



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Evaluación de la expresión y localización de las proteínas Notch-1 y Numb en lesiones premalignas y de cáncer invasor del cervix.

TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIOLOGA

PRESENTA
ANA CLARA RAMOS CRUZ

DIRECTORA DE TESIS
DRA. ADRIANA CONTRERAS PAREDES

ASESOR INTERNO
M. EN C. JOSÉ MISAEL VICENTE HERNÁNDEZ VÁZQUEZ

2017

CIUDAD DE MÉXICO



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.

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno

Ramos Cruz Ana Clara

5518222683

Universidad Nacional Autónoma de México

Fes Zaragoza

Biología

30407638-9

2. Datos del tutor

Dra. Adriana Contreras Paredes

Subdirección de Investigación Básica

Instituto Nacional de Cancerología

3. Datos del asesor interno

M. en C. José Misael Vicente Hernández Vázquez

Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer

UMIEZ-FES ZARAGOZA-UNAM

4. Presidente

M. en C. Rosalva Rangel Corona

Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer

UMIEZ-FES ZARAGOZA-UNAM

5. Suplente

Dr. Jorge Flavio Mendoza Rincón

Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer

UMIEZ-FES ZARAGOZA-UNAM

6. Suplente

Dr. Hugo López Muñoz

Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer

UMIEZ-FES ZARAGOZA-UNAM

7. Datos del trabajo escrito

Evaluación de la expresión y localización de las proteínas Notch-1 y Numb en lesiones premalignas y de cáncer invasor del cervix.

55p

2017

AGRADECIMIENTOS

A mi máxima casa de estudios, "Universidad Nacional Autónoma de México" por otorgarme la oportunidad de amar la ciencia y buscar acercarme a la verdad, ya que, el no encontrarla nos da la apertura de seguir siempre en la búsqueda del conocimiento. Por brindarme el deporte y la cultura, actividades me impulsaron tantas veces.

A la Dra. Alma Delia Chávez Blanco, por brindarme su apoyo profesional, personal, asesorías, y brindarme el ambiente de trabajo más agradable y humano que he encontrado; por demostrarme que sin importar el grado académico siempre se puede ser humilde y solidario, sus acciones me mostraron que aún existen personas que buscan descubrir la ciencia y no la manipulan, a pesar de la creciente deshonestidad que se presenta en el mundo, y por acercarme a la Dra. Adriana.

A la Dra. Adriana Contreras Paredes por apreciar mi trabajo y esfuerzo; sus enseñanzas, su completo apoyo en todo el transcurso de este proyecto y por demostrar que la honestidad y el esfuerzo pueden construir proyectos valiosos. Y sobre todo por su paciencia y comprensión.

A mi compañera de trabajo María Alicia Elenaé Vázquez Ulloa, por compartir su conocimiento, amistad, consejos y valorar mi trabajo a su lado.

A la Dra. Lizano por brindarme un espacio en su laboratorio, apoyarme y otorgarme su confianza.

Al Dr. Dueñas por permitirme trabajar en el laboratorio 6 de Epigenética, dónde tuve la oportunidad de conocer y trabajar con mis compañeros Mandy Juárez, Dominique Cortes, Dra. Guadalupe Domínguez, Alejandro Schcolnik, Ytzel Flores, Beatriz Santamarina, Blanca Gutiérrez, Yiliam Cruz, Harold Salamanca, Catalina Cobos, Dra. Catalina Trejo, Dr. Enrique Pérez, Dra. Lucia Taja, Alfonso Rivera, Briseida Martínez, Ileana Fernández, Norma Leticia, Marisol, Mau y Desiree; quienes compartieron su conocimiento, apoyo y amistad, eso ayudó a que el desarrollo de este trabajo fuese una agradable y confortante experiencia.

A los compañeros del laboratorio 3 de Virus y cáncer Elenaé, Joaquin, Leslie, Ashlin, Josué, Jhoner, Alfredo, Omar, Luna, Ade e Ime por su consejos, observaciones y ayudarme a mejorar este trabajo.

A la QFB Lourdes Peña y la QFB Guadalupe Moncada del departamento de Inmunohistoquímica del Instituto Nacional de Cancerología por su capacitación y consejos.

Al Dr. Alejandro Avilés Salas del departamento de Patología del Instituto Nacional de Cancerología por brindarle el conocimiento, apoyo y sugerencias al progreso de este trabajo. Al profesor M. en C. José Misael Vicente Hernández Vázquez, por ser mi profesor, contribuir a mi formación, mi interés en el estudio del cáncer y brindarle tiempo a este proyecto con sus revisiones y recomendaciones.

Al Dr. Diddier Prada, gracias por sus asesorías, el análisis estadístico mejoró con su ayuda, consejos y observaciones.

A mi padre por darme la vida, enseñarme a tener sueños y luchar por ellos siempre de una forma honesta, amorosa y solidaria.

A mi madre por darme la vida, amarme y ayudarme en la medida de sus posibilidades.

A mi tía Lulú por enseñarme siempre a ver la vida y el mundo de formas tan diversas, a creer en mí, el amor, la libertad, el respeto y que a pesar de la adversidad se puede seguir adelante construyendo un camino sano y agradable, que nos hace más felices.

A toda mi familia adquirida y consanguínea, que esta o estuvo a mi lado en momentos cruciales de adversidad, felicidad, apoyo, reflexión, amor, enojos, angustia y crisis, sin su presencia mi ser no hubiese tomado este camino.

A mi tía Vero y Laura por presentarme al InCan.

A mis amigas, que se convirtieron en mi familia Mandy Juárez, Briseida Martínez, Ileana Fernández, Norma Leticia y Beatriz García, por apoyarme, escucharme y hacerme pasar momentos tan felices y divertidos, las quiero mucho.

A Vichis por estar conmigo en los momentos más difíciles.

Gracias.

Este proyecto se elaboró en el Instituto Nacional de Cancerología

DEDICATORIAS

A mi padre por creer en mí, apoyarme económica, emocional y académicamente; eres mi maestro de vida, gracias por luchar en contra de lo injusto, siempre pensando en un mundo mejor para mí, con tus acciones honestas y solidarias no solo me educaste a mí, estoy segura de que también a otros tantos, admiro tu inteligencia, que me enseñas a cuestionar lo que atenta en contra del bienestar social y luchar por esos sueños en los que otros no creen, por fomentar mi amor a la lectura, a la ciencia, el conocimiento y la cultura de una forma respetuosa y amorosa. Por estar y amarme a tu manera.

A mi madre por darme la vida, por inculcarme la lectura, por estar en mi infancia, por intentar hacer las cosas diferentes, aunque no haya sido nada fácil, a pesar de las asperezas y las caídas, me ayudaste a luchar por cambiar tantas cosas que ahora me hacen sentirme más feliz, de las faltas de los demás también se aprende y ayudan a ver las propias.

A mi tía Lulú por enseñarme a valorar la vida, el amor, la verdad, la libertad, la equidad, por mostrarme caminos diferentes y sanos en busca de mis sueños, por ayudarme a mirar aquello que daña mi salud y cambiar todo lo que ya no funciona para seguir con el desarrollo de los objetivos a cumplir, por presentarme a todas esas mujeres y hombres ilustres que han cambiado mi visión del mundo, por enseñarme que las acciones dicen más que las palabras y por mostrarme que no solo somos razón.

A todas esas mujeres y hombres ilustres que no solo aportaron con su conocimiento y obras, ya que, también mediante sus acciones han luchado por que este mundo cuente con una creciente equidad o dieron apertura a ella, que lucharon contra corriente: Marie Curie, Rosalind Franklin, Lynn Margulis, Polly Matzinger's, Charles Darwin, Autores de Ciencia que ladra, Remedios Varo, Elena Poniatowska, Laura Restrepo, Wilhelm Reich, Simone de Beauvoir, Juana Inés de Asbaje y Ramírez de Santillana, Daniel Viglietti, Mario Benedetti, Alaíde Foppa, Leonora Carrington, Damián Alcázar y muchas indómitas e indómitos, su lucha también es mi lucha y recordarlos y leerlos me ayuda a recordar que todavía existen personas que luchan por esos sueños de hacer un mundo mejor, a pesar de ir contra corriente, cuando siento que ya no vale la pena seguir adelante, por la situación decepcionante y en decadencia de la sociedad, ustedes también son mi motor.

A mi familia por ayudarme en los días de desolación, gracias abue Bertha por siempre brindarme tu solidaridad, Leo por ser mi hermano y consejero, Moy hermano de juego y cariño, Iliana por ser tan bondadosa, Anabel y Oscarito por amarme; Carmela, Dianita y sus retoños siempre recibíendome con cariño; Josefina y Jimena porque me brindaron un hogar, Yola pones a prueba mi paciencia, Verito y las 3 Bautistas gracias por esos pequeños detalles y a todos los demás que siempre me reciben con cariño, aunque diferimos ideológicamente.

A todas esas personas y amigos que se volvieron mi familia adquirida, Julia y Rodolfo por su amor, Caro por sus consejos y los demás que aunque solo a veces nos vemos y seamos tan diferentes o parecidos, enriquecen y alegran mis días. Finalmente todos aquellos que aunque ya no estén fueron muy importantes y siempre estarán en mi recuerdo.

ÍNDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	2
1. Cáncer.....	2
2. Cáncer cervicouterino.....	3
a. Anatomía e histología del cérvix.....	4
3. Patología cervical.....	8
3.1 Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC).....	8
3.2 Cáncer invasor de células escamosas.....	9
3.3 Adenocarcinoma.....	10
4. Virus de papiloma humano.....	11
4.1 Ciclo viral.....	13
5. Vía de señalización Notch.....	15
6. Numb en la vía de señalización Notch-1.....	18
6.1 Numb en cáncer.....	20
6.2 Numb en la carcinogénesis cervical.....	20
Justificación.....	21
Hipótesis.....	21
Objetivo general.....	22
Objetivos particulares.....	22
Materiales y métodos.....	23
1. Revisión de historia demográfica y clínica.....	24
2. Muestras biológicas.....	24
3. Inmunohistoquímica (IHQ).....	24

4. Análisis estadístico.....	25
Resultados.....	26
1. Aspectos demográficos y clínicos de las pacientes con NIC y CaCu, atendidas en el INCan (2004-2016).....	26
2. Aumento de casos positivos para la proteína Numb en CaCu.....	29
3. Los niveles de la proteína Notch-1 disminuyen en el cáncer cervical.....	31
4. Las proteínas Numb y Notch-1 se acumulan en el núcleo en NIC, mientras que en CaCu se localizan en citoplasma.....	33
Discusión.....	37
Conclusiones.....	42
Bibliografía.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía del aparato reproductor femenino.....	4
Figura 2. Fotomicrografía del cérvix.....	5
Figura 3. Corte histológico del exocervix teñido con la técnica de hematoxilina y eosina.....	6
Figura 4. Cambios histológicos en la progresión de la Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC).....	8
Figura 5. Cortes histológicos de carcinomas de células escamosas.....	9
Figura 6. Cortes histológicos de adenocarcinomas.....	10
Figura 7. Genoma viral del HPV 16 con ADN de doble cadena.....	11
Figura 8. Carcinogénesis cervical.....	14
Figura 9. Estructura del receptor Notch.....	16
Figura 10. Vía de señalización de Notch.....	17
Figura 11. Estructura modular de la proteína Numb.....	19
Figura 12. Inmunohistoquímica para las proteínas Numb y Notch-1 en NIC y CaCu.....	30
Figura 13. Intensidad de inmunotinción para las proteínas Numb y Notch-1 en muestras de NIC y CaCu.....	32
Figura 14. Localización de las proteínas Numb y Notch-1 en muestras de NIC y CaCu.....	35

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Principales funciones de las proteínas virales del HPV.....	12
Cuadro 2. Papel de la proteína Notch-1 en la carcinogénesis cervical.....	1
Cuadro 3. Características demográficas y clínicas de pacientes con NIC y CaCu atendidas en el INCan (2004-2016).....	28
Cuadro 4. Características clínicas de pacientes con CaCu atendidas en el INCan (2004-2016).....	29
Cuadro 5. Análisis de positividad para las proteínas Numb y Notch-1 en NIC y CaCu de pacientes atendidas en el INCan (2004-2016).....	29
Cuadro 6. Niveles de inmunoreactividad para las proteínas Numb y Notch-1 en NIC y CaCu de pacientes atendidas en el INCan (2004-2016).....	31
Cuadro 7. Localización de las proteínas Numb y Notch-1 en NIC Y CaCu de pacientes atendidas en el INCan (2004-2016).....	34

LISTA DE ABREVIATURAS

CaCu: Cáncer de cervicouterino

ENT: Enfermedades no transmisibles

OMS: Organización Mundial de la Salud

IARC: International Agency for Research on Cancer

NIC: Neoplasia Intraepitelial Cervical

AIS: Adenocarcinoma *in situ*.

VPH: Virus de papiloma humano

VPH-AR: Virus de papiloma humano de alto riesgo

LCR: Long Control Region (Región Larga de Control)

HSPG: Proteoglicanos con heparán sulfato

NICD: Notch Intracellular Domain (Dominio intracelular de Notch)

TMD: Transmembranal Domain (Dominio transmembranal)

ECD: Extracellular Domain (Dominio extracelular)

EGF: Factor de crecimiento epidermal

HDAC-1: Histona deacetilasa 1

PTB: Phosphotyrosine Binding (Ligando fosfotirosina)

PRR: Proline Rich Region (Sitio rico en prolina)

IMC: Índice de Masa Corporal

ACH: Anticonceptivos Hormonales

INCan: Instituto Nacional de Cancerología

H y E: Hematoxilina y Eosina

IHQ: Inmunohistoquímica

RESUMEN

El cáncer cervicouterino (CaCu) representa el tercer cáncer más común entre las mujeres a nivel mundial. La participación de la vía de señalización de Notch-1 en el CaCu es controversial, ya que se ha descrito como una proteína supresora de tumor y como oncogen, dependiendo del tipo de cáncer. La vía de Notch-1 está regulada por diferentes mecanismos, uno de ellos es la proteína Numb, la cual regula negativamente a Notch-1. Se ha considerado a Numb como un supresor de tumor en diferentes tipos de cáncer; sin embargo, su papel en CaCu no está claramente establecido, por lo cual el interés del presente trabajo fue investigar la participación de Numb y Notch-1 en la carcinogénesis cervical. Se analizaron un total de 144 muestras de tejido cervical, agrupadas en 96 muestras de CaCu y 49 biopsias de neoplasias intraepiteliales cervicales (29 lesiones de bajo grado: NIC I, II y 20 lesiones de alto grado: NIC III), se sometieron a tinción por inmunohistoquímica para las proteínas Numb y Notch-1, se evaluaron los niveles de expresión como débil, moderado o intenso, así como su localización subcelular. Se observó una mayor frecuencia en la expresión de Numb en muestras de CaCu, comparadas con las NIC ($p=0.0138$). No hubo diferencia estadísticamente significativa en la frecuencia de casos positivos para Notch-1 entre CaCu y NIC, pero su expresión disminuyó significativamente en CaCu ($p=0.0001$). La localización de Numb fue nuclear en NICs; mientras que se acumuló en el citoplasma en la mayoría de las muestras de cáncer. Notch-1 también se localizó en el núcleo de las NIC y después de la transformación tumoral se concentró en el citoplasma. Se encontró que la positividad de Numb ($p=0.0003$), y su expresión intensa ($p=0.0097$) se asocian con la malignidad. Con respecto a la proteína Notch su inmunoreactividad intensa en el núcleo se asoció con las lesiones precancerosas ($p=0.00082$).

Nuestros resultados apoyan el papel de las proteínas Numb y Notch-1 como supresoras de tumor, ya que la localización nuclear de ambas proteínas en lesiones premalignas, sugiere la posibilidad de que la vía de Notch-1 se encuentre activa en etapas iniciales de la carcinogénesis. A diferencia del CaCu, donde ambas proteínas se acumularon en el citoplasma, y disminuye la inmunoreactividad de Notch-1, lo que sugiere la pérdida de la actividad de esta vía de señalización, posiblemente por la regulación de Numb.

INTRODUCCIÓN

1. CÁNCER

A nivel mundial el 63% de las muertes anuales son causadas por enfermedades no transmisibles (ENT) que generalmente son crónicas, es decir, son de larga duración y progresan lentamente; los cuatro tipos principales de ENT son: las enfermedades cardiovasculares, enfermedades respiratorias crónicas, diabetes y cáncer, juntas causan aproximadamente 38 000 000 de muertes al año, de las cuales 75% se concentran en países en vías de desarrollo [1, 2].

