

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**IDENTIFICACION DE BIOMARCADORES INVOLUCRADOS EN LA PROGRESIÓN O  
REGRESION DE LAS LESIONES PRENEOPLASICAS DEL CERVIX, A TRAVÉS DE  
MUESTRAS DE TEJIDO PARA ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO, EN LA CIUDAD DE  
BOGOTA**

**JUVENAL DARIO BAENA ACEVEDO**

**BOGOTÁ  
2015**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**IDENTIFICACION DE BIOMARCADORES INVOLUCRADOS EN LA PROGRESIÓN DE  
LAS LESIONES PRENEOPLASICAS DEL CERVIX, A TRAVÉS DE MUESTRAS DE  
TEJIDO PARA ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO, EN LA CIUDAD DE BOGOTA**

**JUVENAL DARIO BAENA ACEVEDO**

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial

Para optar al título de

**MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Directora: Dabeiba Adriana García Robayo. PhD Ciencias Biológicas

**BOGOTÁ**

**2015**

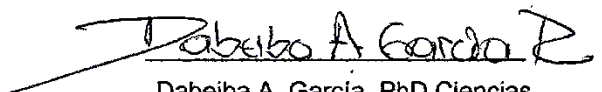
## **NOTA DE ADVERTENCIA**

"La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia". Artículo 23 de la Resolución No13 de julio de 1946.

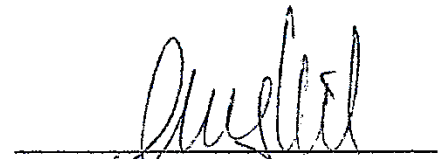
**IDENTIFICACION DE BIOMARCADORES INVOLUCRADOS EN LA PROGRESIÓN DE  
LAS LESIONES PRENEOPLASICAS DEL CERVIX, A TRAVÉS DE MUESTRAS DE  
TEJIDO PARA ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO, EN LA CIUDAD DE BOGOTÁ**

**JUVENAL DARIO BAENA ACEVEDO**

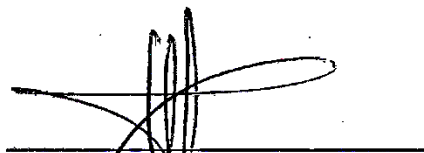
APROBADO



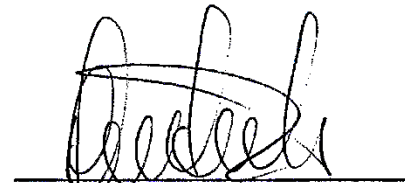
Dabeiba A. García, PhD Ciencias  
Biológicas  
Director



ANGEL CID ARREGUI  
Jurado



MARCOS CASTILLO  
Jurado



ANTONIO HUERTAS SALGADO  
Jurado

**IDENTIFICACION DE BIOMARCADORES INVOLUCRADOS EN LA PROGRESIÓN DE  
LAS LESIONES PRENEOPLASICAS DEL CERVIX, A TRAVÉS DE MUESTRAS DE  
TEJIDO PARA ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO, EN LA CIUDAD DE BOGOTÁ**

**JUVENAL DARIO BAENA ACEVEDO**

APROBADO

---

Concepción Puerta B, PhD  
Decana  
Facultad de Ciencias

---

Alba Alicia Trespalacios, PhD  
Directora de posgrado  
Facultad de Ciencias

Este trabajo de tesis está dedicado a Dios;  
Por seguir brindándome crecimiento profesional;  
A mi esposa e hijas,  
Por su apoyo incondicional,  
Para poder realizar este nuevo proyecto;  
A mi tutora y profesores de la Maestría;  
Por entregarme sus valiosos conocimientos.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mi Tutora, Doctora Dabeiba Adriana García y a las Directivas de la oficina de postgrados de la Universidad, por haberme brindado la oportunidad de realizar mis estudios en Maestría en Ciencias Biológicas. También por su comprensión y colaboración en cada momento, que me hicieron posible finalizar en feliz término este nuevo logro educativo, con el propósito de poder cumplir a cabalidad todos los requisitos académicos.

A la Doctora Luz Mery Vargas León, Patóloga del Laboratorio “Estudios Anatomopatológicos” por su colaboración para la consecución y selección de las muestras que fueron incluidas en el presente trabajo de grado. También por participar en la revisión de las placas histológicas con marcadores de Inmunohistoquímica.

A la histotecnóloga Yudy Díaz del laboratorio “Estudios Anatomopatológicos” por realizar los cortes histológicos de cada una de las muestras seleccionadas, para realizar la extracción del ADN y estudios con marcadores de inmunohistoquímica

## CONTENIDO

	Pág.
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>15</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>17</b>
2.1 CANCER DE CUELLO UTERINO .....	17
2.1.1 Definición.....	17
2.1.2 Epidemiología.....	19
2.1.3 Factores de Riesgo .....	21
2.1.4 Biología del cáncer cervical .....	25
2.2 BIOMARCADORES EN CANCER .....	27
2.2.1 Biomarcadores en Cáncer del Cuello Uterino .....	27
2.2.2 Impacto clínico de biomarcadores en CaCU .....	29
2.2.3 Genes candidatos en estudio.....	30
<b>3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>35</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	36
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
5.1 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.....	37
5.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	38
5.3 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	38
5.4 PROCEDIMIENTO .....	38
5.4.1 Extracción de ARN y realización de RT-PCR .....	39



5.4.2	Inmunohistoquímica .....	40
5.5	ANALISIS ESTADISTICO.....	41
5.6	RESULTADOS .....	42
5.6.1	Descripción de las muestras del estudio transversal y longitudinal.....	42
5.6.2	Expresión de SFRP1 estudio transversal y longitudinal.....	43
5.6.3	Expresión de CDO1 estudio transversal y longitudinal.....	45
5.6.4	Expresión de CDX2 estudio transversal y longitudinal.....	46
5.6.5	Expresión de EPB41L3 estudio transversal y longitudinal .....	47
5.6.6	Expresión de HAND1 estudio transversal y longitudinal .....	49
5.6.7	Expresión de EDNRB estudio transversal y longitudinal .....	50
5.6.8	Expresión de PTPRN estudio transversal y longitudinal .....	52
5.6.9	Estudio de Inmunohistoquímica en muestras con Progresión y Regresión .	54
5.6.10	Resultado expresión Anti-SFRP1 .....	55
5.6.11	Resultado expresión Anti-CDO1.....	56
5.6.12	Resultado expresión Anti-CDX2 .....	58
5.6.13	Resultado expresión Anti-EPB41L3.....	59
5.6.14	Resultado expresión Anti-HAND1.....	60
5.6.15	Correlación entre expresión por RT-PCR e Inmunohistoquímica.....	62
<b>6.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>64</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>69</b>
<b>8.</b>	<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>70</b>
<b>9.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>71</b>
<b>10.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>75</b>

## LISTA DE TABLAS

Pag.

Tabla 1. Cuadro resumen de genes candidatos anotando su función y participación en tumores malignos.....	35
Tabla 2. Total de muestras analizadas según tipo de estudio y grado histológico de la lesión.....	38
Tabla 3. Primers y condiciones estandarizadas para cada uno de los genes.....	40
Tabla 4. Eficiencia de la PCR y coeficiente de correlación para cada gen.....	41
Tabla 5. Relación de casos del estudio transversal según grupo de análisis y diagnóstico histológico.....	43
Tabla 6. Relación de muestras de pacientes con progresión (A) y regresión (B) de la lesión intraepitelial escamosa .....	44
Tabla 7. Comparación del nivel de expresión de SFRP1 en los diferentes grupos de análisis.....	44
Tabla 8. Variación en los niveles de expresión de SFRP1, en las muestras de progresión y regresión .....	45
Tabla 9. Comparación del nivel de expresión de CDO1 en los diferentes grupos de análisis.....	46
Tabla 10. Variación en los niveles de expresión de CDO1, en las muestras de progresión y regresión.....	47
Tabla 11. Comparación del nivel de expresión de CDX2 en los diferentes grupos de análisis.....	47
Tabla 12. Variación en los niveles de expresión de CDX2, en las muestras de progresión y regresión.....	48
Tabla 13. Comparación del nivel de expresión de EPB41L3 en los diferentes grupos de análisis.....	49
Tabla 14. Variación en los niveles de expresión de EPB41L3, en las muestras de progresión y regresión.....	50

Tabla 15. Comparación del nivel de expresión de HAND1 en los diferentes grupos de análisis.....	50
Tabla 16. Variación en los niveles de expresión de HAND1, en las muestras de progresión y regresión.....	51
Tabla 17. Comparación del nivel de expresión de EDNRB en los diferentes grupos de análisis.....	52
Tabla 18. Variación en los niveles de expresión de EDNRB, en las muestras de progresión y regresión.....	53
Tabla 19. Comparación del nivel de expresión de PTPRN en los diferentes grupos de análisis.....	53
Tabla 20. Variación en los niveles de expresión de PTPRN, en muestras de progresión y regresión.....	54
Tabla 21. Graduación de la expresión de los diferentes marcadores de inmunohistoquímica en casos de progresión. Momento 1 (LIEBG) y Momento 2 (LIEAG).....	55
Tabla 22. Graduación de la expresión de los diferentes marcadores de inmunohistoquímica en casos de regresión. Momento 1 (LIEAG) y Momento 2 (LIEBG).....	56
Tabla 23. Variación en la expresión por IHQ de SFRP1, en las muestras de progresión y regresión.....	56
Tabla 24. Variación en la expresión por IHQ de CDO1, en las muestras de progresión y regresión.....	58
Tabla 25. Variación en la expresión por IHQ de CDX2, en las muestras de progresión y regresión.....	59
Tabla 26. Variación en la expresión por IHQ de EPB41L3, en las muestras de progresión y regresión.....	60
Tabla 27. Variación en la expresión por IHQ de HAND1, en las muestras de progresión y regresión.....	62
Tabla 28. Comparación de expresión por RT-PCR e IHQ en progresión .....	63
Tabla 29. Comparación de expresión por RT-PCR e IHQ, en regresión.....	63
Tabla 30. Coeficiente de correlación entre niveles de expresión por RT-PCR e Inmunohistoquímica.....	64

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pag.</b>
Figura 1, NIC I o displasia ligera.....	17
Figura 2, NIC II o displasia moderada.....	18
Figura 3, NIC III, displasia severa o carcinoma in situ.....	19
Figura 4. Incidencia y mortalidad por cáncer en mujeres a nivel mundial.....	20
Figura 5. Tasa ajustada por edad de mortalidad por cáncer de cuello uterino.....	21
Figura 6. Arbol filogenético del virus del papiloma.....	22
Figura 7. Prevalencia de infección por VPH oncogénicos en mujeres.....	23
Figura 8. Carcinogénesis del cáncer del cuello uterino.....	26
Figura 9. Expresión de SFRP1 en las muestras del estudio longitudinal.....	44
Figura 10. Expresión de CDO1 en las muestras del estudio longitudinal.....	45
Figura 11. Expresión de CDX2 en las muestras del estudio longitudinal.....	47
Figura 12. Expresión de EPB41L3 en las muestras del estudio longitudinal.....	48
Figura 13. Expresión de HAND1 en las muestras del estudio longitudinal.....	50
Figura 14. Expresión de EDNRB en las muestras del estudio longitudinal.....	51
Figura 15. Expresión de PTPRN en las muestras del estudio longitudinal.....	53
Figura 16. Expresión de SFRP1 a través de IHQ en tejido cervical en progresión.....	56
Figura 17. Expresión de SFRP1 a través de IHQ en tejido cervical en regresión.....	56
Figura 18. Expresión de CDO1 a través de IHQ en tejido cervical en progresión.....	57
Figura 19. Expresión de CDO1 a través de IHQ en tejido cervical en regresión.....	57
Figura 20. Expresión de CDX2 a través de IHQ en tejido cervical en progresión.....	58
Figura 21. Expresión de CDX2 a través de IHQ en tejido cervical en regresión.....	59
Figura 22. Expresión de EPB41L3 a través de IHQ en tejido cervical en progresión.....	60
Figura 23. Expresión de EPB41L3 a través de IHQ en tejido cervical en regresión.....	60
Figura 24. Expresión de HAND1 a través de IHQ en tejido cervical en progresión.....	61
Figura 25. Expresión de HAND1 a través de IHQ en tejido cervical en regresión.....	61

## LISTA DE ANEXOS

**Pag.**

Anexo A, Extracción de ácidos nucleicos a partir de muestras embebidas en parafina por medio de AllPrep Quiagen.....	75
Anexo B, Preparación de muestras de ARN previo a la RT-PCR y Kit de síntesis de cDNA Super Script VILO- INVITROGEN. ....	77
Anexo C, Procedimiento para realización del estudio de inmunohistoquímica. ....	78
Anexo D. Curvas de eficiencia de PCR para cada gen .....	79

## RESUMEN

Teniendo en cuenta la historia natural del cáncer del cuello uterino, en donde las lesiones preneoplásicas de bajo y alto grado pueden presentar fenómenos de regresión o progresión, existe gran interés en la búsqueda de biomarcadores que permita predecir el comportamiento de las lesiones preneoplásicas del cérvix. Estos biomarcadores pudieran ser de origen genético, o epigenéticos que alteren la expresión de los genes y que pudieran estar asociados con la carcinogénesis en diferentes tipos de tejido humano. En nuestro trabajo de investigación nuestros genes candidatos fueron: SFRP1, PTPRN, CDO1, EDNRB, CDX2, EPB41L3 y HAND1. La metodología consistió en el análisis de expresión de cada uno de estos genes en un primer estudio transversal de 30 muestras (9 normales; 10 LIEBG; 11 LIEAG) y posteriormente en otro estudio de tipo longitudinal donde se incluyeron 6 casos de progresión y 5 regresión. En el estudio transversal EDNRB y CDX2, mostraron diferencia en la expresión en LIEAG en comparación con el grupo normal y LIEBG. En el longitudinal, PTPRN y SFRP1, mostraron aumento en su expresión por RT-PCR en los casos de progresión y regresión respectivamente. Con inmunohistoquímica se observó disminución en la expresión para SFRP1 y CDX2 en los casos de progresión. En conclusión, SFRP1 pudiera considerarse un biomarcador asociado a metilación por observarse menor expresión en progresión y mayor expresión en regresión, en las lesiones preneoplásicas del cérvix. EDNRB y CDX2 también podrían comportarse como biomarcadores asociados a un mecanismo molecular diferente de metilación.

## 1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial el cáncer de cuello uterino representa la tercera causa de incidencia y la cuarta de mortalidad por cáncer en las mujeres. En Colombia, esta enfermedad es la segunda causa de morbi-mortalidad, afectando principalmente mujeres entre 15 y 39 años. Aunque, se han obtenido descensos en las tasas de mortalidad por este cáncer durante los últimos años, aún las cifras en Colombia se sitúan por encima del promedio mundial.

El cáncer del cuello uterino se puede detectar a tiempo, siempre y cuando se realicen periódicamente las pruebas de tamización, tales como la citología vaginal, técnicas de inspección visual del cuello uterino y pruebas de detección molecular del ADN-VPH. Esta última técnica fue incluida en el País, a través del acuerdo 029 de 2011 de la comisión de regulación en salud (Comision de Regulacion en Salud, 2011) y reglamentada por el plan decenal de cáncer en Colombia 2012-2021(Gaviria et al., 2013) , en donde se anota que la prueba molecular del VPH se debe realizar en mujeres de 30 a 65 años y con una periodicidad de cada 5 años.

El proceso carcinogénico del CaCU comienza a través de la infección de las células epiteliales escamosas del cuello uterino por parte del Virus del Papiloma Humano (VPH), generando posteriormente lesiones intraepiteliales de bajo y alto grado hasta continuar con la aparición del CaCU infiltrante. Sin embargo, este proceso no siempre es continuo y por el contrario aproximadamente un 60% de las lesiones intraepiteliales de bajo grado regresan y solo un 10% de los casos progresan a lesiones intraepiteliales de alto grado (Ostor, 1993), Por lo tanto, sería de gran importancia poder identificar algunos biomarcadores, que nos permitan focalizar y predecir aquellas mujeres con mayor probabilidad de progresión de su lesión preneoplásica cervical.

Por todo lo anterior, se planteó en éste estudio identificar 7 posibles biomarcadores involucrados en la progresión o regresión de las lesiones cervicales, teniendo como antecedente un estudio previo en donde se detectaron un grupo de genes hipermetilados y subexpresados en muestras de tejido cervical de pacientes Colombianas, con diferentes grados de lesiones preneoplásicas, cáncer invasor y muestras sin ningún grado de lesión cervical. A pesar de estudios previos sobre biomarcadores tales como: DAPK1, TWIST y MGMT, éstos han sido estudiado en población asiática y europea y con datos inconsistentes con relación al porcentaje de metilación en las lesiones preneoplásicas y cancerosas del cuello uterino.

El diseño de nuestro trabajo de investigación contó inicialmente con un estudio transversal donde encontramos que los genes EDNRB y CDX2, tuvieron diferencia en expresión al comparar el grupo de pacientes que tenían LIE-AG contra aquellos del grupo normal y LIE-BG. Posteriormente, se realizó un estudio longitudinal encontrándose para PTPRN y SFRP1 mayor expresión en los casos de progresión y regresión, respectivamente, luego de comparar sus muestras en dos momentos diferentes.



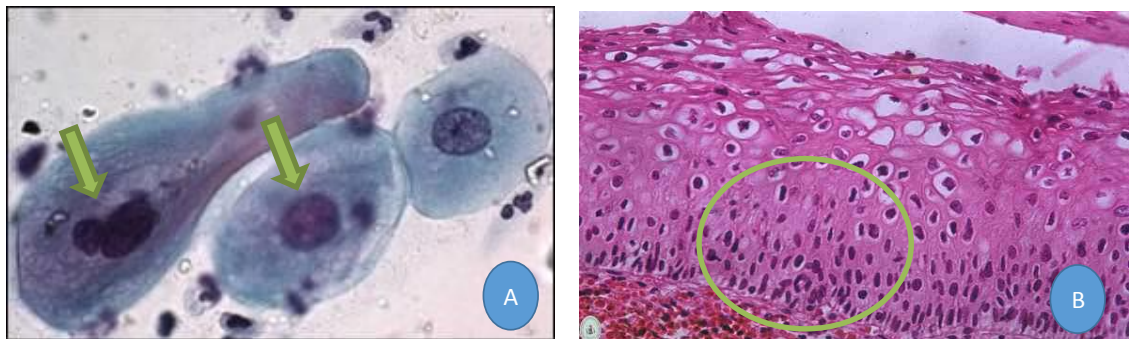
## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 CANCER DE CUELLO UTERINO

#### 2.1.1 Definición

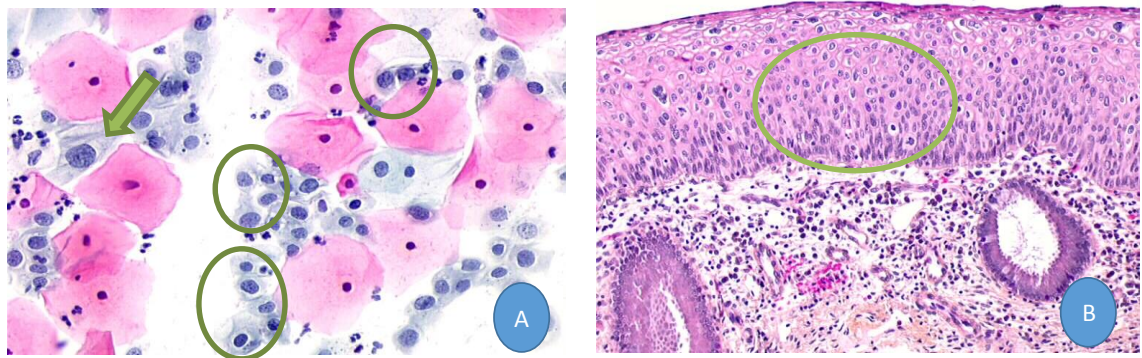
La Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC), se define como cualquier alteración de las células escamosas, que ocurre en la zona de transformación o cercana a ésta y cuya alteración se encuentra relacionada a la infección por virus del Papiloma Humano (VPH). (Crum, y otros, 2006). El NIC a su vez posee una graduación citológica e histológica dependiendo de la severidad de los cambios nucleares en las células escamosas, así como la extensión o compromiso de la lesión displásica a nivel del epitelio exocervical y/o de la zona de transformación. Los NIC se clasifican como NIC I o displasia ligera; NIC II o displasia moderada y NIC III o displasia severa o Carcinoma in Situ

Los NIC I (displasia ligera), se caracterizan por presentar células con ligera hiper cromía e irregularidad de su contorno nuclear, con adecuada relación núcleo / citoplasma. Figura 1A. Desde el punto de vista histológico, las alteraciones celulares se localizan únicamente en el tercio inferior del epitelio escamoso y son muy pocos frecuentes la presencia de figuras mitóticas atípicas. Figura 1B



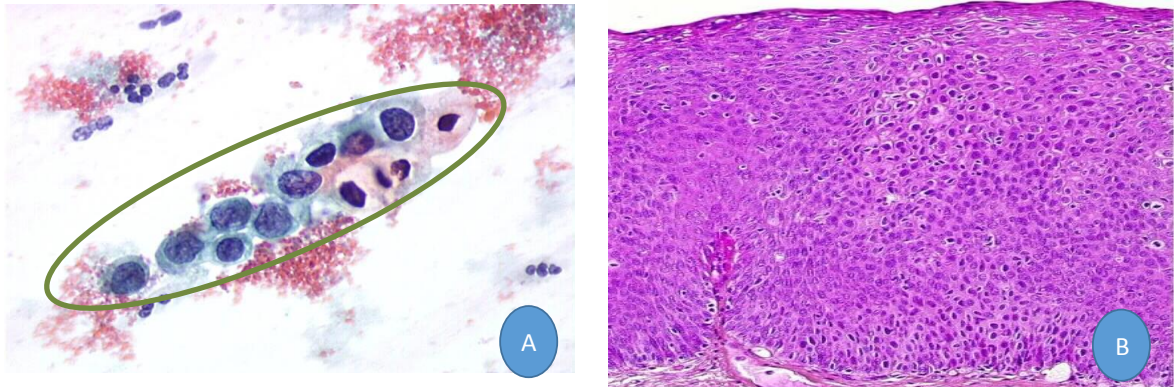
**Figura 1,** NIC I o displasia ligera. (A) extendido citológico con células escamosas y cambios nucleares de displasia ligera -40X. (B) cortes histológicos coloreados con H&E observándose cambios celulares en el tercio inferior del epitelio – 40X. Tomado de Atlas de Histopatología IARC, 2003

Los NIC II (displasia moderada), se caracterizan por presentar las células escamosas con mayor hipercromasia e irregularidad nuclear y hay disminución en la relación núcleo/citoplasma. **Figura 2A**. En la histología se aprecia mayor desorganización y trastornos en la maduración de los queratinocitos y pueden encontrarse figuras mitóticas atípicas. La extensión de la lesión displásica puede alcanzar hasta los dos tercios inferiores del epitelio escamoso. **Figura 2B**



**Figura 2**, NIC II o displasia moderada. (A) extendido citológico con células escamosas y cambios nucleares de displasia moderada -40X. (B) cortes histológicos coloreados con H&E observándose cambios celulares especialmente en los dos tercios inferiores del epitelio -10X. Tomado de Atlas de Histopatología IARC, 2003

Los NIC III (displasia severa), se caracterizan porque células escamosas muestran notoria hipercromasia y pleomorfismo de los núcleos, con nucléolos evidentes y muy escaso citoplasma. Figura 3A. En el estudio histológico se aprecia un extenso crecimiento de células displásica a través de todo el espesor del epitelio, con múltiples figuras mitóticas y escaso citoplasma acompañante. La lesión tumoral aún conserva intacta su membrana basal y no hay proyecciones tumorales hacia el estroma subyacente Figura 3B.

