



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS-IPN  
Unidad Zacatenco  
Departamento de Biomedicina Molecular

**Participación de la proteína celular 1 de unión a retinol  
(CRBP1), en el proceso de quimiosensibilidad al  
cisplatino**

Tesis que presenta:

**M. en C. Mónica Graciela Mendoza Rodríguez**

Para obtener el grado de:  
Doctora en Ciencias en la especialidad de Biomedicina  
Molecular

Directores de tesis: Dr. Marco Antonio Meraz Ríos  
Dr. Mauricio Salcedo Vargas

México D.F

Agosto 2015

Este trabajo fue llevado a cabo en el laboratorio 5 del departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV-IPN y el laboratorio de Oncología Genómica de la Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Oncológicas (UIMEO)-CMN SXXI, bajo la supervisión del Dr. Mauricio Salcedo Vargas y Dr. Marco Antonio Meraz Ríos.

**El Doctorado en Biomedicina Molecular del CINVESTAV-IPN, se encuentra incluido en el Padrón de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), al cual ofrezco mis más sinceros agradecimientos por el apoyo económico que me otorgo durante el desarrollo del Doctorado a través de la beca con número 233391.**

Este trabajo estuvo bajo el financiamiento de los proyectos de Fondos Sectoriales en Salud 2013, con número 202222, proyecto 69719 y 87244 de fondos sectoriales CONACYT.

Un agradecimiento muy especial al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), por el apoyo que recibí mediante la beca que se me otorgó durante mi estancia en esta institución.

## **AGRADECIMIENTOS**

*-A mis padres: Elena Rodríguez y Pacomio Mendoza, que con su ejemplo siempre me enseñaron a luchar por las cosas en la vida, por ser unos padres maravillosos, por todo su amor y apoyo incondicional.*

*-A mis hermanas: Adriana, Isabel, Olga y Cristina, por ese ejemplo de superación que me han dado, por cada palabra de ánimo que me ayudo a seguir adelante.*

*-Al Dr. Mauricio Salcedo Vargas, que me ha acompañado a lo largo de la Maestría y Doctorado como mi tutor, gracias por su amistad, pero sobre todo por los consejos que me dio para que este trabajo se pudiera llevar a cabo, le agradezco infinitamente su asesoría y apoyo incondicional.*

*-Al Dr. Marco Antonio Meraz Ríos, que me ha dirigido a lo largo de estos 6 años de Maestría y Doctorado, por ser uno de los pilares fundamentales que me ayudaron con sus consejos, asesoría y su amistad para que este trabajo se pudiera realizar.*

*- Al Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda: Por su valioso apoyo como asesor de esta tesis, por sus consejos y sugerencias que ayudaron a enriquecer este trabajo.*

*- A la Dra. Carmen Sánchez Torres: Por haber sido asesora de esta tesis, por su apoyo y sugerencias.*

*- A mi mejor amiga, Beatriz Alvarado Hernández: gracias por acompañarme en todos estos años, por compartir conmigo esta gran amistad, escucharme y apoyarme cuando mas lo necesité.*

*- A Eloy y Carolina, gracias por dejarme ser parte de sus vidas permitiéndome ser la madrina de Carito, gracias por sus palabras de apoyo, por esos fines de*

*semana tan amenos.*

*- A mis amigos y compañeros del Laboratorio de Oncología Genómica:*

*Keiko, Daniel, Pablo, Gustavo, Victor y todos os demás, gracias por su amistad.*

*- A mis compañeras del laboratorio de CINVESTAV: Maribel, Carmen, Korina, Maria del Carmen, Perla, Rosalia, Laura, por su amistad y apoyo en este trabajo.*

*-A la M.C. María del Pilar Figueroa Corona: Por el apoyo técnico que me dio para la realización de la parte de clonación en mi trabajo.*

*- Al C. Julio César Ramírez Gómez: Por el apoyo técnico y las facilidades en el área de trabajo.*

*-A mis compañeros y amigos del Doctorado en Biomedicina Molecular CINVESTAV: Betty, Eloy, Carmen, Job, Liliana, Dafne, gracias por su amistad.*

*-Ma. de Jesús Maqueda Villegas: Secretaria del departamento de Biomedicina Molecular, gracias por todo el apoyo recibido durante la maestría para los trámites y cuestiones administrativas.*

*-Al departamento de Biomedicina Molecular y todos sus profesores: por la formación que recibí de ellos.*

*- A María del Carmen López Zavala, Miriam Karina Molina García y Darinka Alvarez Castillo, del departamento de servicios escolares, por las facilidades en los trámites.*

*- A Ninfa Arreola, Socorro Torres Ocaña, María del Carmen López Zavala, Miriam Karina Molina García, Paola Ivette Medina Muñoz, Adrián Rodríguez Beltrán, Gabriel Sánchez Rodríguez y Fabián Rivera, por el apoyo administrativo brindado*

*durante estos 4 años de Doctorado.*



# Índice

	<b>Pag.</b>
1. Abstract.....	1
2. Resumen.....	2
3. Introducción.....	3
3.1. Cisplatino.....	3
3.1. 1. Mecanismos de acción.....	3
3.2. Cáncer cérvicouterino.....	5
2.2.1. Clasificación de cáncer cérvicouterino.....	6
3.3. Tratamiento y recurrencia.....	7
3.3.1. Tratamiento en etapas tempranas.....	7
3.3.2. Tratamiento en etapas localmente avanzadas.....	7
3.3.3. Tratamiento en etapas avanzadas con metástasis.....	8
3.4. Cambios genéticos.....	9
2.4.1. Metilación.....	9
3.5. Retinol.....	10
2.5.1. CRBP1.....	11
4. Antecedentes.....	14
5. Justificación.....	18
6. Hipótesis.....	19
7. Objetivo general.....	19
8. Objetivos específicos.....	19
9. Metodología.....	20

9.1. Cultivo celular.....	20
9.2. Detección de CRBP1 por Inmunofluorescencia.....	20
9.3. Detección de CRBP1 por Western blot .....	21
9.4. Transfección de CRBP1.....	22
9.5. Extracción de RNA total.....	22
9.6. Citotoxicidad y citometria de flujo.....	23
9.7. Microarreglos de expresión.....	23
9.7.1. Análisis de microarreglos.....	24
9.7.2. Expresión mediante RT-PCR.....	25
9.7.3. Determinación de los patrones de fosforilación de proteínas..	25
9.8. Análisis estadístico.....	26
10. Resultados.....	27
10.1. Expresión de CRBP1.....	27
10.2. Quimiosensibilidad al cisplatino.....	31
10.3. Transfección de CRBP1 en las líneas celulares MCF-7 y SiHa.....	34
10.4. Efecto de la expresión de CRBP1 en la quimiosensibilidad al cisplatino en las células SiHa y MCF-7 transfectadas con CRBP1.....	37
10.5. Microarreglos de expresión.....	39
10.5.1. Extracción de RNA total.....	39
10.5.2. Análisis de genes diferencialmente expresados.....	40
10.5.3. Evaluación de la expresión de genes por RT-PCR en tiempo real.....	47
10.6. La Expresión de CRBP1 disminuye la fosforilación de proteínas cinasas.....	49
10.7. Regulación de receptores nucleares por la expresión de CRBP1.....	52

10.8. CRBP1 se asocia a la sobrevida en los pacientes con cáncer cérvicouterino.....	54
11. Discusión.....	55
12. Conclusiones.....	64
13.- Perspectivas del trabajo.....	65
14. Bibliografía.....	66
15. Anexos.....	82

## Índice de figuras

Figura 1. Estructura química del <i>cisplatino</i> y <i>trans-platino</i> .....	2
Figura 2. Reacción química de del cisplatino.....	3
Figura 3. Incidencia y mortalidad de los principales tipos de cáncer en México.....	4
Figura 4. Estructura tridimensional de proteína celular 1 de unión a retinol.....	11
Figura 5. Vía de metabolismo del retinol (RoI).....	12
Figura 6. Detección de la expresión de CRBP1 en NIH3T3 y MCF-7.....	26
Figura 7. Detección de la expresión de CRBP1 en líneas celulares de cáncer de cérvix.....	28
Figura 8. Western blot de las muestras HeLa, SiHa y CasKi.....	29
Figura 9. Quimiosensibilidad a cisplatino en líneas celulares de cáncer de cérvix.....	31
Figura 10. Quimiosensibilidad a cisplatino en MCF-7.....	32
Figura 11. Western blot de reconstitución y aumento de la expresión de CRBP1 en MCF-7 y SiHa.....	34
Figura 12. Reconstitución y aumento de la expresión de CRBP1 en MCF-7 y SiHa.....	35
Figura 13. Sensibilidad a cisplatino en líneas celulares MCF-7/CRBP1 y SiHa/CRBP1 a diferentes concentraciones de cisplatino.....	37

Figura 14. Micro electroforesis de RNA para verificar integridad del material genético.....	38
Figura 15. Diagramas de Venn para representar el número de genes diferencialmente expresados que se comparten entre MCF-7/5 y SiHa/SC-3.....	41
Figura 16. Imágenes representativas del análisis de la participación de los genes diferencial mente expresados en SiHa/SC-3 y MCF-7/5 en diferentes rutas biológicas.....	42
Figura 17. La expresión de CRBP1 disminuye la transcripción de genes asociados con la vía de Wnt.....	47
Figura 18. Niveles relativos de fosforilación de proteínas para las células SiHa/Mock en contraste con SiHa/SC-3.....	49
Figura 19. Niveles relativos de fosforilación de proteínas para las células MCF-7/Mock en contraste con MCF-7/SC-3.....	50
Figura 20. Regulación de la expresión de RAR $\beta$ y RXR $\beta$ en células transfectadas con CRBP1.....	52
Figura. 21. Probabilidad de supervivencia den en pacientes con cáncer de cérvix con expresión de CRBP1.....	53
Figura 22. Modelo hipotético de la regulación de CRBP1 en rutas de supervivencia celular.....	63

## Índice de tablas

	<b>Pag.</b>
Tabla 1. Total de genes diferencialmente expresados en SiHa/SC-3 y MCF 7/5.....	39
Tabla 2. Tabla representativa de genes diferencialmente expresados con un Z score $\geq -1.5$ tanto para SiHa/SC-3 y MCF 7/5.....	40
Tabla S1. Secuencia de primers utilizados para PCR en tiempo real.....	81

## 1. Abstract

Cisplatin has been broadly used in germ cell and epithelial ovarian cancer, as well as in colon, cervical and breast cancer treatment among others. Intrinsic or acquired resistance is one disadvantage of this treatment. Genetic alterations studies seem to be a reliable strategy to understand the phenomena behind the resistance and response to drugs. Larynx cancer studies show that alteration in CRBP1 expression has a possible role in the outcome of the treatment. The main objective of this work was to assess the role of the CRBP1 protein in chemosensitivity to cisplatin. For this, four cervical cancer-derived cell lines (HeLa, RoVa, SiHa and CasKi), and one breast cancer-derived cell line (MCF-7) were used to assess CRBP1 expression. SiHa and MCF-7 clones were generated by transfection with pcDNA3/CRBP1 plasmid. Cellular viability assays were carried out after cisplatin treatments and profile gene expression was analyzed to identify deregulated genes after CRBP1 transfection. The results show that two cervical cancer derived cell lines are highly sensitive to cisplatin treatment (HeLa and RoVa) and two are resistant (SiHa in lesser magnitude than CasKi), while MCF-7 seem to have a moderate resistance. An increase in the cisplatin chemosensitivity was noted in SiHa and MCF-7 cell lines after pcDNA/CRBP1 plasmid transfection, which could be mediated by diminished activity in ERK1/2, p38 and mTOR pathways. The observed results are enough evidence to considerate CRBP1 protein as a key element for the treatment protocol elaboration for cervical and breast cancer, along with all those who present the same alterations within this gene.

## 2. Resumen

El cisplatino ha sido ampliamente utilizado en el tratamiento de células germinales y epiteliales de cáncer de ovario, colon, cérvix y de mama entre otros. Una de las desventajas que presentan en el tratamiento con cisplatino, es la resistencia al tratamiento, la cual puede ser intrínseca o adquirida. El estudio de las alteraciones genéticas en las células tumorales, parece ser una de las estrategias más viables para comprender los fenómenos involucrados en los procesos de resistencia y respuesta a los fármacos. Estudios realizados en cáncer de laringe indican que alteraciones en la expresión de CRBP1 tiene una posible asociación con la respuesta a los tratamientos. Es objetivo principal del trabajo fue evaluar el papel de la proteína CRBP1 como proteína involucrada en la quimiosensibilidad al cisplatino. Se utilizaron 4 líneas derivadas de cáncer de cérvix (HeLa, RoVa, SiHa y CasKi) y 1 de cáncer de mama (MCF-7), de las cuales se evaluó la expresión de CRBP1. Se generaron clones de las líneas celulares SiHa y MCF-7, mediante la transfección del plásmido pcDNA3/CRBP1. Se realizaron ensayos de viabilidad celular posterior al tratamiento con cisplatino y se evaluó el perfil de expresión de genes que se modificaron con la transfección de CRBP1. Los resultados obtenidos indican que 2 de las líneas derivadas de cáncer de cérvix son altamente sensibles al tratamiento con cisplatino (HeLa y RoVa) y 2 son resistentes (SiHa en menor proporción que CasKi) y MCF resultó ser moderadamente resistente. Al realizar la transfección en SiHa y MCF-7 con pcDNA/CRBP1 se observó un aumento en la sensibilidad al tratamiento con cisplatino en estas 2 líneas celulares que podría estar mediada por la disminución en la actividad de vías de señalización de supervivencia celular donde interviene ERK1/2, p38. mTOR. Los resultados observados, son evidencia suficiente para considerar a la proteína CRBP1 como un elemento clave para la elaboración de los protocolos de tratamiento, para los pacientes con cáncer, no sólo de cérvix y mama, si no todos aquellos que presenten estas mismas alteraciones en este gen.



### 3. Introducción

#### 3. 1. Cisplatino

El cisplatino (cis-diamminedichloroplatinum(II)), es un agente quimioterapéutico ampliamente utilizado en el tratamiento contra el cáncer [1]. En 1965 Rosenberg y colaboradores descubrieron que era posible inhibir la división celular de *Escherichia coli* debido a la formación de complejos de platino tetravalente, derivados de la electrólisis de un electrodo de platino sumergido en una solución tampón de cloruro amónico que inhibía la división celular de la bacteria [2]. Posteriormente el estudio de los compuestos derivados del diaminocloroplatino (II), atrajeron mucho la atención y 2 isómeros fueron identificados, el *cis* diaminocloroplatino (II) (*cis*-DDP o cisplatino) y el *trans*-diaminocloroplatino (II) (*trans*-DDP o transplatin) (fig. 1).

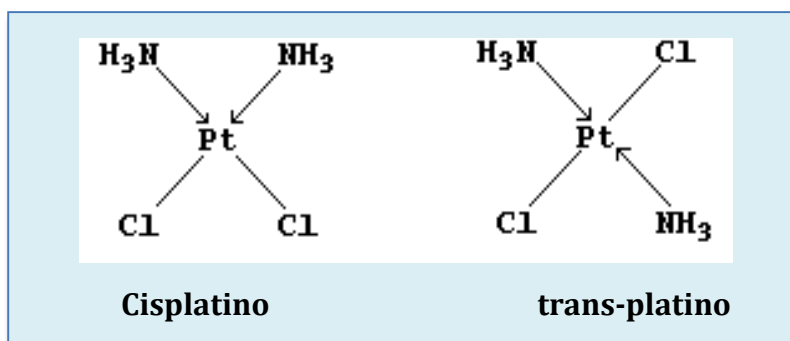


Fig. 1. Estructura química del *cisplatino* y *trans-platino*. Aunque tienen estructura similar el *trans-platino* carece de actividad anti-tumoral.

En los años siguientes se descubrió que el compuesto que tenía un mayor efecto de inhibición de la división celular además de exhibir una actividad antitumoral notable, fue el cisplatino, en contraste con el tras-platino que fue poco efectivo en ambos casos [3, 4]. Tras la realización de estudios de toxicología en roedores, perros y monos, fue hasta abril de 1971 cuando el primer paciente recibió el tratamiento con cisplatino en el Instituto de Medicina Molecular Wadley en Dallas, Texas [5]. En 1978 se hizo comercial para la práctica clínica, llegando como

Platinol, siendo Canadá el primer país en utilizarlo, poco después Estados Unidos, seguido eventualmente por el resto del mundo [6]. Debido al amplio espectro de actividad antitumoral del compuesto original, diversas investigaciones han continuado en esta área con el fin de desarrollar un compuesto que mejore la actividad antitumoral a bajas dosis y pocos efectos secundarios [6, 7].

### 3. 1. 1. Mecanismo de acción

El cisplatino ejerce actividad antitumoral como agentes alquilante clásico. En la sangre, el cisplatino está presente en un estado no cargado inactivo debido a la alta concentración de iones de cloruro, esta concentración es al rededor de 100mM, dentro de las células la concentración del cloruro decae cerca de 2–10mM, aumentando de esta forma la reactividad del cisplatino [8, 9]. El mecanismo de acción del cisplatino consiste en la unión de este a macromoléculas como el DNA y proteínas, siendo la principal unión a DNA la que se considera que genera el efecto citotóxico en la célula tumoral, por la formación de enlaces entrecruzados entre las bases de purina, uniéndose con gran afinidad a las posiciones N-7 altamente nucleofílicas de las bases de guanina, purina y adenina Figure 2 [10-12]. Los aductos interfieren con la replicación y transcripción, favoreciendo la ruptura de las dobles cadenas, por medio del estancamiento de las horquillas de replicación [1].



Figura 2. Reacción química de del cisplatino. El cisplatino reacciona con los átomos en la posición N7 de Guanina adyacente para formar un enlace entrecruzado 1, 2 intracatenario Pt-CpG.

El uso del cisplatino significó un avance en el tratamiento de tumores sólidos, revolucionó el tratamiento de los tumores de células germinales en los que es responsable de las altas tasas de curación [13]. Es utilizado como terapia estándar en cáncer ovario, pulmón, cabeza y cuello, esófago, vejiga, cérvix y mama entre otros [11, 14]. Desafortunadamente, su utilidad clínica está limitada en última instancia por el hecho de que en un porcentaje de los pacientes con cáncer eventualmente tienden a desarrollar resistencia a este tratamiento, dando lugar a la recurrencia del tumor [14, 15].

### 3. 2. Cáncer cérvicouterino

El cáncer cérvicouterino (CaCu), es un importante problema de salud pública a nivel mundial, siendo el cuarto cáncer más frecuente en mujeres. En el 2012 se reportaron 528,00 nuevos casos, con una mortalidad de cerca del 50% (266, 000). La mayoría de los casos se presenta principalmente en los países menos desarrollados, siendo África, Asia, los lugares donde se presentan las tasas más altas de incidencia. En México el CaCu ocupa el segundo lugar en Incidencia y mortalidad, tan sólo por debajo de los datos reportados para cáncer de mama. Fig. 1 [16]. Aun cuando se han hecho esfuerzos para mejorar el tratamiento y prevención de este tipo de cáncer, la mortalidad sigue siendo muy alta.

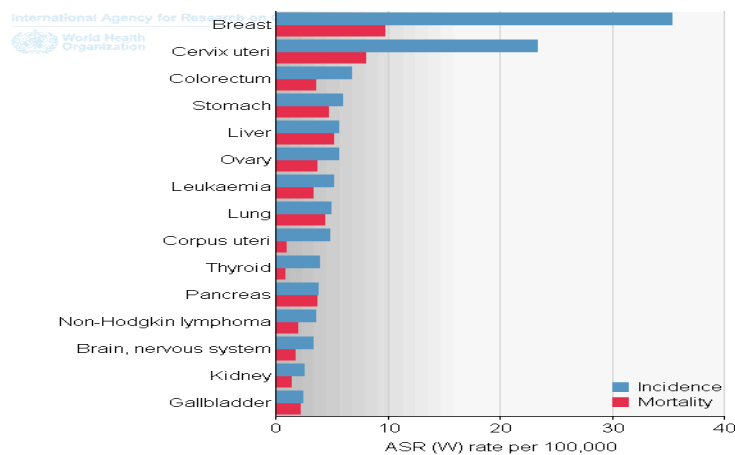


Fig. 3. Incidencia y mortalidad de los principales tipos de cáncer en México. (Globocan 2012). Las barras color azul indican incidencia, barras en color verde indican la mortalidad.

### **3. 2. 1. Clasificación del cáncer cérvicouterino**

El cáncer cérvicouterino es actualmente clasificado de acuerdo a la Federación internacional de Ginecología y Obstetricia (de sus siglas en ingles FIGO), de acuerdo a su etapa clínica [17].

