønberg, A., De Angelis, P.M., 2004. Intratumor chromosomal heterogeneity in advanced carcinomas of the uterine cervix. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 111, 358–366. doi:10.1002/ijc.20258
42. Malinowski, D.P., 2005. Molecular diagnostic assays for cervical neoplasia: emerging markers for the detection of high-grade cervical disease. *BioTechniques Suppl*, 17–23.
43. Mitsuhashi, A., Uno, T., Tanaka, N., Suzuka, K., Tate, S., Yamazawa, K., Matsui, H., Yamamoto, S., Ito, H., Sekiya, S., 2005. Phase I study of daily cisplatin and concurrent radiotherapy in patients with cervical carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 96, 194–197. doi:10.1016/j.ygyno.2004.09.038
44. National Comprehensive Cancer Network, (NCCN), 2009a. Clinical Practice Guidelines in Oncology Cervical cancer. V.1.2009.
45. Nias, A.H.W., 1998. An introduction to radiobiology, 2nd ed. ed. Wiley, Chichester ; New York.
46. Oh, G.-S., Kim, H.-J., Shen, A., Lee, S.B., Khadka, D., Pandit, A., So, H.-S., 2014. Cisplatin-induced Kidney Dysfunction and Perspectives on Improving Treatment Strategies. *Electrolyte Blood Press. E BP* 12, 55–65. doi:10.5049/EBP.2014.12.2.55
47. Perez-Plasencia, C., Duenas-Gonzalez, A., 2006. Can the state of cancer chemotherapy resistance be reverted by epigenetic therapy? *Mol. Cancer* 5, 27. doi:10.1186/1476-4598-5-27
48. Powell, S., McMillan, T.J., 1990. DNA damage and repair following treatment with ionizing radiation. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* 19, 95–108.
49. Rajkumar, T., Vijayalakshmi, N., Sabitha, K., Shirley, S., Selvaluxmy, G., Bose, M.V., Nambaru, L., 2009a. A 7 gene expression score predicts for radiation response in cancer cervix. *BMC Cancer* 9, 365. doi:10.1186/1471-2407-9-365
50. Roepman, P., Wessels, L.F.A., Kettelarij, N., Kemmeren, P., Miles, A.J., Lijnzaad, P., Tilanus, M.G.J., Koole, R., Hordijk, G.-J., van der Vliet, P.C., Reinders, M.J.T., Slootweg, P.J., Holstege, F.C.P., 2005. An expression profile for diagnosis of lymph node metastases from primary head and neck squamous cell carcinomas. *Nat. Genet.* 37, 182–186. doi:10.1038/ng1502
51. Rose, P.G., Bundy, B.N., Watkins, E.B., Thigpen, J.T., Deppe, G., Maiman, M.A., Clarke-Pearson, D.L., Insalaco, S., 1999. Concurrent cisplatin-based radiotherapy and chemotherapy for locally advanced cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* 340, 1144–1153. doi:10.1056/NEJM199904153401502
52. Secretaría de Salud, 2010. Guías de Práctica Clínica. Diagnóstico y Tratamiento de Cáncer Cervicouterino.
53. Shuck, S.C., Short, E.A., Turchi, J.J., 2008. Eukaryotic nucleotide excision repair: from understanding mechanisms to influencing biology. *Cell Res.* 18, 64–72. doi:10.1038/cr.2008.2
54. Snyder, A.R., Morgan, W.F., 2004. Gene expression profiling after irradiation: clues to understanding acute and persistent responses? *Cancer Metastasis Rev.* 23, 259–268. doi:10.1023/B:CANC.0000031765.17886.fa
55. Spanakis, E., 1993. Problems related to the interpretation of autoradiographic data on gene expression using common constitutive transcripts as controls. *Nucleic Acids Res.* 21, 3809–3819.