La Organización Mundial de Salud (OMS) en 2014, describe al cáncer como la enfermedad crónica degenerativa de mayor incidencia entre los adultos. A nivel mundial, en 2015 los tipos de cáncer con mayor prevalencia, en hombres fueron: pulmón y próstata; mientras que en la población femenina fueron el de mama, colorrectal y cáncer cervicouterino (CaCu) [3].

En 2015, la OMS define al cáncer como una alteración celular que provoca un aumento descontrolado de células anormales, que crecen en forma invasiva y se propagan a través de los tejidos, lo que perturba el funcionamiento normal del organismo [3].

Otros autores, definen al cáncer como un conjunto de enfermedades que comparten alteraciones en la regulación del crecimiento y la proliferación. Estas células adquieren capacidad invasiva y poseen rasgos funcionales y morfológicos diferentes a los de sus precursoras. En el año 2000, Hanahan y Weinberg describen características que comparten las células cancerosas, como la autosuficiencia de señales mitógenas, bloqueo de señales

antiproliferativas, invasión de tejidos y metástasis, inmortalidad celular, inducción de angiogénesis y evasión de la apoptosis [4]. En 2011, con los avances en la investigación genómica Hanahan y Weinberg agregan otras características promotoras del desarrollo tumoral: inestabilidad genómica y mutaciones, desregulación metabólica, evasión del sistema inmune e inflamación [5].

La IARC (International Agency for Research on Cancer), clasificó a los agentes carcinógenos en tres grandes grupos [6]:

- Carcinógenos
- 1. Físicos: radiaciones ionizantes y ultravioleta.
 - 2. Químicos: tabaco, alcohol, asbestos, arsénico, aflatoxinas.
 - 3. Biológicos: infecciones causadas por ciertos virus, bacterias o parásitos.

2. CÁNCER CERVICOUTERINO

El CaCu es el tercer cáncer más común en mujeres y el séptimo en la población general, con un estimado de 528 000 nuevos casos en 2012. Para 2016, se estimaron 266 000 muertes por este tipo de cáncer en el mundo, lo que representaría un 7.5% de todas las muertes por cáncer en mujeres [7]. Alrededor del 85% de los casos ocurren principalmente en regiones en vías de desarrollo, como en nuestro país. En México, el CaCu en 2014 ocupó el segundo lugar en mortalidad, con una tasa del 11.34%, en mujeres en edad reproductiva [8]. Para nuestro país, en 2015 se estimaron 15 988 nuevos casos y un total de 5 511 muertes causadas por este tipo de cáncer [9].

2.1 ANATOMÍA E HISTOLOGÍA DEL CÉRVIX

El cuello uterino es la parte fibromuscular inferior del útero, tiene forma cilíndrica o cónica, esta estructura mide aproximadamente 3-4 cm de longitud y 2.5 cm de diámetro, aunque su tamaño varía según la edad, el número de partos y el momento del ciclo hormonal. El cérvix esta anatómicamente constituido por tres regiones: el exocervix recubierto por una mucosa que se encuentra en continuidad con la vagina, un endocervix, el cual recubre el conducto cervical hasta la cavidad uterina y una zona de transformación localizada en la unión del endo y exocervix (figura 1) [10, 11].

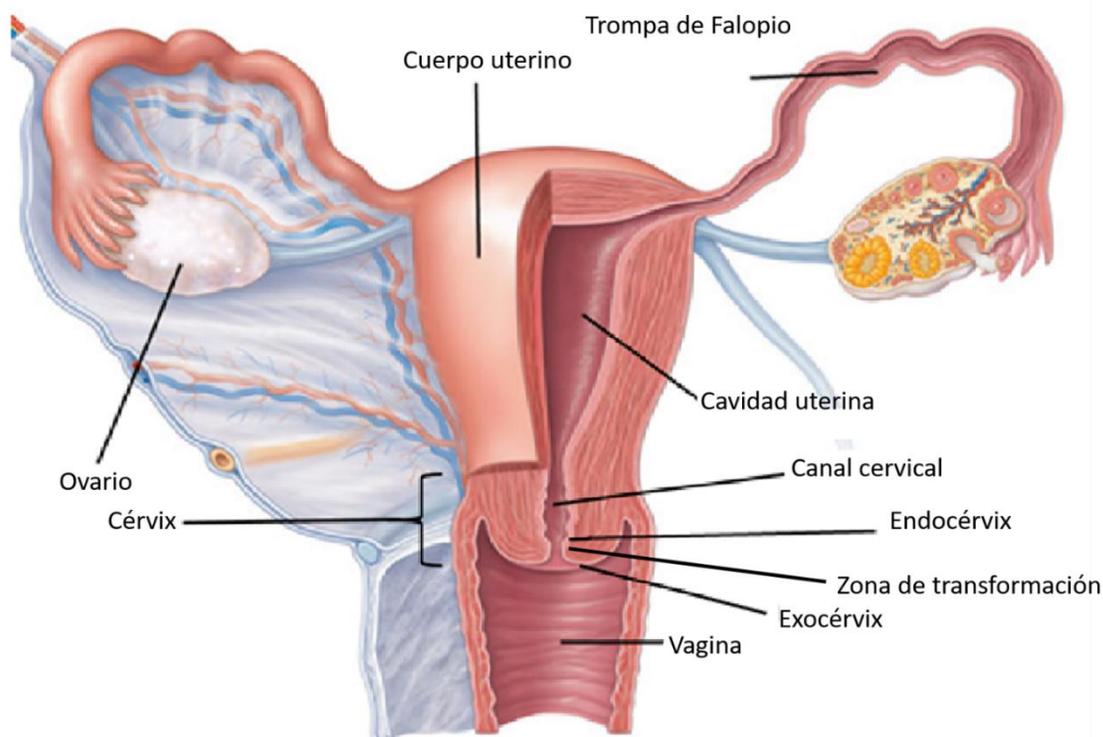


Figura 1. Anatomía del aparato reproductor femenino. Modificado de <https://citopatologiageneral.wordpress.com/anatomia-y-fisiologia/>. Se observan las estructuras que conforma al cérvix: exocervix, endocervix y la zona de transformación (unión escamocolumnar) [12].

El endocervix se encuentra revestido por epitelio columnar o cilíndrico secretor de moco, formado por una sola capa de células altas, con núcleos oscuros. En su límite distal se fusiona con el epitelio endometrial, en la parte inferior del cuerpo del útero, y en su límite proximal se fusiona con el epitelio escamoso en la unión escamocilíndrica (zona de transformación) este es un sitio de transición, donde el epitelio endocervical es remplazado por escamoso inmaduro, que eventualmente madura y es el sitio de origen más frecuente del CaCu (figura 2) [10, 13].



Figura 2. Fotomicrografía del cérvix, modificada de Sepúlveda, 2013. Se muestra el endocervix con epitelio cilíndrico (1) y glándulas cervicales (2), la zona de transformación (3) y el exocervix con epitelio escamoso estratificado plano (4); por debajo del epitelio se observa la lámina basal (5) [13].

El exocervix está cubierto por epitelio escamoso estratificado queratinizado, en continuidad con la mucosa vaginal y está constituido por cuatro estratos celulares: el primero es el estrato basal, formado por una membrana y células parabasales, estas células son altamente sensibles a señales mitogénicas y de diferenciación. El segundo, es el estrato espinoso, formado por varias capas de células poligonales. El tercer estrato, consta de una capa granulosa formada por 3 a 5 filas de células fusiformes o en forma de huso. Por último, el estrato superficial o córneo está formado por células muertas anucleadas, que protegen el epitelio de lesiones e infecciones (figura 3) [10, 13, 14].

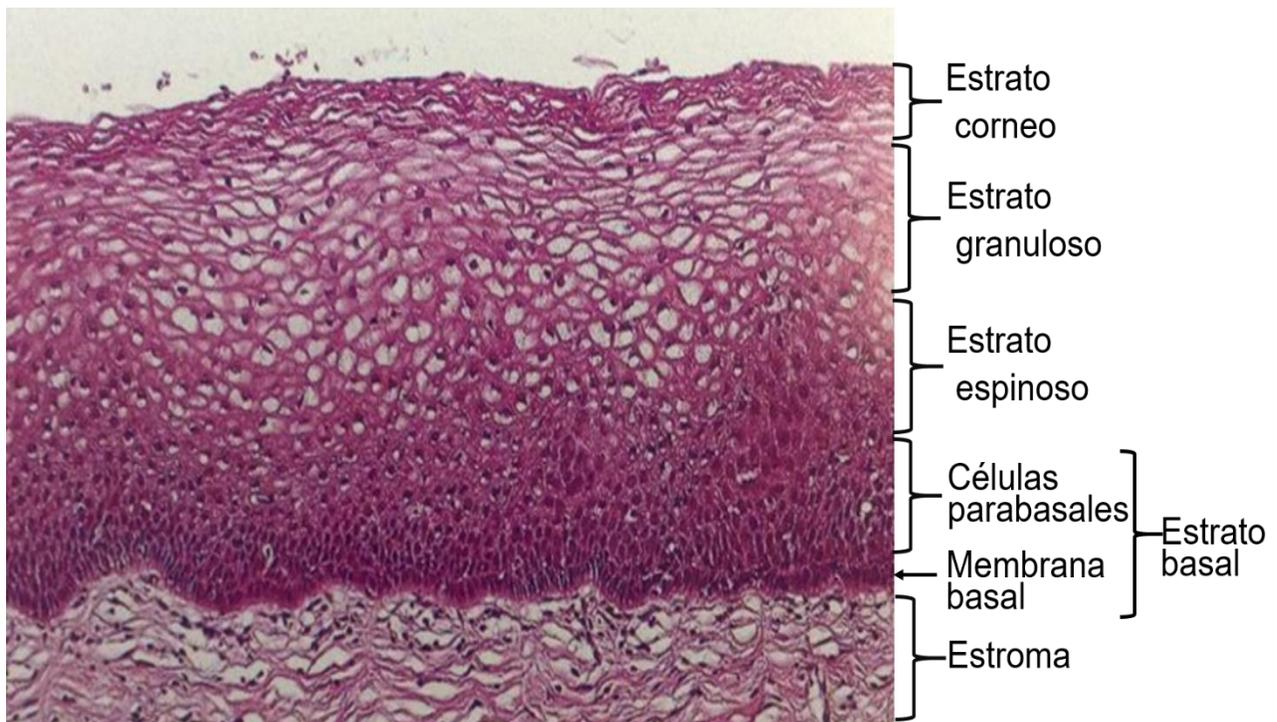


Figura 3. Corte histológico del exocervix teñido con la técnica de hematoxilina y eosina. Se observa la arquitectura del exocervix, el cual está formado por cuatro estratos de células. Modificado de <http://www.slideshare.net/jaifegon2/tejidos-epiteliales-10086002> [15].

3. PATOLOGÍA CERVICAL

3.1 NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL (NIC)

La enfermedad premaligna del cérvix se denomina Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) y se dividen en NIC I (displasia leve), NIC II (displasia moderada) y NIC III (displasia severa/carcinoma *in situ*), lo que finalmente podría evolucionar a CaCu (figura 4) [16, 17].

En NIC I, las alteraciones citológicas han afectado el tercio inferior del epitelio escamoso, se presenta una hiperplasia epitelial inicial, se puede observar la presencia de coilocitos y alteraciones en la queratinización. En el caso de NIC II, se considera que las alteraciones celulares modifican dos tercios inferiores del epitelio escamoso, se observan aneuploidías, mitosis anormales y células con índice mitótico elevado. En NIC III todo el epitelio se encuentra afectado por células anormales, pero aún se conserva la membrana basal; finalmente se desarrolla el CaCu, donde la pérdida de arquitectura celular es total y se presenta la invasión (figura 4 y 8) [18, 19].

Los tipos histológicos más prevalentes en el CaCu son el carcinoma de células escamosas (epidermoide), que comprende el 90% de los casos, y los adenocarcinomas que representan el 10% aproximadamente. Existen algunos tipos menos frecuentes como: el carcinoma de células adenoescamosas y de células pequeñas [20].

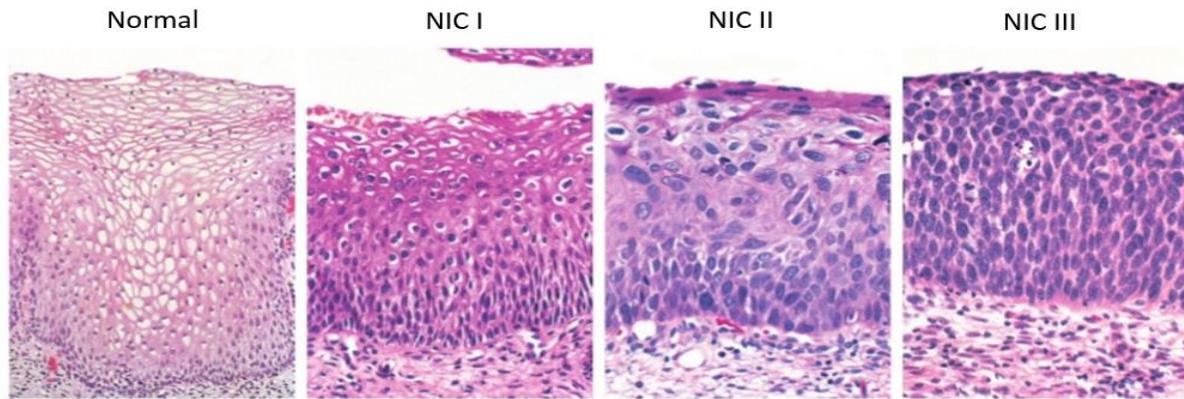


Figura 4. Cambios histológicos en la progresión de la Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC). Se observa el epitelio escamoso normal, NIC I (células coilocíticas), NIC II (se desarrolla mayor atipia en la membrana del epitelio) y NIC III (carcinoma *in situ*), donde se observa, pérdida de la diferenciación y la estratificación, anomalías nucleares en todo el epitelio. Modificado de Kumar, 2013 [21].

3.2 CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS (EPIDERMIOIDE)

En la mayoría de estos cánceres, microscópicamente se observa la formación de redes infiltrantes, constituidas por células neoplásicas separadas por el estroma, con gran variación en el tipo celular, grado de diferenciación y patrones de crecimiento. El estroma cervical que separa las bandas de células malignas, muestra infiltración por linfocitos y células plasmáticas. Las células malignas pueden subdividirse en dos tipos, queratinizantes y no queratinizantes. El carcinoma escamoso queratinizante está compuesto por células epidermoides, que contienen perlas de queratina; los núcleos son grandes e hiperocrómicos y las figuras mitóticas visibles son escasas (figura 5A). El carcinoma escamoso no queratinizado posee una estructura muy similar, pero carece de perlas de queratina (figura 5B) [10].

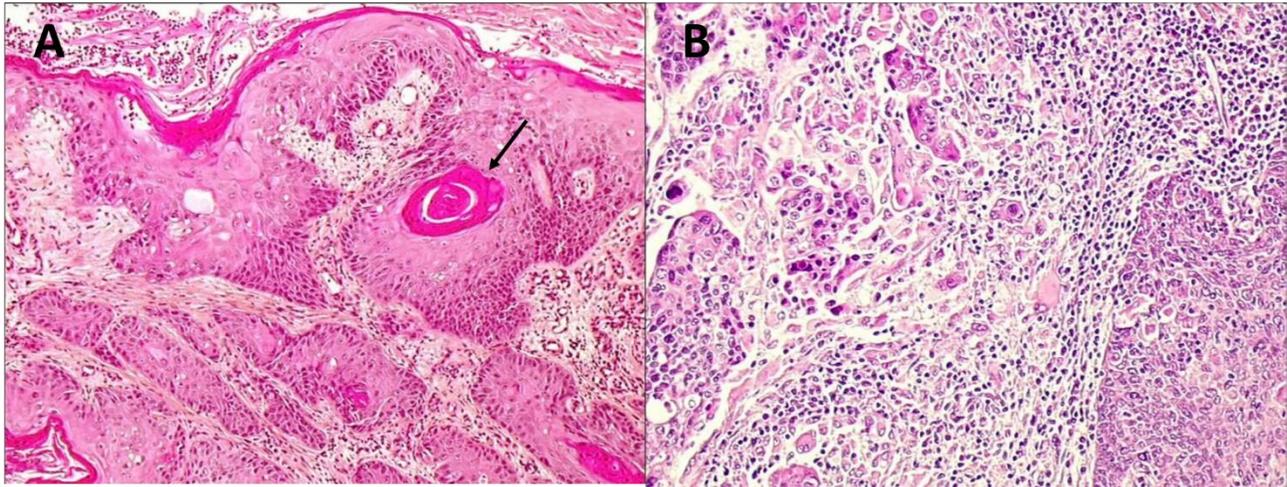


Figura 5. Cortes histológicos de carcinomas de células escamosas. En (A) se muestra un corte histológico de un carcinoma escamoso queratinizante, la flecha señala una perla de queratina y en B) se observa un carcinoma escamoso no queratinizante [22].

