



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

MODULACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN Notch EN LA CARCINOGENESIS
CERVICAL

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

MARÍA ALICIA ELENAÉ VÁZQUEZ ULLOA

TUTOR PRINCIPAL

DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN

[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. ADRIANA CONTRERAS PAREDES

[Instituto Nacional de Cancerología](#)

DRA. CLAUDIA GONZÁLEZ ESPINOSA

[Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN](#)

Ciudad de México. Enero, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
(CONACyT CB-2010-01) proyecto 151493

Especial agradecimiento al “Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado”
(PAEP) por los recursos otorgados para la asistencia a congresos y estancia en el
extranjero

Esta tesis fue realizada en el Instituto Nacional de Cancerología

“Si no sabes hacia qué puerto zarpa tu barco, ningún viento te será favorable”

“En la adversidad conviene muchas veces tomar un camino atrevido”

Seneca

Agradecimientos

- A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), que desde hace tantos años ha sido mi casa. Me siento muy orgullosa de ser parte de la máxima casa de estudios.
- Al programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas. Gracias a todos los profesores y colaboradores que hacen de éste un posgrado de excelencia.
- Al Instituto Nacional de Cancerología (INCAN), en donde he aprendido tanto y he superado tantas cosas.
- Al departamento de Patología del INCAN, en especial al Dr. Alejandro Avilés quien por tantos años ha sido parte de esta investigación y a quien le agradezco su tiempo, paciencia y consejos. Gracias por ser un maestro para mí.

- A mi comité tutor:

Dra. Marcela Lizano, gracias por tantos años de permitirme ser parte de su laboratorio, en donde con su gran experiencia y humanidad he aprendido todo lo que hoy se.

Dra. Claudia González, gracias por la crítica constructiva, por todas las ideas que aportó para que este trabajo llegara a buen puerto.

Dra. Adriana Contreras, gracias por haberte arriesgado conmigo desde hace tanto tiempo, por confiar en las ideas que te he mostrado y hacer de mí un mejor científico. Siempre será un placer trabajar bajo tu guía.

- Al Dr. Diddier Prada, por su conocimiento que sin duda dio un importante giro a este trabajo.
- Al comité revisor: Dra. Martha Robles, Dra. Elizabeth Ortiz, Dr. Luis Covarrubias, Dr. Marco Antonio Cerbón y Dr. Jesús García Sainz, gracias por cada uno de sus consejos.
- A mi laboratorio, que ha sido mi segundo hogar. Cada persona que por ahí he visto pasar ha dejado algo en mí. Gracias porque somos un equipo im-
pa-ra-ble!

Dedicatorias

Como una travesía en barco, así ha sido esta aventura que empezó ya hace varios años, y que más de una vez parecía no llegaría a destino. He sido el capitán de éste barco que hoy felizmente llega al puerto que tanto soñó. Me doy cuenta que este viaje no lo logre sola, tuve una maravillosa tripulación:

Madre mía, haz sido el mejor “segundo al cargo” que puede haber tenido. No solo eres mi MaPa y mi brújula, eres la razón por la que en aguas turbias no me di por vencida. Fuiste ancla cuando necesite parar y fuiste vela cuando pude seguir. No tengo palabras para agradecerle todo lo que me has dado: una vida llena de amor y un par de fuertes alas para volar. Si algo bueno soy, es gracias a ti, y este triunfo es tuyo. Te amo con todo mi corazón

Lupansky, como un faro en la lejanía emites tu luz que me guía. Te quiero muchísimo y siempre habrá un lugar especial en mi barco para ti y tu familia. Para llevar a Aitana a una aventura con su tía, la que es un poquito diferente.

Creo que cuando a la vida se le acaban los abuelos, te da tíos y me siento muy afortunada de tenerlos:

Nina, eres parte importante de mi aventura, simplemente no imagino mi vida sin que estés presente en ella. En las fuertes olas te puedes quebrar pero no abandonas el barco. Gracias por acompañarme siempre, por quererme y por cada detalle que nunca te ha faltado para mí. Te quiero!

Tío Fernando, eres el marinero con experiencia, ¡el que sabe! Tantas veces te he escuchado decirme “nada que valga la pena es fácil” y “tú puedes”, palabras que me han llenado de confianza para seguir. Gracias por los recursos, porque con ellos me has dado la oportunidad de conocer otros mares, pero más agradecida estoy de que siempre has creído en mí. Gracias infinitas, te quiero!

A mi primata Liz quien en su propio viaje siempre ha hecho tiempo para acompañarme en la aventura, gracias!

Álvaro, gracias por recordarme que no voy sola en el viaje, por entender quién soy y compartir conmigo el gusto de ser raros.

Afortunada he sido de poder compartir ésta travesía con mis amigos, quienes no solo me han acompañado, sino que también me han llenado de energía las miles de veces que quise renunciar:

Carlos, eres el mejor amigo y trajiste contigo otro ser humano lleno de luz, Sofía. A ustedes gracias por quererme así tal cual soy. Por cuidarme y procurarme y hacerme sentir en casa cuando estoy con ustedes. Espero tengamos muchas más aventuras juntos.

Rosa, en las buenas y en las malas ahí estamos. No importa cuánto tiempo pase, siempre se siente como cuando éramos dos jóvenes estudiantes de biología. Sin duda, compartimos una de las épocas más maravillosas juntas, y ahora que hemos crecido, y cada una ha tomado su ruta, agradezco por seguir juntas en este mar.

Gilda, tu bien sabes cuánto miedo le tengo al mar abierto al que me he enfrentado. Haz estado en los embates más fuertes y una cosa te he aprendido: es sin miedo y para adelante sin importar que o quien. Gracias, porque uno no se hace fuerte con la suavidad.

Yadira, desde que te conozco solo puedo recordar risas. Eres ese puerto en donde uno llega a pasarla bien, porque siempre das lo mejor. Me siento honrada que además me haz compartido a tu familia que tanto estimo y que siempre me ha recibido de brazos abiertos. Que vengan más viajes juntas!

Dora, haz sido vigía de mi barco, siempre atenta a que no me estrelle, a que no me hunda. Gracias por depositar en mí la confianza de ser parte de la vida de María José. Sé que aunque lejos, siempre cuento con ustedes.

A esos que le dan tantas risas a mi viaje y con quienes comparto la experiencia que es navegar estas aguas: Omar, Leslie, Robert, Ángel, Lucio y Clao. Gracias por cada risa, cada lágrima, cada copa que con ustedes he compartido. Ustedes me sacaron del hoyo cuando el mundo se puso gris y llenaron de sol mis días para que pudiera seguir adelante. Cada uno de ustedes me ha dado algo que llevar dentro de mí como un tesoro. Omar eres la alegría mezclada de inteligencia, Leslie la sonrisa eterna y la expresión de cariño, que además trajiste a la no prudencia (a veces también necesaria) a través de Guillermo. Robert la fortaleza y rudeza necesaria, Ángel la calma en momentos de descontrol y la agudeza para decir las cosas, Lucio la energía y el buen decir y Clao la prudencia y el esfuerzo. Espero que aunque naveguemos diferentes mares, nos encontremos siempre en algún puerto. ¡Los quiero!

A esos amiguitos especiales Darwin y Curie que me enseñaron a respetar la vida en todas sus formas y que fueron parte de este viaje. ¡Los extraño!

He sido también capitán de nuevos proyectos, me ha tocado la fortuna de enseñar a nuevos marineros. Sin duda, encontré en la docencia mi vocación. Gracias Carlos por abrirme las puertas a ese mundo. Al Instituto Tecnológico de Gustavo A. Madero, porque no importa a donde llegue, ese será siempre el puerto desde donde zarpé. A las personas que me dieron la oportunidad de estar ahí. A mis alumnos, por quienes he aprendido a ser más tolerante y más humana. A Juan Carlos, por ser el primero en arriesgarse a navegar conmigo; y a mi equipo residuos, Alberto y Michel, que me llevaron a aguas desconocidas con lo que me permitieron reinventarme. Gracias millones!

El camino nunca fue recto, tuve que parar en muchos puertos, en donde personas abandonaron el barco. A ellas, gracias por enseñarme lo que me tocaba aprender en ese momento, ahora sé que ese era su destino. Otros tripulantes vendrán, a ustedes bienvenidos y ojala disfrutemos juntos de nuevos viajes y lleguemos a bellos puertos.

Sin duda, de las aventuras más difíciles, y también más satisfactorias, fue el paso por Estocolmo, en donde conocí personas maravillosas:

- Dr. Emma Andersson, thank you for the opportunity and for ever let me feel as part of your lab. I learned so much things that set the standard to what I would like to achieve.
- Aiman, you was my family in the time I was there. I'm grateful of the time I spend with you and all the lessons you gave me about faith. My life was touch by your kindness. I'll always love and remember you.
- Marika, since the first moment I meet you, you was incredible nice with me. You filled my days with laughs and good thoughts, with early lunches and FIKA. You have teach me that friendship is not about what we have in common, is what we want to share. Thank you because I know I have a friend in the other side of the world.
- Bettina, you are the sweetest person I have ever meet. Thanks for your patience to teach me, learned from you to truly respect animal's life. You also teach me not to judge people. Thanks for be my true friend.
- To those who I meet at KI and were super nice with me: special thanks to Simona, you was always willing to help me. Also to Katrin, Iliana, Cristina, YP, Francesca.
- To nice people I meet in Stockholm: my friends Yuki Minato and Danna. Ashley, Kristin and the kind people from church, thank you all because you bring me closer to God.
- A mis paisanos y amigos latinos que siempre tuvieron una mano para ayudarme: Marce, Abraham, Javier; a mis chicas Vero, Rosita, Elizabeth y Janet.

Gracias Dios por todo lo que tengo.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
1. EL CÁNCER CERVICOUTERINO (CaCU)	5
2. EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH)	8
2.1 ENTRADA DEL VPH AL EPITELIO CERVICAL	9
2.2 INFECCIÓN PRODUCTIVA	11
2.3 INFECCIÓN ABORTIVA	14
3. VÍA DE SEÑALIZACIÓN Notch	16
3.1 SEÑALIZACIÓN CANÓNICA DE LA VÍA Notch	17
3.2 SEÑALIZACIÓN NO CANÓNICA DE LA VÍA NOTCH	20
3.3 REGULACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN Notch	21
3.4 PARTICIPACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN NOTCH EN CÁNCER	22
3.5 PARTICIPACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN NOTCH EN CaCU	25
4. LA PROTEÍNA NUMB	26
4.1 NUMB: ANTAGONISTA DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN NOTCH	28
4.2 NUMB EN CÁNCER	29
4.3 NUMB EN CaCU	30
JUSTIFICACIÓN	32
HIPÓTESIS	33
OBJETIVO GENERAL	33
OBJETIVOS PARTICULARES	33
MATERIALES Y MÉTODOS	34
1. CLASIFICACIÓN DEL ESTUDIO	34
2. SELECCIÓN DE CASOS Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS	34

3. INMUNOHISTOQUÍMICA	34
3.1 EVALUACIÓN DE LA TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA	38
4. CULTIVO CELULAR	38
5. EXTRACCIÓN DE ARN Y ENSAYOS DE EXPRESIÓN	38
6. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS Y WESTERN BLOT	39
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	41
8. ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO	42
RESULTADOS	43
EXPRESIÓN DE NOTCH1 Y NUMB EN LÍNEAS CELULARES DE CaCU	43
CARACTERIZACIÓN DE LAS PACIENTES	45
EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA NICD1 EN PACIENTES CON NIC Y CaCU	47
EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA NUMB EN PACIENTES CON NIC Y CaCU	50
RELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE NICD1 Y NUMB	52
ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE NICD1 CON MALIGNIDAD	55
ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE NUMB CON MALIGNIDAD	56
EFFECTO DE LA EXPRESIÓN DE NOTCH1 CON EL PRONÓSTICO CLÍNICO	59
DISCUSIÓN	60
CONCLUSIONES	70
PERSPECTIVAS	70
ANEXO 1	71
REFERENCIAS	84

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Lesiones precursoras de CaCU</i>	6
<i>Figura 2. Genoma del VPH</i>	9
<i>Figura 3. Infección de las células basales por VPH</i>	11
<i>Figura 4. Infección productiva por VPH</i>	13
<i>Figura 5. Transformación maligna por las oncoproteínas virales E5, E6 y E7</i>	15
<i>Figura 6. Vía canónica de señalización Notch y su regulación.</i>	19
<i>Figura 7. Vía de señalización Notch en cáncer.</i>	23
<i>Figura 8. Proteína NUMB.</i>	27
<i>Figura 9. Comparación de la tinción con diferentes anticuerpos para NOTC</i>	37
<i>Figura 10. Expresión génica de Notch1 y NUMB en líneas de CaCU.</i>	44
<i>Figura 11. Expresión de las proteínas NICD1 y NUMB en líneas de CaCU.</i>	44
<i>Figura 12. Expresión de NICD1 en lesiones precursoras y CaCU.</i>	48
<i>Figura 13. Localización de NICD1 en lesiones precursoras y CaCU.</i>	48
<i>Figura 14. Determinación de la expresión de la proteína NICD1, mediante ensayos de Western blot e inmunohistoquímica en tumores del cuello uterino.</i>	49
<i>Figura 15. Expresión de la proteína NUMB en lesiones precursoras y CaCU.</i>	51
<i>Figura 16. Localización de NUMB en lesiones precursoras y CaCU.</i>	52
<i>Figura 17. Correlación del porcentaje de tejido positivo a la expresión de NICD1 y NUMB.</i>	55
<i>Figura 18. Localización de NOTCH1 y sobrevida de pacientes con CaCU.</i>	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentración de anticuerpos utilizada para la técnica de inmunohistoquímica.	36
Tabla 2. Oligonucleótidos para evaluar la expresión de Notch1 y NUMB.	39
Tabla 3. Anticuerpos empleados para la técnica de Western blot	41
Tabla 4. Características clínicas y demográficas de pacientes con NIC y CaCU (n=144) atendidas en el Instituto Nacional de Cancerología en el periodo de 2004 a 2017	46
Tabla 5. Expresión y localización de la proteína NOTCH1 (NICD) en muestras de pacientes con NIC y CaCU (n= 144) atendidas en el Instituto Nacional de Cancerología en el periodo de 2004 a 2017.	47
Tabla 6. Expresión y localización de la proteína NUMB en muestras de pacientes con NIC y CaCU (n=144) atendidas en el Instituto Nacional de Cancerología en el periodo de 2004 a 2017	51
Tabla 7. Relación en la expresión y localización de las proteínas NICD1 y NUMB en pacientes con NIC y CaCU (n=144) atendidas en el Instituto Nacional de Cancerología en el periodo de 2004 a 2017	54
Tabla 8. Análisis de sensibilidad sobre la asociación de la expresión nuclear de NICD1 con la malignidad en pacientes con CaCu (n=95) atendidas en el Instituto Nacional de Cancerología en el periodo de 2004 a 2017	57
Tabla 9. Análisis de sensibilidad sobre la asociación de la expresión citoplásmica de NUMB con la malignidad en pacientes con CaCu (n=95) atendidas en el Instituto Nacional de Cancerología en el periodo de 2004 a 2017	58

ABREVIATURAS

Cáncer Cervicouterino
Virus del Papiloma Humano
Virus del Papiloma Humano de Alto Riesgo
Neoplasia Intraepitelial Cervical
Lesión Intraepitelial Escamosa de Bajo Grado
Lesión Intraepitelial Escamosa de Alto Grado
Adenocarcinoma *in situ*
Ácido Desoxirribonucleico
Ácido Ribonucleico
Nanómetro
Pares de bases

CaCU
VPH
VPH-AR
NIC
LIEBG
LIEAG
AIS
ADN
ARN
nm
pb

RESUMEN

El cáncer cervicouterino (CaCU) continua siendo un problema de salud pública en México y en países en vías de desarrollo. La infección persistente por virus del papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR) es el factor etiológico necesario para el desarrollo de CaCU, sin embargo la sola infección no es suficiente, por lo que diferentes eventos celulares participan en la transformación. La vía de señalización Notch, es una forma de comunicación entre células en contacto y su participación en el desarrollo de CaCU es controversial. Además, poco se sabe del papel de NUMB, regulador negativo de NOTCH, en esta neoplasia.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la asociación de la expresión de las proteínas NOTCH1 y NUMB con el desarrollo de CaCU, para lo cual se analizó la expresión génica y proteica de NOTCH1 y NUMB en las líneas de CaCU Hela, C33A y Caski. Además se evaluó la expresión inmunohistoquímica de estas proteínas, en 144 tejidos provenientes de mujeres atendidas en el Instituto Nacional de Cancerología, México, en el periodo 2004-2017. Las muestras fueron divididas en 49 neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) y 95 CaCU.

Se encontró que las líneas celulares Hela, C33A y Caski expresan el transcrito NOTCH1. Se evaluó la porción activa del receptor NOTCH1 (NICD1), encontrándose que las células Caski fueron las de mayor expresión de la proteína. En el caso de NUMB, las tres líneas expresan diferentes transcritos que corresponden a las isoformas conocidas NUMB 1-4, las cuales también fueron evidentes a nivel proteico. Con respecto a los tejidos, la expresión de NICD1 disminuye en CaCU en comparación con NIC, además de que ésta se relocaliza del núcleo al citoplasma de las células tumorales. Lo anterior concuerda con el hecho de que existe un aumento en la expresión de NUMB en CaCU comparado con NIC, y al igual que NICD1, la proteína pasa de ser nuclear en la lesiones

precursoras, al citoplasma de los casos de CaCU. Al evaluar la correlación en la expresión y localización de NICD1 y NUMB, se encontró que en CaCU, hay un aumento de casos donde ambas proteínas son positivas y co-existen en el citoplasma celular, además de coincidir en las mismas áreas de tejido.

Por otro lado, existe una asociación negativa de la expresión nuclear de NICD1 con la malignidad y ésta, es independiente de la edad, uso de anticonceptivos hormonales o inclusive de la expresión citoplásmica de NUMB. Sin embargo, aquellos casos de CaCU que presentaron una expresión nuclear de NICD, la tendencia fue que las pacientes tuvieran una menor sobrevida. En el caso de NUMB, la expresión citoplásmica de esta proteína se asocia de manera positiva con la malignidad independientemente de la edad o el uso de anticonceptivos hormonales, sin embargo la asociación se pierde cuando se considera la expresión nuclear de NICD1.

Los resultados aquí presentados sugieren que la vía de señalización Notch1 se encuentra inactiva en CaCU, ya que la porción activa del receptor, NICD1, no se localiza en el núcleo celular, sin embargo este fenómeno no pareciera estar relacionado con la regulación negativa por parte de la expresión citoplásmica de NUMB. Por lo anterior, pareciera que NICD1 se comporta como una proteína supresora de tumor en el contexto de CaCU; por lo que se propone que, la pérdida nuclear de NICD1 es un marcador biológico de predicción para el desarrollo de CaCU.

ABSTRACT

Invasive Cervical Cancer (ICC) remains as a public health problem in Mexico and other developing countries. The persistent infection with high-risk human papilloma viruses (HPV) it's the etiological factor need for ICC development. Even though, the solely infection is not enough, so different cell pathways participates in cell transformation. The Notch pathway mediates cell-cell communication and its participation in the development of ICC remains controversial. Moreover, little is known about its negative regulator NUMB, in this neoplasia.

The objective of the present study was to determine the association between the expression of NOTCH1 and NUMB in the development of ICC. In order to achieve the objective, the genetic and protein expression of NOTCH1 and NUMB was evaluated in the cervical cell lines Hela, C33A and Caski; as well as the immunohistochemical expression in 144 tissues from women attended in the Instituto Nacional de Cancerologia, Mexico, from 2004 to 2017. The samples were divided into groups: 49 Cervical Intraepithelial Neoplasias (CIN) and 95 ICC.

We found that the cell lines Hela, C33A and Caski express NOTCH1 mRNA. The active form of the NOTCH1 receptor, known as NICD1, was express in the three cell lines with higher expression in the Caski cells. In the case of NUMB, different mRNAs corresponding to the NUMB 1-4 isoforms, were detected in the three cell lines as well as the different proteins. The ICC patient sample's showed a diminished expression of NICD1 in comparison with CIN cases, and the protein tended to be located at the cytoplasm instead that at the nucleus, as it happened in CIN. Accordingly, there is an increase in NUMB expression in ICC and the protein was found in the cytoplasm rather that in the nucleus. Even more, we found that in ICC, there is an increase in cases where both proteins, NICD1 and NUMB, were positive and those co-exist in the cell cytoplasm in the same tissue areas.

On the other hand, NICD1 had a negative association with cervical malignancy, and that association is independent of the patient's age or the use of hormonal contraceptives, even of NUMB cytoplasmic expression. Additionally, the patients positives to nuclear NICD1 expression, tended to have a shorter overall survival. On the contrary, cytoplasmic NUMB expression showed a positive correlation with cervical malignancy, independently of the age and use of hormonal contraceptives, but the association was lost when NICD1 nuclear expression was taken into consideration.

The data presented here suggest that the Notch1 pathway is inactive in ICC, since the active domain, NICD1, is not present in the cell nucleus, and this phenomenon seems to be independent of cytoplasmic NUMB negative regulation. So, NICD1 might behaves as a tumor suppressor in ICC and the loss of nuclear NOTCH1 could be and independent predictor of cervical malignancy.

INTRODUCCIÓN

1. EL CÁNCER CERVICOUTERINO (CaCu)

El cérvix o cuello uterino, es el órgano fibromuscular que conecta al útero con la vagina [1]. Éste se divide en el *portio vaginalis* o ectocervix el cual se proyecta hacia la vagina y está constituido por tejido escamoso estratificado; y el endocervix que está cubierto de un epitelio columnar también llamado mucíparo o glandular, el cual secreta moco [2]. El punto de contacto entre ambos epitelios (escamoso y columnar) se conoce como la unión escamocolumnar. Durante la pubertad, por influencia de los estrógenos, se da el crecimiento del cérvix, lo que provoca que el epitelio columnar eversione, con lo que parte del endocervix queda expuesto sobre el ectocervix. A este proceso se le conoce como ectropión [3]. El epitelio columnar expuesto es afectado debido a las condiciones vaginales ácidas, lo que provoca que este epitelio sea remplazado por un proceso denominado metaplasia, en el que parte del tejido escamoso recubre al tejido columnar. Esta zona de recambio es conocida como la zona de transformación la cual se piensa pudiera ser la zona de inicio del proceso carcinogénico [3, 4].

El crecimiento de células neoplásicas en el cérvix es conocido como cáncer cervicouterino (CaCu). Este tipo de cáncer es el cuarto más común entre las mujeres a nivel mundial con 527,624 nuevos casos anuales, presentándose la gran mayoría de casos (80%) en países subdesarrollados [5]. Es el segundo cáncer de mayor incidencia para mujeres mexicanas con aproximadamente 13,960 nuevos casos al año [6]. Alrededor del 80% de los casos de CaCu se presentan en el epitelio escamoso, 10% en el tejido columnar provocando lo que se conoce como adenocarcinoma; el restante 10% de los casos se debe al tipo neuroendocrino [7, 8].

Las manifestaciones clínicas previas al desarrollo de este tipo de cáncer son conocidas, según la terminología de Richart de 1967[9], como neoplasia cervical

intraepitelial (NIC), las cuales van desde NIC 1 hasta NIC 3, haciendo referencia al tercio del epitelio escamoso que se ve afectado por la lesión: El NIC 1 afecta las capas más profundas del epitelio (tercio inferior), el NIC 2 en donde se afectan los dos tercios inferiores y se caracteriza por presentar cambios celulares displásicos y finalmente en el NIC3 donde se pierde la diferenciación y estratificación por completo. Una vez que se rompe la membrana basal donde descansa el epitelio escamoso, se considera un cáncer invasor (Figura 1). Las lesiones precursoras en el epitelio columnar se denominan adenocarcinoma *in situ* (AIS) [7, 10].

Existen otros sistemas de clasificación para las lesiones precursoras de CaCU, además de la terminología NIC, como lo es el sistema Bethesda, el cual solo tiene dos niveles: lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LIEBG) que incluye a los condilomas, y las displasias moderadas o NIC1; y la lesión intraepitelial escamosa de alto grado (LIEAG), que incluye a las lesiones moderadas y severas que corresponden a los NIC 2 y 3, así como el cáncer *in situ* [2].

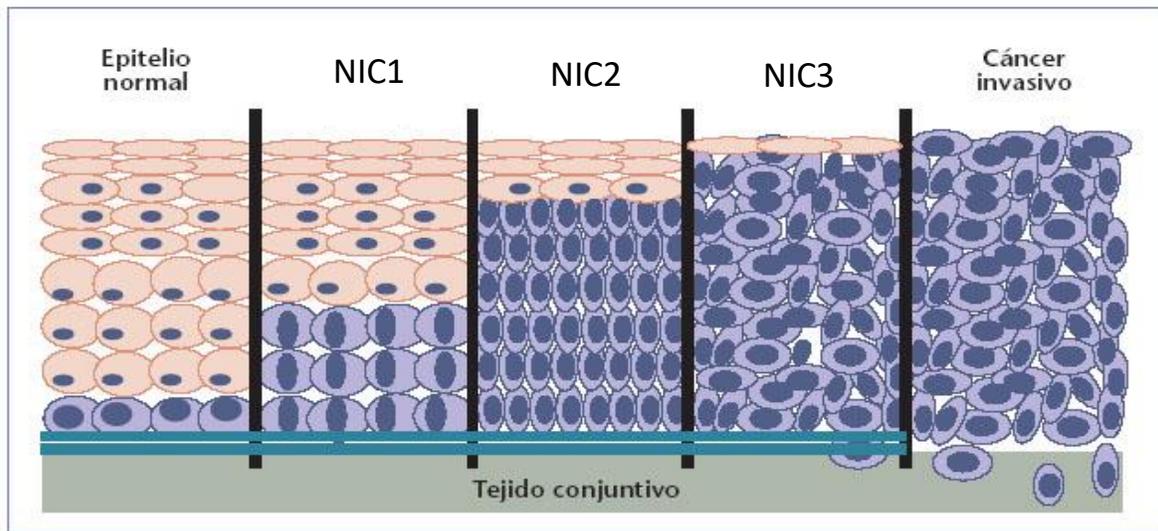


Figura 1. Lesiones precursoras de CaCU. La proliferación de células neoplásicas del cérvix, conlleva a diferentes grados de NIC, las cuales pueden evolucionar hasta cáncer. Tomado de Carretero Colomer 2008 [11].

Con respecto a la progresión de NIC a CaCU, se ha visto que el 88% de las lesiones NIC 1 reversion espontáneamente, motivo por el cual no requieren ninguna

intervención clínica, a menos que éstas persistan por más de dos años. En el caso de las lesiones NIC 2, la probabilidad de progresión a CaCu es del 5%, mientras que para NIC 3 es del 12%-31% por ello, todas estas lesiones deben de ser quirúrgicamente removidas [12].

Entre los factores de riesgo asociados al desarrollo de NIC y consecuentemente de CaCU, destaca la infección persistente por virus del papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR). Debido a que este patógeno es de transmisión sexual, aspectos relacionados al comportamiento sexual son factores de riesgo para la adquisición de la infección por VPH, como lo son la temprana edad de inicio de la vida sexual, el número de parejas sexuales y el comportamiento sexual de la pareja, todos estos aspectos relacionados a la probabilidad de la adquisición de la infección por VPH [3, 13]. Cabe señalar que la infección por VPH es la infección de transmisión sexual más común, con una incidencia del 80% a nivel mundial y una mayor presencia en la población entre los 15 a los 24 años [5]. Sin embargo, del total de las mujeres infectadas, solo entre el 1%-2% llegan a desarrollar CaCU [14].

Pese a que la infección por VPH es necesaria para el desarrollo de CaCU, ésta no es suficiente, y es por ello que algunos otros cofactores son requeridos para el desarrollo de esta neoplasia como lo son: número de partos, uso de anticonceptivos orales, tabaquismo, alcoholismo, aspectos nutricionales, coinfecciones con Chlamydia o virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH) e inclusive un nivel socio-económico bajo [3, 13, 15].

2. EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH)

El VPH es un virus pequeño de ~55 nm de diámetro, no envuelto con un genoma circular de doble cadena de ADN de aproximadamente 7900 pares de bases (pb). Estos virus, pertenecen a la familia *Papillomaviridae*, la cual agrupa cinco géneros ($\alpha, \beta, \gamma, \mu$ y ν) con 49 especies diferentes, siendo los VPH que infectan epitelios cutáneos y mucosos, pertenecientes al género α [16].

