



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA CRBP2 EN CÁNCER
DE CÉRVIX**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

MARÍA LUCERO PANIAGUA GARCÍA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. MAURICIO SALCEDO VARGAS
HOSPITAL DE ONCOLOGÍA, CMNS XXI(FACULTAD DE MEDICINA)

COMITÉ TUTOR: DR. RAFAEL CAMACHO CARRANZA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES
FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

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

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, en su sesión ordinaria del día 12 de agosto de 2013, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **PANIAGUA GARCÍA MARÍA LUCERO** con número de cuenta 406024963, con la tesis titulada **"DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA CRBP2 EN CÁNCER DE CÉRVIX"**, realizada bajo la dirección del **DR. MAURICIO SALCEDO VARGAS**:

Presidente: **DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN**
Vocal: **DR. FABIÁN JESÚS ARECHAVALTA VELASCO**
Secretario: **DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES**
Suplente: **DRA. MARTHA PATRICIA OSTROSKY SHEJET**
Suplente: **DR. RAFAEL CAMACHO CARRANZA**

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 15 de octubre de 2013

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por la formación académica brindada.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado para la realización de este proyecto con la beca No. 413084.

A los miembros del Comité Tutorial, Dr. Mauricio Salcedo, Dr. Rafael Camacho y Dr. Marco Cerbón por su tiempo a aportaciones al proyecto.

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

Al Dr. Mauricio por haberme recibido en su laboratorio, su guía y su apoyo para realizar este trabajo.

A los sinodales por su tiempo y apoyo para mejorar y enriquecer la presente tesis: Dra. Marcela Lizano, Dr. Fabian Arechavaleta, Dr. Marco Cerbón, Dr. Patricia Ostroski y Dr. Rafael Camacho.

Al Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), por las facilidades concedidas para la realización de este proyecto.

Al servicio de Colposcopia del Hospital General por las facilidades para la recolección de muestras.

Al servicio de Patología del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

Al laboratorio de Oncología Experimental en el Instituto Nacional de Pediatría por la colaboración y las facilidades otorgadas para la realización de este proyecto.

A mis compañeros del laboratorio, los que están y los que estuvieron, por todos los buenos momentos compartidos, los comentarios enriquecedores y los buenos consejos.

DEDICATORIAS

Sin duda alguna a **mi familia** por todo su apoyo a lo largo de mi vida y que han llegado conmigo hasta este día y seguirán. A **mis padres** por siempre permitirme e impulsarme a hacer lo que me hace feliz. A **mis hermanos** por ser ellos, estar para compartir buenos y malos momentos, reír y permitirme saber que al menos hay 4 personas tan extrañas como yo.

A mis compañeros del posgrado, especialmente al **Equipo α** y a todas las **Mueganas**, por todo su apoyo en las clases, en el trabajo de cada día y todos esos buenos momentos fuera del aula. A **Jannet** especialmente, por ser una gran compañera en esta aventura de la maestría y por ser mi amiga.

A **mis amigos** que son una inspiración y un aliento en mi vida. Especialmente a aquellos he conocido por azares del destino, que no pertenecen a ciencias y que el simple hecho de conocerlos me ha marcado profundamente. **Ingrid** eres un amor de persona gracias por escuchar mis incoherencias, dilemas mentales y locuras, por apoyarme en todas mis aventuras y prestarme el hombro cuando ha sido necesario. Haces que no me sienta tan sola y perdida en el planeta.

A **mis compañeros en la FES-C** por su apoyo cada vez que los necesité. Sin ustedes no hubiera sido posible continuar en el camino de la docencia.

Índice

Índice de figuras.	2
Índice de Cuadros.	2
Resumen.	3
Abstract.....	4
Introducción.	5
Cáncer cérvico uterino.....	5
Factores de riesgo asociados a cáncer cérvico uterino.....	6
Progresión de las lesiones del cérvix.....	9
Alteraciones genómicas del Cáncer Cérvico Uterino.....	11
Retinol.....	14
Proteínas unidoras de retinol en cáncer.....	16
Proteína Celular Unidora de Retinol tipo 2.....	16
Justificación.....	18
Pregunta de investigación.....	19
Hipótesis.	19
Objetivos.	20
General.....	20
Objetivos particulares.....	20
Diseño experimental.....	21
Métodos y materiales.....	22
Resultados.....	28
Discusión.	38
Conclusiones.....	42
Perspectivas.	42
Referencias.....	43

Índice de figuras.

<i>Figura 1. Incidencia y mortalidad de cáncer en mujeres a nivel mundial. Globocan 2008.</i>	5
<i>Figura 2. Progresión de las lesiones del cérvix.</i>	11
<i>Figura 3. Ideograma mostrando alteraciones cromosómicas frecuentes en tumores de cáncer de cérvix.</i>	13
<i>Figura 4. Estructura de la holoproteína CRBP2.</i>	17
<i>Figura 5. Curva estándar para la cuantificación del número de copias.</i>	29
<i>Figura 6. Cuantificación del número de copias del gen CRBP2 en cáncer cérvico uterino.</i>	29
<i>Figura 7 Amplificación del control endógeno 18S.</i>	31
<i>Figura 8. Datos de expresión del mRNA de CRBP2 en CaCu y cérvix sano.</i>	31
<i>Figura 9. Tejidos control de inmunohistoquímica.</i>	32
<i>Figura 10. Inmunohistoquímica que demuestra la expresión de CRBP2.</i>	33
<i>Figura 11. Inmunodetección de CRBP2.</i>	34
<i>Figura 12. Inmunodetección de CRBP2 en urea.</i>	34
<i>Figura 13. Porcentaje de muestras de CaCu positivas a CRBP2.</i>	35
<i>Figura 14. Análisis de la secuencia del promotor de CRBP2.</i>	37

Índice de Cuadros.

<i>Cuadro 1. Genes de VPH asociados a la promoción de cáncer (Kajitani N 2012).</i>	7
<i>Cuadro 2. Ejemplos de genes que contienen elementos de respuesta a AR funcional y/o evolutivamente conservados (Rhinn 2012).</i>	15
<i>Cuadro 3. Descripción de datos clínico patológicos de las muestras analizadas de CaCu.</i>	28
<i>Cuadro 4. Correlación de datos clínicos y el número de copias del gen.</i>	30
<i>Cuadro 5. Análisis de correlación entre expresión de CRBP2 y los datos clínicos de las pacientes.</i>	36

Resumen.

El cáncer cérvico uterino es el segundo tipo de cáncer mas frecuente entre las mujeres, tanto en incidencia como en mortalidad. Los desbalances cromosómicos son una de las alteraciones más frecuentes en este tipo de cáncer, y diversos trabajos concluyen que una alteración característica es la ganancia del brazo largo del cromosoma 3 (3q). Una de las regiones que se observa amplificada con mayor frecuencia en el brazo 3q, es donde se encuentra el gen *CRBP2* (Proteína Celular de Unión a Retinol tipo 2). La proteína para la que codifica esta involucrada con el metabolismo del retinol, el cual participa en la activación de genes relacionados a adhesión, factores de transcripción, enzimas, entre otros. A la fecha no se han descrito las alteraciones o la participación de *CRBP2* en ningún tipo de cáncer, por lo que nos propusimos determinar las alteraciones moleculares de *CRBP2* en cáncer cérvico uterino.

Se colectaron 20 muestras de CaCu y 20 muestras de cérvix sin lesión. Se purificó el ADN y el ARN de las muestras. Con el ADN se realizó la determinación del número de copias del gen *CRBP2* mediante PCR en tiempo real. Con el ARN obtenido de las muestras se determinó el cambio en la cantidad de mRNA mediante PCR en tiempo real. A partir de los tejidos en parafina se realizó un microarreglo de tejidos; con el cual se realizó una inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-*CRBP2*. Por otra parte, la región promotora del gen fue evaluada in silico para determinar la presencia de posibles sitios de unión a CTCF.

En el 50% de las muestras de CaCu evaluadas se detectó un aumento en el número de copias. Por otra parte no se detectó el ARN mensajero en las muestras. Sin embargo cuando se realizó la evaluación de la expresión proteica de *CRBP2* por inmunohistoquímica se observó que el 100% de las muestras fue detectada la proteína, de las cuales el 80% es de manera intensa, mientras que el 20% es de forma débil. Finalmente al realizar el análisis estadístico correspondiente se demuestra que la única correlación significativa es entre la expresión proteica con los antecedentes familiares de cáncer, sin embargo no se encuentra alguna otra correlación entre la expresión proteica ni el aumento en el número de copias con respecto a los datos clínico-patológicos.

Se observó que el 50% de pacientes con cáncer cérvico uterino presentan una ganancia en el número de copias del gen *CRBP2*. La amplificación del gen *CRBP2* no se asocia al aumento en la expresión proteica. La expresión en ARN mensajero del gen *CRBP2* no se encontró. Finalmente, con base en estos resultados se sugiere que *CRBP2* no se encuentra directamente asociado al proceso de carcinogénesis.

Abstract.

Cervical cancer (CC) is the second most common cancer in women worldwide in mortality. Chromosomal imbalances in CC are a very frequent alteration. Several studies conclude that an alteration feature is the gain of the long arm of chromosome 3 (3q). One of the regions that is more frequently amplified in the 3q arm is in 3q21 where the CRBP2 (Protein Cellular Retinol Binding type 2) gene is mapped. This gene encodes a protein which is involved in the retinol metabolism. Retinol and its derivatives participate in the activation of genes related to adhesion, transcription factors, enzymes, and others. So far, alterations of CRBP2 involvement in any type of cancer have not been described, in this context we have decided to determine CRBP2 molecular alterations in CC.

Twenty CC samples of cervical cancer and 20 healthy cervical samples were collected. From them, DNA and RNA were purified and subjected for gene copy number and transcripts by real time PCR. From the tissues, they were used for tissue microarray construction and then subjected for CRBP2 immunodetection assay. Furthermore, CRBP2 promoter region sequence was analyzed to find possible CTCF binding sites. Finally the data was analyzed with SPSS version 16.

The gene copy number assay showed that all the healthy cervical samples had 2 copies of the gene, while the 50% of CC samples showed an increase in the gene copy number. We were not able to detect mRNA in the samples, suggesting the presence of extremely low amounts of transcripts. In contrast, all the tissues showed CRBP2 protein; a strong immunodetection was observed in 80% of the samples and weak reaction for the remaining samples. According to these data, there was not observed any correlation between gain of gene copy number and protein expression; but only a significant correlation between protein expression and family history of cancer was observed.

In conclusion, CRBP2 protein expression is not associated to gain of gene copy number, further there is a constitutive expression of CRBP2 in cervical epithelial cells, and probably, there is not clear association of CRBP2 and CC.

Introducción.

Cáncer cérvico uterino.

El cáncer cérvico uterino (CaCu) es una enfermedad compleja que se caracteriza por la acumulación de múltiples alteraciones moleculares y celulares. Dichas alteraciones permitirán a las células neoplásicas convertirse en tumorigénicas y en última instancia en malignas (Hanahan 2011). Ya existe a disposición mundial una vacuna contra el principal factor etiológico asociado, el Virus de Papiloma Humano, sin embargo sus resultados podrán ser evaluados 20 años aproximadamente por lo que al día de hoy la incidencia continua siendo una de las más altas. Así mismo se ha observado que el CaCu se presenta principalmente en mujeres jóvenes y todavía conduce a la muerte a muchas de estas (Villa 2012, Kaufmann 2012).

Actualmente el cáncer cérvico uterino es una neoplasia que ocupa el segundo lugar a nivel mundial tanto en incidencia como en mortalidad en mujeres (Figura 1), solo detrás

del cáncer de mama; sin embargo aunque se puede observar que en incidencia se encuentran grandes diferencias entre ambos tipos de cáncer, en mortalidad son muy similares (Globocan 2008 n.d., Arbyn 2011, Walboomers 1999).

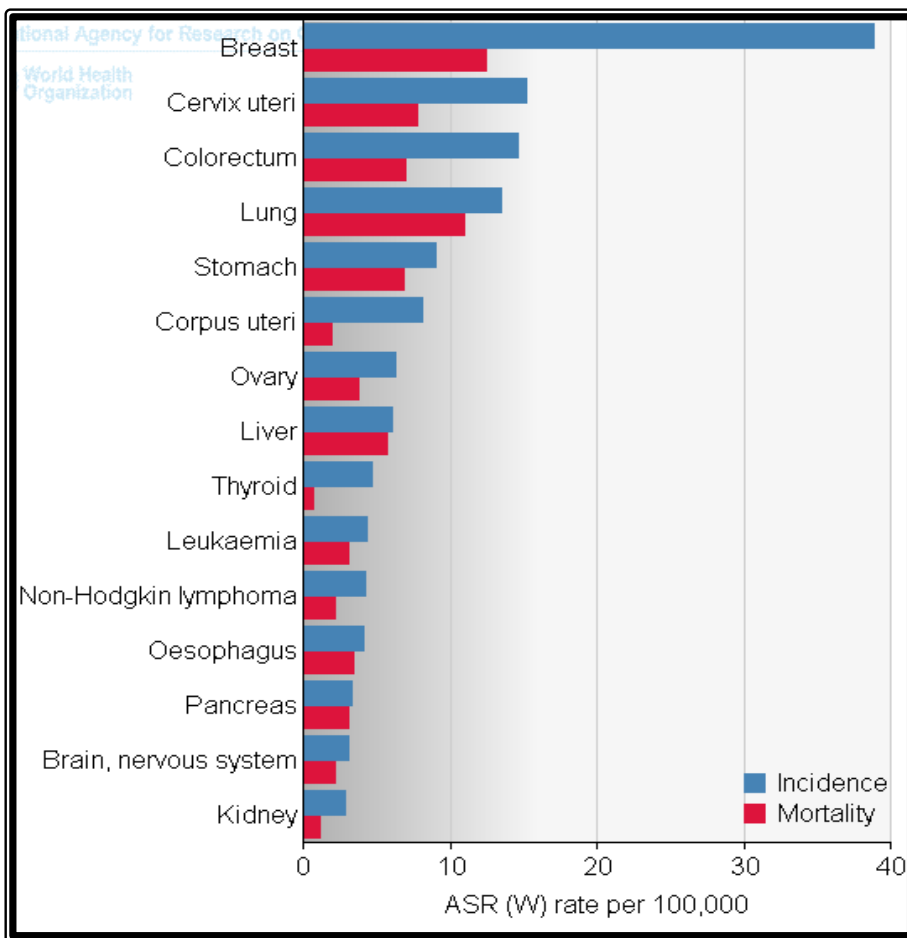


Figura 1. Incidencia y mortalidad de cáncer en mujeres a nivel mundial. Globocan 2008.

Factores de riesgo asociados a cáncer cérvico uterino.

La infección por el Virus de Papiloma Humano representa una de las enfermedades de transmisión sexual mas común y su presencia se ha asociado como el principal factor etiológico causante del CaCu (Walboomers 1999).

El VPH puede ser clasificado como virus de bajo riesgo (VPHbr) cuando causa verrugas genitales, por ejemplo los tipos 6 y 11, por otra parte se consideran de alto riesgo (VPHar) cuando causan lesiones intraepiteliales que pueden progresar a un carcinoma (Münger 2004). Se ha demostrado que la presencia de los dos tipos virales 16 y 18 del VPH, en pacientes con lesiones premalignas aumentan el riesgo de producir cáncer invasor en un 16.9% (Duensingi 2004, Tota 2011).

Aunque no todas las infecciones por VPHar progresan a cáncer, se considera que los VPHar tienden a ocasionar mayor inestabilidad genómica (alto índice en el número de cambios en la estructura cromosómica, génica y/o genómica (Negrini 2010)), inducción de la actividad de la telomerasa y proliferación aberrante lo cual contribuye a un desarrollo más frecuente del cáncer (Münger 2004), debido a que existen genes del propio virus que alteran la proliferación, immortalización, apoptosis, entre otras funciones celulares propias. Las funciones de los genes del VPH se resumen en la Tabla 1.

Por otro lado, también se ha demostrado que de las pacientes con Lesiones Intraepiteliales de Alto Grado (LIEAG) que no son sometidas a tratamiento para remover el área de la lesión, sólo entre 30 y 70% desarrollan cáncer invasor .Lo anterior indica que la presencia de LIEAG y la infección por VPHar son importantes pero no suficientes para desarrollar una lesión invasora y que podrían participar otros mecanismos moleculares (Brisson 1994, Frega 2003, Heselmeyer 1997).