Etapa I: El carcinoma es estrictamente conferido al cérvix. Se subdivide etapas IA y BI. AI; se detecta una cantidad muy pequeña de cáncer en los tejidos del cuello uterino, donde la invasión se limita al estroma con una profundidad máxima de 5 mm y no más ancho de 7. El estadio IA se divide en estadios IA1 y IA2 de acuerdo con el tamaño del tumor. IB, que se divide en IB1, IB2, dependiendo del tamaño del carcinoma. Las lesiones clínicas siguen siendo limitadas al cuello uterino pero son mayores que en la etapa IA, las lesiones son de mas de 5mm hasta 4cm en la etapa IB2 [18].

Etapa II: El cáncer se disemina más allá del cuello uterino, pero no hasta la pared de la pelvis y puede afectar la vagina pero no en gran cantidad, si no hasta el tercio inferior de esta. El estadio II se divide en estadios IIA y IIB, según la distancia a la que el cáncer se diseminó. Estadio IIA: el cáncer se diseminó más allá del cuello uterino hasta los dos tercios superiores de la vagina, pero no hasta los tejidos que rodean el útero. El estadio IIB, el cáncer se diseminó más allá del cuello uterino hasta los tejidos que rodean el útero [18].

Etapa III: El cáncer se ha extendido a la pared pélvica, afecta el tercio inferior de la vagina. Puede causar problemas de riñón como hidronefrosis o pérdida de función de un riñón. La etapa III se divide en IIIA y IIIB. Estadio IIIA; el cáncer se diseminó hasta el tercio inferior de la vagina, pero no hasta la pared de la pelvis. IIIB; el cáncer se disemina hasta la pared pélvica o este ya creció lo suficiente y puede bloquear los uréteres provocando problemas renales [18].

Etapa IV: el cáncer se diseminó hasta la vejiga o el recto y otras partes del cuerpo. El estadio IV se divide en estadios IVA y IVB, según el lugar donde se encuentre el cáncer. Etapa IVA; el tumor se diseminó a órganos pélvicos cercanos, como vejiga y recto. IVB; el tumor ya se diseminó a órganos distantes, como pulmón, hígado, huesos o ganglios linfáticos distantes [18].

### **3. 3. Tratamiento y recurrencia**

En lo que corresponde al tratamiento este puede ser dividido en 3 grupos principales de acuerdo al cáncer invasor: 1) Etapa temprana de la enfermedad que abarca desde al cáncer microinvasor en las etapas IA1 y IA2, hasta un cáncer macroscópico confinado al cérvix, <4 cm IB1; 2) Localmente avanzado, comprende las etapas IB2-IVA; 3) que comprende la etapa IVB [19]

#### **3. 3. 1. El tratamiento para etapas tempranas**

Consiste en un procedimiento local, como la conización o histerectomía total, esto dependiendo del deseo de la paciente de permanecer fértil; para los pacientes IA2 y hasta IB1, el procedimiento recomendado es radical incluyendo linfadenectomía pélvica. En los casos que se ha intervenido quirúrgicamente y existe la presencia de una combinación de factores de riesgo intermedio (exista permeabilización vascular, linfática y el tamaño del tumor sea mayor de 2 cm, además que la invasión del estroma cervical sea profunda) se indica el uso de radiación o quimioterapia [20-23].

#### **2. 3. 2. Tratamiento para la etapa localmente avanzada**

Cerca de los años 80 se utilizaba únicamente la radiación para tratar las etapas localmente avanzadas del CaCu. Desde hace aproximadamente 20 años a la fecha, se ha utilizado la quimioterapia concomitantemente con la radiación, esto debido a que cerca del año 2000 quedo demostrado que la tasa de supervivencia

es mucho mejor con el uso de quimio y radioterapia en conjunto, ofreciendo una supervivencia del 12% más que únicamente la radiación, siendo el cisplatino el principal quimioterapéutico. Así también otra estrategia llevada a cabo que ofrece mayor supervivencia a los pacientes, en un 15%, es la quimioterapia seguida de la cirugía, incrementando de manera absoluta la supervivencia en 5 años [24, 25]

### **3. 3. 3. Tratamiento para etapas avanzadas, con metástasis**

El tratamiento que se ofrece para esta etapa del cáncer consiste en quimio y radioterapia, y si el paciente aun presenta la enfermedad se ofrece un tratamiento más radical, la exenteración pélvica total, ofreciendo un 5 años de supervivencia a un 50% de los pacientes, pero desafortunadamente este procedimiento se limita actualmente a los pacientes con tumores pequeños [26].

La tasa de recurrencia para el cáncer cervicouterino son variadas dependiendo de las etapas, en la actualidad, aproximadamente el 35% de las mujeres diagnosticadas con CaCu presentan recurrencia, encontrándose el 90% de estas entre los 3 primeros años después de iniciado el tratamiento [27], de un 10-20% en las primeras etapas y de 50-70% en las etapas local y avanzadas de la enfermedad [28].

La recurrencia es un grave problema, debido a que en esta etapa clínica el cáncer se vuelve más difícil de tratar, ya que es el resultado de un fenotipo más maligno, derivado de defectos genéticos acumulados durante la progresión y los tratamientos previos; por lo que generalmente el tumor en esta etapa es comúnmente resistente a la quimioterapia [29].

El estándar de oro en la quimioterapia para el tratamiento del CaCu consiste en el uso del Cisplatino (CDDP) y el 5-Fluoracilo (5-FU), sin embargo la viabilidad y eficacia de la quimioterapia van a depender de diversos factores, incluyendo el

tipo celular, grado de diferenciación, estado del ciclo celular y de complejas alteraciones genéticas [30, 31].

### **3. 4. Cambios genéticos**

El cáncer es el resultado de la acumulación de múltiples alteraciones genéticas que incluye mutaciones puntuales, amplificación génica, deleciones y activación de oncogenes o inactivación de genes supresores [32]. El estudio de las alteraciones genéticas en el cáncer son de gran relevancia, ya que estas puede proporcionar información importante que permite predecir la sensibilidad de un tumor a los agentes quimioterapéuticos[33].

Recientemente muchos genes han sido reportados como genes que pueden determinar la sensibilidad a diversas drogas, incluyendo transportadores de fármacos, enzimas que metabolizan los fármacos y genes involucrados en procesos de apoptosis, diferenciación y proliferación [34-37]. Los mecanismos de regulación de estos genes son diversos; un evento importante que se ha relacionado con la quimiorresistencia y la expresión de genes es la metilación, la cual tiene un papel fundamental en la inactivación de genes que son requeridos para la citotoxicidad [38, 39].

#### **3. 4. 1. Metilación**

La metilación del DNA es una modificación química covalente, en la cual un grupo metilo ( $\text{CH}_3$ ) se posiciona en la región 5', en la primer citosina de una secuencia promotora. El DNA esta formado por 4 bases diferentes, citosina (C), guanina (G), timina (T) y adenina (A), por lo tanto pueden ocurrir 16 posibles combinaciones de dinucleótidos, siendo el dinucleótido CpG el más frecuente, aproximadamente en un 6%, por lo que la supresión de los dinucleótidos CpG puede estar relacionado con la hipermutabilidad de metilación de la citosina [40]. Aproximadamente la mitad de todos genes en el humano tienen islas CpG y éstas están presentes

tanto en los genes constitutivos y genes con patrones de expresión tejido específico [41, 42]. Chang *et. al* (2010), menciona que la metilación es un evento frecuente en células expuestas de manera persistente al cisplatino y que la metilación puede inducir silenciamiento en genes que podrían estar jugando un papel en el desarrollo de resistencia a agentes quimioterapéuticos citotóxicos. Los genes involucrados en el metabolismo del retinol, son un grupo de genes de gran importancia biológica, que tienen que ver con procesos de proliferación, diferenciación y apoptosis [43-45]. Se ha observado que en procesos de cáncer muchos de éstos sufren una pérdida de expresión asociada a la metilación, tal es el caso de receptores de ácido retinoico (RAR), específicamente los receptores beta ( $\beta$ ), y las proteínas celulares de unión a retinol (CRBPs).

### **3. 5. Retinol**

El metabolismo del retinol, es un factor importante implicado en diferentes procesos biológicos, tiene diversas funciones en el organismo, dentro de las que se encuentran: mantenimiento de la visión normal, función como agente fotoprotector y antioxidante, pero cabe resaltar su función en la modulación del crecimiento, apoptosis [46], arresto de la célula en la fase G1 y proliferación normal del tejido epitelial [47].

El retinol es necesario para mantener la homeostasis celular y se ha observado que puede prevenir el inicio o el progreso de neoplasias estimulando la diferenciación celular [48, 49]. El efecto de los retinoides esta mediado por proteínas celulares de unión a retinol, y los receptores nucleares del ácido retinoico, los RAR y receptores X de retinoides (RXR) [50]. Estos receptores captan al retinol en el núcleo y al unirse a las secuencias conocidas como los elementos de respuesta a ácido retinoico (secuencias RARE) se inicia la transcripción de diversos genes blanco [51].



Las CRBPs son proteínas monoméricas de aproximadamente 15.5 kDa. Pertenecen a una familia de pequeñas proteínas citoplasmáticas de interacción específica con ligandos hidrofóbicos, de interacción intracelular de proteínas de unión a lípidos [52]. En el humano se han descrito 4 tipos diferentes de proteínas celulares de unión a retinol: CRBP1 que está ampliamente distribuida a través del cuerpo, principalmente en hígado, riñón y tracto genital, CRBP2 está principalmente restringida al intestino delgado, CRBP3 se distribuye en músculo esquelético y cardíaco, CRBP4 es principalmente expresada en riñón, corazón y colón [53]. Las CRBPs se saben que regulan la esterificación y almacenamiento del retinol en el hígado, además de regular la oxidación del ácido retinoico en tejidos blanco [54-56].

Diversos estudios han demostrado que CRBP1 tiene un papel crucial en el mantenimiento normal del retinol hepático y su almacenamiento [52, 54], además de participar como proteína clave en la regulación de los genes asociados a la homeostasis del retinol; como los *RAR*. Estos receptores son los encargados de encender la transcripción de diversos genes blanco por lo que, el desequilibrio en la expresión y funcionamiento de CRBP1[57], tiene como consecuencia la pérdida de la diferenciación celular favoreciendo la progresión tumoral y un posible papel en el mecanismos de resistencia a los quimioterapéuticos.

### **3. 5. 1. CRBP1**

La proteína CRBP1 es codificada por el gen *RBP1* o también nombrado como *CRBP1*, se encuentra ubicado en la región del cromosoma 3q21, la proteína es 135 aminoácidos, de peso molecular de 15.8 kDa., con un dominio de unión de forma  $\beta$ - barril donde se acomodan en su interior los ligandos hidrofóbicos [58] (Fig. 4).

CRBP1 es miembro de una amplia familia de proteínas de unión a ácidos grasos, tiene una ubicación celular citoplasmática, con un peso molecular de

aproximadamente 15 KDa.[56], juega un importante papel en la captación celular y el metabolismo de todos los *trans*-retinol, los cuales son transportados en la sangre por las proteínas de unión a retinol (RBP o también conocida como RBP4) que forman un complejo con la Transtiretina (TTR), que es un precursor de la albumina, para evitar que el retinol sea filtrado por el riñón y este pueda llegar a su tejido blanco.

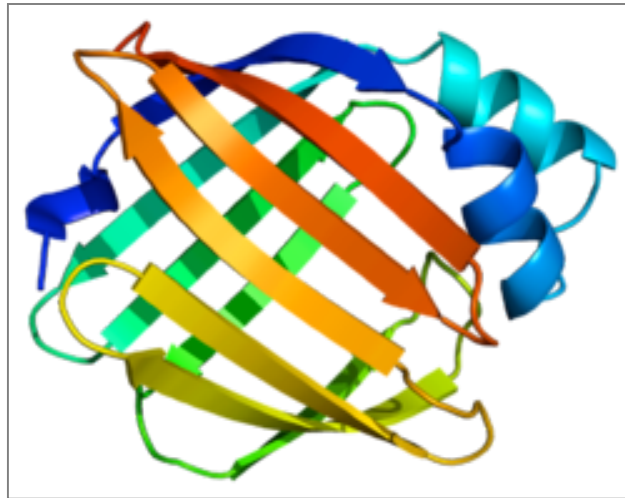


Figura 4. Estructura tridimensional de proteína celular 1 de unión a retinol

Los *trans*-retinol pueden entrar a las células mediante 2 mecanismos, uno es por difusión, el otro mediado por un receptor de membrana conocida como molécula estimulada por ácido retinoico [59], al llegar a la de membrana, el complejo retinol-RBP-TTR se disocia y el retinol entra a la célula por cualquiera de los 2 mecanismos antes mencionados; dentro de la célula, ya en el citoplasma, el retinol se unen a la proteína CRBP1, a partir de este paso todos los *trans*-retinol unidos a la proteína celular 1 de unión a retinol pueden tomar 2 diferentes destinos metabólicos: pueden ser esterificados a retinil ester y ser almacenado o ser oxidado a ácido retinoico [60] (Fig. 4). La forma de almacenamiento considerada como la mejor para todos los *trans*-retinol es en retinil ester, ya que puede ser concentrado en gotas de lípidos y así el retinol puede movilizarse rápidamente para su posterior metabolismo [61], mientras que por otra parte, el retinol que se

oxidada a ácido retinoico es unido a los RAREs, para encender la transcripción de genes blanco [62] (Fig. 5).

La proteína CRBP1 actúa como una chaperona al prevenir la interacción entre el retinol y el medio enzimático intracelular, lo que evita la oxidación e isomerización del este sirviendo como un sustrato y un efector del metabolismo del retinol [63-65]. Los niveles de expresión de CRBP1 se han asociado a ciertos tipos de cáncer, como cáncer de mama y ovario entre otros, donde los bajos niveles de la proteína se han asociado a una metilación aberrante de la secuencia promotora, lo cual desencadena con un fenotipo tumoral maligno [54, 66, 67], así también se ha asociado la pérdida de CRBP1 con la pérdida de diferenciación celular y desarrollo de carcinomas endometriales [68].

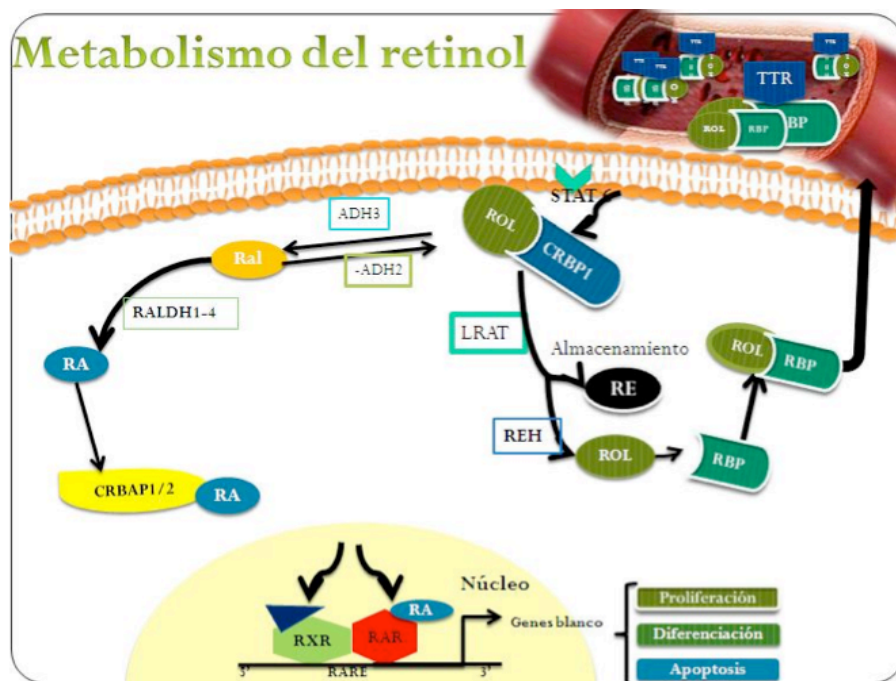


Fig. 5. Vía de metabolismo del retinol (Rol). Alcohol deshidrogenasas 2,3, (ADH), retinaldeido deshidrogenasas 1 a la 4 (RALDH1-RALDH4), ácido retinoico (AR), retinol acil transferasa (LRAT), receptores nuclear de ácido retinoico  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , isotipos de receptores nucleares RXR  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ .

## 4. Antecedentes

La quimioterapia basada en el cisplatino y 5-Fluorouracilo han demostrado gran eficacia en el tratamiento de diversos tumores epiteliales [69-71], incluyendo en estos el CaCu, aunque la respuesta en los pacientes se presenta de manera heterogénea, debido a que no todos responden de la misma manera, este fenómeno ha motivado la búsqueda de los factores que intervienen en estos procesos, como es el caso de los genes se altera su expresión y que podrían tener un efecto en la respuesta a los tratamientos. La búsqueda de marcadores genéticos resulta ser una alternativa viable para identificación de los pacientes que pueden responder a un tratamiento en específico [72].

La alteración de los genes implicados en el metabolismo del retinol parecen ser un factor importante en los procesos carcinogénicos, esto fue observado desde los primeros estudios que se realizaron para describir sus funciones, describiendo que al inducir experimentalmente la deficiencia de vitamina A, esto conllevó al desarrollo de lesiones pre-neoplásicas y en última instancia a neoplasias [47].

La acción de la vitamina A está mediada por proteínas celulares de unión específica a retinol, CRBP1 se ha distinguido por su alta afinidad al retinol y su papel en la esterificación y almacenamiento de este, de ahí la relación que se le ha dado con el desarrollo de procesos carcinogénicos [47]. Experimentos realizados con ratones *knock-out* CRBP1, confirmaron la importancia de esta proteína en, ya que al someter a estos ratones a una dieta deficiente de Vit. A, se observó que los ratones agotaron por completo sus reservas de retinil-éster en el hígado después de 5 meses, y presentaron desarrollo post-natal anormal característico de hipovitaminosis A, incluyendo metaplasia escamosa queratinizante [56].

La expresión de la proteína codificada por el gen con el mismo nombre (*CRBP1*), se ha visto alterada en diversos tipos de cáncer, ejemplo de ello es lo que sucede

en cáncer de mama. Kuppumbati y cols. (2000), reportan que la pérdida de la expresión de la proteína se relaciona con al menos un cuarto del total de los casos de cáncer de mama, y que además esto es un evento temprano en el proceso de carcinogénesis y es un evento independiente de la edad del paciente o grado del tumor [66].

En cáncer de ovario también se han realizado estudios en los cuales los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado para cáncer de mama. Ejemplo de esto fue lo que se demostró al realizar la evaluación de los niveles de expresión de CRBP1 en muestras de tejido fresco y congelado de cáncer de ovario, por PCR en tiempo real e inmunohistoquímicas de cortes de parafina, observándose que existe una pérdida de expresión de la proteína en la mayoría de las muestras, además se encontró que la pérdida de la expresión de CRBP1 ocurre desde los primeros estadios [67], como dato relevante a diferencia de otros trabajos donde no se reporta una asociación entre el grado de progresión y los niveles de expresión de la proteína, indicando así que la pérdida de la expresión de la proteína CRBP1 es un factor que contribuye al desarrollo de cáncer de ovario, por medio de la alteración de la vía del metabolismo del retinol [66]. Doldo y cols. (2014). Demuestran que la pérdida de expresión de la proteína CRBP1 caracteriza a los tipos de cáncer de ovario más agresivos, además de indicar al gen *CRBP1* como un posible blanco terapéutico en cáncer de ovario, ya que este incrementa la viabilidad del retinol intracelular induciendo de esta forma el arresto celular[73].

La alteración en pérdida de expresión de la proteína (CRBP1), en cáncer de próstata se han reportado que ocurren en alrededor del 40% de las muestras de adenocarcinomas y el 50% de las muestras de neoplasias prostáticas intraepiteliales de alto grado, presentan una disminución en la expresión de la proteína celular 1 de unión a retinol [51].

Los factores relacionados con las alteraciones CRBP1 en los diversos tipos de cáncer y la asociación que esto podría tener en la respuesta a los tratamientos ha

sido poco estudiado, una de las alteraciones con mayor asociación con la expresión de la proteína, ha sido el proceso de metilación. Esteller y *cols.* [74] fueron los primeros en señalar que procesos epigenéticos, específicamente la hipermetilación del gen *CRBP1*, es un factor importante que participa en el desarrollo oncogénico en mama, debido a que se observó una asociación entre este fenómeno y la disminución en los niveles de expresión de la proteína en muestras de este tejido [74].