Según la asociación de los VPH con el desarrollo de cáncer, estos se dividen en dos grupos: virus de bajo riesgo (VPH-BR), los cuales no provocan el desarrollo carcinogénico, pero sí lesiones como verrugas, entre los que destacan el tipo VPH6 y VPH11; y virus de alto riesgo u oncogénicos, los cuales se encuentran tácitamente presentes en todos los casos de CaCU [10]. En todo el mundo, el VPH16 es el de mayor prevalencia, seguido por el VPH18, siendo estos dos responsables de alrededor del 70% de los casos de CaCU. Los VPH52, VPH58, VPH39, VPH56 y VPH51 son también frecuentes a nivel mundial [17] [18, 19]. En el caso de la población mexicana se ha visto que los VPH33 y VPH45 son los de mayor incidencia [20].

El genoma viral está dividido en tres regiones: 1) la región larga de control, la cual contiene el origen de replicación y los sitios de unión para factores de transcripción que modulan la expresión de los genes del VPH. 2) la región de expresión temprana (E: early) que contiene a los oncogenes E6 y E7, que se encuentran bajo la regulación del promotor temprano (p97) y los genes virales E1, E2, E4 y E5 regulados por el promotor tardío de diferenciación (p670). 3) La región de expresión tardía (L: late) la cual codifica para los genes de las proteínas de la cápside L1 y L2 (Figura 2) [10, 21].

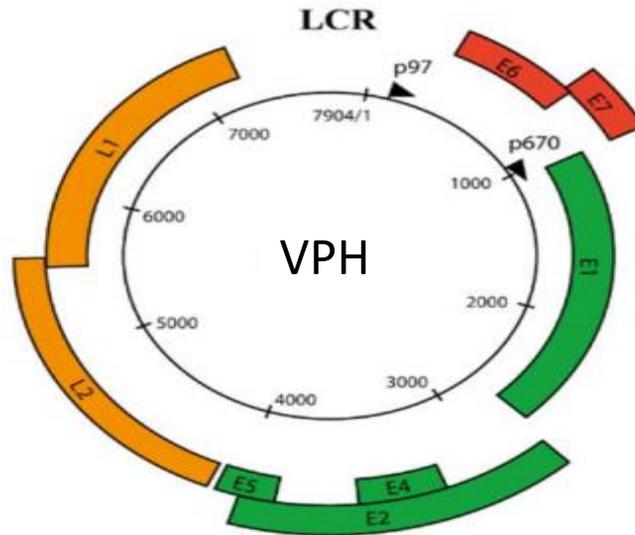


Figura 2. Genoma del VPH. El VPH codifica para genes de expresión temprana (Early) (mostrado en rojo los oncogenes virales y en verde el resto de los genes tempranos); y genes de expresión tardía (Late) (mostrados en color naranja). La transcripción de genes y la replicación viral son controlados por la región larga de control (LCR). En VPH16 el promotor temprano (p97) se encuentra en la LCR y el promotor tardío (p670) dentro del marco de lectura de E7. Tomado de Egawa *et al.* 2015 [22, 23].

La expresión de los genes virales está íntimamente relacionada a la diferenciación del epitelio cervical, en dos escenarios diferentes: una infección productiva en donde se producirán más virus o una infección abortiva, en la cual se lleva a cabo la integración del genoma viral al del hospedero, pudiendo provocar el desarrollo de CaCU debido a la expresión de los oncogenes virales [24].

2.1 ENTRADA DEL VPH AL EPITELIO CERVICAL

Durante la relación sexual con una pareja infectada con VPH, el epitelio cervical puede sufrir abrasiones, las cuales son la puerta de entrada del virus a las células basales del epitelio. En esta capa, se encuentran las conocidas como células troncales que dan origen a las células transitorias, las cuales son mitóticamente activas pero que, a diferencia de las células troncales, llegarán a diferenciación

terminal [22]. La membrana basal, la cual está constituida de matriz extracelular, contiene laminina, a la cual se unirá el virus. Después, el VPH se adherirá a las moléculas de heparán sulfato (HPSP: heparan sulfate proteoglycans) tipo sindecan 1, presentes en la membrana del queratinocito. Este molécula reconoce la proteína L1 de la cápside viral y provoca un cambio conformacional que expone un sitio de corte mediado por Furina en la proteína L2 de la cápside. Esto permitirá el paso a un receptor de entrada hasta ahora desconocido, pero que se ha propuesto podría ser del tipo de integrinas (α o β), el cual permitirá la endocitosis del tipo de macropinocitosis con la participación de actina y clatrina (Figura 3) [25, 26].

Tras la entrada del virión a la célula basal infectada, éste ingresa al tráfico endolisosomal, en donde se lleva a cabo el desensamblaje de la cápside. Primero L1 se degradada proteolíticamente en condiciones ácidas, con lo que el complejo L2 con DNA viral llega hasta la red trans-Golgi, donde residirán hasta que se lleve a cabo la mitosis, en donde tanto la membrana nuclear, como el aparato de Golgi se fragmentan, lo que permite que el DNA viral llegue a los cromosomas celulares [27].

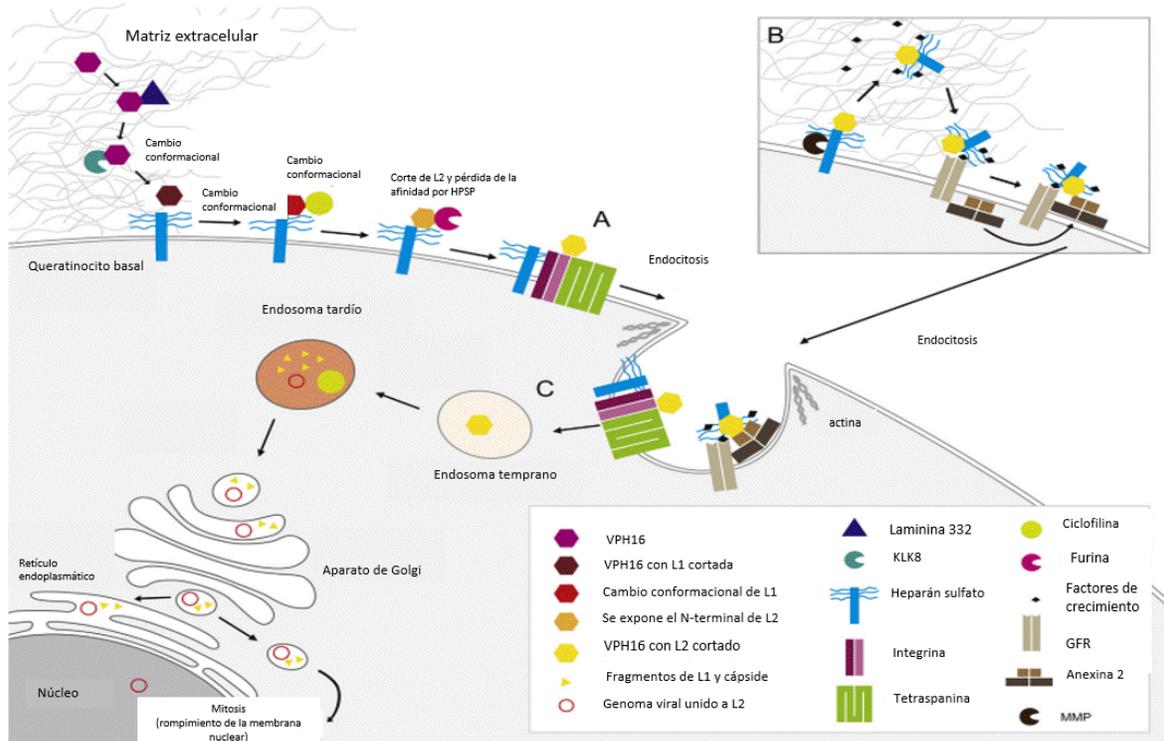


Figura 3. Infección de las células basales por VPH. Las abrasiones del epitelio cervical exponen a la membrana basal y a los queratinocitos basales. EL virus se une a proteoglicanos de heparán sulfato a través de la proteína de la cápside L1, lo que provoca cambios conformacionales que exponen el sitio de corte por Furina en la proteína L2. Esto último permite el paso del virión a un receptor de entrada que permite la internalización. Modificado de Aksoy 2017[25].

2.2 INFECCIÓN PRODUCTIVA

Tras la infección de las células basales, se lleva a cabo la amplificación de un bajo número de copias del genoma viral, lo cual es dependiente de la expresión de las proteínas virales tempranas E1 y E2, las cuales se encuentran bajo la regulación del promotor temprano (p97 en VPH-16) (Figura 2) [24]. La proteína E1 es una helicasa dependiente de ATP, mientras que la proteína E2 es un factor de transcripción, el cual regula a E1 aumentando su especificidad de unión al origen de replicación viral, todo esto durante la fase S y G2 del ciclo celular [28]. Durante

la citocinesis, la proteína E2 mantiene el episoma viral unido al cromosoma celular [24].

En las capas parabasales del epitelio cervical, ya no hay división celular, ya que aquí es donde se inicia la diferenciación de los queratinocitos; sin embargo, ante la presencia de VPH, y por la expresión coordinada de las oncoproteínas virales E6 y E7, se da la reentrada al ciclo celular, con lo que se provoca la expansión de las NICs [24]. Tanto la proteína E6 como E7 tiene la capacidad de unirse a una gran variedad de blancos celulares, con lo que modulan diversos procesos biológicos como el ciclo celular y la proliferación [29]. En particular, destaca la capacidad de E7 para unirse a miembros de la familia Rb, lo que permite la liberación del factor de transcripción E2F, el cual modula la expresión de genes como CDK2 y las ciclinas A y E importantes para la progresión del ciclo celular de G1 a S [30]. Por otro lado, el principal blanco de degradación de E6 de los VPH-AR es la proteína supresora de tumores p53, a la cual se une a través de la proteína conocida como E6AP (proteína asociada a E6), que es una ligasa de ubiquitina tipo E3 que media la degradación proteosomal de p53, comprometiendo la respuesta al daño del genoma celular y la apoptosis [30].

El promotor tardío o de diferenciación (Figura 2), se activa en las capas suprabasales del epitelio, permitiendo la expresión de los genes intermedios E1, E2, E1^E4, E5 que permiten la amplificación del genoma viral; así como los genes tardíos L1 y L2 cuyos productos forman la capsida viral [31]. La abundante expresión de la proteína viral E4, es responsable de la liberación de los viriones de las células descamadas del estrato córneo del epitelio cervical, debido a su capacidad de colapsar las estructuras de queratina [32]. Por su parte, la proteína E5, se ha visto que se expresa en las células diferenciadas y es también considerada una oncoproteína, ya que regula la respuesta mitogénica mediada por el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR por sus siglas en inglés) a través de la vía de MAPK [22, 24].

Las últimas proteínas en expresarse durante la infección productiva son las proteínas de la cápside viral L1 y L2, las cuales, como ya se mencionó, también están bajo la regulación del promotor tardío [10]. La cápside viral está compuesta por 72 capsómeros organizados de forma icosaédrica, cada uno conteniendo cinco monómeros de la proteína mayor L1 y doce monómeros de la proteína menor L2 [33]. El empaquetamiento del genoma viral se da por el reclutamiento de L2 al lugar de la replicación, esto mediado por la proteína E2; y subsecuente expresión de L1 para la formación de la partícula viral en el núcleo celular [10]. La infección productiva por VPH se ilustra en la figura 4.

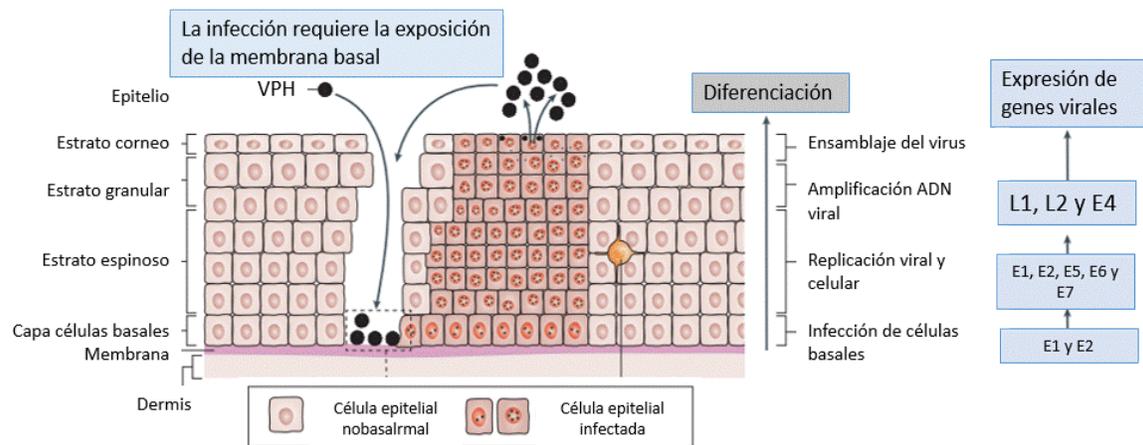


Figura 4. Infección productiva por VPH. Tras la infección de las células basales, el genoma viral se amplifica en un bajo número de copias (hasta 200 episomas) que serán segregados en las células hijas tras la división celular. Las oncoproteínas E6 y E7 permiten la proliferación celular continua, sentando las condiciones para que E1 y E2 dirijan la replicación viral. La diferenciación terminal de las células en las capas superiores desencadena la expresión de E4, L1 y L2, para llevar a cabo el empaquetamiento del DNA viral y la liberación de los nuevos viriones debido al colapso de los filamentos de queratina, lo cual es provocado por E4. Modificado de Roden 2018 [34].

2.3 INFECCIÓN ABORTIVA

La infección persistente por VPH-AR es el factor clave para el desarrollo de cáncer, en donde ya no se presenta la infección productiva y se da la integración del genoma viral al celular [10, 34]. Aunque la integración es azarosa, se ha visto que ésta ocurre con mayor frecuencia en sitios frágiles de los cromosomas o también conocidos como “hot spots”. La integración estabiliza la transcripción de E6 y E7, debido a la pérdida de la región codificante de E1 y E2 [10, 35]. Además de los ya mencionados efectos sobre p53 y pRb, la sobreexpresión de E6, E7 y E5 afectan otras vías consideradas necesarias para el desarrollo de cáncer, y las cuales son conocidas como características del cáncer, descritas por Hanahan y Weinberg [36], quienes postularon seis características básicas de una célula cancerosa [36, 37].:

1. Auto suficiencia en la señalización para la proliferación
2. Insensibilidad a los supresores de la proliferación
3. Resistencia a la muerte celular
4. Potencial de replicación ilimitado
5. Angiogénesis sostenida
6. Invasión y metástasis
7. Modificación del metabolismo energético
8. Evasión inmune

En el particular caso del desarrollo de CaCU, son las oncoproteínas virales las que modulan las vías de señalización que controlan estas características transformantes (Figura 5). Por ejemplo E6 de VPH-AR es capaz de unirse y provocar la degradación de proteínas con dominios PDZ, lo que favorece la invasión y metástasis así como la desregulación de la señalización celular mediada por proteínas PDZ como lo son las pertenecientes a la familia MAGUK (membrane-associated guanylate kinase), por mencionar algunas [38]. E6 también es capaz de provocar la immortalización celular al favorecer la expresión de la telomerasa (hTERT) y estabilizar su función [39]. Además, E6 impide la degradación del factor inducible por hipoxia HIF-1 α , lo cual a su vez repercute en la reprogramación del metabolismo energético en lo que se conoce como efecto Warburg, caracterizado por un alto ingreso de glucosa a las

células transformadas, pero con un compromiso de la oxidación completa de ésta [40].

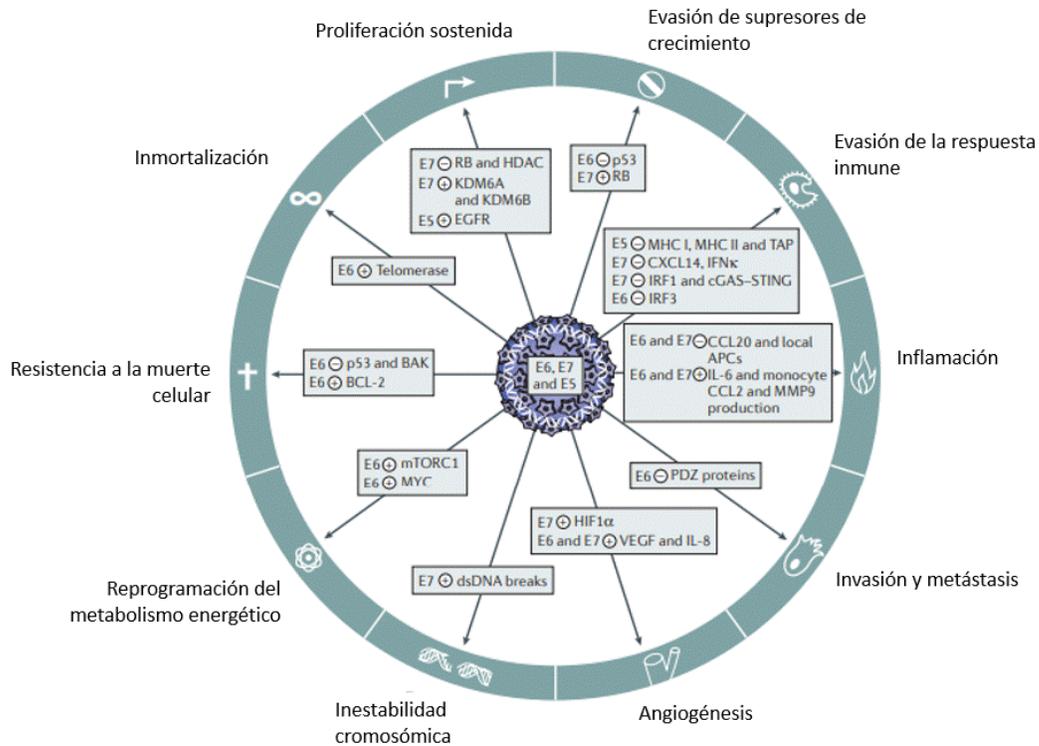


Figura 5. Transformación maligna por las oncoproteínas virales E5, E6 y E7.

Los VPH-AR regulan diversos efectos biológicos involucrados en el desarrollo de cáncer, esto incluye la proliferación sostenida mediada por E5 y E7, la inmortalización, la invasión y metástasis mediada por E6. La inhibición de la diferenciación y reprogramación metabólica también inducida por E6. En el proceso de angiogenesis y en la evasión de la apoptosis participan tanto E6 como E7. En este escenario sentado por estas interacciones, se provoca la ruptura de dobles cadenas de ADN (dsDNA), inestabilidad cromosómica y mutaciones que actúan de manera aditiva al desarrollo de cáncer. Modificado de Roden 2018 [34].

Por su parte, E7 puede afectar la expresión de genes celulares debido a su interacción desacetilasas de histonas (HDACs) y provocar inestabilidad cromosómica debido a la replicación supernumeraria de centrosomas, lo que induce ruptura de la doble cadena de DNA [41]. Así mismo regula la respuesta inmune a través de su interacción con elementos de la vía de interferón (IFN γ) y promueve inflamación mediada por la expresión de IL-6 [34, 41].

Finalmente E5, además de favorecer la proliferación a través de la regulación de EGFR, está implicada en la evasión inmune, ya que disminuye la expresión del antígeno leucocitario de histocompatibilidad, con lo que altera la presentación de antígenos por los complejos de histocompatibilidad I y II [14, 34].

Además de todas las interacciones previamente descritas, la transformación maligna de los queratinocitos en respuesta a la infección por VPH, se acompaña de muchas otras modificaciones de la biología celular. Alguno de estos cambios se desconoce si son provocados por la infección y por lo tanto promotores de la carcinogénesis, o son consecuencia de la transformación. Entre estos se encuentra la desregulación de la vía de señalización Notch, la cual se describe a continuación.

3. VÍA DE SEÑALIZACIÓN Notch

La vía de señalización Notch es una de las siete vías básicas del desarrollo embrionario. Las primeras evidencias de la participación de Notch en el desarrollo datan de los años 30's cuando se demostró que las *Drosophilas* con mutaciones en *Notch*, carecían de tejido de las capas embrionarias mesodérmica y ectodérmica; además de que el tejido nervioso se producía a expensas de las células hipodérmicas, motivo por el cual a este fenotipo se le conoce como "neurogénico" [42]. Sin embargo, el descubrimiento de esta vía se dio alrededor de veinte años antes. En 1914, Dexter describiría un fenotipo en el cual, se pierden los márgenes de las alas de la mosca apareciendo "notches" (muescas por su traducción del inglés) y por lo que se dio nombre a esta vía de señalización [42, 43]. En 1917, durante los experimentos de Thomas Hunt Morgan sobre cromosomas, este identificó los alelos mutantes del gen *Notch* [44]. En los 80's, Artavanis-Tsakonas y Michel Young, de forma independiente, secuenciaron y clonaron el receptor Notch [44]. Fue hasta 1991, momento en que se evidenció la existencia de esta señalización en humanos, cuando se descubrió una translocación entre los

cromosomas 7 y 9, común en la leucemia linfoblástica de células T (T-ALL), la cual afectaba al homólogo del receptor Notch de *Drosophila* [43]. Por esto, históricamente la vía ha sido reconocida como oncogénica, sin embargo, en los recientes años, aumenta la evidencia de su participación como proteína supresora de la carcinogénesis [45].

Además de su participación en cáncer, la desregulación de esta vía se ha visto fuertemente implicada en diversas patologías como en el síndrome pediátrico de Alagille [43], el desorden vascular conocido como CADASIL (del inglés: cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy), el síndrome Adams-Oliver y Alzheimer [46, 47].

3.1 SEÑALIZACIÓN CANÓNICA DE LA VÍA Notch

La vía de señalización Notch es una forma de comunicación entre células vecinas, es decir, es una regulación yuxtacrina, donde la célula inductora expresa el ligando que interacciona con el receptor de la célula efectora [48]. Tanto el ligando como el receptor son proteínas transmembranales tipo 1. En mamíferos, la célula inductora expresa uno de los cinco ligandos DSL (Delta, Serrata y Lag2) descritos: Delta-like 1, 3 y 4; y Jagged 1 y 2; los cuales son parálogos de los dos ligandos en *Drosophila*. Por su parte, la célula efectora expresa uno de los cuatro receptores NOTCH 1- 4. [49].

La activación de la vía Notch se da cuando el ligando y el receptor interaccionan (Figura 6.1), lo que provoca una serie de cortes proteolíticos sobre el receptor NOTCH:

1. La unión del ligando provoca un cambio conformacional del receptor, ya que ejerce una fuerza de tracción por parte de la célula transmisora [50]. Lo anterior, permite que la región reguladora negativa (NRR: negative regulatory

región) localizada en la porción extracelular del receptor, se abra dejando expuesto el sitio de corte S2, sobre la porción juxtamembranal del receptor, donde las metaloproteasas de la familia ADAM (particularmente ADAM 10 y 17/TACE) llevan a cabo el corte entre los residuos Ala 1710 y Val 1711, dando origen a un péptido unido a la membrana conocido como NEXT (Notch Extracellular Truncation) (Figura 6.2) [51].

2. El segundo corte es llevado a cabo por el complejo γ -secretasa, el cual es un complejo de alto peso molecular compuesto por cuatro subunidades, de las cuales la aspartil-proteasa presenilina corta en el porción transmembranal de NEXT, en el sitio S3 entre los residuos Gly 1743 y Val 1744; liberando la porción carboxilo terminal del receptor Notch (NICD: Notch intracelular domain) (Figura 6.3) [52].

Una vez liberado el NICD de la membrana, éste se transloca al núcleo ya que NICD cuenta con al menos una señal de localización nuclear (NLS: nuclear localization signaling), la cual interacciona con proteínas del tipo de las importinas α/β en la membrana nuclear, permitiendo el ingreso del NICD al núcleo [53].

En el núcleo, el factor de transcripción RBPJ- κ (también conocido como CSL: CBF1/RBPJ, Su (H), Lag-1) regula toda la respuesta mediada por la vía Notch [54, 55]. En ausencia de NICD, RBPJ- κ se encuentra unido al DNA y recluta co-represores, como: NCoR, MINT y KyoT, que varían dependiendo del contexto y tipo celular; además de reclutar desacetilasas de histonas y desmetilasas, lo que implica remodelación de la cromatina haciéndola más condensada debido a la unión con las histonas, evitando la transcripción de genes blancos [49, 56]. Sin embargo, tras el acceso de NICD al núcleo, el complejo co-represor, unido a RBPJ- κ , es intercambiado por un complejo activador de la transcripción (NTC: NOTCH transcriptional complex), el cual está compuesto básicamente por el co-activador MAML1 (Mastermind-like transcriptional co-activator 1), la acetilasa de histonas p300/CBP, SKIP, entre otros. Esto provoca un aumento en la acetilación de histonas y, por lo tanto, aumento de la transcripción (Figura 6.4) [49, 56].

De los blancos transcripcionales de la vía destacan los genes pertenecientes a la familia HES (Hairy of Enhancer of Split), los cuales codifican para proteínas nucleares del tipo hélice-bucle-hélice (bHLH: basic helix-loop-helix), los cuales son supresores de la transcripción [49] y la familia de HERP (Hes-related proteins) mejor conocida como Hey [57]. En mamíferos los blancos de estas familias mejor descritos son Hes1, Hes5 y Hey1. Otros blancos de esta vía son c-myc, ciclina D1, p21/Waf1, bcl-2, entre muchos otros (Figura 6.4) [58].

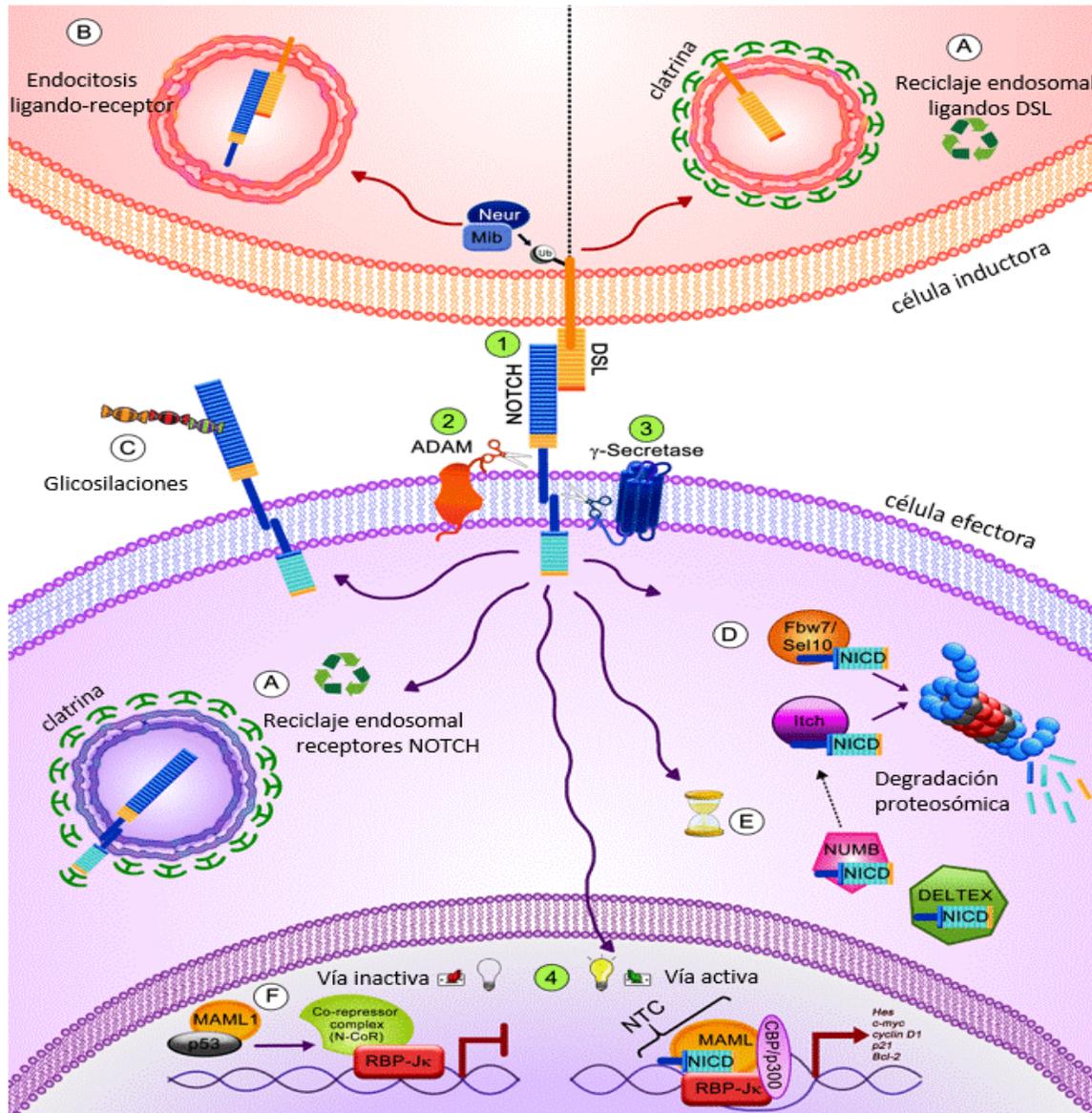


Figura 6. Vía canónica de señalización Notch y su regulación. 1) La activación de la vía se da cuando un receptor NOTCH interacciona con algún ligando DSL en la célula emisora. 2) La interacción ligando-receptor provoca un cambio

conformacional a nivel del receptor lo que permite el primer corte (S2) juxtamembranal por metaloproteasas de la familia ADAM. **3)** El segundo corte (S3) es llevado a cabo en la porción transmembranal por el complejo γ -secretasa, liberando la porción activa del receptor conocida como NICD. **4)** El dominio NICD es traslocado al núcleo en donde desplaza a los co-represores que se encuentran unidos al factor de transcripción RBPJ- κ y permite el reclutamiento de los co-activadores MAML y p300/CBP con lo que favorece la transcripción de los genes blancos (familia de genes HES y HEY, *c-myc*, ciclina D, entre otros). **A)** La disponibilidad de ligandos y receptores en la membrana se debe al reciclaje endosomal. **B)** La activación de la vía depende de la endocitosis del ligando y de la porción extracelular del receptor por la célula emisora. **C)** La interacción ligando-receptor está regulada por glicosilaciones del receptor. **D)** Las ligasas de ubiquitina Fbw7, Itch y Deltex ubiquitinan a NICD haciéndolo susceptible de degradación proteosomal. **E)** La proteína NUMB se une directamente al receptor NOTCH, así como a NICD con lo que modifica la vida media de este, ya que regula su tráfico vesicular, la interacción con otras proteínas (como la ligasa Itch) o su translocación nuclear. **F)** En el núcleo la actividad de la vía depende de los co-represores y co-activadores presentes en ese momento (contexto dependiente) así como las interacciones entre estos, se muestra el secuestro de MAML por la proteína supresora de tumores p53, lo que inhibe la actividad de NOTCH. Tomado de Vázquez-Ulloa 2018 [59].