Cuadro 1. Genes de VPH asociados a la promoción de cáncer (Kajitani N 2012).

Gen	Función de la proteína codificada	Factor blanco
L1	Proteína principal de la capsida.	
L2	Proteína minoritaria de la capsida.	
E1	Replicación del genoma viral.	RPA, Topoisomerasa, Polimerasa α .
E2	Transcripción de genes virales, replicación del genoma viral, mantenimiento del genoma viral.	Brd4, ChlR1.
E4	Destrucción de la red de queratina, inducción del arresto en G ₂ M del ciclo celular.	Citoqueratina 8/18.
E5	Posiblemente involucrado en proliferación y/o inhibición de apoptosis.	EGFR, PDGFR, V-ATPase, MHC1, TRAIL receptor, FAS receptor.
E6	Reactivación de los mecanismos de replicación celular. Proliferación, inmortalización, inhibición de apoptosis. Mantenimiento del genoma viral.	p53, ADA3, p300/CBP, E6AP, SP1, c-Myc, NFX1-91, TERT, FAK, FADD, Caspasa 8, BAX, BAK, IRF3, proteínas con dominio PDZ.
E7	Reactivación de los mecanismos de replicación celular. Proliferación, inestabilidad genómica, inhibición de apoptosis. Mantenimiento del genoma viral.	RB, p107, p130, HDAC, E2F6, p21, p27, CDK/Cyclin, ATM, ATR, gamma-tubulin.

Existen otros factores de riesgo que se han visto asociados al desarrollo del CaCu y además, se han visto asociados a la infección por VPH tales como:

- El número de parejas sexuales. Un elevado número de parejas es considerado un importante indicador del riesgo de infección por VPH (Walboomers 1999). Comparado con mujeres que solo han tenido una pareja sexual en su vida, las mujeres que han tenido entre 6 a 9 y 10 o más parejas, tienen 5 y 11 veces más posibilidades de contraer la infección por VPH (Chelimo 2012).

- Tabaquismo. La exposición al humo de tabaco puede alterar la capacidad del hospedero para montar una respuesta inmune adecuada contra la infección viral. Aunque aumenta su participación como cofactor debido al hecho de que ha sido más asociado al desarrollo de la enfermedad que a la adquisición del VPH por la misma causa (Veldhuijzen 2010, Deacon 1983). Así mismo se ha observado que el fumar tiene una gran correlación con el desarrollo de carcinoma escamoso pero no de adenocarcinoma (Yetimalar 2012).
- Infección por otros agentes causales de enfermedades de transmisión sexual. Como ejemplo de las infecciones asociadas mas comunes se encuentran el HSV-2 (virus de herpes simple), *Chlamydia trachomatis* y VIH (virus de inmunodeficiencia humana) (Piña 2006). Presentar una historia de infecciones genitales no específicas sustenta la idea de que las infecciones crónicas de varias infecciones de transmisión sexual puede contribuir al riesgo de desarrollar CaCu (Yetimalar 2012). También se ha encontrado que el riesgo de padecer CaCu se duplica cuando existe la presencia de anticuerpos contra *C. trachomatis* (Castellsagué 2002).
- Edad: Las mujeres mayores de 40 años tienen un riesgo mayor de padecer cáncer cérvico uterino. La mayoría de las mujeres con infección por VPH son jóvenes menores de 25 años (Veldhuijzen 2010). De igual manera un hombre mayor que su pareja, tiene mayor probabilidad de ser portador del virus (Chelimo 2012). Aunado a esto, se tienen registros de que las pacientes con CaCu de menor edad desarrollan cáncer mas agresivo que aquellas que los desarrollan a edades mayores (Mitra 1995).
- Uso de anticonceptivos orales. Se ha descrito que sinergizan los procesos de carcinogénesis, además de que el prolongado consumo de estos facilitan la reactivación o persistencia de VPH (Walboomers 1999). El incremento del riesgo de padecer cáncer cérvico uterino es marcadamente menor en aquellas mujeres que son negativas a la infección por VPH que en aquellas que si presentan la infección (Smith 2003).
- Inicio temprano de vida sexual activa. Mujeres que han comenzado su vida sexual a una edad temprana pueden tener mayor número de parejas sexuales en el curso de su vida y pueden estar expuestas a una infección persistente por VPH por un período de tiempo mayor comparado con aquellas mujeres que comenzaron su vida sexual a edades mayores (Yetimalar 2012)
- Coinfección con Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH): Se ha identificado que la incidencia y la persistencia de la infección por VPH es mayor en mujeres VIH-

positivas (Chelimo 2012, Veldhuijzen 2010). Además, entre las mujeres infectadas por VIH, existen una mayor prevalencia de VPH de alto riesgo, así mismo existe mayor probabilidad de desarrollar una lesión intraepitelial (Volkow 2001). El incremento al riesgo del desarrollo de CaCu también se ve asociado a un bajo conteo de Linfocitos T CD4+ ocasionado por el virus (Castellsagué 2002).

- Alcoholismo: debido a su asociación con la práctica sexual sin protección que favorece la infección por VPH. Además de producir moléculas oxidadas que pueden favorecer el desarrollo de CaCu (Veldhuijzen 2010).
- Multiparidad. Una alta paridad ha sido consistentemente asociada con el cáncer cérvico uterino y carcinoma in situ en poblaciones con mujeres que tienen un alto número de hijos (Yetimalar 2012). Con cada parto se aumenta el riesgo subsecuente de desarrollar una lesión precursora, particularmente entre mujeres con una persistencia de la infección por VPH, sin embargo no existe esa misma asociación con el embarazo (Jensen 2013). Se han propuesto mecanismos hormonales, traumáticos e inmunológicos para explicar la asociación entre el parto y la neoplasia cervical; también se ha propuesto que el aumento del riesgo es debido al mantenimiento de la zona de transformación en el exocervix facilitando la exposición directa al VPH y otros cofactores (Muñoz 2002). Los cambios hormonales inducidos por el embarazo también pueden modular la respuesta inmune al VPH y su influencia sobre el riesgo de persistencia o progresión (Sethi 1998).
- Predisposición genética: Se estima que el factor genético representa el 27% del efecto de los factores subyacentes para el desarrollo del cáncer cérvico uterino. El desarrollo de los estadios del tumor pueden ser influenciados por genes heredados e incluso puede tener influencia en la probabilidad de exposición a VPH. Por tanto, genotipos que predispongan a desarrollar tumores cervicales de manera independiente a la infección por VPH, pueden existir (Magnusson 2000, Bontkes 1998).

Progresión de las lesiones del cérvix.

Previo a la aparición del CaCu es posible detectar un espectro continuo de alteraciones epiteliales, también llamadas neoplasia intraepitelial cervical (NIC). Las NIC's están divididas del 1 al 3 según el grado de daño en el epitelio; de igual forma según la clasificación de Bethesda las identifica como lesiones intraepiteliales de bajo grado (LIEBG), LIEAG (Figura 2) (Dzul 2004, Kjær 2010, Mazibrada 2008)

Tanto los VPHar como los VPHbr son capaces de ocasionar una LIEBG al infectar la zona de transformación del cuello uterino (zona de transición entre endocérnix y exocérnix). La LIEBG inducida por VPHar que se desarrolle en esta región, puede progresar a una LIEAG, que se caracterizan por presentar mayor actividad mitótica y contenido de células inmaduras en los tercios central y superior la lesión. La LIEAG es comúnmente positivo a los tipos virales oncogénicos que evitan la maduración y diferenciación, produciendo una replicación continua de células inmaduras y eventualmente la acumulación de anomalías genéticas que favorecen la malignidad (Figura 2) (López 2006).

En términos histopatológicos, la progresión hacia un carcinoma de cérvix comienza con una infección por VPH en la zona de transformación (Schiffman 2007). Al inicio la infección es productiva, es decir, el genoma del virus se encuentra de forma episomal y se generan nuevos virus. Las células infectadas por VPH se caracterizan por tener una vacuola que oprime al núcleo hasta tomar una forma de media luna. A estas células se les conoce como coilocitos (Doorbar 2012).

Si la infección persiste entonces se originan las lesiones premalignas más leves que son las NIC I, que consisten en la presencia de células anormales en la tercera parte inferior del epitelio, conservando las otras dos terceras partes su arquitectura normal (Dzul 2004). Las lesiones NIC I conservan la habilidad para completar el ciclo de vida del VPH y producir nuevas partículas virales. Estas lesiones se asemejan a verrugas planas (Doorbar 2012). Este tipo de lesiones se caracterizan por presentar una mayor actividad mitótica y contenido de células inmaduras en tercio inferior del epitelio. Este se diferencia y madura, mostrando anomalías menores de la célula (Schiffman 2007).

El siguiente cambio en el espectro, consiste en la aparición de células anormales en dos terceras partes del epitelio, presentando diferenciación persistente (pero anormal) hacia las capas de células espinosas y queratinizadas. Estas lesiones entran dentro de las NIC II (Dzul 2004). El cambio en expresión que conducen a una NIC II es principalmente la elevación de la expresión de E6 y E7 (Doorbar 2012).

A medida que la enfermedad avanza, hay una pérdida progresiva de la diferenciación que afecta a más y más capas del epitelio, hasta que éste queda sustituido totalmente por células anormales, que no muestran ninguna diferenciación en su superficie. Esta lesión pertenece a las NIC III o el llamado cáncer in situ (Dzul 2004).

En general, se piensa que la integración del genoma vírico al genoma humano ocurre en las lesiones de alto grado, una vez que esto ocurre la expresión de E6 y E7 puede incrementar aún más (Doorbar 2012).

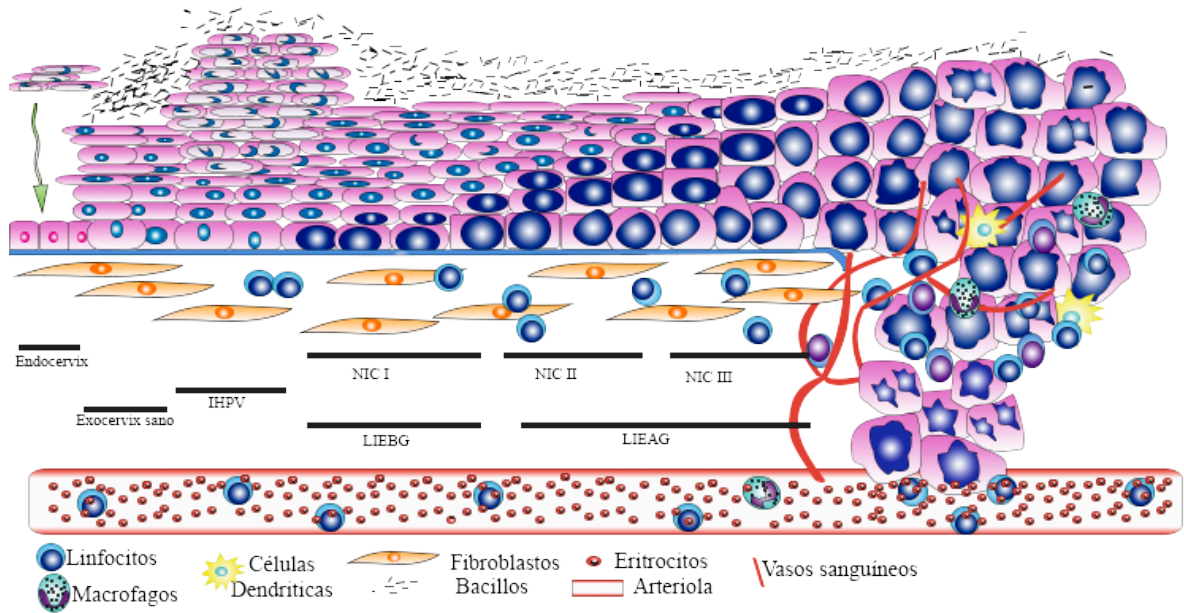


Figura 2. Progresión de las lesiones del cérvix. Se observa la transformación del epitelio desde una infección por VPH hasta un CaCu invasor.

Es importante tomar en cuenta que del total de mujeres jóvenes infectadas por VPH, la mayoría reversionen la infección de forma espontánea (López 2006). Se sabe que de estas mujeres solo el 25% desarrolla una LIEBG. De las LIEBG sólo entre el 20 y 40% desarrollan una LIEAG (Hildesheim 1994, Huang 2007).

En cuanto a la persistencia se ha encontrado que mujeres positivas a VPH16 por 3, 5 y 12 años tienen un riesgo de 8.9%, 23.8% y 47.4% respectivamente. Para desarrollar NIC2 es de 11.3%, 24.7% y 50.9%, para los mismos lapsos de tiempo. Después de 12 años el riesgo absoluto para mujeres con una infección persistente y mujeres con una infección incidente por VPHar (p.e. VPH 16) es virtualmente el mismo, 19.3% y 17.3% respectivamente. (Kjær 2010, Gustafsson 1997).

Alteraciones genómicas del Cáncer Cérvico Uterino.

Desde los años 60's, mediante citogenética clásica, se comenzaron a realizar estudios para evidenciar las alteraciones a nivel genómico en diversos tipos de cáncer (Boddington 1965); estos cariotipos mostraron que en diversas líneas celulares existían alteraciones tales como inversiones, inserciones, deleciones, poliploidias, etc. Desde los primeros estudios se observa que la ganancia del brazo largo del cromosoma 3 (3q) es particularmente frecuente en los carcinomas cervicales y que dicha ganancia ha sido asociada a una progresión maligna, aún en aquellos no infectados por VPH (Zimonjic 1995, Backsch 2011, Boddington 1965). A finales de los 90's, se demuestra por medio de Hibridación Genómica Comparativa (CGH) en metafase que existe un patrón recurrente de alteraciones en CaCu, donde se encuentra una consistente ganancia del 3q en casi el 90% de

los carcinomas (Dellas 1999, Allen 2000, Allen 2000, Allen 2000). Sin embargo debido a lo limitado de esta tecnología, no se pudo detectar los genes involucrados directamente en dichas alteraciones (Duensing 2004, Rao 2004).

El avance de la tecnología ha permitido detectar de manera más precisa los desbalances cromosómicos, mediante CGH en microarreglos se han identificado las regiones con mayor ganancia en el brazo 3q, 8q, 5p y 20q, así como la pérdida del 2q, 4, 3p, 5q, 8p (Kloth 2007, Dellas 1999, Rao 2004).

Se ha encontrado que la amplificación génica es mucho más frecuente en displasias cervicales que la pérdida. Solo la región 3p14 ha exhibido pérdidas significantes, lo cual ha sido observado principalmente en casos de carcinomas (Policht 2010). Por medio de distintos análisis se ha distinguido que las regiones 8q24 y 3q24-27 se amplifican tanto en displasias de alto grado como en cáncer y que además pueden ser utilizados como marcadores de displasia cervical, especialmente en las de alto grado (Policht 2010, Allen 2000, Arbyn 2011). Sin embargo, se requieren estudios adicionales que permitan establecer la confianza en la utilidad clínica de las pruebas de Hibridación Fluorescente in Situ (técnica molecular que permite la detección de anomalías numéricas y estructurales en el núcleo celular en interfase mediante sondas fluorescentes) para dichas regiones como marcadores pronósticos.

Así mismo, el número de aberraciones o alteraciones se han visto relacionadas con la supervivencia de pacientes con carcinoma invasivo, en los cuales se ha visto que la mayor parte del pronóstico es atribuido a las pérdidas de secuencias de ADN. Así mismo la ganancia del 3q podría ser utilizado como un marcador molecular para la detección de este tipo de cáncer (Dellas 1999).

También, se ha encontrado relación entre la expresión ciertos genes, como VWF, EPB41L4B, NEK1, CSTA, Survina, FasL entre otros, y un fenotipo metastásico (Lyng 2006, Wu 2012). Aunque, la relación es entre la expresión y el fenotipo, se piensa que si bien esta implicada la regulación de la expresión, uno de los principales mecanismos por el cual se altera dicha expresión es por el cambio en el número de copias (Huang 2007). En el análisis realizado por Pérez y cols. 2007 se encontró que las principales vías alteradas, en cuanto a expresión, en CaCu son metabólicas y de adhesión focal. En un estudio con 20 muestras se encontró que el 58.8% de los casos se encuentra amplificada la región 3q21-23 en la que se encuentran ubicados los genes de las proteínas celulares unidoras de retinol (CRBP) 1 y 2; en otro estudio más reciente y donde el número de muestras es mayor (n=39) esta región se mantiene como una de las principalmente ganadas, en muestras infectadas por diversos tipos de VPH (Hidalgo 2005, Yamaguchi 2009).