En lo que corresponde a cáncer de laringe se han hecho valiosas aportaciones, en el 2010 Peralta y *cols.*, reportan que un aumento en la expresión de la proteína CRBP1 se asocia con un mayor nivel de sobre vida en estos pacientes, a diferencia de aquellos donde se observó una pérdida de expresión de la proteína asociándose esto con un nivel de sobre vida menor, esto podría indicar una participación de CRBP1 en la respuesta a los tratamientos, lo cual se ve reflejado en la sobrevida de los pacientes [75]. En el 2011 este mismo grupo reporta que la expresión de la proteína CRBP1 se asocia fuertemente con el estado de metilación de su secuencia promotora, lo cual coinciden con datos reportados para otros tipos de cáncer, aportando además, la idea de que la expresión de la proteína relacionada con el estado de metilación del gen *CRBP1*, tienen una correlación con las variables clínicas en los pacientes con cáncer de laringe[75].

Los reportes realizados de la asociación de CRBP1 en cáncer cérvicouterino de igual manera son muy pocos, en el 2002 Kitahara y *cols.*, mediante microarreglos de expresión, reportan que el aumento de CRBP1 se asocia con una mejor respuesta a tratamientos en CaCu, los mecanismos o las alteraciones que este gen pueda tener para ejercer dicho efecto no eran conocidas hasta ese momento [76]. En el 2005 el grupo de Hidalgo y *cols.*, realizaron un estudio de hibridación genómica comparativa en microarreglos, para la detección de desbalances cromosómicos en carcinoma de cérvix uterino; en el cual obtuvieron datos muy interesantes en lo que respecta al conocimiento del desequilibrio cromosómico que se genera en el cáncer de cérvix, resaltando el dato de la ganancia de *CRBP1*

ubicada en la región citogenética 3q [77]. El aumento del número de copias se encontró tanto en muestras de lesiones precursoras y de cáncer invasor, en un 58.8% de las muestras analizadas[76]. Estos son uno de los primeros datos que se han reportado con respecto a las alteraciones del gen *CRBP1* en cáncer cérvix. Los desbalances cromosómicos como la ganancia o pérdida de material genético, son un factor importante en el desarrollo de neoplasias y el estudio de estos puede llevar a un mayor entendimiento de la biología del cáncer.

Mendoza-Rodríguez (2011), aporta datos de gran importancia en el entendimiento de las alteraciones de *CRBP1* en CaCu, observando que dentro de las principales alteraciones de este gen se encuentran, ganancia en número de copias, lo cual vino a validar los datos obtenidos por Hidalgo y cols. (2005), así como alteraciones en expresión de la proteína asociada fuertemente con el estado de metilación del gen. En este estudio la mayoría de las muestras de CaCu presentaron metilación aberrante, siendo esto de gran interés ya que se observó una fuerte asociación entre la pérdida de expresión de la proteína CRBP1 y el estado de metilación de la secuencia promotora, ocurriendo lo contrario en aquellas muestras donde se observó un aumento de expresión de la proteína[78].

Los datos obtenidos en el trabajo anterior, abren un panorama para el entendimiento de la participación de *CRBP1* en CaCu y la relación que este gen pudiese tener en la respuesta a los tratamientos en esta neoplasia, cabe resaltar que todas estas alteraciones que se observaron tienen una gran similitud con lo que ocurre en cáncer de laringe, en el cual ya se ha realizado estudios en el pronóstico de los pacientes, observando una mayor sobrevida en aquellos que presentan expresión de la proteína; por lo que se podría pensar que en CaCu estas alteraciones en metilación y expresión de la proteína podrían tener el mismo efecto en los pacientes. Por lo que se hace necesario realizar estudios de mayor profundidad, en los cuales se pueda establecer de manera contundente si *CRBP1* tiene un papel fundamental en los procesos carcinogénicos y por lo tanto en la respuesta a los tratamientos para esta neoplasia.

## 5. Justificación

La expresión de CRBP1 se ha asociado con un buen pronóstico de sobrevida en los pacientes con cáncer de laringe, lo que se podría asociar en con la efectividad en los esquemas de tratamientos. A la fecha se desconocen los mecanismos asociados a *CRBP1* en el proceso de respuesta a las terapias. En CaCu estudios preliminares sugieren que la pérdida de expresión de CRBP1, puede jugar un papel importante en el desarrollo de este tipo de cáncer, así también, su expresión podría estar involucrada en una respuesta favorable del paciente a los tratamientos. De tal forma, es importante realizar estudios que nos permitan conocer la participación de esta proteína en esta neoplasia y la respuesta a las terapias, particularmente al cisplatino, principal agente quimioterapéutico para CaCu.



## **6. Hipótesis**

La expresión del gen *CRBP1* tiene un papel fundamental en la quimiosensibilidad al cisplatino en el tratamiento del cáncer.

## **7. Objetivo General**

Evaluar el papel de la proteína CRBP1 como proteína involucrada en la quimiosensibilidad al cisplatino.

## **8. Objetivos específicos**

- 1.- Determinar la expresión de CRBP1 en líneas celulares de cáncer cérvix y mama.
- 2.- Evaluar el efecto del cisplatino en líneas celulares y su correlación con expresión de CRBP1.
- 3.- Reconstituir la expresión de CRBP1 en líneas celulares negativas a CRBP1 y evaluar la respuesta al cisplatino.
- 4.- Evaluar el perfil de expresión de genes que se modifican con la reconstitución y aumento de expresión de CRBP1

## **9. Metodología**

### **9. 1. Cultivos celulares**

Las líneas celulares que se utilizaron para el presente trabajo fueron: HeLa, SiHa, CasKi, derivadas de cáncer de cérvix , estas líneas fueron cultivadas bajo las siguientes condiciones: HeLa y SiHa fueron crecidas en medio mínimo esencial marca GIBCO, con 10% de suero fetal bovino y 1% de Penicilina/estreptomicina, en incubadora a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> [79]. CasKi, se creció en medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de Penicilina/estreptomicina, en incubadora a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. La línea células NIH3T3 Y MCF-7, derivada de fibroblastos de ratón y de cáncer de mama respectivamente fueron utilizadas como control positivo y negativo expresión de CRBP1, la primera se cultivó en medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de Penicilina/estreptomicina, en incubadora a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y MCF-7 fue cultivada en medio DMEM-F12 con 10% de SFB y 1% de Penicilina/estreptomicina bajo las mismas condiciones que NIH3T3.

### **9. 2. Detección de CRBP1 por Inmunofluorescencia**

Las células HeLa, SiHa CasKi, NIH3T3 y MCF-7 fueron crecidas sobre cubreobjetos estériles en placas de 12 pozos a una densidad aproximada de  $0.5 \times 10^5$  células por pozo, durante 24 hrs. Posteriormente se retiró el medio y las células fueron lavadas 2 veces con PBS 1X y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 min. Las laminillas se lavaron 4 veces con PBS al 1X y se permeabilizó con PBS-Tritón al 0.3% mediante 4 lavados de 5 minutos cada uno. El bloqueo se realizó con BSA al 1% durante 1hr a temperatura ambiente en cámara húmeda. Posterior al bloqueo, se retiró el exceso de líquidos de las laminillas y se incubaron con el anticuerpo primario anti-CRBP1 1:100 (Ab24090, marca AbCAM) en cámara húmeda durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente las laminillas se lavaron 4 veces con PBS-Tritón al 0.3% y se colocaron 50µl del anticuerpo secundario correspondiente: anti ratón acoplado al fluorocromo Alexa

488, preparado a una dilución 1:100 en BSA en PBS-Tritón al 0.3% y se incubó en cámara húmeda cubierta de la luz a 1 hora a temperatura ambiente, finalmente se lavaron las laminillas 5 veces con PBS-Tritón al 0.3%. El montaje de las laminillas se realizó colocando una gota de 8  $\mu$ l Vectashield en un portaobjetos sobre el cual se colocaron el cubreobjetos del lado donde se encuentran las células. Las laminillas fueron almacenadas a -20°C cubiertas de la Luz. Las imágenes fueron tomadas en el microscopio confocal Leica TCS SP5.

### **9. 3. Detección de CRBP1 por Western blot**

Las líneas celulares fueron crecidas en placas p100. Se realizó el cultivo de las células utilizando buffer RIPA 1X para realizar la extracción de proteínas. La cantidad total de proteínas en las muestra se determinó mediante ensayo BCA (PIERCE). De cada muestra, se tomaron 30  $\mu$ g de proteína, se realizó electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE), al 15%. Al terminar la electroforesis se realizó la transferencia a membrana de nitrocelulosa (BIO-RAD). Se bloqueó con solución de TBS en leche al 5% durante 1 hora a temperatura ambiente, finalmente se incubó con el anticuerpo primario anti-CRBP1, -RAR $\beta$ , -RXR $\beta$ , a una dilución 1:2000, 1:1000, 1:100 respectivamente (marca AbCAM) durante toda la noche a 4°C en agitación y como control de carga se utilizó anticuerpo anti-HPRT. Después la membrana se lavaron 3 veces con TBS-Tween 0.05% y se incubó anticuerpo secundario acoplado a HRP. Las imágenes fueron tomadas mediante Chemidoc-BioRad, utilizando el software Image-Lab.

#### **9. 4. Transfección de CRBP1**

MCF-7 y SiHa fueron seleccionadas para ser transfectadas con pcDNA3-CRBP1. Las células fueron sembradas en cajas Petri de 35mm ( $3 \times 10^5$  células por pozo) y transfectadas de manera estable a un 80% de confluencia con pcDNA3 como control y pcDNA-CRBP1, utilizando el reactivo Lipofectamina 2000. Después de sembrar las células, estas se dejaron crecer 24hr para alcanzar la confluencia deseada, posterior a esto se ayunaron por 6 hrs. Se preparó el complejo lipofectamina 2000 más OptiMEM, a la par en otro tubo se preparó el complejo OptiMEM-pcDNA3/CRBP1 y pcDNA3/Mock. Se dejaron reposar a temperatura ambiente 5 min. de acuerdo a los protocolos descritos por el fabricante, posteriormente se mezclaron los 2 tubos y dejaron incubar por 20min. pasado este tiempo se retiró el medio de cultivo de las células y se colocó 500 $\mu$ l del compuesto lipofectamina-OptiMEM-pcDNA3/CRBP1 y pcDNA3/Mock a diferentes pozos por separado que contenían las células a transfectar y se completó con 500 $\mu$ l de medio de cultivo con únicamente con suero fetal bovino SFB. Después de 48hrs, se añadió medio fresco a las células con el reactivo de selección G418 (1 mg/ml). La selección de las células transfectadas se continuó por dos semanas más, cambiando el medio cada 2 días. Se aislaron clones y la expresión de CRBP1 fue confirmada mediante Inmunofluorescencia, western blot y PCR en tiempo real.

#### **9. 5. Extracción de RNA total**

El RNA total fue extraído con el kit RNeasy tissue Mini Kit. Las células fueron crecidas a un 80% de confluencia en placas de 100mm, se retiró el medio y se lavaron con PBS 1X, se realizó la extracción de RNA de acuerdo a las especificaciones del fabricante. La integridad del RNA fue evaluada con NanoDrop 1000 y electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

## **9. 6. Citotoxicidad y citometría de flujo**

La sensibilidad de las células al cisplatino fue evaluada mediante citometría de flujo, utilizando el kit para viabilidad celular Live/Dead Fixable Red Dead Cell Stain kit. El cual consiste en la unión del fluoróforo a los grupos amino de las células, por lo que cuando las células estén vivas únicamente se unirá a los grupos aminos de la membrana, y cuando las células se encuentre con un daño estas emitirán una mayor fluorescencia ya que no solamente se unirá a los grupos amino del exterior sino, a los grupos amino del interior de las células. Las células fueron cultivadas a una confluencia de  $1 \times 10^6$  células en placas 60mm por 24hrs. Se evaluaron 5 condiciones diferentes en concentración de cisplatino en las diferentes líneas celulares [80].

El medio de cultivo fue remplazado por medio de cultivo nuevo que contenía diluciones en serie de cisplatino ( $10\mu\text{M}$ ,  $30\mu\text{M}$ ,  $50\mu\text{M}$ ,  $70\mu\text{M}$  y  $100\mu\text{M}$ ) [81] Posterior a las 24hrs de incubación con la droga, se tomaron  $1 \times 10^6$  células por condición y se tiñeron con el Fixable Red Dead Cell Stain kit. de acuerdo a los protocolos del fabricante, finalmente se leyó intensidad de fluorescencia de las células tratadas con cisplatino contra el grupo control, utilizando el Citómetro de flujo Fac's Calibur de Becton Dickinson. 20,000 eventos fueron colectados y analizados por muestra. Se utilizó el programa FlowJo para el análisis de datos. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

## **9. 7. Microarreglos de expresión**

Los microarreglos utilizados fueron el Human 70-mer oligo library de OPERON Oligo Sets (<http://omad.operon.com/>). En la unidad de microarreglos de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). El protocolo que se utilizó fue el siguiente: a partir de  $10\mu\text{g}$  del RNA total extraídos de las muestras MCF7-7/CRBP1, MCF7/Mock y SiHa/CRBP1 y SiHa/Mock, el RNA de cada muestra se sintentizó a cDNA mediante la incorporación de dUTP-Alexa 555 para el control de

las células (Mock) y dUTP-Alexa 647 para MCF7 y SiHa/CRBP1 utilizando el Kit de marcaje First-Strand cDNA (Amersham). La incorporación del fluoróforo fue analizada mediante el análisis de la absorbancia a 555 nm para Cy3 y 655 para Cy5. Se hibridaron cantidades iguales de cDNA marcado utilizando la solución de hibridación HybIT2 (TeleChem International INC). Los arreglos fueron incubados por 14 hrs. A 42°C, pasado este tiempo se lavaron 3 veces con solución SCC 1X y SDS 0.05% a temperatura ambiente.

### **9. 7. 1. Análisis de microarreglos**

La adquisición y cuantificación de las imágenes de los arreglos se realizó mediante el ScanArray 4000 con el software ScanArray 4000 BioChips Packard (USA). Las imágenes escaneada se analizaron con el software GenePix con el que se realizó del análisis del ruido de fondo y la intensidad de cada spot para calcular la intensidad final de la señal de acuerdo a la siguiente ecuación: (6) Intensidad = intensidad del primer plano - intensidad de fondo generada por los dos fluorocromos Cy3 y Cy5, en seguida se utilizó el software GenArise para normalizar los datos de cada spot. El análisis se realizó para determinar los genes con un Z-score de  $\pm 1.5$ . Los genes que presentaron Z-score de  $\geq -1.5$  que fueron regulados a la baja por efecto del aumento en la expresión de CRBP1 en las líneas transfectadas MCF-7/5 y SiHa/SC-3 en relación al control (Mock) se seleccionaron para realizar el análisis. Para realizar el análisis se utilizó el software KEGG, (Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto), para realizar el análisis de las rutas biológicas que se regulan a la de la lista de genes obtenidas de los microarreglos. Las rutas que se seleccionaron fueron aquellas con un valor de Fisher de  $p \leq 0.05$

### **9. 7. 2. Expresión mediante RT-PCR**

1 µg RNA total se tomó para realizar la transcripción inversa y generar cDNA en un volumen final de 20 µl utilizando SuperScript® VILO™ MasterMix (Applied Biosystems, CA, USA). Se tomó 1µl de cDNA y mediante primers específicas para CRBP1 se evaluó el aumento en el mensajero de CRBP1 y genes involucrados en la vía de Wnt: RBX1, RUVBL1, CTBP2, PLCB3, PPP2RC5 y AKT1. La secuencia de los primers utilizados para las reacciones se describen en la tabla S1 de anexo. Se utilizaron 11 µl de Taqman Gene Expression Master Mix, 1 µl de cada sonda Taqman, 500 ng de cDNA en un volumen final de 20 µl para cada reacción, utilizando el equipo StepOne de Applied Biosystem bajo las siguientes condiciones: 2 min a 50°C seguido de 10 min 95°C, 15 segundos 95°C y 1 min 60°C por 40 ciclos. Como gen de referencia fue utilizado la sonda para RPLP0. El cálculo para el análisis de la expresión relativa se realizó mediante el uso del método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [82].

### **9. 7. 3. Determinación de patrones de fosforilación de proteínas**

Se evaluó la fosforilación relativa de 38 proteínas en las muestras SiHa/Mock, SiHa/SC-3 y MCF-7/Mock, MCF-7/5. Esta evaluación se obtuvo mediante el análisis del perfil de 46 sitios específicos de fosforilación utilizando Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array Kit (ARY003 R&D Systems) (Minneapolis, MN). Las células fueron lavadas con PBS 1X y posteriormente se agregó buffer de lisis, se colectó y se mantuvo en agitación por 30 minutos a 4°C, finalmente se centrifugó 15 minutos a 10000rpm durante y se obtuvo el sobrenadante, las alícuotas del lisado se almacenaron a -80°C previo a su uso. Las membranas que contenían los spots de los anticuerpos fueron incubadas con 50µg del lisado de proteínas durante toda una noche a 4°C. Al día siguiente se añadieron cocteles de anticuerpos de detección biotinilados a temperatura ambiente durante 2 horas. Las imágenes de las proteínas fosforiladas fueron reveladas utilizando quimioluminiscencia/HRP-estreptavidina como sustrato con el equipo ChemiDoc

chemiluminescence system (Bio-Rad) y la cuantificación se realizó utilizando el software Image Lab (BIO-RAD).

### **9. 8 . *Análisis estadístico***

El análisis estadístico fue diseñado utilizando una prueba t-Student pareada con una distribución de dos colas para muestras de distribución normal (  $*P < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo). Los valores se presentaron como media  $\pm$  desviación estándar.



## 10. Resultados

### 10. 1. Expresión de CRBP1

La expresión de CRBP1 en las líneas celulares se determinó mediante inmunofluorescencia y western blot. En la inmunofluorescencia se pudo determinar que la expresión de la proteína CRBP1 es totalmente citoplasmática, lo cual se pudo observar en las células que fueron utilizadas como control para la tinción. Se observó una fuerte tinción en color verde para las células NIH3T3, derivadas de fibroblastos de ratón, que se utilizaron como control positivo, siendo ausente esta expresión en las células MCF-7, que son células derivadas de cáncer de mama y que fueron utilizadas como control negativo, Figura 6.

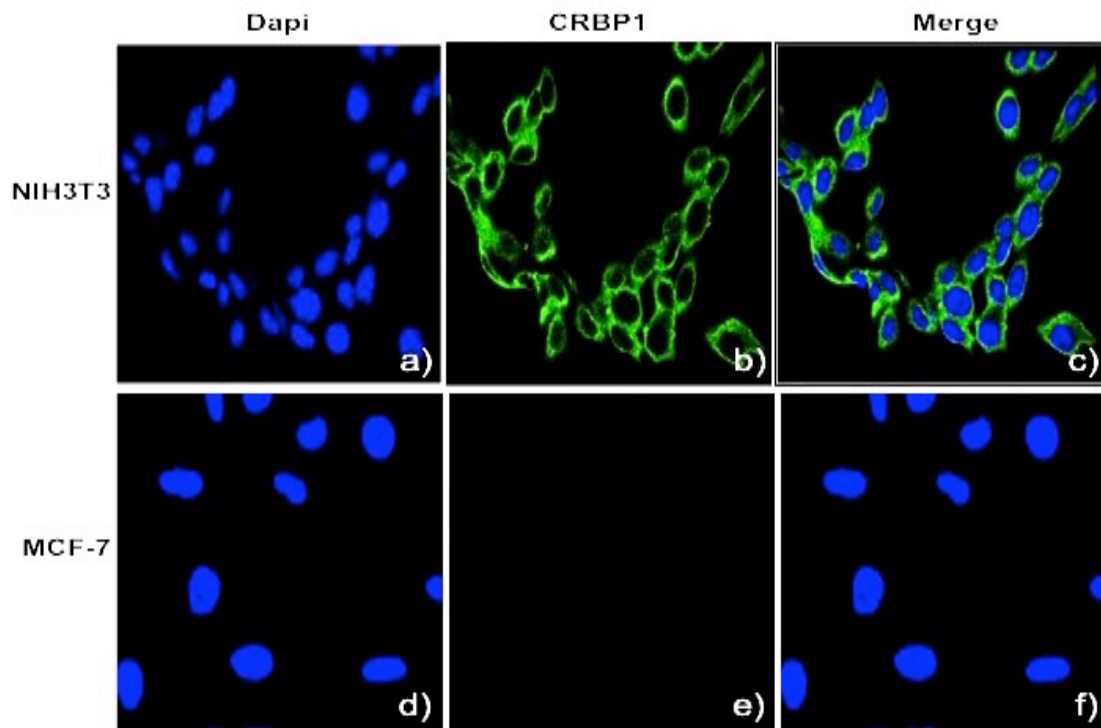


Fig. 6. Detección de la expresión de CRBP1 en NIH3T3 y MCF-7. a) y d) tinción en azul Dapi para el núcleo; b) y e) tinción en verde con Alexa 488 para tinción de expresión de CRBP1; c) y f) merge de tinción nuclear y expresión de CRBP1 donde se observa claramente la tinción citoplasmática para CRBP1.