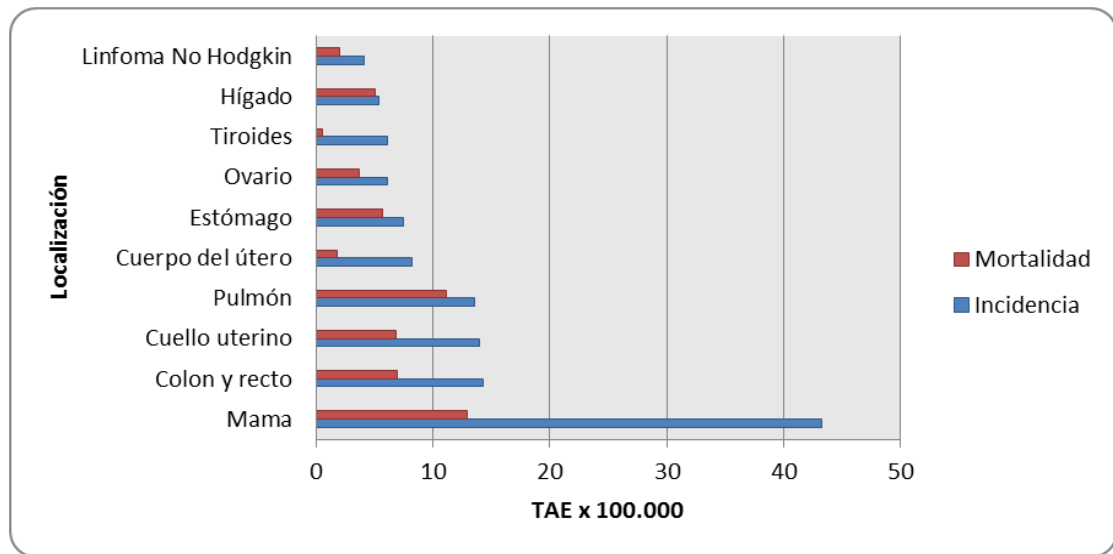


**Figura 3,** NIC III, displasia severa o carcinoma in situ. (A) extendido citológico con células escamosas y cambios nucleares de displasia severa con un fondo hemorrágico -40X. (B) cortes histológicos coloreados con H&E observándose cambios celulares en todo el espesor del epitelio -10X. Tomado de Atlas de Histopatología IARC, 2003

En 1989, el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos propone una nueva clasificación orientada inicialmente para los reporte de citología vaginal, conocida como clasificación Bethesda e introduce el concepto de Lesión Intraepitelial Escamosa de bajo grado (LIE-BG) y de alto grado (LIE-AG). La categorización de LIE-BG comprende los cambios citológicos e histológicos asociados a infección por VPH y NIC I; mientras que el LIE-AG, abarca las lesiones NIC II y NIC III

### 2.1.2 Epidemiología

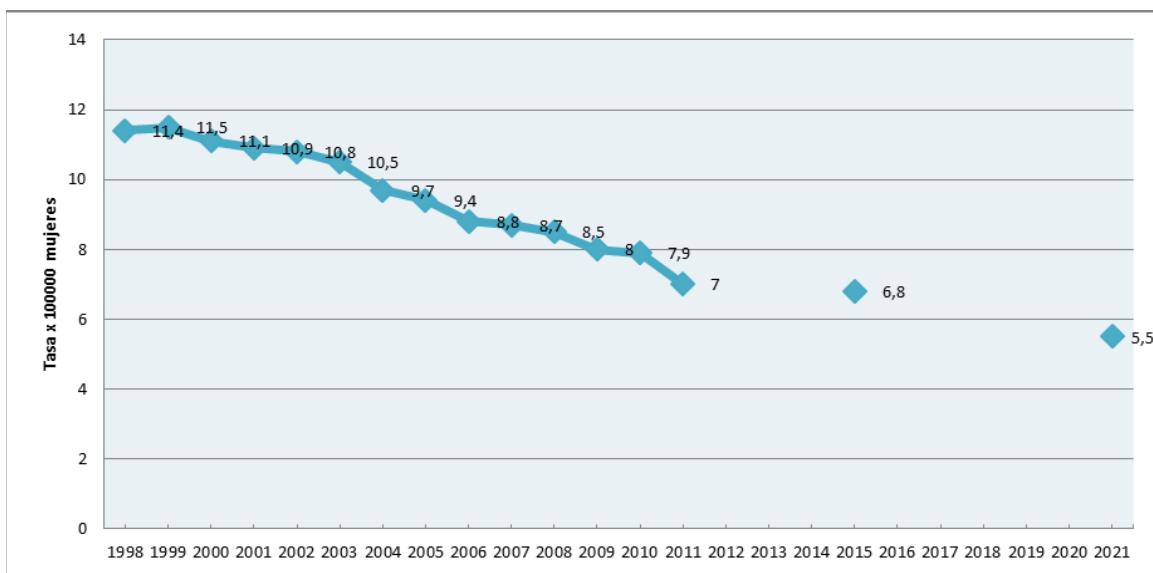
Se estima que a nivel mundial el cáncer de cuello uterino es la tercera causa de incidencia y la cuarta causa de mortalidad por cáncer en las mujeres. Cada año se registran 527.624 casos nuevos y 265.653 defunciones por esta causa, cifras que representan una tasa ajustada por edad (TAE) de 14 x 100.000 mujeres y 6,8 x 100.000 mujeres respectivamente. Este tipo de tumor maligno es superado en incidencia por el cáncer de mama y de colon-recto; entre tanto, la mortalidad sólo es mayor en el cáncer de mama, pulmón y colon-recto. Figura 4 (Ferlay et al., 2013)



**Figura 4.** Incidencia y mortalidad por cáncer en mujeres a nivel mundial, TAE x 100.000

TAE: Tasa Ajustada por Edad. Tamado de GLOBOCAN, IARC 2012

Estimaciones de Globocan para el 2012 señalan que en Colombia, se presentan 4.661 casos nuevos de cáncer de cuello uterino cada año con una TAE de 18.7 x 100.000 mujeres. Y con respecto a la mortalidad por esta patología, los cálculos realizados por el Instituto Nacional de Cancerología a partir de las Estadísticas Vitales del Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE) dan cuenta del descenso en las tasas de mortalidad, en este sentido los últimos datos disponibles indican que en Colombia la TAE de mortalidad para el 2011 fue de 7 por 100.000 mujeres, lo cual significa una reducción en la tasa de mortalidad del 38,6% si se compara con la cifra registrada para el año 1998 (INS, 2011) . Ver figura 5



**Figura 5.** Tasa ajustada por edad de mortalidad por cáncer de cuello uterino por 100.000 mujeres. Colombia 1998-2011. Tomado de estadísticas vitales DANE

### 2.1.3 Factores de Riesgo

#### 2.1.3.1 Virus del Papiloma Humano (VPH)

El Virus del Papiloma Humano, es un virus ADN encapsulado, de la familia papillomaviridae, con una configuración Icosaédrica, miden 60nm y tiene aproximadamente 8000 pb. En la actualidad se han descrito ciento diez y ocho tipos de papilomavirus, reconocidos por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV). Este virus se divide en 16 géneros basados en la homología del ADN, designados con una letra del alfabeto griego. Los géneros más asociados con el desarrollo del cáncer son el alfa y beta, dentro del género alfa-papilomavirus, se encuentran los tipos de VPH oncogénicos más prevalentes; VPH 16 y VPH 18, los cuales han sido asociados con el CaCU (Muñoz et al., 2003; Villiers et al., 2004) . Figura 6

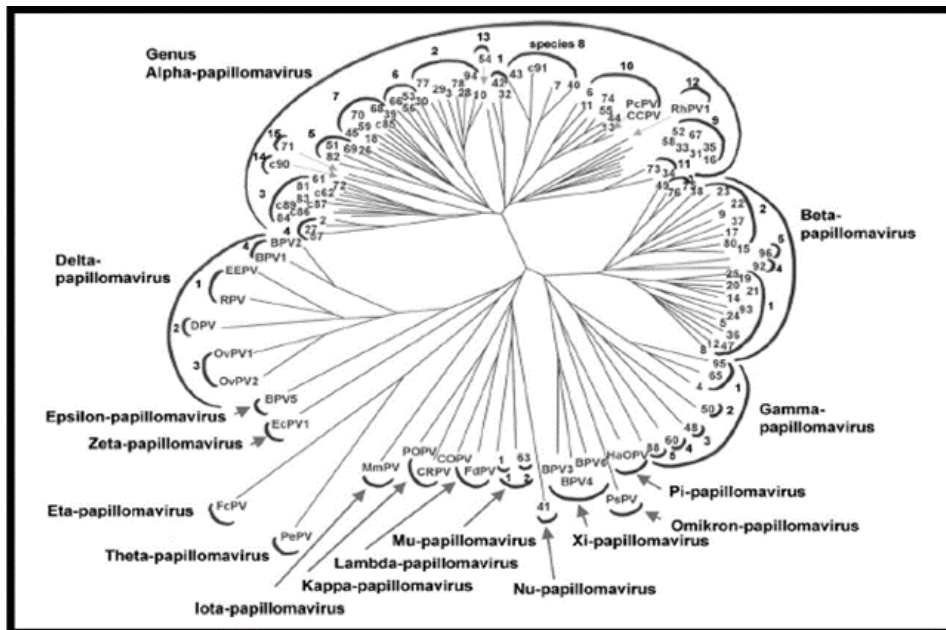


Figura 6. Arbol filogenético del virus del papiloma basado en el marco de lectura abierto L1.

Tomado de Villiers et al., 2004

El VPH es un virus epiteliotrópico, es decir que infecta las células epiteliales de revestimiento, tales como piel y mucosa y es allí donde pueden desarrollar diferentes entidades patológicas, dependiendo del tipo viral que haya infectado a la célula hospedera. Existen dos grandes grupos del VPH, los de bajo riesgo que están asociados con la aparición de lesiones benignas y los de alto riesgo que se encuentran relacionados con los procesos tumorales malignos. Los VPH de bajo riesgo más frecuente son los subtipos: 6 y 11, que se encuentran en lesiones tales como papilomas escamosos y verrugas cutáneas. Mientras que los tipos de alto riesgo más frecuentes asociados a cáncer cervical en un estudio poblacional mundial son: 16,18,45, 31 y 52 (Muñoz et al., 2003).

La incidencia de la infección por VPH muestra dos picos, el primero de ellos ocurre en mujeres menores de 25 años y un segundo pico menos acentuado a partir de los 50 años (Castle et al., 2005). Estos resultados fueron similares a los publicados por un estudio en mujeres colombianas (Muñoz et al., 2004) Figura 7

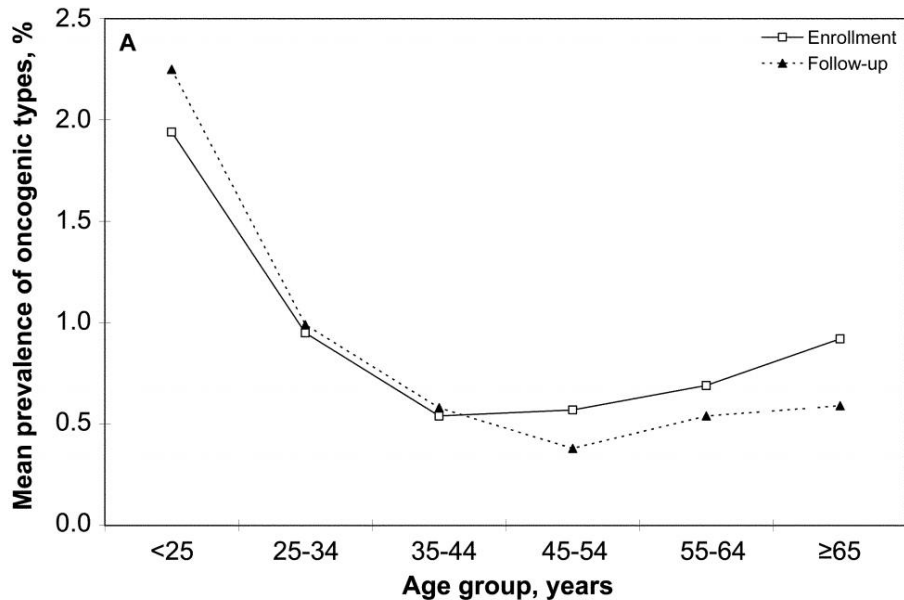


Figura 7. Prevalencia de infección por VPH oncogénicos en mujeres Guanacaste - Costa Rica.  
Tomado de Castle et al., 2005

La infección de la célula hospedera por parte del VPH, es la causa necesaria más no suficiente para que se desarrolle el cáncer del cuello uterino (Walboomers et al., 1999), es decir la sola presencia del VPH en las células escamosas, no indica la aparición de futuras LIE-AG o cáncer invasor, por cuanto la mayoría de las infecciones son eliminadas por medio del sistema inmunológico (Stanley, 2012)

### 2.1.3.2 Otros factores de riesgo asociados a cáncer de cuello uterino

El tabaco a través de sus sustancias tóxicas como Nicotina y Cotinina, pueden ser absorbidas por el torrente sanguíneo y alcanzar el cuello uterino, donde a través del moco cervical éstas sustancias pueden estar en contacto con las células epiteliales escamosas. Estas dos sustancias pueden alterar el ADN de las células escamosas a través de formaciones de enlaces covalentes. (Ali et al., 1994). La asociación entre fumar e infección por VPH ha sido controversial encontrándose publicaciones como la realizada por el Insituto Nacional de Cáncer (INC) en mujeres colombianas donde no hubo asociación entre ellas (Muñoz et al., 2004).

Otro factor de riesgo asociado es la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), que causa daño al sistema inmunológico y ocasiona que las mujeres y hombres estén en mayor riesgo de infecciones con VPH. El estudio publicado por (Moscicki et al., 2000), mostró que un 77.4% de las mujeres infectadas por HIV también tenían infección cervical por VPH, en comparación del grupo de mujeres VIH(-) que tuvo un 54,4% de infección por VPH. Adicionalmente, solo un 30% de las mujeres VIH (+) y VPH (+) tuvieron un reporte de citología vaginal como “negativo para anormalidad”, en comparación a un 70% de las mujeres VIH (-) y VPH (+). Uno de los trastornos inmunológicos que ocasiona el VIH es la disminución de linfocitos T CD4+ circulantes, el cual a su vez podría favorecer la persistencia de la infección por VPH.

Existe evidencia de que el uso de píldoras anticonceptivas por períodos prolongados aumenta el riesgo de cáncer de cuello uterino., argumentando la influencia sobre el crecimiento epitelial que ejercen los estrógenos sobre la zona de transformación cervical. El riesgo de CaCU aumenta mientras más tiempo una mujer tome las píldoras, pero el riesgo se reduce nuevamente después de suspender las mismas. (Kjellberg et al., 2000)

Con respecto a la multiparidad, varios estudios epidemiológicos realizados en Holanda, Inglaterra, Costa Rica, USA y por la Agencia Internacional de Investigación contra el cáncer (IARC) han demostrado la relación directa entre el número de partos y la probabilidad de desarrollar cáncer in situ o invasor del cuello uterino. Se ha mencionado como una posible causa de esta relación, una mayor exposición a hormonas durante el embarazo. (Muñoz N, 2003). Sin embargo, En Colombia en un estudio posterior publicado por (Muñoz et al., 2004), realizado por el INC, el resultado con respecto a la paridad fue discordante, por cuanto la paridad se comportó como un factor protector especialmente para la infección de VPH de bajo riesgo.

Y por último desde el punto de vista genético, el riesgo de desarrollar CaCu es 74-80% mayor en mujeres que tengan un familiar de primer grado que también haya presentado esta enfermedad, en comparación con la población general (Hussain, Sundquist, & Hemminki, 2008). También es importante anotar que en las últimas dos décadas se han venido desarrollado investigaciones en el campo de la epigenética, especialmente en la búsqueda de biomarcadores asociados a hipermetilación, que puedan comportarse como



un factor de riesgo que permitan predecir la progresión de LIEBG hacia CaCU. (Esteller, 2008)(Mikeska & Craig, 2014)

#### **2.1.4 Biología del cáncer cervical**

La historia natural del CaCU, comienza con la infección del VPH quien a través de pequeñas microabrasiones o laceraciones de la superficie epitelial alcanza la capa basal del epitelio exocervical o de la zona de transformación, el cual contiene células mitóticamente activas. El proceso de unión y de entrada del virus en la célula, no está del todo claro y son objeto de estudio. La proteína integrina  $\alpha$ -6 y los receptores tipo heparan sulfato (HSPG) se han sugerido como receptores del VPH y los viriones son internalizados por endocitosis a través de una vía dependiente de Clatrina.(Doorbar, 2006)

Una vez establecidas en el núcleo de las células basales, se replica el ADN viral y se procede a la síntesis de proteínas del VPH en la célula hospedera. Cuando la célula infectada alcanza las capas más superficiales, y por tanto el máximo grado de diferenciación, se activan los genes de la región L que codifican las proteínas estructurales de las partículas víricas, que forman la cápside y permiten el ensamblaje de nuevas partículas virales que repetirán el ciclo infeccioso en las células epiteliales vecinas

Al comienzo de la infección por VPH, las células escamosas basales presentan cambios citológicos sutiles, tales como ligero agrandamiento e hiper cromasia nuclear, pero con la progresión del proceso infeccioso, comienzan a ocurrir cambios nucleares característicos de la infección por VPH, denominado Coilocitosis, en donde la célula presenta aumento de tamaño, binucleación y halo claro perinuclear. Posteriormente, con la alteración del ciclo celular y el mecanismo de apoptosis, producido por la interacción de las proteínas oncogénicas virales E7 y E6 con pRb y P53 respectivamente, los cambios citológicos progresan hacia una LIE-AG (NIC II – NICIII). Figura 8. El proceso de la carcinogénesis cervical puede tardar entre 10 y 15 años desde el inicio de la infección por el VPH. (Woodman, Collins, & Young, 2007)

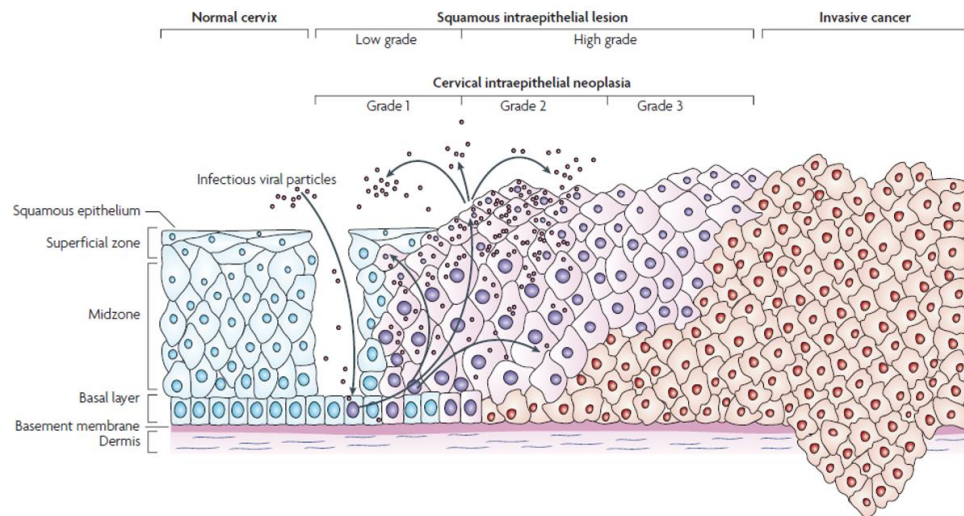


Figura 8. Carcinogénesis del cáncer del cuello uterino. Tomado de Woodman et al., 2007

Es importante anotar que el proceso de carcinogénesis cervical no es unidireccional, es decir que luego de la infección por VPH no siempre ocurre un proceso evolutivo de las lesiones preneoplásicas hacia el cáncer escamocelular infiltrante. Por el contrario, la mayoría de los LIE-BG regresan (aproximadamente 60%), otras persisten (30%); otro 10% progresan a lesiones de alto grado y menos del 1% progresan a cáncer invasor. (Ostor, 1993)

Incluso las lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (NIC II – NIC III) también pueden presentar regresión de su lesión en un 40% y 30%, respectivamente. Pero el porcentaje de progresión de los NIC III hacia cáncer invasor aumenta notoriamente hasta un 22%. (Ostor, 1993)

Por lo anterior, se han venido realizando diversos estudios en busca de posibles biomarcadores en la célula hospedera que permitan predecir con mayor exactitud la progresión o regresión de las lesiones preneoplásicas del cérvix. Alguno de los biomarcadores estudiados en cáncer cervical son: detección de RNA de oncogenes E6 y E7; P16/Ki67; anomalías cromosómicas y marcadores epigenéticos como metilación del ADN en genes candidatos. (Sahasrabudde et al., 2011)

## **2.2 BIOMARCADORES EN CANCER**

El Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH) define un biomarcador como una característica que es objetivamente medible y evaluable, como un indicador de un proceso biológico normal, proceso patogénico o respuesta farmacológica a una intervención terapéutica. (Dasari et al., 2015)

Con respecto a las lesiones tumorales, los biomarcadores, pueden ser moléculas que permitan predecir sobre el comportamiento clínico de las lesiones, respuesta esperada hacia tratamientos farmacológicos y expectativa de vida de los pacientes. Hoy en día son varios los marcadores que están siendo utilizados en la práctica clínica, por ejemplo para el cáncer de mama se utilizan los receptores de progesterona, estrógenos, BRCA1/BRCA2, así como el HER-2; en cáncer de colon los marcadores BRAF y KRAF actúan como factor pronóstico de la lesión tumoral; PSA en cáncer de próstata; y el marcador SOX11 en cáncer gástrico el cual está asociado con un peor pronóstico.