Trabajos de nuestro grupo con CGH en microarreglos, donde se incluyen 39 muestras de CaCu de mujeres mexicanas (Datos en preparación), han sido analizados utilizando la base de datos de PROGENETIX, en colaboración con la Universidad de

Zurich. Los resultados han confirmado que la ganancia más frecuente se encuentra en el brazo largo del cromosoma 3 (Figura 3).

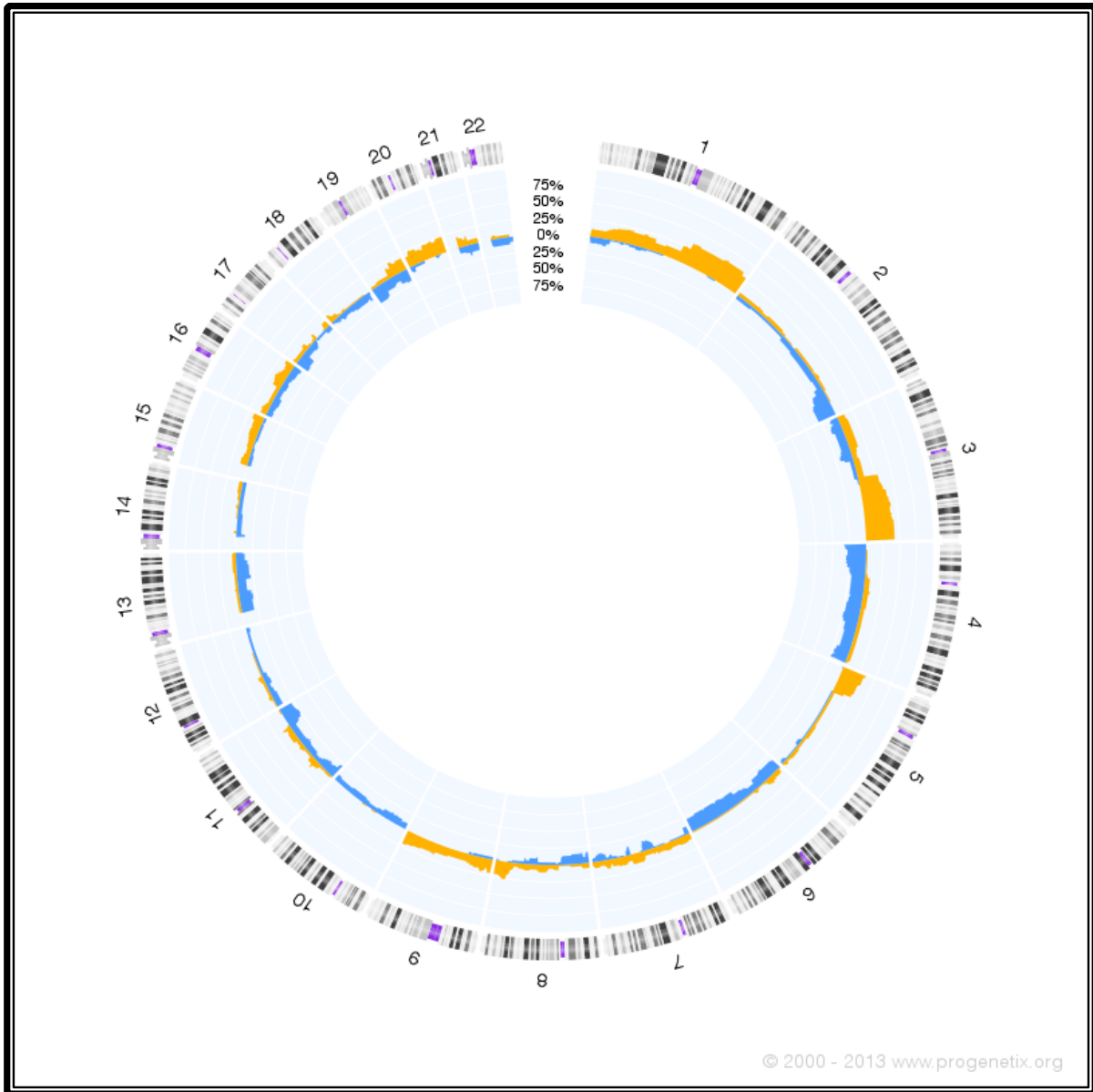


Figura 3. Ideograma mostrando alteraciones cromosómicas frecuentes en tumores de cáncer de cérvix. De color amarillo se pueden observar las ganancias de material genético y de color azul las pérdidas. Claramente se puede observar que en el brazo largo de cromosoma 3 se encuentra la ganancia mas frecuente. (Arreola H. Datos en preparación).

Retinol.

El retinol y sus derivados tienen diversas funciones en el organismo, dentro de la que se encuentran: mantenimiento de la visión normal, función como agente fotoprotector y antioxidante, pero cabe resaltar su función en la modulación del crecimiento, apoptosis, arresto de la célula en la fase G1 y proliferación normal del tejido epitelial (Wolbach 1925, Ross 2000). Además, existen muchos genes que tienen elementos de respuesta a ácido retinoico (Tabla 2) (Rhinn 2012).

Otros experimentos han demostrado que el retinol es importante para mantener la diferenciación de los tejidos epiteliales e inhibir la formación de tumores (Sanl 1977). La correcta regulación de estos procesos por parte del retinol depende en gran parte de su metabolismo, entre estas proteínas encargadas de su transformación y transporte se encuentran las CRBPs, que participan activamente en su metabolismo y pueden actuar como ligandos inducibles de factores transcripcionales (Jerónimo 2004).

Los retinoides son ampliamente utilizados para tratar enfermedades visuales y dermatológicas. Sus efectos en la prevención y tratamiento del cancer han sido recibidos con gran atención ya que han sido utilizados como un potencial compuesto quimioterapéutico o quimiopreventivo debido a sus efectos en la diferenciación, reducción del estrés oxidativo, entre otros ya mencionados (Bushue 2010). Estudios epidemiológicos demuestran que una baja ingesta de vitamina A resulta en un mayor riesgo de desarrollar cáncer (Sun 2002). La expresión alterada de los receptores de Ácido Retinoico también es asociada con transformación maligna en tejidos de animales o células en cultivo. También, se ha encontrado que los retinoides suprimen la carcinogénesis en modelos animales tumorigénicos para piel, mama, ovarios y próstata (Bukhari 2007, Pisano 2007, Li 2008, Liu 2005). Estos efectos antiproliferativos y de diferenciación que presentan los retinoides han sido utilizados para la prevención y tratamiento de diversos tipos de cáncer tales como mama, cabeza, cuello, pulmón y piel (Williams 2009).

En el humano se han descrito 4 tipos diferentes de proteínas celulares de unión a retinol: CRBP1 que está ampliamente distribuida a través del cuerpo, principalmente en hígado, riñón y tracto genital, CRBP2 está principalmente restringida al intestino delgado, CRBP3 se distribuye en músculo esquelético y cardíaco, CRBP4 es principalmente expresada en riñón, corazón y colón (Vogel 2001, Folli 2002).

Cuadro 2. Ejemplos de genes que contienen elementos de respuesta a AR funcional y/o evolutivamente conservados (Rhinn 2012).

Gen	Producto	Gen	Producto
Factores de transcripción		Proteínas secretadas/factores de señalización y hormonas.	
Rar	Receptores de ácido retinoico	Epo	Eritropoyetina
Hoxa1, Hoxb1, Hoxa4, Hoxb4, Hoxd4, Hoxb5	Genes homeobox	Fgf8	Factor de crecimiento de fibroblastos 8
Tlx2	Homeobox 2 leucemia T-cel	Gh	Hormona del crecimiento
Foxa	Factor 3 α nuclear hepático	Oxt	Oxitocina
Proteínas de la vía de retinoides		Prl3d1	Lactógeno placentario 1
Adh7	ADH7	Proteínas de adhesión/matriz extracelular	
Crabp2	CRABP-2	Icam1	Molécula 1 de adhesión intercelular
Cyo26a1	CYP26A1	Itgb3	B3 integrina
Enzimas		Otros	
Cd38	Ciclase 1 de ADP-ribosil	Afp	α -fetoproteína
Mmp11	Metaloproteasa11	Apoa1, Apoa2, Apoc3	Apolipoproteínas A-1, A-2, C-3
Prkca	Proteincinasa C α		

Proteínas unidoras de retinol en cáncer.

Las proteínas unidoras de retinol son una gran familia encargada de transportar el retinol y sus derivados como lo son el retinal y ácido retinoico hacia las enzimas encargadas de metabolizarlos o bien hacia los receptores correspondientes. Se ha encontrado que un par de genes codificantes para estas proteínas está localizado en una región cromosómica alterada frecuentemente en CaCu, sin embargo los estudios relacionados a investigar la relación de una de estas proteínas (CRBP2) son prácticamente nulos.

En estudios sobre cáncer de ovario se ha relacionado la oncogénesis a la alteración de la homeostasis de la vitamina A, así como de la proteína CRBP 1. De igual manera en cáncer de laringe se ha asociado a la sobreexpresión de la proteína CRBP 1 a un buen pronóstico de supervivencia (Williams 2009, Peralta 2010, Kloth 2007).

Datos no publicados del grupo, han demostrado en CaCu que 38.5% muestran ganancia en el número de copias del gen *CRBP 1* y que esta ganancia muestra correlación con la expresión de la proteína y un estado desmetilado del gen; así mismo la ganancia en el número de copias de *CRBP 1* mostró tener asociación con el grado de diferenciación del tumor y con el inicio temprano de vida sexual activa. A la fecha no existen estudios acerca del papel específico de la proteína CRBP 2, así como de sus alteraciones en cáncer de cervix ni en ningún otro tipo de cáncer en el humano. Debido a que estos genes se encuentran implicados en la diferenciación celular y que la agresividad de algunos tipos de cáncer se encuentra asociado al grado de diferenciación o indiferenciación, es necesario saber si la expresión del gen *CRBP 2* se encuentra asociada a la de *CRBP 1* debido a su cercanía o si por el contrario la expresión de este gen es independiente.

Proteína Celular Unidora de Retinol tipo 2.

El gen codificante de esta proteína se localiza en la posición citogenética 3q23; está conformado por Direct Repeat tipo 1 (DR-1), una caja TATA (localizados hacia el extremo 5'), cuatro exones y 3 intrones. Este gen puede ser activado por diversos receptores nucleares tales como el receptor activado de proliferación de peroxisomas (PPAR), factor nuclear del hepatocito-4 α (HNF-4 α), y receptor de X retinoides (RXR), los cuales pueden unirse como homo o heterodímeros al DR-1 para incrementar su transcripción. El gen *CRBP 1* se encuentra adyacente a *CRBP 2*, que también es activado por PPAR, RAR y RXR, sin embargo su expresión está también regulada por eventos epigenéticos, como lo es la hipermetilación (Demmer LA 1987, Tsunoda S 2009, Noa 2000, Arbyn M. 2011, Suruga 1999).



Figura 4 Estructura de la holoproteína CRBP2.

CRBP 2 es una proteína citosólica localizada principalmente en los enterocitos del intestino delgado de muchos vertebrados (Noa 2000). Esta constituida por 133 aminoácidos, con un peso de 16 KDa, con una conformación de 8 dominios antiparalelos β -plegados, que dan forma a un solo sitio activo; a este sitio activo pueden unirse trans-retinol y trans-retinal (Tarter M 2007). La localización de esta proteína en el intestino ha indicado que juega un papel importante en la captación de y procesamiento de los trans-retinol y sus derivados, así como en el procesamiento inicial de la vitamina , dirigiendo al retinal y al retinol hacia las deshidrogenasas correspondientes hasta transformarlo en ácido retinoico; también está encargada de proteger y solubilizar al

retinol para transportarlo a los diversos sitios blanco como son epitelios y ojo, donde tiene efectos relacionados a la diferenciación, crecimiento y apoptosis (Matsuda 2004, Tarter 2007, Bushue 2010). Por otra parte, en intestino también esta encargado de dirigir al retinol hacia las esterasas correspondientes que transformaran el retinol en estér retinoico para su almacenamiento (Ong DE 1987).

En ratas se ha demostrado que CRBP2 aparece 2-3 días antes del nacimiento, alcanza su máximo nivel de expresión (500 pmol/mg de proteína soluble) el día 3 después del nacimiento, y declina hasta un 50% estabilizándose en este nivel durante su vida adulta. Mientras que CRBP1 alcanza su máximo nivel (15 pmol/por mg de proteína soluble) durante la gestación y al nacimiento esta cantidad decae hasta en 70% para mantenerse en este nivel durante la vida adulta (Ong 1991).

Por otra parte en hígado de pollo se ha encontrado que existe una aparición transitoria tanto de mRNA como de la proteína CRBP2 durante el periodo perinatal, donde se puede identificar el mRNA en el día 0 únicamente y la proteína se puede detectar desde los 15 días de desarrollo hasta 7 días después del nacimiento. Este estudio sugiere que es debido a que esta involucrada en el metabolismo hepático de β -caroteno, dirigiendo el retinal hacia la retinal reductasa y guiándolo a la subsecuente esterificación y se ve directamente relacionada con la cantidad de β -caroteno en suero e hígado (Takase 1996).

Hasta el momento existen muy pocos estudios acerca de la función de CRBP2 en humanos y ningún trabajo relacionado a su participación en neoplasias.

Justificación.

El cáncer cérvico uterino representa la segunda causa de muerte en mujeres mexicanas, por tanto representa un grave problema de salud pública.

Se ha demostrado una frecuente ganancia de la región 3q21, por medio de estudios de citogenética molecular, donde se encuentra localizado el gen *CRBP2*.

Este gen tiene una valiosa participación en el metabolismo del ácido retinoico que se encuentra implicado en procesos de diferenciación, proliferación y apoptosis.

Hasta el momento no se cuenta con información acerca de la participación de este gen en el cáncer de cérvix uterino. De igual manera no se tienen datos acerca de las alteraciones moleculares que pueda llegar a presentar. Por tanto es necesario realizar los estudios correspondientes para conocer las alteraciones y su posible participación en este tipo de cáncer.

Pregunta de investigación.

¿Las alteraciones moleculares del gen *CRBP2* tendrán un impacto en la expresión de la proteína CRBP2 y estarán asociadas a algún factor de predisposición?

Hipótesis.

El gen *CRBP2* se encuentra alterado en ganancia de número de copias y expresión de la proteína en muestras de CaCu.

Objetivos.

General.