Las líneas celulares derivadas de cáncer de cérvix fueron evaluadas bajo las mismas condiciones que los controles para determinar la expresión de CRBP1. Las líneas celulares que resultaron positivas para la tinción presentaron un patrón similar de tinción en el citoplasma. Se observó que 3 de las 4 líneas celulares fueron positivas para la expresión de CRBP1, con una aparente diferencia de expresión entre ellas, HeLa, RoVa, presentaron una intensidad similar en la expresión, siendo SiHa la tercera línea celular en presentar expresión de la proteína, pero con una aparente disminución en esta, con respecto a HeLa y RoVa. La única línea celular negativa para la expresión de CRBP1 fue CasKi (Figura 7-h).

Con el objetivo de poder evidenciar de manera cuantitativa la diferencia de expresión entre las líneas celulares, se realizó el ensayo de western blot únicamente para las líneas celulares HeLa, SiHa, CasKi de cáncer de cérvix, RoVa fue excluida ya que presentó características similares a HeLa en expresión, y MCF-7 de cáncer de mama como control negativo. Se pudo observar que al igual que en las Inmunofluorescencias, la línea celular con mayor expresión para CRBP1 fue HeLa, seguida de SiHa que presentó expresión de la proteína pero con una disminución de cerca del 40% con respecto a HeLa y finalmente CasKi que a diferencia de lo observado en las inmunofluorescencias, mediante western blot pudo observarse una expresión muy baja de la proteína (Figura 8).

Figura 7.

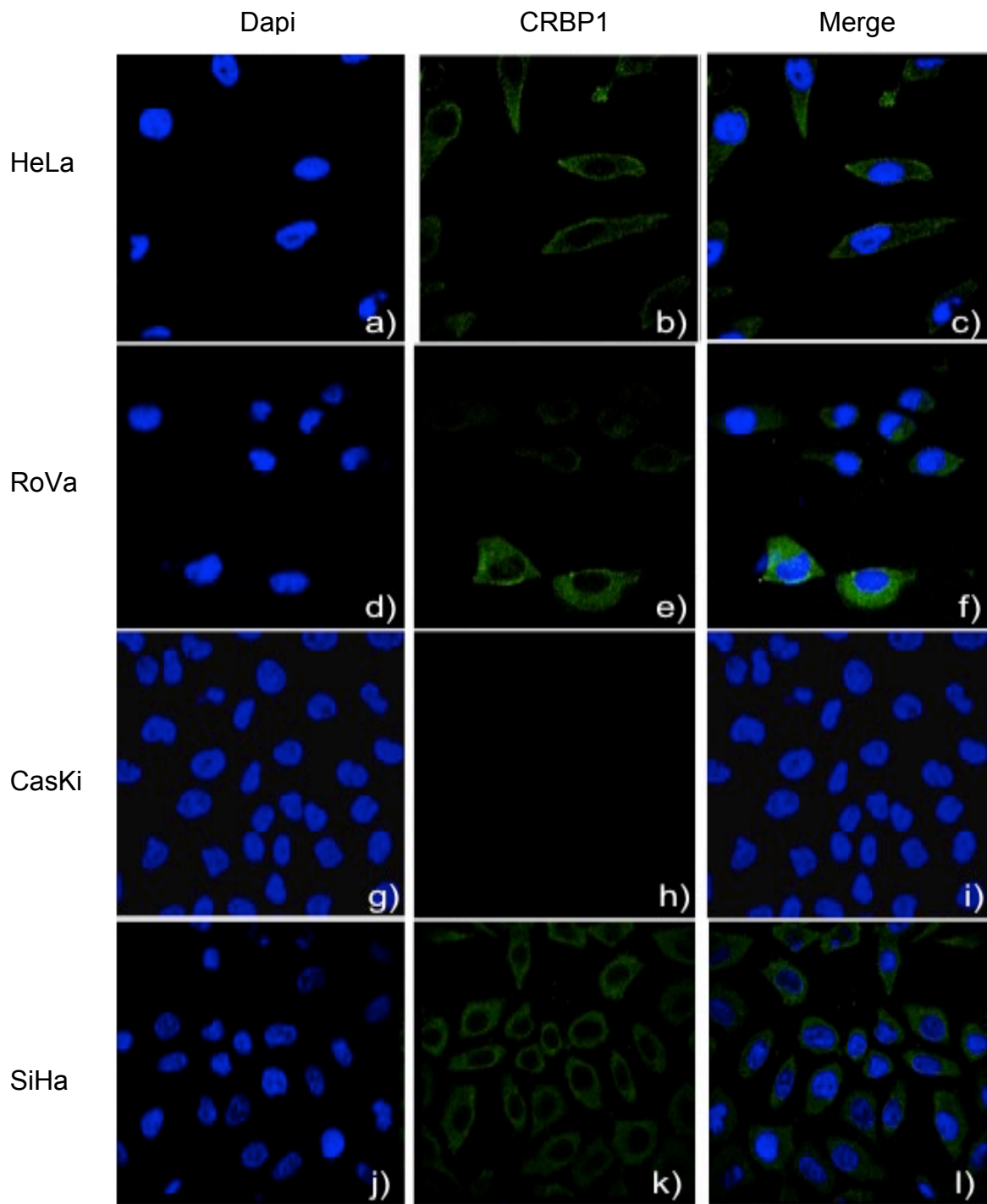


Fig. 7. Detección de la expresión de CRBP1 en líneas celulares de cáncer de cérvix, HeLa, RoVa, CasKi y SiHa. Tinción de los núcleos en azul con Dapi (a, d, g, j); inmunodetección de CRBP1 en verde (b, e, h, k); merge de Dapi y CRBP1 para determinar inmunolocalización (c, f, i, l).

Figura 8.

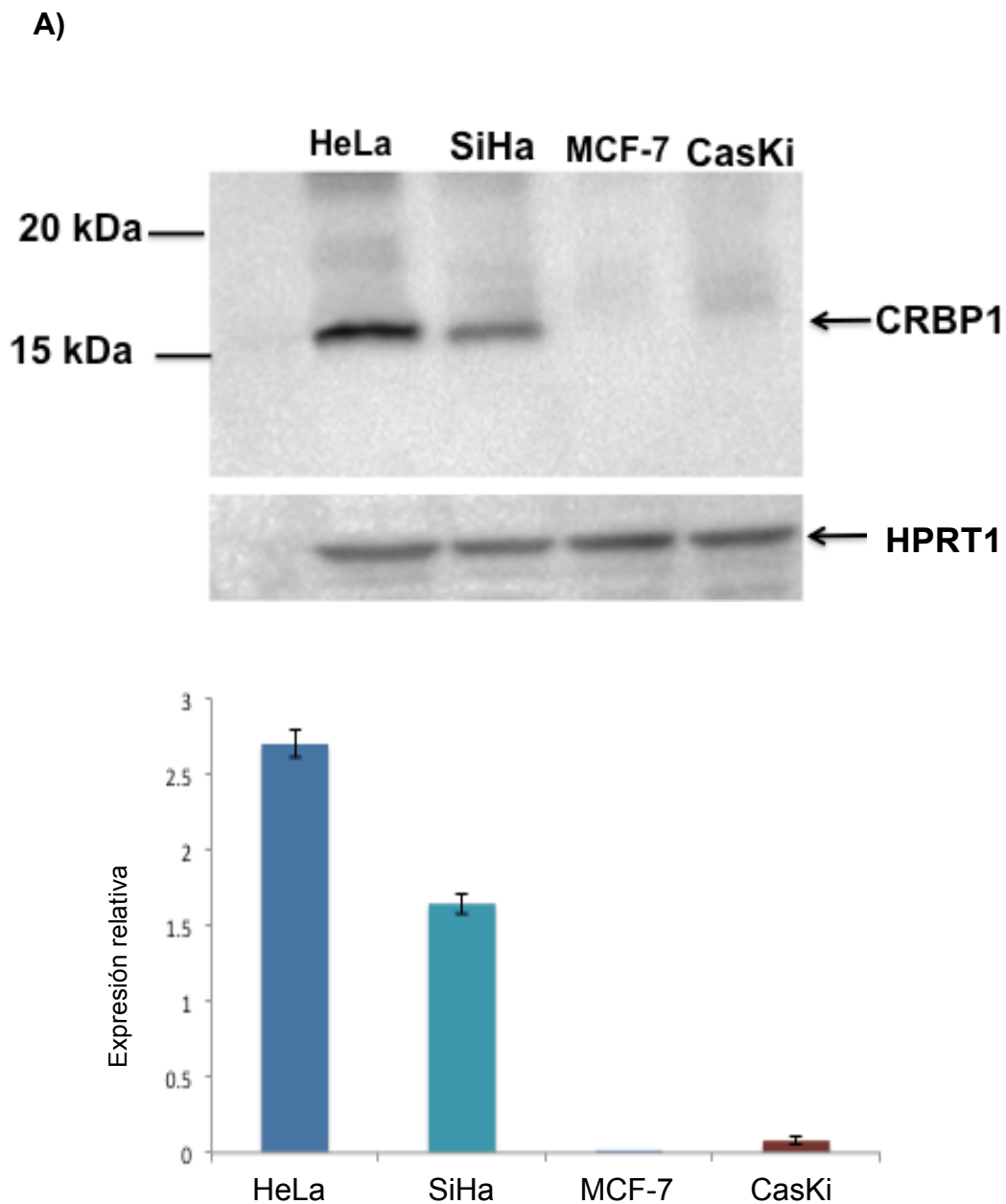


Figura 8. A. Western blot de las muestras HeLa, SiHa y CasKi. Observándose una mayor expresión en la línea celular HeLa (Barra en azul), seguida de SiHa con una expresión de cerca del 40% menos con respecto a HeLa (barra en celeste) y CasKi con una expresión muy baja de cerca del 1% con respecto a HeLa (barra en color rojo) (B). Se utilizó la línea celular MCF-7 como control negativo de expresión.

## **10. 2. Quimiosensibilidad a cisplatino**

Los ensayos de viabilidad celular se realizaron con el objetivo de evaluar una posible asociación entre expresión de la proteína CRBP1 y la quimiosensibilidad al tratamiento con cisplatino. Se trabajó con diferentes concentraciones del fármaco, para todas las líneas celulares, desde 10 $\mu$ M a 100 $\mu$ M. De las 4 líneas celulares de cérvix, HeLa y RoVa fueron las más sensible al tratamiento, se observó un marcado decremento de cerca del 90% de muerte celular a una concentración de 70  $\mu$ M. SiHa presentó una moderada sensibilidad al fármaco presentando menos del 70% de muerte celular a 70  $\mu$ M y CasKi fue la línea celular más resistente presentando sólo un 20% de muerte celular a dicha concentración del fármaco (Fig.9).

Al evaluar el efecto del cisplatino en las líneas celular de cáncer de cérvix con y sin expresión de CRBP1, se decidió realizar este mismo ensayo en la línea celular MCF-7, que había sido utilizada al principio como un control negativo de expresión de CRBP1, para determinar si ocurría un efecto similar en esta línea derivada de cáncer de mama. Se pudo observar una resistencia al tratamiento con cisplatino a la concentración de 70 $\mu$ M de cerca de un 60% de células vivas (figura 10.).

Figura 9.

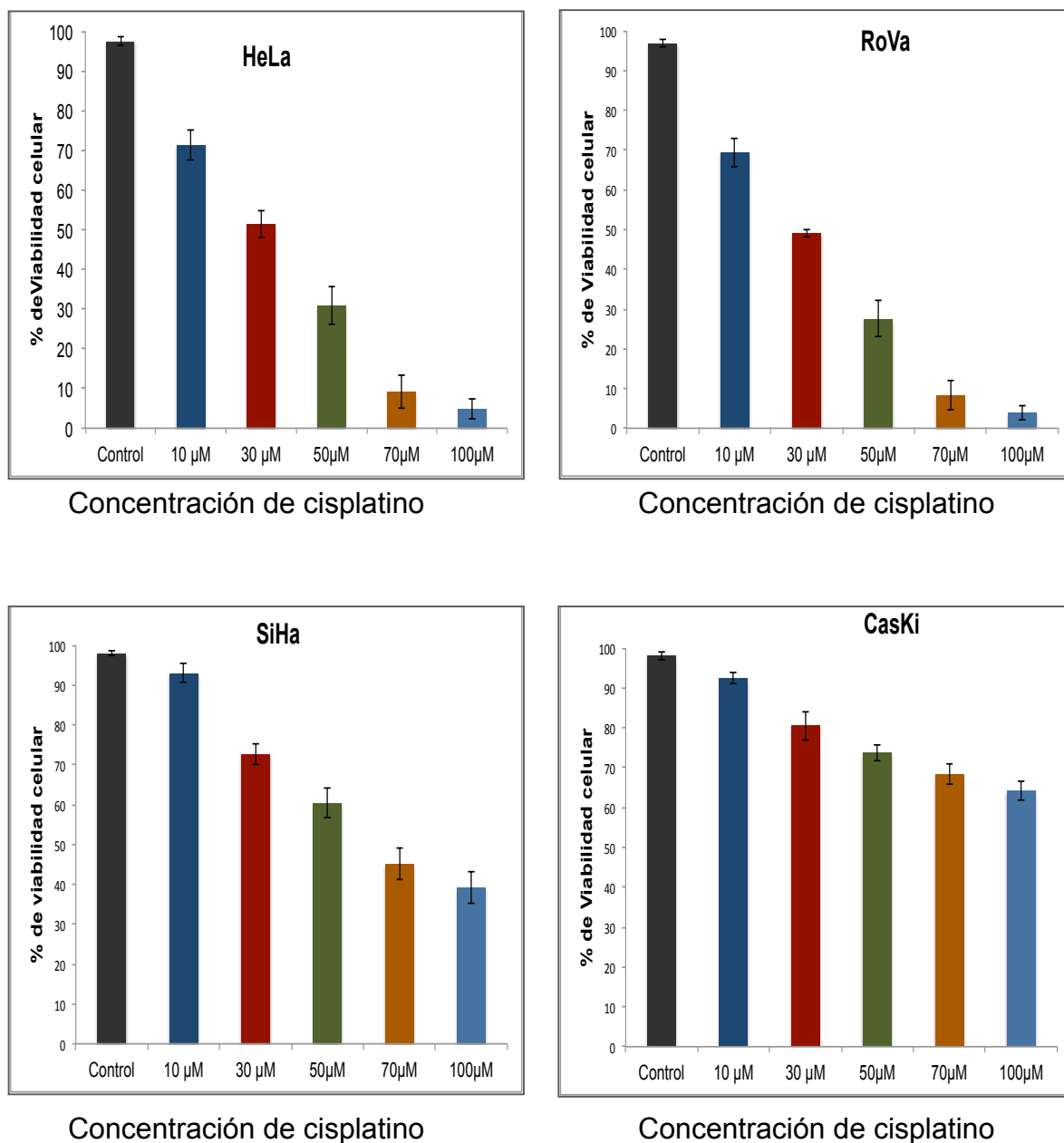


Figura 9. Quimiosensibilidad a cisplatino en líneas celulares de cáncer de cérvix. (A) Porcentaje de viabilidad celular a diferentes concentraciones para línea celular HeLa. Barra color negro se presentan los datos reportados para el control sin tratamiento, en azul las células tratadas con 10 μM de cisplatino, en rojo corresponde a la concentración de 30 μM, barra en verde a 50 μM, en naranja a 70 μM t finalmente en celeste para 100 μM. B), C) y D) corresponde a las líneas celulares RoVa, SiHa y CasKi, respectivamente. El código de colores corresponde al mismo en las 4 líneas.

Figura 10.

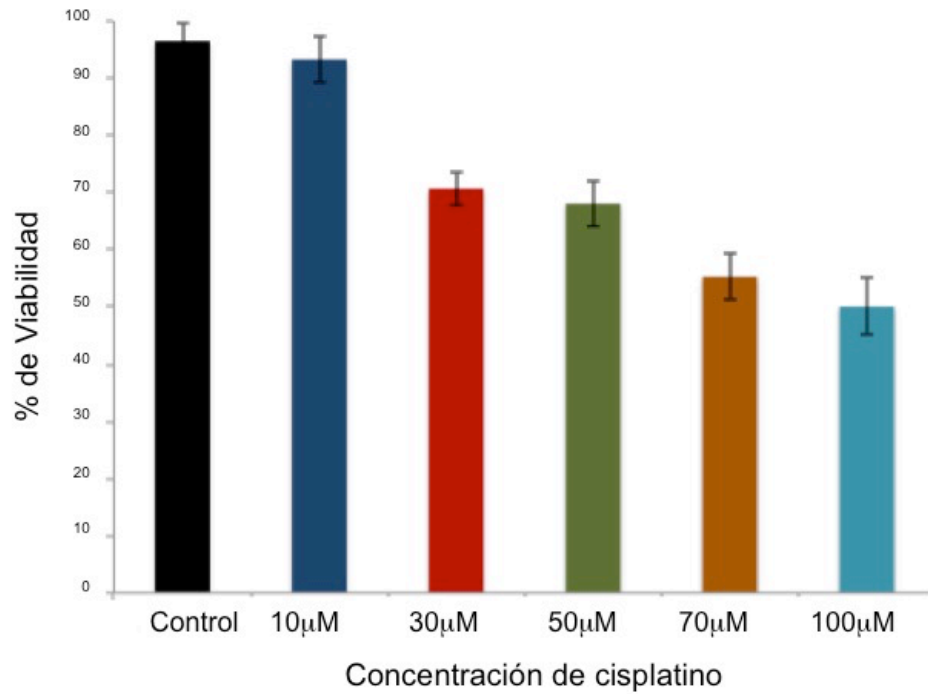


Figura 10. Quimiosensibilidad a cisplatino en MCF-7. (A) Porcentaje de viabilidad celular a diferentes concentraciones de cisplatino 10-100 $\mu$ M. Barra color negro se presentan los datos reportados para el control sin tratamiento, en azul las células tratadas con 10 $\mu$ M de cisplatino, en rojo corresponde a la concentración de 30 $\mu$ M, barra en verde a 50 $\mu$ M, en naranja a 70 $\mu$ M y finalmente en celeste para 100 $\mu$ M.

### **10. 3. Transfección de CRBP1 en las líneas celulares MCF-7 y SiHa**

Con el objetivo de evaluar si la expresión de la proteína CRBP1 participa de manera directa en la respuesta al tratamiento con cisplatino, se realizó la clonación de la secuencia del gen CRBP1 en el vector de expresión pcDNA3, posteriormente esta construcción fue transfectada en las células las células MCF-7 y SiHa. Estas 2 líneas celulares fueron seleccionadas por la moderada respuesta que se observó al tratamiento con cisplatino y el patrón de expresión que presentan de CRBP1 (Fig. 8-10). Para la línea celular MCF-7 se obtuvieron 2 clones estables transfectadas con la construcción pcDNA/CRBP1, MCF-7/3 y MCF-7/5 (Fig. 11A) y para la línea celular SiHa se obtuvieron 4 clones, SC-1, SC-2, SC-3, SC4, de las cuales las que presentaron mayor expresión con respecto al control fueron, SC-2 y SC-3 (Fig. 11B) .

Mediante la evaluación por western blot e Inmunofluorescencia se corroboró que el vector vacío (Mock), de las células MCF-7 no presentó expresión de la proteína, ocurriendo lo contrario en las células transfectadas con la construcción del vector pcDNA/CRBP1, para MCF-7/5, donde se observó una fuerte expresión de la proteína CRBP1 (Fig. 12A-5). Se seleccionó la clona SiHa/SC-3 para evaluar por western blot e inmunofluorescencia el aumento de la expresión de CRBP1 en esta línea celular y se observó un incremento de cerca del 40% en la expresión de CRBP1, comparado con el control del vector vacío para estas células. (Fig. 12C).



Figura 11.