Uno de los biomarcadores que ha venido siendo estudiado en la patología tumoral maligna es la metilación del ADN, el cual es un mecanismo epigenético en donde se le adiciona un grupo metilo a la citosina que antecede a una guanina, estas regiones han sido denominadas CpG, las cuales se ha visto hipermetiladas en varios tipos de cáncer, especialmente en las regiones promotoras de genes que pueden participar en la regulación del ciclo celular, reparación del ADN, interacción célula-célula, apoptosis y angiogénesis. Esta hipermetilación del ADN, generalmente se acompaña de un silenciamiento génico es decir hay disminución o ausencia en la expresión de ARN. (Esteller, 2008)

### **2.2.1 Biomarcadores en Cáncer del Cuello Uterino**

La carcinogénesis del CaCU comienza con la infección por VPH, continuando luego con las lesiones preneoplásicas y por último la instauración del carcinoma invasor. Sin embargo hay que tener presente que la infección por VPH es causa necesaria pero no suficiente para que se desarrolle el CaCU (Walboomers et al., 1999). Se estima que un 92% de mujeres infectadas por VPH y sin alteración citológica, resolverán su infección en un periodo de 5 años (Elfgren et al., 2000) y las mujeres sin alteración citológica pero con

infección por VPH de alto riesgo, específicamente VPH 16, un 15% de éstas desarrollarán LIE-AG. (Xi et al., 1997)

Por esta razón, ha venido existiendo el interés en la búsqueda de biomarcadores en las células hospederas, que puedan funcionar como un factor pronóstico con respecto a la historia natural de las lesiones preneoplásicas del cuello uterino. Es decir poder focalizar aquellas mujeres que tengan mayor probabilidad en progresión de su LIE-BG hacia LIE-AG. Uno de estos biomarcadores estudiados en CaCU es la metilación del ADN en algunos genes candidatos, comparando los niveles de expresión entre las muestras con diagnóstico de LIEBG, LIEAG y cáncer invasor con respecto a muestras que no evidencien lesiones intraepiteliales cervicales. A la fecha han sido varios los genes candidatos estudiados como posibles biomarcadores del CaCU, entre los cuales podemos mencionar DAPK, RASSF1, CD1, MGMT, CADM1, entre otros. Sin embargo, estos estudios han sido en población extranjera (Korea, Taiwan y Holanda) y las muestras fueron tomadas por cepillado cervical o de contenido residual de citología en base líquida. Adicionalmente, ningún estudio hasta la fecha ha reportado el comportamiento de dichos biomarcadores en al menos dos muestras en diferentes tiempos de las mismas pacientes, para predecir de una mejor manera la progresión o regresión de la patología.

Un estudio realizado por (García et al., 2012) con muestras de tejido cervical con diagnóstico histológico de negativo para displasia, LIEBG, LIEAG y CaCU, en población Colombiana se encontraron 1069 genes hipermetilados y 89 genes hipometilados a través de las plataformas Illumina y Affimetrix respectivamente, donde finalmente se encontraron 132 genes que se encontraron hipermetilados y a su vez subexpresados, al comparar las muestras con cáncer invasor y LIEAG vs LIEBG y grupo normal.

Teniendo como base el listado de genes subexpresados e hipermetilados anteriormente descritos, se procedió a la búsqueda de aquellos que tuvieran publicaciones en revistas internacionales reportando alteraciones epigenéticas asociadas con algún tipo de cáncer en el cuerpo humano, incluyendo CaCU. También se priorizó aquellos que tuvieran participación en la vía de señalización WNT y que tuvieran la comercialización de los anticuerpos para estudios de inmunohistoquímica en bloques de parafina con distribuidor autorizado en Colombia. Por último, se incluyeron en nuestro estudio los siguientes genes

candidatos para ser evaluados como posibles biomarcadores en la progresión o regresión de las lesiones preneoplásicas del cuello uterino: **SFRP1, PTPRN, CDO1, EDNRB, CDX2, EPB41L3, HAND1**

### **2.2.2 Impacto clínico de biomarcadores en CaCU**

La citología cervico-uterina (CCU), es una técnica de tamización consistente en el estudio citológico de células exfoliadas del cérvix para identificar cambios nucleares displásicos especialmente en las células epiteliales escamosas. Esta técnica viene siendo utilizada ampliamente a nivel mundial con el propósito de detectar de manera temprana lesiones premalignas en el cuello uterino, sin embargo su sensibilidad es variable dependiendo de la calidad al momento de tomar la muestra que garantice la presencia de células escamosas del epitelio exocervical y sobre todo a nivel de la zona de transformación, además también depende de la calidad en la lectura de los extendidos citológicos. En Colombia esta sensibilidad se ha encontrado alrededor de un 50%. (Murillo et al.; 2011)

Adicional a lo anteriormente mencionado, en Colombia los programas de detección temprana de cáncer del cuello uterino, han mostrado problemas de cobertura en la tamización, así como la pérdida de adherencia de las mujeres con resultados positivos en la citología para continuar con su tratamiento. En Colombia el 35,8% de las mujeres con diagnóstico de LIEAG no acceden a su tratamiento (Murillo et al., 2011). Esta situación es similar con lo reportado por (Thinkhamrop et al., 1998) en donde 41.1% de las mujeres con anormalidad en su CCU no recibieron su tratamiento, manifestando que existió fallas en la comunicación entre el clínico y las pacientes, búsqueda de tratamiento en otros hospitales, mala interpretación de los resultados por parte de las mujeres, entre otros.

La búsqueda de biomarcadores asociados con las lesiones preneoplásicas y CaCU, permitirían focalizar a las mujeres que tengan mayor probabilidad de progresión de sus lesiones intraepiteliales escamosas. Por tal motivo serían una pieza muy importante para mejorar la adherencia y seguimiento de las mujeres con resultados anormales en citología y biopsias cervicales y permitirían el acceso oportuno de las pacientes a su tratamiento definitivo (Dasari et al., 2015). Algunos de los biomarcadores diferentes a la tipificación viral,

que están siendo estudiado en la célula hospedera son: detección de mRNA E6/E7; p16, anomalías cromosómicas como deleción 3p; y marcadores epigenéticos como metilación del ADN en genes supresores tumorales. (Sahasrabudde et al., 2011)

### **2.2.3 Genes candidatos en estudio**

#### **SFRP1 (Secreted frizzled-related protein1)**

Este gen se encuentra ubicado en el cromosoma 8(p.11.21) y codifica una proteína (SFRP1) que actúa como modulador de la vía de señalización Wnt, la cual juega un papel muy importante en el desarrollo embrionario, diferenciación celular y proliferación celular y se ha evidenciado la alteración de esta vía de señalización en varias entidades tumorales malignas en el ser humano, tales como cáncer colorectal, de seno, hepático, próstata y pulmonar.

Se ha propuesto que SFRP1 actúa como un gen supresor, en la categoría de aquellos que afectan el crecimiento celular. En los tipos de cánceres anteriormente mencionados, este gen se ha encontrado hipermetilado y por lo tanto pierde su propiedad de gen supresor tumoral. También hay estudios con cáncer de cérvix e hipermetilación del ADN de SFRP1 (Sova et al., 2006)

#### **PTPRN (Protein-tyrosine phosphatase, receptor –type N)**

El gen PTPRN contiene 23 exones, siendo identificado por Lan et al en 1994 en los islotes beta de las células pancreáticas humanas y se encuentra localizado en el cromosoma 2, q35. Este gen codifica una proteína que actúa como receptor y posee un solo dominio transmembranal.

PTPRN, participa en procesos de fosforilación reversible de la proteína Tirosina, la cual a su vez interactúa para el control de señales de transducción, proliferación y diferenciación celular. La importancia de los PTP en los procesos fisiológicos ha sido demostrada en

algunos casos como por ejemplo CD45 es esencial tanto para la señalización como para la maduración de linfocitos T.

PTPRN, se ha asociado con la presencia de diferentes tipos de tumores malignos tales como: esófago, seno, próstata, colon, pulmón, linfoma T y tumores neuroendocrinos. También existe un estudio donde se relaciona el estado de metilación de PTPRN como factor pronóstico de supervivencia libre de enfermedad posterior al tratamiento con quimioterapia en pacientes con cáncer de ovario (Bauerschlag et al., 2011)

### **CDO1 (Cysteine Dioxygenase type 1)**

Este gen se localiza a nivel del cromosoma 5 (q22.3) y codifica una proteína que participa en la vía metabólica del Piruvato y varios componentes sulfurados. Participa en la regulación celular de las concentraciones de Cisteína, especialmente a nivel hepático y de la médula ósea. La enzima Cisteína Dioxygenasa es vital para el ser humano, debido a que participa en la biodegradación de la Cisteína tóxica y por lo tanto, regula la concentración de esta enzima a nivel corporal.

CDO1 participa en la transcripción de genes específicos a nivel hepático, gracias a su unión con el factor nuclear HNF-3. Alteración en la expresión de este gen ha sido estudiado e implicado en tumores de tipo colorectal, pulmonar, mamario, esofágico, gástrico y con los linfomas cutáneos de linaje T. Dado que estas patologías se ha encontrado un estado de hipermetilación con disminución en su expresión de RNA, se le ha postulado como un gen supresor tumoral (Brait et al., 2012)

### **EDNRB (Endothelin receptor type B)**

El gen EDNRB se encuentra localizado en el cromosoma 13 (13q22) y codifica para un receptor ligado a la proteína G para la Endotelina 3. EDNRB está aceptado como uno de los genes responsables de la enfermedad de Hirschsprung, debido a que interviene para el normal desarrollo del tejido ganglionar entérico., la cual juega un papel muy importante durante el desarrollo embriogénico de la población celular de la cresta neural. Este gen

interviene en la vía de señalización de la endotelina, la cual favorece la angiogénesis, expansión metastásica del tumor e inhibe procesos de apoptosis

Las Endotelinas pertenecen a una familia de potentes péptidos vasoactivos, consistentes de 3 isopéptidos: EDN1; EDN2; Y EDN 3. Un diverso grupo de actividades fisiológicas son realizadas por las endotelinas, sugiriendo la existencia de varios subtipos de receptores ET. Takayanagi et al, en 1991 describieron dos subtipos de receptores ET, principalmente los de tipos ET1 que son específicos y los ET no selectivos.

Alteraciones epigenéticas asociadas a hipermetilación del promotor del EDNRB, se ha visto implicado en carcinoma escamocelular esofágico, leucemia, cáncer gástrico, carcinoma nasofaríngeo, melanoma, cáncer de pulmón y también en CaCU (Watanabe et al., 2014); (Vasiljevic et al., 2014), .

### **CDX2 (Caudal – type Homeobox Transcription Factor 2)**

A partir del año 2006 con las investigaciones del Doctor Deb et al, reportaron la expresión del factor de transcripción Cdx2, en el núcleo de las células en división del Blastómero y su presencia es esencial para el desarrollo embrionario en los ratones. El CDX2 es un gen localizado en el cromosoma 13 (q12.2) y codifica un factor de transcripción y juega un papel esencial en el desarrollo del intestino, inhibiendo la proliferación y promoviendo la diferenciación y expresión de genes específicos del Intestino. Esta expresión específica de genes intestinales, requieren la actividad reguladora de factores de transcripción, tales como: HNF4 $\alpha$ , GATA, ETS, CDX1 y CDX2.

CDX2 se ha utilizado como un biomarcador para algunos tipos de cáncer gastrointestinal y también pulmonar. La mayoría de los cánceres colorectal muestran una fuerte expresión nuclear y solo entre un 10-30% de los casos muestran pérdida o pobre expresión del CDX2. Esta pérdida de expresión del CDX2 se correlaciona con el grado de diferenciación nuclear, localización proximal del tumor, mutación del BRAF y hay algunos estudios clínicos que correlacionan la pérdida de expresión del CDX2 menor sobrevivida de los pacientes con cáncer colorectal (Liu et al., 2012)..



### **EPB41L3 (erythrocyte membrane protein band 4.1-like 3)**

Este gen se localiza en el cromosoma 18 (p11-32) y codifica una proteína localizada en la membrana citoplasmática, que interviene en la vía de señalización Tight Junction, la cual participa en la regulación del citoesqueleto. En condiciones normales este gen es altamente expresado en tejido nervioso, testicular, placentario, adiposo y renal.

Este gen tiene función supresora tumoral, inhibiendo la proliferación tumoral y promoviendo la apoptosis y se ha observado la sub-expresión de este gen en patología tumoral maligna, tales como: carcinoma de próstata, meningioma y carcinoma pulmonar de célula pequeña (Vasiljevic et al., 2014)

### **HAND1 (Heart And Neural Crest Derivatives Expressed 1)**

Este gen se localiza en el cromosoma 5 (q33.2), codificando una proteína que se encuentra involucrado en procesos de morfogénesis, especialmente a nivel cardíaco (ventrículo derecho y arco aórtico). Este gen ha estado implicado en anomalías congénitas del corazón como la tetralogía de Fallot y también hay estudios donde reportan alteraciones epigenéticas de HAND1 con cáncer de origen colorectal, mamario, pulmonar y hepático (Yagi et al., 2010)

En la tabla 1, se detalla el nombre de cada gen estudiado en nuestro trabajo de investigación, anotando la vía de señalización o metabólica donde interactúa, si participa en funciones celulares de proliferación, apoptosis, diferenciación celular y si actúa como gen supresor tumoral, teniendo en cuenta las revisiones bibliográficas. También se relacionan los diferentes tipos de cánceres en donde se ha visto hipermetilados cada uno de ellos.

GEN CANDIDATO	NOMBRE	VIA SEÑALIZACION / METABÓLICA	FUNCION				TIPO DE CANCER ASOCIADO
			PRO	APO	DIF.	GEN SUPRESOR	
<b>SFRP1</b>	Secreted frizzled-related protein 1	Wnt	↓		↑	+	Colorectal, Seno, Hepático, Próstata y Pulmonar
<b>CDO1</b>	Cysteine dioxygenase type1	Piruvato	↓			+	Hepático, Colon, Ganglio linfático
<b>CDX2</b>	Caudal type homebox2	Wnt	↓		↑	+	Colon y vejiga
<b>EPB41L3</b>	Erythrocyte membrane protein band 4.1 - like 3	Tight Juntion	↓	↑		+	Pulmón y meningioma
<b>HAND1</b>	Heart and neural crest derivatives expressed transcript 1	Integrinas	↑		↑		Colorectal, seno, pulmón y hepático
<b>EDNRB</b>	Entothelin receptr type B	Endotelina	↑				Esofágico, gástrico, pulmón, melanoma y Leucemia.
<b>PTPRN</b>	Protein tyrosine phosphatase, receptor type N	PAK	↑	↓			Esófago, Seno, Próstata, Colon, Pulmón, Ovario, Ganglio Linfático y Neuroendocrino

Tabla 1. Cuadro resumen de genes candidatos anotando su función y participación en tumores malignos

PRO= proliferación; APO= apoptosis; DIF= diferenciación celular; +: actúa como gen supresor tumoral

### 3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

El Cáncer el cuello uterino es la segunda causa de morbi-mortalidad por cáncer en las mujeres en nuestro país, además hay que tener presente que las cifras obtenidas de GLOBOCAN 2012, corresponden al registro de población caleña principalmente, es decir que pudiéramos estar ante un posible subregistro con respecto a la realidad nacional.

La meta del Gobierno Nacional es seguir disminuyendo la mortalidad por éste tipo de cáncer hasta un 5.5 x 100.000 mujeres para el año 2021, según el Plan Decenal para el control del Cáncer en Colombia. Para lo cual se ha propuesto incrementar la detección de lesiones premalignas y cáncer invasor del cuello uterino en estadios clínicos tempranos, con pruebas altamente sensibles y específicas, y determinar con mayor precisión aquellas mujeres con mayor riesgo de desarrollar una Lesión Intraepitelial Escamosa de alto grado, así como poder predecir aquellas que tengan mayor probabilidad de progresión de su lesión hacia el carcinoma invasor o infiltrante.

En la literatura científica se han descrito diferentes biomarcadores como MGMT ó DAPK entre otros en cáncer cervical, sin embargo dichos estudios muestran resultados discordantes del verdadero papel que cumplen en el proceso carcinogénico del cuello uterino, adicionalmente a la fecha no hay reportes de estudios de tipo longitudinal donde se demuestre el comportamiento de dichos biomarcadores a través del tiempo. Por lo anterior, en el presente estudio se determinaron posibles biomarcadores que se encuentren involucrados en la progresión o regresión de las lesiones preneoplásicas del cuello uterino, a través de niveles de expresión génica y proteica de siete (7) genes candidatos en muestras de tejido cervical, que nos permita focalizar el pronóstico a las mujeres con mayor riesgo de desarrollar lesiones cervicales de alto grado. Para esta selección se tuvieron en cuenta trabajos de investigación que relacionaran el estado de hipermetilación de genes con carcinogénesis en diferentes tipos de tejido humano y muy especialmente se tuvo en cuenta los resultados del grupo de investigación de (García et al., 2012) en donde se identificaron genes hipermetilados y subexpresados en muestras cervicales con lesiones precancerosas, cáncer infiltrante y comparadas contra un grupo normal. Estos biomarcadores brindarán apoyo para el adecuado seguimiento y manejo de las pacientes con lesiones preneoplásicas, por parte de los profesionales de la salud.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GENERAL**

Identificar Biomarcadores en muestras de cérvix con Lesión Intraepitelial Escamosa (LIE) que permitan predecir la progresión o regresión de las lesiones preneoplásicas.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Estudiar genes candidatos a través de su expresión diferencial en biopsias de cérvix, con diagnóstico histológico de bajo grado, alto grado y compararlo con un grupo de muestras normales.

Identificar mujeres que hayan presentado progresión o regresión de sus lesiones intraepiteliales escamosas, a través de estudio de patología cervical.

Identificar a través de RT-PCR e Inmunohistoquímica, biomarcadores en las muestras de cérvix, que estén asociados con la progresión o regresión de las lesiones preneoplásicas del cuello uterino.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

El trabajo de investigación consta de un estudio transversal y otro longitudinal. En el estudio transversal se incluyeron muestras de diferentes pacientes que tuvieran un diagnóstico histológico de cérvix sin cambios displásicos, LIEBG y LIEAG, durante los años 2009 a 2014. Mientras que en el estudio longitudinal se incluyeron muestras pareadas de pacientes que presentaron progresión durante el periodo 2010 a 2013 y casos con regresión a través de muestras recolectadas durante el periodo 2012 a 2014. Las muestras pareadas se denominaron “momento 1” y “momento 2” tanto para los casos de progresión como de regresión y tuvieron al menos un año de diferencia con respecto a la fecha de toma de muestra. El estudio contó con aprobación del comité de ética de la Facultad de Odontología de la Pontificia Universidad Javeriana. La disponibilidad de los tejidos embebidos en parafina estuvo a cargo de “Estudios Anatomopatológicos Ltda” quien actúa como custodio de las muestras incluidas en el presente estudio.

### POBLACIÓN DE ESTUDIO Y MUESTRA

Se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia durante los años de 2009 al 2014. Un total de 52 bloques de parafina correspondientes a biopsias de cérvix o conización de mujeres que fueron diagnosticadas en el laboratorio de Citología y Patología “Estudios Anatomopatológicos Ltda”. Se incluyeron casos reportados como LIEBG (cambios asociados a infección por VPH y NIC I); LIEAG (NIC II – NIC III/ Ca in situ), un caso con CaCU y también cérvix sin cambios displásicos, Tabla 2

ESTUDIO	NORMAL	LIEBG	LIEAG	Ca. INFILTRANTE	TOTAL
Transversal	9	10	11		30
Longitudinal - Progresión		4	7	1	12
Longitudinal - Regresión		5	5		10
<b>TOTAL</b>					52

Tabla 2. Total de muestras analizadas según tipo de estudio y grado histológico de la lesión

## **5.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

- Paciente con Anormalidad Epitelial en el cuello uterino y que posteriormente fueron sometidas a Colposcopia y Biopsia.
- Pacientes con al menos dos muestras de tejido cervical (biopsia y/o cono cervical con diferente grado histológico de la lesión para el caso del estudio longitudinal
- Producto de Histerectomía total por patología benigna del cuello uterino (Leiomioma) para tomar muestra del cuello uterino y ser considerada como normal.
- Confirmación diagnóstica de la lesión precancerosa del cérvix por medio de la lectura de dos Médicos Patólogos.