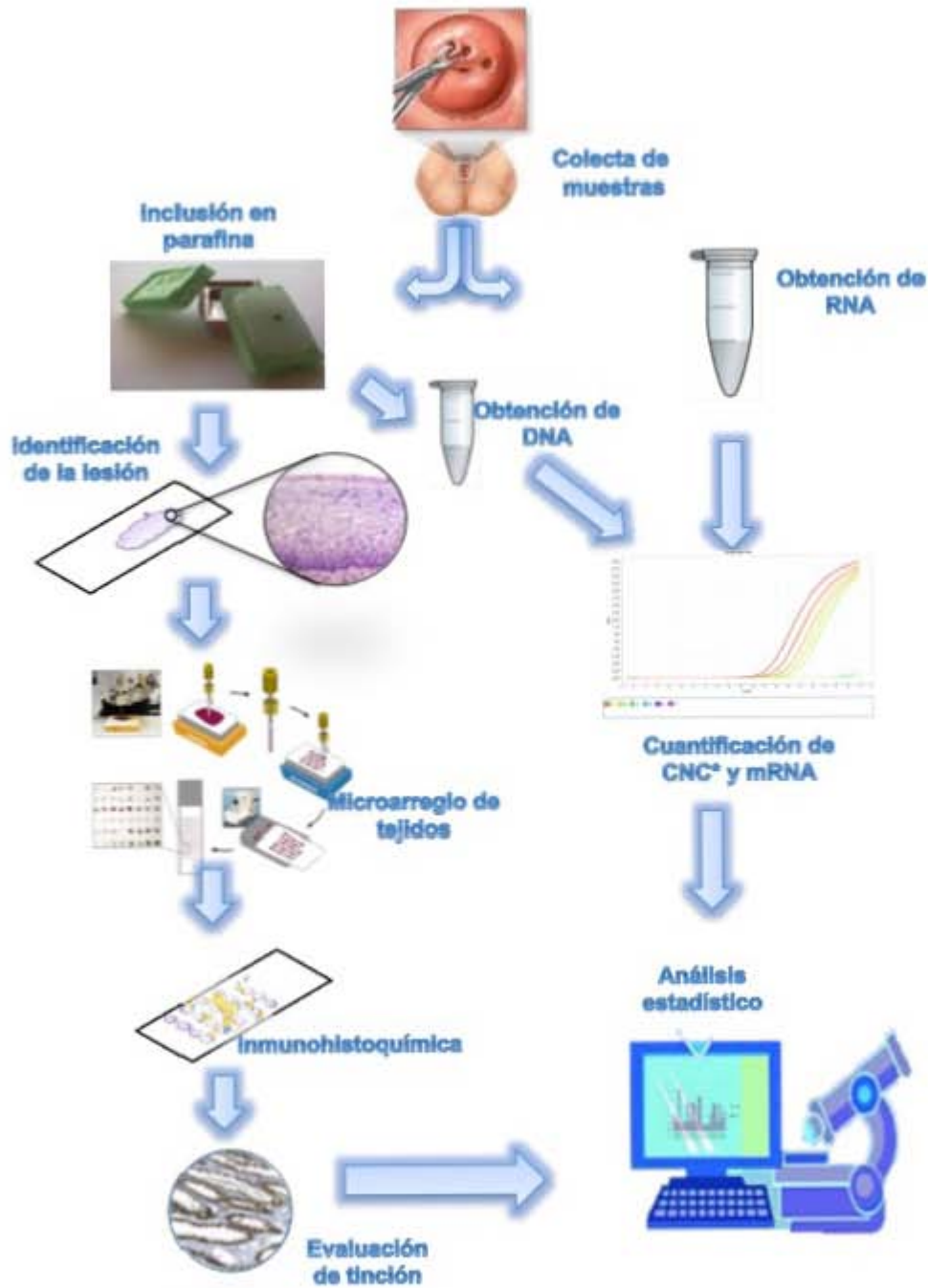
Determinar las alteraciones moleculares del gen *CRBP 2* en muestras de cáncer del cérvix uterino.

Objetivos particulares.

- Determinar el número de copias del gen *CRBP 2* en muestras de cáncer cérvico uterino y muestras de cérvix sin lesión.
- Evaluar la cantidad relativa del mRNA del gen *CRBP2* en muestras de CaCu y cérvix sin lesión.
- Determinar la expresión proteica de CRBP2 en muestras de CaCu y muestras de cérvix sin lesión.
- Crear una base de datos a partir de la historia clínica de las pacientes.
- Realizar la correlación entre la expresión de la proteína CRBP2 y factores de riesgo.

Diseño experimental.

A continuación se describe de forma gráfica la metodología utilizada para la realización del proyecto de investigación.



*CNC. Cuantificación en el número de copias.

Métodos y materiales.

Obtención de muestras.

Se colectaron muestras de pacientes con CaCu y muestras de cérvix sin lesión, bajo consentimiento informado del paciente e historia clínica. Se incluyeron mujeres con diagnóstico de CaCu atendidas en el Hospital General de México y con historial clínico disponible; se excluyeron a aquellas pacientes que tuvieran antecedentes de haber padecido cualquier tipo de cáncer o bien con tratamientos previos por lesiones del cérvix uterino como asa diatérmica o criocirugía; finalmente, no se incluyeron aquellas muestras que no fueran suficientes para realizar todos los análisis correspondientes. Los cérvix sin lesión fueron tomados bajo la sospecha de una posible lesión, sin embargo al obtener el diagnóstico histopatológico se corroboró que eran tejidos sin lesión. El diagnóstico de las muestras fue confirmado por un estudio de colposcopia en la Clínica de Displasias del Hospital General de México y por el diagnóstico histopatológico en el servicio de Patología del Hospital de Oncología de Centro Médico Nacional Siglo XXI. En total se obtuvieron 20 muestras de CaCu y 20 muestras de cérvix sin lesión.

Preparación de las muestras.

Las muestras fueron colocadas en solución fijadora para posteriormente ser incluidos en parafina. Para realizar la inclusión se deshidrató el tejido en un tren de deshidratación con alcoholes graduales (70, 90 y 100 %), etanol-xilol (50-50%) y xilol (100%).

Otro fragmento de cada una de las muestras, utilizado para la extracción de ARN se preservó en RNAlater (Ambion; USA) a -70 °C hasta la extracción de ARN.

Identificación de la lesión.

Se realizaron cortes, de los bloques de parafina, de 4 μm y se colocaron en un portaobjetos. Estos cortes fueron desparafinados, en horno a 60° C por media hora, y rehidratados en un tren de rehidratación con alcoholes graduales (100, 90, 70, 30 %). La tinción se llevó a cabo con hematoxilina de Harris 2 min, agua destilada, agua amoniacal y agua destilada. Finalmente para fijar la tinción se deshidrató con alcoholes graduales (70, 90 y 100 %), y finalmente en xilol y montada con Permount (Fisher Scientific; USA).

Las laminillas fueron analizadas por un patólogo que marco y delimitó el área de la lesión correspondiente a CaCu.

Extracción de ADN.

De cada uno de los bloques incluidos en parafina se hicieron cortes de 10 μm (3-5 cortes) y se colocaron en un tubo eppendorf. Para realizar la desparafinación se colocó a cada tubo 1 mL de xilol, se incubó a 60° C, se descartó el sobrenadante y se repitió este procedimiento hasta observar que ya no hubo parafina. Se dejó secar el tejido y después se agregaron 300 μl de buffer de lisis nuclear (100 mM NaCl, 10 mM Tris HCl, 25 mM

EDTA, 0.5% SDS) y 5 μ l de Proteinasa K (Invitrogen; USA), para dejar actuar a la proteinasa se incubó a 60° C por 24-48 horas. Se adicionaron 300 μ l de acetato de amonio 5 M para precipitar las proteínas. Se centrifugaron a 14 000 rpm por 3-4 minutos. Se transfirió el sobrenadante a tubo nuevo. Después se agregaron 600 μ l de isopropanol frío para precipitar el ADN, enseguida de centrifugar por 15-20 minutos a 14 000 rpm se decantó el sobrenadante y se agregó 500 μ l de etanol al 70% para posteriormente homogenizar y centrifugar 2-3 minutos a 14 000 rpm. En el siguiente paso se decantó el sobrenadante y se dejó secar a 60 °C. Finalmente las muestras fueron resuspendidas en 25 μ l de agua estéril. La verificación de la integridad del ADN se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y se observa en un transiluminador, además se cuantificó por espectrofotometría en Nanodrop ND1000 Spectrophotometer (Thermo; USA).

Cuantificación del número de copias del gen.

La detección del número de copias del gen *CRBP2* en muestras de CaCu y tejido sano, se determinó mediante la técnica de PCR en tiempo real, utilizando sondas Taqman TaqMan® (Applied Biosystems; USA) en el equipo Applied Biosystems StepOne™. Los iniciadores y las sondas utilizadas fueron de Applied Biosystems. Para el gen *CRBP2* la sonda utilizada fue Hs01918547_cn y los iniciadores que acompañan la sonda generan un amplicon de 91 pb. Para el control interno se utilizaron RNasa P la sonda utilizada fue Hs0092255_cn, los iniciadores generan un amplicon de 101 pb y GAPDH cuya sonda fue Hs00894322_cn, los iniciadores correspondientes generan un amplicon de 108 pb. Las reacciones de amplificación se realizaron por triplicado utilizando los reactivos TaqMan® Genotyping Master Mix (No. 4371355; Applied Biosystems; USA). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10 μ l, utilizando 5 μ l de master mix, 0.5 μ l de sonda, 2 μ l de ADN (equivalentes a 50ng) y 2.5 μ l de agua.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: activación de la enzima 10 min a 95 ° C, 40 ciclos de PCR 15 segundos a 95 ° C, seguida de 1 min a 60 ° C. La detección de la señal se realizó en el último paso de la PCR. Los resultados se analizaron utilizando el método del $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para cuantificación relativa.

Extracción de ARN.

La extracción del ARN total se realizó mediante el kit para extracción mirVana™ (Ambion; USA). La muestra fue lisada en Tissue lyser II® (Quiagen; USA) con 600 μ l de Buffer de Lisis del kit. Enseguida, se agregó un volumen 1/10 del reactivo miRNA Homogenate Aditiv, se mezcló e incubó por 10 minutos en frío. Después de esto, se adicionó 1 volumen de la mezcla Fenol:Cloroformo (1:1), se mezcló y centrifugó 5 minutos a 10 000 rpm. La fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo al que se le adicionó 1.25 volúmenes de etanol al 100%. Después de homogenizar la mezcla se colocó en una columna de purificación, se incubó 2-3 minutos a temperatura ambiente. A continuación se procedió a centrifugar a 10 000 rpm durante 15 segundos descartando el eluido. Se

adicionaron 700 µl de la solución de lavado 1, posteriormente fue centrifugada 15 segundos a 10 000 rpm y se descartó el eluido. Se realizó el mismo procedimiento 2 veces mas con la Solución de Lavado 2/3. Para eliminar cualquier residuo de las soluciones anteriores se centrifugó a 14 000 rpm por 1 minuto y se dejó secar la columna por 1 minuto a temperatura ambiente. Finalmente, para eluir el ARN se adicionaron 20 µl de Solución de Elución a 95 °C, se incubó 2-3 minutos y se procedió a centrifugar a 14 000 rpm por 30 segundos.

Como ARN control se eligió la línea celular derivada de cáncer de cérvix INBL. Para la extracción del ARN de esta línea celular se utilizó una caja de cultivo de 25 cm² con una confluencia de 90-95% a la cual se le adicionaron directamente los 600 µl de Buffer de Lisis del kit, una vez homogenizado se transfirió a un tubo eppendorf y se procedió con la técnica anteriormente descrita

Una vez obtenido el ARN se procedió a cuantificarlo por espectrofotometría en Nanodrop ND1000 Spectrophotometer.

Obtención de cADN.

Previo a la obtención del cADN se hizo un tratamiento con DNasa. Después se obtuvo el cADN mediante High Capacity cADN Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems; USA) el cual lleva por reacción 10X RT Buffer 2.0 µl, 25X dNTP Mix (100 mM) 0.8 µl, 10X RT Random Primers 2.0 µl, MultiScribe Reverse Transcriptase 1.0 µl, agua 3.2.

El ciclo de amplificación se llevó a cabo primero a 25° C por 10 min, después 120 min a 37° C y finalmente 85° C por 5 min.

Como control interno se sometió el cADN a una PCR en punto final para amplificar una región del ARN RPS 18 (FRPS18 AAT CCA CGC CAG TAC AAG ATC CCA; RRPS18 TTT CTT CTT GGA CAC ACC CAC GGT; ambos con una T_m de 60 °C) previo a someterlo a PCR en tiempo real. Se utilizaron FRPS 18 y RRPS 18 (10 pM) con 12.5 µl de GoTaq® Green Master Mix (Promega; USA), en un volumen final de 25 µl, incubando por 35 ciclos de desnaturalización a 96 °C 45 segundos, alineamiento a 64 °C 45 segundos y extensión 72 °C 30 segundos.

Cuantificación del ARN mensajero de CRBP2.

La cuantificación de la expresión del gen *CRBP2* en muestras de CaCu y tejido sano, se determinó mediante la técnica de PCR en tiempo real, utilizando sondas Taqman® en el equipo Applied Biosystems StepOne™. Los iniciadores y las sondas utilizadas fueron de Applied Biosystems (USA), para el gen *CRBP2* la sonda utilizada fue, Hs00188160_m1 cuyos iniciadores generan un amplicon de 111 pb que abarca entre el exón 2 y 3, para el control interno se utilizaron el constitutivo ribosomal R18 la sonda utilizada fue Hs023928990_g1, los iniciadores que la acompaña genera un amplicon de 61 pb y

PolR2A cuya sonda fue Hs00172187_m1, los iniciadores correspondientes generan un amplicon de 61 pb.

Se realizó curva de eficiencia tanto del gen blanco como el de referencia para corroborar que se podía utilizar el método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para el análisis de los datos. Se realizaron las diluciones a las concentraciones 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 ng/ μ l y se procedió a realizar la PCR en tiempo real por triplicado de cada concentración. Establecida la concentración a trabajar se procedió a realizar las reacciones de amplificación se realizaron por triplicado utilizando sondas TaqMan® y Universal Master Mix (Applied Biosystems; USA). La reacción se llevo a cabo en un volumen final de 10 μ l, utilizando 5 μ l de master mix, 0.5 μ l de sonda, 2 μ l de ADN (equivalentes a 50ng) y 2.5 μ l de agua.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 2 min a 50° C, 10 min a 95° C, 40 ciclos de PCR 15 segundos a 95° C, seguida de 1 min a 60° C. La detección de la señal se realizó en el último paso de la PCR. Los resultados se analizaron utilizando el método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de cuantificación relativa.

Conformación del microarreglo de tejidos.

La construcción de los dos arreglos de tejidos se realizó con los 20 tejidos embebidos en parafina de muestras de CaCu y las 20 muestras de cérvix sanos respectivamente, se incluyeron para el arreglo de muestras invasoras de CaCU 10 controles de tejidos sanos, dentro de los que se encuentra, placenta, hígado, riñón, intestino, corazón entre otros. El arreglo de tejido fue relizado mediante el empleo del Tissue-Arrayer ATA 100 de chemicon, siguiendo las instrucciones del equipo. Este sistema de precisión es operado de manera semi-automatizada y permite arreglar en un solo bloque de parafina, múltiples muestras de tejido, lo que permite analizar decenas a cientos de muestras pequeñas de tejido en condiciones homogéneas y con un mínimo consumo de reactivos, en comparación con las técnicas convencionales de inmunohistoquímica.

Se preparó el Tissue Arrayer colocando dos agujas de punción, la donante y la receptora con una sección de 2 mm en la torreta. Se localizó el área de interes en el bloque de tejido donante en parafina y se construyó un bloque de parafina en blanco, que se utilizó como bloque receptor del arreglo de tejido. Se colocó el bloque receptor en su receptáculo y se seleccionó el punto de inicio en la posición cero para los dos micrómetros X y Y. Posteriormente se realizó una perforación en el bloque receptor y se retiró el cilindro blanco de parafina sobrante de la aguja receptora. De la misma manera, se colocó el bloque donante en su receptáculo y se perforó el área seleccionada, con la aguja del donante. Se deslizó el receptáculo receptor hasta lo posición de la aguja donante y se colocó el cilindro de tejido donante en el orificio previo que se había efectuado en el bloque receptor. Se avanzó la torreta del Tissue Arrayer a una distancia de 3 mm del orificio anterior haciendo una nueva perforación con la aguja de punción receptora y se repitieron los pasos anteriores sucesivamente, hasta completar la primera fila de orificios y oclusión con cilindros tisulares donantes en el bloque receptor. Se repitieron los pasos descritos para la segunda y

siguientes filas. Hasta completar los arreglos de tejidos. Al terminar los arreglos estos se incubó en una estufa a 60 °C durante 10 min. para homogeneizar los posibles espacios creados en la parafina de los bloques receptores de los arreglos tisulares entre orificio receptor y orificio de tejido donante. Una vez terminado los arreglos se procedió a realizar los cortes histológicos de 4 micras, para realizar la inmunohistoquímica.

Inmunohistoquímica.

Previamente se estableció que la dilución de trabajo del anticuerpo a utilizar sería de 1/200, en el caso de ambos anticuerpos.