Con respecto al estado de diferenciación del tumor, los carcinomas pueden dividirse en: bien diferenciados, moderadamente diferenciados o indiferenciados. La mayoría de los casos (50-60%) son carcinomas poco diferenciados y los restantes se distribuyen por igual entre las otras dos categorías [10].

3.3 ADENOCARCINOMA

El adenocarcinoma *in situ* (AIS) se desarrolla a partir de una lesión precursora originada en el epitelio cilíndrico glandular, aunque su origen es controversial, debido a que algunos autores postulan que son escamosos muy avanzados. Se caracterizan por células y núcleos de mayor tamaño, con hiper cromasia nuclear, actividad mitótica elevada, menor producción de mucina citoplasmática y pérdida de la polaridad celular. También pueden observarse ramificaciones glandulares anormales y glándulas arracimadas con proyecciones epiteliales papilares intraluminales sin islotes de estroma (figura 6) [10].

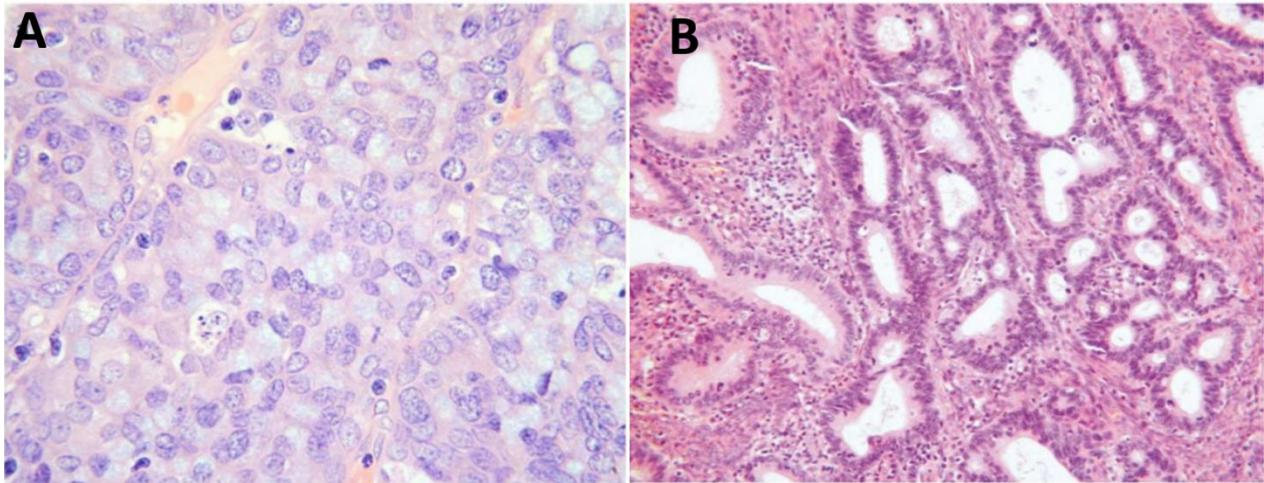


Figura 6. Cortes histológicos de adenocarcinomas. En (A) se observa adenocarcinoma cervical no diferenciado y en (B) adenocarcinoma cervical con buena diferenciación glandular [23].

4. VIRUS DE PAPILOMA HUMANO

El factor etiológico del CaCu es la infección persistente por el Virus de Papiloma Humano (VPH), ya que el genoma del virus se ha detectado en el 99% de los cánceres cervicales [24]. Estos virus se dividen epidemiológicamente debido a su capacidad oncogénica en tipos de bajo y alto riesgo, los primeros asociados al desarrollo de verrugas benignas en los genitales (condylomata acuminata), en el ano o alrededor de ellos, de estos los más comunes son los tipos 6 y 11, que causan el 90% de todas las verrugas genitales [25]. Los VPH de alto riesgo (VPH-AR) están involucrados en la carcinogénesis, siendo los tipos 16 y 18, los más prevalentes, ya que juntos se encuentran en el 70% de los casos de CaCu [26, 27].

Los VPH, son pequeños virus de ADN de doble cadena, sin envoltura, su genoma está constituido por aproximadamente 7200-8000 pb y se divide en tres regiones: la región de expresión temprana E (Early), la cual codifica para las proteínas virales (E1, E2, E4, E5, E6 y E7), necesarias para regular la transcripción y replicación viral, así como la transformación e inmortalización de la célula huésped. Una región de expresión tardía L (Late), que codifica para proteínas estructurales que forman la cápside (L1 y L2) y una región reguladora conocida como región larga de control o LCR (Long Control Region), que no codifica para proteínas, pero contiene la secuencia de ADN que controla la replicación y la expresión del genoma viral (figura 7) [28]. La capacidad oncogénica de los VPH-AR, recae principalmente en la actividad de las oncoproteínas E6, E7 y E5, ya que interactúan con un sin número de blancos celulares que modulan efectos biológicos como la proliferación celular y la apoptosis [16, 27]. En el cuadro 1 se muestran las principales funciones de las proteínas virales.

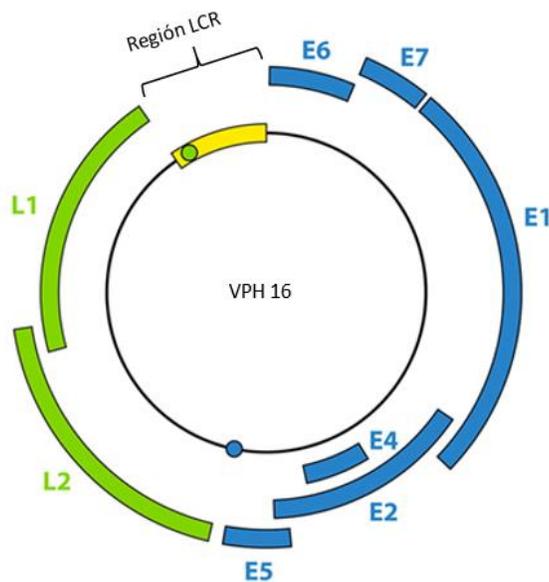


Figura 7. Genoma viral del VPH 16 con ADN de doble cadena, modificado de Stanley, 2012. Se muestran las regiones de expresión temprana, en azul (E1-7), las regiones de expresión tardía, en verde (L1 y L2) y la región larga de control, en amarillo (LCR) [29].

Cuadro 1. Principales funciones de las proteínas virales del VPH.

Proteína	Función
Región Larga de Control (LCR)	En esta región se encuentra el origen de la replicación y los elementos que regulan la expresión génica viral [30].
E1	Forma complejos heterodiméricos con E2 para controlar la replicación viral [28].
E2	Regula promotores que transcriben genes virales como E6-E7, y junto con E1 regula la replicación del ADN viral [28].
E4	Participa en la liberación de partículas virales, mediante la desestabilización de las redes de citoqueratina del citoesqueleto [28].
E5	Estimula señales mitogénicas, mediante su interacción con factores de crecimiento como EGF y PDGF [28].
E6	Interactúa con diversas proteínas celulares involucradas en la regulación de procesos biológicos importantes como apoptosis, proliferación e inmortalización, diferenciación, polaridad celular e inestabilidad genómica [28, 31].
E7	Interactúa con una gran variedad de proteínas celulares, que afectan diversos procesos biológicos, como en la proliferación celular activa, apoptosis e inestabilidad genómica [31].
L1	Proteína que se encuentra en mayor proporción formando la cápside viral [28].
L2	Proteína que se encuentra en menor proporción formando, la cápside [28].

4.1 CICLO VIRAL

Se ha postulado que la entrada del VPH es a través de microlesiones en el epitelio cervical, específicamente en la zona de transformación. El virus se une a las células basales mediante los polisacáridos HSPG (Proteoglicanos y heparán sulfato) presentes en la membrana celular del huésped, posteriormente se produce la internalización del virus al citoplasma mediante endocitosis, que puede ser mediada por clatrina o caveolina [32], dentro de la vesícula la

cápside se desintegra, el ADN queda libre y se transporta al núcleo de la célula huésped, donde puede ser integrado al genoma o mantenerse en forma de episoma. Este ciclo viral puede dividirse en dos etapas: una no productiva y otra productiva [27, 28, 31, 33, 34]. La fase no productiva se lleva a cabo en el estrato basal, se mantiene el genoma en forma de episoma, con un número bajo de copias, para poder evadir la respuesta del sistema inmune. Debido a la actividad de las proteínas E1 y E2 es posible mantener esta fase episomal, ya que inhiben la transcripción de los oncogenes E6 y E7, que de manera complementaria inducen la replicación del virus, la transformación y sobrevivencia de las células hospederas [27, 28, 31, 33, 34].

La fase productiva se inicia con la integración del genoma viral al de la célula huésped y es necesaria para que se produzcan viriones infecciosos, se expresan las proteínas E5, E6 y E7, ya que se pierde expresión de E1 y E2, se sintetizan las proteínas L1 y L2 de la cápside viral y junto con el ADN se forman viriones. Se retarda la diferenciación celular por las funciones de E6 y E7, por otra parte la actividad de la proteína E4 induce alteraciones en el citoesqueleto, provocando el colapso de las queratinas localizadas en los filamentos intermedios del citoplasma, seguido de la liberación de los viriones por descamación de las células del estrato corneo (figura 8). Las fases no productivas y productivas pueden llevarse a cabo dentro de la misma célula [27, 28, 31, 33, 34].

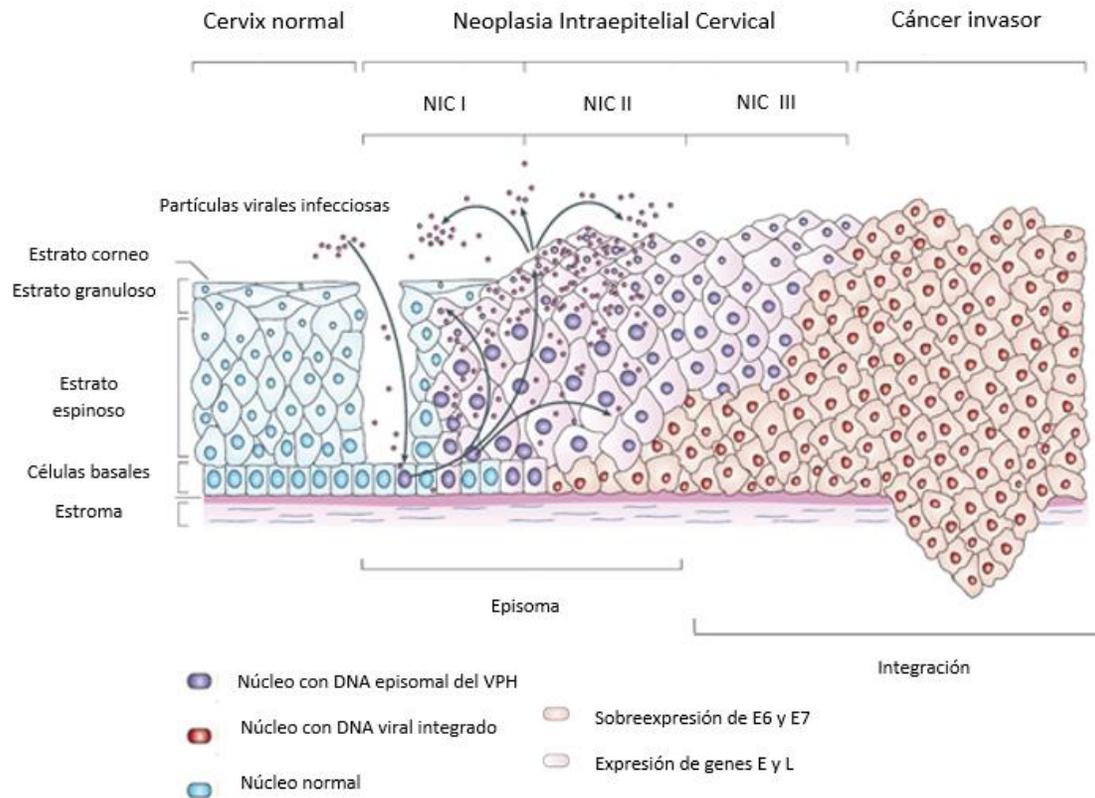


Figura 8. Carcinogénesis cervical, modificado de Woodman, 2007. El virus entra a las células basales mediante endocitosis y su ADN llega al núcleo, donde se mantiene durante la infección no productiva (núcleos morados) con un número bajo de copias en forma de episoma, mediante la expresión de las proteínas E1 y E2. En la infección productiva se expresan los genes tempranos E5, E6 y E7 y se inhiben E1 y E2 (citoplasmas rosa claro), las células infectadas proliferan verticalmente, por lo que migran al estrato granuloso, se producen las proteínas de la cápside y se lleva a cabo el ensamblaje de los viriones. Las lesiones de bajo grado no siempre progresan a cáncer, pero algunas infecciones causadas por VPH-AR avanzan a NIC de alto grado. La progresión de NIC hacia cáncer está asociada con la integración del genoma viral (núcleos rojos) [27].

La infección persistente con VPH-AR es necesaria, pero no suficiente para la progresión a cáncer [16], por lo que actualmente se han propuesto otros factores que podrían cooperar en la tumorigénesis cervical, entre estos se encuentra: la amplificación de genes como: *c-myc* [35], *pik3ca* [36], *erbB* [37] y *c-iap1* [38], la disminución en la expresión de PTEN [39] y la desregulación de diferentes vías de señalización como: Akt/PI3K [40], Wnt [41], la degradación de proteínas con dominio PDZ [42] y Notch [43].

5. VÍA DE SEÑALIZACIÓN NOTCH

La vía de señalización Notch fue descrita por primera vez en *Drosophila*, y esta evolutivamente conservada en los organismos multicelulares, controla diversos eventos durante el desarrollo como la diferenciación, la decisión del linaje celular, el crecimiento celular, la proliferación, la migración y la apoptosis [43]. Mantiene la homeostasis del tejido adulto, esta vía está involucrada en la formación de vasos sanguíneos de *novo* y en la morfogénesis durante el desarrollo vascular [44].

En mamíferos, a la fecha se han caracterizado 4 receptores y 5 ligandos: 3 designados como “Delta-like” (Dll1, Dll3 y Dll4) y 2 llamados “Serrate-like” conocidos como Jagged (JAG1 JAG2), basado en la homología estructural con los ligandos Delta y Serrata de *Drosophila* respectivamente [45]. Los genes de Notch codifican para receptores transmembranales de aproximadamente 300 kDa altamente conservados, los productos de cada gen se expresan como un solo polipéptido precursor (pre Notch), que es procesado proteolíticamente en el aparato de Golgi, dando lugar a un heterodímero que se procesa endosomalmente [46]. El precursor heterodimérico se ancla posteriormente a la membrana y está constituido por 3 dominios: el intracelular (NICD), que regula la actividad del receptor, el transmembranal (TMD), que le permite anclarse a la membrana y el dominio extracelular (ECD), que contiene los sitios de unión a su ligando (figura 9) [44, 45].