3.2 SEÑALIZACIÓN NO CANÓNICA DE LA VÍA NOTCH

Como ya se mencionó, los elementos básicos de la vía de señalización Notch son los ligandos (DSL), los receptores (NOTCH1-4) y el factor transcripcional RBPJ- κ [60], a través de los cuales se lleva a cabo la transcripción de los genes blanco, tras el corte proteolítico del receptor y su subsecuente translocación nuclear [49]. Ahora bien, cualquier modificación a este modelo simple de señalización, se le considera una señalización no canónica, de la cual se reconocen dos: Tipo I, en la cual existe activación del receptor NOTCH por parte de alguno de los ligandos DSL pero la transducción de la señalización es independiente de RBPJ- κ ; señalización Tipo II, en la cual se da la expresión de los blancos transcripcionales independientemente del corte proteolítico del receptor NOTCH o de la actividad de RBPJ- κ y Tipo III que se da cuando se da la transcripción de los genes blancos por parte de RBPJ- κ pero independiente de NOTCH [61].

Todo lo anterior implica una serie de entrecruzamientos entre vías. Por mencionar algunos ejemplos, se ha visto que NOTCH puede provocar la expresión de genes a través de los factores transcripcionales NF-kB, YY1 e HIF1 α [62]. También, la activación de NOTCH por parte de Jagged1, provoca la actividad de la vía PI3K/Akt pero esto independientemente a la actividad de RBPJ- κ [63].

Ahora bien, también se ha visto que el receptor NOTCH completo, no activo para su propia vía, se puede unir a β -catenina lo que evita la translocación nuclear de ésta, y por ende, la regulación negativa de la vía de Wnt [64]. Similar a lo anterior, el receptor NOTCH membranal, así como NICD citoplásmico, son capaces de activar la vía PI3K/Akt a través de la interacción con mTOR, lo que resulta en resistencia a la apoptosis [65]. Los anteriores ejemplos, son solo algunos de los diferentes entrecruzamientos de NOTCH con otras vías, y cuya descripción sale del objetivo del presente trabajo.

3.3 REGULACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN Notch

Pese a la supuesta simplicidad de la vía, debido a que carece de intermediarios que amplifiquen la señal, ésta se encuentra finamente regulada por eventos post traduccionales como glicosilaciones, ubiquitinación y tráfico celular [60]. A nivel de membrana, la endocitosis mediada por clatrina, tanto de los ligandos como de los receptores, determina la disponibilidad de ambos en la superficie celular (Figura 6.A). Además, tiene efectos en la activación de la vía, ya que la endocitosis del ligando (mediado por las ligasas de ubiquitina Mindbomb y Neuralized) permite la fuerza de tracción requerida para disociar el heterodímero compuesto por el receptor NOTCH y el ligando, antes de su procesamiento proteolítico (Figura 6.B) [50, 66].

La glicosilación determina la interacción entre el receptor y los ligandos: los receptores NOTCH son glicosilados en su porción extracelular (específicamente en los repetidos tipo EGF) por la O-fucosiltransferasa 1 y posteriormente, esta

fucosilación es elongada por la transferasa Fringe (en mamíferos se conocen tres enzimas: Fringe: Lunatic, Manic y Radical) [67]. El receptor ya glicosilado sale del aparato de Golgi en dirección a la membrana plasmática, en donde debido a esta glicosilación en específico, se favorece la señalización NOTCH-Delta y no así la mediada por los ligandos Jagged (Figura 6.C) [68]. Cabe señalar que pese a que los ligandos DSL también cuentan con diversos repetidos tipo EGF, los cuales son glicosilados. El significado funcional de estas modificaciones no ha sido determinado [67].

A nivel del citoplasma, diferentes proteínas determinan la vida media de Notch. Las ligasas de ubiquitina Itch, Fbw7 y Deltex; favorecen la degradación de NICD con lo que se disminuye la actividad de la vía (Figura 6.D) [55]. Por su parte la proteína NUMB, puede funcionar como adaptadora para la ligasa Itch o puede unirse directamente a NICD secuestrándolo en el citoplasma (Figura 6.E) [69].

Finalmente, una vez que el NICD ha sido traslocado al núcleo, su actividad depende de los co-represores y co-activadores presentes en el núcleo, mencionados anteriormente, lo que está determinado por el contexto celular y finalmente dicta la especificidad de la respuesta de esta vía según el tipo y momento de la célula [49, 55, 60]. La interacción de los elementos que componen el NTC modifica la actividad de la vía, por ejemplo, la proteína MAML puede unirse a la proteína supresora de tumores p53, con un efecto negativo sobre la vía (Figura 6.F) [70].

3.4 PARTICIPACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN NOTCH EN CÁNCER

Como ya se mencionó anteriormente, la vía de señalización Notch fue históricamente definida como oncogénica, esto debido a una mutación en T-ALL

que provoca una activación independiente de ligando del receptor NOTCH [43, 55]. Sin embargo, existen otros escenarios en donde la vía Notch se comporta de manera supresora y esto se da principalmente en diversos cánceres de tipo escamoso. En la figura 7, se muestra un resumen del comportamiento de la vía Notch en diferentes tipos de cáncer [55].

Tumores provocados por mutaciones de la vía Notch o por su desregulación

Mutaciones supresoras de Notch (hipo actividad de Notch)		Mutaciones oncogénicas de Notch (híper actividad de Notch)	
Cáncer escamoso de cabeza y cuello	NOTCH1	T-ALL	NOTCH1, NOTCH3, FBXW7
Cáncer escamoso de piel y pulmón	NOTCH1, NOTCH2	Leucemia linfoblástica crónica	NOTCH1
Cáncer escamoso de esófago	NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3	Linfoma ocular tipo MALT de la zona marginal	NOTCH1, NOTCH2
Cáncer de células pequeñas de pulmón	NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4	Linfoma esplénico de la zona marginal	NOTCH2
Cáncer de vejiga	NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, MAML, NICASTRIN	Linfoma de células del manto	NOTCH1, NOTCH2
Desregulación de la vía (no mutagénico)		Carcinoma quístico adenoide	NOTCH1, NOTCH2
Adenocarcinoma ductal de páncreas		Miofibroblastoma infantil	NOTCH3
Tumor cerebral		Cáncer de mama	NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3
Cáncer hepático		Tumores glómicos	NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3 rearrangements
Cáncer de próstata			

Figura 7. Vía de señalización Notch en cáncer. De lado izquierdo se muestran los tipos de cáncer en donde la vía se comporta de manera supresora (hipo-actividad); del lado derecho se muestran aquellos canceres en donde se presentan mutaciones oncogénicas (híper-actividad de la vía Notch). En la esquina inferior izquierda, se muestran los tipos de cáncer en donde no se presentan mutaciones y aun así, la vía se encuentra desregulada. Modificado de Siebel (2017) [55].

Como se puede observar, en el caso de los tumores de tipo escamoso, los cuales son tumores comunes de amplia distribución en el cuerpo, se tiende a perder la actividad de la vía Notch, esto ya que las mutaciones comúnmente encontradas en estos tipos de cáncer se relacionan a mutaciones que provocan un mal plegamiento del péptido o que afectan la interacción con los ligandos DSL [71].

Ahora bien, esta relación de la pérdida de la función de Notch con desarrollo de cánceres de tipo escamoso, se debe a la función que esta vía tiene en este tipo de tejido. Los epitelios estratificados, como los son la piel o el cérvix, están formados por varias capas de queratinocitos. Es en la capa basal de este tipo de epitelios, es donde las células adquieren el compromiso con un destino celular. Las células troncales, tras una división asimétrica, darán origen a las conocidas como células amplificadoras transitorias, las cuales estarán comprometidas a una diferenciación terminal. Lo anterior se logra a través de la inhibición lateral, la cual provoca que una célula dentro de un grupo de células iguales tenga un destino celular diferente [59, 72]. En el caso del epitelio estratificado, las células troncales expresaran abundantemente el ligando Delta, provocando la activación de los receptores NOTCH presentes en las células circundantes. Estas células, ahora efectoras de la vía, empezaran la diferenciación, por lo que de los primeros eventos que sufrirán será el arresto del ciclo celular debido a la expresión de p21 (inhibidor de complejo ciclina-cinasa), posteriormente en un estrato superior del epitelio (en el estrato espinoso), comenzará la expresión de marcadores de diferenciación temprana como son las proteínas queratina 1 y 10, así como involucrina [73].

La pérdida de la actividad de Notch en la piel, provoca hiperplasia del estrato basal y córneo del epitelio, seguido del desarrollo de tumores; acompañado de un aumento en la actividad de la vía de Wnt y Hedhehog, las cuales debido a su papel en renovación de células troncales, deberían estar reprimidas en células en diferenciación [74]. Así pues, Notch se comporta como un supresor tumoral en la mayoría de los casos de cáncer escamoso [71, 73, 74].

3.5 PARTICIPACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN NOTCH EN CaCU

En el caso de CaCU, la participación de la vía Notch continúa siendo controversial, ya que no se ha determinado un comportamiento oncogénico o supresor en este tipo de cáncer. Los primeros trabajos mostraron la tendencia de un comportamiento oncogénico de la vía Notch en CaCU: Zagouras en 1995 y Daniel en 1997, mostraron que existía una elevada expresión de NICD en CaCU, en comparación con las lesiones precursoras [75]. En este mismo sentido, Rangarajan (2001) reporta que NICD es capaz de hacer sinergia con las oncoproteínas E6 y E7 y promover la resistencia a la anoikis, todo esto mediante la activación de la vía de PKB/Akt [76].

De manera contraria, Talora *et al.* (2002) reporta que los tumores cervicales así como las líneas celulares provenientes de éstos, carecen de la expresión de NICD [77]. Este mismo grupo demostró que es necesaria la supresión de la expresión de NOTCH para permitir la expresión sostenida de los oncogenes virales E6 y E7, ya que éstos se encuentran bajo la regulación del factor transcripcional AP-1, mismo que es regulado por la vía Notch [77]. Por su parte, Lathion (2003) sugiere que la actividad de la vía en esta neoplasia es dosis dependiente, a altas concentraciones inhibirá la expresión de E6 y E7 además de inhibir la proliferación; pero niveles moderados de NICD favorecen la transformación de células en donde se encuentra activa la vía de PI3K [78]. Reportes recientes demuestran que la expresión de NICD es retardada en células que expresan el oncogén E6, esto debido a la disminución en la expresión de p53 quien regula a su vez la transcripción de *Notch*; lo anterior tiene como resultado el retardo en la diferenciación acompañado de una mayor capacidad de proliferación [79].

4. LA PROTEÍNA NUMB

Como ya se había mencionado anteriormente, la proteína NUMB es capaz de regular de manera negativa la vía de Notch (Figura 6. E); sin embargo, ésta proteína tiene importantes funciones fuera de solo regular esta vía: NUMB participa en la división asimétrica y compromiso del destino celular, endocitosis, adhesión celular, migración celular, andamio para ligasas de ubiquitina y regula también otras vías como los son p53 y Hedgehog (Shh) [80].

La proteína NUMB debe su nombre al hecho de que la pérdida de su expresión provoca un marcado “entumecimiento” (del inglés numb) o letargo en el organismo, esto definido en *Drosophila* en donde se estudió inicialmente por su papel en la neurogénesis [80]. Estructuralmente, la proteína NUMB contiene dos dominios de interacción proteína-proteína, un dominio amino terminal de unión a tirosinas fosforiladas (PTB: phosphotyrosine-binding) y una región carboxilo terminal rica en prolinas (PRR: proline-rich region), que en el caso de mamíferos, estas regiones pueden sufrir procesamiento alternativo dando origen a varias isoformas con función y localización diferente [80, 81]. En 1999 y casi al mismo tiempo, Joseph Verdi y Sascha Dho describieron las primeras cuatro isoformas de NUMB en mamíferos [82, 83], una inserción de 48 aminoácidos en la RRP distingue a las isoformas NUMB1 y NUMB3 (también llamadas p72 y p73 por su peso molecular) de las isoformas NUMB2 (p66) y NUMB4 (p65). Además, las isoformas NUMB1 y 2 contienen una inserción de 11 aminoácidos en la región del PTB (Figura 8).

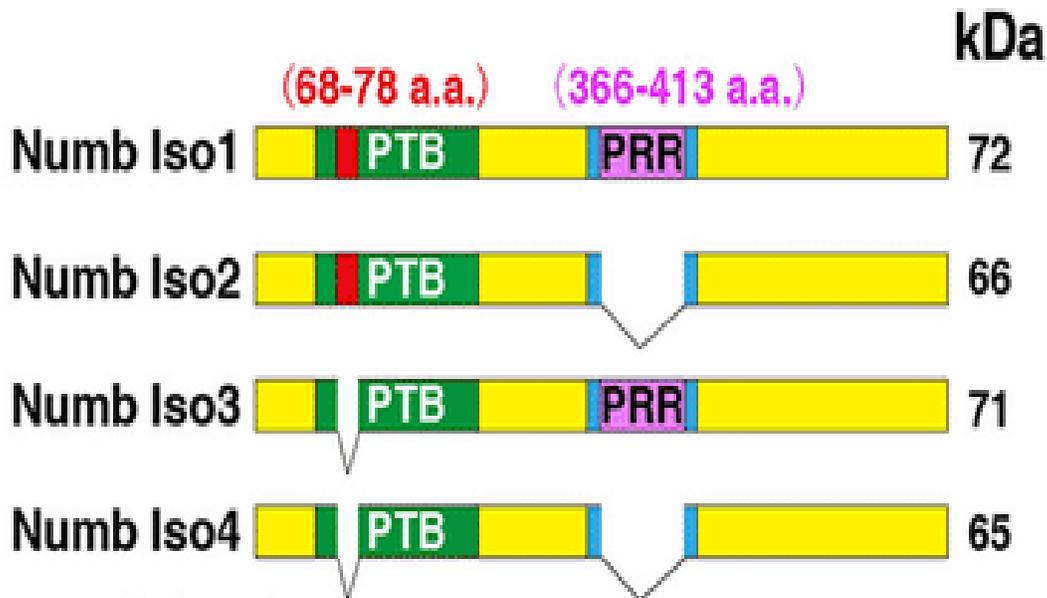


Figura 8. Proteína NUMB. En mamíferos se conocen varias isoformas de la proteína NUMB. En verde se muestra el dominio PTB, el cual presenta una inserción de 11 aminoácidos en las isoformas NUMB 1 y 2. En morado se muestra la RRP la cual se conoce como PRR_L (long: larga) a aquella que contiene un inserción de 48 aminoácidos como en las isoformas NUMB 1 y 3, o PRR_s (short: corta) presente en las isoformas NUMB 1 y 4. Tomado de Wei (2014) [84].

Con respecto a las funciones de las diferentes isoformas, Verdi mostró que la expresión de las isoformas PRR_s, es decir NUMB 2 y 4, están relacionadas a diferenciación; mientras tanto, las isoformas PRR_L (NUMB 1 y 3) se relacionan a proliferación, esto durante la neurogénesis [83]. Por su parte, las diferencias en el PTB determinan la localización de la proteína, aquellas isoformas con el PTB largo (PTB^L) se ubican en la membrana plasmática, mientras que las isoformas con PTB corto (PTB^s) son principalmente citoplásmicas. Además, solo las PTB^L pueden ser ubiquitinadas por la ligasa LNX (Ligand of NUMB protein) [85].

Cabe señalar que se han descrito más isoformas para la proteína NUMB, las isoformas 5 y 6, las cuales son más pequeñas que NUMB4 y se expresan muy poco en tejido normal, por lo que se propone que pudieran ser formas dominantes negativas de las isoformas NUMB1-4 [86], sin embargo poco se ha estudiado hasta el momento.

Además de los ya mencionados dominios PTB y PRR, todas las proteínas NUMB cuentan en su extremo carboxilo terminal con dos motivos de unión conservados, uno a α -adaptina y un segundo dominio de unión a Eps15, ambos necesarios para su participación en endocitosis y tráfico celular [87].

4.1 NUMB: ANTAGONISTA DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN NOTCH

La proteína NUMB puede regular de diferentes maneras a la vía de señalización Notch [88]:

1. Endocitosis: como ya se había mencionado, NUMB contiene los motivos de unión a Eps15, que forma parte de la maquinaria de endocitosis; y α -adaptina que forma parte del complejo AP-2, uno de los mayores componentes de las vesículas de clatrina [87]. De esta manera, NUMB es una proteína que regula la endocitosis del receptor NOTCH y por ende su disponibilidad a nivel de membrana [81, 85] (Figura 6.A).
2. División asimétrica: Esta forma de regulación de NUMB sobre NOTCH fue descrita inicialmente en las células precursoras de los órganos sensoriales (SOP: sensory organ precursor) de *Drosophila*, en donde la proteína NUMB guía la localización y actividad de NOTCH tras la división, que en este caso que es una división asimétrica, las células hijas son diferentes entre ellas: una célula heredará NOTCH y la otra no [80]. En *Drosophila*, lo anterior se logra ya que NUMB determina la localización de NOTCH a través de proteínas transmembranales como Sanpodo; la cual es capaz de unirse tanto a NOTCH como a NUMB, pero la unión con ésta última, provoca la deslocalización de Sanpodo de la membrana y por lo tanto la de NOTCH [89]. Previo a la división asimétrica, NUMB se polariza en la membrana de la célula a dividirse (regulado por fosforilación mediada por aPKC) con lo que se logra

que los polos difieran en cuanto a la presencia de NUMB, Sanpodo y NOTCH [81, 89, 90].

3. Inhibición de NICD: Tras la activación de la vía y una vez liberado NICD de la membrana celular, NUMB se puede unir directamente a NICD, evitando su translocación nuclear [91]. Ahora bien, esta interacción es dependiente del dominio PTB de NUMB [92], y no todas las isoformas tienen esta función antagonista, ya que se ha propuesto que aunque todas las isoformas se unen a NOTCH, son las de PTB^L, principalmente p66 (NUMB 2), las que provocan la disminución de la actividad de la vía [82, 86, 93]. Esta disminución de la concentración de NICD se logra ya que NUMB funciona como una proteína adaptadora para la unión de la ligasa de ubiquitina Itch promoviendo la degradación vía proteosoma de NICD (Figura 6. E) [69].

4.2 NUMB EN CÁNCER

Las diferentes funciones de NUMB, además de ser un regulador negativo de la vía de señalización Notch, hacen de esta proteína un elemento esencial en el mantenimiento de la homeostasis; motivo por el cual, su alteración se ha visto implicada como un supresor tumoral en diversos tipos de cáncer [81]. Por ejemplo, en cáncer de mama, se ha reportado que existe pérdida de la expresión de NUMB en alrededor del 50% de casos, esto debido a que existe una constante degradación proteosomal de NUMB [94]. Además, los tumores carentes de NUMB tienden a ser menos diferenciados y con peor pronóstico clínico, que aquellos que sí expresan la proteína [81]. Al ser NUMB capaz de regular la estabilidad del supresor tumoral p53 (esto debido a que NUMB a su vez regula a la ligasa Mdm2, responsable de la degradación de p53), la pérdida de NUMB en tumores mamarios, se relaciona con resistencia a la terapia antitumoral [95].

En el caso de tumores de células pequeñas de pulmón, también se ha observado pérdida de la expresión de NUMB y activación de la vía de Notch [81]. Sin embargo, un estudio reciente reporta que no existe relación entre la expresión de NUMB y NOTCH en este tipo de cáncer, pero es necesario llevar a cabo análisis sobre la expresión específica de las isoformas de NUMB [96].

En contraste, existen algunas evidencias que sugieren el papel oncogénico de NUMB: en cáncer esofágico se ha visto que NUMB se sobre-expresa y esto tiene una relación con un mal pronóstico clínico [97]. De igual forma, en glioblastoma se ha visto que NUMB es un marcador de invasividad [98]. En cáncer de endometrio, también se ha reportado la sobre expresión de NUMB, particularmente la isoforma p72, que debido a la presencia de un PTB^L debería tener una localización membranal; sin embargo, se reporta una localización nuclear que pudiera ser un nuevo evento patogénico, no reportado anteriormente [99].

4.3 NUMB EN CaCU

Existen pocos reportes sobre la participación de NUMB en CaCU. Tomando la información disponible del Atlas de proteínas, éste reporta que la expresión de NUMB por inmunohistoquímica en tejido cervical sano es intensa en el componente escamoso y media en el glandular. En CaCU, la expresión va de moderada a intensa, tanto en el citoplasma como en la membrana de las células tumorales [100]. Chen y colaboradores en el 2009 reportaron que existe un aumento en la expresión de NUMB conforme avanza la lesión a cáncer invasor, con mayor presencia de las isoformas PRR^L [101]. Finalmente, Cai y colaboradores en el 2017, obtienen un resultado similar en donde las isoformas PRR^L son las que se expresan en mayor proporción en tumores cervicales, sin embargo, la expresión de estas isoformas tuvo correlación con la expresión de genes blancos de la vía Notch como son Hes1 y Hey2, dejando de manifiesto el comportamiento opuesto de las

isoformas de NUMB; ya que las isoformas largas de NUMB pueden contribuir a la activación de NOTCH y no así las isoformas cortas [102].

JUSTIFICACIÓN

El cáncer cervicouterino continúa siendo un problema de salud pública en México y en otros países en vías de desarrollo. Además de la infección persistente por VPH-AR, existen otros factores asociados al desarrollo de CaCu; entre ellos, la desregulación de la vía de señalización Notch, cuyo papel continúa siendo controversial en el establecimiento y desarrollo de este tipo de cáncer. Por ello, determinar la posible asociación de NICD y su regulador negativo NUMB en lesiones precursoras y CaCu, permitirá aclarar la participación de esta vía en la carcinogénesis cervical, así como su posible valor pronóstico.

HIPÓTESIS

La pérdida de la expresión de la proteína NOTCH1 por la presencia de su regulador negativo NUMB se asociará al desarrollo de CaCu.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la asociación de la expresión de las proteínas NOTCH1 y NUMB con el desarrollo de CaCu.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Caracterizar la expresión y localización del dominio activo de NOTCH1 (NICD1) y NUMB en muestras de pacientes con lesiones premalignas y CaCu.
2. Determinar la correlación entre la expresión y localización de las proteínas NICD1 y NUMB.
3. Establecer la asociación entre la expresión de las proteínas NICD1 y NUMB con el desarrollo de CaCu.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CLASIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Se realizó un estudio observacional retrospectivo de tipo transversal de cohorte [103].

2. SELECCIÓN DE CASOS Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Se incluyeron 144 pacientes del Instituto Nacional de Cancerología atendidos en el departamento de ginecología en el periodo de 2004 a 2017 y que cumplieran con los siguientes criterios: vírgenes a tratamiento y no estar embarazadas; no se incluyeron en el estudio pacientes con otra neoplasia agregada y se eliminaron los casos en los que no se contara con material biológico suficiente para el análisis. De estos casos se obtuvieron biopsias embebidas en parafina del departamento de patología del Instituto, de los cuales ya existe el consentimiento informado firmado por las pacientes.

Se llevó a cabo la consulta de expedientes clínicos para obtener los datos demográficos y clínico-patológicos de todas las pacientes. Aunado a lo anterior, se revisaron las laminillas teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) para determinar el área con mayor tejido neoplásico. Con lo anterior las muestras fueron agrupadas como premalignas (49 casos), incluidas 12 NICI, 17 NICII y 20 NICIII; y cáncer invasor del cérvix (95 casos) incluidos 11 adenocarcinomas y 84 cánceres escamosos.

3. INMUNOHISTOQUÍMICA

La inmunohistoquímica es una técnica de tinción basada en el uso de anticuerpos específicos, que se emplea para visualizar *in situ* la expresión de alguna proteína.

En este caso, se empleó esta técnica para determinar la expresión y localización de las proteínas NOTCH1 (NICD) y NUMB en lesiones premalignas y CaCU.

De los bloques de parafina, se realizaron cortes secuenciales de 3 μm . Para desparafinar, las laminillas se colocaron en estufa a 60 °C durante 1 hr, y posteriormente, se pasaron por xilol para eliminar totalmente la parafina. El tejido fue re-hidratado en concentraciones decrecientes de alcohol (96°, 80°, 70°). La recuperación de antígenos se realizó en una vaporera de uso doméstico, hirviendo el tejido durante 30 minutos en buffer de citrato de sodio (0.1 mol/L pH=6). Posteriormente, se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena del tejido, con el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) contenido en el kit DakoCytomation EnVision+® System-HRP (DAB). Finalmente, se realizó un lavado con PBS (pH=7.4) y se incubaron con los diferentes anticuerpos primarios, a la concentración que se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Concentración de anticuerpos utilizada para la técnica de inmunohistoquímica.

Anticuerpo y marca	Concentración
NOTCH1 (NICD) (Millipore, Merck, New Jersey, USA. 07-1231)	1:50
Anti-Numb (pan-isoform) (Santa Cruz Biotechnology Inc. Dallas, Texas. sc-15590)	1:30
NOTCH1 C-20 (Santa Cruz Biotechnology Inc. Dallas, Texas, sc-6014)	1:50

Las muestras con los anticuerpos primarios fueron incubadas toda la noche a 4° C en cámara húmeda. Pasado este tiempo se realizó un lavado con PBS y se agregó el anticuerpo secundario incluido en el mismo kit; y éste se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente.

El revelado se realizó con 3'.3'-diaminobencidina (DAB) también incluidos en el kit. Las laminillas se contrastaron con hematoxilina de Harris (Merck, Alemania), se lavaron en agua corriente y deshidrataron en concentraciones decrecientes de alcohol (70°, 80°, 96° y xilol). Las muestras se montaron con medio Entellan® (Merck, Alemania). Como control positivo fue incluido tejido cervical sano y el anticuerpo primario fue reemplazado por PBS como control negativo.