Para realizar la reacción de inmunohistoquímica se utilizó el kit de inmunodetección Ratón/Conejo con el sistema Biotina-Estreptavidina-Peroxidasa (Mouse/Rabbit HRP/DAB, Bio SB; USA). lo cual se pusieron a desparafinar las laminillas, en horno, por 20 minutos a 60°C. Después se procedió a pasar el tejido por un tren de hidratación. La exposición del antígeno se realizó con Trilogy (Cell Marque; USA) 1x a 94° C por 1 hora. Enseguida se colocaron en solución amortiguadora de fosfatos (PBS), se bloqueo la peroxidasa endógena con ImmunoDetector Peroxidase Protein Peroxidase Blocker por 15 minutos, se lavo con PBS. Por otra parte se prepararon diluciones del anticuerpo Anti CRBP 2 (Abcam Anti-RBP2, ab76631; USA) y Anti-ER (anti-receptor de estrógenos BSB-5494, Bio SB, Santa Barbara, CA, USA). Después del bloqueo con ABS se colocó la dilución del anticuerpo en la laminilla correspondiente y se incubó a 37° C por 1 h, se procedió a revelar con el anticuerpo secundario (Immunodetector Biotin Link) durante 15 minutos, se realizaron dos lavados con PBS, se colocó la estreptavidina conjugada (Immunodetector HRP Label) por 15 minutos, PBS y se reveló con Diaminobenzidina (DAB) 15-20 segundos. Se prosiguió a realizar la contratinción de la siguiente manera: Hematoxilina de Harris 2 minutos, PBS, Agua Amoniaca, PBS. Para fijar la laminilla se deshidrató en un tren de deshidratación con alcoholes graduales (70, 90 y 100 %), etanol-xilol (50-50%) y xilol (100%). Finalmente se montó con Permount. Se deja secar toda la noche y se analiza en microscopio óptico a 10, 40 y 100 x.

Se evaluó cada uno de los tejidos de acuerdo a los criterios de Simon y cols., para tener una clasificación semicuantitativa de la expresión de la proteína.

Extracción de Proteínas.

Los extractos de proteínas totales se realizaron utilizando buffer de lisis (50 mM NaH₂PO₄, pH 8, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, 1 mM benzamidina, 2 µg/ml leupeptina, 2 µg/ml pepstatina) o buffer Urea/Thiourea (7M urea, 2M thiourea, 4% CHAPS) y 1 ml de inhibidor de proteasas (GE/Amersham; USA).

Además se sometieron a sonicación por 40 segundo con una amplitud de 30%. Se precipitó la proteína con acetona y se agregó el buffer de extracción requerido.

La cuantificación de proteínas totales se realizó empleando el kit 2D Quant (GE/Amersham; USA). Tomando en cuenta los siguientes lineamientos $m = 0.009 \pm 1$, $r^2 = >0.98$ y $DEA \pm 15\%$.

Se realizó la electroforesis de las proteínas en un gel de acrilamida (7.5 %), para evaluar su integridad.

Inmunodetección de CRBP2.

Una vez extraídas las proteínas totales, de cada línea celular, se fraccionaron 30 µg de proteína en un gel de poliacrilamida al 12% y se transfirieron a una membrana de PVDF. La membrana se incubó por una hora en buffer TBS-Tween con 5% de leche en polvo para bloquear la unión proteica inespecífica, y posteriormente, fueron tratadas con el anticuerpo anti-CRBP2 por 24 horas. A continuación, fueron incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente. La visualización se realizó por quimioluminiscencia del Kit ECL Plus Western Blotting Detection System (GE /Amersham; USA).

Para corroborar que la técnica de inmunodetección se realizó adecuadamente se detectó paralelamente actina como control.

Análisis estadístico.

Para saber si en ambos grupos los parámetros clínicos de las pacientes se encuentran en el mismo rango se utilizó la prueba de T de Student con un intervalo de confianza del 95%. Se consideró que la diferencia entre las medias es significativa cuando se obtuvo una $p < 0.05$.

El análisis estadístico de asociación entre la ganancia del número de copias del gen CRBP2, la intensidad de la expresión de la proteína y los principales parámetros clínicos patológicos fueron analizados, mediante la prueba estadística de chi cuadrada (χ^2) con un α de 0.05. Se consideró como significativo una $p < 0.05$. Los datos clínicos e histopatológicos fueron extraídos de las historias clínicas. Los cálculos de χ^2 se realizaron en el paquete de estadística SPSS v15.

Análisis de la secuencia promotora del gen *CRBP2*.

La secuencia del promotor de *CRBP2*, fue analizada in silico utilizando la herramienta para predicción de sitios de unión a CCCTC-Binding Factor (CTCF). Dicha herramienta utiliza el programa STORM para realizar una búsqueda de sitios de unión a CTCF en la Base de Datos para sitios de unión a CTCF y Organización del Genoma (Ziebarth 2013).

Resultados.

Descripción de los datos clínico-patológicos de las muestras analizadas.

Se puede observar que 12 pacientes presentaron una edad mayor o igual a 45 años (60%) y solo 8 son menores de 45 (40%). La etapa clínica se agrupó en I/II y III/IV según la clasificación de la FIGO, más de la mitad de los casos fueron etapas tempranas. La diferenciación histológica se agrupó en Bien/Moderadamente diferenciados y Poco diferenciados/indiferenciados. Para los antecedentes familiares se consideraron antecedentes de cáncer tanto en línea directa como colateral, y por otra parte también se analizaron aquellas pacientes con antecedentes de CaCu en línea directa. El valor de p nos dice si las medias de los datos clínicos entre ambos grupos son diferentes.

Cuadro 3. Descripción de datos clínico patológicos de las muestras analizadas de CaCu.

Dato Clínico	CaCu		Sanos		Valor de P
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	
Total de casos	20	100	20	100	
Edad					
<45 años	8	40	19	95	0.001
≥45 años	12	60	1	5	
Estado clínico					
I/II	11	55	/	/	/
III/IV	4	20	/	/	
Diferenciación histológica					
Bien/moderadamente	2	10	/	/	/
Poco/indiferenciado	18	90	/	/	
Embarazos					
< 2	2	10	4	20	0.389
≥ 2	18	90	16	80	
IVSA					
< 18 años	10	50	2	10	0.005
≥ 18 años	10	50	18	90	
Antecedentes familiares de cáncer					
Si	9	45	8	40	1
No	11	55	12	60	
Antecedentes familiares de CaCu					
Si	4	20	0	0	0.036
No	16	80	20	100	

Obtención del ADN y cuantificación del número de copias del gen *CRBP2*.

Los resultados que se obtuvieron de la fluorescencia que detecta el equipo se observan a continuación (Figura 5), y corresponden a las curvas de amplificación del gen *CRBP2* con las cuales se determinó una eficiencia de 99% para ambas, con lo que se determinó que era factible utilizar el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

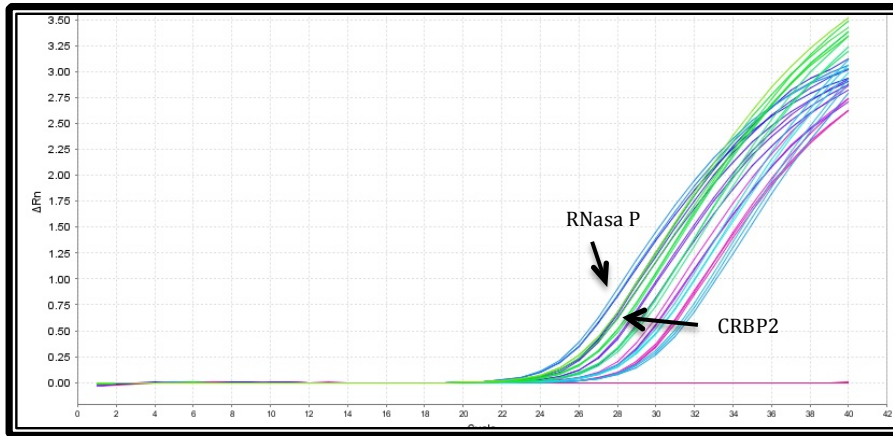


Figura 5. Curva estándar para la cuantificación del número de copias. Muestra ADN de leucocitos a diferentes diluciones para realizar curva de eficiencia, con flechas color negro se señalan curvas para *CRBP2* y *RNasa P* a la menor dilución.

En las muestras normales (cervix sin lesión) como se esperaba, el 100% tienen 2 copias del gen. Por otra parte, 50% de las muestras de CaCu presentan aumento en el número de copias (barras rojas) y 50% no presentan cambios. Los datos se presentan en la figura 6.

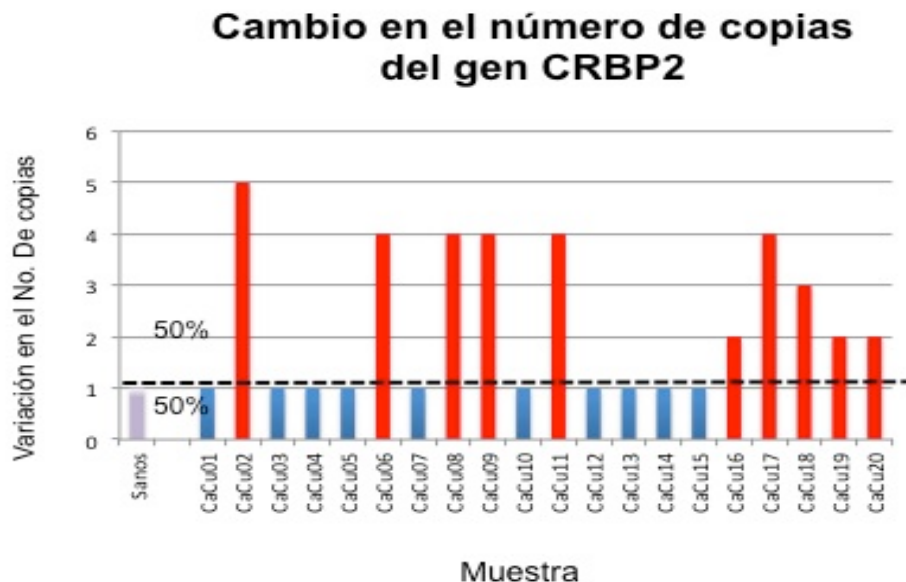


Figura 6. Cuantificación del número de copias del gen *CRBP2* en cáncer cérvico uterino. En el se pueden observar que el 50% de las muestras en color rojo presentan un aumento el número de copias, mientras que en azul se encuentran las muestras que no presentan cambios en el número de copias con respecto a las muestras de sanos agrupadas en color lila. La línea de corte trazada es con respecto al control de sanos.

El análisis de número de copias de las muestras de CaCu mostraron que existe un 50 % en los que se encontró una ganancia heterogénea número de copias desde 2 hasta 5 veces mas, mientras que el otro 50% no se encontró variación en el número de copias (Figura 6).

Análisis de correlación del número de copias del gen *CRBP2* con datos clínico-patológicos.

Al realizar el análisis estadístico de correlación con la prueba de χ^2 , entre el número de copias del gen y los datos clínicos no se encontró un valor de P significativo. Estos datos indican que no hay ninguna asociación entre el número de copias y los datos clínicos. Debido a que el número de copias del gen de todos las muestras de sanos es una constante, no se pudo establecer una correlación entre este parámetro y los datos clínicos.

Cuadro 4. Correlación de datos clínicos y el número de copias del gen.

Variable Clínica	N	Valor de P
Edad		
<45 años	8	0.526
≥45 años	12	
Embarazos		
≤ 2	2	0.61
> 2	18	
IVSA		
< 18 años	10	0.263
≥ 18 años	10	
Antecedentes familiares de cáncer		
Si	9	0.178
No	11	
Antecedentes familiares de CaCu		
Si	4	0.079
No	16	
Diferenciación		
Bien/moderadamente	2	0.136
Poco/indiferenciado	18	
Estado clínico		
I/II	11	0.185
III/IV	4	

Cuantificación del ARN mensajero de CRBP2.

Se corroboró que fueran amplificables mediante una PCR para amplificar una fracción del gen ribosomal 18S. El producto obtenido es de 240 pb como se puede observar en la figura 7. Con ello se pudo determinar que los ARN's obtenidos son amplificables.

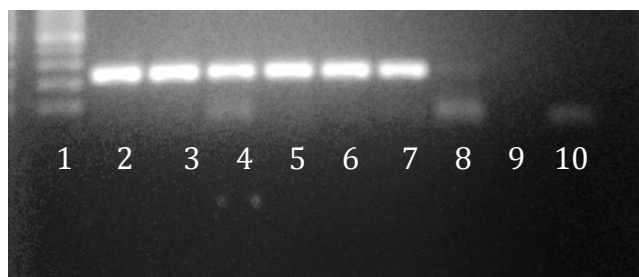
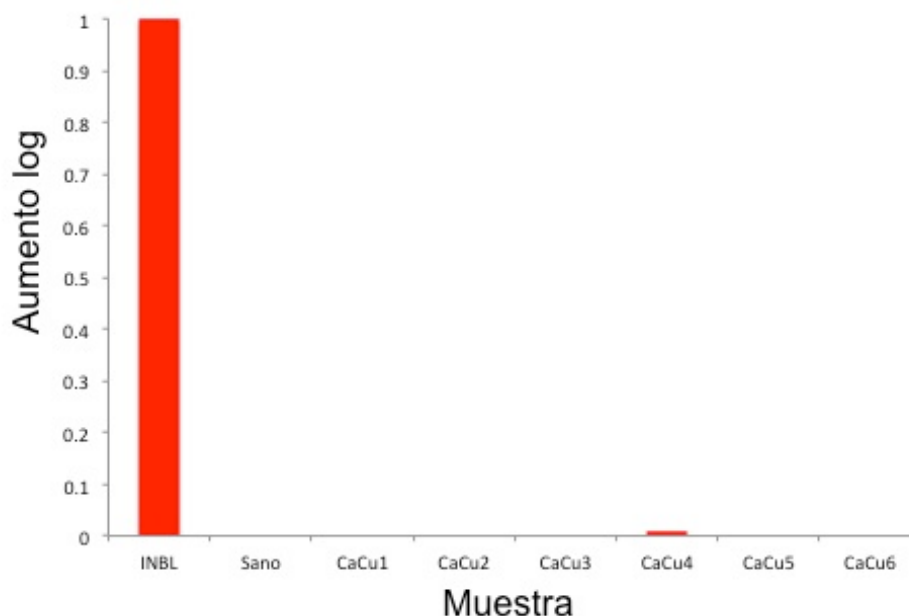


Figura 7 Amplificación del control endógeno 18S. El gen fue amplificado por rtPCR, se observa una banda de 240 pb.

Para determinar la cantidad de mRNA de CRBP2 en muestras de tejido normal del cérvix y las de cáncer invasor, se realizó previamente al análisis de las muestras, una curva de eficiencia tanto del mRNA blanco como el de referencia para corroborar que se podía utilizar el método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para el análisis de los datos. Se realizaron las diluciones del ARN de la línea celular INBL, a las concentraciones 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 ng/ μ l y se procedió a realizar la PCR en tiempo real por triplicado de cada concentración. Estableciéndose que la concentración a utilizar sería de 100 ng/ μ l.

Se observó que en las muestras la amplificación del mRNA del gen *CRBP2* no es cuantificable, ya que solo se obtuvo señal por parte del control de amplificación utilizado que fue INBL (Figura 8). Esto indica que la concentración del mRNA correspondiente a CRBP2 es muy baja ya que ni en las muestras de sanos o de cáncer cérvico uterino fueron cuantificables.

Figura 8. Datos de expresión del mRNA de CRBP2 en CaCu y cérvix sano. Se puede observar que únicamente se encontró la detección del mRNA en INBL, el control, pero no se encontró en ninguna de las muestras.



Expresión de la proteína CRBP2.

Para el control positivo de expresión de CRBP2, fue utilizado el tejido de intestino delgado (Fig. 9 b) en el cual vemos claramente una fuerte tinción en el citoplasma mientras que el núcleo se observa sin tinción (marcado con flechas), placenta fue el control negativo (Fig. 9 a). Es importante mencionar que estos tejidos control se encuentran incluidos en el microarreglo de tejidos de CaCu's.

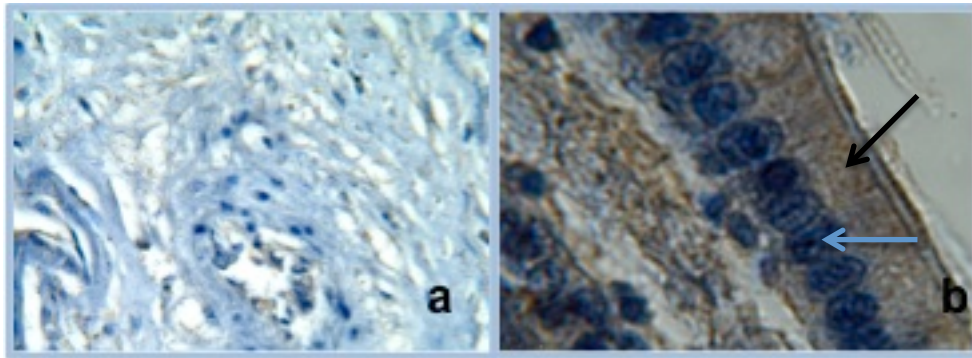


Figura 9. Tejidos control de inmunohistoquímica. a. Placenta utilizada como control negativo. b. Intestino delgado donde se observa que el citoplasma se encuentra teñido (flecha negra) mientras que los núcleos no (flecha azul).