## **5.3 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

- Ausencia del epitelio escamoso exocervical y/o de la zona de transformación, posterior a la realización de los cortes histológicos para el estudio de inmunohistoquímica y extracción de RNA.

## **5.4 PROCEDIMIENTO**

A cada uno de los bloques de Parafina, se le realizaron dos (2) cortes de 5um para extracción del ADN/ARN, luego se realizaron 5 cortes de 3um para estudios de inmunohistoquímica y finalmente, se obtuvo un último corte de 3um para estudio histológico con coloración de Hematoxilina&Eosina, para verificar que aún existiera tejido cervical luego de realizar los anteriores cortes.

### 5.4.1 Extracción de ARN y realización de RT-PCR

Para la desparafinación y extracción de ARN se utilizó el Kit de la casa comercial Quiagen. Ver anexo A. Posteriormente se realizó el proceso de retrotranscripción con el kit de la casa comercial Invitrogen Ver anexo B. Luego se cuantificó la concentración de cDNA de cada una de las muestras a través de nanodrop 1000® y se conservó el material a -70°C.

Para realizar la PCR en tiempo real se utilizó 1X de Fast SybrGreen de Kappa, 200nM de cada primer para todos los genes de estudio (ACTINA, PTPRN, CDO1, EDNRB, CDX2, EPB41L3 y HAND1) Y 10ng de cDNA para un volumen final de 10uL, cada muestra fue analizada por duplicado en el equipo CFX96 Biorad. Las condiciones de ciclaje fueron 95°C 3 minutos, seguido por 35 repeticiones de 95°C por 3 segundos y 61°C para EDNRB y CDX2 ó 63°C para ACTINA; SFRP1, PTPRN y CDO1 ó 65°C para EPB41L3 y HAND1 durante 45 segundos, finalmente se realizó curva de melting. Ver tabla 3

GEN	NUMERO DE ACCESO	PRIMER	TAMAÑO	TEMP. ANILLADO	TEMP. MELT
ACTINA	NM_001101.3	F: 5'-ATTGCCGACAGGATGCAGA-3'	89	63°C	88.50
		R: 5'-GAGTACTTGCCTCAGGAGGA-3'			
SFRP1	NM_003012.4	F: 5'-CTACGTGAGCTTCCAGTCGG-3'	216	63°C	88.50
		R: 5'-GCGTGGCAGTTCTTGTGAG-3'			
PTPRN	NM_002846.3	F 5'-GCAGTGTGTCCTCCAGTTC-3'	214	63°C	88.50
		R 5'-CAGGTGTTTGGCTCTGCTTG-3'			
CDO1	NM_001801.2	F 5'-CCCCACGAGATGGAACAGAC-3'	169	63°C	88.50
		R 5'-CGAACTTGGCGTACATTGCC-3'			
EDNRB	NM_001201397.1	F 5'-GAACAAGTGCATGCGAAACG-3'	151	61°C	88.00
		R 5'-AGGCACCAGCTTACACATCT-3'			
CDX2	NM_001265.4	F 5'-GGAAAGGCTTGGCTGGTGTA-3'	174	61°C	88.50
		R 5'-GACAGGAAGTCCAGGTTGGC-3'			
EPB41L3	NM_012307.3	F 5'-GCAGTGCAAAGTGATACTTC-3'	246	65°C	88.50
		R 5'-TCTGGTGGATAAAAATTCACAT-3'			
HAND1	NM_004821.2	F 5'-GTCCGAGAAAGGGTTAAACA-3'	195	65°C	88.50
		R 5'-CCCTATTAACGCCGCTCCA-3'			

Tabla 3. Primers y condiciones estandarizadas para cada uno de los genes.

Luego se consolidó los resultados obtenidos del Cq y curva Melt, de cada uno de los genes, para finalmente obtener el Fold Change ( $2^{Ct_{actina} - Ct_{gen\ blanco}}$ ) de cada uno de ellos y hacer el análisis estadístico a través del programa GraphPad Prism 6.

Las curvas de eficiencia para cada gen, se realizaron a través de DNA de la línea celular HeLa con las siguientes concentraciones: 100ng; 20ng; 4ng; 0.8ng y 0.16ng. La eficiencia ( $10^{-1/\text{pendiente}}$ ) y coeficiente de correlación ( $R^2$ ) obtenido para cada gen, se detalla en la tabla 4.

	$R^2$	EFICIENCIA
ACTINA	0,994	2,10
SFRP1	0,986	2,12
CDO1	0,966	2,07
PTPRN	0,998	2,06
EDNRB	0,985	2,08
CDX2	0,998	2,03
EPB41L3	0,965	1,96
HAND1	0,995	2,11

Tabla 4. Eficiencia de la PCR y coeficiente de correlación para cada gen.

#### 5.4.2 Inmunohistoquímica

Para la realización del estudio con marcadores de Inmunohistoquímica (IHQ), se utilizaron cortes histológicos de 3 micras de espesor, de tejido cervical embebido en bloques de parafina. Cada uno de estos cortes histológicos se colocó sobre láminas especiales para IHQ (Slidotech), continuado con la desparafinación del tejido, posteriormente se realizó el proceso de recuperación antigénica y colocación del anticuerpo. Finalmente se adicionó el cromógeno y cubrimiento de cada una de las muestras para lectura de los Patólogos. Todo el procedimiento se encuentra detallado en el Anexo C.

Los anticuerpos primarios utilizados para el presente estudio fueron: SFRP1 (1:50, Sigma-Aldrich), CD01 (1:30, Sigma-Aldrich); CDX2 (1:150, Sigma-Aldrich), EPBL41L3 (1:1000, Sigma-Aldrich) y HAND1 (1:150, Sigma-Aldrich). La reacción fue interpretada como positiva para SFRP1 y HAND1, si los hallazgos se localizaron a nivel citoplasmático y/o nuclear; para CDX2 fue interpretada como positiva la reacción a nivel nuclear; para CDO1 y EPB41L3, fue interpretada como positiva la reacción a nivel citoplasmático.



Para cada anticuerpo utilizado se realizaron sus respectivos controles positivos. Para anti-SFRP1, se utilizaron cortes de parénquima testicular; para anti-CDO1 se obtuvieron cortes de piel normal; para anti-CDX2 y anti-EPB41L3 se realizaron cortes de duodeno con inflamación crónica moderada; y para anti-HAND1 se utilizaron cortes de biopsia gástrica con inflamación crónica moderada. Adicionalmente, para verificar la antigenicidad de tejido se realizó un corte de cada uno de los bloques de parafina para ser estudiado a través del marcador de inmunohistoquímica Vimentina.

Todas las láminas para el estudio de inmunohistoquímica, fueron analizadas por dos Médicos Patólogos de manera independiente y posteriormente se confrontaron los resultados de cada uno. En los casos donde no existió concordancia, las láminas fueron revisadas nuevamente de manera conjunta por los Patólogos hasta llegar a un diagnóstico definitivo sobre la expresión del marcador de IHQ. La concordancia interobservador fue calculada a través del índice de kappa, de acuerdo a los resultados en la lectura de las muestras de forma independiente por cada Patólogo.

La tinción de cada una de las láminas para estudio de inmunohistoquímica fue graduada de la siguiente manera: “0” para ausencia de expresión en las células neoplásicas; “1+” presencia de expresión entre un 1% - 25% entre las células neoplásicas; “2+” presencia de expresión entre un 26% - 50% entre las células neoplásicas; “3+” presencia de expresión mayor a un 50% entre las células neoplásicas. Esta clasificación ha venido siendo utilizada por el INC en sus publicaciones científicas y por tal razón la hemos adoptado para nuestro estudio de investigación. (Moreno-Acosta et al., 2013)

## **5.5 ANALISIS ESTADISTICO**

Para el estudio transversal se utilizó la prueba no paramétrica de ANOVA; Para el estudio longitudinal y resultados de inmunohistoquímica se utilizó la prueba no paramétrica T-student. Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism 6. Para la lectura de los resultados de inmunohistoquímica se obtuvo el índice de concordancia (Kappa) entre los dos patólogos tanto para los casos de progresión como regresión. Y también se obtuvo el coeficiente de correlación de Spearman para mostrar la concordancia entre la expresión por RT-PCR e inmunohistoquímica de los genes analizados.

## 5.6 RESULTADOS

### 5.6.1 Descripción de las muestras del estudio transversal y longitudinal

En el estudio transversal se incluyeron un total de 30 casos. En el grupo normal, 2 muestras correspondieron a cervicitis crónica obtenida por biopsias y las otras 7 muestras fueron obtenidas durante el procesamiento de histerectomía debido a leiomiomas uterinos. Un total de 10 muestras correspondieron a LIEBG y el grupo de LIEAG estuvo conformado por 7 NIC II y 4 NIC III. Tabla 5

ESTUDIO	GRUPO	DIAGNOSTICO
TRANSVERSAL	NORMAL	Cervicitis crónica
	NORMAL	Cervicitis crónica
	NORMAL	Leiomioma
	NORMAL	Leiomioma
	NORMAL	Leiomioma
	NORMAL	Leiomioma
	NORMAL	Leiomioma
	NORMAL	Leiomioma
	NORMAL	Leiomioma
	LIEBG	NIC I
	LIEBG	NIC I
	LIEBG	NIC I
	LIEBG	NIC I
	LIEBG	NIC I
	LIEBG	NIC I
	LIEBG	NIC I
	LIEBG	NIC I
	LIEBG	NIC I
	LIEBG	NIC I
	LIEAG	NIC II
	LIEAG	NIC II
	LIEAG	NIC II
	LIEAG	NIC II
	LIEAG	NIC III
	LIEAG	NIC II
	LIEAG	NIC III
	LIEAG	NIC II
	LIEAG	NIC II
	LIEAG	NIC III
	LIEAG	NIC III

Tabla 5. Relación de casos del estudio transversal según grupo de análisis y diagnóstico histológico

Para el estudio longitudinal se incluyeron 6 pacientes que mostraron progresión en su lesión preneoplásica y 5 pacientes que mostraron lo contrario, es decir, que existió regresión de su lesión preneoplásica a un grado histológico menor. En la tabla 4A, se relacionan los casos de progresión encontrándose 4 pacientes con LIEBG que progresaron a LIEAG, un paciente progresó de NIC III a Ca, Infiltrante y otro paciente mostró progresión de NIC II a NIC III. En la tabla 1B, se relacionan los casos de regresión donde todos mostraron un cambio de diagnóstico histológico NIC II hacia NIC I. Tabla 6

A			B		
CASO	DIAGNOSTICO MOMENTO 1	DIAGNOSTICO MOMENTO 2	CASO	DIAGNOSTICO MOMENTO 1	DIAGNOSTICO MOMENTO 2
Progresión No. 1	NIC I	NIC II	Regresión No. 1	NIC II	NIC I
Progresión No. 2	NIC I	NIC II	Regresión No. 2	NIC II	NIC I
Progresión No. 3	NIC I	NIC II	Regresión No. 3	NIC II	NIC I
Progresión No.4	NIC III	Ca. INFILTRANTE	Regresión No. 4	NIC II	NIC I
Progresión No. 5	NIC II	NIC III	Regresión No. 5	NIC II	NIC I
Progresión No 6	NIC I	NIC II			

Tabla 6. Relación de muestras de pacientes con progresión (A) y regresión (B) de la lesión intraepitelial escamosa

### 5.6.2 Expresión de SFRP1 estudio transversal y longitudinal

Al comparar SFRP1 con respecto al gen calibrador Actina se observó disminución en la expresión de SFRP1 en el 60% de las muestras con LIEBG y un 63.6% en las correspondientes a LIEAG. En el grupo normal se observó disminución en la expresión de en un 77.8%. No hubo diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,2426$ ) Tabla 7.

GEN	ESTUDIO TRANSVERSAL												PVALUE
	NORMAL (n=9)				LIEBG (n=10)				LIEAG (n=11)				
	MENOR A		MAYOR A		MENOR A		MAYOR A		MENOR A		MAYOR A		
SFRP1	n=	%	n=	%	n=	%	n=	%	n=	%	n=	%	0,2426
	7	77,8	2	22,2	6	60,0	4	40,0	7	63,6	4	36,4	

Tabla 7. Comparación del nivel de expresión de SFRP1 en los diferentes grupos de análisis

Menor A: corresponde a una expresión menor con referencia al gen calibrador ACTINA

Mayor A: corresponde a una expresión mayor con referencia al gen calibrador ACTINA

Al realizar las comparaciones entre el momento 2 y el momento 1 para el estudio longitudinal se observó para los casos de progresión que SFRP1 no tuvo una tendencia definida con respecto a la diferencia de expresión, solamente sobresale un caso en donde

se observa una notoria diferencia en la expresión. Esta diferencia no fue significativa desde el punto de vista estadístico ( $p=0.2874$ ). En cuanto a los casos de regresión, se observó una diferencia de expresión en las muestras del momento 2 con respecto al momento 1, pero no fue estadísticamente significativa ( $*p=0.0304$ ). Figura 9

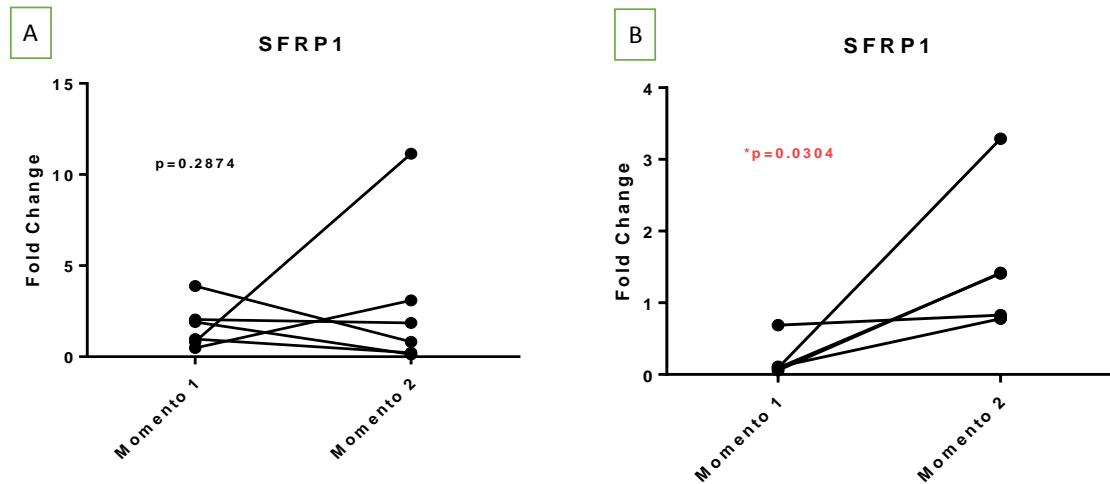


Figura 9. Expresión de SFRP1 en las muestras del estudio longitudinal que presentaron progresión (A) y regresión (B) de la lesión intraepitelial escamosa.

En progresión se observó que 4 de 6 casos (66.7%) tuvieron disminución en la expresión de las muestras al comparar el momento 2 vs momento 1. En cuanto a la regresión, se observó que en todas las 5 muestras del momento 2, existió aumento en la expresión con respecto a los niveles de expresión de las muestras del momento 1. Tabla 8.

ESTUDIO LONGITUDINAL										
	PROGRESIÓN (n= 6 pacientes)					REGRESIÓN (n= 5 pacientes)				
	MOMENTO 2 vs MOMENTO 1					MOMENTO 2 vs MOMENTO 1				
GEN	DISMINUCION		AUMENTO		P VALUE	DISMINUCION		AUMENTO		P VALUE
	n=	%	n=	%		n=	%	n=	%	
SFRP1	4	66,7	2	33,3	0,2874	0	0,0	5	100,0	0,0304

Tabla 8. Variación en los niveles de expresión de SFRP1, en las muestras de progresión y regresión

### 5.6.3 Expresión de CDO1 estudio transversal y longitudinal

CDO1, mostró expresión muy similares entre LIEAG y el grupo normal, encontrándose una menor expresión con respecto al gen calibrador, del 54.5% y 55.6%, respectivamente. En el grupo de LIEBG, el porcentaje de casos con disminución de expresión fue del 40%. No hubo diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,5782$ ). Tabla 9.

GEN	ESTUDIO TRANSVERSAL												PVALUE
	NORMAL (n=9)				LIEBG (n=10)				LIEAG (n=11)				
	MENOR A		MAYOR A		MENOR A		MAYOR A		MENOR A		MAYOR A		
CDO1	n=	%	n=	%	n=	%	n=	%	n=	%	n=	%	0,5782
	5	55,6	4	44,4	4	40,0	6	60,0	6	54,5	5	45,5	

Tabla 9. Comparación del nivel de expresión de CDO1 en los diferentes grupos de análisis

Menor A: corresponde a una expresión menor con referencia al gen calibrador ACTINA

Mayor A: corresponde a una expresión mayor con referencia al gen calibrador ACTINA

En el estudio longitudinal, CDO1 no mostró una tendencia definida con respecto a las diferencias de expresión encontradas en el momento 2 con relación a las evidenciadas en el momento 1, para los casos de progresión. Mientras que en los casos de regresión, se observó una tendencia de mayor diferencia de expresión en las muestras del momento 2, con relación a las del momento 1. No hubo diferencia estadísticamente significativa para progresión ( $p=0,1543$ ) ni regresión ( $p=0,1241$ ). Figura 10.

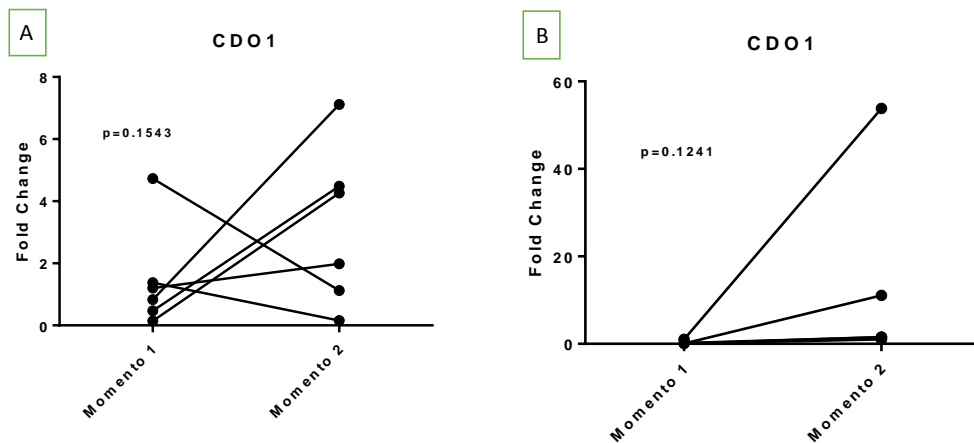


Figura 10. Expresión de CDO1 en las muestras del estudio longitudinal que presentaron progresión (A) y regresión (B) de la lesión intraepitelial escamosa

En los casos de progresión, un 50% mostró disminución en su expresión y en regresión todos los casos mostraron aumento de la expresión del momento 2 en relación al momento 1. Tabla 10

ESTUDIO LONGITUDINAL										
PROGRESIÓN (n= 6 pacientes)					REGRESIÓN (n= 5 pacientes)					
MOMENTO 2 vs MOMENTO 1					MOMENTO 2 vs MOMENTO 1					
GEN	DISMINUCION		AUMENTO		P VALUE	DISMINUCION		AUMENTO		P VALUE
CDO1	n=	%	n=	%	0,1543	n=	%	n=	%	0,1241
	3	50,0	3	50,0		0	0,0	5	100,0	

Tabla 10. Variación en los niveles de expresión de CDO1, en las muestras de progresión y regresión

#### 5.6.4 Expresión de CDX2 estudio transversal y longitudinal

CDX2, tuvo menor expresión con respecto al gen calibrador en el 66,7% de los casos normales, 50% en LIEBG y 27,3% en LIEAG. Hubo diferencia estadísticamente significativa entre la expresión de las muestras de LIEAG en comparación con la expresión de LIEBG y normal ( $p= 0,0203$ ) Tabla 11.

ESTUDIO TRANSVERSAL													PVALUE
NORMAL (n=9)				LIEBG (n=10)				LIEAG (n=11)					
GEN	MENOR A		MAYOR A		MENOR A		MAYOR A		MENOR A		MAYOR A		
CDX2	n=	%	n=	%	n=	%	n=	%	n=	%	n=	%	0,0203
	6	66,7	3	33,3	5	50,0	5	50,0	3	27,3	8	72,7	

Tabla 11. Comparación del nivel de expresión de CDX2 en los diferentes grupos de análisis

Menor A: corresponde a una expresión menor con referencia al gen calibrador ACTINA

Mayor A: corresponde a una expresión mayor con referencia al gen calibrador ACTINA

En el estudio longitudinal, CDX2 no mostró una tendencia definida en relación a las diferencias de expresión entre las muestras del momento 2 vs momento 1. No hubo diferencia estadísticamente significativa para progresión ( $p=0.2455$ ) ni regresión ( $p=0.2108$ ). Figura 11.

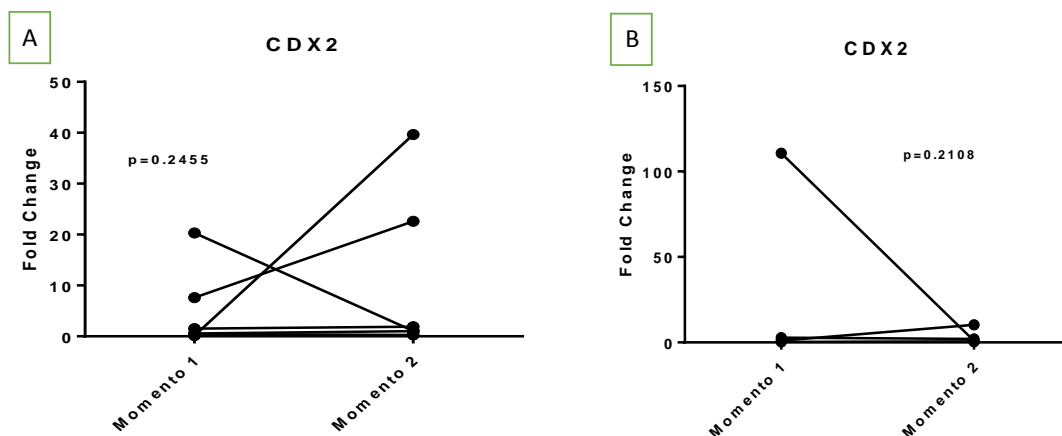


Figura 11. Expresión de CDX2 en las muestras del estudio longitudinal que presentaron progresión (A) y regresión (B) de la lesión intraepitelial escamosa

En los casos de progresión, un 50% mostró disminución en su expresión y en el grupo de regresión el incremento se observó en 3 de los 5 casos (60%). Tabla 12.