Para demostrar que el anticuerpo de NICD1 empleado a lo largo de todas las tinciones inmunohistoquímicas fuera específico, se llevó a cabo la validación de la tinción en un grupo de 10 muestras representativas, para lo que se realizó la tinción con el anticuerpo NOTCH1 de la marca Millipore (y que fue empleado para todas las muestras) y el anticuerpo NOTCH1 de Santa Cruz. De las 10 muestras analizadas, 9 coincidieron en el resultado con ambos anticuerpos, lo que denota que el anticuerpo elegido es confiable para llevar a cabo el análisis inmunohistoquímico. En la figura 9 se muestra la imagen representativa de lo anteriormente descrito.

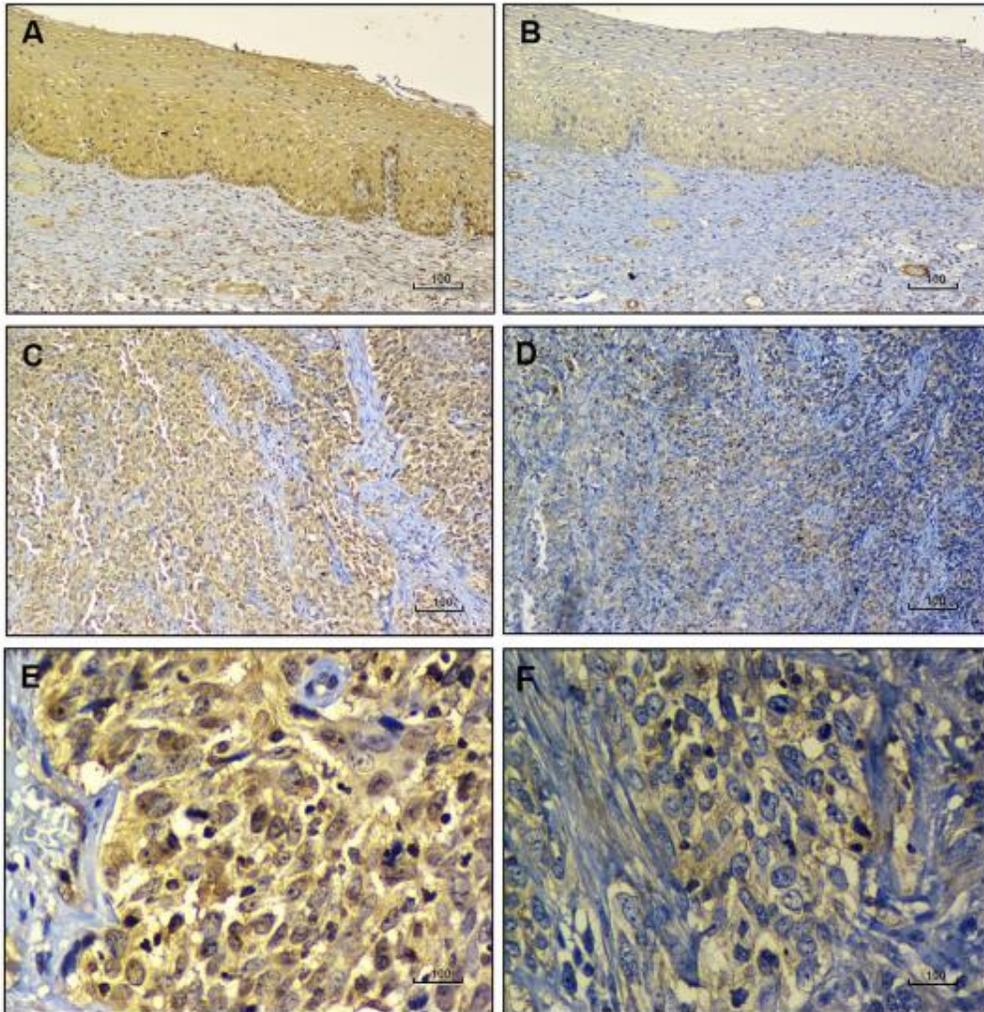


Figura 9. Comparación de la tinción con diferentes anticuerpos para NOTCH1. Tinción positiva empleando el anticuerpo NOTCH1 C-20 de Santa Cruz Biotechnology (A, C y E). Tinción positiva con el anticuerpo NOTCH1 Millipore (B, D y F).

3.1 EVALUACIÓN DE LA TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA

La tinción inmunohistoquímica fue evaluada por dos patólogos expertos del Instituto Nacional de Cancerología. Se empleó un microscopio óptico (Nikon ECLIPSE E200 con objetivos 10X y 40X). La intensidad de la tinción fue definida como débil (incluidas + y ++) cuando la reacción fuera visible solo a un aumento de 40X; e intensa (+++) cuando la tinción fuera observable usando el objetivo 10X. La localización subcelular de la tinción se determinó como membranal, citoplásmica, nuclear o combinación de las anteriores.

4. CULTIVO CELULAR

Por otro lado, en este trabajo se emplearon las líneas celulares: HEK 293 (células epiteliales fetales de riñón humano); Hela (adenocarcinoma de cérvix, positivas a VPH-18), Caski (carcinoma de cérvix positiva para VPH-16) y C33A (carcinoma de cérvix sin VPH). Estas líneas celulares se crecieron en medio de cultivo (DMEM GIBCO), suplementado con 10% de Suero Bovino Fetal (SBF, GIBCO). Se mantuvieron en una atmósfera húmeda al 5% de CO₂ y a una temperatura de 37°C.

5. EXTRACCIÓN DE ARN Y ENSAYOS DE EXPRESIÓN

Para evaluar la expresión génica de *Notch1* y *NUMB* en líneas derivadas de CaCU, se llevó a cabo la extracción de ARN con ayuda del kit RNeasy mini kit (Quiagen). Los restos de DNA fueron eliminados empleando DNasa libre de RNasa (Ambion). La concentración de ARN se determinó con nanodrop (Thermo Fisher Scientific). 2 µg de ARN fueron reverso transcritos a cADN, usando oligonucleótidos al azar con el sistema de síntesis para RT-PCR Superscript (Invitrogene Life Technologies). Posteriormente el cADN se amplificó con los oligonucleótidos específicos para cada transcrito (Tabla 2).

Tabla 2. Oligonucleótidos para evaluar la expresión de *Notch1* y *NUMB*.

Blanco	Oligonucleótido	Referencia
<i>Notch1</i>	5'CAACATCCAGGACAACATGG3' 3'TTGTTAGCCCCTTCTTCAG5'	Mittal <i>et al.</i> (2009) [104]
<i>NUMB</i>	5'AGGAATGCACATCTGTGAAG3' 3'CTCAGAGGGAGTACGTCTAT5'	Karaczyn <i>et al.</i> (2010) [86]

6. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS Y WESTERN BLOT

Para evaluar la expresión de las proteínas NOTCH1 (NICD) y NUMB se realizaron ensayos de Western blot con proteínas extraídas de líneas celulares y muestras de pacientes, con anticuerpos específicos. Para esto, las células se crecieron en cajas de 75 cm², hasta alcanzar una confluencia aproximada del 90%. Posteriormente, las células se lavaron con PBS y la monocapa se despegó de manera mecánica con gendarme.

La obtención de las proteínas totales se realizó en un buffer de lisis RIPA (3mM tris pH 8, 50 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40) con 10% de inhibidores de proteasas (Proteasa inhibitor Cocktail, SIGMA). Los lisados celulares se pasaron 10 veces por una jeringa de insulina y se dejaron incubar por 30 minutos en hielo. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 10 000xg, durante 10 min. a 4°C. El sobrenadante fue recuperado y almacenado a -20°C hasta ser utilizado.

Con respecto a los tejidos, las proteínas totales se obtuvieron de tejidos congelados en buffer de almacenamiento (RNAlater, Thermo Fisher Scientific). El tejido fue disgregado con un homogeneizador en buffer de lisis RIPA. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 10 000xg, durante 10 min. a 4°C. y se conservó el sobrenadante que fue almacenado a -20°C hasta ser utilizados.

La cuantificación de proteínas se realizó por el método de ácido Bicinconínico (Bicinchonilic Acid solution/ Copper(II) sulfate solution, Sigma-Aldrich), en el cual la unión entre Cu^{2+} y los grupos amino presentes en las proteínas resulta en una coloración púrpura que correlaciona con la concentración de proteínas presentes en la muestra. La absorbancia se midió en espectrofotómetro a una longitud de onda de 560 nm.

Las proteínas se separaron en geles de acrilamida-SDS a una concentración del 10% y se electro-transfirieron (60 min a 200 mA) a membranas de nylon-nitrocelulosa (Hybond-C Amersham, LIFE Science). Posteriormente se bloquearon los sitios no específicos libres de la membrana con 10% de leche. Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios específicos para cada proteína durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados de 15 minutos con TBS-tween. Las muestras se incubaron con los anticuerpos secundarios por 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron de la misma manera que los primarios. Los anticuerpos y las concentraciones empleadas de cada uno de ellos se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Anticuerpos utilizada para la técnica de Western blot

Anticuerpo y marca	Concentración	Secundario	Concentración
Anti-NOTCH1, NOTCH Intracellular Domain (NICD) (Millipore).	2: 1000	Conejo	1:10 000
Anti-Numb (pan-isoform) (Upstate).	1:1000	Conejo	1:10 000

Para la detección del complejo antígeno-anticuerpo, se empleó una reacción de quimioluminiscencia (Amersham, LIFE Science). La membrana, previamente incubada con el anticuerpo secundario, se incubó por 1 min con luminol y la emisión de luz se detectó, exponiendo la membrana a placas de rayos X (Hyper film ECL, Amersham, LIFE Science).

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La diferencia en las distribuciones entre grupos, así como la expresión inmunohistoquímica de NOTCH1 (NICD) y NUMB, se determinó mediante la prueba estadística de ji-cuadrado (χ^2) con un Intervalo de Confianza de 95% (IC=95%) y un valor de alpha de 0.05 ($\alpha=0.05$). La correlación en la expresión de ambas proteínas fue determinada mediante el coeficiente de *Pearson*. La asociación de la expresión de NOTCH1 y NUMB con cáncer, se determinó mediante un análisis multivariado, empleando el criterio de información Akaike (AIC) para evaluar la bondad del ajuste. Finalmente, el efecto de la expresión de NOTCH1 en la supervivencia de las pacientes se evaluó mediante el método de Kaplan-Meier. Para los análisis se empleó el software R (R Project for Statistical Computing, Wien).

8. ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO

Se utilizó el software libre ImageJ para llevar a cabo el análisis densitométrico de los resultados de los Western blots. Brevemente, se seleccionó una de las bandas del Blot y se analizó la densidad óptica por área, y esto se repitió por cada una de las bandas. Los resultados se normalizaron con respecto al control de carga (GAPDH).

RESULTADOS

1. 1. EXPRESIÓN DE NOTCH1 Y NUMB EN LÍNEAS CELULARES DE CaCU

La participación de la vía de señalización Notch en la carcinogénesis cervical, continua siendo controversial. Más aun, poco se ha estudiado a la proteína NUMB en el contexto de CaCU. Por lo anterior, se evaluó la expresión tanto génica como proteica de *Notch1*, NICD1 (porción activa del receptor NOTCH1) y su regulador NUMB, en líneas celulares derivadas de CaCU y en la línea control HEK 293 (Figura 10 y 11).

La expresión génica de *Notch1* y *NUMB* se muestra en la Figura 10. Se observa que todas las líneas celulares expresan el gen *Notch1*, siendo aparentemente C33A la que lo expresa menos (Figura 10.A). Para el caso de NUMB, es evidente la expresión de varias isoformas; con los oligonucleótidos empleados para la amplificación del transcrito, los productos esperados son los siguientes[86]:

- NUMB1 de 1,159 pb
- NUMB2 de 1,015 pb
- NUMB3 de 1,126 pb
- NUMB4 de 982 pb
- NUMB5 de 688 pb
- NUMB6 de 721 pb

Dado el número de pb de cada isoforma, las bandas se encuentran muy cercanas una a la otra y se observan como dobletes. Todas las líneas celulares claramente expresan la isoforma NUMB4 (982 pb). En el caso de las líneas C33A y Caski, éstas muestran una banda alrededor de las 1000 pb que corresponde a NUMB2. Las isoformas NUMB5 y NUMB6 que por longitud deberían de separarse notoriamente, no fueron detectadas (Figura 10.B).

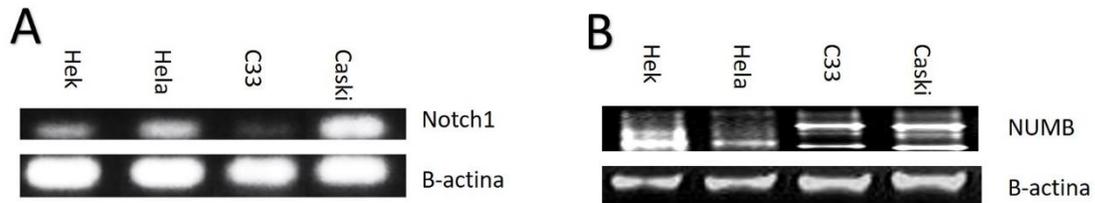


Figura 10. Expresión génica de *Notch1* y *NUMB* en líneas de CaCU. A) RT-PCR de la expresión de *Notch1*. B) RT-PCR de la expresión de las diferentes isoformas de *NUMB*.

A continuación se analizó la expresión de la proteína NICD y fue evidente que todas las líneas la expresan, siendo en la línea celular Caski en donde se tiene la mayor presencia; similar a lo sucedido con la proteína NUMB (Figura 11.A). Nótese que en el caso de NUMB se observan dos bandas intensas entre los pesos moleculares de 75 a 65 kDa y una tercera banda inferior, alrededor de los 50 kDa, en la línea Caski. Lo anterior sugiere la expresión de las isoformas de NUMB 5 y 6, las cuales no han sido anteriormente descritas en líneas de CaCU [86]. Como es evidente en el análisis densitométrico (Figura 11.B), en ninguno de los casos hay una menor expresión de NICD1 con respecto a NUMB.

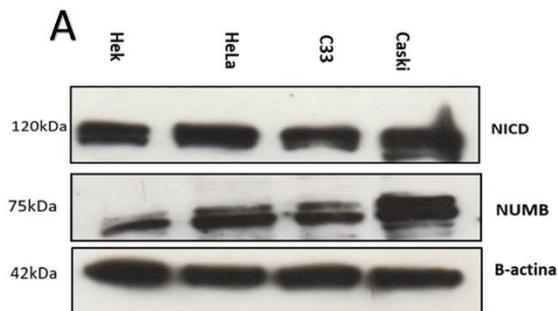


Figura 11. Expresión de las proteínas NICD1 y NUMB en líneas de CaCU. A) Western blot que muestra la expresión proteica de NICD y NUMB, se observan varias bandas correspondientes a las diferentes isoformas de NUMB.

2. 2. CARACTERIZACIÓN DE LAS PACIENTES

Para determinar si existía alguna diferencia en la expresión de NOTCH1 y su inhibidor NUMB, durante la evolución del CaCU, en el presente trabajo se llevó a cabo el análisis de la expresión inmunohistoquímica de las proteínas NICD1 y NUMB en muestras de pacientes con lesiones precursoras y CaCU. En la tabla 4 se muestran las características de las 144 pacientes incluidas, de las cuales 49 presentaron alguna lesión precursora (NIC1 a 3) y 95 CaCU.

La edad de las pacientes fue agrupada como menores o mayores de 30 años y esta característica presentó diferencia estadística entre los grupos de NIC y CaCU, con un 97.8 % de mujeres mayores de 30 años en el grupo de cáncer, contra el 69.39% en el grupo de NIC ($p = <0.001$). El índice de masa corporal también mostró diferencias entre ambos grupos, con un mayor porcentaje de casos de obesidad en el grupo premaligno. A su vez, el uso de anticonceptivos hormonales, un importante factor de riesgo para la carcinogénesis cervical, también reveló diferencia entre grupos siendo las mujeres del grupo premaligno las que más consumían anticonceptivos (58.62% vs 32.50%, $p=0.05$). En el caso del tipo viral, no se encontró diferencia entre ambos grupos, y los tipos 16 y 18 (VPH-AR) fueron los más prevalentes en la población estudiada.

Tabla 4. Características clínicas y demográficas de pacientes con NIC y CaCU (n=144) atendidas en el Instituto Nacional de Cancerología en el periodo de 2004 a 2017

Variable	NIC (n=49)		CaCU (n=95)		Valor de p
	n	(%)	N	(%)	
Edad					
<30	15	(30.61%)	2	(2.11%)	<0.001
≥30	34	(69.39%)	93	(97.89%)	
Tabaquismo^a					
Fumadoras	5	(10.20%)	11	(11.57%)	1.00
No fumadoras	44	(89.80%)	84	(88.43%)	
Alcoholismo^b					
Positivo	0	(0.00%)	4	(4.21%)	0.36
Negativo	49	(100%)	91	(95.79%)	
Índice de masa corporal, kg/m²					
Normal (18.5-24.9)	4	(15.38%)	31	(39.24%)	0.01
Sobrepeso (25-29.9)	7	(26.92%)	27	(34.18%)	
Obesidad (≥30)	15	(57.70%)	21	(26.58%)	
Desconocido ^c	23		16		
Uso de anticonceptivos hormonales					
Si	17	(58.62%)	13	(32.50%)	0.05
No	12	(41.38%)	27	(67.50%)	
Desconocido ^c	20		55		
Número de parejas sexuales					
1	16	(38.10%)	22	(64.71%)	0.61
≥2	26	(61.90%)	12	(35.29%)	
Desconocido ^c	7		61		
Virus del Papiloma Humano (VPH)					
16	12	(63.15%)	48	(51.06%)	0.49
18	3	(15.80%)	14	(14.90%)	
Otros ^d	4	(21.05%)	32	(34.04%)	
Desconocido ^c	30		1		

^a El tabaquismo fue considerado como consumo de tabaco durante el periodo de vida. ^b El consumo de alcohol fue considerado como positivo cuando se consumía alcohol al menos una vez por semana. ^c Datos no contenidos en el expediente clínico y que no fueron considerados en las comparaciones. ^d En otros tipos de VPH se incluyen: 6, 11, 31, 43, 42, 45 y 58. Se muestra resultado en negro los datos estadísticamente significativos.

3. 3. EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA NICD1 EN PACIENTES CON NIC Y CaCU

La expresión y localización de NICD1 se muestra en la tabla 5. El grupo de lesiones precursoras presenta una mayor expresión de NICD1 comparado con el de CaCU, ya que el 22.45% de las lesiones premalignas tuvieron una tinción intensa, mientras que en cáncer solo el 3.16% fue intensa ($p=0.001$). Lo anterior sugiere que existe una disminución en la expresión de NICD1 en CaCU, sin embargo, no se pierde totalmente la expresión de esta proteína, ya que solo el 27.37% de los casos son negativos. En el caso del tejido de cérvix normal, las células basales presentaron tinción intensa y moderada a lo largo de todo el epitelio cervical. Se muestran imágenes representativas de la intensidad de la tinción de NICD1 (Figura 12).

Tabla 5. Expresión y localización de la proteína NOTCH1 (NICD) en muestras de pacientes con NIC y CaCU (n= 144) atendidas en el Instituto Nacional de Cancerología en el periodo de 2004 a 2017.

Variable	NIC (n=49)		CaCU (n=95)		Valor de <i>p</i>
	n	(%)	n	(%)	
Intensidad^a					
Negativa	10	(20.41%)	26	(27.37%)	0.001
Débil	28	(57.14%)	66	(69.47%)	
Intensa	11	(22.45%)	3	(3.16%)	
Localización					
Negativa	10	(20.41%)	26	(27.37%)	<0.001
Citoplasma	0	(0.00%)	42	(44.21%)	
Núcleo	38	(77.55%)	15	(15.79%)	
Cito/nuc	1	(2.04%)	12	(12.63%)	

^a La intensidad fue definida como débil (incluidas + y ++ e intensa a aquella con tinción +++). Se muestra resaltado en negro los datos estadísticamente significativos.

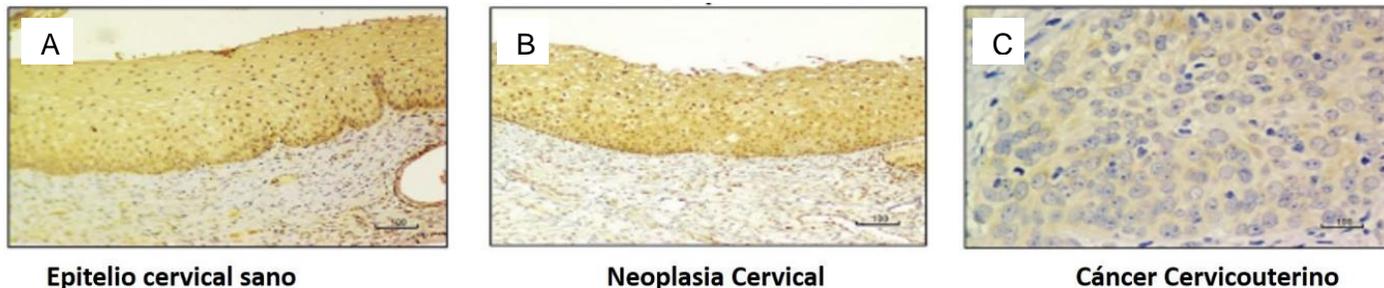


Figura 12. Expresión de NICD1 en lesiones precursoras y CaCU. A) Epitelio cervical sano que muestra tinción intensa en las células basales (+++) y moderada (++) en los estratos parabasales (10X). B) Caso representativo de NIC con una expresión moderada a lo largo del epitelio (10X). C) Muestra representativa de CaCU que presenta una tinción débil (40X).

Con respecto a la localización subcelular de NICD1 (tabla 5), es sobresaliente el hecho de que en lesiones premalignas, prácticamente todos los casos positivos presentan a la proteína en el núcleo (77.55%), lo que sugiere que la vía Notch se encuentra activa. En cambio, en CaCU solo el 15.79% de los casos son positivos para NICD1 en el núcleo (Figura 13), con un importante aumento en el citoplasma (44.21%). La diferencia entre ambos grupos es estadísticamente significativa ($p < 0.001$). Aunado al resultado de intensidad, la pérdida de la localización nuclear de NICD, sugiere que esta vía podría estar inactiva en una alta proporción de los tumores cervicales.

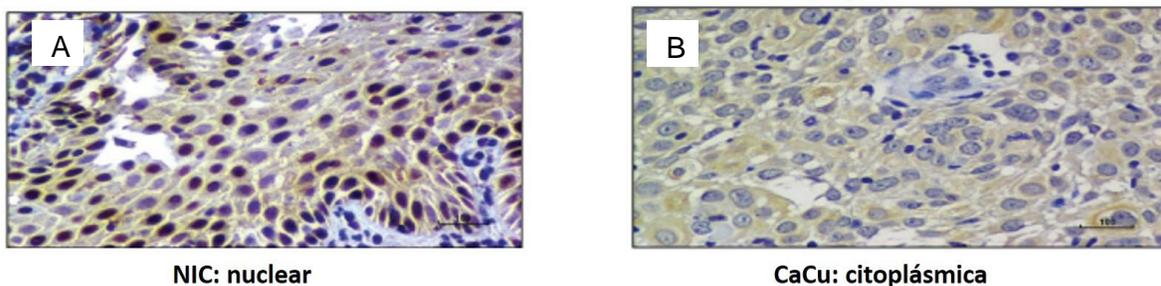


Figura 13. Localización de NICD1 en lesiones precursoras y CaCU. A) NIC en donde se observa una intensa tinción nuclear (40X). B) Tumor en donde se aprecia una débil tinción citoplásmica (40X).

Con la finalidad de corroborar los resultados obtenidos por la técnica de inmunohistoquímica para la expresión de NICD1; de una muestra representativa de tumores, se llevó a cabo la extracción de proteínas y se evaluó la expresión de ésta por la técnica de Western blot. Se obtuvo una concordancia entre ambas técnicas (Figura 14). Como se puede observar en el Western blot y el análisis densitométrico de éste (Figura 14.A y B), el tumor número 1 fue el de mayor expresión proteica lo que corresponde al tejido que presentó una tinción intensa (Figura 14. C). En el caso de la muestra número 8, la cual no presento expresión de NICD, el tejido también fue negativo a la tinción de esta proteína. Los resultados anteriores confirman que la evaluación inmunohistoquímica de NICD1 es similar a la obtenida por la tecnica de Western blot.

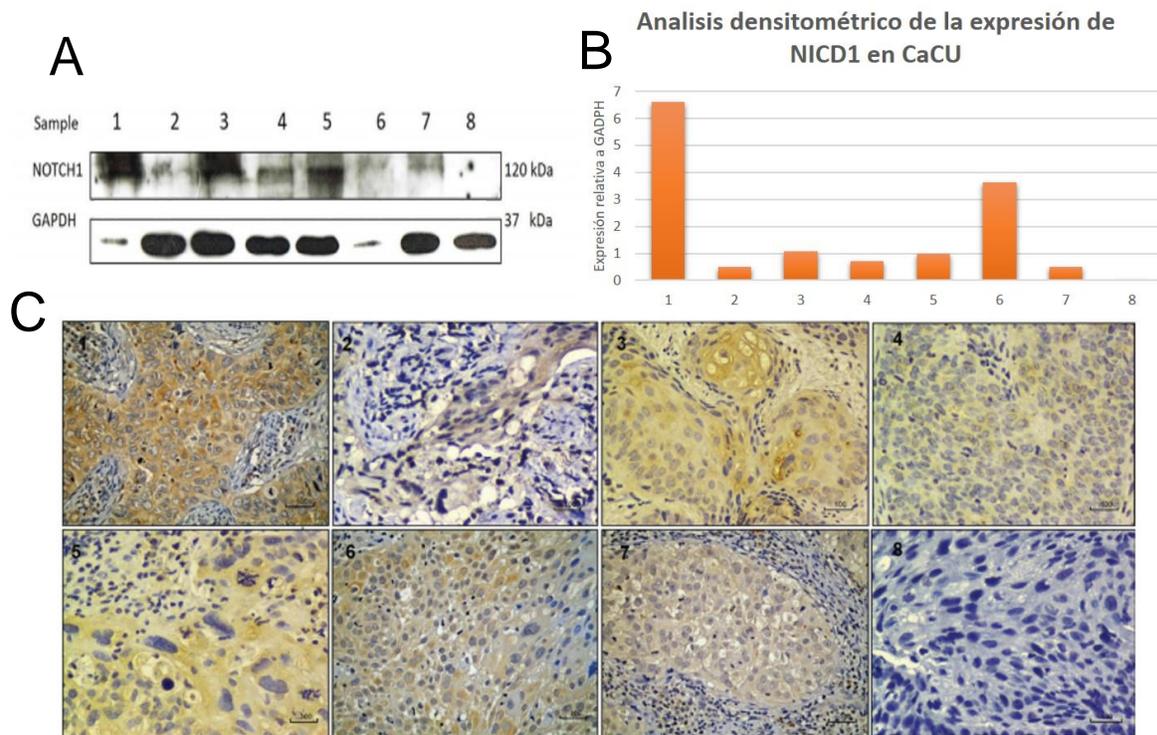


Figura 14. Determinación de la expresión de la proteína NICD1, mediante ensayos de Western blot e inmunohistoquímica en tumores del cuello uterino. A) Western blot que muestra la expresión de NICD1 en 8 tumores derivados del cérvix B) Análisis densitométrico de la expresión proteica. La expresión fue normalizada con respecto al control (GAPDH) expresado en unidades arbitrarias. C) Tinción inmunohistoquímica de 8 tumores derivados del cérvix en donde se muestra

una tinción intensa (1), una moderada (6) y cinco casos leves (2,3,4,5 y 7) así como un caso negativo (8).

4. EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA NUMB EN PACIENTES CON NIC Y CaCU

Una vez conocida la expresión y localización de la porción activa del receptor NOTCH1, se evaluaron también estos aspectos de la proteína NUMB, regulador negativo de la vía. En la tabla 6, se puede observar que hubo un aumento en la expresión de esta proteína en los casos de CaCU comparado con los de NIC, tanto en la frecuencia de positividad como en la intensidad de la expresión, ya que en NIC no hubo casos con una tinción intensa, mientras que en CaCU el 6.31% de los casos presentaban esta tinción y esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p=0.014$). En la figura 15, se muestran imágenes representativas de la intensidad de la expresión de NUMB, en tejido cervical sano la tinción fue intensa tanto en el epitelio escamoso como glandular (Figura 15.A).