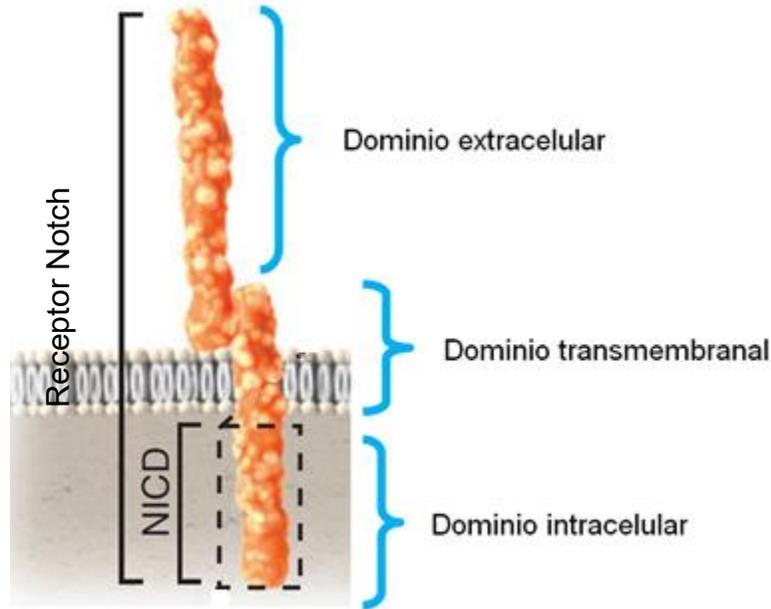


Figura 9. Estructura del receptor Notch, modificado de Andersson, 2011. Se esquematizan los tres dominios que forman al receptor: un dominio extracelular (ECD), el dominio transmembranal (TMD) y el dominio intracelular (NICD) [44].

Cuando el receptor Notch se une con alguno de sus ligandos que se encuentra generalmente en otra célula, el dominio transmembranal es procesado proteolíticamente, generando un fragmento NICD que se transloca al núcleo y se une con factores de transcripción de la familia CLS (CBF-1/ lag-1/ Suppressor of Hairless) (figura 10) [45]. Al unirse CBF-1 con el NICD, se disocia la histona deacetilasa 1 (HDAC-1) y recluta coactivadores nucleares como SKIP y MAMAL1 (mastermind), lo que hace a CBF-1 actuar como activador de la transcripción [45]. Por último, los genes blanco incluyen factores de transcripción que pertenecen a la familia de genes *hes* y *hey* (figura 10) [45].

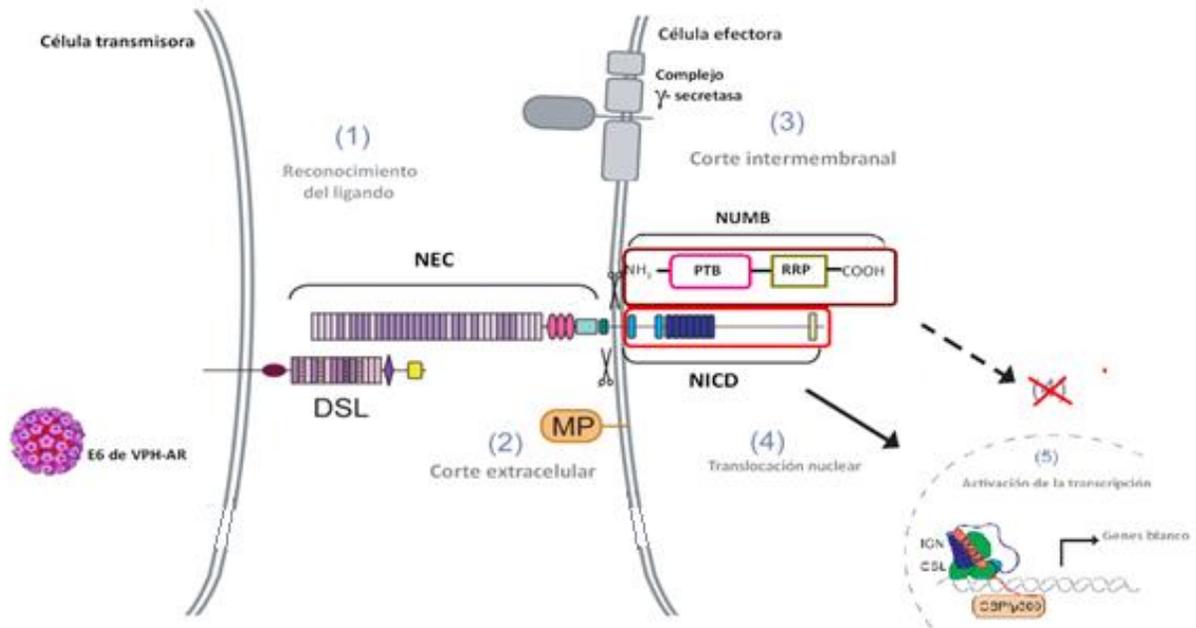


Figura 10. Vía de señalización de Notch. Modificado de Vázquez, 2013. La vía de señalización Notch se inicia tras la unión del ligando al receptor (Notch 1-4) (1), esto induce la activación dos complejos enzimáticos (2 y 3) que liberan el fragmento intracelular del receptor (NICD: Notch Intarcellular domain) (4), el cual se transloca al núcleo y regula la transcripción de diversos genes (5). El NICD es regulado negativamente por la proteína Numb [47].

Debido a que el rol de Notch-1 en la carcinogénesis cervical es controversial, en el cuadro 2 se muestran algunas evidencias, que apoyan la función oncogénica y de supresor tumoral de la proteína Notch-1 en la carcinogénesis cervical [47].

Cuadro 2. Papel de la proteína Notch-1 en la carcinogénesis cervical.

Notch como supresor de tumor	Autor y referencia
La reducción de Notch-1 es importante en estadios tardíos de CaCu para que se pueda llevar a cabo la progresión tumoral.	Allenspach 2007 [43]
La expresión de Notch-1 se reduce en las neoplasias escamosas, en comparación con tejido normal. La reducción de Notch-1 evita la diferenciación terminal y por lo tanto permite la formación de epitelios inmaduros.	Sakamoto 2012 [48]
Notch1 afecta la expresión del receptor nuclear NR4A2. (inductor de la proliferación) con lo que induce el arresto del ciclo celular en la fase G1.	Sun 2016 [49]
Notch como oncogén	
En tumores escamosos y adenocarcinomas se encontró una intensa expresión por IHQ.	Zagouras 1995 [50]
NICD sinergiza con los oncogenes virales (E6 y E7) para la transformación e inmortalización, además de generar resistencia a la anoikis.	Rangarajan 2001 [51]
NICD induce la proliferación a través de la ciclina D1 y genera resistencia a la apoptosis.	Nair 2003 [52]
La expresión de Notch-1 y Jagged-1 en CaCu fue mayor que en tejido sano y correlacionado con un peor pronóstico.	Yousif, 2015 [53]

Modificado de Vázquez 2013 [47].

6. NUMB EN LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN NOTCH-1

La proteína Numb esta evolutivamente conservada en mamíferos y está asociada a la membrana; juega un papel crítico en la determinación del destino celular en *D. melanogaster*, en mamíferos muestra un mayor grado de complejidad estructural, y por consiguiente tiene un complejo rol de funciones, como la endocitosis, el control de la división celular asimétrica,

la elección del destino celular, modula la actividad del receptor Notch y de cadherinas e integrinas, para controlar la adhesión celular y la migración [54, 55]. Esta proteína tiene un dominio PTB (Ligando fosfotirosina terminal) y dos sitios ricos en prolinas (PRR). En la figura 11 se muestra el dominio PTB en azul, un sitio PRR en verde (PRR1) y el otro en rosa (PRR2) [56]. El dominio PTB tienen función de tirosina cinasa en la transducción de señales y las PRR se encuentra relacionado con la transducción de señales intracelulares.

Numb codifica cuatro splicings alternativos que generan cuatro isoformas proteicas, que van desde 65 hasta 72 kDa [54]. Karaczyn y colaboradores en 2010 demostraron la existencia de dos isoformas adicionales (Numb5 y Numb6) las cuales no cuentan con la región PRR; estas formas son transitorias y escasas en tejidos normales, pero abundantes en células transformadas y cancerosas [57]

Cuando actúa como modulador en la actividad de Notch-1, regula esta vía de señalización al unirse con la región NICD de Notch-1, a través de su dominio PTB, mientras que por su extremo C-terminal se une a la ligasa de ubiquitina Itch y otros componentes de la maquinaria de degradación, por lo que promueve la ubiquitinación y degradación del dominio NICD de Notch-1, antes de ser translocado al núcleo. Se ha demostrado la función de modulación negativa de Numb sobre Notch-1, durante la división asimétrica en el desarrollo del sistema nervioso de *Drosophila* y de ratones [58, 59].

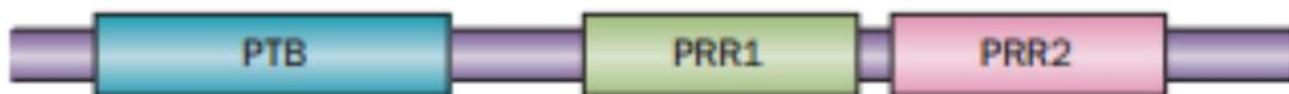


Figura 11. Estructura modular de la proteína Numb, modificada de Flores, 2014. Se muestra el dominio PTB (en azul) y los sitios PRR1 (en verde) y PRR2 (en rosa) [56].

6.1 NUMB EN CÁNCER

Debido a la habilidad de la proteína adaptadora Numb, de tener diferentes funciones celulares, dependiendo las interacciones que forme con distintas proteínas y de la localización celular se le ha atribuido función supresora en varios tipos de cáncer, como el de mama, colon, pulmón, glándulas salivales, meduloblastoma y leucemia mielógena [55, 60, 61], de forma contraria en astrocitoma y carcinoma de células escamosas se ha visto que actúa oncogénicamente [60]. Por lo que García y colaboradores concluyen, que la proteína Numb actúa de diferente forma, dependiendo del contexto tisular o de las funciones que pueda tener en diferentes vías de señalización [60].

En 2015 Wang y colaboradores observaron que en líneas celulares de endometrio (HEC-1B) la localización de la proteína Numb es nuclear [62], posteriormente Wang y colaboradores en 2015 justifican dicha translocación mediante la posible interacción de Numb con la proteína p53 [63].

6.2 NUMB EN LA CARCINOGENESIS CERVICAL.

El papel de la proteína Numb en la carcinogénesis cervical ha sido poco estudiado, ya que existen pocos trabajos, uno de ellos fue realizado por Chen y colaboradores en 2008, donde se evaluó la expresión y la división simétrica de la proteína Numb en carcinomas de células escamosas de etapas tempranas de CaCu, donde concluyen que algunas células tienen aumento en la división simétrica a causa de alteraciones en la orientación y la proliferación celular, con respecto a la expresión de Numb, observaron un incremento en las isoformas que contienen dominio rico en prolinas que promueven la proliferación celular [64].

JUSTIFICACIÓN

Aunque ha disminuido la incidencia y mortalidad por CaCu en países desarrollados, en México esta neoplasia sigue siendo un problema de salud pública [1], se sabe que la infección persistente por VPH-AR es un factor necesario, pero no suficiente para el desarrollo de este tipo de cáncer, por lo que se han propuesto otros factores que podrían cooperar como la desregulación de vías de señalización importantes en el control de la proliferación y la apoptosis como Notch-1, con respecto al papel de esta vía en el establecimiento de la carcinogénesis cervical, las evidencias son controversiales, por lo que es de importancia realizar estudios que nos permitan determinar si existen cambios en los niveles y la localización de la proteína Notch-1 y su regulador negativo Numb, en lesiones premalignas y cáncer cervical.

HIPÓTESIS

La vía de señalización Notch-1 actúa como oncogen en algunos tipos de cáncer, por lo que se esperaría un aumento en la expresión del NICD en CaCu, lo que podría correlacionar con la disminución en la expresión de Numb.

OBJETIVOS

General:

- Evaluar la expresión y localización de las proteínas Notch-1 y Numb mediante la técnica inmunohistoquímica, en muestras de pacientes con Neoplasias Intraepiteliales Cervicales y de cáncer de cérvix, para correlacionarlo con aspectos clinicodemográficos de las pacientes.

Particulares:

- Determinar los niveles de expresión y la localización de las proteínas Numb y Notch en Neoplasias Cervicales Intraepiteliales y de cáncer cericouterino.
- Correlacionar la expresión y localización de Numb y Notch con aspectos clínicodemográficos de las pacientes.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Revisión de historia clínica

De los expedientes clínicos se colectaron datos demográficos y algunos aspectos de la conducta sexual que se consideran factores de riesgo para el desarrollo de CaCu [65] como: la edad, índice de masa corporal (IMC), alcoholismo, tabaquismo, tipo histológico, edad de menarca, número de parejas sexuales, uso de anticonceptivos hormonales (ACH), paridad, tipo viral.

2. Muestras biológicas

En este trabajo, se analizaron un total de 144 muestras, incluyendo 95 casos de CaCu (11 adenocarcinomas y 84 carcinomas de células escamosas) y 49 de lesiones premalignas del cérvix, que incluyen 29 lesiones de bajo grado (NIC I, II); y 20 lesiones de alto grado (NIC III). Las muestras fueron obtenidas del Departamento de Patología del Instituto Nacional de Cancerología (INCan). El diagnóstico histopatológico fue confirmado mediante la tinción con hematoxilina y eosina (H y E).

3. Inmunohistoquímica

La presencia de las proteínas Numb y Noch-1, se determinó mediante el método de inmunohistoquímica (IHQ), para lo cual se obtuvieron cortes de 5µm, de muestras previamente fijadas con formol y embebidos en parafina. Posteriormente las muestras se desparafinaron por calor a 60°C, durante 30 min y se sumergieron en xilol para eliminar los residuos de parafina. Se rehidrataron en alcohol a concentraciones descendentes (96°, 80°, 70° y agua). La recuperación de antígenos de cada una de las proteínas, se realizó en buffer de citrato de sodio (pH=6). Para el bloqueo de la actividad endógena, de la enzima

peroxidasa, se empleó la solución bloqueadora del kit DakoCytomation EnVision+® System-HRP (Dako), se lavó el exceso de H₂O₂ con buffer de fosfatos (PBS) y se incubó con los anticuerpos primarios específicos:

- Numb policlonal, que reconoce las isoformas: p65/p66 y p71/p72 (No. Cat. sc-15590, Santa Cruz Biotechnology Inc), a una concentración de 1:30.
- Notch-1 monoclonal, que reconoce el dominio intracelular activo (NICD) (No. Cat. 07-1231, Millipore, Merck) a una concentración de 1:100.

Los anticuerpos se incubaron durante toda la noche a 4°C, posteriormente, se realizaron lavados con PBS para eliminar el exceso de anticuerpo no unido al tejido, posteriormente, las muestras fueron incubadas con el anticuerpo secundario respectivo (biotinilado y acoplado a HPR) durante 45 min del mismo Kit de Dako.

Para revelar el complejo antígeno-anticuerpo, se empleó diaminobencidina contenida en el kit DakoCytomation EnVision+® System-HRP (Dako), las muestras se contrastaron con la tinción de hematoxilina de Harris (Merck) y se deshidrataron en concentraciones de alcohol ascendentes (70%, 80%, 96% y xilol). Finalmente se montaron con medio rápido Entellan ® (Merck).

La intensidad de la inmunoreactividad se evaluó como leve, moderada e intensa, con respecto al control positivo, que en el caso de la proteína Numb fue una muestra de cáncer de ovario y para Notch-1, un hepatocarcinoma. Con respecto a la localización se evaluó como: nuclear, citoplásmico, membranal y las combinaciones: membrana/citoplasma y membrana/núcleo.

4. Análisis estadístico

El análisis de resultados se realizó con el uso del programa GraphPad Prism 5.01 para obtener las medidas de tendencia central (media y mediana), así como sus respectivas medidas de variabilidad. La asociación de la expresión de Notch-1 o Numb con las variables categóricas fueron analizadas utilizando la prueba de chi cuadrada (χ^2). Un valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS

1. Aspectos clínicodemográficos de las pacientes con NIC y CaCu, atendidas en el Instituto Nacional de Cancerología (2004-2017).

Con el fin de evaluar la expresión y localización de las proteínas Notch-1 y Numb de las proteínas Numb y Notch-1 en lesiones premalignas y de CaCu y poder correlacionar estos datos con datos clinicopatológicos de los pacientes, se analizaron un total de 144 muestras embebidas en parafina, incluyendo 49 lesiones premalignas (CIN I-III) y 95 casos de CaCu (11 adenocarcinomas y 84 carcinomas de células escamosas), se sometieron a tinción por IHQ.