ESTUDIO LONGITUDINAL						
PROGRESIÓN (n= 6 pacientes)					REGRESIÓN (n= 5 pacientes)	
MOMENTO 2 vs MOMENTO 1					MOMENTO 2 vs MOMENTO 1	
GEN	DISMINUCION		AUMENTO		P VALUE	P VALUE
	n=	%	n=	%		
CDX2	3	50,0	3	50,0	0,2455	0,2108
	2	40,0	3	60,0		

Tabla 12. Variación en los niveles de expresión de CDX2, en las muestras de progresión y regresión

### 5.6.5 Expresión de EPB41L3 estudio transversal y longitudinal

EPB41L3, mostró menor expresión con respecto al gen calibrador en los grupos de LIEBG y LIEAG en un 40% y 45,5%, respectivamente. Mientras que en el grupo normal hubo menor expresión en 77,8% de los casos. No se observó diferencia estadísticamente significativa ( $p= 0,4302$ ) Tabla 13.

GEN	ESTUDIO TRANSVERSAL												PVALUE
	NORMAL (n=9)				LIEBG (n=10)				LIEAG (n=11)				
	MENOR A		MAYOR A		MENOR A		MAYOR A		MENOR A		MAYOR A		
EPB41L3	n=	%	n=	%	n=	%	n=	%	n=	%	n=	%	0,4302
	7	77,8	2	22,2	4	40,0	6	60,0	5	45,5	6	54,5	

Tabla 13. Comparación del nivel de expresión de EPB41L3 en los diferentes grupos de análisis

Menor A: corresponde a una expresión menor con referencia al gen calibrador ACTINA

Mayor A: corresponde a una expresión mayor con referencia al gen calibrador ACTINA

En el estudio longitudinal, EPB41L3 mostró tendencia hacia mayor diferencia de expresión en las muestras del momento 2 con respecto a las del momento 1, en los casos de progresión. Mientras que sólo en un caso de regresión se observó una notoria diferencia de expresión al comparar el momento 2 contra el momento 1. No hubo diferencia estadísticamente significativa para progresión ( $p=0.1108$ ) ni regresión ( $p=0.2217$ ). Figura 12.

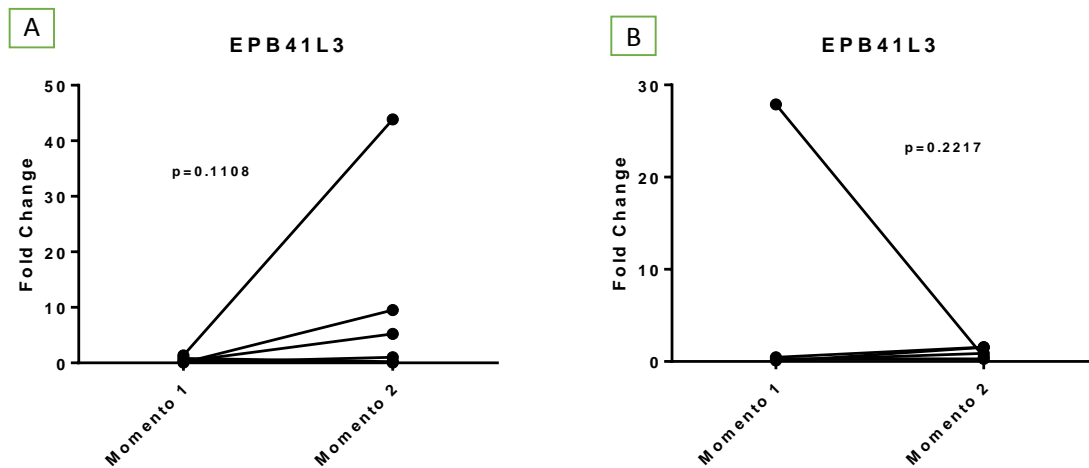


Figura 12. Expresión de EPB41L3 en las muestras del estudio longitudinal que presentaron progresión (A) y regresión (B) de la lesión intraepitelial escamosa

La expresión de EPB41L3, en el estudio longitudinal mostró en los casos de progresión se observó disminución en un 33,3% de casos, mientras que en regresión el incremento puede observarse en un 60% de los casos del momento 2 con relación al momento 1. Tabla 14.



ESTUDIO LONGITUDINAL										
PROGRESIÓN (n= 6 pacientes)					REGRESIÓN (n= 5 pacientes)					
MOMENTO 2 vs MOMENTO 1					MOMENTO 2 vs MOMENTO 1					
GEN	DISMINUCION		AUMENTO		P VALUE	DISMINUCION		AUMENTO		P VALUE
	n=	%	n=	%		n=	%	n=	%	
EPB41L3	2	33,3	4	66,7	0,1108	2	40,0	3	60,0	0,2217

Tabla 14. Variación en los niveles de expresión de EPB41L3, en las muestras de progresión y regresión

### 5.6.6 Expresión de HAND1 estudio transversal y longitudinal

HAND1, mostró menor expresión con relación al gen calibrador en 8 de 10 casos (80%) en el grupo de LIEBG. En las muestras con LIEAG, hubo menor expresión en 54,5% y en el grupo normal existió menor expresión en 66,7%. No hubo diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,2225$ ) Tabla 15.

ESTUDIO TRANSVERSAL													
GEN	NORMAL (n=9)				LIEBG (n=10)				LIEAG (n=11)				PVALUE
	MENOR A		MAYOR A		MENOR A		MAYOR A		MENOR A		MAYOR A		
	n=	%	n=	%	n=	%	n=	%	n=	%	n=	%	
HAND1	6	66,7	3	33,3	8	80,0	2	20,0	6	54,5	5	45,5	0,2225

Tabla 15. Comparación del nivel de expresión de HAND1 en los diferentes grupos de análisis

Menor A: corresponde a una expresión menor con referencia al gen calibrador ACTINA

Mayor A: corresponde a una expresión mayor con referencia al gen calibrador ACTINA

En el estudio longitudinal, para progresión HAND1 mostró mayor diferencia en la expresión de las muestras del momento 2 con respecto a las del momento 1. Mientras que en los casos de regresión, no se observó una tendencia definida con respecto a las diferencias de expresión encontradas entre las muestras del momento 2 vs momento 1. No se observó diferencia estadísticamente significativa para progresión ( $p=0,1162$ ) ni regresión ( $p=0,5591$ ). Figura 13.

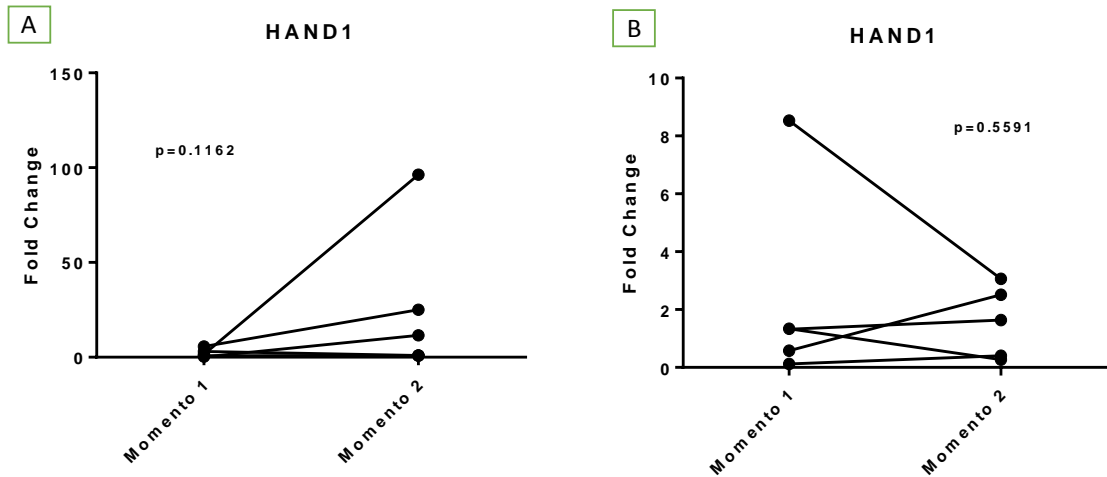


Figura 13. Expresión de HAND1 en las muestras del estudio longitudinal que presentaron progresión (A) y regresión (B) de la lesión intraepitelial escamosa

HAND1 tuvo disminución en la expresión en 33,3% de los casos en progresión y en los casos de regresión, se encontró aumentada la expresión en un 60%. Tabla 16.

ESTUDIO LONGITUDINAL										
	PROGRESIÓN (n= 6 pacientes)					REGRESIÓN (n= 5 pacientes)				
	MOMENTO 2 vs MOMENTO 1					MOMENTO 2 vs MOMENTO 1				
GEN	DISMINUCION		AUMENTO		P VALUE	DISMINUCION		AUMENTO		P VALUE
	n=	%	n=	%		n=	%	n=	%	
HAND1	2	33,3	4	66,7	0,1162	2	40,0	3	60,0	0,5591

Tabla 16. Variación en los niveles de expresión de HAND1, en las muestras de progresión y regresión

### 5.6.7 Expresión de EDNRB estudio transversal y longitudinal

EDNRB, registró menor expresión con respecto al gen calibrador en un 66,7% en el grupo normal, en el grupo de LIEBG el porcentaje fue 50% y en el grupo de LIEAG el 36,4% de las muestras. Hubo diferencia estadísticamente significativa entre la expresión de las muestras de LIEAG en comparación con la expresión de LIEBG y normal ( $p= 0,0252$ ). Tabla 17.

GEN	ESTUDIO TRANSVERSAL												PVALUE
	NORMAL (n=9)				LIEBG (n=10)				LIEAG (n=11)				
	MENOR A		MAYOR A		MENOR A		MAYOR A		MENOR A		MAYOR A		
EDNRB	n=	%	n=	%	n=	%	n=	%	n=	%	n=	%	0,0252
	6	66,7	3	33,3	5	50,0	5	50,0	4	36,4	7	63,6	

Tabla 17. Comparación del nivel de expresión de EDNRB en los diferentes grupos de análisis

Menor A: corresponde a una expresión menor con referencia al gen calibrador ACTINA

Mayor A: corresponde a una expresión mayor con referencia al gen calibrador ACTINA

En el estudio longitudinal, EDNRB no mostró diferencias en los casos de progresión a excepción de un caso donde hubo mayor diferencia de expresión en la muestra 2 con respecto a la muestra 1. Para las muestras de regresión no se observó tendencia de expresión al comparar las muestras del momento 2 con respecto al momento 1. No hubo diferencia estadísticamente significativa para progresión ( $p=0,1782$ ) ni regresión ( $p=0,2882$ ). Figura 14.

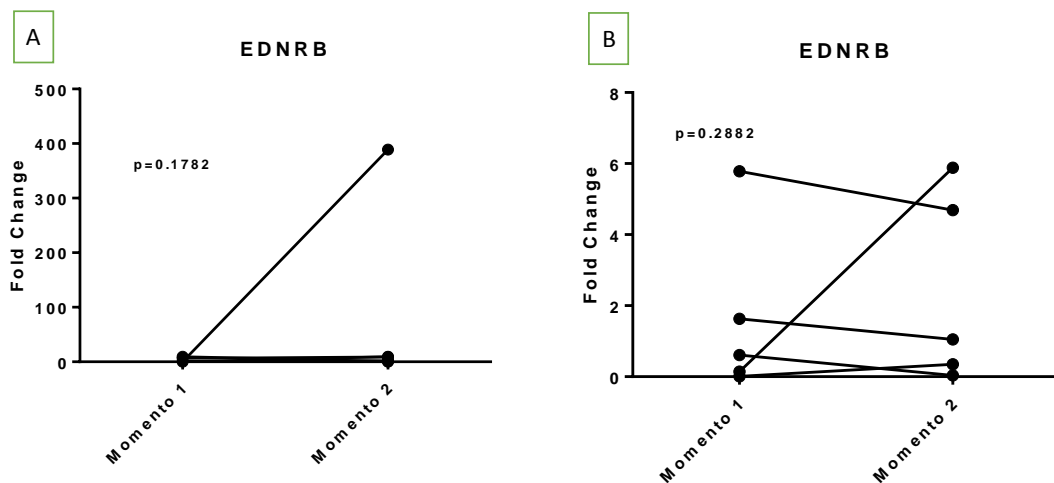


Figura 14. Expresión de EDNRB en las muestras del estudio longitudinal que presentaron progresión (A) y regresión (B) de la lesión intraepitelial escamosa

En los casos de progresión, un 50% mostró disminución en su expresión, mientras que en regresión ésta disminución ocurrió en 3 de los 5 casos (60%), del momento 1 con relación al momento 2. Tabla 18

ESTUDIO LONGITUDINAL										
PROGRESIÓN (n= 6 pacientes)					REGRESIÓN (n= 5 pacientes)					
MOMENTO 2 vs MOMENTO 1					MOMENTO 2 vs MOMENTO 1					
GEN	DISMINUCION		AUMENTO		P VALUE	DISMINUCION		AUMENTO		P VALUE
EDNRB	n=	%	n=	%	0,1782	n=	%	n=	%	0,2882
	3	50,0	3	50,0		3	60,0	2	40,0	

Tabla 18. Variación en los niveles de expresión de EDNRB, en las muestras de progresión y regresión

### 5.6.8 Expresión de PTPRN estudio transversal y longitudinal

El nivel de expresión de PTPRN con respecto al gen calibrador fue similar entre los tres grupos de análisis, observándose un porcentaje en la disminución de la expresión en el grupo normal, LIEBG y LIEAG del 55.6%, 50% y 54.5%, respectivamente. No hubo diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,4529$ ) Tabla 19

ESTUDIO TRANSVERSAL													
GEN	NORMAL (n=9)				LIEBG (n=10)				LIEAG (n=11)				PVALUE
	MENOR A		MAYOR A		MENOR A		MAYOR A		MENOR A		MAYOR A		
PTPRN	n=	%	n=	%	n=	%	n=	%	n=	%	n=	%	0,4529
	5	55,6	4	44,4	5	50,0	5	50,0	6	54,5	5	45,5	

Tabla 19. Comparación del nivel de expresión de PTPRN en los diferentes grupos de análisis

Menor A: corresponde a una expresión menor con referencia al gen calibrador ACTINA

Mayor A: corresponde a una expresión mayor con referencia al gen calibrador ACTINA

En el estudio longitudinal, PTPRN mostró una tendencia hacia mayor diferencia de expresión en las muestras del momento 2 con respecto al momento 1 tanto para los casos de progresión como de regresión. Para los casos de progresión la diferencia fue estadísticamente significativa ( $*p=0,0338$ ); mientras que no para los casos de regresión esta diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p= 0,0720$ ). Figura 15.

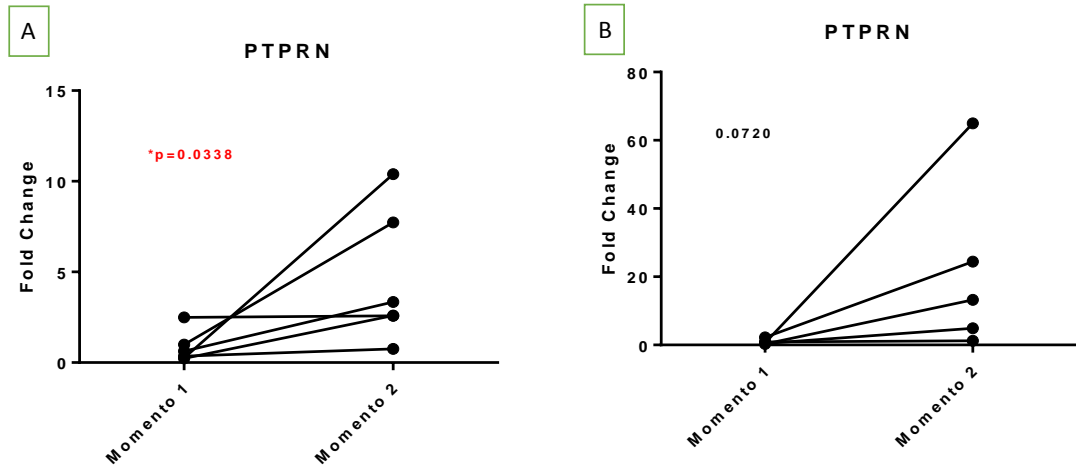


Figura 15. Expresión de PTPRN en las muestras del estudio longitudinal que presentaron progresión (A) y regresión (B) de la lesión intraepitelial escamosa.

En los casos de progresión se observó aumento en la expresión en 5 de los 6 casos (83,3%) al comparar momento 2 vs momento 1. Y con respecto a los casos de regresión todas las muestras tuvieron aumento en la expresión en el momento 2 con respecto al momento 1.

Tabla 20.

ESTUDIO LONGITUDINAL										
	PROGRESIÓN (n= 6 pacientes)					REGRESIÓN (n= 5 pacientes)				
	MOMENTO 2 vs MOMENTO 1					MOMENTO 2 vs MOMENTO 1				
GEN	DISMINUCION		AUMENTO		P VALUE	DISMINUCION		AUMENTO		P VALUE
	n=	%	n=	%		n=	%	n=	%	
PTPRN	1	16,7	5	83,3	0,0338	0	0,0	5	100,0	0,0720

Tabla 20. Variación en los niveles de expresión de PTPRN, en las muestras de progresión y regresión

### 5.6.9 Estudio de Inmunohistoquímica en muestras con Progresión y Regresión

Para los seis (6) casos de progresión se realizaron 5 marcadores de inmunohistoquímica para las muestras del momento 1 y momento 2, para un total de 60 láminas para estudio inmunohistoquímico. La graduación de la inmunoreacción de cada muestra con los diferentes anticuerpos, se encuentra resumida en la Tabla 21.

CASO DE PROGRESION	MOMENTO DE LA MUESTRA	SFRP1	CDO1	CDX2	EPB41L3	HAND1
1	1	3+	2+	3+	1+	3+
	2	2+	3+	1+	1+	2+
2	1	3+	3+	3+	1+	3+
	2	1+	2+	1+	0+	2+
3	1	3+	3+	3+	1+	2+
	2	3+	1+	1+	0	3+
4	1	2+	2+	1+	1+	1+
	2	1+	2+	1+	0	2+
5	1	3+	3+	3+	0	2+
	2	1+	1+	2+	0	1+
6	1	3+	3+	3+	0	3+
	2	2+	2+	2+	0	2+

Tabla 21. Graduación de la expresión de los diferentes marcadores de inmunohistoquímica en casos de progresión. Momento 1 (LIEBG) y Momento 2 (LIEAG)

El índice de concordancia kappa obtenido luego de la revisión de todas las muestras de progresión por los dos patólogos fue de 0.82, lo que significó que no hubo concordancia en 11 de las 60 muestras analizadas. Sin embargo, luego de revisar los 11 casos anteriormente mencionados de manera conjunta el índice de consenso fue del 100%

Con relación a los casos de regresión, también se realizaron 5 marcadores de inmunohistoquímica para cada una de las muestras de momento 1 y momento 2, para un total de 50 láminas para análisis inmunohistoquímico. La graduación de los resultados del estudio de IHQ para cada una de las muestras se encuentra resumida en la Tabla 22

CASO DE REGRESION	MOMENTO DE LA MUESTRA	SFRP1	CDO1	CDX2	EPB41L3	HAND1
1	1	3+	1+	3+	1+	3+
	2	3+	1+	3+	1+	2+
2	1	3+	2+	3+	1+	2+
	2	3+	2+	1+	2+	3+
3	1	3+	3+	1+	1+	2+
	2	1+	3+	1+	0	1+
4	1	3+	2+	3+	2+	3+
	2	3+	2+	3+	1+	3+
5	1	3+	3+	3+	1+	3+
	2	1+	1+	1+	1+	1+

Tabla 22. Graduación de la expresión de los diferentes marcadores de inmunohistoquímica en casos de regresión. Momento 1 (LIEAG) y Momento 2 (LIEBG)

El índice de concordancia kappa para las muestras de regresión fue de 0.74, lo que significó que no hubo concordancia en 13 de las 50 muestras analizadas. Sin embargo, posterior a la revisión en conjunto de los 13 casos mencionados por los Patólogos, el índice de consenso fue del 100%.