Tabla 6. Expresión y localización de la proteína NUMB en muestras de pacientes con NIC y CaCU (n=144) atendidas en el Instituto Nacional de Cancerología en el periodo de 2004 a 2017

Variable	NIC (n=49)		CaCU (n=95)		Valor de <i>p</i>
	N	(%)	N	(%)	
Intensidad^a					
Negativa	32	(65.31%)	40	(42.11%)	0.014
Leve	17	(34.69%)	49	(51.58%)	
Intensa	0	(0.00%)	6	(6.31%)	
Localización					
Negativa	32	(65.31%)	40	(42.11%)	<0.001
Membrana	0	(0.00%)	2	(2.10%)	
Citoplasma	1	(2.04%)	34	(35.79%)	
Núcleo	16	(32.65%)	6	(6.32%)	
Mem/cito	0	(0.00%)	8	(8.42%)	
Cito/nuc	0	(0.00%)	5	(5.26%)	

^a La intensidad fue definida como débil incluidas + y ++ e intensa a aquella tinción +++. Se muestra resaltado en negro los datos estadísticamente significativos.



Figura 15. Expresión de la proteína NUMB en lesiones precursoras y CaCU. A) Epitelio cervical sano que muestra tinción intensa (+++) del epitelio cervical y glandular (10X). B) NIC que muestra expresión leve a lo largo del epitelio (10X). C) CaCU que muestra una tinción intensa (40X).

En la mayoría de los casos positivos a NUMB del grupo de NIC, esta proteína se localizó en el núcleo (32.65%), con una importante disminución de esta localización en los casos de CaCU (6.32%); en donde la proteína fue encontrada principalmente en el citoplasma celular (35.79%, $p = <0.001$) (Figura 16). Además, cabe señalar que una baja proporción de casos de CaCU presentaron tinción membranal (2.10% en

membrana y 8.42% en la combinación de membrana y citoplasma). Por el anticuerpo aquí empleado (panNUMB), el cual va dirigido al extremo C-terminal, no nos es posible discernir entre las isoformas presentes.

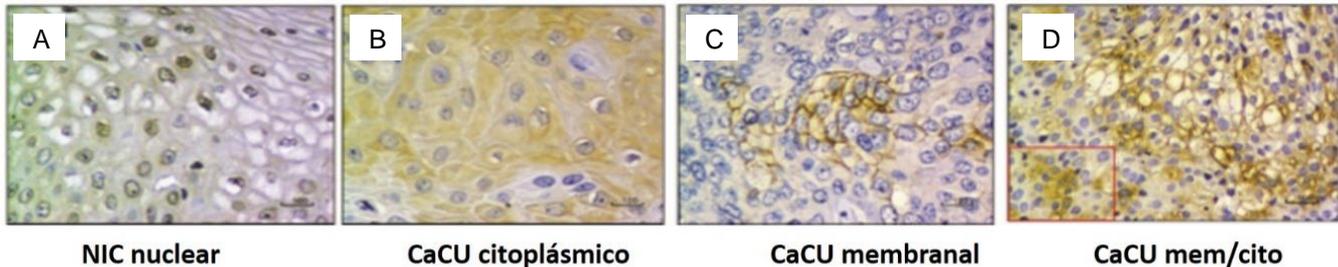


Figura 16. Localización de NUMB en lesiones precursoras y CaCU. A) Caso representativo de NIC, en donde se observa una tinción nuclear moderada (40X). B) Tumor que muestra una tinción moderada en el citoplásmica (40X). C) Tinción de membrana intensa (40X). D) Combinación de la localización membranal y citoplásmica (en el recuadro rojo).

5. RELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE NICD1 Y NUMB

Para determinar si existe alguna relación entre la expresión y la localización de NICD1 y NUMB, se llevó a cabo un análisis de las posibles combinaciones de estos parámetros (Tabla 7). En las lesiones precursoras, la condición más frecuente fue que NICD1 fuera positivo y NUMB negativo (44.90%), seguido por la combinación en que ambas proteínas son positivas (34.69%). Mientras tanto en CaCU, las condiciones predominantes fueron que ambas proteínas tuvieron tinción positiva (46.32%), así como que NICD1 fue positivo y NUMB negativo (26.32%). La diferencia entre ambos grupos fue estadísticamente significativa ($p=0.014$).

La presencia nuclear de NUMB no se asocia a degradación de NICD1 y como se puede observar en la tabla 7, en el 32.65% de los casos de NIC, ambas proteínas se encuentran en el núcleo y solo un caso en donde NICD1 fue nuclear y NUMB citoplásmico. En cambio, en CaCU hay una disminución en los casos en donde

ambas proteínas se encuentran en el núcleo con solo el 6.32% de los casos y se hace manifiesta la condición donde ambas proteínas se encuentran citoplásmicas con el 30.52% ($p=0.001$). Cabe aclarar que para el análisis de la localización, se reagruparon las localizaciones de la proteína NUMB, ya que la tinción membranal y la combinación membrana/citoplasma se consideraron citoplásmicas.

Adicional a lo anterior, se evaluó la correlación en la distribución de NICD1 y NUMB en cortes histológicos seriales. Para esto, el porcentaje de tejido tumoral positivo a cada una de las dos proteínas fue determinado y la correlación entre ambas fue evaluada. Como se puede observar en la Figura 18.A, en el caso de los NICs no existe una correlación entre la expresión de ambas proteínas ($r=0.23$, $p=0.116$). Sin embargo, en el caso de los tumores de cérvix, existe una correlación marginalmente positiva ($r=0.31$) y estadísticamente significativa ($p=0.003$) entre el porcentaje de tejido tumoral que expresa a ambas proteínas (Figura 18.B).

Tabla 7. Relación en la expresión y localización de las proteínas NICD1 y NUMB en pacientes con NIC y CaCU (n=144) atendidas en el Instituto Nacional de Cancerología en el periodo de 2004 a 2017

Variable	NIC (n=49)		CaCU (n=95)		Valor de <i>p</i>
	n	(%)	n	(%)	
Expresión proteica					
NOTCH1 negativo y NUMB negativo	10	(20.41%)	15	(15.79%)	0.014
NOTCH1 negativo y NUMB positivo	0	(0.00%)	11	(11.58%)	
NOTCH1 positivo y NUMB positivo	17	(34.69%)	44	(46.32%)	
NOTCH1 positivo y NUMB negativo	22	(44.90%)	25	(26.32%)	
Localización proteica *					
Negativas	32	(65.30%)	51	(53.68%)	<0.001
NOTCH1 nuclear y NUMB nuclear	16	(32.65%)	6	(6.32%)	
NOTCH1 nuclear y NUMB citoplásmico	1	(2.05%)	5	(5.28%)	
NOTCH1 citoplásmico y NUMB nuclear	0	(0.00%)	4	(4.20%)	
NOTCH1 citoplásmico y NUMB citoplásmico	0	(0.00%)	29	(30.52%)	

Para el análisis de la localización, se tomaron en cuenta solo aquellos casos que fueron positivos a ambas proteínas. Se muestra resaltado en negro los datos estadísticamente significativos.

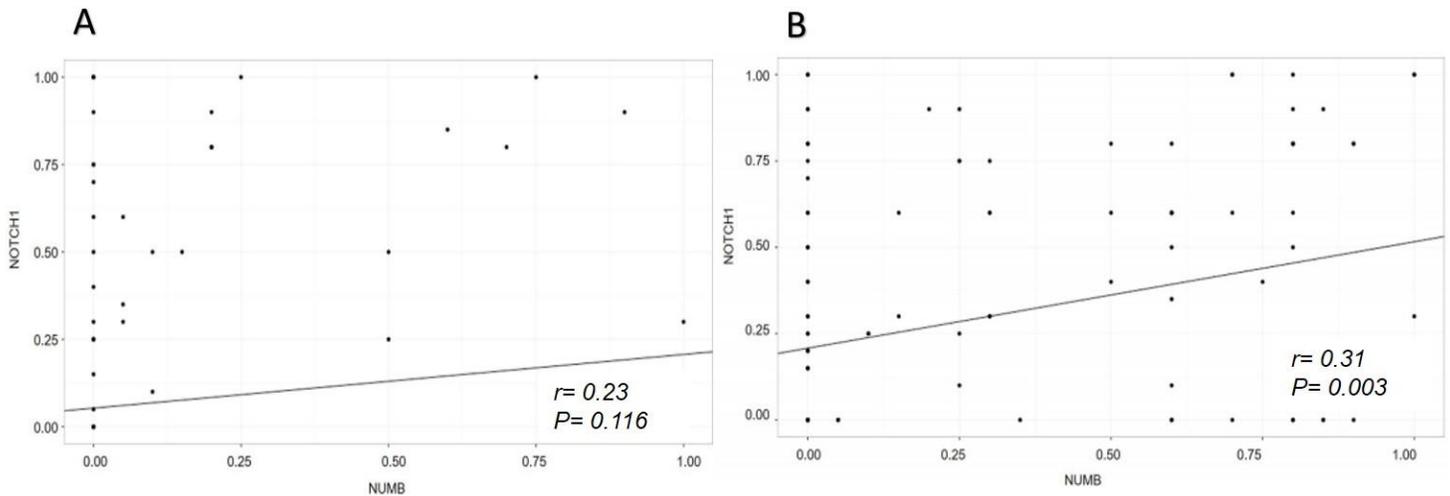


Figura 17. Correlación del porcentaje de tejido positivo a la expresión de NICD1 y NUMB. A) Lesiones precursoras. B) Casos de CaCU.

6. ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE NICD1 CON MALIGNIDAD

A continuación se determinó la asociación de la expresión nuclear de NICD1 con la malignidad. Se tomó en consideración solo la expresión nuclear, ya que esta sugiere una activación de la vía [86]. Se llevó a cabo un análisis de sensibilidad incluyendo como confusores la de edad de las pacientes, uso de anticonceptivos hormonales y la expresión citoplásmica de NUMB. Esta última fue seleccionada ya que es a nivel citoplásmico donde se espera pueda llevar a cabo la regulación negativa sobre NOTCH1 [59, 71].

En la tabla 8 se muestra el resultado del análisis multivariado: para el caso de la expresión nuclear de NICD, éste tiene una asociación negativa y estadísticamente significativa con la malignidad ($\beta = -2.836$, $p = 0.001$). Esta asociación negativa se mantiene cuando se toma en consideración la edad ($\beta = -3.122$, $p = 0.001$) y el uso de anticonceptivos ($\beta = -3.790$, $p = 0.001$). Cuando se toma en consideración la expresión citoplásmica de NUMB como variable, aumenta la asociación negativa de NICD1 nuclear con la condición de malignidad ($\beta = -3.428$, $p = 0.001$). Lo anterior

apunta a que en CaCU se pierde la expresión nuclear de NOTCH1 y que éste es un factor predictor de malignidad independiente de NUMB.

7. ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE NUMB CON MALIGNIDAD

También se evaluó la asociación de la expresión citoplásmica de NUMB con la malignidad (Tabla 9). En el análisis univariado, la presencia de NUMB en el citoplasma celular estuvo asociada de manera positiva con la malignidad ($\beta= 3.286$, $p=0.001$). La asociación se mantuvo en el análisis bivariado considerando la edad ($\beta=3.487$, $p= 0.001$) y en también cuando se incluyó el uso de anticonceptivos ($\beta=2.946$, $p=0.007$). Sin embargo, cuando se consideró la expresión nuclear de NICD1, la asociación de NUMB citoplásmico con la malignidad perdió la significancia ($\beta = 2.074$, $p =0.094$), sugiriendo que la participación de NUMB en el citoplasma celular es dependiente de NOTCH1.

Tabla 8. Análisis de sensibilidad sobre la asociación de la expresión nuclear de NICD1 con la malignidad en pacientes con CaCu (n=95) atendidas en el Instituto Nacional de Cancerología en el periodo de 2004 a 2017

	Univariado			Bivariado			Multivariable 1			Multivariable 2		
	β	95% CI	<i>p</i>	β	95% CI	<i>p</i>	β	95% CI	<i>p</i>	β	95% CI	<i>p</i>
NOTCH1^a	-2.836	(-3.694, -1.978)	0.001	-3.122	(-4.180, -2.063)	0.001	-3.790	(-5.459, -2.120)	0.001	-3.428	(-5.127, -1.728)	0.001
Edad				0.099	(0.055, 0.142)	0.001	0.088	(0.013, 0.162)	0.022	0.092	(0.015, 0.168)	0.018
Uso de anticonceptivos							-1.300	(0.209, -2.809)	0.091	0.973	(-0.595, 2.541)	0.223
NUMB^b										2.074	(-0.358, 4.506)	0.094
AIC		136.47			109.5			56.374			54.72	

^a Expresión nuclear de NICD1. ^b Expresión citoplásmica de NUMB. AIC: Criterio de Información de Akaike. Se muestra resaltado en negro los datos estadísticamente significativos.

Tabla 9. Análisis de sensibilidad sobre la asociación de la expresión citoplásmica de NUMB con la malignidad en pacientes con CaCu (n=95) atendidas en el Instituto Nacional de Cancerología en el periodo de 2004 a 2017

	Univariado			Bivariado			Multivariable 1			Multivariable 2		
	β	95% CI	<i>p</i>	β	95% CI	<i>p</i>	β	95% CI	<i>p</i>	β	95% CI	<i>p</i>
NUMB^a	3.286	(5.310, 1.262)	0.001	3.487	(5.548, 1.427)	0.001	2.946	(0.809, 5.082)	0.007	2.074	(-0.358, 4.506)	0.094
Edad				0.091	(0.129, 0.054)	0.001	0.072	(-0.024, 0.076)	0.005	0.092	(0.015, 0.168)	0.018
Uso de anticonceptivos							-0.844	(-2.027, 0.339)	0.162	-0.973	(-2.541, 0.595)	0.223
NOTCH1^b										-3.428	(-5.127, -1.728)	0.001
AIC	162.63			128.77			75.546			54.722		

^a Expresión citoplásmica de NUMB. ^b Expresión nuclear de NICD1. AIC: Criterio de Información de Akaike. Se muestra resaltado en negro los datos estadísticamente significativos.

8. EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE NOTCH1 CON EL PRONÓSTICO CLÍNICO

Finalmente y conociendo que la expresión de NOTCH1 (NICD1) tiene una asociación negativa con el CaCU y no así Numb cuya participación en la malignidad es dependiente de NOTCH, se evaluó cuál es el efecto de NOTCH1 en la supervivencia de las pacientes. En la figura 19 se muestra la curva de tipo Kaplan-Meier, en donde aquellas pacientes que expresaron a NICD1 en el citoplasma tuvieron una supervivencia mayor en comparación con aquellas que expresaron a la proteína en el núcleo. Sin embargo la asociación no fue estadísticamente significativa ($p=0.08$).

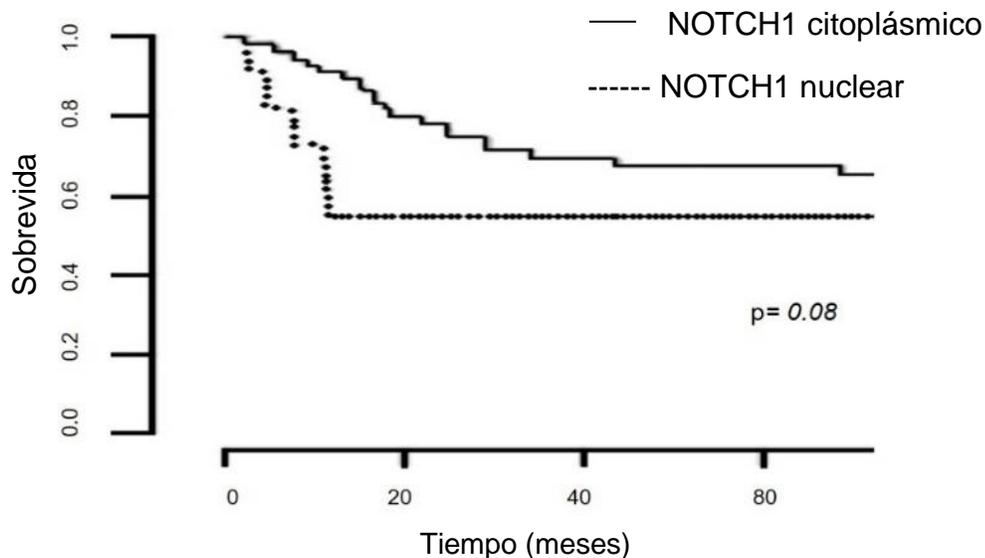


Figura 18. Localización de NOTCH1 y supervivencia de pacientes con CaCU. Se evaluó la supervivencia de pacientes con CaCU ($n=95$) atendidas en el Instituto Nacional de Cancerología en el periodo de 2004 a 2017, con respecto a la localización de NOTCH1 (citoplasma o núcleo).

DISCUSIÓN

El CaCU continúa siendo un problema de salud pública en México, en donde pese a los esfuerzos de diagnóstico temprano y a los programas públicos de vacunación comenzados en el año 2012, aún estamos lejos de una cobertura total y existen poblaciones adultas no beneficiadas con la vacuna [20]. Además, se espera que sea hasta dentro de 30 años que se observen los beneficios de los programas de vacunación, cuando las niñas inmunizadas alcancen la edad de mayor incidencia del CaCU, que es entre los 40-50 años [20, 105]. Por lo anterior, resulta importante identificar factores que aunados a la infección por VPH participen en el desarrollo del CaCU.

La participación de la vía de señalización Notch en la evolución del CaCU es controversial y hasta la fecha no se ha podido determinar su papel como oncogeno o supresor en ese contexto [65, 67]. Por ello, en el presente trabajo se evaluó, tanto la expresión como la localización de NOTCH1 y su regulador negativo, la proteína NUMB. Se encontró que líneas celulares derivadas de CaCU expresan el transcrito y la proteína NOTCH1, además de varias isoformas de NUMB, que pudieron ser observadas por western blot. Por otro lado, en muestras de pacientes, la proteína NOTCH1 activa (NICD1) disminuyó en CaCU comparado con las lesiones precursoras; además de que no se encontró en el núcleo de las células tumorales. En contraste, los casos de CaCU tuvieron mayor expresión de NUMB con una localización mayoritariamente citoplásmica, comparado con los casos de NICs, en donde esta proteína se encontraba en el núcleo. Los análisis de sensibilidad permitieron determinar que la expresión nuclear de NICD1 tiene una asociación negativa con la malignidad, pero no así NUMB, la cual mostró que su expresión citoplásmica tiene una asociación positiva con la malignidad y depende de NOTCH1. Por lo tanto, nuestros resultados proponen que la pérdida nuclear de NOTCH1 es un predictor independiente de malignidad en CaCU.

La población incluida en el presente estudio fue dividida en dos grupos de edades, siendo los 30 años el punto de corte. Tal como era de esperarse, hubo más mujeres mayores de los 30 años en el grupo de cáncer, en comparación con las pacientes con lesiones precursoras (97.89% en CaCU vs 69.39% en NIC). Cabe mencionar que en el año 2012, la incidencia de CaCU en México fue de 1123 nuevos casos en las edades comprendidas de los 15 a los 29 años; en contraste, el grupo de edades de 30 a 34 años presentó una incidencia de 1200 casos en el mismo periodo de tiempo [20]. De esta manera, nuestra población de estudio se comporta según las estadísticas nacionales.

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), una tercera parte de las muertes por cáncer se deben a alguno de los cinco factores de riesgo relacionados con hábitos de vida y la dieta, estos son: alto índice de masa corporal, una dieta pobre en frutas y vegetales, sedentarismo, consumo de alcohol y tabaco [106]. Algunos de los aspectos anteriormente mencionados se revisaron en nuestra cohorte de estudio y se encontró que no existe diferencia entre los grupos de NIC y cáncer con respecto al consumo de tabaco o alcohol ($p=1.00$ y $p=0.36$ respectivamente). Resulta interesante el hecho de que del total de las 144 mujeres estudiadas, solo 16 fueran fumadoras (11.11%) y 4 (2.77%) consumían alcohol, ya que según la Encuesta Nacional de Consumo de Drogas, Alcohol y Tabaco (ENCODAT) 2016-2017, el consumo de alcohol se ha duplicado en la población femenina con respecto a datos del año 2011 [107]; mientras que en el caso del tabaco, se estima que el 8.7% del total de las mujeres mexicanas son fumadoras [108]. En relación al tabaquismo, nuestra población pareciera comportarse según lo esperado; sin embargo, es bajo el número de mujeres que contestaron de manera positiva al consumo de alcohol, lo que pudiera deberse a una cuestión cultural donde se estigmatiza el consumo de alcohol y el comportamiento sexual que fueron datos que también se preguntaron a las pacientes. Sería recomendable llevar a cabo la recolección de datos de las historias clínicas en una modalidad de auto-llenado, ya que se ha visto que los pacientes están más dispuestos a contestar cuando escriben ellos mismos la información en lugar de ser entrevistados [109].

El índice de masa corporal es otro factor de riesgo para el desarrollo no solo de cáncer, sino también de otras enfermedades como diabetes, hipertensión arterial, enfermedades cardiovasculares, entre otras [110]. De las pacientes estudiadas, 57.70% de las mujeres del grupo de lesiones precursoras fueron obesas en comparación con el 26.58% de las mujeres con cáncer. Esta disminución en el número de mujeres obesas en el grupo de cáncer puede ser un reflejo del deterioro por la enfermedad e inclusive una manifestación del estrés por un diagnóstico de este tipo.

Aunado a los factores de riesgo anteriormente mencionados, el factor etiológico para el desarrollo de CaCU, es la infección persistente con algún VPH-AR [13, 111]. Al ser ésta una infección de transmisión sexual, son también co-factores de riesgo aquellos aspectos relacionados al comportamiento sexual como lo son, inicio temprano de la vida sexual, elevado número de parejas sexuales, alto número de partos, uso de anticonceptivos hormonales y co-infecciones con otros agentes biológicos como el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), *Chlamydia trachomatis* o Herpes virus [13, 112]. Contrario a lo que se esperaba, en la población estudiada el número de parejas sexuales y el uso de anticonceptivos hormonales no presentaron diferencia entre los grupos (NIC vs CaCU). Cabe señalar que en muchos de los expedientes no se contaba con la información completa y, por ser este un estudio retrospectivo, no fue posible recabar la información faltante. Además, como ya se había mencionado, pudiera ser que los datos con los que se contaba en la historia clínica, no fueron del todo ciertos por que las pacientes no contestaron honestamente a las preguntas relacionadas con su vida sexual.

De los VPH clasificados como de alto riesgo, los tipos VPH16 y VPH18 son responsables de alrededor del 70% de los casos de cánceres escamosos, mientras que en conjunto con el VPH45, causan el 94.2% de adenocarcinomas [105]. Liu y colaboradores, en el 2017, reportan que el tercer VPH más común es el tipo VPH58 para la población mundial [18]; sin embargo, según datos de la población mexicana los VPH33 y VPH31 se encuentran entre los de mayor incidencia, variando según se trate de una lesión precursora o CaCU [20]. De los tejidos obtenidos para el

presente estudio, una porción fue empleada para la tipificación viral, con lo que se determinaron los tipos virales del grupo de mujeres estudiadas. Los VPH16 y VPH18 fueron los de mayor incidencia, sin diferencia entre ambos grupos. Cabe señalar que dentro de los otros tipos virales detectados también estaban incluidos virus de bajo riesgo como lo son los tipos VHP6 y VPH11.

Desde los años 90's se ha estudiado la participación de NOTCH en la carcinogénesis cervical [75] y desde entonces se han llevado a cabo diferentes trabajos en donde se ha evaluado la expresión de NOTCH1 en líneas derivadas de CaCU. Talora *et al* (2002) analizó la expresión de NOTCH1 y 2 en queratinocitos de diferente origen y en una serie de líneas de CaCU, reportando que la línea celular Hela no presenta expresión del transcrito ni de la proteína, y en el caso de las células Caski, éstas presentan niveles apenas detectables [77]. Esto difiere de lo aquí encontrado, ya que como se muestra en la figura 10, las tres líneas cervicales estudiadas (Hela, C33A y Caski) expresan al transcrito Notch1 y en el caso de los niveles de la proteína (figura 11), en las células Caski se encontró la mayor abundancia. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Sun *et al* en 2015, que al estudiar líneas derivadas de CaCU, encontraron que la proteína NOTCH1 se expresa en niveles similares en Hela y C33A, mientras que en las células Caski eran mayores los niveles de NOTCH1 [113]. Es de notar que los dos trabajos citados emplearon el mismo anticuerpo: Notch C-20 de la marca Santa Cruz Biotechnology, el cual va dirigido al extremo C-terminal del receptor y que, por lo tanto, detecta tanto el receptor completo como NICD. En ninguno de los dos trabajos se aclara si se está reportando el receptor completo (de 300 kDa) o NICD (120 kDa). En el caso del Western blot aquí presentado, el anticuerpo usado va dirigido específicamente a NICD. Quizá la discrepancia en los resultados se deba a que se están reportando diferentes péptidos (completo y cortado). Además se debe considerar que las condiciones del cultivo pueden cambiar los resultados.

La proteína NUMB ha sido vagamente estudiada en el contexto de CaCU. De los que se tiene conocimiento, son los trabajos de Chen *et al.* 2009 [101] y Rong *et al.* en 2017 [102], que en ninguno de los dos incluye el análisis de líneas celulares

derivadas de CaCU. Aquí se muestra que las líneas Hela, C33A y Caski expresan diferentes transcritos de NUMB (Figura 10), que corresponden a las cuatro isoformas típicamente descritas de NUMB (1-4). Aunque los oligonucleótidos empleados podrían amplificar isoformas adicionales, no se observaron bandas por debajo de las 900 pb. Con respecto a las isoformas y la abundancia de la proteína NUMB, se aprecian dos bandas en las tres líneas cervicales revisadas (Hela, C33A y Caski), una alrededor de los 75kDa y la segunda aproximadamente 10 kDa abajo (Figura 11), una tercera banda inferior se aprecia alrededor de 55 kDa en Caski, la cual pudiera corresponder a las isoformas 5 o 6 [86]. Esta tercera banda ha sido consistentemente observada en otros experimentos. Es necesario confirmar la expresión de estas isoformas en CaCU, ya que la función hasta ahora descrita para estas es de inducir la migración [86], por lo que su expresión en células transformadas podría favorecer la metástasis.

Hablando de la expresión de NOTCH1 (NICD1) y NUMB en las muestras de pacientes, como se puso de manifiesto en la tabla 5, la expresión de NICD1 se ve disminuida en las muestras de CaCU, ya que hay un menor porcentaje de casos con tinción intensa (solo 3.16% de los tumores). Como ya se había mencionado anteriormente, se evaluó la expresión del fragmento NICD1, ya que éste es liberado tras la interacción entre el ligando y el receptor, translocándose al núcleo para activar a genes blancos (Figura 6) [49, 60]. Así, la presencia de NICD en el núcleo, sugiere que la vía se encuentra activa. En esta muestra, se encontró que solo el 28.42% de los casos de CaCU tuvieron una tinción nuclear comparado al 79.59% de los NICs. Además, en CaCU el NICD se encontraba preferentemente en el citoplasma (44.21%). Esto podría deberse a que el receptor está siendo activado, pero que el NICD es secuestrado en el citoplasma, por la proteína NUMB, ya que ésta se puede unir directamente a NOTCH1 [114].

Para corroborar los resultados de la técnica de inmunohistoquímica, se evaluó la expresión proteica por western blot en un grupo representativo de 8 tumores. Como se observa en la figura 14 la cantidad de proteína no fue la misma en cada caso, esto se observa en el control de carga (GAPDH), el cual no se encuentra equilibrado

entre muestras, y que podría ser un indicativo de degradación de proteínas por el tiempo de almacenaje de las muestras. Aun así, fue posible detectar a la proteína NICD1 y llevar a cabo la comparación entre técnicas con lo que se encontró que la evaluación inmunohistoquímica arroja resultados similares a los de western blot, pero con la bondad de conocer la localización de la proteína que además esto refleja la actividad de la misma [96].

Los resultados al momento sugieren que la vía de señalización Notch1 se encuentra inactiva en los casos de CaCU, ya que no se observa NICD en el núcleo de las células tumorales, y pareciera que la proteína se queda en el citoplasma. Para conocer si existe alguna relación con la proteína NUMB, se evaluó la expresión y localización de esta en NICs y CaCU (Tabla 6). La expresión de NUMB aumento en los casos de CaCU, en donde 6.31% tuvieron una tinción intensa y hubo una disminución del número de casos negativos del 65.31% que había en NICs a 42.11% en las muestras de CaCU. Ahora bien, la proteína se localiza principalmente en el núcleo de las lesiones precursoras y se relocaliza en el citoplasma de los tumores, similar a lo que sucede con NOTCH1. Lo anterior sugiere que existe alguna relación entre ambas proteínas, particularmente alguna regulación negativa de NUMB sobre NOTCH1, ya que el aumento en la expresión de NUMB se relacionó a una disminución en la expresión de NOTCH1 en los tumores del cérvix y la presencia de la proteína NUMB en el citoplasma coincide con la presencia de NOTCH1 en esta misma localización subcelular.