Los resultados obtenidos en los arreglos de cérvix sano y CaCu's son descritos a continuación: En el cérvix sano se observa que la tinción es mas intensa en el núcleo (hasta el momento no hay datos acerca de que esta proteína se transloque) que en el citoplasma de las células epiteliales del estrato basal, así mismo se puede observar que la reacción es evidente en todo el epitelio, sin embargo, conforme se observan estratos superiores es evidente que la tinción deja de ser nuclear y en los estratos mas diferenciados prácticamente se pierde la expresión (fig. 10 a-d). Mientras que en las muestras de CaCu (fig. 10 e-h) se observa como la expresión nuclear es en todas las células del tejido tumoral, en la mayoría de forma intensa, sin embargo, también se encuentran tejidos tumorales en los cuales la expresión de CRBP2 es débil siendo la localización de la tinción nuclear (fig. 10g).

Se puede observar en la figura 11 por inmunodetección, que el anticuerpo marca una banda de 36 kDa que corresponde a CRBP2 según el inserto, pero no según el peso teórico que era el esperado . Así mismo, se puede observar el control de actina con una banda de 50 kDa.

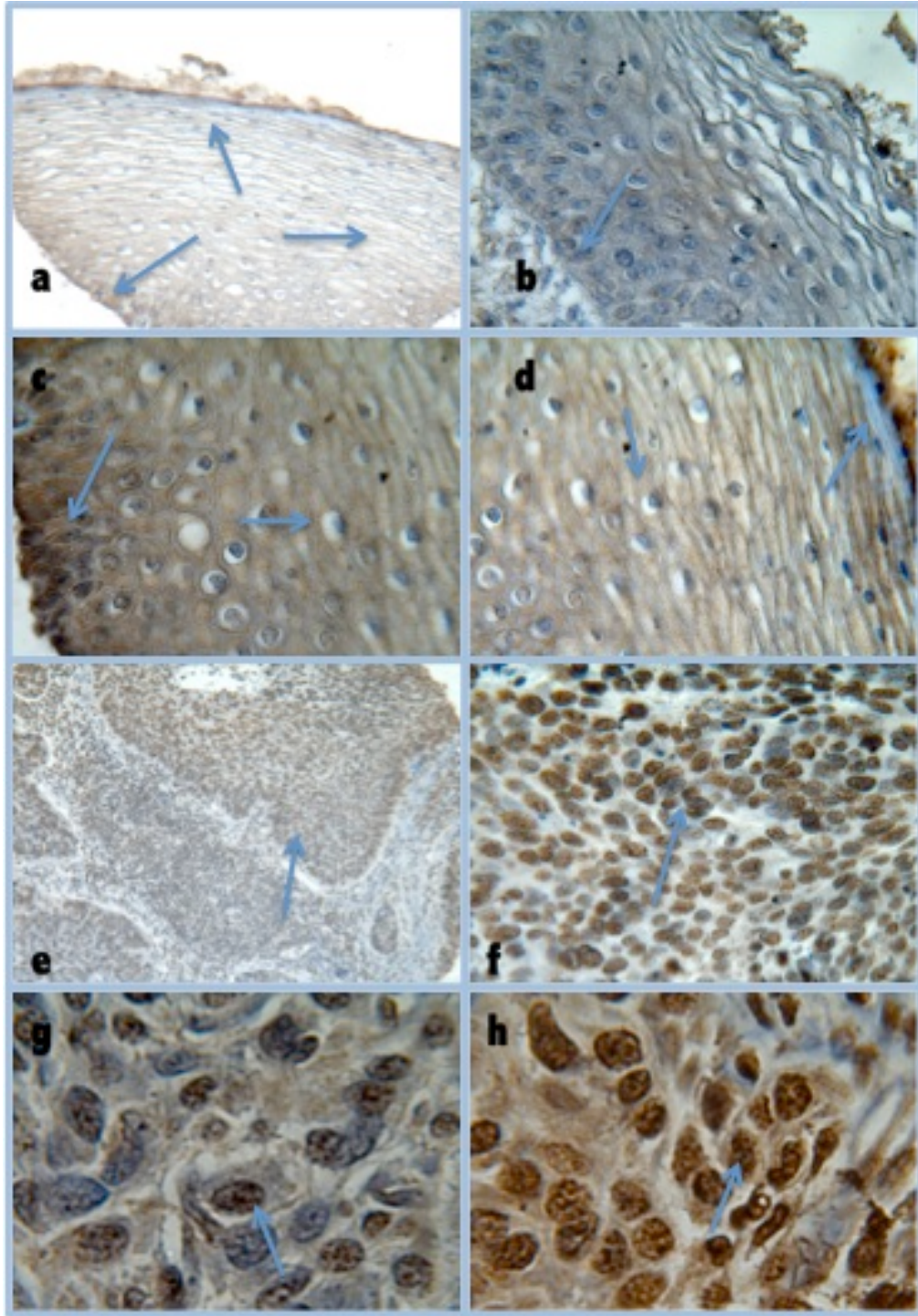


Figura 10. Inmunohistoquímica que demuestra la expresión de CRBP2. La expresión en cérvix sano se observa en los recuadros a) Con flechas se señala la expresión en el estrato basal, parabasal y superficial (10x), b) Con flecha se señala la tinción en el estrato basal (40x), c) Con flechas se señala la tinción en estrato basal y parabasal y d)(100x); cáncer cérvico uterino a 10x (e) y 40x (f) con tinción fuerte; con tinción débil g) 100 x y tinción fuerte h) 100 x.

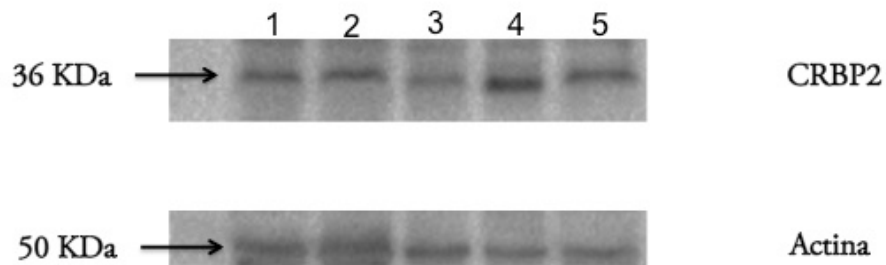


Figura 11. Inmunodetección de CRBP2. 1 corresponde a la línea celular HeLA, en el número 2 se encuentra SiHa, en el carril 3 se encuentra la línea RoVa, en la 4 esta Inbl y en el 5 Hacat .

Se procedió a realizar una segunda inmunodetección con condiciones aún mas astringentes que permitieran eliminar los posibles enlaces mas fuertes que pudieran mantener a CRBP2 unida a alguna otra. Se observa en la figura 12 que finalmente se obtiene una banda de 18 KDa que corresponde a lo esperado de forma teórica.

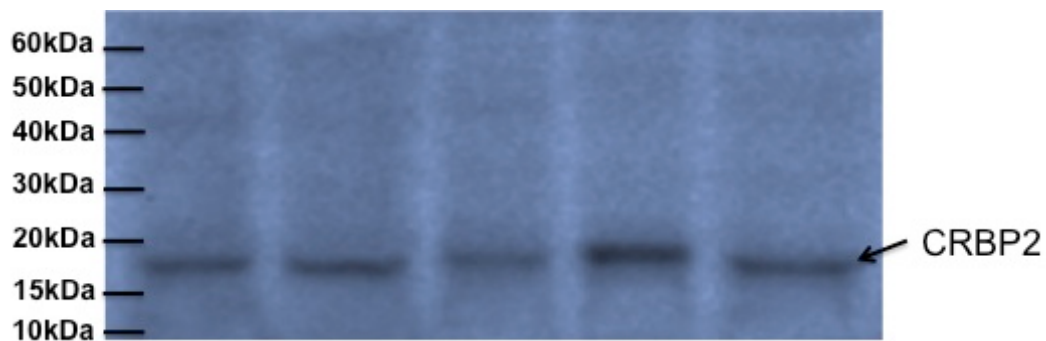


Figura 12. Inmunodetección de CRBP2 en urea. Se muestra la banda correspondiente para CRBP2 con un peso de 18 KDa. En la posición 1 se encuentra la muestra correspondiente a un cervix sano, en el 2 se encuentra una muestra de cáncer cérvico uterino, en el 3 RoVa, en el 4 la línea INBL y en el 5 HaCaT. Se observa mucho mas intensa la banda correspondiente a la línea celular INBL.

Una vez corroborada la especificidad del anticuerpo, se observó que aproximadamente el 80% de las muestras de CaCu presentan una tinción fuerte, mientras que el 20% presenta una tinción débil o tenue (figura 13). En cuanto a la tinción de las normales se observa una tinción fuerte en el estrato basal del epitelio en el 100% de las muestras.

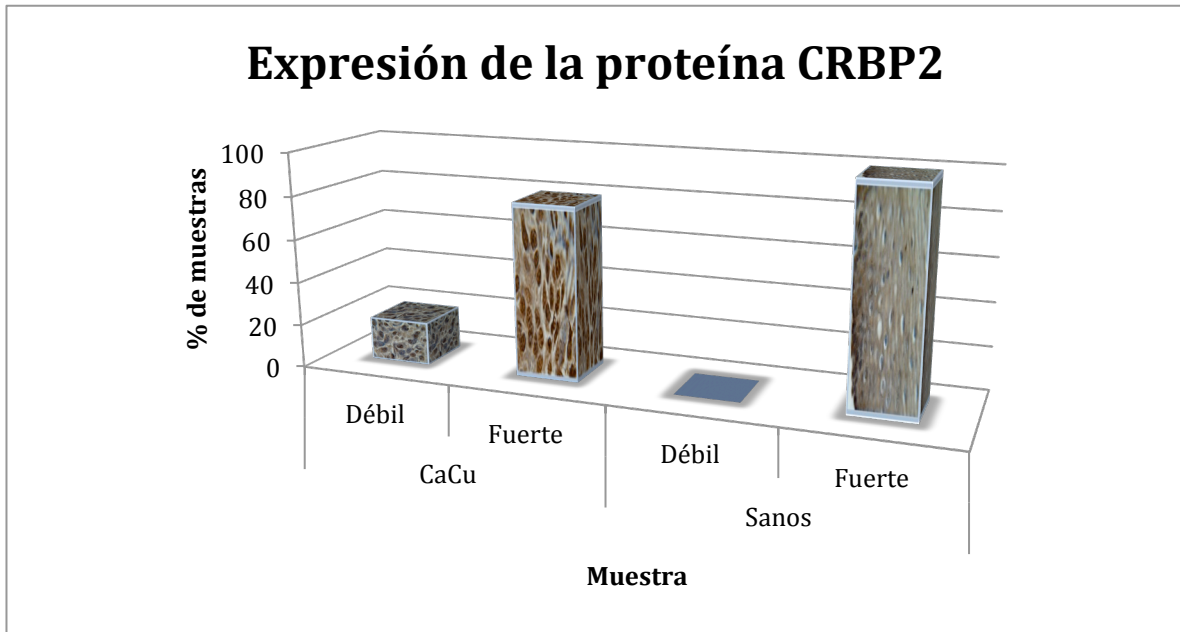


Figura 13. Porcentaje de muestras de CaCu positivas con tinción débil (20%) y fuerte (80%) por inmunohistoquímica a CRBP2.

Correlación entre la expresión proteica y los datos clínicos.

Posteriormente se realizó el análisis estadístico entre los datos clínicos y la intensidad de expresión de la proteína CRBP2 de cada muestra. Se debe resaltar que la única correlación con un valor de P significativo es con respecto a los antecedentes familiares de cáncer, el cual fue de 0.013, no así con los antecedentes directos de CaCu. Con respecto al resto de las características evaluadas no se encontró correlación alguna que fuera significativa para relacionarla con la expresión. También es importante mencionar que no hubo asociación entre una expresión alta de CRBP2 y un aumento en el número de copias.

Debido a que la intensidad de todas las muestras de sanos es una constante, no se pudo establecer una correlación entre este parámetro y los datos clínicos.

Cuadro 5. Análisis de correlación entre expresión de CRBP2 y los datos clínicos de las pacientes.

Correlación	N	Valor de P
Edad	8	0.648
<45 años	12	
≥45 años		
Embarazos		0.456
≤ 2	2	
> 2	18	
IVSA		0.264
< 18 años	10	
≥ 18 años	10	
Antecedentes familiares de cáncer		0.013
Si	9	
No	11	
Antecedentes familiares de CaCu		1.0
Si	4	
No	16	
Diferenciación		0.456
Bien/moderadamente	2	
Poco/indiferenciado	18	
Estado clínico		0.36
I/II	11	
III/IV	4	
Número de copias		0.264
Igual a 2	10	
Mayor de 2	10	

Análisis de la secuencias del promotor del gen *CRBP2*.

Para investigar una posible razón por la que se tiene una expresión en todas las muestras independientemente del número de copias y de que el gen adyacente (*CRBP1*) se encuentre apagado en la mayoría de los casos, se realizó un análisis del promotor del gen *CRBP2*. Se encontró que el promotor tiene sitios de unión a la proteína CTCF en distintas localizaciones y con motivos de diferentes longitudes (fig 14), siendo así una región rica en sitios de unión a CTCF sugiriendo de esta manera que la cromatina puede permanecer abierta permitiendo así la expresión continua de *CRBP2*. Entre mas grande el score, indica la mayor probabilidad de que CTCF se una a esta secuencia. Los motivos EMBL_M1 y EMBL_M2 fueron identificados por Schmidt y colaboradores. Los motivos Ren_20 fue identificado por Kim y colaboradores (2007), y los motivos LM2, LM7, LM23 fueron identificados por Xie y colaboradores (2007).

Motif PWM	Motif Sequence	Input Sequence Name
EMBL_M1	TGCCTCCATCTGGA	TCAGGGAATCTCAAGTTTCACTGGATGGGATTGCCAAGGGCATTCCAAGGATCCTTGGA
EMBL_M2	AGCACAGCA	TCAGGGAATCTCAAGTTTCACTGGATGGGATTGCCAAGGGCATTCCAAGGATCCTTGGA
REN_20	TCAGCCACTAGGTAGGGCTG	TCAGGGAATCTCAAGTTTCACTGGATGGGATTGCCAAGGGCATTCCAAGGATCCTTGGA
MIT_LM2	AGTCCAGATGGAGGCAGAG	TCAGGGAATCTCAAGTTTCACTGGATGGGATTGCCAAGGGCATTCCAAGGATCCTTGGA
MIT_LM7	CAGCCACTAGGTAGGGCTGG	TCAGGGAATCTCAAGTTTCACTGGATGGGATTGCCAAGGGCATTCCAAGGATCCTTGGA
MIT_LM23	CAGCCACTAGGTAGGGCTGG	TCAGGGAATCTCAAGTTTCACTGGATGGGATTGCCAAGGGCATTCCAAGGATCCTTGGA

Figura 14. Análisis de la secuencia del promotor de *CRBP2*.

Motif Start Location	Motif Length	Motif Orientation	Score
3962	14	+	6.07359
615	9	-	9.71243
239	20	-	3.53331
3959	19	-	7.91447
238	20	-	10.5157
238	20	-	14.0837

Figura 14. cont. análisis de la secuencia del promotor.

Discusión.

Los resultados del presente trabajo muestran que el 50% de las muestras tienen un aumento en el número de copias del gen, lo cual coincide con los datos anteriores. Esto indica que el gen *CRBP2* está directamente relacionado a la ganancia de esta región ya que los datos obtenidos por Hidalgo y cols. en 2005 mediante CGH en microarreglos, se determinó que la región 3q23 se ve amplificada en un 58%. En trabajos recientes en nuestro grupo (Arreola H. Datos en preparación) con análisis más estrictos y arreglos con mayor resolución en colaboración con la Universidad de Zurich, también se encuentra que un 50% de las muestras presenta amplificación de la región cromosómica. De igual manera, en trabajos previos en CaCu (Mendoza 2013) se demostró que existe ganancia en el número de copias del gen homólogo *CRBP1* que se encuentra en la misma región citogenética. Reportes previos del gen homólogo *CRBP1* en cáncer de laringe destacan que el 52.6% presenta un aumento en el número de copias. En este mismo tipo de cáncer además, la expresión de *CRBP1* se ve asociada a un buen pronóstico de supervivencia de los pacientes (Peralta 2010). Esto muestra que *CRBP1* y *CRBP2* están contribuyendo en la ganancia de la región 3q23 en cáncer de tipo epitelial como el del cérvix en 50% de las pacientes.