Se obtuvieron los datos clinicodemográficos del expediente de las pacientes y se tomaron en cuenta los parámetros que se muestran en el cuadro 3, en este se resumen algunos factores de riesgo que se han postulado para el desarrollo del CaCu; como la edad, el índice de masa corporal (IMC), edad de la menarca, el consumo de tabaco, de alcohol y aspectos de la conducta sexual como: el número de parejas, el consumo de anticonceptivos orales, el número de gestas, y la presencia de la infección por VPH [65-67]. La edad y el IMC fueron los únicos aspectos que tuvieron diferencias significativas entre los dos grupos, ya que la edad promedio para los casos de NIC fue de 38 años, comparado con los de CaCu, en donde fue de 44 años ($p > 0.001$), lo que concuerda con la literatura, porque se sabe que el tiempo promedio de evolución de una lesión precursora a cáncer es de entre 10 a 20 años [66, 68, 69]. Con respecto al sobrepeso, este ha sido ampliamente reportada como un factor de riesgo para el desarrollo del cáncer [67], en este trabajo se presentó una diferencia estadística entre los pacientes con lesiones premalignas y los casos de CaCu ($p > 0.05$), para el caso con NICs

solo el 12.24% tenían sobrepeso, mientras que en los pacientes con CaCu el 26.32% estaban en esta categoría . Dentro del rubro de la conducta sexual, solo se encontró una diferencia significativa entre ambos grupos en el consumo de anticonceptivos hormonales (ACH) ($p < 0.01$), el 28.57% de las pacientes usaron ACH, mientras que solo el 10.2% no los empleó.

Finalmente, con respecto a las características clínicas de los casos con CaCu como el tipo histológico y el estadio clínico (cuadro 4). El tipo histológico más frecuente fue el de tipo escamoso con un 88.42% (84/95 casos) comparado con los adenocarcinomas que ocuparon el 11.58% (11/95 casos) del total de los casos. Con respecto al estadio clínico, la mayoría de los casos (49.47%) se encontraban en un estadio clínico avanzado, lo cual refleja la problemática de nuestro país, donde la gran mayoría de las pacientes son diagnosticadas en estadios avanzados de la enfermedad.

Cuadro 3. Características demográficas y clínicas de pacientes con NIC y CaCu atendidas en el INCan (2004-2016).

		Número y % de casos con NIC (n=49)	Número y % de casos con CaCu (n=95)	Valor de P
Edad	<30	15 (30.61%)	2 (2.11%)	<0.001
	≥30	34(69.39%)	91 (95.79%)	
	ND		2 (2.1%)	
Tabaquismo	Si	12 (24.49%)	46 (48.42%)	>0.05
	No	3 (6.12%)	11 (11.58%)	
	ND	30 (61.22%)	61 (64.21%)	
IMC	Desnutrición (<18.5)	0	2 (2.11%)	<0.05
	Normal (18.5-24.9)	4 (8.16%)	31 (32.63%)	
	Sobrepeso (25-29.9)	6 (12.24%)	25 (26.32%)	
	Obesidad I (30-34.9)	5 (10.2%)	17 (17.89%)	
	Obesidad II (35-39.9)	2 (4.08%)	3 (3.16%)	
	Obesidad mórbida (≥40)	6 (6.12%)	1 (1.05%)	
	ND	29 (59.18%)	16 (16.84%)	
Alcoholismo	Si	0	4 (4.21%)	>0.05
	No	15 (30.61%)	52 (54.74%)	
	ND	34 (69.39%)	39 (41.05%)	
Menarca	10-13	24 (48.98%)	52 (54.74%)	>0.05
	≥14	8 (16.33%)	34 (35.79%)	
	ND	17 (34.69%)	9 (9.47%)	
ACH	Si	14 (28.57%)	13 (13.68%)	<0.01
	No	5 (10.2%)	27 (28.42%)	
	ND	30 (61.22%)	55 (57.89%)	
Paridad	No	1 (2.04%)	6 (6.31%)	>0.05
	1-2	9 (18.37%)	15 (15.79%)	
	≥3	14 (28.58%)	56 (58.95%)	
	ND	25 (51.01%)	18 (18.95%)	
HPV	16	12 (24.49%)	48 (50.53%)	>0.05
	18	3 (6.12%)	14 (14.74%)	
	Otro	4 (8.16%)	32 (33.68%)	
	ND	30 (61.22%)	1 (1.05%)	

IMC=Índice de masa corporal.
 ACH=Anticonceptivos hormonales.
 PS= Parejas sexuales.
 ND= No dato

Cuadro 4. Características clínicas de pacientes con CaCu atendidas en el INCan (2004-2017).

		Número y % de casos CaCu (n=95)	
histológico	Tipo	Escamoso	84 (88.42%)
		Adenocarcinoma	11 (11.58%)
Estadío clínico		Bajo (I-II)	37 (38.95%)
		Alto (III-IV)	47 (49.47%)
		ND	11 (11.58%)

2. Aumento de casos positivos para la proteína Numb en CaCu

Los resultados muestran patrones de positividad diferencial de las proteínas Notch-1 y Numb entre las NIC y CaCu (figura 12). Se observó una mayor frecuencia de casos positivos para Numb en CaCu (55 casos de 95, que corresponde al 57.89%) que en muestras de NIC (34.69%, con 17 casos de 49) ($p < 0.01$) (cuadro 5).

Cuadro 5. Análisis de positividad para las proteínas Numb y Notch-1 en NIC y CaCu de pacientes atendidas en el INCan (2004-2016) (n=144).

	NIC Numb n=49	CaCu Numb n=95	NIC Notch-1 n=49	CaCu Notch-1 n=95
Positivo (+)	17 (34.69%)	55 (57.89%)	39 (79.59%)	69 (72.63%)
Negativo (-)	32 (65.31%)	40 (42.11%)	10 (20.41%)	26 (27.37%)

La positividad de la proteína Numb aumentó significativamente en las muestras de CaCu en relación a NIC ($p < 0.01$).

3. Los niveles de la proteína Notch-1 disminuyen en el cáncer cervical.

A diferencia de lo que se ha reportado en tejido sano, donde la expresión de la proteína Numb es intensa en células del epitelio escamoso y moderada en células glandulares. La inmunoreactividad para la proteína Notch-1 se reporta como moderada en epitelio escamoso y leve en tejido glandular [70, 71], en este trabajo nosotros encontramos que la inmunoreactividad para la proteína Numb fue generalmente leve en ambos grupos (76.47% en las NIC y el 70.91% en los casos de CaCu). Sin embargo, se observó una inmunoreactividad intensa en el 10.9% de las muestras de CaCu para Numb, en comparación con el 0% de las muestras de NIC (cuadro 6).

Cuadro 6. Niveles de inmunoreactividad para las proteínas Numb y Notch-1 en NIC y CaCu de pacientes atendidas en el INCan (2004-2016) (n=144).

	NIC Numb n=49	CaCu Numb n=95	NIC Notch-1 n=49	CaCu Notch-1 n=95
Leve	13 (26.53%)	39 (41.05%)	10 (20.41%)	42 (44.21%)
Moderado	4 (8.16%)	10 (10.53%)	18 (36.73%)	24 (25.26%)
Intenso	0	6 (6.32%)	11 (22.45%)	3 (3.16%)

Los niveles de la proteína Notch-1 disminuyeron significativamente en las muestras de CaCu en relación a NIC ($p < 0.001$).

Debido al aumento significativo observado en la positividad para Numb en los casos de CaCu, se esperaba una disminución en la expresión de Notch-1 en estas muestras. Sin embargo, el análisis de IHQ reveló que no había diferencia significativa en el número de casos positivos para Notch-1, entre el CaCu y los casos de NIC (figura 12 y 13), ya que en ambos grupos se presentó un alto número de muestras positivas (79.59% y 72.63%, para NIC y CaCu respectivamente) (figura 12).

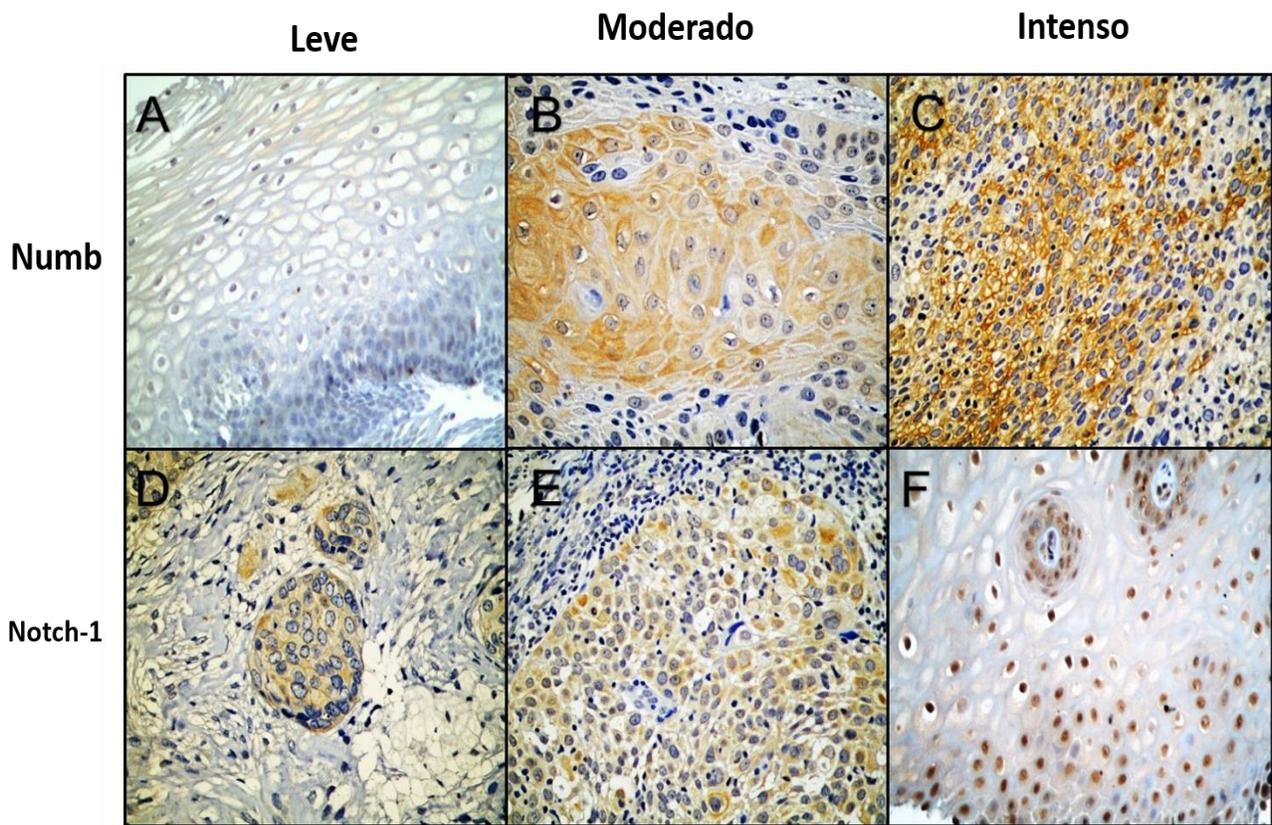


Figura 13. Intensidad de inmunotinción para las proteínas Numb y Notch-1 en muestras de NIC y CaCu, tomadas a 40x. Expresión leve en NIC (A), moderada e intensa en CaCu (B y C, respectivamente) para la proteína Numb. Se ejemplifica la tinción para Notch-1 leve (D), moderada (E) en CaCu e intensa en NIC (F).

Resulta interesante que a pesar de que no hubo un cambio significativo en el número de casos positivos para Notch-1 entre NIC y CaCu, se observó una reducción significativa ($p < 0,0001$) en la intensidad de la inmunoreactividad para esta proteína, en los casos de CaCu, ya que solo 4.35% mostraron una expresión intensa (3 de 95 casos), en contraste con el 28.21% de los casos de NIC (11 de 49 casos) (cuadro 6, figura 13).

4. Las proteínas Numb y Notch-1 se acumulan en el núcleo en NIC, mientras que en CaCu se localizan en citoplasma.

Numb se ha descrito como una proteína ubicua con diferentes funciones de acuerdo con su localización celular [72]. En este estudio, se encontró que 16 de 17 casos positivos para Numb en NIC, mostraron una localización exclusivamente nuclear (94.12%); mientras que en CaCu, Numb se acumula significativamente en el citoplasma (61.8%) ($p < 0.001$). La localización nuclear de Numb sólo se encontró en 6 de los 55 casos positivos de CaCu (10.9%) (cuadro 7 y figura 14).

El receptor Notch-1 es una proteína transmembranal de tipo 1, que posterior a la unión con su ligando se corta para generar el fragmento intracelular (NICD), que se transloca al núcleo para activar la transcripción de sus genes blanco [43, 44, 73]. En casi la totalidad de las muestras de NIC, Notch-1 presentó una localización nuclear (97.44%), pero en CaCu esta proteína disminuyó en el núcleo (23.19%) y se acumuló en el citoplasma. A pesar de que la mayoría de muestras de CaCu fueron citoplásmicas (44.93%), de estos casos sólo el 3.22% mostró niveles intensos, el 41.94% niveles moderados y el 54.84% leves, por lo que se observa una tendencia a que los niveles de Notch-1 se pierdan en los caso de CaCu.

Cuadro 7. Localización de las proteínas Numb y Notch-1 en NIC y CaCu de pacientes atendidas en el INCan (2004-2016) (n=144).

	NIC Numb n=49	CaCu Numb n=95	NIC Notch-1 n=49	CaCu Notch-1 n=95
Membrana	0	2 (2.1%)	0	0
Citoplasma	1 (2.04%)	34 (35.79%)	0	31 (32.63%)
Núcleo	16 (32.65%)	6 (6.32%)	38 (77.55%)	16 (16.84%)
Membrana/citoplasma	0	8 (8.42%)	0	10 (10.53%)
Citoplasma/núcleo	0	5 (5.26%)	1 (1.05%)	12 (12.63%)

La expresión de Numb y Notch-1 en NIC es nuclear, mientras que se acumula en citoplasma en los casos de CaCu ($p < 0.001$).

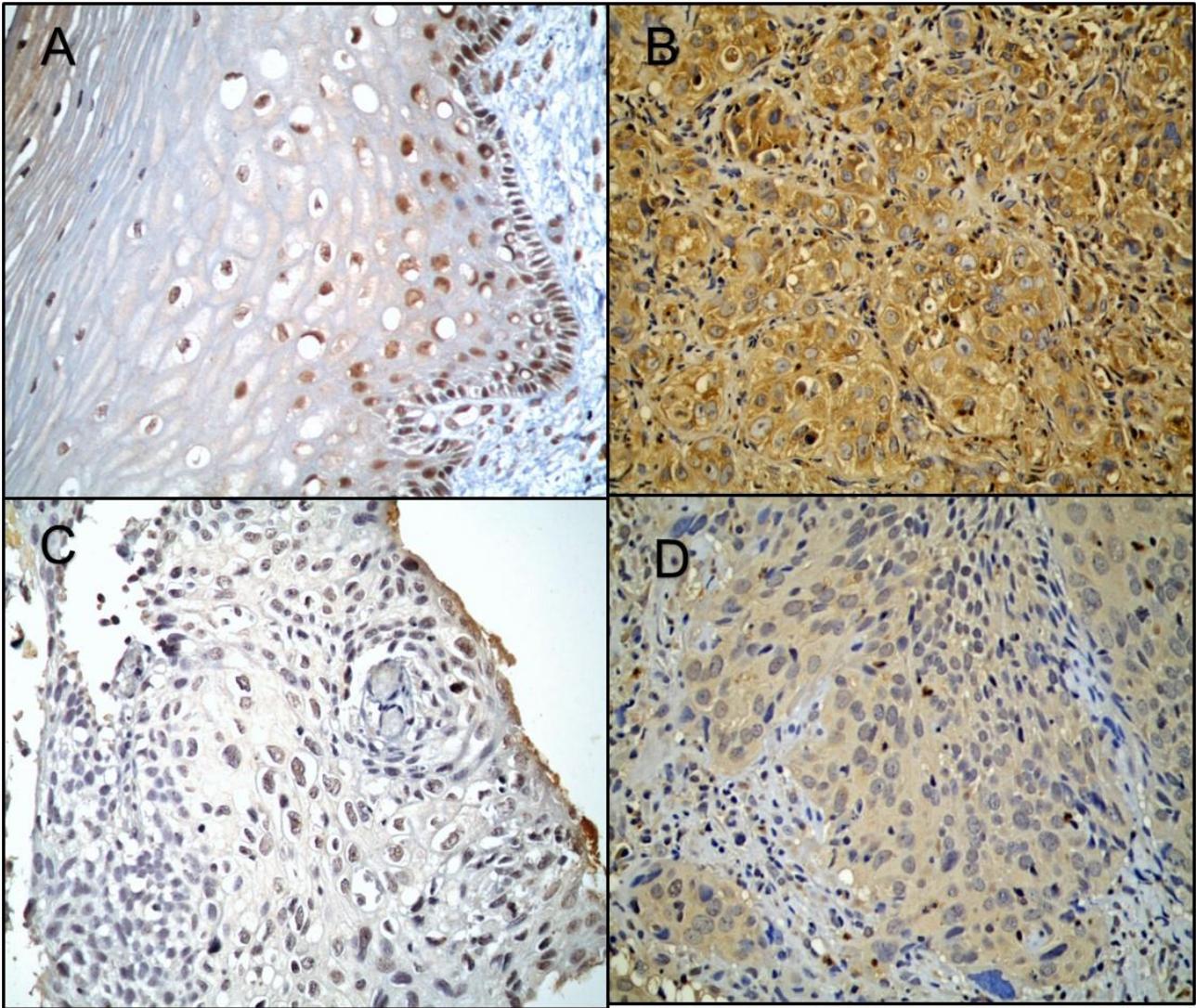


Figura 14. Localización de las proteínas Numb y Notch-1 en muestras de NIC y CaCu, tomadas a 40x. Las proteínas Numb y Notch-1 se localizaron principalmente en el núcleo en NIC (A y C), mientras que en CaCu, se acumularon en el citoplasma tanto Numb (B) como Notch-1 (D).