Con la finalidad de determinar una posible correlación en la expresión y localización de ambas proteínas, se llevaron a cabo dos análisis diferentes: en primer lugar se analizó la coexistencia de ambas proteínas, tanto en expresión como en localización; en segundo lugar se determinó la correlación de la presencia de ambas proteínas por áreas de tejido. El primer análisis (Tabla 7), muestra que en los casos de NIC la condición imperante fue que NOTCH1 fuera positivo cuando NUMB fue negativo (44.90%), esta condición disminuyó en los tumores a solo el 26.32%. En la misma línea de pensamiento, de una regulación negativa de NUMB sobre NOTCH1,

se observa que no existe ningún caso en donde NOTCH1 fuera negativo y NUMB positivo en NIC, mientras que el 11.58% cumplieron esta condición en CaCU. Lo anterior era de alguna manera lo esperado, ya que existen varios reportes de que la expresión de NUMB provoca la degradación proteosomal de NOTCH1 [59, 70, 78]. En contraste, existen algunos casos en donde ambas proteínas son positivas el 34.69% en NICs y el 46.32% en CaCU. Esto apunta a que una proporción de NOTCH1 no está siendo regulada por NUMB y esto se puede deber en parte a la localización de esta proteína, ya que las interacciones conocidas entre NUMB y NOTCH1 que modifican la vida media de este último, se dan a nivel tanto de membrana, como de citoplasma y hasta la fecha no existen reportes de alguna regulación a nivel nuclear [66, 80, 87, 99].

Al revisar la localización de ambas proteínas, para determinar una coexistencia en alguna área subcelular en particular, se reagrupó la localización de NUMB considerando la tinción membranal y la membrana/citoplásmica como tinción citoplásmica. Este análisis mostro que en el 32.65% de los casos positivos a ambas proteínas, estas residen en el núcleo de las lesiones premalignas y no así en el caso de CaCU, en donde el 30.52% de los casos dobles positivos, ambas proteínas están en el citoplasma. Apoyando los resultados anteriores, cuando se determinó la correlación en la expresión de ambas proteínas por área de tejido (Figura 18) se observó que en los NIC, no hay correlación positiva, lo que sugiere que aunque NICD1 y NUMB se encuentran en el núcleo (como ya se vio en la tabla 7) no se encuentran en las mismas células, ya que no coinciden (no existe correlación) en el área del tejido. En cambio, en CaCU existe una correlación positiva ($r=0.31$, $p=0.003$), que como ya sabíamos, muestra que ambas proteínas se localizan en el citoplasma y en la misma área de tejido de acuerdo a los análisis de correlación.

Los resultados anteriores dejan ver diversas cuestiones: 1) En los NICs, la vía de señalización Notch1 pudiera estar activa como lo sugiere la presencia del NICD en el núcleo y posiblemente no existe una regulación negativa de la misma por parte de NUMB; 2) en CaCU, se disminuye la actividad de la vía de Notch1, ya que NICD se localiza en el citoplasma coexistiendo con NUMB. 3) Existe una proporción de

tumores en donde pareciera que se pierde la regulación negativa de NUMB sobre NOTCH1.

Ahora bien, reportes previos han evaluado la actividad de la vía de NOTCH en CaCU con resultados similares. De los trabajos más recientes está el de *Tripathi, 2014* [115], quien muestra que en casos de cáncer cervical del tipo escamoso hay una reducción de la proteína NOTCH1, tanto en el núcleo como en el citoplasma; aunado a este trabajo está el de *Talora, 2002* con resultados similares [77]. De particular interés es lo analizado en el trabajo de *Tripathi 2014* con respecto a la relación de VPH y expresión de NOTCH1, muestra que las lesiones precursoras y tumores que fueron negativas a VPH16 presentaron expresión de NOTCH1, sugiriendo una asociación entre VPH16 y la degradación de NOTCH1 [115]. Esto quizá podría explicar una proporción de tejidos que se encontraron negativos a NOTCH1 y a NUMB, en donde la ausencia de NOTCH1 fuera un efecto mediado por VPH y no por NUMB. Evidencias sugieren que esta disminución en la expresión de NOTCH1 es mediada por la expresión E6 de VPH-AR [116]; sin embargo, lo anterior es una asociación epidemiológica que requiere confirmación experimental.

En el presente trabajo, la presencia citoplásmica de NUMB se asocia a una posible regulación negativa de NOTCH1 (Tabla 7). Lo anterior es importante, ya que el grueso de los reportes hablan de la actividad de NUMB en la membrana y el citoplasma celular, ya sea asociada a la regulación sobre NOTCH o independiente a esta, como lo es la de ser una proteína implicada en endocitosis [77], una proteína adaptadora para ligasas de ubiquitina [106] e inclusive un modulador de otras vías de señalización como lo son Hedgehog y p53 [71, 85]. Sin embargo, poco se sabe de la actividad de NUMB en el núcleo y como ya se demostró, una buena proporción de casos de NICs cumplen con esta característica (Tabla 6 y 7). Algunos reportes sugieren la presencia de NUMB en el núcleo debido a forforilaciones de esta, con una concomitante translocación de p53 al núcleo quien acarrea a NUMB. Así pues, es posible que en las muestras de NICs donde NUMB se encuentra preferentemente nuclear, sea porque aún no hay una marcada degradación de p53 por parte de E6, condición que cambia tras la transformación. Es importante mencionar, que la

presente muestra de pacientes ha sido previamente empleada para estudiar la expresión de p53, PTEN y hDlg [107] y que se contempla como perspectiva de trabajo evaluar la relación entre estas proteínas y la vía de Notch, particularmente la posible participación de hDlg (proteína PDZ que es degradada por E6 de VPH-AR) con la localización de NUMB.

Como parte final del presente trabajo, se evaluó la asociación de NOTCH1 y NUMB con la malignidad a través de un análisis de sensibilidad (Tablas 8 y 9). Como ya se mencionó, en el caso de la expresión nuclear de NOTCH1, esta tuvo una asociación negativa con la malignidad, es decir concuerda con lo observado en cuanto a su expresión y localización. Pero lo que es más importante, es que esta asociación se mantiene cuando se consideran las variables de edad, uso de anticonceptivos y la expresión citoplásmica de NUMB ($\beta = -3.428$, $p = 0.001$), lo cual se traduce en que la expresión de NOTCH1 es un factor predictor de malignidad independiente de la expresión de NUMB. Así pues, NOTCH1 podría ser empleado como marcador biológico de malignidad y posiblemente de pronóstico clínico, ya que como se muestra en la figura 19, aquellas pacientes con una expresión nuclear mostraron una tendencia a tener una sobrevida menor, sin embargo se requiere aumentar la muestra para poder alcanzar diferencia estadística. El uso de NOTCH como un factor pronóstico ya ha sido evaluado en cáncer de pulmón, en donde se vio que la alta expresión de NOTCH1 es un factor independiente de mal pronóstico clínico; sin embargo, este tiene diferente impacto si se trata de un cáncer escamoso o un adenocarcinoma [117]. En este trabajo los casos de CaCU no fueron divididos según su tipo histológico debido al bajo número de adenocarcinomas presentes en la muestra (11 adenocarcinomas del total de 95 casos de CaCU), pero sería importante aumentar la muestra y explorar si existen diferencias debido al tipo histológico.

Por último, con respecto a la asociación de NUMB con la malignidad, esta presentó una asociación positiva, aun cuando se incluyeron en el análisis las variables de edad y uso de anticonceptivos hormonales ($\beta = 2.946$, $p = 0.007$); pero se perdió la significancia estadística cuando se consideró la expresión nuclear de NICD1 en el

análisis. Lo anterior sugiere que la asociación de NUMB con la malignidad es dependiente de NOTCH1, lo que le resta su poder como posible marcador biológico de malignidad. Además, deja entre ver una regulación recíproca entre NOTCH1 y NUMB y no solo de NUMB hacia NOTCH1. En este sentido, el grupo de Urban Lendahl, demostró que la actividad de NUMB es dependiente de la concentración de NOTCH; ya que a baja expresión de NOTCH1, NUMB promueve su degradación; sin embargo, a altas concentraciones de esta proteína, NOTCH promueve la degradación proteosomal de NUMB, por un mecanismo aun no descrito [118].

Es importante resaltar que una variable que no fue considerada en el presente análisis fue la de las isoformas de NUMB, debido a que el anticuerpo empleado no permitía discernir entre isoformas, además de ser un objetivo más allá de los alcances del presente estudio. Sin embargo, sería importante profundizar en este hecho, ya que las funciones de NUMB, difieren según las isoformas: aquellas con PTB^L se localizan en la membrana plasmática, mientras que las PTB^S preferencialmente en el citoplasma [82]. Se ha visto que el splicing alternativo de NUMB es regulado en respuesta a diferentes oncogenes [93] y esto es importante ya que las isoformas interactúan con diferentes blancos. Por citar un ejemplo, está el caso de las isoformas PTB^L que se ha demostrado que son aquellas que pueden promover la estabilización de p53 al interactuar con la ligasa Mdm2, así pues en cáncer de mama se ha visto que existe una disminución en la expresión de las isoformas NUMB 1 y 2 (PTB^L) [119]. Las evidencias anteriores nos permiten pensar que el cambio en la localización de NUMB reportado en esta muestra, pudiera ser provocada por un cambio en la expresión de las isoformas, sin embargo, esto requiere mayor investigación.

Los resultados aquí presentados sugieren la pérdida de la actividad de NOTCH1, lo que apunta a un papel de supresor tumoral en CaCU; por ello será importante evaluar la expresión de genes blancos de esta vía para poder determinar que efectivamente se encuentra inactiva. Por lo anterior, se propone que la pérdida nuclear de NOTCH1 es un predictor independiente de malignidad, título del artículo científico producto de la presente investigación y el cual se muestra en el Anexo I.

CONCLUSIONES

- Existe una menor expresión de NOTCH1 en los casos de CaCu comparado con las lesiones precursoras.
- En las muestras de CaCU hay un aumento en la expresión de NUMB comparado con los casos de NICs.
- Se observó una correlación en cuanto a la presencia de NUMB y la disminución de NOTCH1 en los casos de CaCU.
- Solo una proporción de NOTCH1 podría estar siendo regulada por la expresión de NUMB.
- La traslocación nuclear de NOTCH1 tiene una asociación negativa con el CaCu.
- La asociación de NUMB con la malignidad es dependiente de NOTCH1.
- **La pérdida nuclear de NOTCH1 es un predictor independiente de malignidad.**

PERSPECTIVAS

Una vez determinada la pérdida de la presencia nuclear de NOTCH1 en los casos de CaCU y que la regulación de esta proteína pudiera ser independiente de NUMB en la carcinogénesis cervical, resulta importante identificar qué otras proteínas pudieran estar regulando la actividad de NOTCH1. Además, ya se cuenta con la información de la expresión y localización de la proteína hDIg en la misma muestra de pacientes, y esta pareciera que coexiste con NOTCH1 en el núcleo celular. Por lo que se propone evaluar la participación de la proteína hDIg, la cual es un conocido blanco de degradación de los VPH-AR, en la vía de señalización Notch en CaCU.

ANEXO 1

Loss of nuclear NOTCH1, but not its negative regulator NUMB, is an independent predictor of cervical malignancy

Elenaé Vázquez-Ulloa¹, Ana Clara Ramos-Cruz², Didier Prada^{2,3}, Alejandro Avilés-Salas⁴, Alma Delia Chávez-Blanco², Luis A. Herrera^{2,5}, Marcela Lizano^{2,5} and Adriana Contreras-Paredes²

¹Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Mexico City, México

²Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología-Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, México

³Departamento de Informática Biomédica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, México

⁴Departamento de Patología Quirúrgica, Instituto Nacional de Cancerología, Mexico City, México

⁵Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, México

Correspondence to: Adriana Contreras-Paredes, email: adycon@yahoo.com.mx
Marcela Lizano, email: lizano@unam.mx

Keywords: cervical cancer; cervical intraepithelial neoplasia; NOTCH1; NUMB; immunostaining

Received: June 20, 2017

Accepted: February 24, 2018

Published: April 10, 2018

Copyright: Vázquez-Ulloa et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 [CC BY 3.0], which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

The participation of NOTCH signaling in invasive cervical cancer (ICC) remains controversial since both tumor suppressive and oncogenic properties have been described. Additionally, the role of NUMB, a negative regulator of NOTCH, remains unclear in ICC. We aimed to investigate the role of NOTCH1 and NUMB expression and their localization in cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and ICC samples. A total of 144 biopsies were obtained from the Instituto Nacional de Cancerología, México from 2004 to 2017, and were subjected to immunohistochemistry for NOTCH1 and NUMB. We found that nuclear NOTCH1 expression was more frequently found in CIN samples compared with ICC (77.55% vs. 15.79%, $p = 0.001$). NUMB was almost exclusively found in the nucleus of CIN samples (32.65% vs. 6.32%, $p = 0.001$). Cytoplasmic expression of NOTCH1 (44.21%) and NUMB (35.79%) was the most frequent localization in ICC. Multivariable-adjusted analysis showed that the loss of nuclear NOTCH1 expression was an independent predictor of malignancy ($\beta = -3.428$, 95% confidence interval [95% CI] = $-5.127, -1.728$, $p = 0.001$). In contrast, the association between cytoplasmic NUMB expression and cervical cancer was lost after adjusting for nuclear NOTCH1 expression ($\beta = 2.074$, 95% [CI] = $-0.358, 4.506$, $P = 0.094$). Additionally, patients with cytoplasmic NOTCH1 expression showed a borderline association with longer overall survival (OS) than those with nuclear NOTCH1 expression ($P = 0.08$). Our data suggest that the loss of nuclear NOTCH1 but not NUMB might be an independent predictor of malignancy in cervical cancer.

INTRODUCTION

Invasive cervical cancer (ICC) is the fourth most common malignancy among women worldwide, with an

estimated 528,000 new cases and 266,000 deaths in 2012 and with 87% of cervical cancer deaths occurring in less developed regions [1]. Among Mexican women, ICC is the second most common neoplasia, just after breast

cancer [2]. Infection with human papillomaviruses (HPVs) has been well documented as the main etiological factor for ICC since the viral genome is present in practically all cervical cancer tumors [3]. To date, 13 HPV genotypes have been defined as carcinogenic or high-risk (HR) viral types for cervical cancer [4]. The HPV viral oncoproteins E5, E6 and E7 can disrupt several host signaling pathways; for example, E6 can deregulate p53 and PDZ proteins and enhance the activation of cellular pathways such as PI3K, Wnt and Notch [5].

The Notch pathway is a highly conserved signaling system that plays a key role in cell differentiation, survival and proliferation [6]. In the canonical Notch pathway, a transmembrane Notch receptor (NOTCH 1–4) interacts with Delta-Serrate-Lag-type (Dll1, Dll3, Dll4, Jagged1 or Jagged2) ligands. This interaction triggers the sequential proteolytic cleavage of the Notch receptor, releasing the intracellular domain (NICD), which translocates to the nucleus and activates the transcription of target genes, including *Hes1*, *Hes5*, *Hey1*, *Cyclin D1* and *Myc* [7–9].

The participation of Notch signaling in cervical cancer remains controversial since both tumor suppressive [10–12] and oncogenic properties [13, 14] have been described. Talora *et al.* (2002) showed a lack of NOTCH1 expression in ICC samples and in cervical cell lines [11]. In contrast, Zagouras *et al.* (1995) and Yousif *et al.* (2015) found an increase in NOTCH1 expression throughout cervical cancer progression [14, 15]. Moreover, Jagged-1 and Delta-1 ligands have been reported as overexpressed in ICC and in cervical adenocarcinoma [16].

Several reports have suggested that NUMB is a negative regulator of NOTCH1 signaling [7–9]. The interaction of NUMB with NOTCH1 may result in increased NOTCH1 ubiquitination [17]. NUMB may also act as a scaffold for the E3 ligases Itch and Suppressor of Deltex Su(Dx) [7, 18, 19] and cooperates with α -adaptin (part of the endocytic AP2 complex), thereby promoting NOTCH1 endocytosis [8, 20]. In breast cancer, NUMB has been defined as a tumor suppressor protein [21–23]; nevertheless, its role in ICC is not clear. Chen *et al.* (2009) reported NUMB overexpression in cervical malignant lesions compared with normal epithelia, suggesting a role for NUMB in cervical cancer progression [24]. However, the relationship between NOTCH1 and NUMB in ICC is not clear.

To understand the role of NOTCH1 and its negative regulator NUMB in cervical cancer, we investigated the expression and localization of NOTCH1 and NUMB in samples from 144 patients with cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and ICC obtained from the Instituto Nacional de Cancerología-México from 2004 to 2017 using immunohistochemistry and determined their role as predictors of malignancy in ICC.

RESULTS

Characteristics of patients

We recruited cases with available paraffin-embedded samples from women diagnosed with CIN or ICC at the Instituto Nacional de Cancerología, Mexico from April 2004 to January 2017. A total of 49 CIN and 95 ICC paraffin-embedded tissue samples and their clinical data were collected. The demographic and clinical characteristics of the patients are shown in Table 1. Most patients were older than 30 years old in both groups, corresponding to 69.39% in the CIN group and 97.89% in the ICC group ($P = 0.001$). Smoking (10.20% vs. 11.57%) and alcohol consumption (0.00% vs. 4.21%) were not different among groups. A higher frequency of obesity was observed in CIN patients than in ICC patients (57.70% vs. 26.58%, $P = 0.01$). Additionally, hormone contraception usage was more common in the CIN group (58.62%) than in the ICC group (32.50%, $P = 0.01$). The number of previous sexual partners and the type of HPV were not different among groups. HPV types 16 and 18 were the most common in both groups (CIN vs. ICC: 63.15% vs. 51.06% for type 16; and 15.80% vs. 14.90% for type 18).

NOTCH1 and NUMB expression and localization in CIN and ICC

Normal cervical epithelium was used as positive control for NOTCH1 and NUMB expression in immunohistochemical analysis. Besides, confirmation of immunohistochemical results was done in a representative set of ICC samples with an alternative NOTCH1 antibody, obtaining 90% of concordance between antibodies, which confirms that the antibody used in this study is reliable (Supplementary Figure 1 and Supplementary Table 3). Accordingly to the protein Atlas database, the immunostaining of NOTCH1 in normal squamous cells is moderate with a homogenous distribution in the cell [25], similar to what we observed in normal epithelium (Figure 1A). Intense NOTCH1 expression was more frequently observed in CIN samples (22.45%) than in ICC samples (3.16%, $P = 0.001$) (Table 2 and Figure 1A). NOTCH1 nuclear staining was more frequently observed in CIN samples than in ICC samples (77.55% vs. 15.79%). Additionally, in ICC samples, NOTCH1 protein expression was mainly observed in the cytoplasm (44.21%), while no cytoplasmic case was observed in CIN ($P = 0.001$) (Table 2 and Figure 1B).

NOTCH1 protein expression was evaluated by Western Blot in eight representatives ICC cases (Figure 2A). The densitometric analysis showed that immunostaining intensity correlates with protein expression (Figure 2B). Relative NOTCH1 protein expression is higher in intense immunostained cases

Table 1: Demographic and clinical characteristics of patients (n = 144) with CIN and ICC treated at the Instituto Nacional de Cancerología-México from 2004 to 2017

Variable	CIN (n = 49)		ICC (n = 95)		P-value
	n	(%)	n	(%)	
Age					
<30	15	(30.61%)	2	(2.11%)	<0.001
≥30	34	(69.39%)	93	(97.89%)	
Smoking status^a					
Smokers	5	(10.20%)	11	(11.57%)	1.00
Non-smokers	44	(89.80%)	84	(88.43%)	
Alcohol consumption^b					
Positive	0	(0.00%)	4	(4.21%)	0.36
Negative	49	(100%)	91	(95.79%)	
Body mass index, kg/m²					
Normal (18.5–24.9)	4	(15.38%)	31	(39.24%)	0.01
Overweight (25–29.9)	7	(26.92%)	27	(34.18%)	
Obesity (≥30)	15	(57.70%)	21	(26.58%)	
Unknown ^c	23		16		
Hormone contraception usage					
Yes	17	(58.62)	13	(32.50%)	0.05
No	12	(41.38)	27	(67.50%)	
Unknown ^c	20		55		
Number of previous sexual partners					
1	16	(38.10%)	22	(64.71%)	0.61
≥2	26	(61.90%)	12	(35.29%)	
Unknown ^c	7		61		
Human Papillomavirus (HPV)					
16	12	(63.15%)	48	(51.06%)	0.49
18	3	(15.80%)	14	(14.90%)	
Others ^d	4	(21.05%)	32	(34.04%)	
Unknown ^c	30		1		

CIN: Cervical intraepithelial neoplasia. ICC: Invasive cervical cancer ^aSmoking was defined as any tobacco consumption during their lifetime. ^bAlcohol consumption was defined as any alcohol intake per week. ^cData not reported in the clinical files, and thus, this category was not included in the comparisons ^dOther HPV's include types 6, 11, 31, 43, 42, 45 and 58. Bold: statistically significant.

(samples 1 and 6), than in weak cases (samples 2, 3 and 4 and 7).

For the NUMB protein, the normal epithelium showed weak cytoplasmic immunoreactivity (Figure 3A). Negative NUMB protein expression was more frequently observed in CIN samples than in ICC samples (65.31% vs. 42.11%, $P = 0.014$). Additionally, observations of the highest intensity for NUMB

immunoreaction were more frequent in ICC than in CIN samples (0.00% in CIN vs. 6.31% in ICC) (Table 3 and Figure 3A). The NUMB protein, when present, was almost exclusively found in the nucleus in CIN samples (32.65% of nuclear NUMB in CIN vs. 2.04% of cytoplasmic NUMB), whereas in the ICC samples, its localization was heterogeneous, with a significant increase of NUMB expression in the cytoplasm (6.32%

of nuclear NUMB in ICC vs. 35.79% of cytoplasmic NUMB) (Table 3 and Figure 3B).

Relationship between NOTCH1 and NUMB expression

To determine if there was a relationship between the expression of NOTCH1 and NUMB (negative regulator of NOTCH1), we evaluated the expression, localization and positive tumoral area percentage of NOTCH1 and NUMB proteins in both CIN and ICC samples (Table 4). In CIN samples, the most frequent condition was NOTCH1-positive and NUMB-negative expression (44.90% vs. 26.32% for the same condition in ICC). In contrast, in ICC samples, the most frequent condition was NOTCH1-positive and NUMB-positive expression (34.69% in CIN vs. 46.32% in ICC). We also evaluated NOTCH1 and NUMB localization and we found that the most frequent combination was nuclear NOTCH1 and nuclear NUMB in CIN samples (75.51% vs. 16.84% in ICC). The most frequent condition observed in ICC samples was cytoplasmic NOTCH1 and nuclear NUMB (22.44% in CIN vs. 47.36% for the same condition in ICC). The distribution of frequencies for both expression and localization among the CIN and

ICC groups were statistically significant ($P = 0.014$ for expression; and $P = 0.001$ for localization) (Table 4). Additionally, we evaluated the correlation between the distribution of NOTCH1 and NUMB throughout serial histological sections and found to be statistically significant in ICC but not in CIN ($r = 0.226$, $P = 0.116$ in CIN vs. $r = 0.306$, $P = 0.002$ in ICC) (Supplementary Figures 2 and 3).

Association of NOTCH1 expression with malignancy status

Multivariable-adjusted analysis for the association between nuclear NOTCH1 expression and malignancy status showed a negative and significant association ($\beta = -2.836$, 95% CI = -3.694 , -1.978 , $P = 0.001$) (Table 5 and Supplementary Table 1). This association was consistent through sensitivity analyses, including age ($\beta = -3.122$, 95% CI = -4.180 , -2.063 , $P = 0.001$) and contraceptive consumption ($\beta = -3.790$, 95% CI = -5.459 , -2.120 , $P = 0.001$) as covariates (Supplementary Table 1). Moreover, the negative association of nuclear NOTCH1 with malignancy persisted even after adjustment for cytoplasmic NUMB expression ($\beta = -3.428$, 95% confidence interval [95% CI] = -5.127 , 1.728 , $P = 0.001$) (Table 5).

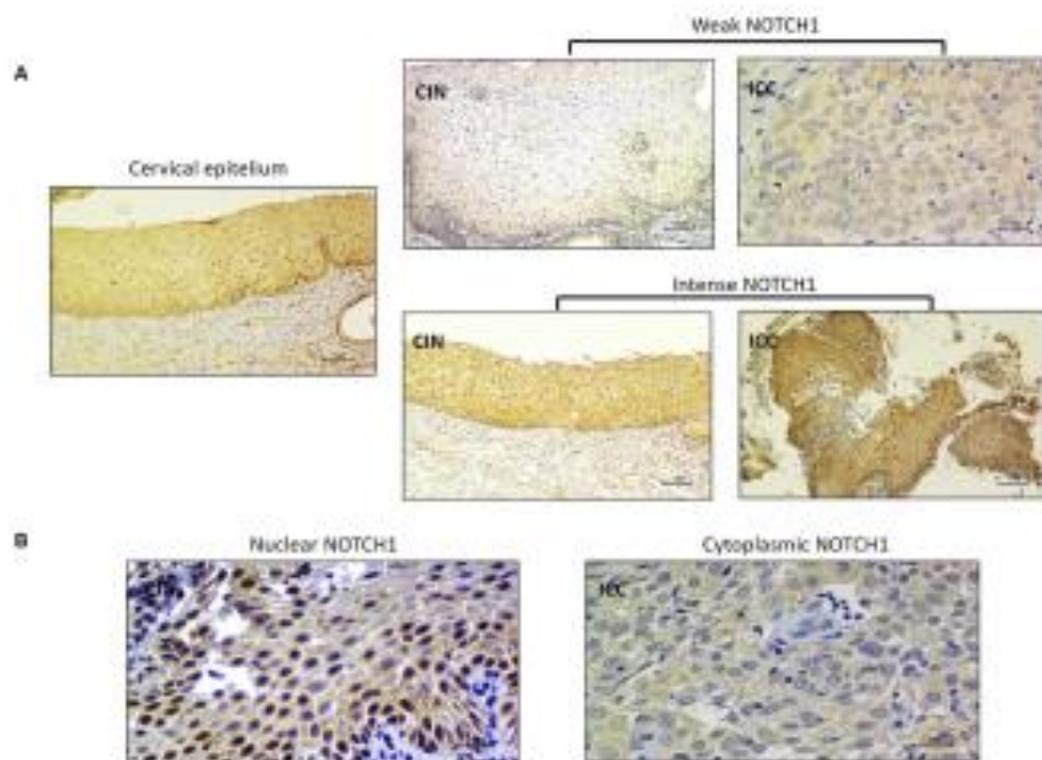


Figure 1: NOTCH1 immunostaining in CIN and ICC. (A) Comparison of NOTCH1 immunostaining intensity (weak vs. intense) in CIN and ICC samples. (B) NOTCH1 immunostaining localization in the cell nucleus (CIN) and cytoplasm (ICC).

Table 2: NOTCH1 protein expression intensity and cellular localization in samples of patients (n = 144) with CIN and ICC treated at the Instituto Nacional de Cancerología-Mexico from 2004 to 2017

	CIN (n = 49)		ICC (n = 95)		P-value
	n	(%)	n	(%)	
Intensity*					
Negative	10	(20.41%)	26	(27.37%)	0.001
Weak	28	(57.14%)	66	(69.47%)	
Intense	11	(22.45%)	3	(3.16%)	
Localization					
Negative	10	(20.41%)	26	(27.37%)	<0.001
Cytoplasm	0	(0.00%)	42	(44.21%)	
Nucleus	38	(77.55%)	15	(15.79%)	
Cyto/nuc ^b	1	(2.04%)	12	(12.63%)	

CIN: Cervical intraepithelial neoplasia. ICC: Invasive cervical cancer. *Intensity was categorized as weak = + and ++, and intense = +++ by immunohistochemistry. ^bPresence of the protein in the cytoplasm and nucleus. Bold: statistically significant.