#### 5.6.10 Resultado expresión Anti-SFRP1

Con respecto a SFRP1, al comparar el grado de tinción evidenciado en las muestras del momento 2 vs momento 1 en los casos de progresión, se encontró que 5 de 6 (83,3%) tuvieron disminución en la escala de graduación. Esta variación fue estadísticamente significativa (\*p=0,0063). Mientras que en los casos de regresión la disminución en la graduación fue del 40% y el otro 60% restante no mostró cambios. No hubo diferencia estadísticamente significativa (p=0,0889). Tabla 23 y figuras 16-17

ESTUDIO LONGITUDINAL	PERFIL INMUNOHISTOQUÍMICO DE SFRP1						P VALUE
	RELACION EXPRESION IHQ MOMENTO 2 vs MOMENTO 1						
	AUMENTO		DISMINUCION		SIN CAMBIO		
n	%	n	%	n	%		
PROGRESION	0	0,0	5	83,3	1	16,7	*p=0,0063
REGRESION	0	0,0	2	40,0	3	60,0	p=0,0889

Tabla 23. Variación en la expresión por IHQ de SFRP1, en las muestras de progresión y regresión

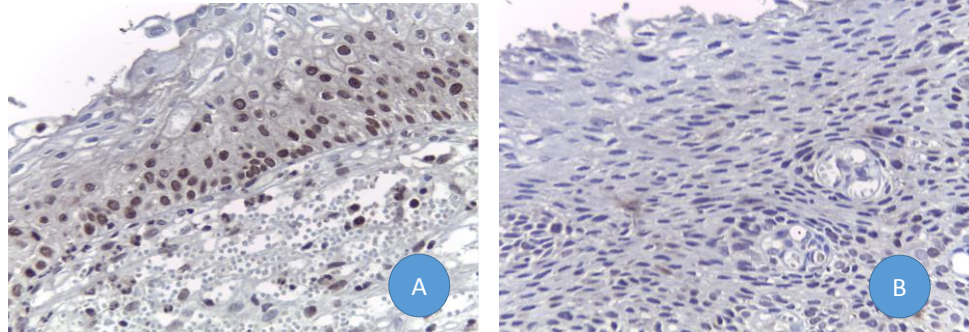


Figura 16. Expresión de SFRP1 a través de IHQ en tejido cervical. Caso de Progresión LIEBG (A); LIEAG (B)

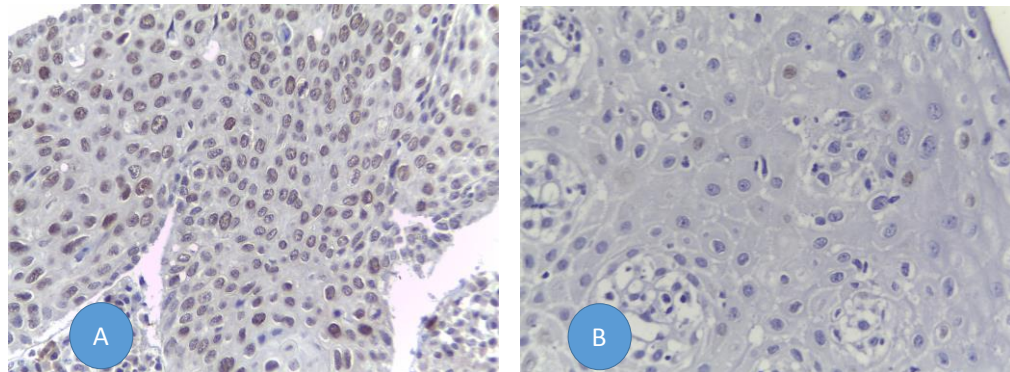


Figura 17. Expresión de SFRP1 a través de IHQ en tejido cervical. Caso de regresión LIEAG (A); LIEBG (B)

### 5.6.11 Resultado expresión Anti-CDO1

Con el marcador de IHQ anti-CDO1, se observó disminución en la graduación de los resultados, luego de comparar las muestras del momento 2 vs momento 1, en 4 de 6 casos (66,7%). Y con respecto a la regresión, 4 de los 5 casos (80%) no tuvieron modificación en la graduación del resultado de IHQ. No hubo diferencia estadísticamente significativa ni para progresión (0,0706) ni regresión (0,1870). Tabla 24 y figuras 18-19



PERFIL INMUNOHISTOQUÍMICO DE CDO1							
RELACION EXPRESION IHQ MOMENTO 2 vs MOMENTO 1							
ESTUDIO LONGITUDINAL	AUMENTO		DISMINUCION		SIN CAMBIO		P VALUE
	n	%	n	%	n	%	
PROGRESION	1	16,7	4	66,7	1	16,7	p=0,0706
REGRESION	0	0,0	1	20,0	4	80,0	p=0,1870

Tabla 24. Variación en la expresión por IHQ de CDO1, en las muestras de progresión y regresión

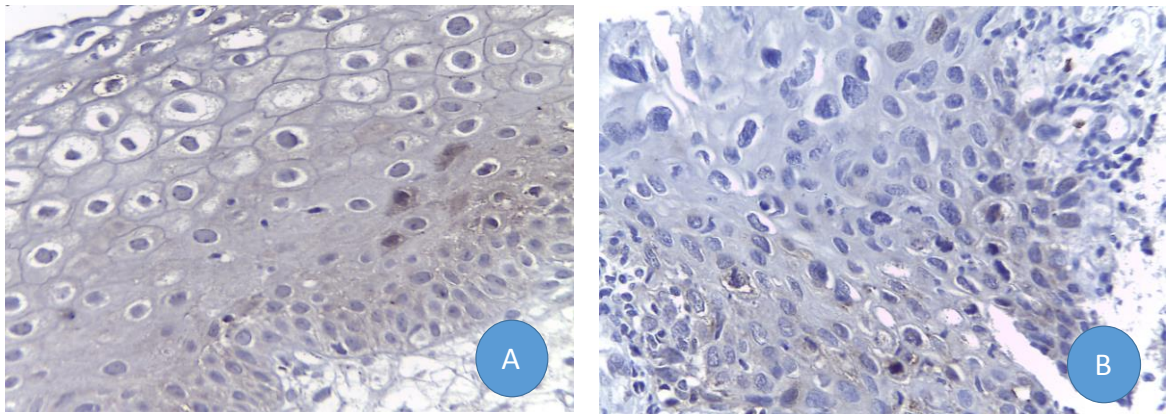


Figura 18. Expresión de CDO1 a través de IHQ en tejido cervical. Caso de Progresión LIEBG (A); LIEAG (B)

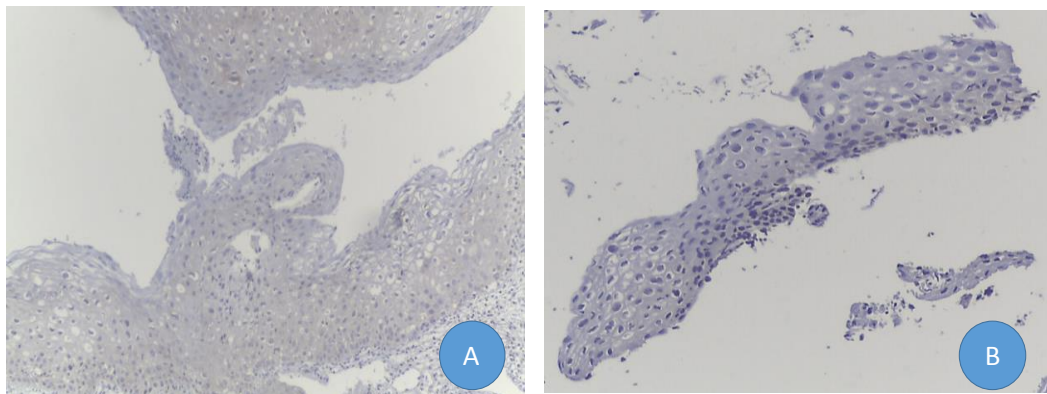


Figura 19. Expresión de CDO1 a través de IHQ en tejido cervical. Caso de regresión LIEAG (A); LIEBG (B)

### 5.6.12 Resultado expresión Anti-CDX2

Con el marcador de IHQ anti-CDX2, en progresión se observó disminución en la graduación de los resultados, luego de comparar las muestras del momento 2 vs momento 1, en 5 de 6 casos (83,3%). Esta variación fue estadísticamente significativa (\*p=0,0052). Mientras que en los casos de regresión la disminución en la graduación fue del 40% y el otro 60% restante no mostró cambios. No hubo diferencia estadísticamente significativa (p=0,0889). Tabla 25 y figuras 20-21

ESTUDIO LONGITUDINAL	PERFIL INMUNOHISTOQUÍMICO DE CDX2						P VALUE
	RELACION EXPRESION IHQ MOMENTO 2 vs MOMENTO 1						
	AUMENTO		DISMINUCION		SIN CAMBIO		
	n	%	n	%	n	%	
PROGRESION	0	0,0	5	83,3	1	16,7	*p=0,0052
REGRESION	0	0,0	2	40,0	3	60,0	p=0,0889

Tabla 25. Variación en la expresión por IHQ de CDX2, en las muestras de progresión y regresión

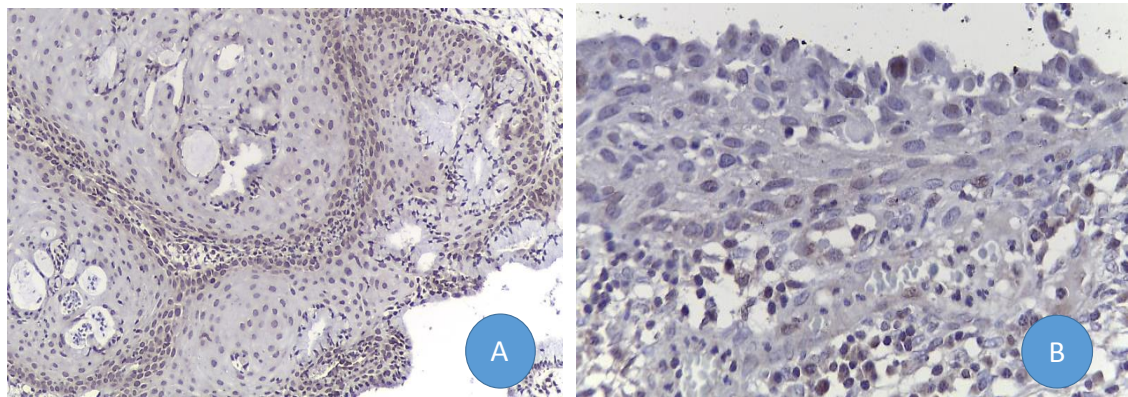


Figura 20. Expresión de CDX2 a través de IHQ en tejido cervical. Caso de Progresión LIEBG (A); LIEAG (B)

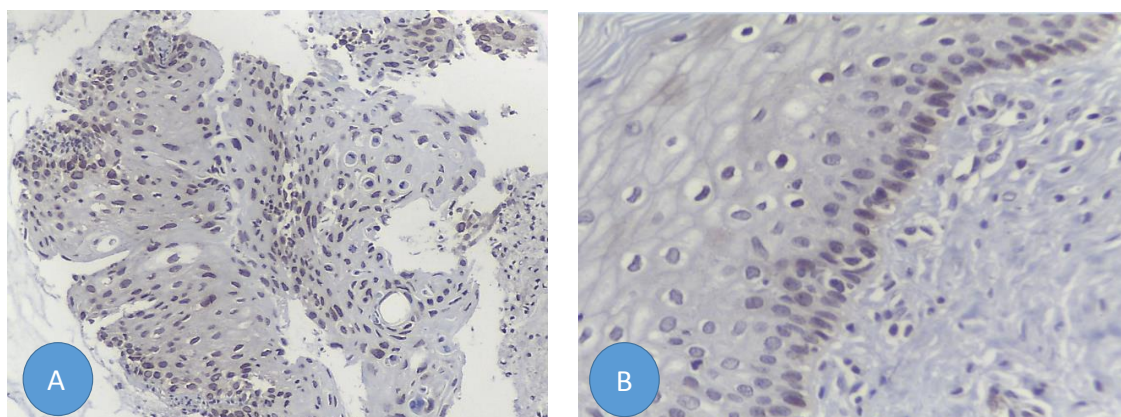


Figura 21. Expresión de CDX2 a través de IHQ en tejido cervical. Caso de regresión LIEAG (A); LIEBG (B)

### 5.6.13 Resultado expresión Anti-EPB41L3

Con el marcador de IHQ anti-EPB41L3, se observó disminución en la graduación de los resultados, luego de comparar las muestras del momento 2 vs momento1, en 3 de 6 casos (50%). Y con respecto a la regresión, se observó aumento en la graduación en 20%, disminución en 40% y el restante 40% no registró cambios. No hubo diferencia estadísticamente significativa ni para progresión (0,0756) ni regresión (0,3107). Tabla 26 y figuras 22-23

PERFIL INMUNOHISTOQUÍMICO DE EPB41L3							
RELACION EXPRESION IHQ MOMENTO 2 vs MOMENTO 1							
ESTUDIO LONGITUDINAL	AUMENTO		DISMINUCION		SIN CAMBIO		P VALUE
	n	%	n	%	n	%	
PROGRESION	0	0,0	3	50,0	3	50,0	p=0,0756
REGRESION	1	20,0	2	40,0	2	40,0	p=0,3107

Tabla 26. Variación en la expresión por IHQ de EPB41L3, en las muestras de progresión y regresión

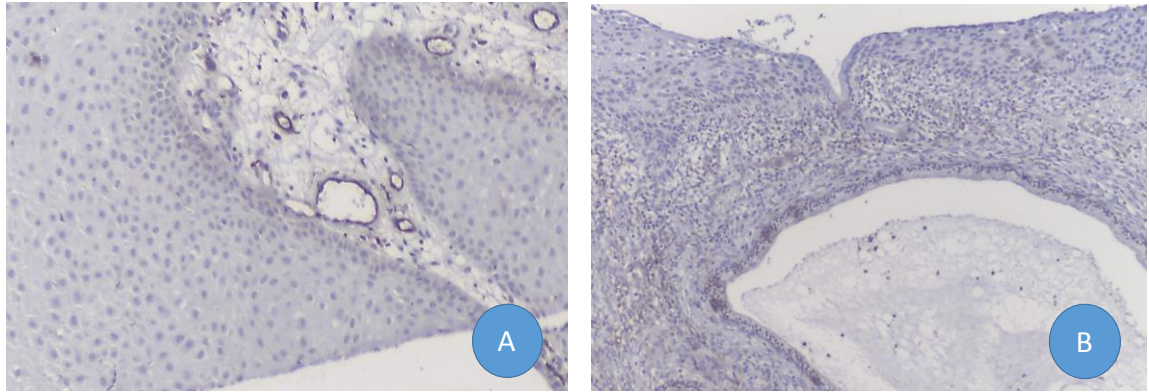


Figura 22. Expresión de EPB41L3 a través de IHQ en tejido cervical. Caso de Progresión LIEBG (A); LIEAG (B)

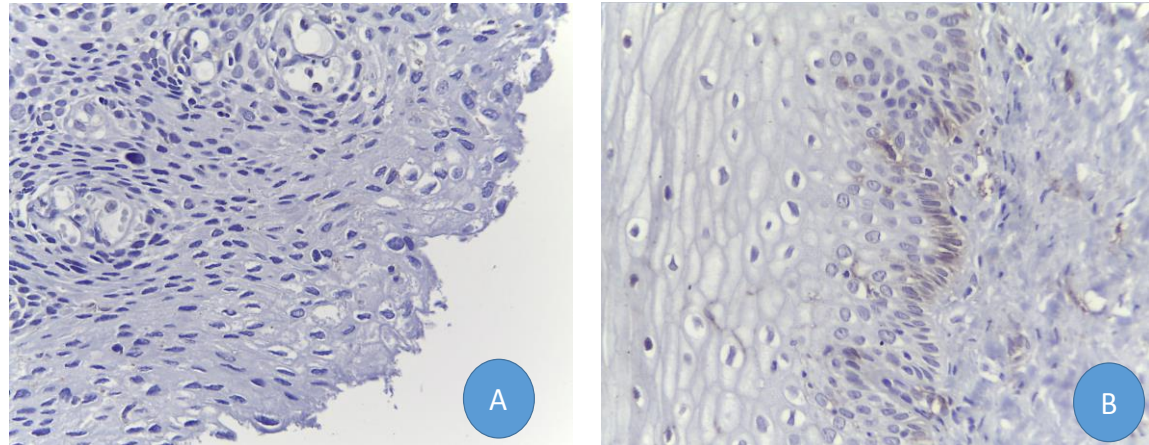


Figura 23. Expresión de EPB41L3 a través de IHQ en tejido cervical. Caso de regresión LIEAG (A); LIEBG (B)

#### 5.6.14 Resultado expresión Anti-HAND1

Con el marcador de IHQ anti-HAND1, se observó disminución en la graduación de los resultados, luego de comparar las muestras del momento 2 vs momento1, en 4 de 6 casos (66,7%) y en los 2 casos restantes (33.3%) hubo aumento en la graduación de la reacción. En cuanto a la regresión, hubo un 60% de casos con disminución de la graduación, 20% mostró aumento y el restante 20% no registró cambios en la expresión del marcador de IHQ. No hubo diferencia estadísticamente significativa ni para progresión (0,4650) ni regresión (0,1523). Tabla 27 y figuras 24-25

ESTUDIO LONGITUDINAL	PERFIL INMUNOHISTOQUÍMICO DE HAND1						P VALUE
	RELACION EXPRESION IHQ MOMENTO 2 vs MOMENTO 1						
	AUMENTO		DISMINUCION		SIN CAMBIO		
	n	%	n	%	n	%	
PROGRESION	2	33,3	4	66,7	0	0,0	p=0,4650
REGRESION	1	20,0	3	60,0	1	20,0	p=0,1523

Tabla 27. Variación en la expresión por IHQ de HAND1, en las muestras de progresión y regresión

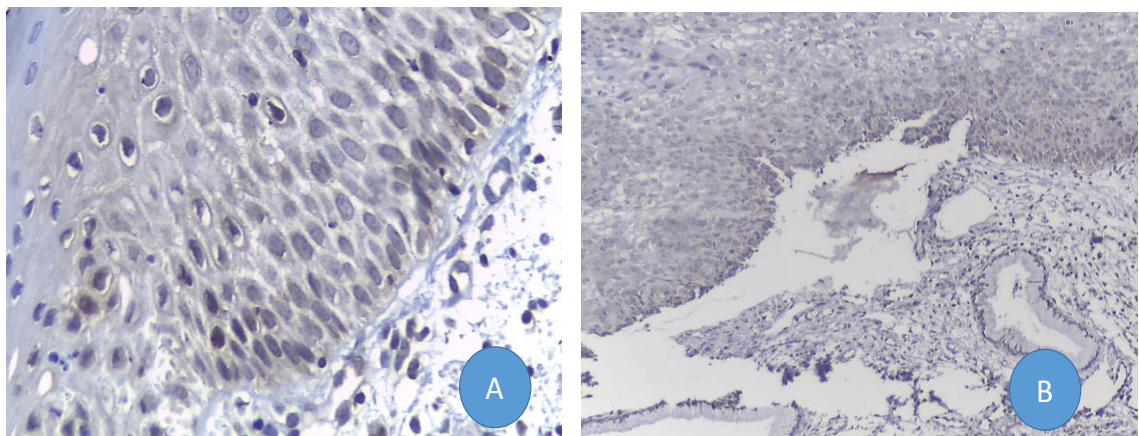


Figura 24. Expresión de HAND1 a través de IHQ en tejido cervical. Caso de Progresión LIEBG (A); LIEAG (B)

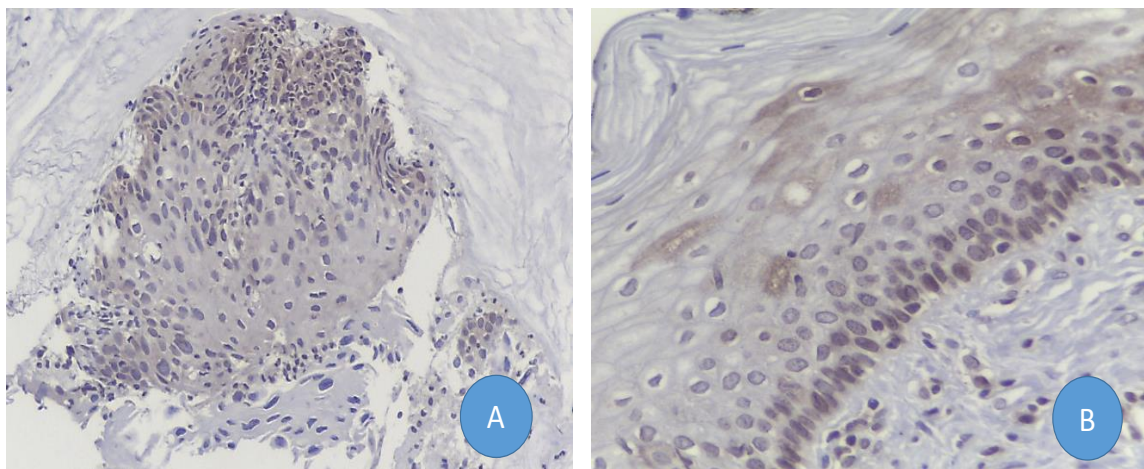


Figura 25. Expresión de HAND1 a través de IHQ en tejido cervical. Caso de regresión LIEAG (A); LIEBG (B)

### 5.6.15 Correlación entre expresión por RT-PCR e Inmunohistoquímica.

Para obtener el coeficiente de correlación de Spearman, se consideró “sin cambios” en la expresión por RT-PCR, si la diferencia de expresión entre las muestras del momento 2 vs momento 1, fue  $\pm 2,5$ . En las tablas se compara la expresión por RT-PCR e IHQ para cada uno de los casos tanto de progresión como de regresión. Tabla 28-29

CASO PROGRESION	SFRP1		CDO1		CDX2		EPB41L3		HAND1	
	PCR	IHQ	PCR	IHQ	PCR	IHQ	PCR	IHQ	PCR	IHQ
1	1	2	3	3	3	2	1	3	1	2
2	3	2	1	2	3	2	1	2	2	2
3	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1
4	1	3	1	3	3	3	1	2	1	1
5	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2
6	2	2	2	2	2	2	2	3	1	2

Tabla 28. Comparación de expresión por RT-PCR e IHQ, al comparar los resultados del momento 2 vs momento 1 en los casos de **progresión**. 1= aumentó; 2= disminuyó; 3= sin cambios de expresión

CASO DE REGRESION	SFRP1		CDO1		CDX2		EPB41L3		HAND1	
	PCR	IHQ	PCR	IHQ	PCR	IHQ	PCR	IHQ	PCR	IHQ
1	1	3	3	3	3	3	3	3	2	2
2	3	3	2	1	2	2	2	1	3	1
3	1	2	1	3	1	3	2	2	1	2
4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
5	1	2	2	3	2	2	1	3	1	1

Tabla 29. Comparación de expresión por RT-PCR e IHQ, al comparar los resultados del momento 2 vs momento 1 en los casos de **regresión**. 1= aumentó; 2= disminuyó; 3= sin cambios de expresión

Los resultados obtenidos del coeficiente de correlación a través de la prueba de Spearman, entre la expresión por RT-PCR e Inmunohistoquímica, se encuentra resumida en la tabla 30

		SFRP1	CDO1	CDX2	EPB41L3	HAND1
<b>Progresión</b>	<b>Spearman r</b>	0,566	0,112	0,447	0,333	0,500
	<b>P value</b>	0,333	0,533	0,500	0,500	0,400
<b>Regresión</b>	<b>Spearman r</b>	0,667	0,186	0,304	0,295	0,250
	<b>P value</b>	0,300	0,200	0,300	0,400	0,367

Tabla 30. Coeficiente de correlación entre niveles de expresión por RT-PCR e Inmunohistoquímica

Todos los genes analizados a través de IHQ mostraron un coeficiente de correlación positivo al comparar los niveles de expresión obtenidos a través de RT-PCR. En los casos de progresión las mayores correlaciones se encontraron con los niveles de expresión de SFRP1 ( $r=0,566$ ); HAND1 ( $r=0,500$ ); y CDX2 ( $r=0,477$ ). En cuanto a los casos de regresión, también SFRP1 mostró el mayor coeficiente de correlación ( $r=0,667$ ), seguido por CDX2 ( $r=0,304$ ) y EPB41L3 ( $r=0,295$ ).