Al realizar el análisis de expresión mediante PCR en tiempo real, no se encontró amplificación de *CRBP2* en las muestras, pero sí se encontró amplificación del gen constitutivo ribosomal R18 y de otros genes de interés para el laboratorio como *PSG9* o *FANCI* (datos no mostrados). Esto sugiere que el tiempo de vida media del ARN mensajero sea extremadamente corto y la vida media de la proteína sea larga, tal como sucede para *CRBP1* (Eskild 2000). Por otra parte se ha demostrado que los niveles de mRNA de *CRBP2* depende de la presencia de Ácido Retinoico (Levin 1997), esta podría ser una razón por la que no se encuentra el ARN ya que no podemos determinar si la paciente consumió vitamina A antes de la toma de la muestra y si la tomamos no sabemos en que cantidades; la influencia de la ingesta podría estudiarse en un modelo animal que nos proporcione mayores datos acerca de cómo cambian los niveles de mRNA de *CRBP2* en CaCu. De igual manera existe la posibilidad de que se encuentre una isoforma por splicing alternativo no reportado o no comprobado ya que en los últimos años se han descubierto nuevos ARN tanto codificantes como no codificantes que son producto de splicing alternativo no reportado o bien de marcos de lectura abiertos que no son obvios o bien no han sido predecidos de forma *in silico* (Ota 2004), sin embargo esto implicaría un cambio en el tamaño de la proteína y dicho cambio no fue observado en la inmunodetección. Por otra parte para considerar esta teoría sería necesario utilizar varios iniciadores que puedan proporcionar evidencia de la expresión de los distintos exones que componen el mRNA, ya que los iniciadores utilizados en este trabajo únicamente abarcan fragmentos de los exones 2 y 3. Otra posible explicación es el hecho de que se pueda estar transcribiendo en muy baja cantidad y que debido a la metodología utilizada no se pueda detectar por lo que se sugiere que el mRNA de *CRBP2* puede disminuir de manera considerable y sin embargo se puede encontrar la proteína en las mismas cantidades, tal como ocurre con *CRBP1* (Eskild 2000).

Por otro lado, la actividad de este gen puede estar regulada por mecanismos epigenéticos al igual que CRBP1. Se ha encontrado que existen en promedio 3.1 promotores putativos alternos (PPA) por gen y que mas de la mitad de genes están regulados por estos PPA's (Kimura K 2006). Además, se sabe sobre la regulación de la transcripción está influenciada por elementos regulatorios distales y proximales putativos tales como CTCF o MYC, y que los diferentes factores de transcripción y las modificaciones de histona varían con respecto a su asociación con los sitios de inicio de la transcripción (Consortium, The ENCODE Project 2007). Es probable que cualquiera de estos mecanismos moleculares potencialmente puedan estar asociados a la regulación del gen. Como se ha mencionado previamente, los genes CRBP1 y CRBP2 se encuentran en la misma región cromosómica, de forma adyacente (Nilsson MH 1988, De Baere E 1998) y sin embargo la expresión de CRBP1 es contrastante con la de CRBP2, pues CRBP1 solo es expresado en el 35% de los CaCu's (Mendoza 2013) evaluados. La expresión de CRBP1 esta regulada por metilación (Esteller 2002) lo que explica que a pesar de que se encuentren aumentos en el número de copias de este gen, no se encuentre la proteína. Esto nos permite sugerir que la regulación de la expresión de CRBP2 está implicado un mecanismo de regulación epigenética que esté influenciando su expresión. En este contexto, para buscar una posible explicación de esta diferencia en la expresión se analizó la secuencia del promotor del gen CRBP2 y se encontró que existen sitios de probable unión a CTCF la cual es una proteína que permite que la cromatina se encuentre abierta para la transcripción. Esto sugiere la expresión de CRBP2 es altamente controlada de forma independiente a los genes adyacentes y que su continua expresión es necesaria para las célula indiferenciadas debido a que su expresión en cérvix sano se encuentra en el estrato basal. Esta apertura de la transcripción selectiva dada por estos sitios de unión a CTCF se ha observado también en la expresión de antígenos de cáncer de testículos (CTA's) que son expresados de forma aberrante en varios tipos de cáncer (Kim R 2013) o con IGF2 en coriocarcinomas (Ito Y 2013).

CRBP2 se observa en el citoplasma de los enterocitos pero no en el núcleo según lo reportado previamente (Noa 2000), mientras que en las muestras de cérvix sano se observó que la localización de la proteína es tanto citoplásmica como nuclear en las células del estrato basal y en todas las muestras de cáncer cérvico uterino se observa una localización en el núcleo y solo en algunas también en citoplasma, esto puede estar asociado a alguna otra función o mecanismo que siga CRBP2 en las células no diferenciadas que no se encuentra reportado. En estudios previos realizados por Thomsom (1995) se demostró que proteínas de la misma familia que CRBP2, como lo es CRABP precipitan como dímeros. Debido a esta diferencia en la localización celular de CRBP2 se decidió realizar un ensayo de inmunodetección en líneas celulares derivadas de CaCu. Este resultado llevó a sugerir que una de las posibles explicaciones a este resultado sea la formación de dímeros, tal como lo reporta Thomsom y cols. (1995) para las proteínas CRABP de la misma familia de lipoproteínas que CRBP2. Se realizó una inmunodetección mas astringente para tratar de separar los posibles dímeros. Una vez que finalmente se obtuvo la proteína monomérica se

volvió a encontrar que el peso no correspondía a lo esperado, sin embargo esto puede ser debido a modificaciones pos-traduccionales por ejemplo fosforilación, ubiquitinación o sumuilación; in silico le proponen que existen 2 sitios probables de fosforilación para CRBP2, en la Tirosina 74 y en la 117 (Phosphosite n.d.), los cuales aumentarían el peso de la proteína. Sin embargo para corroborar estas posibles modificaciones pos-traduccionales sería necesario realizar los estudios pertinentes.

Por otra parte, estudios previos han demostrado que la actividad de la proteína CRBP2 es esencial para la diferenciación y proliferación de enterocitos y endometrio (Loughney 1995, Zhang 2009, Xueping 2002). Aunque no existen estudios previos sobre la expresión de la proteína CRBP2, en cérvix sano se observa una reacción principalmente en el estrato basal y conforme el tejido se va diferenciando la expresión disminuye hasta prácticamente desaparecer. De igual manera, aunado al hecho de observar que en todos los tumores se encuentra expresión sugiere que existe una relación entre el grado de diferenciación y la expresión de la proteína. En un estudio previo realizado por Schmitt en 2003, encuentra que en hepatocarcinomas CRBP1 se acumula fuertemente dentro del núcleo celular y sugieren que puede ser debido a invaginaciones de dominios citoplásmicos recubiertos ricamente por CRBP1; Aunque esta invaginación no ha sido reportada para CRBP1 en cáncer de cérvix, es posible que este ocurriendo con CRBP2. También, con esto se muestra que la expresión de CRBP2 no es exclusiva de los enterocitos y endometrio, como previamente se había descrito.

Como se puede observar por el análisis estadístico la expresión de la proteína no esta condicionada a la ganancia en el número de copias del gen, lo que concuerda con los resultados de Vázquez-Mena y cols (2012) donde mencionan que solo el 15% de las alteraciones en el número de copias tienen una correlación con cambios en la expresión. Además, sugieren que esto puede ser debido a la regulación epigenética y que inclusive algunos de ellos pueden ser apagados, como ocurre con el gen CRBP1 (Mendoza 2011).

En el análisis estadístico se puede observar que los grupos de estudio son heterogeneos entre sí, en cuanto a la edad, el IVSA y los antecedentes familiares de CaCu. Sin embargo, los estudios de Ong y colaboradores (1991) demuestran en ratas que durante la vida adulta la cantidad de proteína no cambia, por tanto podemos considerar que en nuestra población la diferencia significativamente encontrada con respecto a la edad no modificará la expresión de la proteína. Sin embargo, la edad podría ser indicativo de si la paciente posiblemente es postmenopausica o no, ya que después de esta etapa se puede encontrar un epitelio menos diferenciado (Dallenbach 2006), se considera el impacto a la diferenciación ya que hasta ahora es el principal evento celular al cual ha sido asociado CRBP2, pero en los CaCus se tiene una cantidad semejante cantidad de pacientes mayores y menores de 45 años y no existe correlación de la expresión con la edad por lo que no se demuestra que la edad sea un factor que afecte dicha expresión. Un factor más en el que se puede encontrar diferencia entre los grupos es en el IVSA, la NOM-014-SSA2-1994 considera el IVSA antes de los 18 años como un factor de riesgo de desarrollo de cáncer,

pero en el estudio de Hwang los factores que afectan la maduración y diferenciación del epitelio son el fumar, el uso de anticonceptivos orales y la frecuencia de la actividad sexual, debido a que dos de estos factores están relacionados con el IVSA, para tener una idea mas concluyente hacen falta estudios que corroboren la influencia en la diferenciación.

La única correlación que se observó fue de la intensidad con los antecedentes familiares de cáncer, sin embargo no así con los antecedentes de CaCu en línea directa por lo que se puede deducir que en cáncer cérvico uterino la carga genética no tiene una influencia tan ponderante como lo es para otros tipos de cáncer. Esto puede deberse a que también deben estar involucrados factores propios de la persona que la puedan hacer mas susceptible a desarrollar o no a desarrollar cualquier tipo cáncer, no solo de cérvix . Sin embargo al tener la combinación de susceptibilidad y la infección por VPH combinada con el hecho de no recurrir a revisiones periódicas son los factores que en combinación ponderan mas que el solo hecho de tener antecedentes de CaCu en línea directa. Otro punto a considerar es que la intensidad de la tinción es una cuantificación relativa, debido a que se realiza en función de la opinión de varios observadores. Este factor por lo que la correlación con el grado de intensidad no tiene una gran asociación con los antecedentes. Esta evaluación tendría mayor impacto en los pacientes si se realizara el seguimiento y esta diferencia de intensidad correlacionara un un pronóstico de respuesta al tratamiento tal como sucede con CRBP1 (Peralta 2010), Her2Neu (Adam 2013) y otros marcadores para cáncer. Sin embargo para elucidar de mejor manera el papel de CRBP2 en CaCu es necesario estudiar otras proteínas relacionadas al metabolismo del retinol.

Debido a la participación de CRBP1 y CRBP2 en el metabolismo del retinol y su implicación en procesos tales como diferenciación y proliferación, es posible que la alteración en cuanto a ganancia en el número de copias de ambos genes puedan tener asociación parecida en CaCu, por lo que sería necesario un estudio que permita corroborar o descartar dicha posibilidad. De igual manera se sugiere realizar los estudios pertinentes para determinar el papel de CRBP2 en la célula sana donde y su participación en la célula tumoral, en este caso de cáncer de cérvix donde posiblemente sea necesaria su expresión para mantener la indiferenciación celular.





Conclusiones.

En este estudio se demostró que el gen *CRBP2* es susceptible a la ganancia en el número de copias y que el 50% de pacientes con cáncer cérvico uterino pueden presentar dicha alteración. Sin embargo, en todas las pacientes es posible determinar la presencia de la proteína CRBP2, y este evento no encuentra asociación con ningún dato clínico-patológico o con la ganancia de número de copias.

La expresión en RNA mensajero del gen *CRBP2* no es detectable.

Por otra parte se observa que su expresión es principalmente en los estratos no diferenciados del epitelio del cérvix por lo que se sugiere que la expresión CRBP2 se encuentra asociado con las células no diferenciadas.

Perspectivas.

-  Identificar el tiempo de vida media del RNA mensajero.
-  Identificar las isoformas de CRBP2.
-  Estatus en otros tipos de cáncer.
-  Realizar los estudios en líneas celulares de cáncer cérvico uterino para determinar si existe el mismo tipo de alteraciones que en muestras de cáncer cérvico uterino.

Referencias.

Allen, DG. White, DJ. Hutchins, AM. et. al. «Progressive genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization in squamous cell cervical cancer.» 83, nº 12 (2000): 1659-1663.

Arbyn, M. Castellsague, X. Sanjose, S. et. al. «Worldwide burden of cervical cancer in 2008.» *Annals of oncology* 22 (2011): 2675–2686.

Backsch, C. Pauly, B. Liesenfeld, M. et. al. «Two novel unbalanced whole arm translocations are frequently detected in cervical squamous cell carcinoma.» *Cancer Genetics* 204 (2011): 646-653.

Boddington, MM. Spriggs, AI. Wolfendale, MR. «CYTOGENETIC ABNORMALITIES IN CARCINOMA-IN-SITU AND DYSPLASIAS OF THE UTERINE CERVIX.» *Br Med J.* 1 (1965): 154-158.

Bontkes, HJ. van Duin, M. de Gruijl, TD. et. al. «HPV 16 INFECTION AND PROGRESSION OF CERVICAL INTRA-EPITHELIAL NEOPLASIA: ANALYSIS OF HLA POLYMORPHISM AND HPV 16 E6 SEQUENCE VARIANTS.» *Int. J. Cancer* 78 (1998): 166-171.

Brisson, J. Morin, C. Fortier, M. et. al. «Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia: differences between low and high grade lesions.» *Am J Epidemiol* 140 (1994): 700-710.

Bukhari, MH. Qureshi, SS. Niazi, S. et. al. «Chemotherapeutic/chemopreventive role of retinoids in chemically induced skin carcinogenesis in albino mice.» *International Journal of Dermatology* 46, nº 11 (2007): 1160-5.

Bushue, N. Wan YJ. «Retinoid pathway and cancer therapeutics.» *Advanced Drug Delivery Reviews* 62, nº 13 (2010): 1285-98.

Castellsagué, X. et al. «Enviromental co-factor in HPV carcinogenesis.» *Virus Research* 89 (2002): 191-199.

Chelimo, C. Wouldes, TA. Cameron, LD. Elwood, JM. «Risk factors for and prevention of human 75 76 papillomaviruses (HPV), genital warts and cervical 77 78 80 cance.» *Journal of infection*, 2012.

Consortium, The ENCODE Project. «Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project.» *Nature* 447 (2007): 799-816.

Dallenbach, G. *Color Atlas of Histopathology of the Cervix Uteri*. Springer Link, 2006.

Dellas, A. Torhorst, J. Jiang, F. et. al. «Prognostic value of genomic alterations in invasive cervical squamous cell carcinoma of clinical stage IB detected by comparative genomic hybridization.» *Cancer Research* 59 (1999): 3475-79.

De Baere, E. Speleman, F. Van Roy, N. et. al. «Assignment of the cellular retinol-binding protein 2 gene (RBP2) to human chromosome band 3q23 by in situ hybridization.» *Cytogenet Cell Genet.* 83, nº 3-4 (1998): 240-241.

Deacon, JM. Evans, CD. Yule, R. et. al. «Sexual behaviour and smoking as determinants of cervical HPV infection and of CIN3 among those infected: a case-control study nested within the Manchester cohort.» *Br J Cancer*, 1983: 1565–1572.

Demmer, LA. Birkenmeier, EH. Sweetser, DA. et. al. «The cellular retinol binding protein II gene. Sequence analysis of the rat gene, chromosomal localization in mice and humans, and documentation of its close linkage to the cellular retinol binding protein gene.» *The Journal of Biological Chemistry* 262, nº 6 (1987): 2467.

Doorbar, J. Quint, W. Banks, L. et. al. «The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses.» *Vaccine* 30S, nº 5 (2012): F55-70.

Duensingi, S. Münger, k. «Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins.» *International Journal of Cancer* 109 (2004): 157-62.

Dzul, K. Puerto, M. González, M. «Cáncer cervicouterino: métodos actuales para su detección.» *Rev Biomed* 15 (2004): 233-241.

Eskild, W. Troen, G. Blaner, WS. et. al. «Evidence for independent control at the mRNA and protein levels of cellular retinol binding protein 1 in rat Sertoli cells.» *Journal of Reproduction and Fertility* 119 (2000): 101-109.

Esteller, M. Guo, M. Moreno, V. et. al. «Hypermethylation-associated Inactivation of the Cellular Retinol-Binding-Protein 1 Gene in Human Cancer.» *Cancer Research* 62 (2002): 5902-5905.