Association of NUMB expression with ICC

We also explored the association between NUMB expression and malignancy status through sensitivity analyses (Table 6 and Supplementary Table 2). In the

univariable regression model, cytoplasmic NUMB expression was associated with cervical malignancy ($\beta = 3.28$, 95% CI = 5.310, 1.262, $P = 0.001$), and this association was persistent in the multivariable model adjusted by age ($\beta = 3.487$, 95% CI = 5.548, 1.427,

A



B

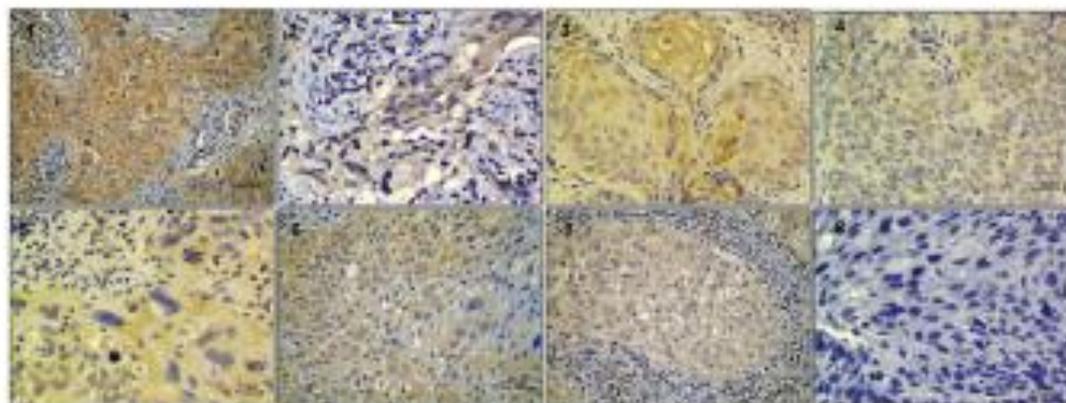


Figure 2: NOTCH1 protein expression and correlation with immunostaining in ICC. (A) NOTCH1 protein expression analyzed by Western Blot in a set of cervical tumors showing intense (lanes 1, 6), moderate (lanes 3 and 5) and weak (2, 4 and 7) expression as well as negative expression (lane 8). **(B)** Immunostaining of corresponding samples showing intense (images 1 and 6), moderate (images 3 and 5), weak (images 2, 4 and 7) and negative (image 8) immunostaining of NOTCH1.

Table 3: NUMB protein expression intensity and cellular localization in samples of patients (n = 144) with CIN and ICC treated at the Instituto Nacional de Cancerología-México from 2004 to 2017

	CIN (n = 49)		ICC (n = 49)		P-value
	n	(%)	n	(%)	
Intensity^a					
Negative	32	(65.31%)	40	(42.11%)	0.014
Weak	17	(34.69%)	49	(51.58%)	
Intense	0	(0.00%)	6	(6.31%)	
Localization					
Negative	32	(65.31%)	40	(42.11%)	<0.001
Membrane	0	(0.00%)	2	(2.10%)	
Cytoplasm	1	(2.04%)	34	(35.79%)	
Nucleus	16	(32.65%)	6	(6.32%)	
Mem/cyto ^b	0	(0.00%)	8	(8.42%)	
Cyto/nuc ^c	0	(0.00%)	5	(5.26%)	

CIN: Cervical intraepithelial neoplasia. ICC: Invasive cervical cancer. ^aIntensity was categorized as weak = + and ++; and intense = +++ by immunohistochemistry. ^bPresence of the protein at the membrane and in the cytoplasm. ^cPresence of the protein in the cytoplasm and nucleus. Bold: statistically significant.

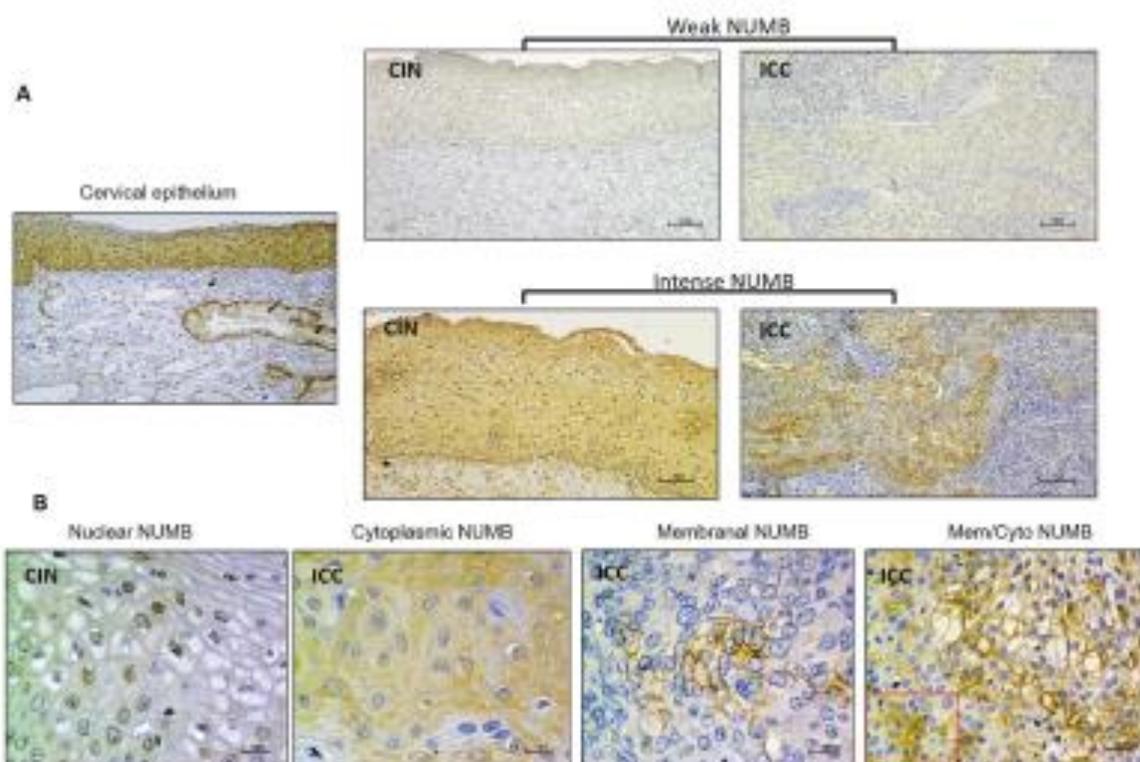


Figure 3: NUMB immunostaining in CIN and ICC. (A) Comparison of NUMB immunostaining intensity (weak vs. intense) in CIN and ICC samples. (B) NUMB immunostaining localization in the cell nucleus (CIN); cytoplasm, membrane and membrane/cytoplasm (ICC).

Table 4: Demographic and clinical characteristics of patients ($n = 144$) with CIN and ICC treated at the Instituto Nacional de Cancerología-México from 2004 to 2017

Variable	CIN ($n = 49$)		ICC ($n = 49$)		P-value
	n	(%)	n	(%)	
Protein expression					
Negative ^a NOTCH1 and negative ^a NUMB	10	(20.41%)	15	(15.79%)	0.014
Negative ^a NOTCH1 and positive ^b NUMB	0	(0.00%)	11	(11.58%)	
Positive ^b NOTCH1 and positive ^b NUMB	17	(34.69%)	44	46.32%	
Positive ^b NOTCH1 and negative ^a NUMB	22	(44.90%)	25	(26.32%)	
Protein localization					
Nuclear ^c NOTCH1 and nuclear ^c NUMB	37	(75.51%)	16	(16.84%)	0.001
Nuclear ^c NOTCH1 and cytoplasmic ^d NUMB	1	(2.04%)	0	(0.00%)	
Cytoplasmic ^d NOTCH1 and nuclear ^c NUMB	11	(22.44%)	45	(47.36%)	
Cytoplasmic ^d NOTCH1 and cytoplasmic ^d NUMB	0	(0.00%)	34	(35.78%)	

CIN: Cervical intraepithelial neoplasia. ICC: Invasive cervical cancer. ^aThe negative condition was defined as an absence of immunostaining in the sample. ^bThe positive condition was defined as the presence of any immunostaining in the sample. ^cNuclear expression was defined as any positive nuclear immunostaining. ^dCytoplasmic expression was defined as any positive immunostaining outside of the cell nucleus. Bold: statistically significant.

$P = 0.001$) and contraceptive consumption ($\beta = 2.946$, 95% CI = 0.809, 5.082, $P = 0.007$) as covariates. Remarkably, when the model was adjusted by nuclear NOTCH1 expression, the significance of the association was lost ($\beta = 2.074$, 95% CI = -0.358, 4.506, $P = 0.094$) (Table 6).

Effect of NOTCH1 expression on prognosis

To determine the potential effect of NOTCH1 on cervical cancer prognosis, we explored the association of NOTCH1 expression with overall survival (OS) in patients with malignant lesions. Patients with cytoplasmic NOTCH1 expression showed a longer OS than those with nuclear NOTCH1 expression, but it was only a borderline association ($P = 0.08$) (Figure 4).

DISCUSSION

In the present study, we showed that ICC samples exhibited lower NOTCH1 expression than CIN samples and that this differential expression is also related to higher NUMB expression. We also showed that nuclear NOTCH1 expression is negatively associated with

malignancy independent of known risk factors for ICC, including age and use of hormonal contraceptives as well as NUMB expression. In contrast, the association of NUMB with malignancy was not independent; it relied on NOTCH1 expression. Based on these findings, we conclude that the loss of nuclear NOTCH1 might be a key factor involved in cervical carcinogenesis. To our knowledge, this is the first study to clarify the expression and localization of NOTCH1 and NUMB in cervical cancer.

It is well known that a persistent infection with high-risk HPV is an etiological factor for cervical cancer [26]. All our samples were positive for HPV infection according to molecular examination, and the main HPV types were 16 and 18, as expected for the Mexican population, with no differences between groups [27]. The HPV type was not related to the expression of either NOTCH1 or NUMB. Concomitant factors for HPV infection and CIN development include: age, menarche, parity, age of first intercourse, number of sexual partners, use of hormonal contraceptives, body mass index, smoking and alcohol consumption [28]. Accordingly, we found that women in the cancer group were older than those in the CIN group.

Table 5: Multivariable-adjusted model for the association between nuclear NOTCH1 expression and ICC diagnosis in patients with cervical cancer treated at the Instituto Nacional de Cancerología-Mexico from 2004 to 2017 (n = 95)

Variable	β	(95% CI)	P-value
NOTCH1 expression ^a	-3.428	(-5.27, -1.728)	0.001
Age	0.092	(0.015, 0.168)	0.018
HC	0.973	(-0.595, 2.541)	0.223
NUMB expression ^b	2.074	(-0.358, 4.506)	0.094

^aNuclear NOTCH1 expression was defined as any positive nuclear immunostaining at the cell nucleus. ^bNUMB expression was defined as any positive immunostaining at the cell cytoplasm. Age was included as a continuous variable. HC: Hormonal contraception use. β = Estimate for the association between NOTCH1 expression and patient characteristics. 95% CI = 95% confidence interval. Bold: statistically significant.

Table 6: Multivariable-adjusted model for the association between cytoplasmic NUMB expression and malignancy in patients with cervical cancer treated at the Instituto Nacional de Cancerología-Mexico from 2004 to 2017 (n = 95)

Variable	β	(95% CI)
NUMB expression ^a	2.074	(0.358, 4.506)
Age	0.092	(0.015, 0.168)
HC	-0.973	(-2.541, 0.595)
NOTCH1 expression ^b	-3.428	(-5.525, 1.728)

^aNUMB expression was defined as any positive immunostaining in the cell cytoplasm ^bNOTCH1 expression was defined as any positive immunostaining in the cell nucleus. Age was included as a continuous variable. HC: Hormonal contraception use. β = Estimate for the association between NUMB expression and patient characteristics. 95% CI = 95% confidence interval. Bold: statistically significant.

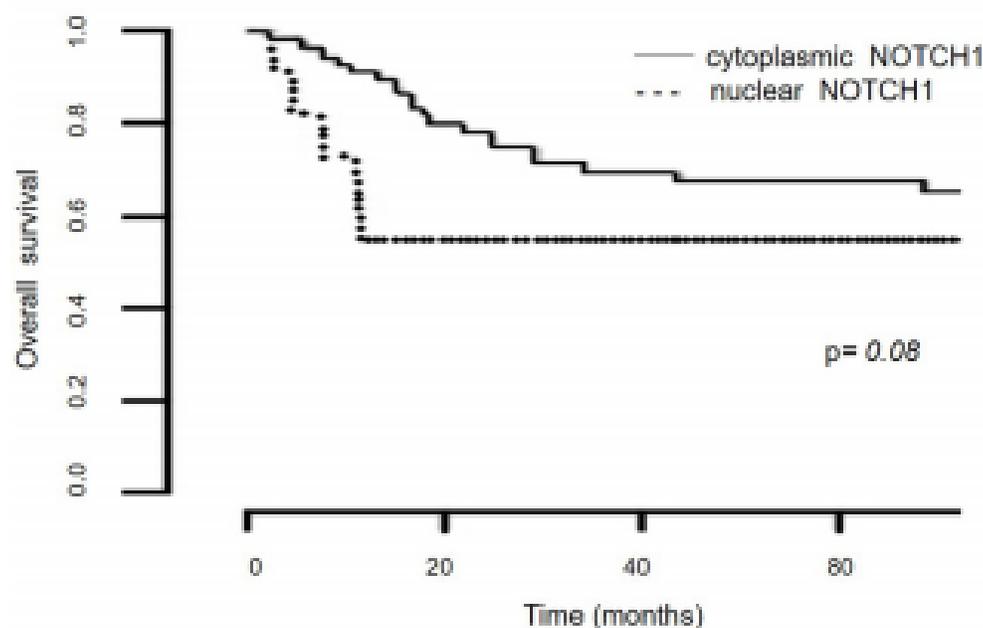


Figure 4: Kaplan-Meier survival analysis of the NOTCH1 localization status. Overall survival according to the NOTCH1 localization status in patients with ICC treated at the Instituto Nacional de Cancerología-Mexico from 2004 to 2017 (n = 95).

This finding is expected since ICC has a peak age incidence around the fourth decade of life [29].

Alterations in NOTCH signaling have been associated with tumorigenesis, but its activity is dissimilar among cancer types [22, 30–32]. In ICC, the role of the NOTCH pathway is controversial [10, 12, 13]. Some authors have proposed that NOTCH1 expression levels are stage-specific: 1) in early lesions, NOTCH1 expression is upregulated; and 2) in malignant lesions, NOTCH1 expression is downregulated [33]. In our samples, the distribution of positive cases was not different between groups, but NOTCH1 immunostaining was weaker in malignant lesions, suggesting a reduction of the expression of NOTCH1 protein.

In order to confirm the obtained results, NOTCH1 protein expression was evaluated by Western blot in ICC available cases, demonstrating coincidence with the immunohistochemical analysis which supports the loss of NOTCH1 expression in ICC.

Moreover, NOTCH1 localization has been used as a marker of activation [34], since signaling transduction relies on NICD nuclear translocation. In our samples, the loss of nuclear immunoreactivity in ICC samples, could be related to inactivation of the canonical pathway. This could be confirmed by the analysis of the expression of NOTCH1 target genes, such as those belonging to the *Her* or *Hey* family [7, 9].

Chen *et al.* (2009) showed that NUMB expression increased during cervical carcinogenesis [24]. Increased NUMB expression has also been reported in oral squamous cell carcinoma (OSCC) [31], hepatocellular cancer (HCC) [35] and endometrial cancer [36]. In contrast, other studies have suggested NUMB as a tumor suppressor protein [37]. NUMB downregulation has been reported in breast cancer and non-small-cell lung carcinomas (NSCLCs), probably due to extensive degradation [22, 38]. We found an increase in NUMB expression in ICC compared to CIN, and this overexpression of NUMB correlates with a decrease in NOTCH1 expression. Even more, we found that premalignant lesions tended to express NUMB in the nucleus which is upregulated in cervical cancer with a cytoplasmic localization. Besides, cytoplasmic NUMB expression was associated with a decrease in nuclear NOTCH1 expression in cervical cancer samples, suggesting the potential regulation of NUMB over NOTCH1, as previously suggested [17, 39]. In the correlation analysis, we expected that tissue areas with NUMB positive expression would correlate with negative NOTCH1 areas. In CIN samples, we did not find a correlation, but we found low positive correlation between the expressing areas of NOTCH1 and NUMB in ICC reflecting that both proteins are present in the cytoplasm in the transformed tissue. This could suggest, that a cytoplasmic NUMB isoform expressed in ICC, could avoid NICD nuclear translocation and thus, inhibit its activity [19, 40].

As previously mentioned, the differences in NUMB localization in our groups (CIN vs. ICC) might be due to different isoform expression. *NUMB* mRNA can be alternatively spliced, giving rise to at least six isoforms of the protein with differences in the size of the phosphotyrosine-binding domain (PTB) and the proline-rich region (PRR) [41]. However, analysis of the NUMB isoforms is beyond the aims of our study since there are no isoform-specific NUMB antibodies available.

The expression of another suppressor as p63 [33, 47]. It is worth to mention that the protein Atlas database report a moderate NOTCH1 immunorexpression in cervical cancer, with a heterogeneous localization in the cell [25]; this is opposite to our results since we found a diminished NOTCH1 expression in cervical cancer. We are not able to distinguish the membranal protein since our antibody is against the intracellular domain. On the other hand, our results of NUMB expression agree with those reported in the Protein Atlas since in both cases the expression is strong with a cytoplasmic localization.

NOTCH1 expression has been proposed as a poor prognostic factor for many types of cancer, such as breast, gastric and lung cancer [42–44]. In this study, we showed that nuclear NOTCH1 expression was negatively correlated with malignancy status, this means that loss of nuclear NOTCH1 expression, the presumably active protein, might favor neoplastic progression from precursor cervical lesions (CIN) to cancer (ICC). Similar findings were recently observed in a study of small cell lung cancer, in which high NOTCH1 expression was an independent favorable prognostic factor [45].

Besides, we found that patients with ICC and cytoplasmic NOTCH1 expression tended to exhibit longer OS compared with those with nuclear NOTCH1 expression. Our findings related to OS are limited by the low number of ICC samples used for this analysis. Poor survival of patients with nuclear NOTCH1 and 3 expressions has already been described in non-small cell lung cancer and cervical carcinoma [44, 46].

The data showed here, support the results of Talora *et al.* (2012) that NOTCH1 is downregulated in later stages of cervical carcinogenesis. Thus, NOTCH1 seems to have a suppressive function in ICC. Moreover, Sun *et al.* (2009) found a similar behavior for NOTCH1, demonstrating its suppressive role through the induction of We acknowledge that the present analysis has several limitations, including that this is a retrospective study based mainly in paraffin embedded tissue; therefore, we lack enough fresh biological material to perform immunofluorescence for co-localization confirmation. Moreover, since our Institution is a cancer reference center, we could collect only a relatively low number of samples in the CIN group. Still, the consistency of the results from our sensitivity analysis suggests that the sample size was not a limitation. Additionally, we obtained a limited number of ICC samples exhibiting

nuclear NOTCH1 expression. Nonetheless, the present study is distinctively unique due to the analysis of NOTCH1 and NUMB expression and localization in CIN and ICC samples.

In conclusion, nuclear NOTCH1 is highly expressed in premalignant lesions, while the lack of nuclear NOTCH1 is an independent predictor of malignancy. Additionally, the association of NUMB with malignancy is dependent on NOTCH1 expression. We propose that the loss of nuclear NOTCH1 may contribute to cervical carcinogenesis. These results point to target the NOTCH pathway as a therapeutic in cervical cancer.

MATERIALS AND METHODS

Tissue specimens

A total of 144 biopsy tissue samples were collected from January 2004 to December 2016 in the Pathology Department of the Instituto Nacional de Cancerología in México City: 95 ICC samples (11 adenocarcinomas and 84 squamous cell carcinomas) and 49 cervical premalignant lesions (including 29 low-grade squamous intraepithelial lesions: CIN I and II; and 20 high-grade lesions: CIN III and *in situ* carcinoma). Hematoxylin and eosin staining confirmed histopathological diagnoses. Clinical and pathological parameters were collected from the medical files. This project was approved by the Institutional Review Board (INCAN/OECEI577/15).

Antibodies

The antibodies used for immunohistochemical staining were polyclonal antibodies against the C-terminus of human NUMB isoforms (p65/p66 and p71/p72) (Santa Cruz Biotechnology Inc. Dallas, Texas, sc-15590) (1:30) and activated NOTCH1 (against the cleaved intracellular fragment, NICD) (Millipore, Merck, New Jersey, USA, 07-1231) (1:50). The NOTCH1 C-20 polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc. Dallas, Texas, sc-6014) (1:50) was used for immunostaining validation.

Immunohistochemical assays

Immunohistochemical staining was performed in serial sections of paraffin-embedded tissues. The slides were incubated at 60° C for 1 h, dewaxed in xylene and rehydrated in alcohol. Antigen retrieval was performed by boiling the tissues for 1 min in 0.1 mol/L citrate buffer (pH = 6) at 80° C, incubating for 30 min in a water bath, and cooling down for 5 min. Subsequently, the slides were incubated for 20 min in 0.3% H₂O₂ blocking buffer (EnVisio System-HRP, Dako, California, USA). Slides were incubated with the corresponding antibody overnight at 4° C in a wet chamber and later washed with phosphate-buffered saline (PBS pH 7.4) prior to incubation with

anti-mouse secondary antibody (DakoCytomation EnVisio System-HRP, California, USA) for 30 min. Positive staining was detected with 3,3'-diaminobenzidin, and then, the slides were counterstained with Mayer's hematoxylin (Merck, New Jersey, USA). Finally, the slides were preserved with rapid mounting media (Merck) and covered with a glass coverslip. Normal cervical epithelium was included as a control, accordingly to the protein Atlas database (<https://www.proteinatlas.org/>) that showed positive immunoreaction for NOTCH1 and NUMB proteins. Primary antibodies were replaced with PBS for the negative controls.

Evaluation of immunohistochemical staining

The immunohistochemical evaluation was performed by a senior pathologist and an experienced examiner of the Instituto Nacional de Cancerología-México in a double-blind fashion. A Nikon ECLIPSE E200 optical microscope with a 10x eyepiece and 10x and 40x objective lens was used. The staining intensity was defined as: weak (including + and ++), when the immunoreaction was visible only with a 40x objective; and intense (+++), when staining was visible even using a 10x objective. Localization was categorized as membranar, cytoplasmic, nuclear, or combinations among them. Percentage of positivity was assessed by quartiles. Technique validation was performed using an alternative NOTCH1 antibody in a representative set of samples.

Western blotting

NOTCH1-antibody specificity was assessed by Western Blot analysis in 22 random paraffin embedded tissues. Protein extraction was performed using the Qproteome FFPE Tissue Kit (Quiagen, Hilden, Germany). Briefly, 5 serial sections from the same block were cut with a thickness of up to 15 µm and placed in a 1.5 ml collection tube. For deparaffinization, 1 ml xylene was added into the tube and vortexed vigorously for 10 s and incubated for 10 min at room temperature (15–25° C), 100 µl of extraction buffer was added and heated. After centrifugation, the supernatant was transferred into a new tube. Total protein quantification was determined with bicinchoninic acid. After protein electrophoresis, proteins were transferred to a nitrocellulose membrane and tested with NOTCH1 (Millipore, Merck, New Jersey, USA, 07-1231) and GAPDH antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas). Clarity kit (Bio Rad, California, USA) was used for chemiluminescent protein detection. Densitometric analysis was performed using ImageJ software (Image Processing and analysis in Java).

HPV detection

HPV typing was performed as previously described [27]. Primers from the L1 region were used (MY09/

MY11/HMB01 and L1C1/L1C2.1/L1C2.2). DNA from HeLa and CaSki cells was used as a positive control. Products were analyzed by electrophoresis on 2% agarose gels stained with ethidium bromide. PCR products were directly sequenced with the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). HPV sequences were aligned using BLAST software (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, NCBI GenBank).

Statistical analysis

We evaluated the different distributions of NOTCH1 and NUMB expression, intensity and localization among groups (CIN vs. ICC) using the chi-squared test. We also explored correlations between NOTCH1 and NUMB expression in histological sections using Pearson coefficients. Multivariate analysis was conducted to determine the association between NOTCH1/NUMB expression and cancer status. For the association between NOTCH1 and NUMB in malignancy, we included the following confounders: age (continuous) and hormone contraception (categorical). We used three sets of models: unadjusted; adjusted for age; and adjusted for age and hormone contraception. We used the Akaike information criterion (AIC) to evaluate goodness-of-fit. The effect of nuclear NOTCH1 expression on OS was observed using the Kaplan and Meier method, and the log-rank test was used to compare groups. All analyses were performed using R software (R Project for Statistical Computing, Wien).

Abbreviations

ICC: Invasive cervical cancer; CIN: Cervical intraepithelial neoplasia; HPV: Human papilloma virus; HR: High risk; NICD: Notch intracellular domain; OS: Overall survival; OSCC: Oral squamous cell carcinoma; HCC: Hepatocellular carcinoma; PTB: Phosphotyrosine-binding domain; PRR: Proline-rich region; NSCLC: Non-small cell lung carcinoma.

Author contributions

Immunohistochemical staining: Elenaé Vázquez-Ulloa, Ana Clara Ramos-Cruz and Alma Chávez-Blanco. Immunohistochemical data interpretation: Alejandro Avilés-Salas and Elenaé Vázquez-Ulloa. Database analysis: Elenaé Vázquez-Ulloa, Ana Clara Ramos-Cruz and Didier-Prada, Marcela Lizano. Statistical analysis: Adriana Contreras-Paredes and Didier-Prada. Sample collection: Adriana Contreras-Paredes and Alma Chávez-Blanco. Study design: Adriana Contreras-Paredes and Marcela Lizano. Manuscript preparation: Elenaé Vázquez-Ulloa, Didier-Prada, Luis A Herrera-Montalvo, Adriana Contreras-Paredes and Marcela Lizano.

ACKNOWLEDGMENTS

This work is part of the Ph.D. thesis of María Alicia Elenaé Vázquez-Ulloa from the Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas at the Universidad Nacional Autónoma de México, who thanks CONACyT México for scholarship CVU 347097. We thank Sofia Ochoa MSc. for advising on the statistical analysis and Dr. Marika Sjöqvist for valuable comments regarding the manuscript.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest.

FUNDING

This work was partially supported by CONACyT CB-2010-01-151493; Instituto Nacional de Cancerología, México; and a scholarship to María Alicia Elenaé Vázquez-Ulloa CONACyT 347097.

REFERENCES

1. International Agency for Research in Cancer. Cervical Cancer Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Retrieved March 26 2018, from <http://globoan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/cervix-new.asp>.
2. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Estadísticas a propósito del día Mundial contra el cáncer. 2016. Retrieved March 26, 2018, from http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018_Nal.pdf.
3. Bosch FX, de Sanjose S. The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Dis Markers*. 2007; 23:213–227.
4. 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.
5. Chen J. Signaling pathways in HPV-associated cancers and therapeutic implications. *Rev Med Virol*. 2015; 25:24–53.
6. Allenspach EJ, Maillard I, Aster JC, Pear WS. Notch signaling in cancer. *Cancer Biol Ther*. 2002; 1:466–476.
7. Andersson ER, Sandberg R, Lendahl U. Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. *Development*. 2011; 138:3593–3612.
8. Kopan R, Ilagan MX. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell*. 2009; 137:216–233.
9. Ranganathan P, Weaver KL, Capobianco AJ. Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time. *Nat Rev Cancer*. 2011; 11:338–351.