Es importante señalar que algunas funciones de Numb en el núcleo celular se han caracterizado previamente. Específicamente en cáncer, se ha propuesto que Numb nuclear induce un arresto en G1/M, estabiliza a p53 y disminuye la proliferación [74, 75]. En el caso de Notch-1, la porción intracelular NICD se transloca al núcleo y favorece la transcripción de genes blanco [44, 76].

Se encontró una fuerte asociación entre la positividad citoplásmica de Numb con la malignidad ($p < 0.001$), por el contrario, la inmunotinción nuclear para Notch-1, se asoció negativamente con la malignidad ($p < 0.0001$). Estos resultados sugieren que la expresión nuclear de Notch-1 es un factor pronóstico favorable, mientras que la expresión citoplásmica de Numb es un factor desfavorable para la carcinogénesis cervical.

	Estimado	IC 95%	valor de p
Expresión citoplásmica de Numb	3.286	5.31, 1.262	0.001
Expresión nuclear de Notch-1	-4.125	-1.041, -7.288	0.004

DISCUSIÓN

Las alteraciones en la vía de Notch-1 se han asociado a la tumorigénesis, pero su comportamiento difiere entre diversos tipos de cáncer [76-79]. En cáncer de cuello uterino, el papel de esta vía es controversial [80-82]. Algunos estudios proponen que los niveles de expresión de Notch-1 se modulan según el estadio de la enfermedad; es decir, en lesiones tempranas su expresión se encuentra aumentada; mientras que en cáncer disminuye [49]. Pocos son los estudios que han abordado el papel de la regulación negativa de esta vía mediante la proteína Numb, que antagoniza la señal de Notch-1 por interacción directa o indirecta [73]. En el presente estudio determinamos, mediante análisis de IHQ el patrón de expresión y localización de Numb y Notch-1, tanto en muestras de NIC, como en CaCu, con el fin de determinar su participación en la carcinogénesis cervical.

Se analizaron algunos factores clinicodemográficos que se han postulado como factores de riesgo para el desarrollo de cáncer como la edad, el tabaquismo, el consumo de alcohol y la del IMC, así como aspectos de la conducta sexual como: el número de parejas, gestas y partos, entre otros. Con respecto a la edad, se encontró una diferencia significativa entre ambos grupos, ya que la mayoría de los pacientes con cáncer estaban en el rango de edad de ≥ 30 años, lo cual concuerda con el tiempo de evolución de una lesión premaligna del cérvix y con lo reportado por otros autores [69]. Con respecto al sobrepeso y la obesidad son claramente factores de riesgo en el desarrollo del cáncer [67], específicamente en CaCu existen estudios que han demostrado que existe asociación entre el sobrepeso y el desarrollo de adenocarcinomas, el mecanismo no es claro, sin embargo esta podría ser por acción hormonal, pero puede ser afectado por la edad [83]. En cuanto a los factores de riesgo

relacionados con la conducta sexual, solo se encontró diferencia significativa en el consumo de ACH, ya que la mayoría de las pacientes con CaCu reportaron el uso de ACH, esto concuerda con lo reportado por el International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer en 2007, ellos concluyen que el uso de anticonceptivos hormonales por más de 5 años junto con otros factores aumenta el riesgo para desarrollar CaCu [84]. El número de parejas sexuales no mostró diferencias significativas en ambos grupos, sin embargo se considera como un claro factor de riesgo el tener más de 2 parejas sexuales para el desarrollo de CaCu, esto debido a que el factor etiológico para este tipo de cáncer es el VPH, el cual se sabe se transmite por vía sexual y que al aumentar el número de parejas sexuales aumenta el riesgo de la infección persistente [66, 85]. En parámetro no se encontraron diferencias significativas que se podrían atribuir a que las pacientes no responden con verdad a este tipo de preguntas, debido a que la considera una intromisión a su intimidad.

Numb fue detectada tanto en muestras de NIC, como en CaCu, pero la frecuencia de casos positivos fue significativamente mayor en CaCu. Este dato concuerda con los hallazgos de Chen *et al.*, (2008), quienes mostraron que Numb incrementa durante el proceso de transformación [64]. Numb se ha identificado como una proteína supresora de tumor [55] y su pérdida ha sido reportada en cáncer de mama y en carcinomas de pulmón de células no-pequeñas, donde la proteína Numb presenta un aumento en su proceso de degradación [86, 87]. En carcinoma escamoso de esófago, de glándula salival y astrocitoma, la expresión del ARN mensajero de Numb disminuye en relación a tejido sano [88-90], aunque el mecanismo de esta desregulación no se conoce. Por otra parte, se ha reportado un incremento en la expresión de Numb en carcinoma oral [77], hepatocelular [54] y de endometrio [62], por

mecanismos tampoco esclarecidos. Este panorama en la expresión de Numb entre los diferentes tipos de tumor refleja una regulación compleja de la vía de *notch-1*.

Por su parte, Numb contrarresta la función de Notch-1 por diferentes mecanismos, ya sea por su interacción directa, o en su papel de proteína andamio para reclutar proteínas endocíticas y ligasas E3 de ubiquitina [73].

En este estudio observamos un aumento en el número de casos positivos para Numb, así como una tendencia a incrementar la señal de inmunotinción de Numb en los casos de CaCu, en comparación con NIC. Debido a esto, se esperaba un cambio en la expresión de Notch-1; sin embargo, aunque la frecuencia de muestras positivas para Notch-1 fue similar en ambos grupos, si existió una disminución significativa de la intensidad de la señal positiva para Notch-1 en el grupo de CaCu (cuadro 6). Esto concuerda con los hallazgos obtenidos por Talora *et al.*, (2002), quienes encontraron que en líneas celulares derivadas de cáncer cervical y en muestras de CaCu disminuye la expresión del gen Notch-1 [81, 91].

Por otra parte, se sabe que en el tejido cervical normal, Numb se encuentra en la membrana y el citoplasma de la célula [70] donde regula la vida del receptor Notch-1 [92-94]. En el cáncer de endometrio, Numb se acumula en el núcleo [62] y tanto Notch-1 como Hes-1 aumentan su expresión [95], lo que sugiere un papel como oncogen para en este tipo de cáncer. Sin embargo, nuestros resultados contrastan con estas observaciones, ya que muestran que Numb se localiza en el núcleo en los casos de NIC; mientras que en CaCu se acumula en el citoplasma. Se ha reportado anteriormente que la función nuclear de Numb es arrestar el ciclo celular e inducir la apoptosis [74]. Dado que esta proteína no contiene una señal de

localización nuclear, se ha demostrado que su translocación depende de su interacción con p53 [63]. En el caso de las lesiones premalignas, infectadas con el VPH, como es el caso de los NIC estudiados, la expresión del oncogen viral E6 se encuentra controlada por E2 [96], por lo que no podría ser suficiente para impactar en los niveles de la proteína p53 e impedir la translocación de Numb al núcleo [63]. A pesar de que no hay reportes que aborden la relación entre el VPH y Numb, se sabe que en el CaCu, la alta expresión del oncogén E6 promueve la degradación de p53 [97], reduciendo la posibilidad de que Numb se transloque al núcleo. Este mecanismo podría explicar la acumulación de Numb en el citoplasma en las muestras de CaCu.

Es importante señalar, que el gen Numb puede generar al menos seis isoformas producto del procesamiento alternativo, con diferencia en el tamaño del dominio de PTB y la PRR, todas con diferente localización y función. Solamente las isoformas con el dominio PTB largo son capaces de degradar a Notch-1 [57] y se encuentran en membrana. El cambio en la localización de Numb en nuestras muestras, se podría explicar por cambios en el procesamiento alternativo que favoreciera la expresión de las isoformas de Numb capaces de degradar a Notch-1 en CaCu; la presencia de estas isoformas en lesiones neoplásicas del cérvix, ya ha sido reportada anteriormente [64].

La localización nuclear de ambas proteínas en casi todos los casos positivos de NIC, podría sugerir: 1) que Notch-1 podría estar activando la transcripción de genes implicados en el control del ciclo celular, tales como *p21* [49, 98]; y 2) que, debido a su localización nuclear Numb no tendría una función como regulador negativo de Notch-1, pero en cambio, podría estar impidiendo la progresión del ciclo celular e induciendo apoptosis [74]. Estos resultados

apoyan un importante papel de la vía de señalización Notch-1 como supresor de tumor en el tejido cervical, donde esta vía se encuentra activa en las primeras etapas de la carcinogénesis cervical, y se pierde en cáncer cervical ya establecido.

La disminución y localización citoplásmica de la proteína Notch-1 podría estar promoviendo un estado indiferenciado en CaCu y a pesar de estar presente podría no ser funcional. También se promueve un estado proliferativo, debido a que la proteína Notch-1 induce el arresto celular, mediante el incremento en la expresión de la proteína p21, cuando esta vía se encuentra activa [99].

Debido a que Notch-1 induce el arresto celular, mediante el incremento en la expresión de la proteína p21, su disminución podría promover un estado proliferativo, así como un estado indiferenciado debido a que regula genes que están implicados en el mantenimiento de un estado celular diferenciado en epitelio escamoso estratificado mediante la expresión de queratina 1 y 10 [99].

CONCLUSIONES

- Las proteínas Numb y Notch-1 se localizan en el núcleo de lesiones premalignas del cérvix.
- En cáncer cervicouterino las proteínas Numb y Notch-1 se encuentra en citoplasma.
- La intensidad de la inmunotinción para Notch-1 disminuye en cáncer cervical.
- Los resultados de este trabajo sugieren una pérdida de la actividad de Notch-1 en CaCu posiblemente por la acción de su regulador negativo Numb.

BIBLIOGRAFÍA

1. Organización Mundial de la Salud. Enfermedades no transmisibles. 2015. Obtenido de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs355/es/>. (Recuperado en mayo de 2016).
2. Organización Mundial para la Salud. 10 datos sobre enfermedades no transmisibles. 2013. Obtenido de: http://www.who.int/features/factfiles/noncommunicable_diseases/es/. (Recuperado en mayo de 2016).
3. Organización Mundial para la Salud. 10 datos sobre el cáncer. 2014. Obtenido de: <http://www.who.int/features/factfiles/cancer/es/>. (Recuperado en mayo de 2016).
4. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell. 2000; 100 (1): 57-70.
5. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011; 144 (5): 646-674.
6. Coglianò VJ, Baan R, Straif K, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Freeman C, Galichet L, Wild CP. Preventable exposures associated with human cancers. J Natl Cancer Inst. 2011; 103 (24): 1827-1839.
7. Globocan Cervical Cancer 2012. Obtenido de: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx. (Recuperado en mayo 2016).
8. Instituto Nacional de las Mujeres INMUJERES. Tasa de mortalidad por cáncer. 2013. Obtenido de: http://estadistica.inmujeres.gob.mx/formas/muestra_indicador.php?cve_indicador=1124&Switch=0&Descripcion2=NULL&indicador2=0&original=0&fuente=1124.pdf&IDNivel1=17. (Revisado en mayo de 2016).
9. Globocan Cervical Cancer 2012. Obtenido de: http://globocan.iarc.fr/old/burden.asp?selection_pop=126484&Text-p=Mexico&selection_cancer=4162&Text-c=Cervix+uteri&pYear=3&type=0&window=1&submit=%C2%A0Execute. (Revisado en julio de 2016).
10. International Agency for Research on Cancer. Introducción a la anatomía del cuello uterino. 2016. Obtenido de: <http://screening.iarc.fr/colpochap.php?lang=3&chap=1>. (Revisado en junio de 2016).
11. Gonzalo E, Coronel JA, Alvarado A, Cantú DF, Flores D, Ortega A, González A, Islas D, Muñoz DE, Robles JU, Solorza G, Mota A, Gallardo D, Morales F, Cetina ML, Herrera A. Oncoguía: Cáncer Cervicouterino. Instituto Nacional de Cancerología. 2011; 6: 61-69.
12. Citopatología general. Anatomía y fisiología del aparato reproductor femenino. Obtenido de: <https://citopatologiageneral.wordpress.com/anatomia-y-fisiologia>. (Revisado en junio de 2016).
13. Sepúlveda J. Texto atlas de Histología: Biología celular y tisular. 2013. Mac Graw-Hill. México. 312 pp.
14. Vázquez MAE. 2009. Presencia y localización de las proteínas supresoras de tumor p53, hDIg y PTEN, en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 63 pp.
15. Fenollosa, J. Tejidos epiteliales. 2016. Obtenido de: <http://www.slideshare.net/jaifegon2/tejidos-epiteliales-10086002>. (Revisado en mayo de 2016).
16. Lizano M, Carrillo A, Paredes A. Infección por virus de papiloma humano: Epidemiología, historia natural y carcinogénesis. Cancerología. 2009; 4: 205-216.

17. Bajo JM, Laila JM, Xercavins J. Fundamentos de ginecología. 2009. Médica Panamericana. España. 560pp.
18. Jenkins D. Histopathology and citopathology of cervical cancer. *Dis Markers*. 2007; 23 (4): 199-212.
19. Álvarez C, Castro E, Virgilio JM, Bruno G, González C, Vallejos J, Dieguez A. Actualización de la estadificación de cáncer de cuello uterino. *Oncología puesta al día*. 2012; 72 (2): 169-171.
20. National Cancer Institute. Cellular classification of cervical cancer. 2016. Obtenido de <https://www.cancer.gov/types/cervical/research>. (Revisado en octubre de 2016).
21. Kumar V, Abbas, Aster JC. Robbins basic Pathology. 2013. Elsevier. EUA. 910 pp.
22. Eurocytology. Invasive squamous carcinoma. 2016. Obtenido de <http://www.eurocytology.eu/en/course/771>. (Revisado en junio de 2008).
23. McCluggage WG, Tidy J, Smith JHF. Cellular pathology of glandular lesion and uncommon neoplasms of the cervix. 2014. Springer. London. 186 pp.
24. zur Hausen H. Papillomavirus infections—a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta*. 1996; 1228 (2): F55-78.
25. zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers—a brief historical account. *Virology*. 2009; 384 (2): 260-265.
26. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodríguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. 2007; 370 (9590): 890-907.
27. Woodman CB, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer*. 2007; 7 (1): 11-22.
28. Tommasino M. The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol*. 2014; 26: 13-21.
29. Stanley MA. Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. *Clin Microbiol rev*. 2012; 25 (2): 215-222.
30. The Health Professional's HPV Handbook. 1: Human papillomavirus and cervical cancer. 2004. Taylor & Francis. United Kingdom. 97 pp.
31. Moody CA, Laimis LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathway to transformation. *Nat Rev Cancer*. 2010; 10 (8): 550-560.
32. Raff AB, Woodham AW, Raff LM, Skeate JG, Yan L, Da Silva DM, Schelhaas M, Kast WM. The evolving field of human papillomavirus receptor Research: a review of binding and entry. *J Virol*. 2013; 87(11): 6062- 6072.
33. De laCruz E, Mohar A, Lizano M. Elementos víricos y celulares que intervienen en el proceso de la replicación del virus de papiloma humano. *Rev Oncol*. 2004; 6 (5): 263-271.
34. Rivera R, Delgado J, Painel V, Barrero P, Larrín A. Mecanismo de infección y transformación neoplásica producido por virus de papiloma humano en el epitelio cervical. *Rev Chil Obstet Ginecol*. 2006; 71 (2): 135-140.
35. Herrick J, Conti C, Teissier S, Thierry F, Couturier J, Sastre-Garau X, Favre M, Orth G, Bensimon A. Genomic organization of amplified MYC genes suggests distinct mechanisms of amplification in tumorigenesis. *Cancer Res*. 2005; 65 (4): 1174-1179.
36. Bertelsen BI, Steine SJ, Sandvei R, Molven A, Laerum OD. Molecular analysis of the PIK3CA amplification and AKT phosphorylation *Int J Cancer*. 2006; 118 (8): 1877-1883.
37. Lee CM, Lee RJ, Hammond E, Tsodikov A, Dodson M, Zempolich K, Gaffney DK. Expression of HER2neu (c-erbB-2) and epidermal growth factor receptor in cervical cancer: prognostic correlation with clinical characteristics, and comparison of manual and automated imaging analysis. *Gynecol Oncol*. 2004; 93 (1): 209-214.