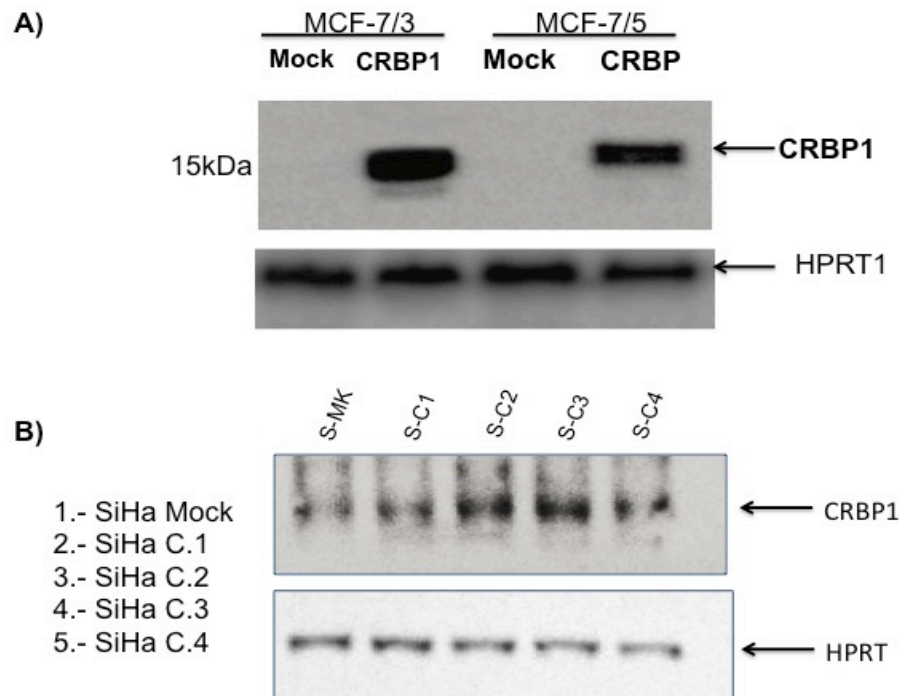
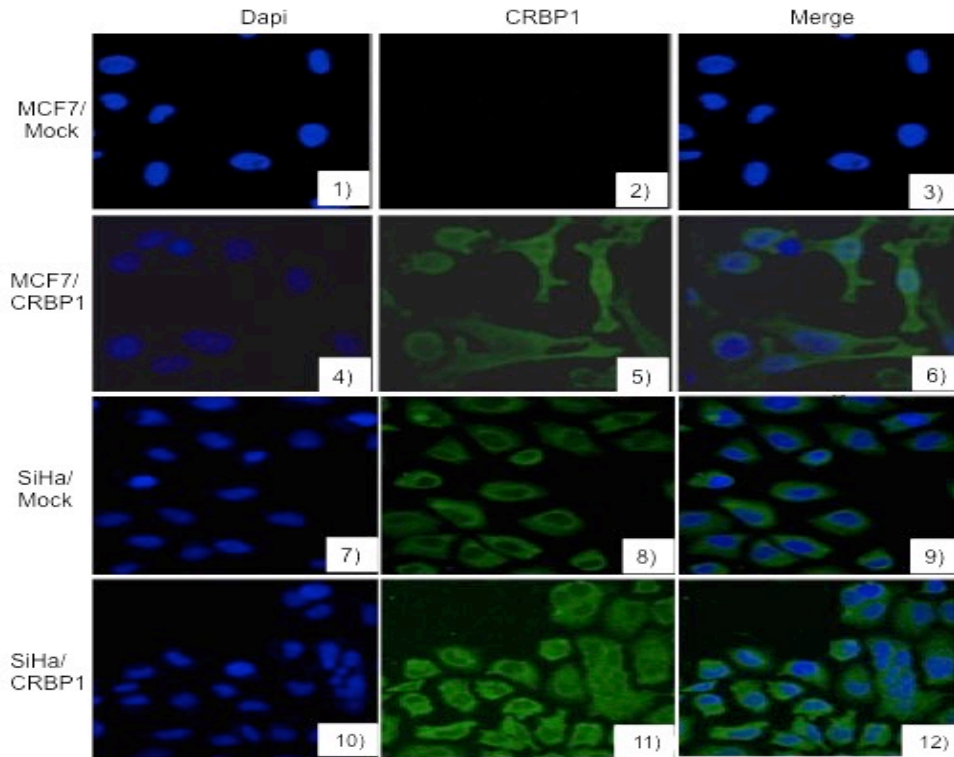


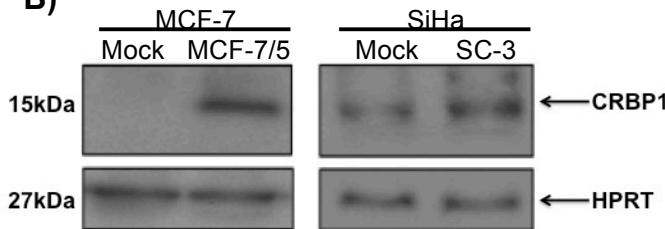
Figura 11. Western blot de reconstitución y aumento de la expresión de CRBP1 en MCF-7 y SiHa. Se realizó Western blot, para evaluar la expresión de CRBP1 en las células transfectadas con el vector pcDNA3/CRBP1. MCF-7/3 y MCF-7/5 fueron las dos clonas obtenidas para MCF-7. B) Western blot para expresión de CRBP1 en SiHa/Mock y SiHa/CRBP1 de las cuales se obtuvieron 4 clonas (SC-1, SC-2, SC-3, SC-4).

Figura 12.

A)



B)



C)

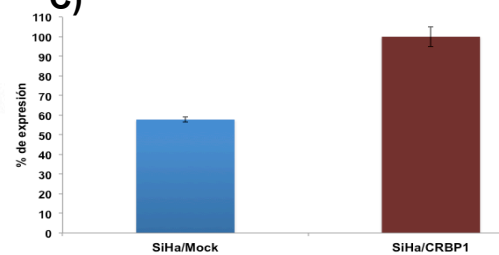


Figura 12. Reconstitución y aumento de la expresión de CRBP1 en MCF-7 y SiHa. Se realizó Inmunofluorescencia y western blot, para evaluar la expresión de CRBP1 en las células transfectadas con el vector pcDNA3/CRBP1. A) Inmunofluorescencia para células MCF-7/Mock, MCF7/5, SiHa/Mock y SiHa/SC-3: 1, 4, tinción de los núcleos con Dapi en azul para MCF7; 7, 10, tinción de los núcleos con Dapi en azul para SiHa. 2, 5 inmunodetección de CRBP1 en color verde para MCF-7/Mock y MCF-7/CRBP1; 8, 11, inmunodetección de CRBP1 en color verde; 3, 6: merge para tinción de MCF-7/Mock y MCF-7/CRBP1; 9, 12, merge para tinción de SiHa/Mock y SiHa/CRBP1. B) Detección de la expresión por western blot de CRBP1 para células MCF-7/5 y SiHa/C2. C) Análisis densitométrico de las bandas obtenidas para expresión de CRBP1 en SiHa/Mock y SiHa/CRBP1.

#### **10. 4. Efecto de la expresión de CRBP1 en la quimiosensibilidad al cisplatino en células SiHa y MCF-7 transfectadas con CRBP1**

Las células que fueron transfectadas previamente con la construcción pcDNA/CRBP1, fueron expuestas al tratamiento con cisplatino para evaluar de esta manera si la expresión de la proteína CRBP1 tiene un papel directo en la quimiosensibilidad a este fármaco.

Las 2 líneas celulares transfectadas con sus respectivos controles (SiHa/Mock, SiHa/SC-3 y MCF-7/Mock, MCF-7/5) fueron tratadas a diferentes concentraciones de cisplatino, 10 $\mu$ M, 30 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 70 $\mu$ M y 100 $\mu$ M por 24 hrs. MCF-7/5 presentó una marcada disminución en la viabilidad celular. A la concentración de 10  $\mu$ M se pudo observar que hubo una disminución de la viabilidad celular de aproximadamente un 20% más con respecto al control, siendo este efecto más evidente a 50 $\mu$ M donde prácticamente el 80% de las células de MCF-7/5 presentaron muerte celular (Fig. 13 A).

Los datos obtenidos para las células con el vector vacío, son muy similares a las MCF-7 sin transfectar (Fig. 10). La línea celular SiHa/SC3 presentó una tendencia similar en la disminución de la viabilidad celular a 10 $\mu$ M de cisplatino, observando mayor sensibilidad al tratamiento a 50 $\mu$ M y 70 $\mu$ M de cerca de 30% más de muerte celular con respecto a la células control (Figura 13B).

Figura 13.

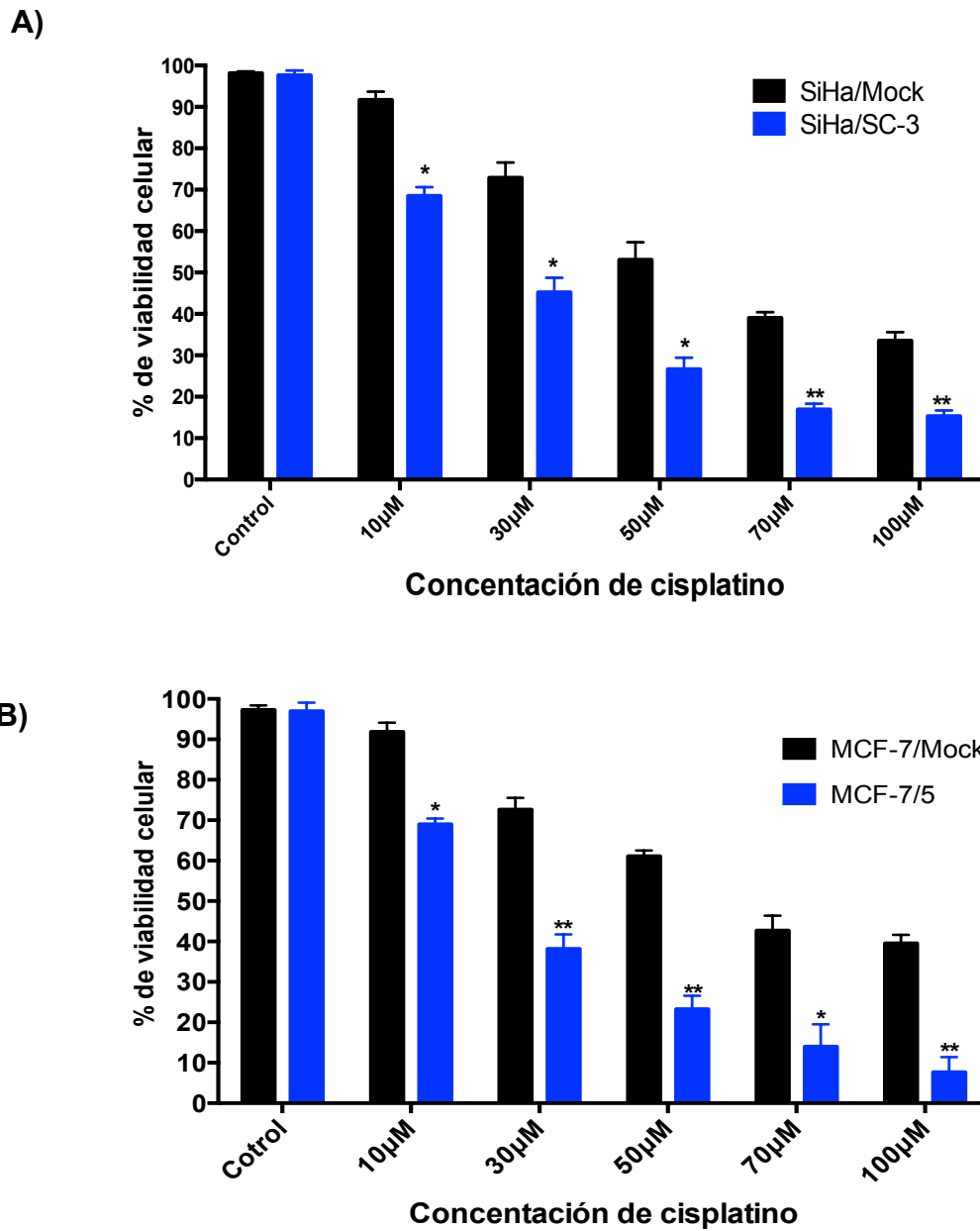


Fig. 13. Sensibilidad a cisplatino en líneas celulares MCF-7/5 y SiHa/SC-3 a diferentes concentraciones de cisplatino. A) Datos de Viabilidad celular para MCF-7/pcDNA3 y MCF-7/5. B) Viabilidad celular para SiHa/pcDNA3 y SiHa/SC-3. En negro los datos de viabilidad celular para MCF-7 y SiHa con el vector vacío (pcDNA3); en azul los datos de MCF-7 y SiHa transfectadas con CRBP1 en respuesta al cisplatino.

## 10. 5. *Microarreglos de expresión*

### 10. 5. 1. *Extracción de RNA total*

La extracción de RNA total se realizó de acuerdo al protocolo descrito en la metodología. Como paso previo a la hibridación de los microarreglos se procedió verificar que el RNA total de las muestras estuviera integro, para eso fue utilizado el bioanalyzer 2100, mediante el cual se realizó una microelectroforesis para observar la integridad de las bandas 28s y 18s ribosomales. Pudimos observar que para las 4 muestras se obtuvo buena integridad del material genético (Fig. 14).

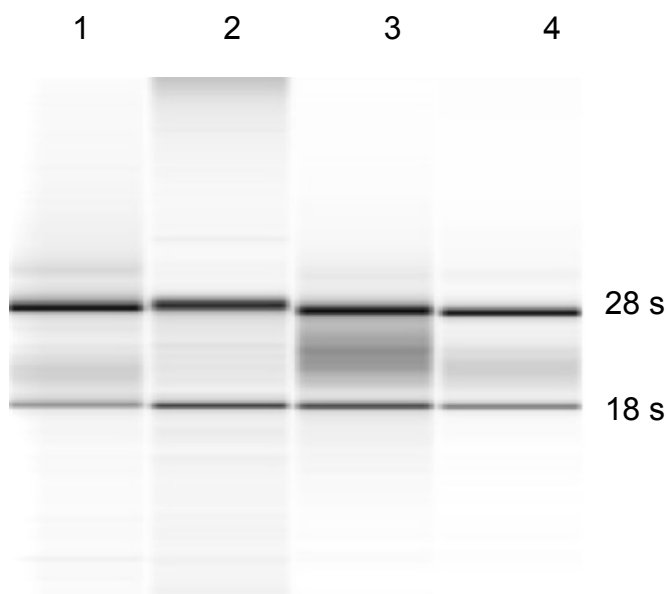


Figura 14. Microelectroforesis de RNA para verificar integridad del material genético. 1: Microelectroforesis de RNA muestra SiHa/Mock. 2: Microelectroforesis muestra SiHa/SC-3. 3: Micro electroforesis muestra MCF-7/Mock. 4: Micro electroforesis muestra MCF-7/5. Bandas en color negro corresponden a 28s y 18 s ribosomal.

### 10. 5. 2. Análisis de genes diferencialmente expresados

Con la finalidad de evaluar los transcritos diferencialmente expresados por la expresión de CRBP1 e identificar posibles genes candidatos involucrados en la quimiosensibilidad generada por CRBP1, se llevó a cabo la hibridación en los microarreglos de expresión de las muestras SiHa/Mock vs SiHa/SC3 y MCF-7/Mock vs MCF-7/5. Los genes con un cambio en número de veces  $\geq -1.5$  y  $-2$  se tomaron en cuenta para realización del análisis. Los genes que se expresaron diferencialmente para SiHa/SC-3 fueron 920 y para MCF-7/5 fueron 1038 con un Z-score de  $\geq -1.5$ , cada uno de ellos en base a su control (Tabla 1). Al realizar el análisis en condiciones más estrictas, tomado en cuenta sólo aquellos genes con un cambio en número de veces  $\geq -2$ , la cantidad de genes diferencialmente expresados fue de 247 genes para MCF-7/5 y 343 para SiHa/SC-3 (Tabla 2).

Los datos previamente citados corresponden al número total de genes que se alteraron en su expresión tanto en MCF-7/5 y SiHa/SC-3. Con el fin de analizar la cantidad de genes diferencialmente expresados que se comparten entre estas dos líneas (MCF7/3 y SiHa/SC-3), se realizaron diagramas de Venn. Con un valor de cambio  $-1.5$  los genes diferencialmente expresados que se comparten fue de 200, siendo exclusivos 838 para MCF-7/5 y 720 para SiHa (15 A). Con el análisis en cambio en número de veces  $-2$  los genes en común fueron 29. Los genes que se modificaron exclusivamente para MCF-7/5 fueron 218 y 314 para SiHa/SC-3 (Fig. 15 B).

Tabla 1. Total de genes diferencialmente expresados en SiHa/SC-3 y MCF-7/5

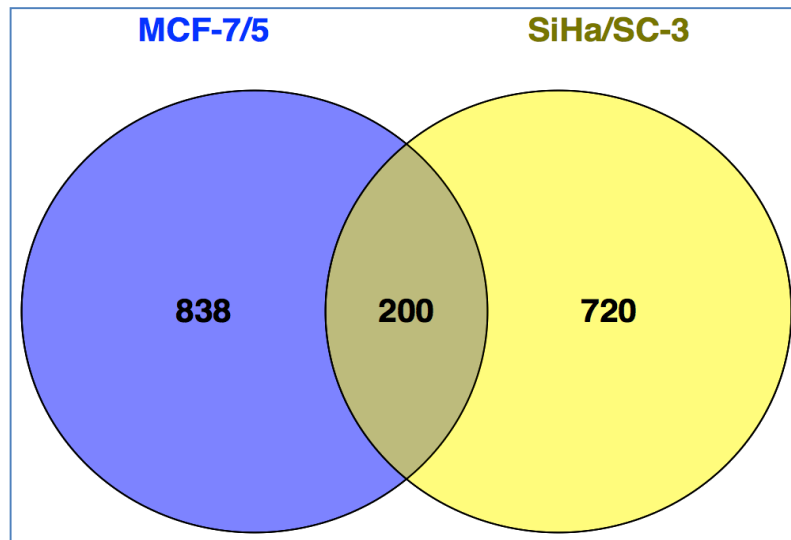
Genes diferencialmente expresados			
MCF-7/5		SiHa/SC-3	
<b>Análisis <math>\geq 1.5</math></b>	1038	Análisis $\geq 1.5$	920
<b>Análisis <math>\geq 2</math></b>	247	Análisis $\geq 2$	343

Tabla 2. Tabla representativa de genes diferencialmente expresados con un Z score  $\geq -1.5$  tanto para SiHa/SC-3 y MCF-7/5

Genes	Official full name	Z Score $\geq -1.5$
MTA2	Metastasis associated 1 family, member 2	-1.5020183
ZNF416	Zinc finger protein 416	-1.5081708
STK32C	Serine/threonine kinase 32C	-1.5134466
CD2BP2	CD2 (cytoplasmic tail) binding protein 2	-1.5531413
ATP9B	ATPase, class II, type 9B	-1.5735453
HMG20B	High mobility group 20B	-1.5940494
ZBED3	Zinc finger, BED-type containing 3	-1.6060659
SMARCC2	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily c, member 2	-1.6228639
MLC1	Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts 1	-1.6230412
NBPF5	Neuroblastoma breakpoint family, member 5	-1.6488225
AGPAT1	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase (lysophosphatidic acid acyltransferase, alpha)	1 -1.6937684
UGCG	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase	-1.7056305
PMPCA	Peptidase (mitochondrial processing) alpha	-1.7301622
TOP1MT	Topoisomerase (DNA) I, mitochondria	-1.769457
ABCC6	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 6	-1.7745263
MYO9B	Myosin IXB	-1.8973651
IRAK1	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1	-1.9652847
TM9SF1	Transmembrane 9 superfamily member 1	-2.2692100
DAZAP1	DAZ associated protein 1	-2.5584705
PPP2R1B	protein phosphatase 2, regulatory subunit A, beta	-2.7143646

Figura 15.