56. Stewart, A.J., Bentzen, S.M., 2011. Radiobiological Aspects of Brachytherapy in the Era of 3-Dimensional Imaging, in: Viswanathan, A.N., Kirisits, C., Erickson, B.E., Pötter, R. (Eds.), *Gynecologic Radiation Therapy*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 131–142.
57. Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A., Heinen, E., 1999. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J. Biotechnol.* 75, 291–295.
58. Therasse, P., Arbuck, S.G., Eisenhauer, E.A., Wanders, J., Kaplan, R.S., Rubinstein, L., Verweij, J., Van Glabbeke, M., van Oosterom, A.T., Christian, M.C., Gwyther, S.G., 2000. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 205–216.
59. Van de Vijver, M.J., He, Y.D., van't Veer, L.J., Dai, H., Hart, A.A.M., Voskuil, D.W., Schreiber, G.J., Peterse, J.L., Roberts, C., Marton, M.J., Parrish, M., Atsma, D., Witteveen, A., Glas, A., Delahaye, L., van der Velde, T., Bartelink, H., Rodenhuis, S., Rutgers, E.T., Friend, S.H., Bernards, R., 2002. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 347, 1999–2009. doi:10.1056/NEJMoa021967
60. Van 't Veer, L.J., Dai, H., van de Vijver, M.J., He, Y.D., Hart, A.A.M., Mao, M., Peterse, H.L., van der Kooy, K., Marton, M.J., Witteveen, A.T., Schreiber, G.J., Kerkhoven, R.M., Roberts, C., Linsley, P.S., Bernards, R., Friend, S.H., 2002. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415, 530–536. doi:10.1038/415530a
61. Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3, RESEARCH0034.
62. Viswanathan, A.N., Dimopoulos, J., Kirisits, C., Berger, D., Pötter, R., 2007. Computed tomography versus magnetic resonance imaging-based contouring in cervical cancer brachytherapy: results of a prospective trial and preliminary guidelines for standardized contours. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 68, 491–498. doi:10.1016/j.ijrobp.2006.12.021
63. Wagenaar, H.C., Trimbos, J.B., Postema, S., Anastasopoulou, A., van der Geest, R.J., Reiber, J.H., Kenter, G.G., Peters, A.A., Pattynama, P.M., 2001. Tumor diameter and volume assessed by magnetic resonance imaging in the prediction of outcome for invasive cervical cancer. *Gynecol. Oncol.* 82, 474–482. doi:10.1006/gyno.2001.6267
64. Waggoner, S.E., 2003. Cervical cancer. *Lancet* 361, 2217–2225. doi:10.1016/S0140-6736(03)13778-6
65. Weigelt, B., Hu, Z., He, X., Livasy, C., Carey, L.A., Ewend, M.G., Glas, A.M., Perou, C.M., Van't Veer, L.J., 2005. Molecular portraits and 70-gene prognosis signature are preserved throughout the metastatic process of breast cancer. *Cancer Res.* 65, 9155–9158. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2553
66. Wong, Y.F., Sahota, D.S., Cheung, T.H., Lo, K.W.K., Yim, S.F., Chung, T.K.H., Chang, A.M.Z., Smith, D.I., 2006. Gene expression pattern associated with radiotherapy sensitivity in cervical cancer. *Cancer J. Sudbury Mass* 12, 189–193.
67. Wong, Y.F., Selvanayagam, Z.E., Wei, N., Porter, J., Vittal, R., Hu, R., Lin, Y., Liao, J., Shih, J.W., Cheung, T.H., Lo, K.W.K., Yim, S.F., Yip, S.K., Ngong, D.T., Siu, N., Chan, L.K.Y., Chan, C.S., Kong, T., Kutlina, E., McKinnon, R.D., Denhardt, D.T., Chin, K.-V., Chung, T.K.H., 2003. Expression genomics of cervical cancer: molecular classification and prediction of radiotherapy response by DNA microarray. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 9, 5486–5492.
68. Wood, R.D., Araújo, S.J., Ariza, R.R., Batty, D.P., Biggerstaff, M., Evans, E., Gaillard, P.H., Gunz, D., Köberle, B., Kuraoka, I., Moggs, J.G., Sandall, J.K., Shivji, M.K., 2000. DNA damage

- recognition and nucleotide excision repair in mammalian cells. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 65, 173–182.
69. Yates, L.R., Campbell, P.J., 2012. Evolution of the cancer genome. *Nat. Rev. Genet.* 13, 795–806. doi:10.1038/nrg3317
 70. Yeoh, E.-J., Ross, M.E., Shurtleff, S.A., Williams, W.K., Patel, D., Mahfouz, R., Behm, F.G., Raimondi, S.C., Relling, M.V., Patel, A., Cheng, C., Campana, D., Wilkins, D., Zhou, X., Li, J., Liu, H., Pui, C.-H., Evans, W.E., Naeye, C., Wong, L., Downing, J.R., 2002. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell* 1, 133–143.
 71. Zhang, B., Spandau, D.F., Roman, A., 2002. E5 protein of human papillomavirus type 16 protects human foreskin keratinocytes from UV B-irradiation-induced apoptosis. *J. Virol.* 76, 220–231.
 72. Zur Hausen, H., 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer* 2, 342–350. doi:10.1038/nrc798

En principio no hay mayor diferencia entre el cobarde y una persona valiente. Ambos tienen miedo. La diferencia es que el cobarde escucha sus miedos y los sigue. La persona valiente los coloca a un lado y sigue adelante. Los miedos están allí, los conoce, pero la persona valiente avanza hacia lo desconocido a pesar de los miedos. Valentía no significa ausencia de miedo, sino avanzar hacia lo desconocido a pesar de todos los miedos.

Osho...