38. Imoto I, Tsuda H, Hirasawa A, Miura M, Sakamoto M, Hirohashi S, Inazawa J. E. Expression of cIAP1, a target for 11q22 amplification, correlates with resistance of cervical cancers to radiotherapy. *Cancer Res.* 2002; 62 (17): 4860-4866.
39. Cheung TH, Lo KW, Yim SF, Chan LK, Heung MS, Chan LK, Heung MS, Chan CS, Cheung AY, Chung TK, Wong YF. Epigenetic and genetic alteration of PTEN in cervical neoplasm. *Gynecol Oncol.* 2004; 93 (3): 621-627.
40. Chappell WH, Steelman LS, Long J. M, Kempf RC, Abrams SL, Franklin RA, Basecke, J, Stivala F, Donia M, Fagone P, Malaponte G, Mazzarino M. C, Nicoletti F, Libra M, Maksimovic-Ivanic D, Mijatovic S, Montalto G, Cervello M, Laidler P, Milella M, Tafuri A, Bonati A, Evangelisti C, Cocco L, Martelli, A. M, McCubrey JA. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health. *Oncotarget.* 2011; 2 (3): 135-164.
41. Anastas JN, Moon RT. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2013; 13 (1):11-26.
42. Nagasaka K, Nakagawa S, Yano T, Taketani Y, Banks L. The mechanism behind human papillomavirus-associated cancer: the role of PDZ recognition in malignant progression. *Future Virology.* 2011; 6 (6): 675-677.
43. Allenspach EJ, Maillard I, Aster JC, Pear WS. Notch signaling in cancer. *Cancer Biol Ther.* 2002. 1 (5): 466-476.
44. Andersson ER, Sandberg R, Lendahl UN. Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. *Development.* 2011; 138 (17): 3593-612.
45. Santos L, León MF, Marino EN. Vía de señalización Notch y nuevas estrategias para el tratamiento del cáncer. *Salud pública Mex.* 2006; 48 (2): 155-165.
46. Cell signaling technology. Notch signaling pathway. 2016. Obtenido de: www.cellsignal.com/common/content/content.jsp?id=pathways-notch. (Revisado en agosto de 2016).
47. Vázquez MAE. 2013. Modulación de la vía de señalización Notch en la carcinogénesis, en Ciencias bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México. 43pp.
48. Sakamoto K, Kawachi H, Miki Y, Omura K, Morita K, Kayamori K, Katsube K, Yamaguchi A. Reduction of NOTCH1 expression pertains to maturation abnormalities of keratinocytes in squamous neoplasms. *Lab Invest.* 2012; 92 (5): 688-702.
49. Sun L, Liu M, Sun GC, Yang X, Qian Q, Feng S, Mackey LV, Coy DH. Notch Signaling Activation in Cervical Cancer Cells Induces Cell Growth Arrest with the Involvement of the Nuclear Receptor NR4A2. *J Cancer.* 2016; 7 (11): 1388-1395.
50. Zagouras P, Stifani S, Blaumueller CM, Carcangiu ML, Artavanis-Tsakonas S. Alterations in Notch signaling in neoplastic lesions of the human cervix. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92 (14): 6414-6418.
51. Rangarajan A, Syal R, Selvarajah S, Chakrabarti O, Sarin A, Krishna S. Activated Notch1 signaling cooperates with papillomavirus oncogenes in transformation and generates resistance to apoptosis on matrix withdrawal through PKB/Akt. *Virology.* 2001; 286 (1): 23-30.
52. Nair P, Somasundaram K, Krishna S. Activated Notch1 inhibits p53-induced apoptosis and sustains transformation by human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes through a PI3K-PKB/Akt-dependent pathway. *J Virol.* 2003; 77 (12): 7106-7112.
53. Yousif NG, Sadiq AM, Yousif MG, Al-Mudhafar RH, Al-Baghdadi JJ, Hadi N. Notch1 ligand signaling pathway activated in cervical cancer: poor prognosis with high-level JAG1/Notch1. *Arch Gynecol Obstet.* 2015; 292 (4): 899-904.

54. Wu J, Shen SL, Chen B, Nie J, Peng, BG. Numb promotes cell proliferation and correlates with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 2014; 9 (4): e95849 (1-12).
55. Gulino A., Di Marcotullio L, Screpanti I, The multiple functions of Numb. *Exp Cell Res*. 2010; 316 (6): 900-906.
56. Flores.AN, McDermond N, Meunier A, Marignol L. NUMB inhibition of NOTCH signalling as a therapeutic target in prostate cancer. *Nat Rev Urol*. 2014; 11(9): 499-507.
57. Karaczyn A, Bani-Yaghoub M, Tremblay R, Kubu C, Cowling R, Adams TL, Prudovsky I, Spicer D, Friesel R, Vary C, Verdi JM. Two novel human NUMB isoforms provide a potential link between development and cancer. *Neural Dev*. 2010; 5 (31): 1-15.
58. Aguado R. 2009. Papel de la proteína adaptadora NUMB en división asimétrica, señalización por pre-TCR y proliferación, en CSIC. Universidad de Granada.167pp.
59. Martín NM. 2010. Papel de la proteína adaptadora Numb en la modulación de la señalización por TCR, en CSIC. Universidad de Granada. 185pp.
60. Garcia JM, Verdugo EM, Lucena A, Molina S, Carnero A. Numb-Like (NumbL) downregulation increases tumorigenicity, cancer stem cell-like properties and resistance to chemotherapy. *Oncotarget*. 2016; 1-18.
61. Pece S, Serresi M, Santolini E, Capra M, Hulleman E, Galimberti V. Zurrída S, Maisonneuve P, Viale G. Loss of negative regulation by Numb over Notch is relevant to human breast carcinogenesis. *J Cell Biol*. 2004; 167(2): 215-221.
62. Wang C, Cui T, Feng W, Li H, Hu L. Role of Numb expression and nuclear translocation in endometrial cancer. *Oncol Lett*. 2015; 9 (4):1531-1536.
63. Wang C, Feng W, Zhang C. The Expression and Function of NUMB in Endometrial Cancer and the Interaction with HDM2 and P53. *J Cancer*. 2015. 6 (10): 1030-1040.
64. Chen H, Chen X, Ye F, Lu W, Xie X. Symmetric division and expression of its regulatory gene Numb in human cervical squamous carcinoma cells. *Pathobiology*. 2009; 76(3): 149-54.
65. Cancer treatment centers of America. Cervical cancer risk factors. 2016. Obtenido de: <http://www.cancercenter.com/cervical-cancer/risk-factors/>. (Revisado en noviembre de 2016).
66. Ghedira R. Mahfoudh W, Hadhri S, Gabbouj S, Bouanene I, Khairi H, Chaieb A, Khelifa R, Bouaouina N, Remadi S, Elmi AA, Bansal D, Sultan AA, Faleh R, Zakhama A, Chouchane L, Hassen E. Human papillomavirus genotypes and HPV-16 variants distribution among Tunisian women with normal cytology and squamous intraepithelial lesions. *Infect Agent Cancer*. 2016; 11 (61): 1-10.
67. National Cancer Institute. Obesity and cancer risk. 2013. Obtenido de: <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/obesity/obesity-fact-sheet>. (Revisado en enero de 2017).
68. Organización Mundial para la Salud. Control integral del cáncer cervicouterino. Guía de prácticas esenciales. 2007. OMS. Suiza. 280pp.
69. Castle PE, Solomon D, Schiffman M, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities. *J Natl Cancer Inst*. 2005; 97(14): 1066-1071.
70. The human protein atlas. Numb. 2016. Obtenido de: <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000133961-NUMB/tissue/cervix%2C+uterine>. (Revisado en agosto de 2016).

71. The human protein atlas. Notch1. 2016. Obtenido de: <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000148400-NOTCH1/tissue/cervix%2C+uterine>. (Revisado en agosto de 2016).
72. Dho SE, French MB, Woods SA, McGlade CJ. Characterization of four mammalian numb protein isoforms. Identification of cytoplasmic and membrane-associated variants of the phosphotyrosine binding domain. *J Biol Chem*. 1999; 274(46): 33097-33104.
73. Andersen P, Uosaki H, Shenje LT, Kwon C. Non-canonical Notch signaling: emerging role and mechanism. *Trends Cell Biol*. 2012; 22(5): 257-265.
74. Schmit TL, Nihal M, Ndiaye M, Setaluri V, Spiegelman VS, Ahmad N. Numb regulates stability and localization of the mitotic kinase PLK1 and is required for transit through mitosis. *Cancer Res*. 2012; 72(15): 3864-3872.
75. Martin-Blanco NM, Checquolo S, Del Guadio F, Palermo R, Franciosa G, Di Marcotullio L, Gulino A, Canelles M, Screpanti I. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell*. 2009; 137(2): 216-233.
76. Kopan R, Llagan MX. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell*. 2009; 137(2): 216-233.
77. Osathanon T, Nowwarote N, Pavasant P. Expression and influence of Notch signaling in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Sci*. 2016; 58(2): p. 283-294.
78. Pece S, Serresi M, Santolini E, Capra M, Hulleman E, Galimberti V, Zurrida S, Maisonneuve P, Viale G. Loss of negative regulation by Numb over Notch is relevant to human breast carcinogenesis. *J Cell Biol*. 2004; 167(2): 215-221.
79. Greife A, Jankowiak S, Steinbring J, Nikpour P, Niegisch G, Hoffmann MJ, Schulz WA. Canonical Notch signalling is inactive in urothelial carcinoma. *BMC Cancer*. 2014; 14: 628 (1-13).
80. Wang L, Qin H, Chen B, Xin X, Li J, Han H. Overexpressed active Notch1 induces cell growth arrest of HeLa cervical carcinoma cells. *Int J Gynecol Cancer*. 2007; 17(6): 1283-1292.
81. Talora C, Cialfi S, Segatto O, Morrone S, Kim Choi J, Frati L, Paolo Dotto G, Gulino A, Screpanti, I. Constitutively active Notch1 induces growth arrest of HPV-positive cervical cancer cells via separate signaling pathways. *Exp Cell Res*. 2005; 305(2): 343-354.
82. Yu H, Zhao X, Huang S, Jian L, Qian G, Ge S. Blocking Notch1 signaling by RNA interference can induce growth inhibition in HeLa cells. *Int J Gynecol Cancer*. 2007; 17(2): 511-516.
83. Maruthur NM, Bolen SD, Brancati FL, Clark JM. The association of obesity and cervical cancer screening: a systematic review and meta-analysis. *Obesity (Silver Spring)*. 2009; 17(2): 375-381.
84. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer, Appleby P, Beral V, Berrington de Gonzalez A, Colin D, Franceschi S, Goodhill A, Green J, Peto J, Plummer M, Sweetland S. Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16,573 women with cervical cancer and 35,509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies. *Lancet*. 2007; 370 (9599): 1609-1621.
85. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)*. 2006; 110(5): 525-541.
86. Tornesello ML, Buonaguro L, Giorgi-Rossi P, Buonaguro FM. Viral and cellular biomarkers in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia and cancer. *Biomed Res Int*. 2013; 2013: 519619 (1-10).

87. Westhoff B, Colaluca IN, D'Ario G, Donzelli M, Tosoni D, Volorio S, Pelosi G, Spaggiari L, Mazzarol G, Viale G, Pece S, Di Fiore PP. Alterations of the Notch pathway in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106(52): 22293-22298.
88. Hong J, Liu Z, Zhu H, Zhang X, Liang Y, Yao S, Wang F, Xie X, Zhang B, Tan T, Fu L, Nie J, Cheng C. The tumor suppressive role of NUMB isoform 1 in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2014; 5(14): 5602-5614.
89. Maiorano E, Favia G, Pece S, Resta L, Maisonneuve P, Di Fiore PP, Capodiferro S, Urbani U, Viale G. Prognostic implications of NUMB immunoreactivity in salivary gland carcinomas. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2007; 20(4): 779-789.
90. Yan B, Omar FM, Das K, Ng WH, Lim C, Shiuan K, Yap CT, Salto-Tellez M. Characterization of Numb expression in astrocytomas. *Neuropathology*. 2008; 28(5): 479-484.
91. Talora C, Sgroi DC, Crum CP, Dotto GP. Mammalian numb proteins promote Notch1 receptor ubiquitination and degradation of the Notch1 intracellular domain. *J Biol Chem*. 2003; 278(25): 23196-23203.
92. McGill MA, McGlade CJ. Mammalian numb proteins promote Notch1 receptor ubiquitination and degradation of the Notch1 intracellular domain. *J Biol Chem*. 2003; 278(25): 23196-23203.
93. McGill MA, Dho SE, Weinmaster G, McGlade CJ. Numb regulates post-endocytic trafficking and degradation of Notch1. *J Biol Chem*. 2009; 284(39): 26427-26438.
94. Giebel B, Wodarz A. Notch signaling: numb makes the difference. *Curr Biol*. 2012; 22(4): R133-R135.
95. Guo Q, Qian Z, Yan D, Li L, Huang L. LncRNA-MEG3 inhibits cell proliferation of endometrial carcinoma by repressing Notch signaling. *Biomed Pharmacother*. 2016; 82: 589-594.
96. Francis DA, Schmid SI, Howley PM. Repression of the integrated papillomavirus E6/E7 promoter is required for growth suppression of cervical cancer cells. *J Virol*. 2000; 74(6): 2679-2686.
97. Chen J. Signaling pathways in HPV-associated cancers and therapeutic implications. *Rev Med Virol*. 2015; 25 Suppl 1: 24-53.
98. Nosedá M, Chang L, McLean G, Grim JE, Clurman, BE, Smith LL, Karsan A. Notch activation induces endothelial cell cycle arrest and participates in contact inhibition: role of p21Cip1 repression. *Mol Cell Biol*. 2004; 24(20): 8813-8822.
99. Wilson A, Radtke F. Multiple functions of Notch signaling in self-renewing organs and cancer. *FEBS Lett*, 2006; 580(12): 2860-2868.