A)



B)

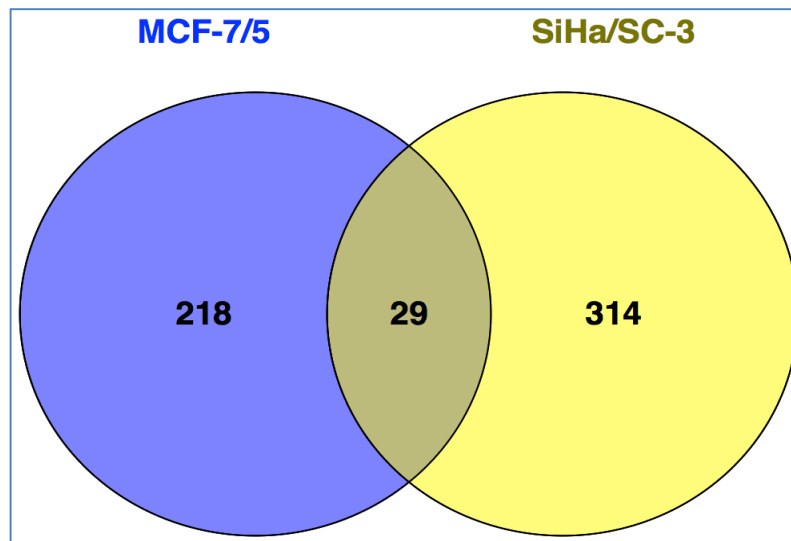
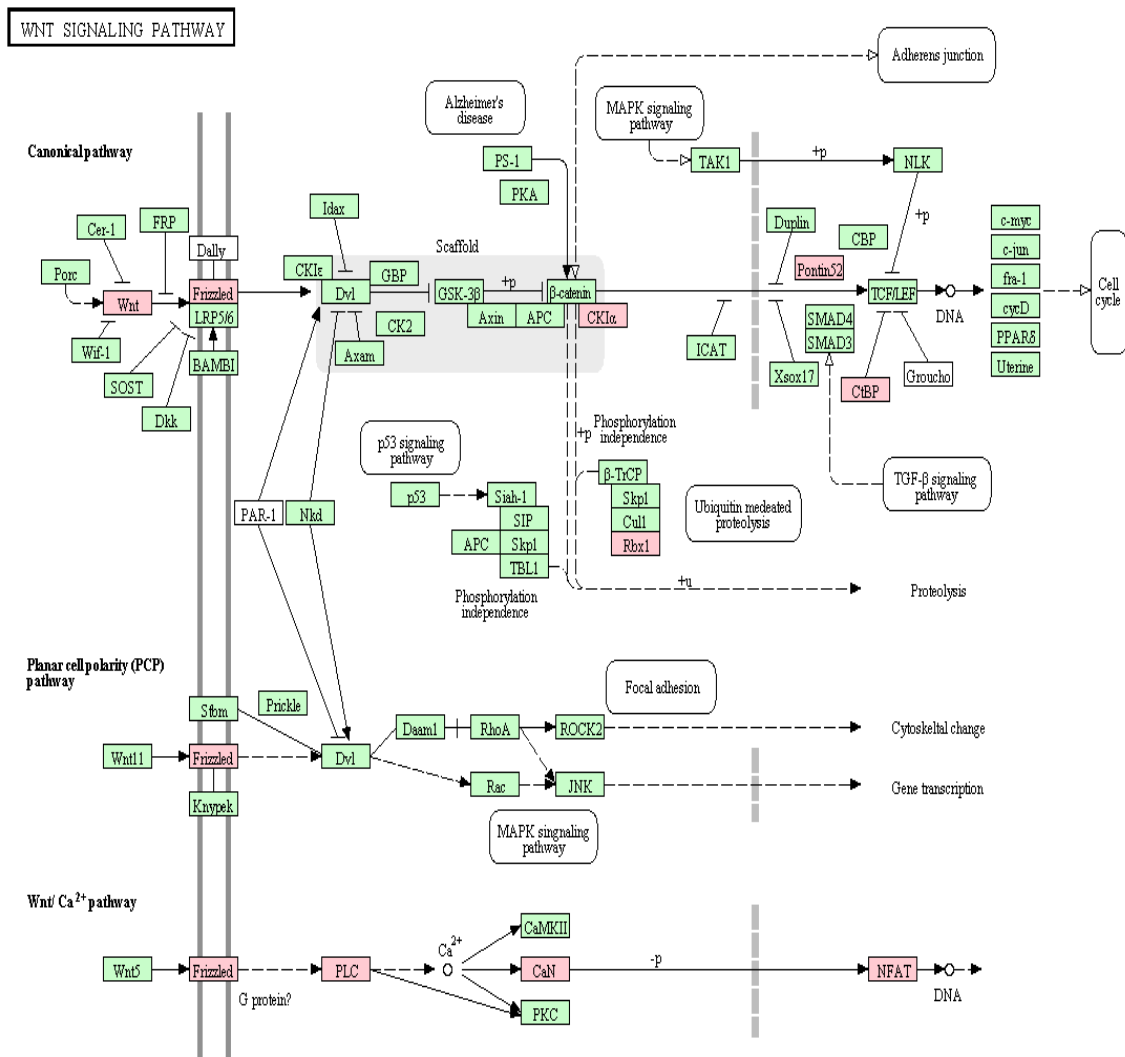


Figura 15. Diagramas de Venn para representar el número de de genes diferencialmente expresados que se comparten entre MCF-7/5 y SiHa/SC-3. A) representación del número de genes diferencialmente expresados entre MCF/5 y SiHa/SC-3 con cambio en número de veces -1.5. B) representación del número de genes diferencialmente expresados entre MCF/5 y SiHa/SC-3 con cambio en número de veces -2. Color morado (MCF-7/5); Color Amarillo (SiHa/SC-3).

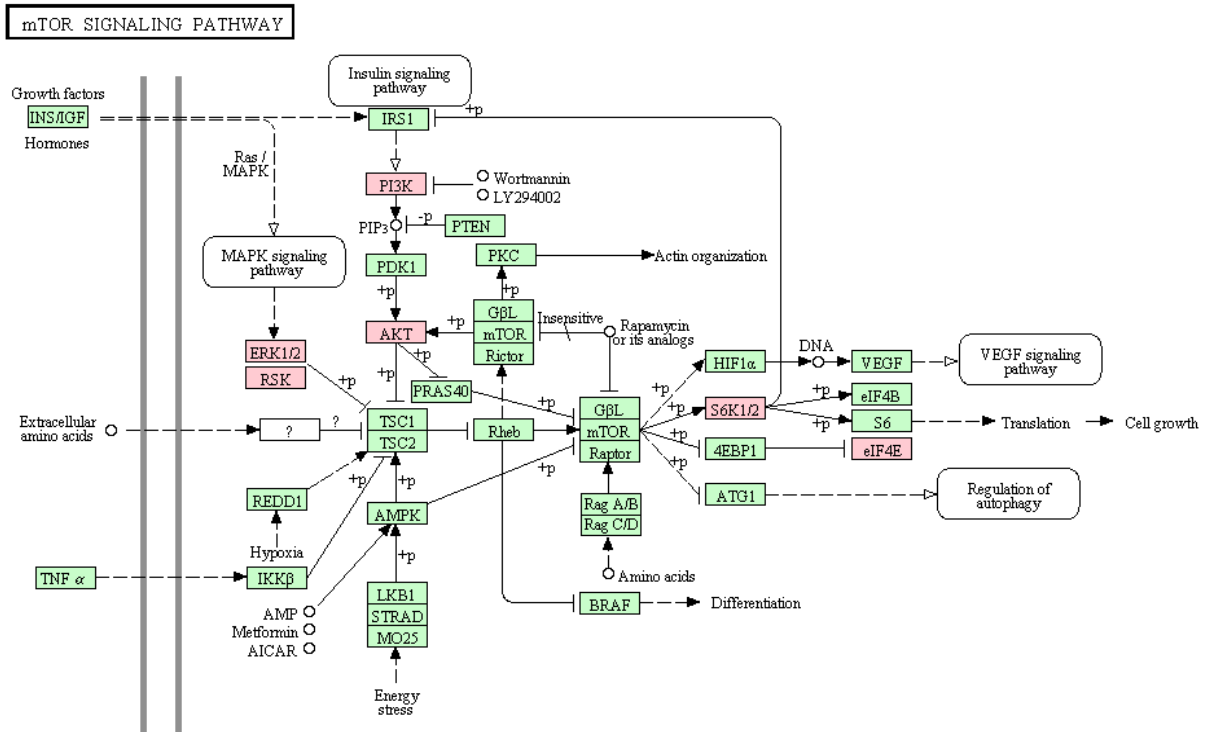


Con el objetivo de tener una mejor comprensión del significado biológico de los genes diferencialmente expresados y las interacciones entre estos, se realizó el análisis en la base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) la cual nos permitió analizar los genes diferencialmente expresados con su posible asociación en rutas biológicas. Dentro de las rutas que se encontraron involucrados estos genes y coinciden tanto SiHa/SC-3 y MCF-7/5 se encontraron la ruta de adhesión focal, la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), mTOR, JAK-STAT, ERBB, Wnt, PI3K/AKT, Ras, Transportadores ABC, VEGF, p53, NOTCH entre otras (Figura 15 A-15 E).

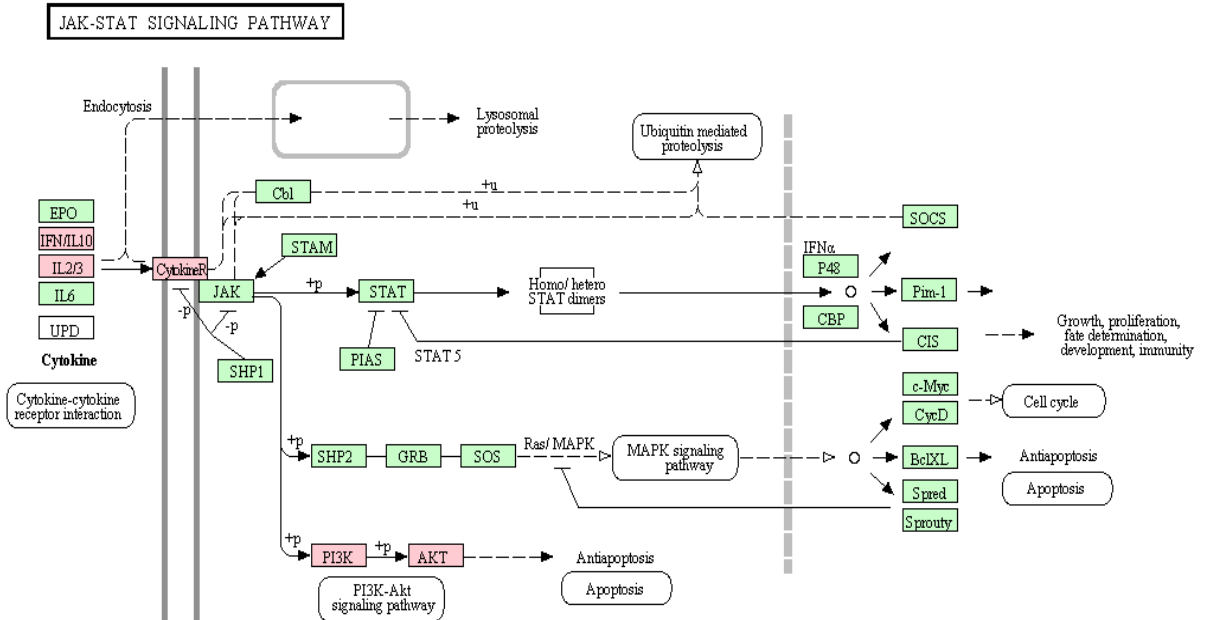
A)



B)

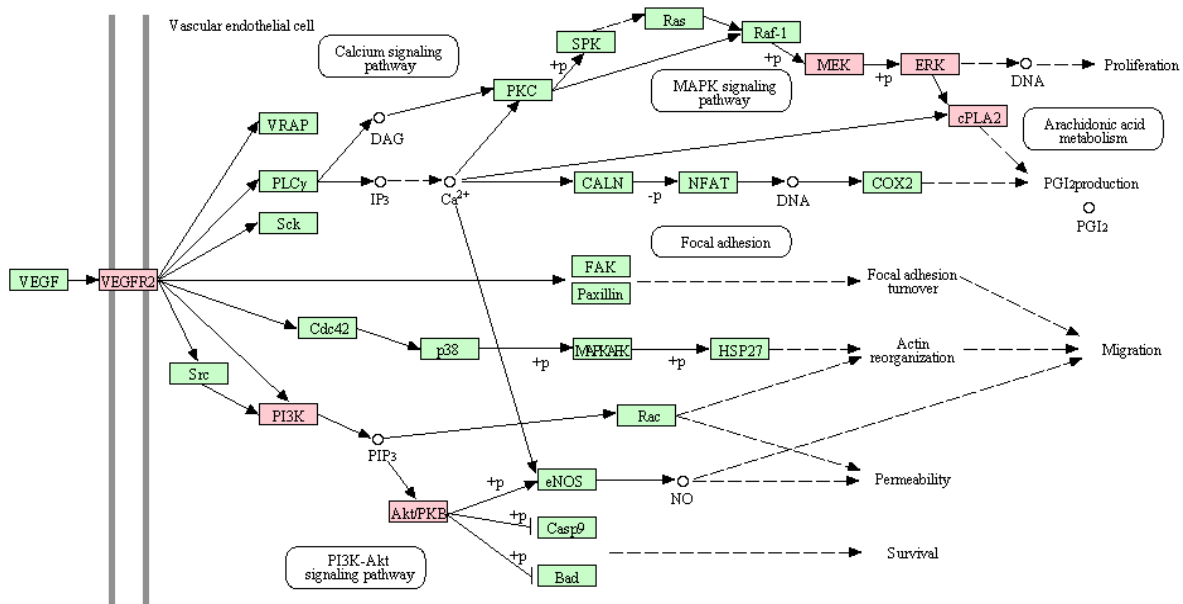


C)



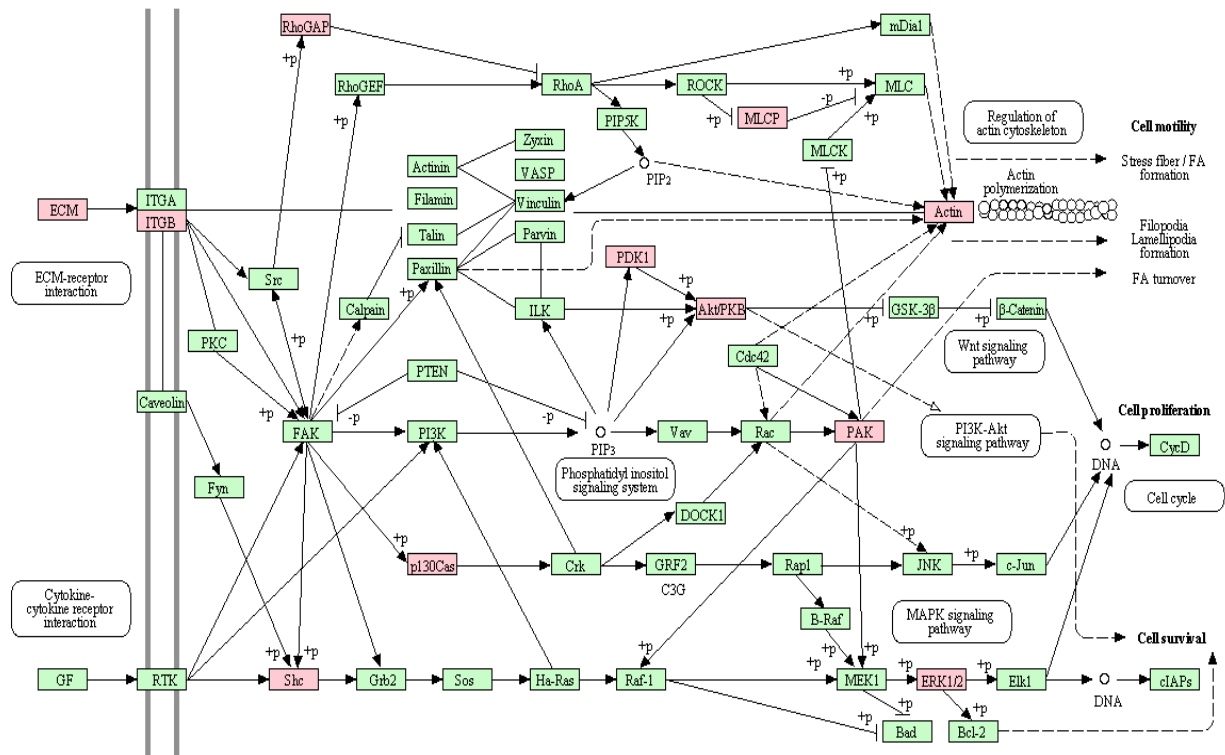
D)

VEGF SIGNALING PATHWAY



E)

FOCAL ADHESION



F)

P53 SIGNALING PATHWAY

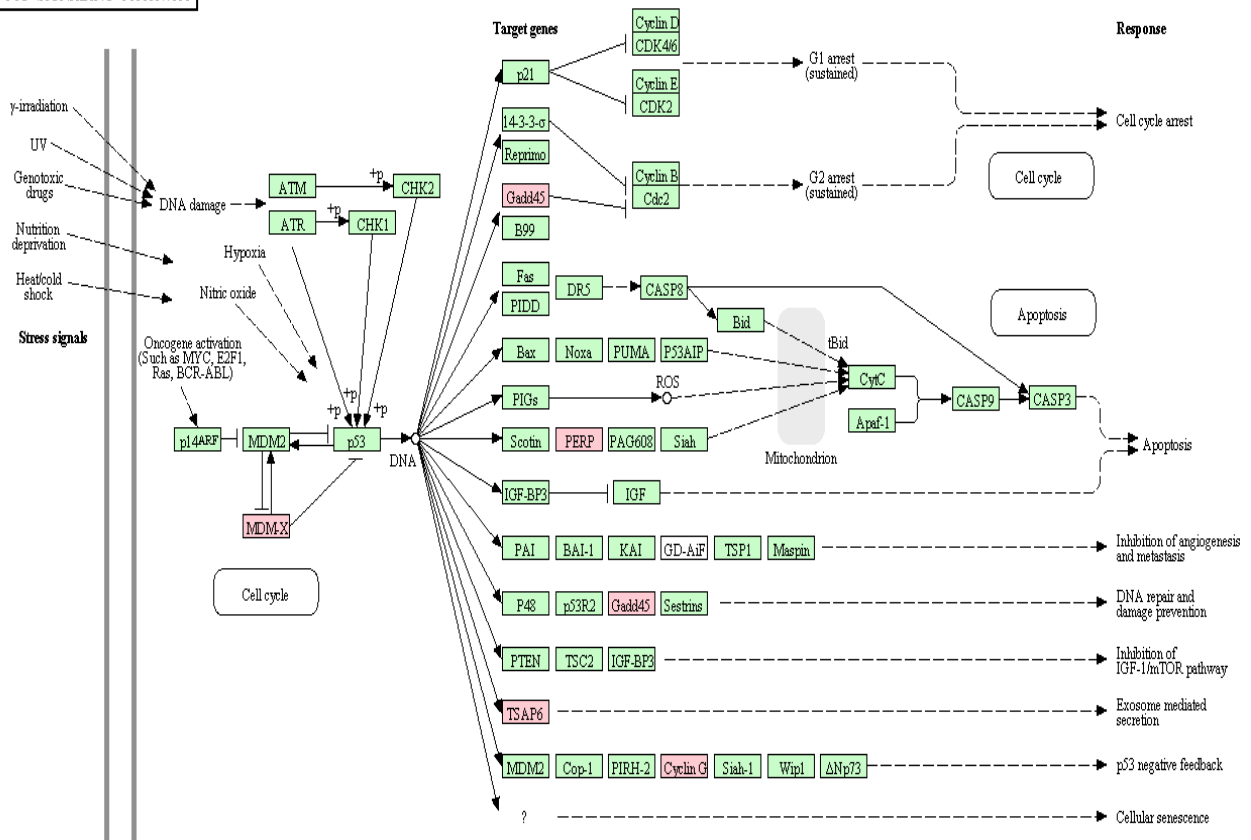


Fig. 16. Imágenes representativas del análisis de la participación de los genes diferencial mente expresados en SiHa/SC-3 y MCF-7/5 en diferentes rutas biológicas. Análisis realizado mediante la base de datos KEGG. A) genes que participan en la ruta de Wnt. B) Vía de señalización de mTOR. C) Vía de señalización de JAK-STAT. D) Vía de señalización para VEGF. E) Vía de señalización de adhesión focal. F) Vía de señalización de p53. En color verde se representan los genes que participan en las diferentes vía pero que no se modifican, en color rosa se resaltan los genes que participan en las diferentes vías y que tienen una expresión diferencial tanto SiHa/SC-3 y MCF-7/5  $\geq -1.5$ .

### **10. 5. 3. Evaluación de la expresión de genes por RT-PCR en tiempo real**

El análisis de los microarreglos nos permitió determinar vías de señalización con mayor alteración por el cambio en expresión de los genes que participan en estas. Para llevar acabo la validación de estos genes diferencialmente expresados se realizó PCR en tiempo real de genes involucrados en rutas de sobrevivencia celular, como la vía de Wnt, AKT/PI3K, como posibles genes involucrados en el proceso de quimiosensibilidad al cisplatino. Como control endógeno utilizamos la secuencia para GAPDH.

La cuantificación de la expresión mostró un decremento significativo ( $P<0.05$ ) en los genes AKT1, tanto para SiHa/SC-3 y MCF7-/5 de cerca de un 40%. RBX1 presentó un decremento significativo para SiHa/SC-3 y MCF-7/5 de cerca del 30% y 20% aproximadamente. RUVBL1 presentó un decremento en los niveles del mensajero, más no fue significativo en las 2 líneas celulares. CTBP2 presentaron diferencia significativa con respecto al control tanto sólo para SiHa/SC-3 y PLCB2 presentó un decremento con diferencia significativa del mensajero, tanto en SiHa y MCF-7. Siendo más evidentes los cambios en los genes involucrados en la vía de Wnt para la línea SiHa/SC-3 (Fig. 17).

Figura 17.