## 6. DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta la historia natural de la infección por VPH a nivel cervical, se observa que ésta es una causa necesaria más no suficiente para el desarrollo de las lesiones premalignas y malignas de cuello uterino y que en general la aparición del cáncer invasor del cérvix es una consecuencia poco frecuente de la infección por VPH. Por lo anterior, varios trabajos de investigación se ha realizado con el propósito de encontrar nuevos biomarcadores a nivel de VPH y de la célula hospedera, que permita predecir de una mejor manera la probabilidad de progresión o regresión de las lesiones premalignas del cuello uterino.

De manera específica con el cáncer del cuello uterino, son varios los genes que han sido estudiados desde el punto de vista epigenético como posibles biomarcadores. Un trabajo realizado en Korea por (Kim et al., 2010) , estudiaron varios genes como factor pronóstico de progresión a LIEAG, algunos de estos genes fueron: CHH1, DAPK, GSTP1 y MGMT. Ellos encontraron mayor hipermetilación en los genes cuando correspondían a muestras de LIEAG o CaCU en comparación a las muestras normales y LIEBG. En este trabajo de investigación las muestras fueron obtenidas a través de citología en base líquida y no se analizó la expresión de éstos genes. Es importante anotar que se encontraron datos discordantes sobre el porcentaje de hipermetilación en algunos de los genes estudiados con otros trabajos de investigación, por ejemplo en el trabajo de (Kim et al., 2010), los porcentajes de metilación para DAPK1 y TWIST fue de 50% y de 37,5% en muestras de LIEAG, respectivamente. Mientras que en el estudio de (Missaoui et al., 2011), el porcentaje de metilación en muestras de LIEAG para DAPK1 y TWIST fue de 73,1% y 40,3%, respectivamente.. También se ha observado inconsistencia entre el porcentaje de metilación para MGMT en el trabajo de (Kim et al., 2010), con un 11,9% en muestras de LIEAG en comparación al trabajo de (Iliopoulos et at., 2009), en donde el porcentaje de metilación para el mismo gen fue de 75% en muestras de LIEAG



Otro estudio fue realizado en Taiwan por el grupo de (Lai et al., 2010), en donde obtuvieron muestras a través de cepillado cervical para estudiar el nivel de metilación del ADN de los genes SOX1, PAX1, LMX1A y NKX6-1, los cuales mostraron estar hipermetilados en lesiones NIC3+ en comparación con LIEBG y NIC2. Por otra parte un estudio realizado en Holanda por (Hesselink et al., 2011), analizaron la utilidad de encontrar genes hipermetilados que permitan predecir la progresión de lesiones a NIC3+. Los genes estudiados fueron CADM y MAL, obtenido de muestras a través de cepillado cervical y de pacientes con presencia de VPH de alto riesgo.

En nuestro trabajo de investigación se escogieron siete (7) genes candidatos como posibles biomarcadores, basado en un estudio previo realizado por el grupo de investigación de (García et al., 2012) en donde detectaron 132 genes hipermetilados y subexpresados, luego de analizar muestras de pacientes Colombianas con lesiones preneoplásicas, malignas y otras sin ningún tipo de lesiones cervicales.

En el estudio transversal se encontró mayor expresión con respecto al gen calibrador para los genes EDNRB y CDX2, en el grupo de LIEAG, en comparación con LIEBG y normal. Teniendo en cuenta los hallazgos del trabajo de (García et al., 2012) y (Vasiljević, 2014) se esperaba encontrar menor expresión de EDNRB en los casos de LIEAG, debido a que según sus resultados este gen se encontró hipermetilado en este tipo de lesiones. Sin embargo en nuestro trabajo se evidenció mayor expresión de EDNRB en 7 de 11 muestras (63,6%), por lo que sería importante poder determinar el estado de metilación de EDNRB en estos casos en futuros trabajos de investigación y correlacionarlos con los niveles de expresión encontrados.

Alteraciones epigenéticas asociadas a hipermetilación del promotor del EDNRB, se ha visto implicado en el desarrollo de cáncer en el ser humano, tales como carcinoma escamocelular esofágico, leucemia, cáncer gástrico, carcinoma nasofaríngeo, melanoma y cáncer de pulmón. Este gen interviene en la vía de señalización de la Endotelina, la cual favorece la angiogénesis, expansión metastásica del tumor e inhibe procesos de apoptosis. Hay estudios contradictorios sobre la participación de EDNRB en la carcinogénesis, por ejemplo

en el estudio realizado por (Watanabe et al., 2014), encontró que la baja expresión de EDNRB se asocia con peor pronóstico para el cáncer de próstata, pero también la sobreexpresión de este gen actúa como factor pronóstico desfavorable en ciertos tumores malignos como el Melanoma.

Situación similar se encontró con CDX2 en donde el 72,7% de las muestras con LIEAG tuvo mayor expresión, en contraste con lo esperado es decir, menor expresión en las muestras diagnósticadas como LIEAG, teniendo en cuenta que se encontró hipermetilado en el trabajo de (García et al., 2012), y que CDX2 actúa como un gen supresor al regular negativamente la vía de señalización Wnt (Liu et al., 2012). Las alteraciones epigenéticas de este gen se ha asociado con lesiones tumorales malignas a nivel gastrointestinal y pulmonar. Es importante anotar que la expresión de CDX2 en las lesiones tumorales gastrointestinales le confiere un mejor pronóstico a los pacientes (Camilo et al., 2014), por lo tanto, podría plantearse la posibilidad que CDX2 en LIEAG, también le pudiera brindar cierto factor pronóstico favorable, que estaría representado en la regresión de la lesión. Mas aún si observamos los resultados obtenidos para el estudio de inmunohistoquímica con CDX2 en los casos de regresión, en donde 4 de los 5 casos tuvieron una graduación en la expresión de 3+ en la muestra inicial (momento 1) que corresponde a un LIEAG. Obviamente, sería importante poder ampliar las muestras pareadas del estudio longitudinal para confirmar o descartar esta posibilidad.

En el estudio longitudinal CDX2 no tuvo diferencia significativa en los niveles de expresión para los casos de progresión ni regresión. Sin embargo con el estudio de inmunohistoquímica si se evidenció una disminución en la graduación de la expresión de CDX2 en las muestras de progresión. Al correlacionar con las expresiones por RT-PCR se observó que 3 de los 6 casos de progresión también tuvieron disminución. El coeficiente de correlación de Spearman entre los niveles de expresión por RT-PCR e IHQ para CDX2 fue 0,447. La diferencia encontrada entre el nivel de expresión por RT-PCR e IHQ pudiera corresponder a que la extracción de ADN fue en tejidos embebidos en bloques de parafina, en donde el formol puede interferir en la adecuada amplificación de los genes.

En el estudio longitudinal se encontró disminución en la expresión de SFRP1 en el 66,7% de los casos de progresión y en los casos de regresión se observó aumento de la expresión en el 100% de los casos. Este comportamiento biológico de SFRP1 se ajusta a los resultados esperados, teniendo en cuenta los estudios donde se ha detectado este gen hipermetilado en muestras de cérvix con LIEAG (Sova et al., 2006), (Shung et al., 2009) y (García et al., 2012). SFRP1, ha sido estudiado desde el punto de vista epigenético en varios tipos de cánceres tales como leucemia, colon-recto, gastrointestinal, seno y carcinoma esofágico en donde se ha encontrado hipermetilado. Este gen actúa como regulador negativo de la vía Wnt, pudiendo por lo tanto favorecer la proliferación celular al encontrarse silenciado debido a su estado hipermetilado. Con respecto a los resultados del estudio de inmunohistoquímica, los hallazgos fueron similares a los descritos para CDX2, es decir hubo disminución en la graduación de la expresión en 83,3% de los casos de progresión. Y en todas las muestras iniciales de los casos de regresión se obtuvo una graduación de expresión de 3+. Al correlacionar con las expresiones por RT-PCR se observó que 4 de los 6 casos de progresión también tuvieron disminución. El coeficiente de correlación de Spearman entre los niveles de expresión por RT-PCR e IHQ para SFRP1 fue 0,566

PTPRN, mostró aumento en los niveles de expresión en 5 de los 6 casos (83,3%) que presentaron progresión de la lesión. Estos hallazgos pueden estar relacionados a que PTPRN, es un gen que participa en procesos de fosforilación reversible de la proteína Tirosina, la cual a su vez interactúa para el control de señales de transducción, proliferación y diferenciación celular a través de la vía de señalización PAK. La metilación del ADN en PTPRN se ha visto relacionado con una mejor sobrevida libre de enfermedad posterior al tratamiento con quimioterapia en pacientes con cáncer de ovario (Bauerschlag et al.,) Con respecto al cáncer de cérvix este gen se encontró hipermetilado en el estudio de (García et al., 2012)., y luego de la revisión de la literatura, no se encontró ningún otro estudio que relacione cambios epigenéticos de PTPRN y CaCU. Teniendo en cuenta que los resultados encontrados de PTPRN no se ajustan a los esperados, por cuanto no se evidenció disminución en la expresión, también sería importante conocer el estado de metilación de este gen y compararlo con los niveles de expresión obtenidos en el presente estudio.

Con respecto a CDO1, se observó aumento de expresión en todas las muestras de regresión, situación similar a lo encontrado con SFRP1. Es decir este gen también actuaría como un supresor tumoral, tal como lo anota (Brait et al., 2012). Alteraciones de hipermetilación de este gen se ha asociado con tumores malignos de origen colon-rectal, pulmonar, mamario, esofágico, gástrico y con linfomas cutáneos de linaje T.

Finalmente, EPB41L3 y HAND1, no mostraron diferencias significativas en los niveles de expresión, entre los diferentes grupos de análisis tanto en el estudio transversal como longitudinal. Tampoco, se observó variaciones significativas en cuanto a los resultados de inmunohistoquímica. Sería importante validar los resultados en un futuro estudio con mayor tamaño maestral.

## **7. CONCLUSIONES**

En conclusión, SFRP1 fue el gen que mostró disminución y aumento de su expresión en los casos de progresión y regresión respectivamente, pudiendo por lo tanto actuar como un biomarcador asociado a proceso de metilación del ADN, en las lesiones preneoplásicas del cuello uterino. Además, en el estudio de inmunohistoquímica SFRP1 mostró adecuada correlación al comparar la expresión obtenida por RT-PCR. Por otra parte, EDNRB y CDX2 también pudieran comportarse como posibles biomarcadores en las lesiones preneoplásicas del cérvix, pero a través de un mecanismo molecular diferente a la metilación del ADN, teniendo en cuenta que en las LIEAG se observó mayor expresión de ambos genes, con relación a las muestras de LIEBG y normal. CDX2 también tuvo una adecuada correlación al comparar los resultados de expresión a través de inmunohistoquímica y RT-PCR.

## **8. RECOMENDACIONES**

Sería importante completar los resultados obtenidos en el presente estudio por medio de futuros trabajos de investigación, para conocer el estado de metilación de los genes y correlacionarlo con las expresiones obtenidas tanto en el estudio transversal como longitudinal. Por otra parte, sería muy importante diseñar estudios con un tamaño muestral probabilístico, especialmente en lo concerniente al estudio longitudinal, donde la consecución de las muestras pareadas resultan un poco más laborioso. Y finalmente, también sería de gran utilidad poder diseñar estudios de investigación con muestras de tejido obtenidas en fresco o de raspados cervicales para minimizar los riesgos de muestras de ADN deterioradas por el uso de fijadores tisulares como el formol.

## 9. BIBLIOGRAFIA

- Ali, S., Astley, S. B., Sheldon, T. a., Peel, K. R., & Wells, M. (1994). Detection and measurement of DNA adducts in the cervix of smokers and non- smokers. *International Journal of Gynecological Cancer*, 4(3), 188–193. <http://doi.org/10.1046/j.1525-1438.1994.04030188.x>
- Bauerschlag, D. O., Ammerpohl, O., Bräutigam, K., Schem, C., Lin, Q., Weigel, M. T., ... Wagner, W. (2011). Progression-free survival in ovarian cancer is reflected in epigenetic DNA methylation profiles. *Oncology*, 80(1-2), 12–20. <http://doi.org/10.1159/000327746>
- Brait, M., Ling, S., Nagpal, J. K., Chang, X., Park, H. L., Lee, J., ... Kim, M. S. (2012). Cysteine Dioxygenase 1 Is a Tumor Suppressor Gene Silenced by Promoter Methylation in Multiple Human Cancers. *PLoS ONE*, 7(9). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0044951>
- Camilo, V., Barros, R., Celestino, R., Castro, P., Vieira, J., Teixeira, M. R., ... Almeida, R. (2014). Immunohistochemical molecular phenotypes of gastric cancer based on SOX2 and CDX2 predict patient outcome, (Im), 1–11.
- Castle, P. E., Schiffman, M., Herrero, R., Hildesheim, A., Rodriguez, A. C., Bratti, M. C., ... Burk, R. D. (2005). A prospective study of age trends in cervical human papillomavirus acquisition and persistence in Guanacaste, Costa Rica. *The Journal of Infectious Diseases*, 191(11), 1808–1816. <http://doi.org/10.1086/428779>
- Comision de Regulacion en Salud. (2011). Acuerdo 29 De 2011.
- Dasari, S., Wudayagiri, R., & Valluru, L. (2015). Cervical cancer: Biomarkers for diagnosis and treatment. *Clinica Chimica Acta*, 445, 7–11. <http://doi.org/10.1016/j.cca.2015.03.005>
- De Villiers, E.-M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H.-U., & zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324(1), 17–27. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.033>
- Doorbar, J. (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science (London, England: 1979)*, 110(5), 525–541. <http://doi.org/10.1042/CS20050369>
- Elfgren, K., Kalantari, M., Moberger, B., Hagmar, B., & Dillner, J. (2000). A population-based five-year follow-up study of cervical human papillomavirus infection. *American Journal*

of *Obstetrics and Gynecology*, 183(3), 561–567.  
<http://doi.org/10.1067/mob.2000.106749>

- Esteller, M. (2008). Epigenetics in Cancer, 1–12. Retrieved from <papers2://publication/uuid/CD7DA39A-C84C-45A9-BE69-ACA42CC6625E>
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., ... Bray, F. (2013). GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase. No. 11 [Internet].
- Gaviria, A., Muñoz, N., Ruiz, F., Ospina, M., Uriquijo, L., Arias, J., ... Bonilla, J. (2013). Plan Decenal de Salud Pública. *Ministerio de Salud*, (32), 2012–2021. Retrieved from <http://www.minsalud.gov.co/Documentos y Publicaciones/Plan Decenal - Documento en consulta para aprobación.pdf>
- Hesselink, A. T., Heideman, D. a M., Steenbergen, R. D. M., Coupé, V. M. H., Overmeer, R. M., Rijkaart, D., ... Snijders, P. J. F. (2011). Combined promoter methylation analysis of CADM1 and MAL: An objective triage tool for high-risk human papillomavirus DNA-positive women. *Clinical Cancer Research*, 17(8), 2459–2465. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2548>
- Hussain, S. K., Sundquist, J., & Hemminki, K. (2008). Familial clustering of cancer at human papillomavirus-associated sites according to the Swedish Family-Cancer Database. *International Journal of Cancer*, 122(8), 1873–1878. <http://doi.org/10.1002/ijc.23265>
- Kim, J.-H., Choi, Y. D., Lee, J. S., Lee, J. H., Nam, J. H., & Choi, C. (2010). Assessment of DNA methylation for the detection of cervical neoplasia in liquid-based cytology specimens. *Gynecologic Oncology*, 116(1), 99–104. <http://doi.org/10.1016/j.ygyno.2009.09.032>
- Kjellberg, L., Hallmans, G., Ahren, A. M., Johansson, R., Bergman, F., Wadell, G., ... Dillner, J. (2000). Smoking, diet, pregnancy and oral contraceptive use as risk factors for cervical intra-epithelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection. *British Journal of Cancer*, 82(7), 1332–1338. <http://doi.org/10.1054/bjoc.1999.1100>
- Lai, H. C., Lin, Y. W., Huang, R. L., Chung, M. T., Wang, H. C., Liao, Y. P., ... Yu, M. H. (2010). Quantitative DNA methylation analysis detects cervical intraepithelial neoplasms type 3 and worse. *Cancer*, 116(18), 4266–4274. <http://doi.org/10.1002/cncr.25252>
- Liu, X., Zhang, X., Zhan, Q., Brock, M. V., Herman, J. G., & Guo, M. (2012). CDX2 serves as a Wnt signaling inhibitor and is frequently methylated in lung cancer. *Cancer Biology and Therapy*, 13(12), 1152–1157. <http://doi.org/10.4161/cbt.21344>
- Mikeska, T., & Craig, J. (2014). DNA Methylation Biomarkers: Cancer and Beyond. *Genes*, 5(3), 821–864. <http://doi.org/10.3390/genes5030821>



- Missaoui, N., Hmissa, S., Trabelsi, A., Traoré, C., Mokni, M., Dante, R., & Frappart, L. (2011). Promoter hypermethylation of CDH13, DAPK1 and TWIST1 genes in precancerous and cancerous lesions of the uterine cervix. *Pathology Research and Practice*, 207(1), 37–42. <http://doi.org/10.1016/j.prp.2010.11.001>
- Moreno-Acosta, P., Carrillo, S., Gamboa, O., Acosta, Y., Balart-Serra, J., Magne, N., ... Romero-Rojas, A. E. (2013). Expresión de marcadores hipóxicos y glucolíticos CAIX, GLUT-1, HKII y su relación con la respuesta temprana al tratamiento en carcinoma escamocelular de cuello uterino. *Progresos de Obstetricia Y Ginecología*, 56(8), 404–413. <http://doi.org/10.1016/j.pog.2012.09.005>
- Moscicki, a B., Ellenberg, J. H., Vermund, S. H., Holland, C. a, Darragh, T., Crowley-Nowick, P. a, ... Wilson, C. M. (2000). Prevalence of and risks for cervical human papillomavirus infection and squamous intraepithelial lesions in adolescent girls: impact of infection with human immunodeficiency virus. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, 154(2), 127–134.
- Muñoz, N., Bosch, F. X., de Sanjosé, S., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, K. V., ... Meijer, C. J. L. M. (2003). Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *New England Journal of Medicine*, 348(6), 518–527. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa021641>
- Muñoz, N., Méndez, F., Posso, H., Molano, M., van den Brule, A. J. C., Ronderos, M., ... Muñoz, A. (2004). Incidence, duration, and determinants of cervical human papillomavirus infection in a cohort of Colombian women with normal cytological results. *The Journal of Infectious Diseases*, 190(12), 2077–2087. <http://doi.org/10.1086/425907>
- Murillo, R., Wiesner, C., & Cendales, R. (2011). Comprehensive evaluation of cervical cancer screening programs : the case of Colombia. *Salud Publica de México*, 53(0), 469–477.
- Ostor, A. G. (1993). Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol*, 12(2), 186–192. <http://doi.org/10.1097/00004347-199304000-00018>
- Sahasrabudde, V., Luhn, P., & Wentzensen, N. (2011). Human papillomavirus and cervical cancer: biomarkers for improved prevention efforts. *Future Microbiology*, 6(9), 1–25. <http://doi.org/10.2217/fmb.11.87>
- Salud, I. N. De. (2011). Mortalidad 1998-2011 y situación de salud en los municipios de frontera terrestre en Colombia, 1 – 240. Retrieved from [http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/ons/SiteAssets/Paginas/publicaciones/Informe2\\_definitvo.pdf](http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/ons/SiteAssets/Paginas/publicaciones/Informe2_definitvo.pdf)
- Sova, P., Feng, Q., Geiss, G., Wood, T., Strauss, R., Rudolf, V., ... Kiviat, N. (2006). Discovery of novel methylation biomarkers in cervical carcinoma by global demethylation and microarray analysis. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 15(1), 114–123. <http://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-05-0323>