10. Takora C, Cialfi S, Segatto O, Morone S, Kim Choi J, Frai L, Paolo Dotto G, Galino A, Screpanti I. Constitutively active Notch1 induces growth arrest of HPV-positive cervical cancer cells via separate signaling pathways. *Exp Cell Res*. 2005; 305:343–354.
11. Takora C, Sgroi DC, Crum CP, Dotto GP. 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; 16:2252–2263.
12. 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; 17:1283–1292.
13. 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; 17:511–516.
14. 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; 292:899–904.
15. 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; 92:6414–6418.
16. Gray GE, Mann RS, Mitsiadis E, Henrique D, Carcangiu ML, Baskin A, Leiman J, Ward D, Ish-Horowitz D, Artavanis-Tsakonas S. Human ligands of the Notch receptor. *Am J Pathol*. 1999; 154:785–794.
17. McGill MA, McGlade CJ. Mammalian numb proteins promote Notch1 receptor ubiquitination and degradation of the Notch1 intracellular domain. *J Biol Chem*. 2003; 278:23196–23203.
18. Andersen P, Ursaki H, Shenje LT, Kwon C. Non-canonical Notch signaling: emerging role and mechanism. *Trends Cell Biol*. 2012; 22:257–265.
19. Giebel B, Wodarz A. Notch signaling: numb makes the difference. *Curr Biol*. 2012; 22:R133–135.
20. Song Y, Lu B. Interaction of Notch signaling modulator Numb with alpha-Adaptin regulates endocytosis of Notch pathway components and cell fate determination of neural stem cells. *J Biol Chem*. 2012; 287:17716–17728.
21. Rennstam K, McMichael N, Berglund P, Honeth G, Hegardt C, Ryden L, Luts L, Bendahl PO, Hedenfalk I. Numb protein expression correlates with a basal-like phenotype and cancer stem cell markers in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2010; 122:315–324.
22. Pece S, Serresi M, Santolini E, Capra M, Hulleman E, Galimberti V, Zurrada S, Maisonneuve P, Viale G, Di Fiore PP. Loss of negative regulation by Numb over Notch is relevant to human breast carcinogenesis. *J Cell Biol*. 2004; 167:215–221.
23. Faraldo MM, Glukhova MA. Regulating the regulator: Numb acts upstream of p53 to control mammary stem and progenitor cell. *J Cell Biol*. 2015; 211:737–739.
24. 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; 76:149–154.
25. The Human Protein Atlas. NOTCH1. 2018. Retrieved March 26 2018, from <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000148400-NOTCH1/tissue>.
26. zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology*. 2009; 384:260–265.
27. Carrillo-Garcia A, Ponce-de-Leon-Rosales S, Cantu-de-Leon D, Fragoso-Ontiveros V, Martinez-Ramirez I, Orozco-Colin A, Molnar A, Lizano M. Impact of human papillomavirus coinfections on the risk of high-grade squamous intraepithelial lesion and cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2014; 134:534–539.
28. Ghedira R, Mahfoudh W, Hadri S, Gabbouj S, Bouanene I, Khairi H, Chaieb A, Khelifa R, Bouaouina N, Remadi S, Elmi AA, Hansal D, Sultan AA, et al. Human papillomavirus genotypes and HPV-16 variants distribution among Tunisian women with normal cytology and squamous intraepithelial lesions. *Infect Agent Cancer*. 2016; 11:61.
29. Sharma A, Kulkarni V, Bhaskaran U, Singha M, Mujtahedi S, Chatrath A, Sridhar M, Thapar R, Mithra PP, Kumar N, Holla R, Darshan BB, Kumar A. Profile of cervical cancer patients attending Tertiary Care Hospitals of Mangalore, Karnataka: A 4 year retrospective study. *J Nat Sci Biol Med*. 2017; 8:125–129.
30. Radtke F, Raj K. The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor? *Nat Rev Cancer*. 2003; 3:726–767.
31. Osathanon T, Nowwarote N, Pavesant P. Expression and influence of Notch signaling in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Sci*. 2016; 58:283–294.
32. 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.
33. 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; 7:1388–1395.
34. Lubin DJ, Mick R, Shroff SG, Stashek K, Furth EE. The notch pathway is activated in neoplastic progression in esophageal squamous cell carcinoma. *Hum Pathol*. 2018; 72:66–70.
35. 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:e95849.

36. Wang C, Cui T, Feng W, Li H, Hu L. Role of Numb expression and nuclear translocation in endometrial cancer. *Oncol Lett.* 2015; 9:1531-1536.
37. Galino A, Di Marcotullio L, Screpanti I. The multiple functions of Numb. *Exp Cell Res.* 2010; 316:900-906.
38. 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; 106:22293-22298.
39. McGill MA, Dho SE, Weinmaster G, McGlade CJ. Numb regulates post-endocytic trafficking and degradation of Notch1. *J Biol Chem.* 2009; 284:26427-26438.
40. Rong C, Feng Y, Ye Z. Notch is a critical regulator in cervical cancer by regulating Numb splicing. *Oncol Lett.* 2017; 13:2465-2470.
41. Karaczyn A, Bani-Yaghoob 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.
42. Xu J, Song F, Jin T, Qin J, Wu J, Wang M, Wang Y, Liu J. Prognostic values of Notch receptors in breast cancer. *Tumour Biol.* 2016; 37:1871-1877.
43. Wu X, Liu W, Tang D, Xiao H, Wu Z, Chen C, Yao X, Liu F, Li G. Prognostic values of four Notch receptor mRNA expression in gastric cancer. *Sci Rep.* 2016; 6:28044.
44. Jin MM, Ye YZ, Qian ZD, Zhang YB. Notch signaling molecules as prognostic biomarkers for non-small cell lung cancer. *Oncol Lett.* 2015; 10:3252-3260.
45. Kikuchi H, Sakakibara-Konishi J, Furuta M, Yokouchi H, Nishihara H, Yamazaki S, Uramoto H, Tanaka F, Harada M, Akie K, Sugaya F, Fujita Y, Takamura K, et al. Expression of Notch1 and Numb in small cell lung cancer. *Oncotarget.* 2017; 8:10348-58. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14411>.
46. Yeamin S, Nakayama K, Rahman MT, Rahman M, Ishikawa M, Iida K, Otsuki Y, Kobayashi H, Nakayama S, Miyazaki K. Expression of nuclear Notch3 in cervical squamous cell carcinomas and its association with adverse clinical outcomes. *Gynecol Oncol.* 2010; 117:409-416.
47. Sun L, Song Y, Tong T, Wu L, Zhang W, Zhan Q. Down-modulation of Notch1 expression in cervical cancer is associated with HPV-induced carcinogenesis. *Clinical Oncology and Cancer Research.* 2009; 6:401-405.

Referencias

1. Cancer IAFri. (2003). Anatomy of the uterine cervix and the transformation zone. In: Sellors JW SR, ed. Colposcopy and treatment of cervical intraepithelial neoplasia: a beginners' manual: Intrantional Agency for Research in cancer).
2. Wildes JW. The ABCs of TBS: A Novice's Guide to the Bethesda System. Laboratory Medicine. 1998; 29(9):546-552.
3. International Agency for Research in Cancer. (2003). Bases anatómicas y patológicas de la inspección visual con ácido acético (IVA) y con solución yodoyodurada de Lugol (IVL). In: Sankaranarayanan R WR, ed. Manual práctico para la Detección Visual de las Neoplasias Cervicales.
4. Herfs M, Yamamoto Y, Laury A, Wang X, Nucci MR, McLaughlin-Drubin ME, Munger K, Feldman S, McKeon FD, Xian W and Crum CP. A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012; 109(26):10516-10521.
5. International Agency for Research in Cancer. (2012). "Cervical Cancer Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worlwide in 2012".
6. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2016). "Estadísticas a proposito del dia Mundial contra el cancer ".
7. World Health Organization. (2014). Comprehensive cervical cancer control A guide to essential practice.
8. Tempfer CB, Tischoff I, Dogan A, Hilal Z, Schultheis B, Kern P and Rezniczek GA. Neuroendocrine carcinoma of the cervix: a systematic review of the literature. BMC Cancer. 2018; 18(1):530.
9. World Health Organization. (2014). Cancer and pre-cancer classification systems. Comprehensive Cervical Cancer Control: A Guide to Essential Practice. (Geneva: World Health Organization).
10. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C and Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. Rev Med Virol. 2015; 25 Suppl 1:2-23.
11. Carretero Colomer M. Cáncer de cuello de útero. Nuevas perspectivas en la prevención. Offarm. 2008; 27(5):120-123.
12. Tierney B, Westin SN, Schlumbrecht MP and Ramirez PT. Early cervical neoplasia: advances in screening and treatment modalities. Clin Adv Hematol Oncol. 2010; 8(8):547-555.
13. Almonte M, Albero G, Molano M, Carcamo C, García PJ and Pérez G. Risk factors for Human Papillomavirus Exposure and Co-factors for Cervical Cancer in Latin America and the Caribbean. Vaccine. 2008; 26:L16-L36.
14. Song D, Li H, Li H and Dai J. Effect of human papillomavirus infection on the immune system and its role in the course of cervical cancer. Oncol Lett. 2015; 10(2):600-606.
15. Schiffman MH and Castle P. Epidemiologic Studies of a Necessary Causal Risk Factor: Human Papillomavirus Infection and Cervical Neoplasia. JNCI: Journal of the National Cancer Institute. 2003; 95(6):E2-E2.
16. Bzhalava D, Eklund C and Dillner J. International standardization and classification of human papillomavirus types. Virology. 2015; 476:341-344.
17. Wagner M, Bennetts L, Patel H, Welner S, de Sanjose S and Weiss TW. Global availability of data on HPV genotype-distribution in cervical, vulvar and vaginal disease and genotype-specific prevalence and incidence of HPV infection in females. Infect Agent Cancer. 2015; 10:13.

18. Liu Y, Pan Y, Gao W, Ke Y and Lu Z. Whole-Genome Analysis of Human Papillomavirus Types 16, 18, and 58 Isolated from Cervical Precancer and Cancer Samples in Chinese Women. *Sci Rep.* 2017; 7(1):263.
19. Wentzensen N, Nason M, Schiffman M, Dodd L, Hunt WC, Wheeler CM and New Mexico HPVPRSC. No evidence for synergy between human papillomavirus genotypes for the risk of high-grade squamous intraepithelial lesions in a large population-based study. *J Infect Dis.* 2014; 209(6):855-864.
20. Bruni L B-R, Albero G, Serrano B, Mena M, Gómez D, Muñoz J, Bosch FX, de Sanjosé S. . Human Papillomavirus and Related Diseases in Mexico. . ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). 2017.
21. Bodily J and Laimins LA. Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. *Trends Microbiol.* 2011; 19(1):33-39.
22. Egawa N, Egawa K, Griffin H and Doorbar J. Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. *Viruses.* 2015; 7(7):3863-3890.
23. Graham SV. Human papillomavirus: gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies. *Future Microbiol.* 2010; 5(10):1493-1506.
24. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR and Stanley MA. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine.* 2012; 30 Suppl 5:F55-70.
25. Aksoy P, Gottschalk EY and Meneses PI. HPV entry into cells. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2017; 772:13-22.
26. Horvath CA, Boulet GA, Renoux VM, Delvenne PO and Bogers JP. Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. *Virology.* 2010; 7:11.
27. Campos SK. Subcellular Trafficking of the Papillomavirus Genome during Initial Infection: The Remarkable Abilities of Minor Capsid Protein L2. *Viruses.* 2017; 9(12).
28. Reinson T, Henno L, Toots M, Ustav M, Jr. and Ustav M. The Cell Cycle Timing of Human Papillomavirus DNA Replication. *PLoS One.* 2015; 10(7):e0131675.
29. Hoppe-Seyler K, Bossler F, Braun JA, Herrmann AL and Hoppe-Seyler F. The HPV E6/E7 Oncogenes: Key Factors for Viral Carcinogenesis and Therapeutic Targets. *Trends in Microbiology.* 26(2):158-168.
30. Tomaic V. Functional Roles of E6 and E7 Oncoproteins in HPV-Induced Malignancies at Diverse Anatomical Sites. *Cancers (Basel).* 2016; 8(10).
31. Songcock WK, Scott ML and Bodily JM. Regulation of the human papillomavirus type 16 late promoter by transcriptional elongation. *Virology.* 2017; 507:179-191.
32. Graham SV. Keratinocyte Differentiation-Dependent Human Papillomavirus Gene Regulation. *Viruses.* 2017; 9(9).
33. Finnen RL, Erickson KD, Chen XS and Garcea RL. Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. *J Virol.* 2003; 77(8):4818-4826.
34. Roden RBS and Stern PL. Opportunities and challenges for human papillomavirus vaccination in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2018; 18(4):240-254.
35. Spurgeon ME and Lambert PF. Human Papillomavirus and the Stroma: Bidirectional Crosstalk during the Virus Life Cycle and Carcinogenesis. *Viruses.* 2017; 9(8).
36. Hanahan D and Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011; 144(5):646-674.
37. Fouad YA and Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res.* 2017; 7(5):1016-1036.
38. Pim D, Bergant M, Boon SS, Ganti K, Kranjec C, Massimi P, Subbaiah VK, Thomas M, Tomaic V and Banks L. Human papillomaviruses and the specificity of PDZ domain targeting. *FEBS J.* 2012; 279(19):3530-3537.

39. Liu X, Dakic A, Zhang Y, Dai Y, Chen R and Schlegel R. HPV E6 protein interacts physically and functionally with the cellular telomerase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106(44):18780-18785.
40. Guo Y, Meng X, Ma J, Zheng Y, Wang Q, Wang Y and Shang H. Human papillomavirus 16 E6 contributes HIF-1 α induced Warburg effect by attenuating the VHL-HIF-1 α interaction. *Int J Mol Sci*. 2014; 15(5):7974-7986.
41. Moody CA and Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer*. 2010; 10(8):550-560.
42. Yamamoto S, Schulze KL and Bellen HJ. Introduction to Notch signaling. *Methods Mol Biol*. 2014; 1187:1-14.
43. Chivukula IV. (2015). Dysregulated Notch Signaling in Breast Cancer and Liver Disease. Institutionen för cell- och molekylärbiologi (Stockholm Karolinska Institutet).
44. Ntziachristos P, Lim JS, Sage J and Aifantis I. From fly wings to targeted cancer therapies: a centennial for notch signaling. *Cancer Cell*. 2014; 25(3):318-334.
45. Nowell CS and Radtke F. Notch as a tumour suppressor. *Nat Rev Cancer*. 2017; 17(3):145-159.
46. Masek J and Andersson ER. The developmental biology of genetic Notch disorders. *Development*. 2017; 144(10):1743-1763.
47. Mao L. *NOTCH* Mutations: Multiple Faces in Human Malignancies. *Cancer Prevention Research*. 2015; 8(4):259-261.
48. SF G. (2000). In: Associates SMS, ed. *Developmental Biology*.
49. Bray SJ. Notch signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016; 17(11):722-735.
50. Meloty-Kapella L, Shergill B, Kuon J, Botvinick E and Weinmaster G. Notch ligand endocytosis generates mechanical pulling force dependent on dynamin, epsins, and actin. *Dev Cell*. 2012; 22(6):1299-1312.
51. Groot AJ and Vooijs MA. The role of Adams in Notch signaling. *Adv Exp Med Biol*. 2012; 727:15-36.
52. van Tetering G and Vooijs M. Proteolytic cleavage of Notch: "HIT and RUN". *Curr Mol Med*. 2011; 11(4):255-269.
53. Huenniger K, Kramer A, Soom M, Chang I, Kohler M, Depping R, Kehlenbach RH and Kaether C. Notch1 signaling is mediated by importins α 3, 4, and 7. *Cell Mol Life Sci*. 2010; 67(18):3187-3196.
54. Kovall RA, Gebelein B, Sprinzak D and Kopan R. The Canonical Notch Signaling Pathway: Structural and Biochemical Insights into Shape, Sugar, and Force. *Dev Cell*. 2017; 41(3):228-241.
55. Siebel C and Lendahl U. Notch Signaling in Development, Tissue Homeostasis, and Disease. *Physiol Rev*. 2017; 97(4):1235-1294.
56. Contreras-Cornejo H, Saucedo-Correa G, Oviedo-Boyso J, Valdez-Alarcon JJ, Baizabal-Aguirre VM, Cajero-Juarez M and Bravo-Patino A. The CSL proteins, versatile transcription factors and context dependent corepressors of the notch signaling pathway. *Cell Div*. 2016; 11:12.
57. Iso T, Kedes L and Hamamori Y. HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J Cell Physiol*. 2003; 194(3):237-255.
58. Borggreffe T and Oswald F. The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes. *Cell Mol Life Sci*. 2009; 66(10):1631-1646.
59. Vazquez-Ulloa E, Lizano M, Sjoqvist M, Olmedo-Nieva L and Contreras-Paredes A. Deregulation of the Notch pathway as a common road in viral carcinogenesis. *Rev Med Virol*. 2018:e1988.
60. Andersson ER, Sandberg R and Lendahl U. Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. *Development*. 2011; 138(17):3593-3612.

61. Sanalkumar R, Dhanesh SB and James J. Non-canonical activation of Notch signaling/target genes in vertebrates. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2010; 67(17):2957-2968.
62. Ayaz F and Osborne BA. Non-Canonical Notch Signaling in Cancer and Immunity. *Frontiers in Oncology*. 2014; 4(345).
63. Veeraraghavalu K, Subbaiah VK, Srivastava S, Chakrabarti O, Syal R and Krishna S. Complementation of Human Papillomavirus Type 16 E6 and E7 by Jagged1-Specific Notch1-Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling Involves Pleiotropic Oncogenic Functions Independent of CBF1;Su(H);Lag-1 Activation. *Journal of Virology*. 2005; 79(12):7889-7898.
64. Andersen P, Uosaki H, Shenje LT and Kwon C. Non-canonical Notch signaling: emerging role and mechanism. *Trends in cell biology*. 2012; 22(5):257-265.
65. Perumalsamy LR, Nagala M, Banerjee P and Sarin A. A hierarchical cascade activated by non-canonical Notch signaling and the mTOR-Rictor complex regulates neglect-induced death in mammalian cells. *Cell Death Differ*. 2009; 16(6):879-889.
66. Fortini ME and Bilder D. Endocytic regulation of Notch signaling. *Curr Opin Genet Dev*. 2009; 19(4):323-328.
67. Takeuchi H and Haltiwanger RS. Role of glycosylation of Notch in development. *Semin Cell Dev Biol*. 2010; 21(6):638-645.
68. Pakkiriswami S, Couto A, Nagarajan U and Georgiou M. Glycosylated Notch and Cancer. *Front Oncol*. 2016; 6:37.
69. McGill MA and McGlade CJ. Mammalian numb proteins promote Notch1 receptor ubiquitination and degradation of the Notch1 intracellular domain. *J Biol Chem*. 2003; 278(25):23196-23203.
70. Zhao Y, Katzman RB, Delmolino LM, Bhat I, Zhang Y, Gurumurthy CB, Germaniuk-Kurowska A, Reddi HV, Solomon A, Zeng MS, Kung A, Ma H, Gao Q, Dimri G, Stanculescu A, Miele L, et al. The notch regulator MAML1 interacts with p53 and functions as a coactivator. *J Biol Chem*. 2007; 282(16):11969-11981.
71. Zhang M, Biswas S, Qin X, Gong W, Deng W and Yu H. Does Notch play a tumor suppressor role across diverse squamous cell carcinomas? *Cancer Med*. 2016; 5(8):2048-2060.
72. Sancho R, Cremona CA and Behrens A. Stem cell and progenitor fate in the mammalian intestine: Notch and lateral inhibition in homeostasis and disease. *EMBO Rep*. 2015; 16(5):571-581.
73. Rangarajan A, Talora C, Okuyama R, Nicolas M, Mammucari C, Oh H, Aster JC, Krishna S, Metzger D, Chambon P, Miele L, Aguet M, Radtke F and Dotto GP. Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *EMBO J*. 2001; 20(13):3427-3436.
74. Nicolas M, Wolfer A, Raj K, Kummer JA, Mill P, van Noort M, Hui C-c, Clevers H, Dotto GP and Radtke F. Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. *Nature Genetics*. 2003; 33:416.
75. Maliekal TT, Bajaj J, Giri V, Subramanyam D and Krishna S. The role of Notch signaling in human cervical cancer: implications for solid tumors. *Oncogene*. 2008; 27(38):5110-5114.
76. Rangarajan A, Syal R, Selvarajah S, Chakrabarti O, Sarin A and 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.
77. Talora C, Sgroi DC, Crum CP and Dotto GP. 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):2252-2263.
78. Lathion S, Schaper J, Beard P and Raj K. Notch1 can contribute to viral-induced transformation of primary human keratinocytes. *Cancer Res*. 2003; 63(24):8687-8694.

79. Kranjec C, Holleywood C, Libert D, Griffin H, Mahmood R, Isaacson E and Doorbar J. Modulation of basal cell fate during productive and transforming HPV-16 infection is mediated by progressive E6-driven depletion of Notch. *J Pathol.* 2017; 242(4):448-462.
80. Gulino A, Di Marcotullio L and Screpanti I. The multiple functions of Numb. *Exp Cell Res.* 2010; 316(6):900-906.
81. Pece S, Confalonieri S, P RR and Di Fiore PP. NUMB-ing down cancer by more than just a NOTCH. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1815(1):26-43.
82. Dho SE, French MB, Woods SA and 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.
83. Verdi JM, Bashirullah A, Goldhawk DE, Kubu CJ, Jamali M, Meakin SO and Lipshitz HD. Distinct human NUMB isoforms regulate differentiation vs. proliferation in the neuronal lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(18):10472-10476.
84. Wei J, Fu ZY, Li PS, Miao HH, Li BL, Ma YT and Song BL. The clathrin adaptor proteins ARH, Dab2, and numb play distinct roles in Niemann-Pick C1-Like 1 versus low density lipoprotein receptor-mediated cholesterol uptake. *J Biol Chem.* 2014; 289(48):33689-33700.
85. Yan B. Numb--from flies to humans. *Brain Dev.* 2010; 32(4):293-298.
86. Karaczyn A, Bani-Yaghoub M, Tremblay R, Kubu C, Cowling R, Adams TL, Prudovsky I, Spicer D, Friesel R, Vary C and Verdi JM. Two novel human NUMB isoforms provide a potential link between development and cancer. *Neural Dev.* 2010; 5:31.
87. Santolini E, Puri C, Salcini AE, Gagliani MC, Pelicci PG, Tacchetti C and Di Fiore PP. Numb is an endocytic protein. *J Cell Biol.* 2000; 151(6):1345-1352.
88. Flores AN, McDermott N, Meunier A and Marignol L. NUMB inhibition of NOTCH signalling as a therapeutic target in prostate cancer. *Nat Rev Urol.* 2014; 11(9):499-507.
89. Babaoglan AB, O'Connor-Giles KM, Mistry H, Schickedanz A, Wilson BA and Skeath JB. Sanpodo: a context-dependent activator and inhibitor of Notch signaling during asymmetric divisions. *Development.* 2009; 136(24):4089-4098.
90. Casanova JE. PARTitioning numb. *EMBO Rep.* 2007; 8(3):233-235.
91. Guo M, Jan LY and Jan YN. Control of daughter cell fates during asymmetric division: interaction of Numb and Notch. *Neuron.* 1996; 17(1):27-41.
92. Petersen PH, Tang H, Zou K and Zhong W. The enigma of the numb-Notch relationship during mammalian embryogenesis. *Dev Neurosci.* 2006; 28(1-2):156-168.
93. Rajendran D, Zhang Y, Berry DM and McGlade CJ. Regulation of Numb isoform expression by activated ERK signaling. *Oncogene.* 2016; 35:5202.
94. Pece S, Serresi M, Santolini E, Capra M, Hulleman E, Galimberti V, Zurrada S, Maisonneuve P, Viale G and Di Fiore PP. Loss of negative regulation by Numb over Notch is relevant to human breast carcinogenesis. *J Cell Biol.* 2004; 167(2):215-221.
95. Kim H and Ronai ZA. Rewired Notch/p53 by Numb'ing Mdm2. *J Cell Biol.* 2018; 217(2):445-446.
96. Kikuchi H, Sakakibara-Konishi J, Furuta M, Yokouchi H, Nishihara H, Yamazaki S, Uramoto H, Tanaka F, Harada M, Akie K, Sugaya F, Fujita Y, Takamura K, Kojima T, Harada T, Higuchi M, et al. Expression of Notch1 and Numb in small cell lung cancer. *Oncotarget.* 2017; 8(6):10348-10358.
97. Liu Z, Luo C, Yang W, Wang K, Hu C, Zou J, Zhu H, Fu L, Nie J and Cheng C. Increased Numb protein expression predicts poor clinical outcomes in esophageal squamous cell carcinoma patients. *Cancer Biol Ther.* 2018; 19(1):34-41.
98. Tuncbag N, Milani P, Pokorny JL, Johnson H, Sio TT, Dalin S, Iykegbe DO, White FM, Sarkaria JN and Fraenkel E. Network Modeling Identifies Patient-specific Pathways in Glioblastoma. *Sci Rep.* 2016; 6:28668.

99. Wang C, Cui T, Feng W, Li H and Hu L. Role of Numb expression and nuclear translocation in endometrial cancer. *Oncol Lett.* 2015; 9(4):1531-1536.
100. Human Protein Atlas.
101. Chen H, Chen X, Ye F, Lu W and Xie X. Symmetric division and expression of its regulatory gene Numb in human cervical squamous carcinoma cells. *Pathobiology.* 2009; 76(3):149-154.
102. Rong C, Feng Y and Ye Z. Notch is a critical regulator in cervical cancer by regulating Numb splicing. *Oncol Lett.* 2017; 13(4):2465-2470.
103. Mauricio Hernández-Avila FG-L, Sergio López-Moreno and Diseño de estudios epidemiológicos. *Salud Publica de México* 2000; 42(2).
104. Mittal S, Subramanyam D, Dey D, Kumar RV and Rangarajan A. Cooperation of Notch and Ras/MAPK signaling pathways in human breast carcinogenesis. *Mol Cancer.* 2009; 8:128.
105. Salmerón J, Torres-Ibarra L, Bosch FX, Cuzick J, Lörincz A, Wheeler CM, Castle PE, Robles C and Lazcano-Ponce E. HPV vaccination impact on a cervical cancer screening program: methods of the FASTER-Tlalpan Study in Mexico. *Salud Pública de México.* 2016; 58:211-219.
106. World Health Organization. *Cancer* 2018.
107. Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz; Instituto Nacional de Salud Pública CNClA, Secretaría de Salud,. *Encuesta Nacional de Consumo de Drogas, Alcohol y Tabaco 2016-2017: Reporte de Alcohol.* . 2017.
108. Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz; Instituto Nacional de Salud Pública CNClA, Secretaría de Salud,. (2017). *Encuesta Nacional de Consumo de Drogas, Alcohol y Tabaco 2016-2017: Reporte de Tabaco.*
109. Boissonnault WG and Badke MB. Collecting Health History Information: The Accuracy of a Patient Self-administered Questionnaire in an Orthopedic Outpatient Setting. *Physical Therapy.* 2005; 85(6):531-543.
110. DiBonaventura MD, Meincke H, Le Lay A, Fournier J, Bakker E and Ehrenreich A. Obesity in Mexico: prevalence, comorbidities, associations with patient outcomes, and treatment experiences. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2018; 11:1-10.
111. zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology.* 2009; 384(2):260-265.
112. Munoz N, Castellsague X, de Gonzalez AB and Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine.* 2006; 24 Suppl 3:S3/1-10.
113. Sun Y, Zhang R, Zhou S and Ji Y. Overexpression of Notch1 is associated with the progression of cervical cancer. *Oncol Lett.* 2015; 9(6):2750-2756.
114. Wakamatsu Y, Maynard TM, Jones SU and Weston JA. NUMB localizes in the basal cortex of mitotic avian neuroepithelial cells and modulates neuronal differentiation by binding to NOTCH-1. *Neuron.* 1999; 23(1):71-81.
115. Tripathi R, Rath G, Jwanjal P, Sharma S, Singhal P, Bhambhani S, Hussain S and Bharadwaj M. Clinical impact of de-regulated Notch-1 and Notch-3 in the development and progression of HPV-associated different histological subtypes of precancerous and cancerous lesions of human uterine cervix. *PLoS One.* 2014; 9(6):e98642.
116. Li Sun YS, Tong Lingying, Wu Wenhua, Zhang Qimin Zhan. Down-modulation of Notch1 expression in cervical cancer is associated with HPV-induced carcinogenesis. *Clinical Oncology and Cancer Research.* 2009; 6(6):401-405.
117. Donnem T, Andersen S, Al-Shibli K, Al-Saad S, Busund LT and Bremnes RM. Prognostic impact of Notch ligands and receptors in nonsmall cell lung cancer: coexpression of Notch-1 and vascular endothelial growth factor-A predicts poor survival. *Cancer.* 2010; 116(24):5676-5685.
118. Chapman G, Liu L, Sahlgren C, Dahlqvist C and Lendahl U. High levels of Notch signaling down-regulate Numb and Numbl. *J Cell Biol.* 2006; 175(4):535-540.

119. Colaluca IN, Basile A, Freiburger L, D'Uva V, Disalvatore D, Vecchi M, Confalonieri S, Tosoni D, Cecatiello V, Malabarba MG, Yang C-J, Kainosho M, Sattler M, Mapelli M, Pece S and Di Fiore PP. A Numb–Mdm2 fuzzy complex reveals an isoform-specific involvement of Numb in breast cancer. *The Journal of Cell Biology*. 2018; 217(2):745-762.