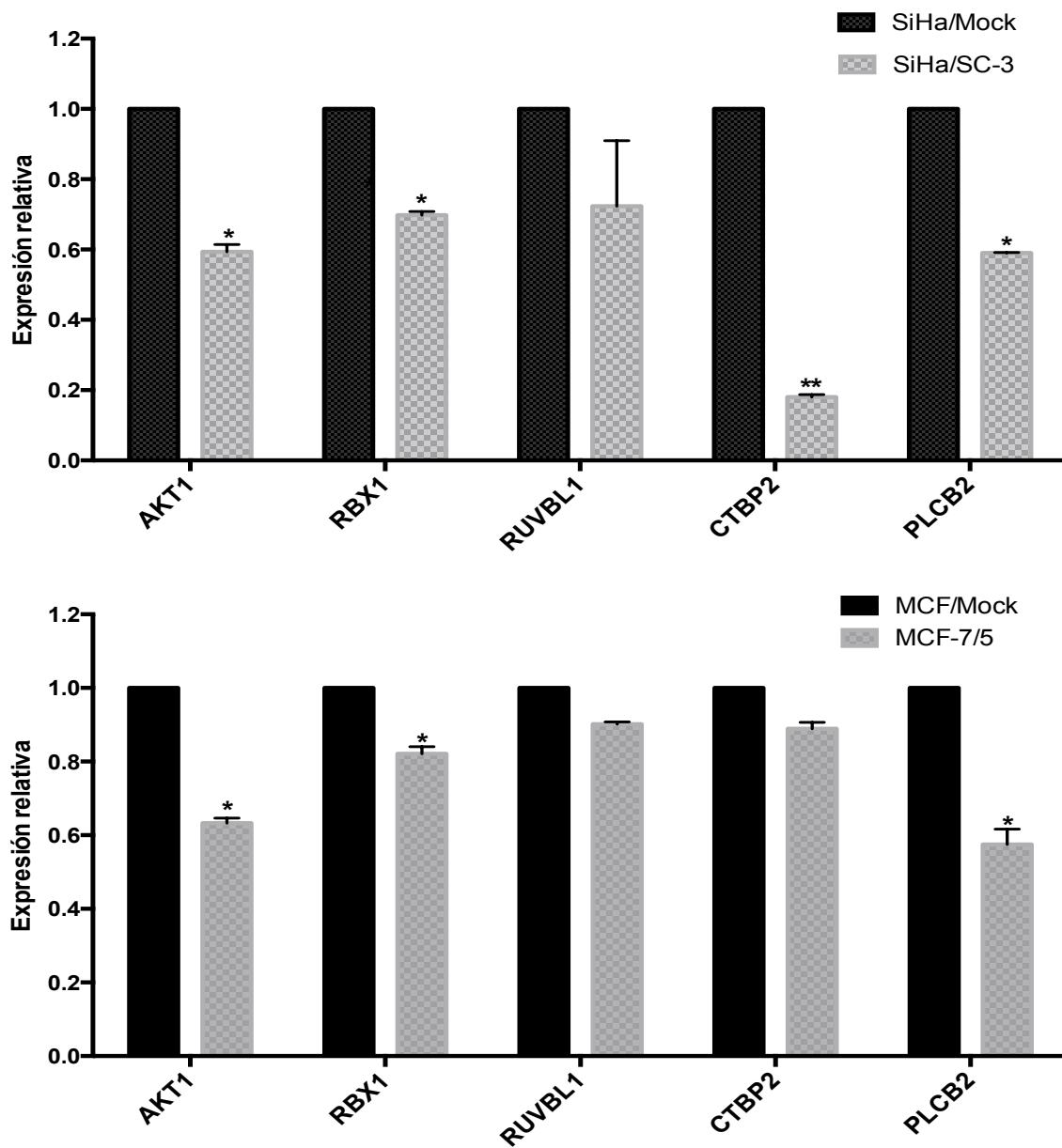


Fig. 17. La expresión de CRBP1 disminuye la transcripción de genes asociados con la vía de Wnt. A) y B) RT-PCR en tiempo para los genes AKT1, RBX1, RUVBL1, CTBP2 y PLCB2 en SiHa/SC-3 y MCF-7/5. Barras en color negro representan la expresión de los diferentes genes evaluados en las muestras de los controles SiHa/Mock (A) y MCF-7/Mock (B). Barras en color gris, representan la expresión de los diferentes genes evaluados correspondientes a las muestras SiHa/SC3 (A) y MCF-7 (B). Los resultados representan la media de tres experimentos independientes  $\pm$  la SD de cada gene

## **10. 6. La expresión de CRBP1 disminuye la fosforilación de proteínas cinasas**

Los análisis de microarreglos nos proporcionaron información de vías de transducción de señales potencialmente reguladas por la expresión de CRBP1 que pudieran estar implicadas en la respuesta al tratamiento con cisplatino. La corroboración de esto se realizó mediante la evaluación de 46 sitios específicos de fosforilación de *Serina/Treonina* o *Tirosina* de 38 proteínas seleccionadas mediante el uso del arreglo de fosfoproteínas. Los niveles de fosforilación de las proteínas se obtuvieron de la normalización de los valores obtenidos de los controles de células con el vector vacío (Figura 18 B). p38a (T180/Y182), ERK 1/2 (T202/Y204, T185/ Y187), mTOR (S2448) y CREB (S133), presentaron una significativa disminución en los niveles de fosforilación, en sus sitios de activación/inactivación en las células SiHa/SC-3 con respecto a su control (Fig. 18 A, B). JNK, MSK12, AKT1 presentaron una ligera disminución en la fosforilación pero al realizar el análisis estadístico este cambio no fue significativo. Para las fosfoproteínas Src, eNOS, PYK2 no se observó ningún cambio en la expresión (Fig. 18 B).

Los niveles de fosforilación para las muestras MCF-7/Mock y MCF-7/5 fueron obtenidos bajo las mismas condiciones de SiHa/SC-3. Se observó que al igual que en SiHa/SC-3 las principales proteínas que presentaron una disminución en los niveles de fosforilación fueron p38a (T180/Y182), ERK 1/2 (T202/Y204) (Fig. 19 A). Se pudo identificar proteínas que presentaron aumento en sus niveles de expresión, p53 y HSP60 lo que podría estar indicando un aumento en la activación de las vías en las que participan estas proteínas (Fig. 19 B). Se observó una ligera disminución de los niveles de fosforilación en AKT1, mTOR, KNK1 (Fig. 19 B).

Figura 18.

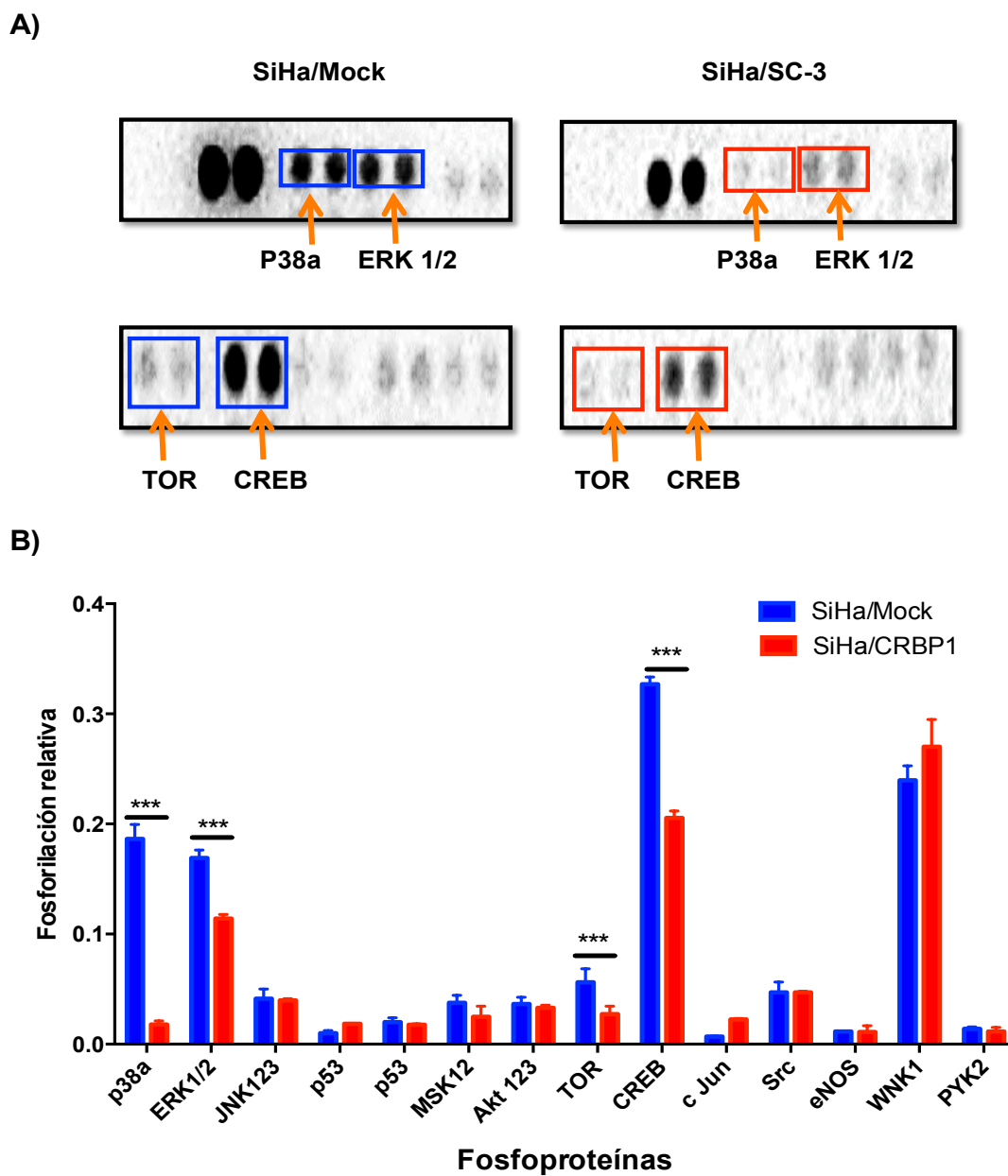


Figura 18. Niveles relativos de fosforilación de proteínas para las células SiHa/Mock en contraste con SiHa/SC-3. P38a. A): Imágenes representativas del arreglo del perfil de fosfo-cinasas en células SiHa/SC3 versus SiHa/Mock. Líneas de cuadros en color azul, niveles de expresión de p38, ERK 1/2, TOR y CREB para SiHa/Mock. Líneas de cuadros color rojo de p38, ERK 1/2, mTOR y CREB para SiHa/SC-3. B): Gráfica representativa de los niveles de fosforilación de las



fosfoproteínas en las células SiHa/Mock en contraste con SiHa/SC-3 ( $P = < .05$ ). Barras en color azul (SiHa/Mock), barras color rojo (SiHa/CRBP1).

Figura 19.

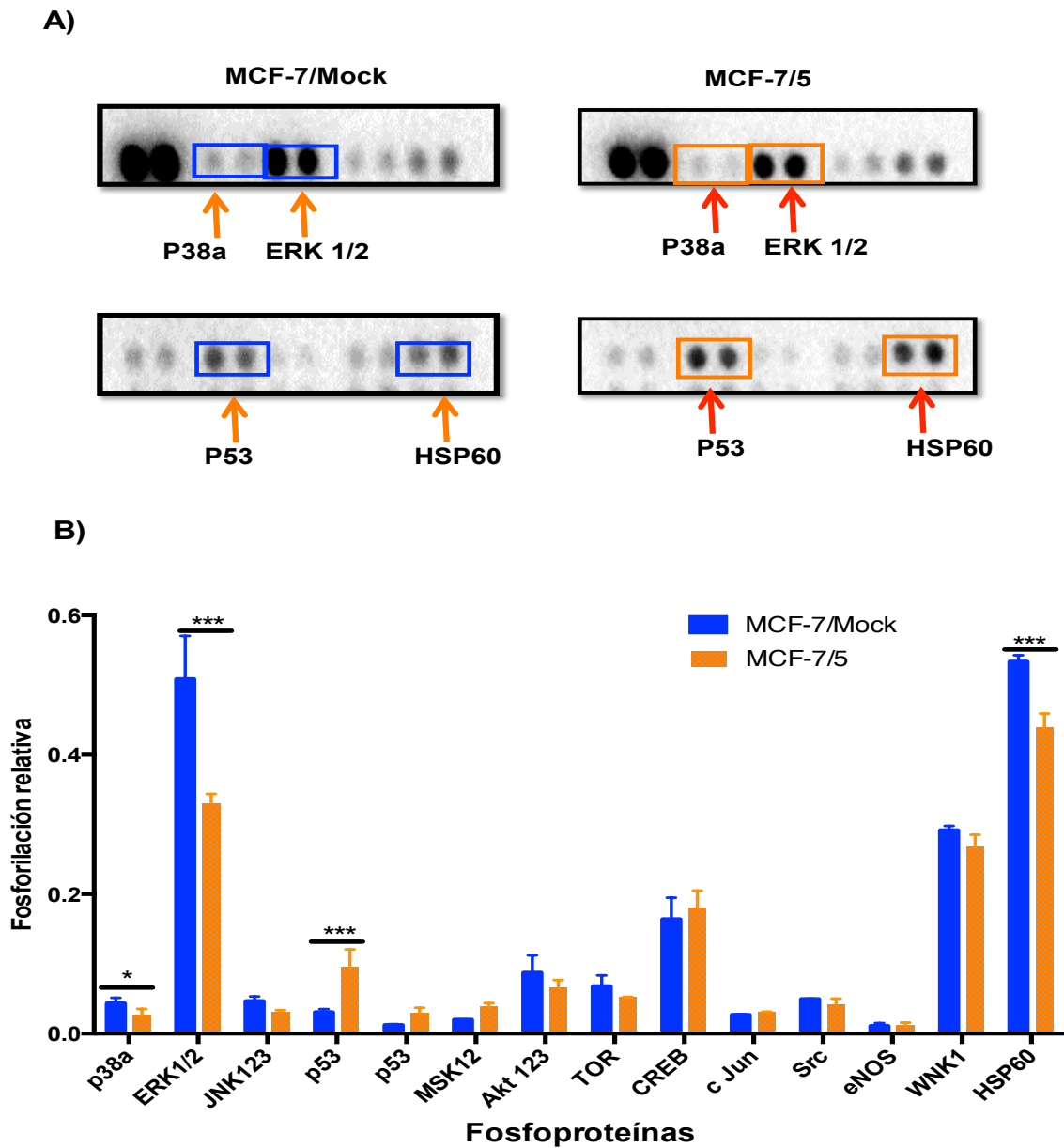


Figura 19. Niveles relativos de fosforilación de proteínas para las células MCF-7/Mock en contraste con MCF-7/SC-3. A): Imágenes representativas del arreglo del perfil de fosfo-cinasas en células MCF-7/Mock versus MCF-7/5. Líneas de cuadros en color azul, niveles de expresión de p38, ERK 1/2, p53 y HSP60 para MCF-7/Mock. Líneas de cuadros color naranja de p38, ERK 1/2, p53 y HSP60 para MCF-7/5. B): Gráfica representativa de los niveles de fosforilación de las

fosfoproteínas en las células MCF-7/Mock en contraste con MCF-7/5. Barras en color azul (MCF-7/Mock), barras color naranja (MCF-7/5).

### ***10. 7. Regulación de receptores nucleares por la expresión de CRBP1***

De acuerdo a la secuencia de la proteína CRBP1 a la fecha no se conoce una señal de localización nuclear que pudiera indicar una posible interacción directa con secuencias en el DNA que regulen la expresión de los genes anteriormente descritos que se ven alterados en su expresión al inducir o aumentar la expresión de CRBP1.

Con el objetivo de poder elucidar un posible mecanismo de cómo CRBP1 regula la expresión de diversos genes, decidimos evaluar la expresión de factores de transcripción que se encuentran río abajo de la ruta del metabolismo del retinol. Los factores de transcripción evaluados fueron RAR $\beta$  y RXR $\beta$ , que intervienen en la regulación de diversos genes blancos. Pudimos observar que para SiHa control al igual que MCF-7 presentan expresión de RAR $\beta$ , de manera interesante esta expresión se ve alterada aumentando en cerca de un 50% al inducir o aumentar la expresión de CRBP1 en MCF-7 y SiHa (Fig. 20). RXR $\beta$  no presentó cambios en sus niveles de expresión al inducir o aumentar la expresión de CRBP1 en SiHa y MCF-7 (Fig. 20).

Figura 20.

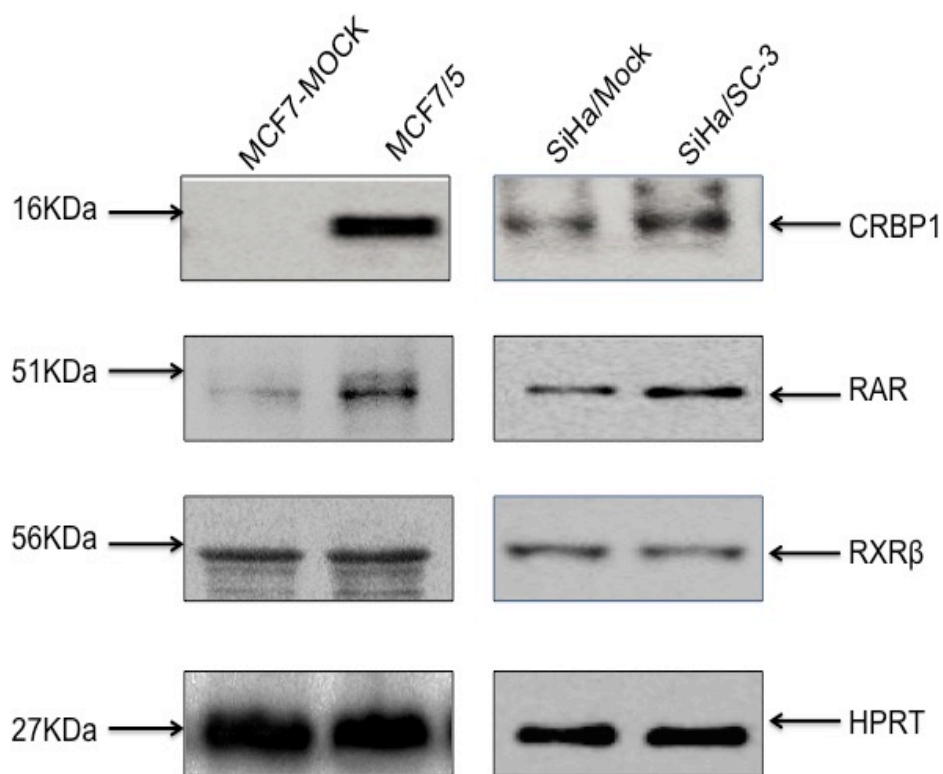


Fig. 20. Regulaci3n de la expresi3n de RAR $\beta$  y RXR $\beta$  en c3lulas transfectadas con CRBP1. Western blot representativo de las muestras MCF-7/Mock, MCF-7/5 y SiHa/Mock para determinar la expresi3n de RAR $\beta$  y RXR $\beta$ .

### 10. 8. CRBP1 se asocia con la sobrevida de los pacientes en Cáncer cérvicouterino

Se realizó el seguimiento de 8 pacientes con CaCu durante 3 años para determinar una posible asociación entre la expresión de la proteína CRBP1 y la sobrevida. Se pudo observar que de los 8 pacientes 2 de estos no expresaban la proteína CRBP1 y 6 de estos si, los cuales al realizar el análisis de Kaplan-Meier fueron los que tuvieron un mayor nivel de sobrevida (Mayor de 2 años) a diferencia de los que no presentaron expresión de CRBP1 (Fig. 21).