- Stanley, M. a. (2012). Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(2), 215–222. <http://doi.org/10.1128/CMR.05028-11>
- Thinkhamrop, J., Lumbiganon, P., & Jitpakdeebodin, S. (1998). Loss to follow-up of patients with abnormal Pap smear: magnitude and reasons. *J Med Assoc Thai*, (11), 862–865.
- Vasiljević, N., Scibior-Bentkowska, D., Brentnall, A. R., Cuzick, J., & Lorincz, A. T. (2014). Credentialing of DNA methylation assays for human genes as diagnostic biomarkers of cervical intraepithelial neoplasia in high-risk HPV positive women. *Gynecologic Oncology*, 132(3), 709–714. <http://doi.org/10.1016/j.ygyno.2014.02.001>
- Walboomers, J. M. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., ... Muñoz, N. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology*, 189(1), 12–19. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199909\)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F](http://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F)
- Watanabe, J., Kaneko, Y., Kurosumi, M., Kobayashi, Y., Sakamoto, M., Yoshida, M. a., ... Matsushima, Y. (2014). High-incidence spontaneous tumors in JF1/Ms mice: Relevance of hypomorphic germline mutation and subsequent promoter methylation of Ednrb. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 140(1), 99–107. <http://doi.org/10.1007/s00432-013-1546-6>
- Woodman, C. B. J., Collins, S. I., & Young, L. S. (2007). The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature Reviews. Cancer*, 7(1), 11–22. <http://doi.org/10.1038/nrc2050>
- Xi, L. F., Koutsky, L. A., Galloway, D. A., Kuypers, J., Hughes, J. P., Wheeler, C. M., ... Kiviat, N. B. (1997). Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *Journal of the National Cancer Institute*, 89(11), 796–802. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9182978>
- Yagi, K., Akagi, K., Hayashi, H., Nagae, G., Tsuji, S., Isagawa, T., ... Kaneda, A. (2010). Three DNA methylation epigenotypes in human colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*, 16(1), 21–33. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-2006>

## 10. ANEXOS

### ANEXO A. Protocolo para extracción de ADN- kit AllPrep DNA/RNA

1. Añadir 350µl de buffer RLT al tejido que ha sido previamente tratado con proteinasa k, realizar vortex.
2. Centrifugar durante 3 minutos a velocidad máxima
3. Retirar el sobrenadante con la pipeta y transferirlo a una columna DNA Allprep.( colocar columna en un tubo de 2ml)
4. Centrifugar durante 30 segundos a 10.000 rpm
5. Colocar la columna de allprep en un nuevo tubo de 2ml ( el flujo se utiliza para purificación de RNA total)
6. Almacenar a temperatura ambiente (15-25 °C) o a 4°C
7. Añadir 500µl de buffer AW1 a la columna DNA Allprep, cerrar bien la tapa
8. Centrifugar 15 segundos a 10.000 rpm, desechar el flujo, utilizar la misma columna.
9. Añadir 500 µl de buffer AW2 a la columna de DNA Allprep, cerrar bien la tapa.
10. Centrifugar durante 2 minutos a velocidad máxima, desechar el flujo, utilizar una nueva columna de 1.5ml
11. Añadir 100µl de buffer EB (precalentado a 70° C) directamente a la membrana de la columna.
12. Incubar a temperatura ambiente (15-25° C) durante 2 minutos
13. Centrifugar durante 1 minuto a 10.000 rpm para eluir el DNA
14. Repetir desde el paso 11 en una nueva columna de 1.5ml. ( se guarda el flujo anterior ya que contiene DNA)

Protocolo para extracción de ARN- kit AllPrep DNA/RNA/ Protein

1. El flujo para purificación de RNA, añadir 250µl de etanol al 100%, realizar vortex.
2. Transferir hasta 700 µl de la muestra a la columna RNeasy, colocarla en un tubo de 2ml.
3. Centrifugar 15 segundos a 10.000 rpm (transferir flujo a un tubo de 2ml para purificación de proteínas)
4. Añadir 700 µl de buffer RW1 a la columna RNeasy, cerrar bien la tapa.
5. Centrifugar 15 segundos a 10.000 rpm, desechar el flujo, utilizar el mismo tubo de 2ml.
6. Añadir 500 µl de buffer RPE a la columna RNeasy , cerrar bien la tapa
7. Centrifugar 15 segundos a 10.000 rpm, desechar el flujo, utilizar el mismo tubo de 2ml.
8. Añadir 500 µl de buffer RPE a la columna RNeasy, cerrar bien la tapa.
9. Centrifugar 2 minutos a 10.000 rpm, para lavar la membrana de la columna, desechar el flujo.
10. Colocar la columna de RNeasy en un nuevo tubo de 2ml. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.
11. Colocar columna en un nuevo tubo de 1.5ml.
12. Añadir 30-50µl de agua libre de RNasa directamente a la membrana de la columna, cerrar bien la tapa.
13. Centrifugar durante 1 minuto a 10.000 rpm para eluir el ARN
14. Repetir paso doce.

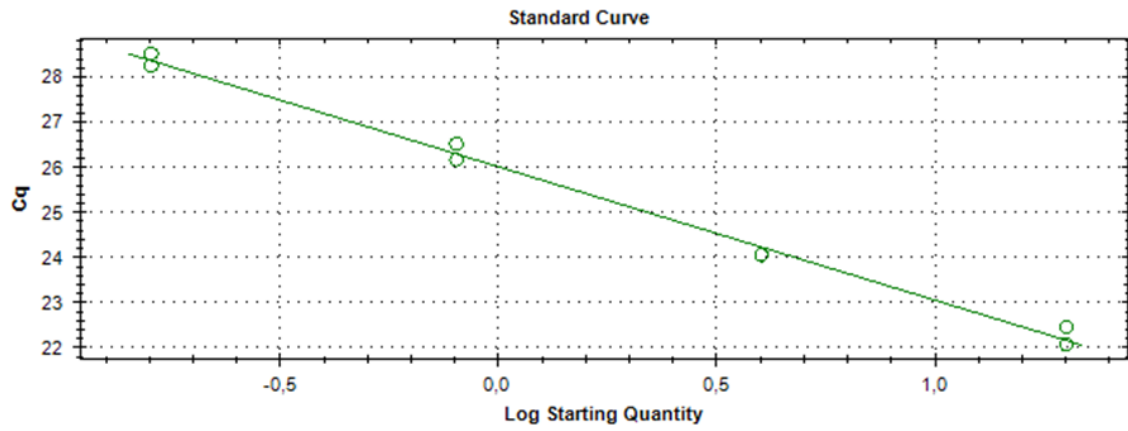
## **ANEXO B. Preparación de muestras de ARN previo a la RT-PCR y Kit de síntesis de cDNA Super Script VILO- INVITROGEN**

1. Obtener 8ul de ARN de cada una de las muestras del estudio
2. Agregar 1ul por cada muestra de DNase I reaction Buffer
3. Agregar 1ul por cada muestra de DNase I, Amp grade 1U/ul
4. Incubación de las muestras por 15 minutos a temperatura ambiente
5. Inactivar la DNasa I por la adición de 1ul de solución de 25nM de EDTA a la mezcla de la reacción
6. Calentar por 10 minutos a 65°C
7. Posterior a la incubación del paso anterior, agregar 4ul de VILO reaction Mix y 6 ul de DEPC-treated water a cada uno de los tubos con el contenido de ARN
8. Mezclar suavemente los tubos e incubar a 25°C durante 10 minutos
9. Incubar los tubos a 42°C por 60 minutos
10. Terminar la reacción a 85°C por 5 minutos

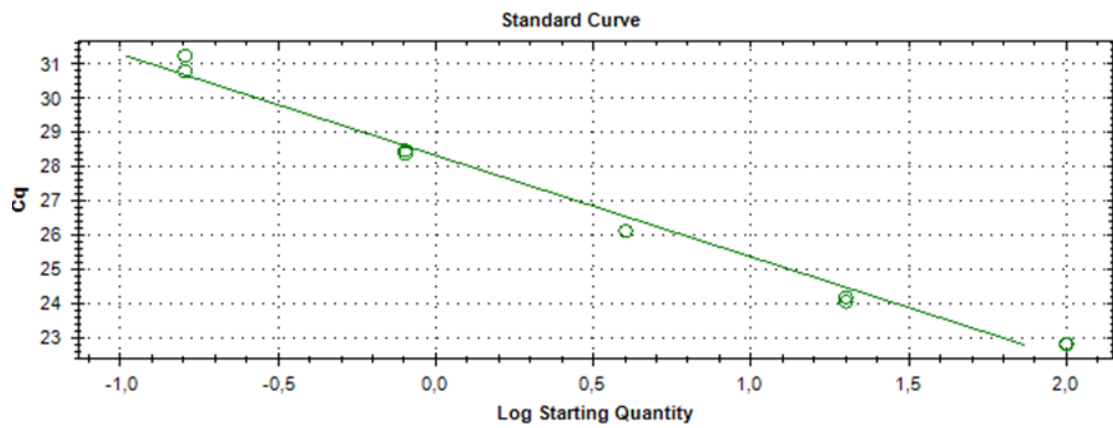
### **ANEXO C. Procedimiento para realización del estudio de inmunohistoquímica.**

1. Realizar cortes con láminas Slidotech® especiales para IHC
2. Desparafinar a 60° C, 2 horas
3. Xilol tres pasadas en el tren de coloración 5 minutos c/u
4. Alcohol tres pasadas en el tren de coloración 5 minutos c/u
5. Agua tres pasadas en el tren de coloración 5 minutos c/u
6. Aplicar peróxido de hidrógeno Incubar de 5 a 10 minutos
7. Lavar con solución lavadora CINtech wash buffer REF: 8557
8. Tratar al calor 40 min con recuperador RE7113-19 novocastra en steamer OSTER 5711
9. Esperar a que las láminas lleguen a temperatura ambiente y empezar la técnica
10. Lavar con solución lavadora CINtech wash buffer REF: 8557
11. Aplicar sobre el tejido 100ml de Power Block e incubar de 10 min
12. Sobre POWER BLOCK aplicar el anticuerpo primario Incubar 1 hora
13. Lavar con solución lavadora CINtech wash buffer REF: 8557
14. Incubar durante 25 minutos con supersensitive KIT (Super enhancer)
15. Lavar con solución lavadora CINtech wash buffer REF: 8557
16. Incubar durante 25 minutos SUPER SENSITIVE KIT (Poly HRP)
17. Lavar con solución lavadora CINtech wash buffer REF: 8557
18. Aplicar Liquid DAB Substrato- Cromógeno e Incubar durante 5 minutos
19. Lavar con Lavar con solución lavadora CINtech wash buffer REF: 8557
20. Contrastar aplicando hematoxilina por 1 minuto y luego lavar.
21. Agregar agua amoniacal al 1% 10 segundos y lavar posteriormente.
22. Alcohol y Xilol tres pases 5 minutos cada uno
23. Finalmente montar con laminilla para el estudio histológico.

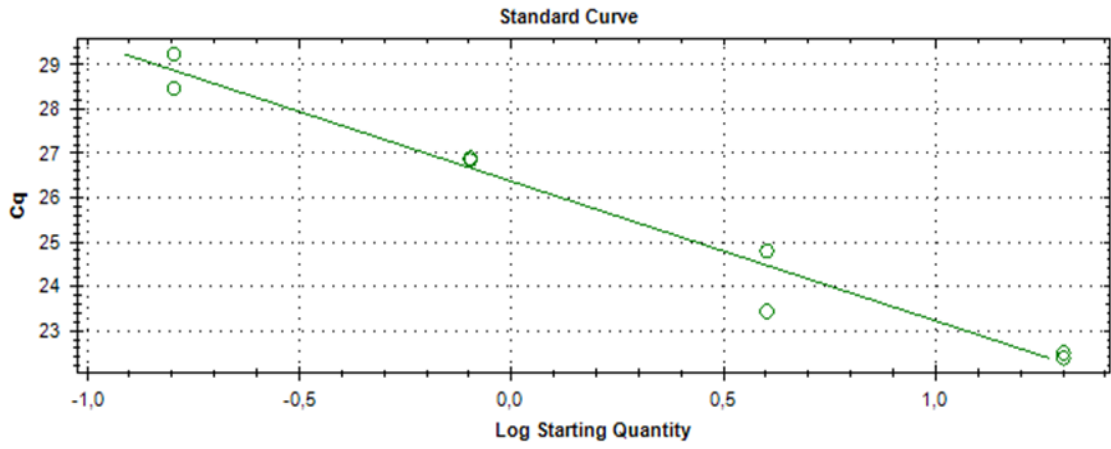
ANEXO D. Curvas de eficiencia de PCR para cada gen.



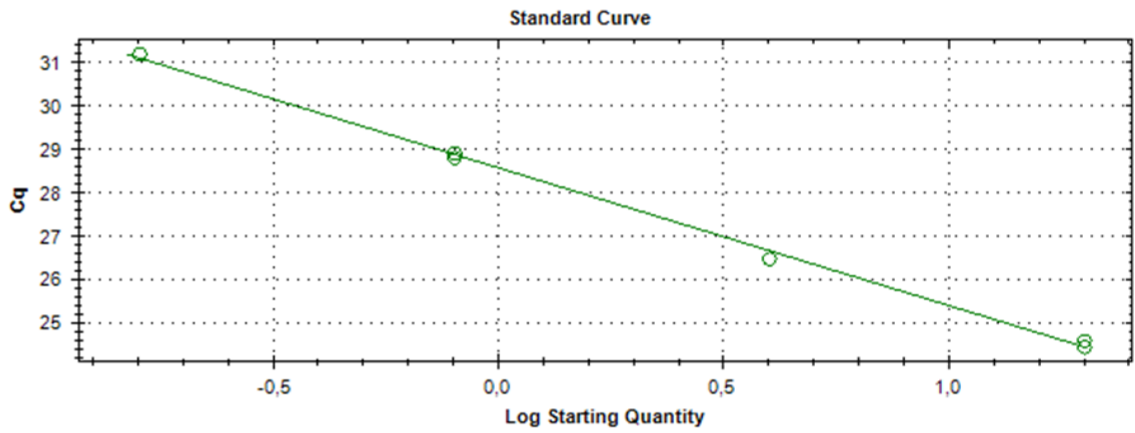
Curva de eficiencia gen **ACTINA**;  $R^2= 0.994$



Curva de eficiencia gen **SFRP1**;  $R^2= 0.986$

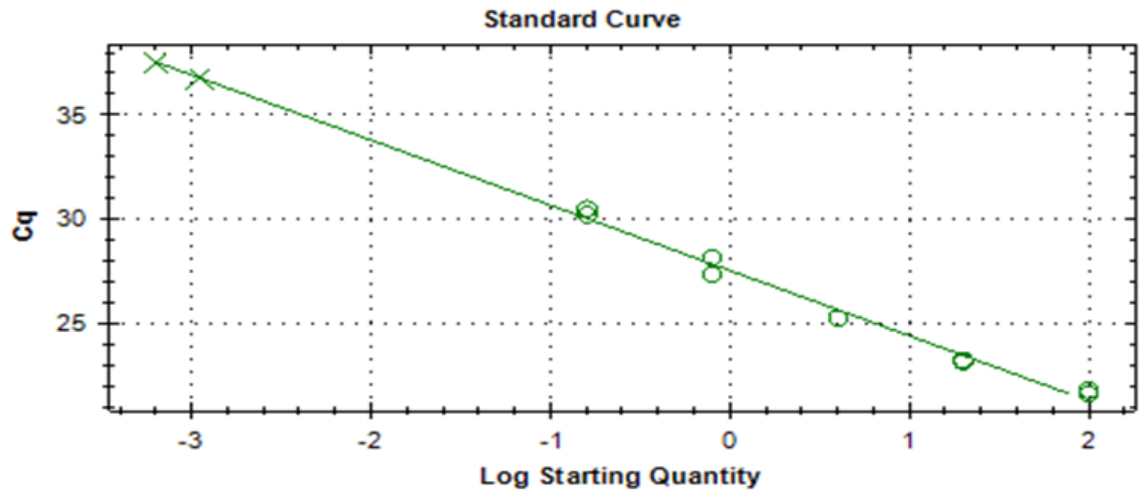


Curva de eficiencia gen **CDO1**;  $R^2= 0.966$

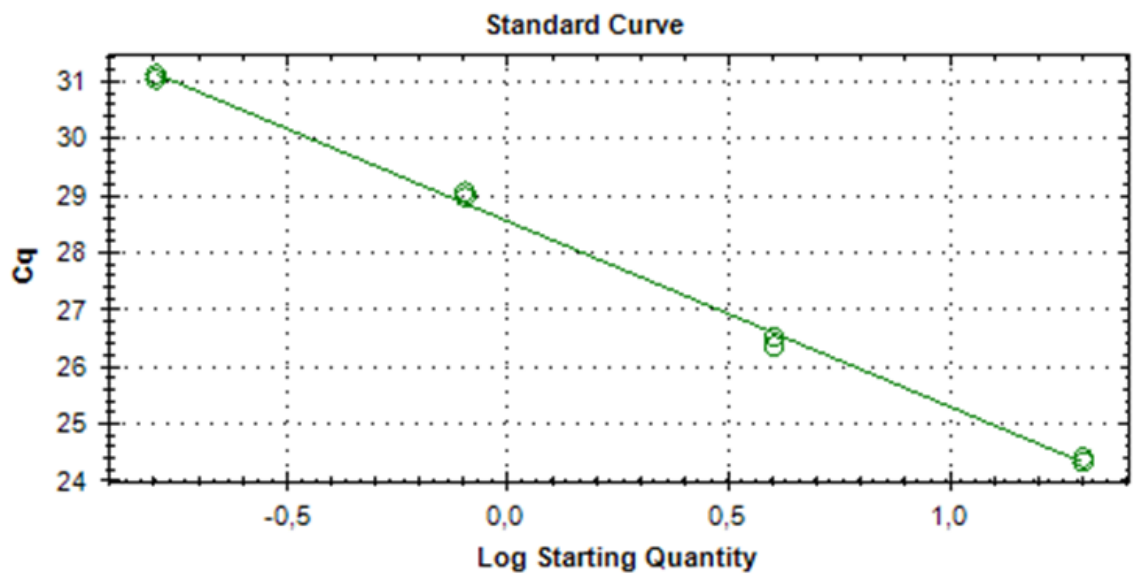


Curva de eficiencia gen **PTPRN**;  $R^2= 0.998$

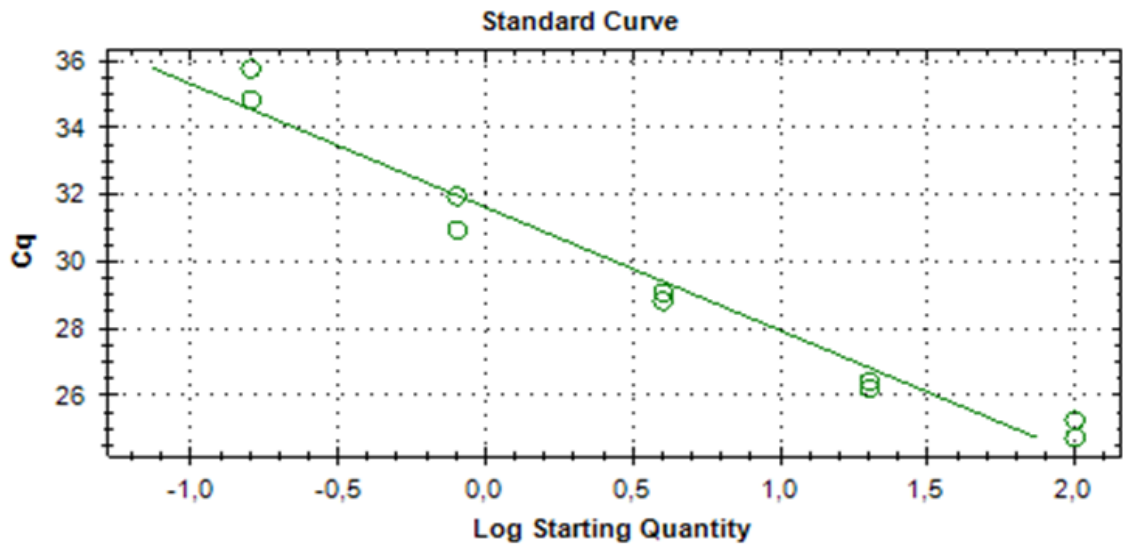




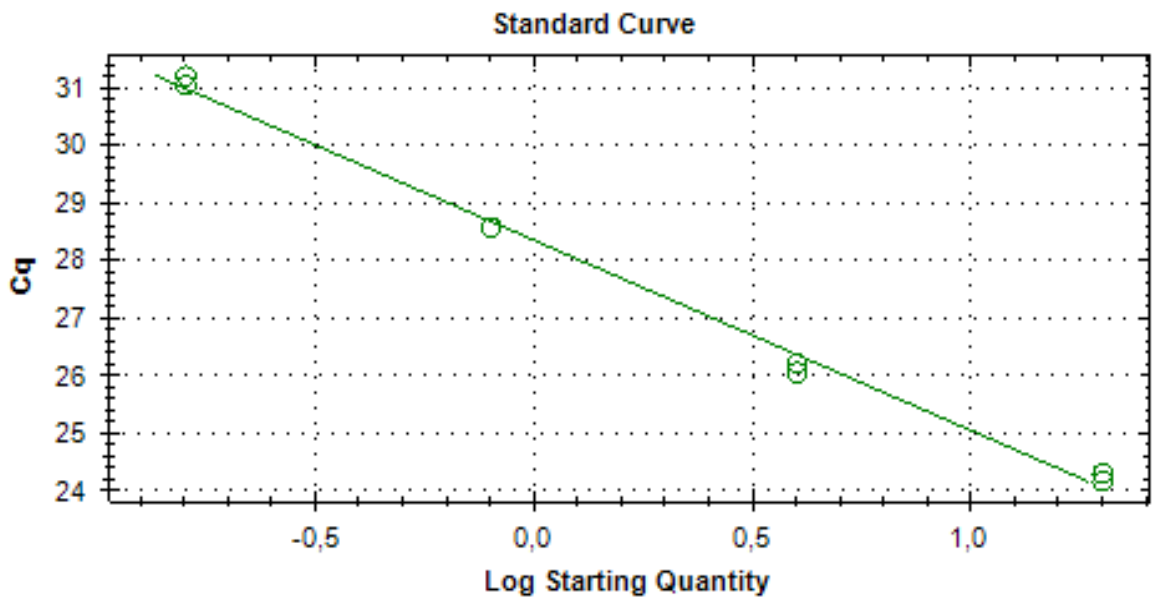
Curva de eficiencia gen **EDNRB**;  $R^2= 0.985$



Curva de eficiencia gen **CDX2**;  $R^2= 0.998$



Curva de eficiencia gen **EPB41L3**;  $R^2= 0.965$



Curva de eficiencia gen **HAND1**;  $R^2= 0.995$