1. Salud, O.M.d.I. *Enfermedades no transmisibles*. Enero de 2015 [cited 2016 30 de mayo]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs355/es/>.
2. Salud, O.M.d.I. *10 datos sobre enfermedades no transmisibles*. Marzo de 2013 [cited 2016 30 de mayo]; Available from: http://www.who.int/features/factfiles/noncommunicable_diseases/es/.
3. Salud, O.M.d.I. *10 datos sobre el cáncer*. 2014 [cited 2016 30 de mayo]; Available from: <http://www.who.int/features/factfiles/cancer/es/>.
4. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
5. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
6. Cogliano, V.J., et al., *Preventable exposures associated with human cancers*. J Natl Cancer Inst, 2011. **103**(24): p. 1827-39.
7. Globocan. *Cervical Cancer 2012* [cited 2016 31 de mayo]; Available from: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.
8. INMUJERES, I.N.d.I.M. *Tasa de mortalidad por cáncer*. 2013 [cited 2016 31 de mayo]; Available from: http://estadistica.inmujeres.gob.mx/formas/muestra_indicador.php?cve_indicador=1124&Switch=0&Descripcion2=NULL&indicador2=0&original=0&fuente=1124.pdf&IDNivel=17.
9. Globocan. *Cancer Mortality Worldwide. Mexico Cervix uteri*. 2012 [cited 2016 5 de julio]; Available from: http://globocan.iarc.fr/old/burden.asp?selection_pop=126484&Text-p=Mexico&selection_cancer=4162&Text-c=Cervix+uteri&pYear=3&type=1&window=1&submit=Execute
10. Cancer, I.A.f.R.o. *Capítulo 1: Introducción a la anatomía del cuello uterino*. 2016 [cited 2016 01 de junio]; Available from: <http://screening.iarc.fr/colpochap.php?lang=3&chap=1>.
11. Gonzalo E, C.J., Alvarado A, Cantú DF, Flores D, Ortega A, González A, Islas D, Muñoz DE, Robles JU, Solorza G, Mota A, Gallardo D, Morales F, Cetina ML, Herrera A, *Oncoguía. Cáncer Cervicouterino* Instituto Nacional de Cancerología, 2011. **6**: p. 61-69.
12. General, C. *Anatomía y fisiología de aparato reproductor femenino*. [cited 2016 01 de junio]; Available from: <https://citopatologiageneral.wordpress.com/anatomia-y-fisiologia>.
13. J, S., *Texto atlas de Histología. Biología celular y tisular*. 2013, México: Mc Graw-Hill.
14. MAE., V., *Presencia y localización de las proteínas supresoras de tumores p53, hDlg y PTEN en lesiones premalignas y cáncer invasor del cérvix*, in *Ciencias*. 2009, Universidad Nacional Autónoma de México. p. 63.
15. J., F. *Tejidos epiteliales*. Noviembre de 2011 [cited 2016 Mayo de 2016]; Available from: <http://www.slideshare.net/jaifegon2/tejidos-epiteliales-10086002>.
16. Lizano M, C.A., Contreras A, *Infeción por virus de papiloma humano: Epidemiología, historia natural y carcinogénesis*. Cancerología, 2009. **4**: p. 205-216.
17. Bajo JM, L.J., Xercavins J. , *Fundamentos de ginecología*. 2009. 560.
18. Jenkins, D., *Histopathology and cytopathology of cervical cancer*. Dis Markers, 2007. **23**(4): p. 199-212.
19. Álvarez C, C.E., Virgilio JM, Bruno G, González C, Vallejos J, Dieguez A, *Actualización de la estadificación de cáncer de cuello uterino*. Oncología puesta al día, 2012. **76**(2): p. 169-171.
20. Institute, N.C. *Celular classification of cervical cancer*. Octubre 2016]; Available from: <https://www.cancer.gov/types/cervical/hp/cervical-treatment-pdq#section/389>.

21. Kumar V, A.A., Aster JC, *Robbins Basic Pathology*. 2013, Estados Unidos de America: Elsevier. 910.
22. Eurocytology. *Invasive Squamous Carcinoma*. 2016 [cited 2016 08 junio]; Available from: <http://www.eurocytology.eu/en/course/771>.
23. McCluggage WG, T.J., Smith JHF. , *Cellular pathology of glandular lesions and uncommon Neoplasms of the cervix*. 2014, London. 186.
24. zur Hausen, H., *Papillomavirus infections--a major cause of human cancers*. *Biochim Biophys Acta*, 1996. **1288**(2): p. F55-78.
25. zur Hausen, H., *Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account*. *Virology*, 2009. **384**(2): p. 260-5.
26. Schiffman, M., et al., *Human papillomavirus and cervical cancer*. *Lancet*, 2007. **370**(9590): p. 890-907.
27. Woodman, C.B., S.I. Collins, and L.S. Young, *The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues*. *Nat Rev Cancer*, 2007. **7**(1): p. 11-22.
28. Tommasino, M., *The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis*. *Semin Cancer Biol*, 2014. **26**: p. 13-21.
29. Stanley, M.A., *Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus*. *Clin Microbiol Rev*, 2012. **25**(2): p. 215-22.
30. *The Health Professional's HPV Handbook. 1: Human Papillomavirus and Cervical Cancer*. 2004, United Kingdom.
31. Moody, C.A. and L.A. Laimins, *Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation*. *Nat Rev Cancer*, 2010. **10**(8): p. 550-60.
32. Raff, A.B., et al., *The evolving field of human papillomavirus receptor research: a review of binding and entry*. *J Virol*, 2013. **87**(11): p. 6062-72.
33. De la Cruz E, M.A., Lizano M. , *Elementos víricos y celulares que intervienen en el proceso de la replicación del virus de papiloma humano*. *Rev. Oncol*, 2004. **6**(5): p. 263-271.
34. Rivera R, D.J., Painel V, Barrero P, Larrín A. , *Mecanismo de infección y transformación neoplásica producido por virus de papiloma humano en el epitelio cervical*. *Rev Chil Obstet Ginecol.*, 2006. **71**(2): p. 135-140.
35. Herrick, J., et al., *Genomic organization of amplified MYC genes suggests distinct mechanisms of amplification in tumorigenesis*. *Cancer Res*, 2005. **65**(4): p. 1174-9.
36. Bertelsen, B.I., et al., *Molecular analysis of the PI3K-AKT pathway in uterine cervical neoplasia: frequent PIK3CA amplification and AKT phosphorylation*. *Int J Cancer*, 2006. **118**(8): p. 1877-83.
37. Lee, C.M., et al., *Expression of HER2neu (c-erbB-2) and epidermal growth factor receptor in cervical cancer: prognostic correlation with clinical characteristics, and comparison of manual and automated imaging analysis*. *Gynecol Oncol*, 2004. **93**(1): p. 209-14.
38. Imoto, I., et al., *Expression of clAP1, a target for 11q22 amplification, correlates with resistance of cervical cancers to radiotherapy*. *Cancer Res*, 2002. **62**(17): p. 4860-6.
39. Cheung, T.H., et al., *Epigenetic and genetic alternation of PTEN in cervical neoplasm*. *Gynecol Oncol*, 2004. **93**(3): p. 621-7.
40. Chappell, W.H., et al., *Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health*. *Oncotarget*, 2011. **2**(3): p. 135-64.
41. Anastas, J.N. and R.T. Moon, *WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2013. **13**(1): p. 11-26.

42. Nagasaka K, N.S., Yano T, Taketani Y, Banks L, *The mechanism behind human papillomavirus-associated cancer: the role of PDZ recognition in malignant progression*. . Future Virology, 2011. **6**(6): p. 675-677.
43. Allenspach, E.J., et al., *Notch signaling in cancer*. Cancer Biol Ther, 2002. **1**(5): p. 466-76.
44. Andersson, E.R., R. Sandberg, and U. Lendahl, *Notch signaling: simplicity in design, versatility in function*. Development, 2011. **138**(17): p. 3593-612.
45. Santos L, L.M., Marino EN, *Vía de señalización Notch y nuevas estrategias para el tratamiento de cáncer*. Salud pública Mex., 2006. **48**(2): p. 155-165.
46. Technology, C.S. *Notch signaling pathway*. 2016 [cited 2016 Agosto de 2016]; Available from: <https://www.cellsignal.com/common/content/content.jsp?id=pathways-notch>.
47. MAE., V., *Modulación de la vía de señalización Notch en la carcinogénesis*, in *Ciencias bioquímicas*. 2013, Universidad Nacional Autónoma de México: México. p. 43.
48. Sakamoto, K., et al., *Reduction of NOTCH1 expression pertains to maturation abnormalities of keratinocytes in squamous neoplasms*. Lab Invest, 2012. **92**(5): p. 688-702.
49. Sun, L., et al., *Notch Signaling Activation in Cervical Cancer Cells Induces Cell Growth Arrest with the Involvement of the Nuclear Receptor NR4A2*. J Cancer, 2016. **7**(11): p. 1388-95.
50. Zagouras, P., et al., *Alterations in Notch signaling in neoplastic lesions of the human cervix*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(14): p. 6414-8.
51. Rangarajan, A., et al., *Activated Notch1 signaling cooperates with papillomavirus oncogenes in transformation and generates resistance to apoptosis on matrix withdrawal through PKB/Akt*. Virology, 2001. **286**(1): p. 23-30.
52. Nair, P., K. Somasundaram, and S. Krishna, *Activated Notch1 inhibits p53-induced apoptosis and sustains transformation by human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes through a PI3K-PKB/Akt-dependent pathway*. J Virol, 2003. **77**(12): p. 7106-12.
53. Yousif, N.G., et al., *Notch1 ligand signaling pathway activated in cervical cancer: poor prognosis with high-level JAG1/Notch1*. Arch Gynecol Obstet, 2015. **292**(4): p. 899-904.
54. Wu, J., et al., *Numb promotes cell proliferation and correlates with poor prognosis in hepatocellular carcinoma*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e95849.
55. Gulino, A., L. Di Marcotullio, and I. Screpanti, *The multiple functions of Numb*. Exp Cell Res, 2010. **316**(6): p. 900-6.
56. Flores, A.N., et al., *NUMB inhibition of NOTCH signalling as a therapeutic target in prostate cancer*. Nat Rev Urol, 2014. **11**(9): p. 499-507.
57. Karaczyn, A., et al., *Two novel human NUMB isoforms provide a potential link between development and cancer*. Neural Dev, 2010. **5**: p. 31.
58. R., A., *Papel de la proteína adaptadora NUMB en división asimétrica, señalización por pre-TCR y proliferación durante el desarrollo de timocitos*. , in CSIC. 2009, Universidad de Granada: Granada. p. 167.
59. NM., M., *Papel de la proteína adaptadora Numb en la modulación de la señalización por TCR*. , in Consejo Superior de Investigaciones Científicas. 2010, Universidad de Granada. p. 185.
60. Garcia-Heredia, J.M., et al., *Numb-Like (Numbl) downregulation increases tumorigenicity, cancer stem cell-like properties and resistance to chemotherapy*. Oncotarget, 2016.
61. Pece, S., et al., *NUMB-ing down cancer by more than just a NOTCH*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1815**(1): p. 26-43.

62. Wang, C., et al., *Role of Numb expression and nuclear translocation in endometrial cancer*. *Oncol Lett*, 2015. **9**(4): p. 1531-1536.
63. Wang, C., W. Feng, and C. Zhang, *The Expression and Function of NUMB in Endometrial Cancer and the Interaction with HDM2 and P53*. *J Cancer*, 2015. **6**(10): p. 1030-40.
64. Chen, H., et al., *Symmetric division and expression of its regulatory gene Numb in human cervical squamous carcinoma cells*. *Pathobiology*, 2009. **76**(3): p. 149-54.
65. American Cancer Society. *Cervical cancer risk factors*. 2015 [cited 2016 noviembre 2016]; Available from: <http://www.cancercenter.com/cervical-cancer/risk-factors/>.
66. Ghedira, R., et al., *Human papillomavirus genotypes and HPV-16 variants distribution among Tunisian women with normal cytology and squamous intraepithelial lesions*. *Infect Agent Cancer*, 2016. **11**: p. 61.
67. Institute, N.C. *Obesity and cancer risk*. 2012; Available from: www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/obesity/obesity-fact-sheet.
68. Salud, O.M.d.l., *Control integral del cáncer cervicouterino. Guía de prácticas esenciales*. 2007, Suiza.
69. Castle, P.E., et al., *Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities*. *J Natl Cancer Inst*, 2005. **97**(14): p. 1066-71.
70. atlas, T.h.p. *Numb*. 2016 [cited 2016 23 de agosto].
71. atlas, T.h.p. *Notch1*. 2016; Available from: <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000148400-NOTCH1/tissue/cervix%2C+uterine>.
72. Dho, S.E., et al., *Characterization of four mammalian numb protein isoforms. Identification of cytoplasmic and membrane-associated variants of the phosphotyrosine binding domain*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(46): p. 33097-104.
73. Andersen, P., et al., *Non-canonical Notch signaling: emerging role and mechanism*. *Trends Cell Biol*, 2012. **22**(5): p. 257-65.
74. Schmit, T.L., et al., *Numb regulates stability and localization of the mitotic kinase PLK1 and is required for transit through mitosis*. *Cancer Res*, 2012. **72**(15): p. 3864-72.
75. Martin-Blanco, N.M., et al., *Numb-dependent integration of pre-TCR and p53 function in T-cell precursor development*. *Cell Death Dis*, 2014. **5**: p. e1472.
76. Kopan, R. and M.X. Ilagan, *The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism*. *Cell*, 2009. **137**(2): p. 216-33.
77. Osathanon, T., N. Nowwarote, and P. Pavasant, *Expression and influence of Notch signaling in oral squamous cell carcinoma*. *J Oral Sci*, 2016. **58**(2): p. 283-94.
78. Pece, S., et al., *Loss of negative regulation by Numb over Notch is relevant to human breast carcinogenesis*. *J Cell Biol*, 2004. **167**(2): p. 215-21.
79. Greife, A., et al., *Canonical Notch signalling is inactive in urothelial carcinoma*. *BMC Cancer*, 2014. **14**: p. 628.
80. Wang, L., et al., *Overexpressed active Notch1 induces cell growth arrest of HeLa cervical carcinoma cells*. *Int J Gynecol Cancer*, 2007. **17**(6): p. 1283-92.
81. Talora, C., et al., *Constitutively active Notch1 induces growth arrest of HPV-positive cervical cancer cells via separate signaling pathways*. *Exp Cell Res*, 2005. **305**(2): p. 343-54.
82. Yu, H., et al., *Blocking Notch1 signaling by RNA interference can induce growth inhibition in HeLa cells*. *Int J Gynecol Cancer*, 2007. **17**(2): p. 511-6.

83. Maruthur, N.M., et al., *The association of obesity and cervical cancer screening: a systematic review and meta-analysis*. Obesity (Silver Spring), 2009. **17**(2): p. 375-81.
84. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical, C., et al., *Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16,573 women with cervical cancer and 35,509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies*. Lancet, 2007. **370**(9599): p. 1609-21.
85. Doorbar, J., *Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer*. Clin Sci (Lond), 2006. **110**(5): p. 525-41.
86. Tornesello, M.L., et al., *Viral and cellular biomarkers in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia and cancer*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 519619.
87. Westhoff, B., et al., *Alterations of the Notch pathway in lung cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(52): p. 22293-8.
88. Hong, J., et al., *The tumor suppressive role of NUMB isoform 1 in esophageal squamous cell carcinoma*. Oncotarget, 2014. **5**(14): p. 5602-14.
89. Maiorano, E., et al., *Prognostic implications of NUMB immunoreactivity in salivary gland carcinomas*. Int J Immunopathol Pharmacol, 2007. **20**(4): p. 779-89.
90. Yan, B., et al., *Characterization of Numb expression in astrocytomas*. Neuropathology, 2008. **28**(5): p. 479-84.
91. Talora, C., et al., *Specific down-modulation of Notch1 signaling in cervical cancer cells is required for sustained HPV-E6/E7 expression and late steps of malignant transformation*. Genes Dev, 2002. **16**(17): p. 2252-63.
92. McGill, M.A. and C.J. McGlade, *Mammalian numb proteins promote Notch1 receptor ubiquitination and degradation of the Notch1 intracellular domain*. J Biol Chem, 2003. **278**(25): p. 23196-203.
93. McGill, M.A., et al., *Numb regulates post-endocytic trafficking and degradation of Notch1*. J Biol Chem, 2009. **284**(39): p. 26427-38.
94. Giebel, B. and A. Wodarz, *Notch signaling: numb makes the difference*. Curr Biol, 2012. **22**(4): p. R133-5.
95. Guo, Q., et al., *LncRNA-MEG3 inhibits cell proliferation of endometrial carcinoma by repressing Notch signaling*. Biomed Pharmacother, 2016. **82**: p. 589-94.
96. Francis, D.A., S.I. Schmid, and P.M. Howley, *Repression of the integrated papillomavirus E6/E7 promoter is required for growth suppression of cervical cancer cells*. J Virol, 2000. **74**(6): p. 2679-86.
97. Chen, J., *Signaling pathways in HPV-associated cancers and therapeutic implications*. Rev Med Virol, 2015. **25 Suppl 1**: p. 24-53.
98. Nosedá, M., et al., *Notch activation induces endothelial cell cycle arrest and participates in contact inhibition: role of p21Cip1 repression*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(20): p. 8813-22.
99. Wilson, A. and F. Radtke, *Multiple functions of Notch signaling in self-renewing organs and cancer*. FEBS Lett, 2006. **580**(12): p. 2860-8.