Folli, C. Calderone, V. Ramazzina, I. et. al. «Ligand Binding and Structural Analysis of a Human Putative Cellular Retinol-binding Protein.» *The Journal of Biological Chemistry* 277, nº 44 (2002): 41970-7.

Frega, A. Stentella, P. De Loris, A. et. al. «Young women, cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus: risk factors for persistence and recurrence.» *Cancer Letters* 192, nº 2 (2003): 127-34.

Globocan 2008. *Cancer World Estadistics*. <http://globocan.iarc.fr> (último acceso: 03 de 08 de 2013).

Gordon, D. Resio, B. Pellman, D. «Causes and consequences of aneuploidy in cancer.» *Genetics (Nature Reviews)* 13 (2012): 189-203.

Gustafsson, L. Pontén, J. Zack, M. Adami H. «International incidence rates of invasive cervical cancer after introduction of cytological screening.» *Cancer causes and control* 8 (1997): 755-763.

- Hanahan, D. Weinberg, R. «Hallmarks of cancer: Next generation.» *Cell* 144 (2011): 646-674.
- Heselmeyer, K. Macville, M. SchroË, E. et. al. «Advanced-stage cervical carcinomas are dened by a recurrent pattern of chromosomal aberrations revealing high genetic instabiity and a consistent gain of chromosomee arm 3q.» *Genes Chromosom Cancer* 19 (1997): 224-33.
- Hildesheim, A. Schiffman, MH. Gravitt, PE. et. al. «Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women.» *J Infect Dis.* 169, n° 2 (1994): 235-240.
- Hidalgo, A. Baudis, A. Petersen, I. et. al. «Microarray comparative genomic hybridization detection of chromosoal imbalances in uterine cervix carcinoma.» *BMC Cancer* 5, n° 77 (2005).
- Huang, KF. Lee, WY. Huang, SC. et. al. «Chromosomal Gain of 3q and Loss of 11q Often Associated with Nodal Metastasis in Early Stage Cervical Squamous Cell Carcinoma.» *J Formos Med Assoc.* 106, n° 11 (2007): 894-902.
- Ito, Y. Nativio, R. Murrell, A. «Induced DNA demethylation can reshape chromatin topology at the IGF2-H19 locus.» *Nucleic Acids Res.* 2 (2013): 1-13.
- Jensen, KE. Schmiedel, S. Norrild, B. et. al. «Parity as a cofactor for high-grade cervical disease among women with persistent human papillomavirus infection: a 13-year follow-up.» *British Journal of Cancer* 108 (2013): 234-239.
- Jerónimo, C. Henrique, R. Oliveira, J. et. al. «Aberrant cellular retinol binding protein 1 (CRBP1) gene expression and promoter methylation in prostate cancer.» *Journal of Clinical Pathology* 57, n° 8 (2004): 872-6.
- Kloth, JN. Oosting, J. van Wezel, T. et. al. «Combined array-comparative genomic hybridization and singlenucleotide polymorphism-loss of heterozygosity analysis reveals complex genetic alterations in cervical cancer.» *BMC Genomics* 8, n° 53 (2007).
- Kajitani N, Satsuka A, Kawate A, and Sakai H. «Productive lifecycle of human papillomaviruses that depends upon squamous epithelial differentiation.» *Frontiers in Microbiology* 3, n° 152 (2012).
- Kaufmann, A. Gissmann, L. Schneider, A. «The Worldwide Perspective on Human Papillomavirus and Cervical Cancer.» *Cancer Epidemiol Biomarkers* 21 (2012): 1400-1401.
- Kim TH, Abdullaev ZK, Smith AD, Ching KA, Loukinov DI, Green RD, Zhang MQ, Lobanenkov VV, Ren B. «Analysis of the vertebrate insulator protein CTCF-binding sites in the human genome.» *Cell* 128, n° 6 (2007): 1231-45.
- Kim, R. Kulkarni, P. Hannenhalli, S. «Derepression of Cancer/Testis Antigens in cancer is associated with distinct patterns of DNA Hypomethylation.» *BMC Cancer* 13 (2013): 144.

- Kimura, K. Wakamatsu, A. Suzuki, Y. et. al. «Diversification of transcriptional modulation: Large-scale identification and characterization of putative alternative promoters of human genes.» *Genome research* 16, nº 1 (2006): 55-65.
- Kjær, S. Frederiksen, K. Munk, C. Iftner, T. «Long-term Absolute Risk of Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 3 or Worse Following Human Papillomavirus Infection: Role of Persistence.» *J Natl Cancer Inst* 102 (2010): 1478–1488.
- Levin, MS. Davis, AE. «Retinoic Acid Increases Cellular Retinol Binding Protein II mRNA and Retinol Uptake in the Human Intestinal Caco-2 Cell Line.» *The Journal of Nutrition* 127, nº 1 (1997): 13-7.
- Li, Y. Zhang, Y. Hill, J. et. al. «The retinoid, bexarotene, prevents the development of premalignant lesions in MMTV-erbB2 mice.» *British Journal of Cancer* 98, nº 8 (2008): 1380-8.
- Liu, B. Lee, KW. Li, H. et. al. «Combination therapy of insulin- like growth factor binding protein-3 and retinoid × receptor ligands synergize on prostate cancer cell apoptosis in vitro and in vivo.» *Clinical Cancer Research* 11, nº 13 (2005): 4851-6.
- Loughney, AD. Kumaredran, MK. Thomas, EJ. Redfern, CP. «Variation in the expression of cellular retinoid binding proteins in human endometrium throughout the menstrual cycle.» *Human Reproduction* 10, nº 5 (1995): 1297-304.
- López, S. Lizano, M. «Cáncer cervicouterino y virus de papiloma humano: la historia que no termina.» *Cancerología* 1 (2006): 31-55.
- Lyng, H. Brøvig, SR. Svendsrud, DH. et. al. «Gene expressions and copy numbers associated with metastatic phenotypes of uterine cervical cancer.» *BMC Genomics* 7 (2006): 268.
- Magnusson, PKE. Lichtenstein, P. Gyllenstein, UB. «HERITABILITY OF CERVICAL TUMOURS.» *Int. J. Cancer* 88 (2000): 698-701.
- Martini, M. Vecchione, L. Siena, S. et. al. «Targeted therapies; how personal should we go?» *Clinical Oncology* 9 (2012): 87-97.
- Matsuda, M. Masui, F. Mori, T. «Neonatal estrogenization leads to increased expression of cellular retinol binding protein 2 in the mouse reproductive tract.» *Cell Tissue Res.* 316, nº 1 (2004): 131-9.
- Mazibrada, J. Rittà, M. Mondini, M. et. al. «Interaction between inflammation and angiogenesis during different stages of cervical carcinogenesis.» *Gynecologic Oncology* 108 (2008): 112-120.
- Mendoza, M. Arreola, H. Valdivia, A. et. al. «Cellular retinol binding protein 1 could be a tumor suppressor gene in cervical cancer.» *Int J Clin Exp Pathol* 6, nº 9 (2013): 1817-1825.
- Mitra, AB. Murty, VV. Li, RG. et. al. «Allelotype Analysis of Cervical Carcinoma.» *Cancer Research* 54, nº 16 (1995): 4481-7.
- Muñoz, N. Franceschi, S. Bosetti, C. et. al. «Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study.» *Lancet* 359, nº 9312 (2002): 1093-1101.

Münger, K. Baldwin, A. Edwards, KM. et. al. «Mechanisms of Human Papillomavirus-Induced Oncogenesis.» *JOURNAL OF VIROLOGY* 78, nº 21 (2004): 157-162.

Negrini, S. Vassilis, G. Halazonetis, T. «Genomic instability- an evolving hallmark of cancer.» *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11 (2010): 220-228.

Nilsson, MH. Spurr, NK. Lundvall, J. et. al. «Human cellular retinol-binding protein gene organization and chromosomal location.» *Eur J Biochem.* 173, nº 1 (1988): 35-44.

Noa, N. «Retinoid-binding proteins: mediators of retinoid action.» *Biochemistry J.* 348 (2000): 481-95.

Ong DE, Kakkad B, MacDonald PN. «Acyl-CoA-independent Esterification of Retinol Bound to Cellular Retinol-binding Protein (Type 11) by Microsomes from Rat Small Intestine .» *J Biol Chem.* 262, nº 6 (1987): 2729-36.

Ong, DE. Lucas, PC. Kakkad, B. Quick, TC. «Ontogeny of two vitamin A-metabolizing enzymes and two retinol-binding proteins present in the small intestine of the rat.» *Journal of lipid research* 39, nº 9 (1991): 1521-7.

Ota, T. Suzuki, Y. Nishikawa, T. et. al. «Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs.» *Nature genetics* 36, nº 1 (2004): 40-45.

Peralta, R. Baudis, M. Vázquez, G. et. al. «Increased expression of cellular retinol-binding protein 1 in laryngeal squamous cell carcinoma.» *J Cancer Res Clin Oncology* 136, nº 931 (2010): 938.

Pérez, C. Vázquez, G. López, R. et. al. «Genome wide expression analysis in HPV16 Cervical Cancer: identification of altered metabolic pathways.» *Infectious Agents and Cancer* 2, nº 16 (2007).

Piña, P. Hernández, DM. López, R. et. al. «Human papillomavirus-specific viral types are common in Mexican women affected by cervical lesions.» *Int J Gynecol Cancer* 16 (2006): 1041–1047.

Pisano, C. Vesci, L. Foderà, R. et. al. «Antitumor activity of the combination of synthetic retinoid ST1926 and cisplatin in ovarian carcinoma models.» *Annals of Oncology* 18, nº 9 (2007): 1500-5.

Policht, F. Song, M. Sitailo, S. et. al. «Analysis of genetic copy number changes in cervical disease progression.» *BMC Cancer* 10, nº 432 (2010).

Rao, P. Arias, H. Lu, XY. et. al. «Chromosomal amplifications, 3q gain and deletions 2q33-37 are the frequent genetic changes in cervical carcinoma.» *BMC Cancer* 4, nº 5 (2004).

Rhinn, M. Dollé, P. «Retinoic acid signalling during development.» *Development* 139 (2012): 843-853.

Ross, SA. McCaffery, PJ. Drager, UC. et. al. «Retinoids in embryonal development.» *Physiological Reviews* 80, nº 3 (2000): 1021-54.

Schiffman, M. Castle, PE. Jeronimo, J. et. al. «Human papillomavirus and cervical cancer.» *Lancet* 370 (2007): 890-907.

Schmidt, D. Schwalie, PC. Wilson, MD. et. al. «Waves of retrotransposon expansion remodel genome organization and CTCF binding in multiple mammalian lineages.» *Cell* 148, nº 1-2 (2012): 335-348.

Sanl, BP. Corbett, TH. «Retinoic Acid-binding Protein in Normal Tissues and Experimental Tumors.» *Cancer Research* 37, nº 1 (1977): 209-13.

Sethi, S. Müller, M. Schneider, A. et. al. «Serologic response to the E4, E6, and E7 proteins of human papillomavirus type 16 in pregnant women.» *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 178, nº 2 (1998): 360-364.

Simon, R. Mirlacher, M. Sauter, G. «Immunohistochemical Analysis of Tissue Microarrays.» *Tissue Microarrays: Methods and Protocols* 664 (2010).

Smith, JS. Green, J. Berrington, A. et. al. «Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review.» *Lancet* 361, nº 9364 (2003): 1159-1176.

Sun, SY. Lotan, R. «Retinoids and their receptors in cancer development and chemoprevention.» *Critical Reviews on Oncology/Hematology* 41, nº 1 (2002): 41-55.

Suruga, K. Mochizuki, K. Suzuki, R. et. al. «Regulation of cellular retinol-binding protein type II gene expression by arachidonic acid analogue and 9-cis retinoic acid in Caco-2 cells.» *European Journal of Biochemistry* 262, nº 1 (1999): 70-8.

Takase, S. Suruga, K. Suzuki, R. Goda, T. «Relationship between perinatal appearance of cellular retinol-binding protein, type II and retinal reductase activity in chick liver.» *Life sciences* 58, nº 2 (1996): 133-44.

Tarter, M. Capaldi, S. Carrizo, M. et. al. «Crystal structure of human cellular retinol binding protein II to 1.2 Å resolution.» *Proteins*, 2007: 1626-1630.

Thomsom, JR. Bratt, JM. Banaszak, LJ. «Crystal Structure of Cellular Retinoic Acid Binding Protein I Shows Increased Access to the Binding Cavity due to Formation of an Intermolecular β -Sheet.» *Journal of molecular biology* 252 (1995): 433-446.

Tota, J. Chevarie, M. Richardson, L. et. al. «Epidemiology and burden of HPV infection and related diseases: Implications for prevention strategies.» *Preventive Medicine* 53 (2011): S12-S21.

Tsunoda, S. Smith, E. De Young, N. et. al. «Methylation of CLDN6, FBN2, RBP1, RBP4, TFP12 and TMEFF2 in esophageal squamous cell carcinoma.» *Oncology Reports* 21 (2009): 1067-73.

Vazquez, O. Medina, I. Juárez, E. et. al. «Amplified Genes May Be Overexpressed, Unchanged, or Downregulated in Cervical Cancer Cell Lines.» *Plos One* 7, nº 3 (2012): 1-17.

Veldhuijzen, N. Snijders, P. Reiss, P. et. al. «Factors affecting transmission of mucosal human papillomavirus.» *Lancet Infect Dis* 10 (2010): 862-74.

Villa, L. «Cervical cancer in Latin America and the caribbean: the problem ant the way to solutions.» *Cancer Epidemilogic Biomarkers Prev* (American Association for Cancer Research.) 21 (2012): 1409-13.

Volkow, P. Rubí, S. Lizano, M. et. al. «High prevalence of oncogenic human papillomavirus in the genital tract of women with human immunodeficiency virus.» *Gynecol Oncol.* 82, nº 1 (2001): 27-31.

Vogel, S. Mendelsohn, CL. Mertz, JR. et. al. «Characterization of a new member of the fatty acid binding protein family that binds all-trans-retinol.» *Journal of Biological Chemistry* 276, nº 2 (2001): 1353-60.

Walboomers, J. Jacobs, M. Manos, M. et. al. «Human Papilloma Virus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide.» *J Pathol* 189 (1999): 12-19.

Williams, SJ. Cvetkovic, D. Hamilton, TC. «Vitamin A metabolism is impaired in human ovarian cancer.» *Gynecologic Oncology* 112 (2009): 637-645.

Wolbach, SB. Howe, PR. «Tissue changes following deprivation of fat- soluble A-vitamin.» Editado por 753-77. *Journal of Experimental Medicine* 42, nº 6 (1925).

Wu, SF. Zhang, JW. Qian, WY. et. al. «Altered expression of survivin, Fas and FasL contributed to cervical cancer development and metastasis.» *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 16, nº 15 (2012): 2044-50.

Xie, X. Mikkelsen, TS. Gnirke, A. et. al. «Systematic discovery of regulatory motifs in conserved regions of the human genome, including thousands of CTCF insulator sites.» *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, nº 17 (2007): 7145-50.

Xueping, E. Liang, Z. Jianyun, L. et. al. «Increased Neonatal Mortality in Mice Lacking Cellular Retinol-binding Protein II.» *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 277, nº 39 (2002): 36617-36623.

Yamaguchi, N. Miyamoto, S. Ogura, Y. et. al. «Hepatocyte nuclear factor-4 regulates human cellular retinol binding protein type II genen expression in intestinal cells.» *J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 296 (2009): G524-G533.

Yetimalar, H. Kasap, B. Cukurova, C. et. al. «Cofactors in human papillomaviruses infection and cervical carcinogenesis.» *Gynecologic Oncology* 285 (2012): 805-810.

Zhang, L. E X. Luker, KE. et. al. «Analysis of human cellular retinol-binding protein II promoter during enterocyte differentiation.» *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 296, nº 3 (2009): G524-G533.

Ziebarth, JD. Bhattacharya, A . Cui, Y. *CTCFBSDB 2.0: a database for CTCF-binding sites and genome organization Nucleic Acids Research Database Issue*. 2013. <http://insulatordb.uthsc.edu>.

Zimonjic, DB. Simpson, S. Popescu, NC. et. al. «Molecular Cytogenetics of Human Papillomavirus-Negative Cervical Carcinoma Cell Lines.» *CancerGenetCytogenet* 82 (1995): 1-8.