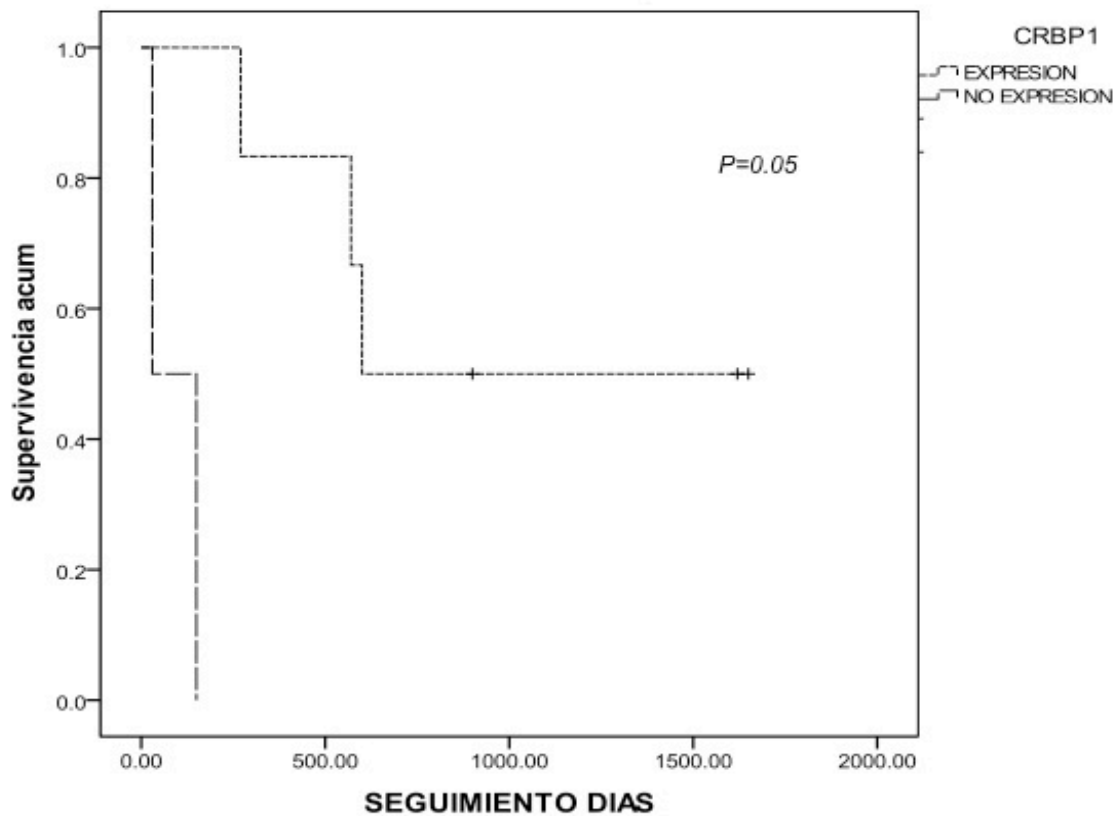


Fig. 21. Probabilidad de supervivencia en pacientes con cáncer de cérvix con expresión de CRBP1. La expresión del gene CRBP1 se asocia significativamente con la probabilidad de supervivencia ( $p=0.05$  análisis de Kaplan-Meier).

## 11. Discusión

En México las 2 principales causas de muerte en mujeres por cáncer siguen siendo el cáncer de mama y cáncer de cérvix, a la fecha se siguen presentando altas tasas de incidencia y mortalidad aun cuando se han hecho avances en el diagnóstico y prevención de estas neoplasias [16]. Uno de los principales problemas que se presentan, tanto en cáncer de cérvix así como en mama, es la falla en los esquemas de terapia [25, 83]. El cisplatino es un agente quimioterapéutico ampliamente utilizado para diversos tipos de cáncer como ovario, colon, laringe, cérvix y mama entre otros [6, 84]. En cáncer de cérvix el cisplatino ha sido utilizado desde la época de los 70' y a la fecha sigue siendo el estándar de oro en tratamiento para los pacientes [85]. En cáncer de mama el cisplatino no es un agente quimioterapéutico de uso frecuente, se sabe que ha sido utilizado como terapia de primera línea para pacientes con cáncer metastásico quedando restringido para etapas avanzadas de la enfermedad [86], ha sido particularmente utilizado en combinación con otros fármacos, como taxanos, vinca alcaloides, y 5-Fluorouracilo, resultando en un efecto sinérgico o aditivo [87]. Silver y cols. (2010), señalan que existe una respuesta favorable de los pacientes con cáncer de mama al tratamiento con cisplatino como terapia adyuvante, induciendo un aumento en la muerte de células tumorales, principalmente en aquellas que son estrógeno resistentes [88].

El cisplatino garantiza el éxito inicial con respuestas parciales y estabilización de la enfermedad en la mayoría de los paciente, pero por desgracia, su utilidad clínica está limitada en última instancia por el hecho de que una mayoría de los pacientes de cáncer eventualmente tienden a desarrollar resistencia a este fármaco, dando lugar a la recurrencia del tumor [25]. Lo que sugiere la necesidad de explorar otros enfoques terapéuticos encaminados a favorecer la susceptibilidad de las célula cancerosas al tratamiento.

Recientemente muchos genes han sido reportados como genes implicados en la sensibilidad a múltiples fármacos, dentro de los que se encuentran genes transportadores, enzimas que metabolizan los fármacos, así también genes supresores de tumores (TSG) [34]. Ejemplo de esto es lo reportado para el gen *FUS1*, el cual se observó que favorece la sensibilidad al tratamiento con cisplatino en células de cáncer de pulmón no pequeñas, al restaurar de la expresión de este gen, el cual a su vez promueve el aumento de la apoptosis mediante la regulación a la baja de *MDM2* y la activación de *Apaf-1* [89]. Otro de los TSG que se conoce tienen un efecto en el aumento a la quimiosensibilidad al tratamiento con cisplatino es el gen *PTEN*, el cual se ha observado puede revertir la quimioresistencia al cisplatino en células de cáncer de ovario, mediante la regulación a la baja de la vía de AKT/PI3K [90].

El gen *CRBP1* recientemente fue reportado como un posible gen supresor de tumores para cáncer de cérvix [78]. Alteraciones en este gen como pérdida de expresión de la proteína asociado a procesos de metilación, ha sido reportado para cáncer de próstata, ovario, laringe, cérvix y mama entre otros [67, 74, 75]. En el 2012 Peralta y cols. señalaron una posible asociación de este gen en la respuesta a los esquemas de quimioterapia en cáncer de laringe, indicando que existe una fuerte asociación entre la expresión de la proteína CRBP1 con un mayor nivel de sobrevida de los pacientes, a diferencia de aquellos donde no existe expresión de la proteína y la sobrevida fue mucho menor, siendo esto un posible reflejo de la respuesta a los tratamientos en los pacientes [75]. Este es el único trabajo a la fecha que presenta esta asociación de expresión de la proteína con un mayor nivel de sobrevida, por lo que resulta interesante ampliar más este estudio y determinar cuales son los mecanismos involucrados por los que CRBP1 puede conferir quimiosensibilidad. En cáncer de cérvix al igual que para cáncer de mama a la fecha no existen estudios que nos puedan señalar una participación directa de esta proteína. El objetivo principal del presente trabajo fue determinar la participación de la expresión de CRBP1 en el tratamiento con cisplatino y las posibles vías de señalización que favorecen la quimiosensibilidad a este fármaco.

Para ello, nosotros utilizamos un modelo en líneas celulares de cáncer de cérvix y cáncer de mama, que son los dos principales tipos de cáncer con mayor frecuencia en mujeres mexicanas. Encontramos un patrón muy similar de las diferentes alteraciones de este gene con respecto a lo que ocurre en laringe, tanto en muestras de pacientes como en líneas celulares derivadas de estos [78]. Los resultados obtenidos de las diferentes líneas celulares, HeLa, RoVa, SiHa, CasKi y MCF-7, representan el primer reporte con respecto a la expresión de la proteína CRBP1 en estas líneas celulares, únicamente en el 2002 Esteller y cols. reportaron la evaluación de la expresión del mensajero de este gen en diferentes líneas de cáncer de mama, dentro de ellas MCF-7, y HeLa de cáncer de cérvix, indicando una ausencia del transcrito para MCF-7 y presencia del transcrito en HeLa, con esto validamos a nivel de proteína estos datos y aportamos los información acerca de la expresión de CRBP1 en RoVa, SiHa y CasKi.

Al realizar los experimento de quimiosensibilidad, observamos que 2 de las 4 líneas celulares derivadas de cáncer de cérvix presentaron mayor sensibilidad al tratamiento con cisplatino, HeLa y RoVa resultaron ser la líneas más sensibles y SiHa y CasKi las más resistentes, SiHa en menor nivel que CasKi. Lo cual concuerda con lo reportado por Funaoka y cols (1996). Padilla y cols. (2001), indican que la resistencia al tratamiento con cisplatino en SiHa y CasKi se debe a la presencia del VPH16 que presentan estas células tumorales, con respecto a HeLa que presenta infección por VPH de tipo 18, la cual resulto ser más sensible. La infección por VPH en las células tumorales derivadas de CaCu puede ser uno de los posibles mecanismos que regule la quimiosensibilidad, pero esto no está del todo claro, ya que en líneas celulares de otro tipo de cáncer donde no se presenta la infección por VPH, también se ha observado resistencia al tratamiento con cisplatino, tal es el caso de las líneas C13, OVCAR-433, A2780 de cáncer de ovario, que son resistentes al tratamiento [91]. Los datos que obtuvimos en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama indican que esta línea presenta resistencia al tratamiento, siendo muy similar a los datos obtenidos para SiHa, con esto corroboramos que la resistencia que se genera al tratamiento no se debe

únicamente a factores externos, como la infección del VPH en cáncer de cérvix, sino también a factores intrínsecos que presentan las células tumorales, como la alteración de diversos genes. Por lo tanto, es importante comprender los mecanismos moleculares que contribuyen a la resistencia a los medicamentos con el fin de identificar nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento del cáncer.

En el 2013 reportamos que las alteraciones en la proteína CRBP1 en CaCu, son independientes de la presencia del VPH [78]. La estrategia propuesta en el presente trabajo en la que células que no expresaban la proteína CRBP1 fueran convertidas a células positivas a esta proteína, nos permitió mostrar que CRBP1 es uno de los genes implicados en el efecto del daño por cisplatino. En otras palabras, la expresión del CRBP1 permite que exista una mejor eficacia de la droga para matar a las células tumorales, en tanto, aquellas células que carecen de la expresión de este gen la quimiosensibilidad es mucho menor. Desde luego, los datos no indican que este gen es el responsable en su totalidad de la resistencia o susceptibilidad al efecto del cisplatino, pero sí muestra que es uno de los genes asociados a este proceso.

Se cree que la capacidad de una célula cancerosa de responder a un agente quimioterapéutico es debido en parte a su capacidad apoptótica. Por otra parte, se sabe que el proceso de apoptosis inducida por fármacos no sólo se rige por una regulación positiva de factores pro-apoptóticos, sino también por la modulación de factores de supervivencia celular [92]. Las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) son una familia de proteínas serina/treonina cinasas estructuralmente relacionadas que coordinan diversas señales extracelulares que regular el crecimiento celular y la supervivencia [93-95], mutaciones o desregulación de estas proteínas tienen un papel que proveen una base para el desarrollo de agonistas y antagonistas de enzimas para los diferentes tratamientos en cáncer [96]. Existen tres principales subfamilias de las MAPK: Las de señal extracelular regulada por cinasas (ERK 1/2), proteínas cinasas activada por estrés (SAPK)/ c-Jun N-terminal cinasa (JNK) y p38 MAPK. Las tres vías MAPKs han



sido implicadas procesos de resistencia a cisplatino [97]. Wei y cols. (2004), señalaron que la inhibición de la vía de ERK en cáncer de ovario favorece la quimiosensibilidad a cisplatino [98]. Esto concuerda con lo reportado por Wang y cols. (2007), donde al realizar ensayos de interferencia de ERK2 observa que existe una disminución en los niveles de MPK-1, que a su vez disminuye los niveles de fosforilación p38 (otra de las proteínas cinasas envueltas en procesos de supervivencia celular), aumentando de esta manera la sensibilidad al tratamiento con cisplatino [99]. Nosotros encontramos que las principales vías alteradas con el aumento en la expresión de CRBP1 en SiHa y reconstitución de la proteína en MCF-7, fue principalmente ERK1/2 y p38, donde se observó claramente una disminución en los niveles de fosforilación de estas proteínas. Se sabe que ERK 1/2 activado además de favorece la disminución de los factores pro-apoptóticos, favorece la supervivencia celular por el aumento en la actividad en las moléculas anti-apoptóticas. Mcl1 es una proteína anti-apoptótica miembro de la familia de Bcl2, se sabe que es fosforilado por ERK 1/2 en la treonina 163, incrementando de esta manera su estabilidad y su actividad anti-apoptótica [100]. Lo que nos hace pensar que al disminuir los niveles de fosforilación de estas proteínas cinasas, por el aumento en expresión de CRBP1, existe una pérdida de su función de estas proteínas, lo cual puede estar favoreciendo la quimiosensibilidad al cisplatino en SiHa/SC-3 y MCF-7/5. Presentando de esta manera, una alternativa biológica por la cual se puede favorecer la disminución de la fosforilación de esta rutas.

La diana de rapamicina en células de mamífero o mTOR por sus siglas en inglés (mammalian Target of Rapamycin) es una proteína serina/treonina cinasa que pertenece a la familia del fosfoinositol-3-cinasa (PI3K), fue otra de las rutas que se vieron alteradas con la expresión de CRBP1, tal como lo pudimos observar en el análisis de los microarreglos de expresión, donde observamos esta disminución a la baja tanto para SiHa/SC-3 como para MCF-7/5, al realizar la validación por proteína utilizando el arreglo de proteínas cinasas, se observó una diferencia significativa en disminución de la fosforilación de la S2448 en SiHa/SC-3 y

únicamente una tendencia en la disminución para MCF-7/5, lo cual nos podría estar indicando que algunas de las rutas que se regulan por la expresión de CRBP1, pueden ser tejido específico. Diversos estudios indican que una de las principales indicativas de activación de mTOR es precisamente la fosforilación en el sitio de la S2448 [101-105]. La actividad de señalización mTOR se asocia con el crecimiento celular del cáncer y la supervivencia, por la inactivación de moléculas pro-apoptóticas como BAD. La activación anormal de la vía de señalización de mTOR ha sido implicada en diferentes tipos de cáncer, como el cáncer colorectal, carcinoma escamoso de esófago, cáncer de pulmón y CaCu entre otros, no siendo claro su papel en cáncer de mama [106, 107]. En líneas celulares de cáncer de cérvix se ha reportado una activación anormal de mTOR, así como la inhibición de este por rampamicina puede representar una posible estrategia terapéutica para el tratamiento de este cáncer [107]. Observamos que existe una marcada disminución en los niveles de fosforilación de S2448, para SiHa/SC-3, los que nos esta indicando de manera indirecta una disminución en la actividad de mTOR [104]. Debido a que no todos los pacientes son sensibles a la rampamicina, el aumento en la expresión de la proteína CRBP1 podría ser una terapia alternativa.

La proteína de unión a elemento de respuesta a AMP cíclico (CREB), en su residuo de serina 133 (S133), presentó una marcada disminución en los niveles de fosforilación en SiHa/SC-3, lo que indica una disminución en la actividad de esta proteína [108]. CREB es un factor de transcripción que regula directamente genes que se encuentran altamente relacionados con procesos de proliferación celular, anti-apoptosis y metástasis, por lo que la disminución en su actividad puede favorecer de igual forma la respuesta a los tratamientos, dentro de estos el cisplatino. Queda claro que es necesario evaluar los diferentes genes que se regulan por la actividad de CREB, al igual que ERK1/2 y mTOR, pero esto nos da evidencia suficiente para decir que estas moléculas implicadas en procesos de supervivencia celular están siendo reguladas claramente por la expresión de CRBP1, con lo cual podemos sugerir que el aumento en la quimiosensibilidad de

las células SiHa y MCF cuando son transfectadas con CRBP1 se debe a la disminución en la actividad de vías de señalización de supervivencia celular.

Otro punto importante que cabe destacar, son las diferencias que existen entre el origen de las líneas celulares que se evaluaron en este trabajo para determinar el efecto de la expresión de CRBP1 al tratamiento con cisplatino. SiHa es derivada de células epiteliales de cáncer de cérvix, mientras que MCF-7 es una línea celular derivada de cáncer mama [109, 110]. Se observaron algunas diferencias entre las vías de señalización que se regularon por la presencia de CRBP1 entre estas 2 líneas celulares, el ejemplo más claro fue lo que observamos en el aumento de la fosforilación de p53 en su residuo S392 en MCF-7/5, lo que de acuerdo a Sakaguchi y cols. (1997) representa la estabilización de la formación tetrámero de la proteína supresora de tumores p53. Esta diferencia en expresión de p53 es bastante aceptable entre estas 2 líneas celulares ya que se sabe, en el caso particular de SiHa es una línea celular derivada de cáncer de cérvix, la cual está infectada por el VPH16, la vía de p53 se encuentra alterada, debido a la presencia del oncogén E6 del virus que promueve la degradación de p53 inhibiendo de esta forma la estabilización y la activación de p53 que normalmente ocurriría por la presencia de los oncogenes [111], a diferencia de lo que sucede en MCF-7 que no está infectada por VPH, el aumento en p53 fue más notable, lo que podría estar indicando otra posible ruta por la cual CRBP1 confiere quimiosensibilidad para este tipo celular, tal como lo que sucede en cáncer de páncreas, donde se observó que mediante la regulación de Chmp1A que es regulado por CRBP1, se aumenta la expresión y fosforilación de p53 [112]. Por lo cual proponemos que este sería el mecanismo por el cual CRBP1 regula la expresión de p53 en MCF-7/5. Otras de las diferencias que se observaron entre SiHa y MCF-7 y que llama la atención fue la expresión de HSP60, en la cual se observó un aumento en su expresión, lo que causa controversia, debido a que el aumento en la expresión de esta proteína se ha asociado a al plegamiento de proteínas en resistencia a fármacos [113, 114]. Por lo que proponemos la hipótesis de que posiblemente esto sea una de las

causas por las que no se logra un 100% de la muerte al realizar el tratamiento con cisplatino en estas líneas celulares transfectadas con CRBP1.

Se sabe que CRBP1 es una proteína citoplasmática, la cual no cuenta con señal de localización nuclear en su secuencia, por lo tanto fue de gran importancia poder determinar los factores de transcripción regulados por CRBP1 que pudieran tener un efecto sobre el encendido o apagado de los diversos genes alterados con la expresión de CRBP1. Se pudo observar que RAR $\beta$  está regulado directamente por CRBP1, ya que en las líneas transfectadas con esta proteína, se pudo observar claramente un aumento en la expresión de RAR $\beta$  a diferencia de RXR $\beta$ . Estos datos concuerdan con lo reportado por Kohlstedt y cols. (2008) en lo que respecta RAR $\beta$ , donde una regulación a la alta de este receptor por la expresión de CRBP1, pero contrasta con lo reportado para RXR $\beta$ , ya que no observamos cambio en los niveles de expresión de este gen. Esto posiblemente puede deberse a que a diferencia de RAR $\beta$  puede ser activado tanto por los *all-trans*-RA y 9-cis-Acido retinóico, mientras que RXR $\beta$  es un factor de transcripción que únicamente se regula por 9-cis-Acido retinoico, teniendo un porcentaje menor de ser activado [115]. Wang y cols. (2010) describen un posible mecanismo por el cuales RAR $\beta$  y RXR $\beta$  favorece la disminución de JNK/AP-1 por transrepresión [116], Xiao-Chun (2007), observó que la expresión de RAR $\beta$  favorece la regulación a la baja de la actividad de ERK 1/2, por lo que podemos sugerir que la expresión de CRBP1 que a su vez induce el aumento en la expresión de RAR $\beta$  puede tener un efecto en la regulación de estas vías de supervivencia celular en un factor en común con Ras, que es la molécula en común que activa por fosforilación ERK1/2, mTOR, p38 (Figura 22) .

Doldo y cols. (2014), señalan que la expresión de CRBP1 es un elemento clave en la regulación a la baja en la transcripción de genes implicados en crecimiento y supervivencia celular, ellos reportan la regulación a la baja de *AKT1*, *AKT3*, *EGFR*, *FOS*, *JUN*, *STAT1* y *STAT5a* en cáncer de ovario [73]. No observamos una diferencia significativa en estos genes al realizar la validación por proteína, pero si

a nivel de mensajero, validamos AKT1 y se observó la disminución del mensajero tanto en SiHa/SC-3 y MCF-7/5. Por lo que podemos sugerir que independiente del origen celular del cáncer, CRBP1 dirige la regulación de diferentes vías que están en caminadas a disminuir la actividad de los factores de supervivencia celular, con lo cual ahora podemos sugerir que es el mecanismo por el cual CRBP1 genera susceptibilidad al cisplatino en células cancerosas. Los datos de supervivencia celular en paciente fortalece nuestra hipótesis, ya que observamos que los pacientes con CaCu que no expresaron la proteína, la sobrevida fue mucho menor con respecto a los que tuvieron expresión.

Así, los datos permiten presentar a CRBP1 como una prueba molecular que pueda ser utilizada en pacientes afectados por algunos tipos de cáncer epitelial como los de cabeza y cuello, o cervix entre otros, es decir, una prueba pronóstica de falla o éxito al tratamiento con el cisplatino. Esto permitiría que previo al inicio al esquema de quimioterapia, una muestra de cada paciente puede ser examinada para determinar la expresión del gen CRBP1 y definir cuales serán los pacientes que presentarán falla en el esquema terapéutico y en estos (los cuales serán aproximadamente la mayoría de los pacientes) proporcionar un esquema de quimioterapia alternativo o tipo de neoadyuvancia, generando así, una nueva prueba molecular en cáncer.

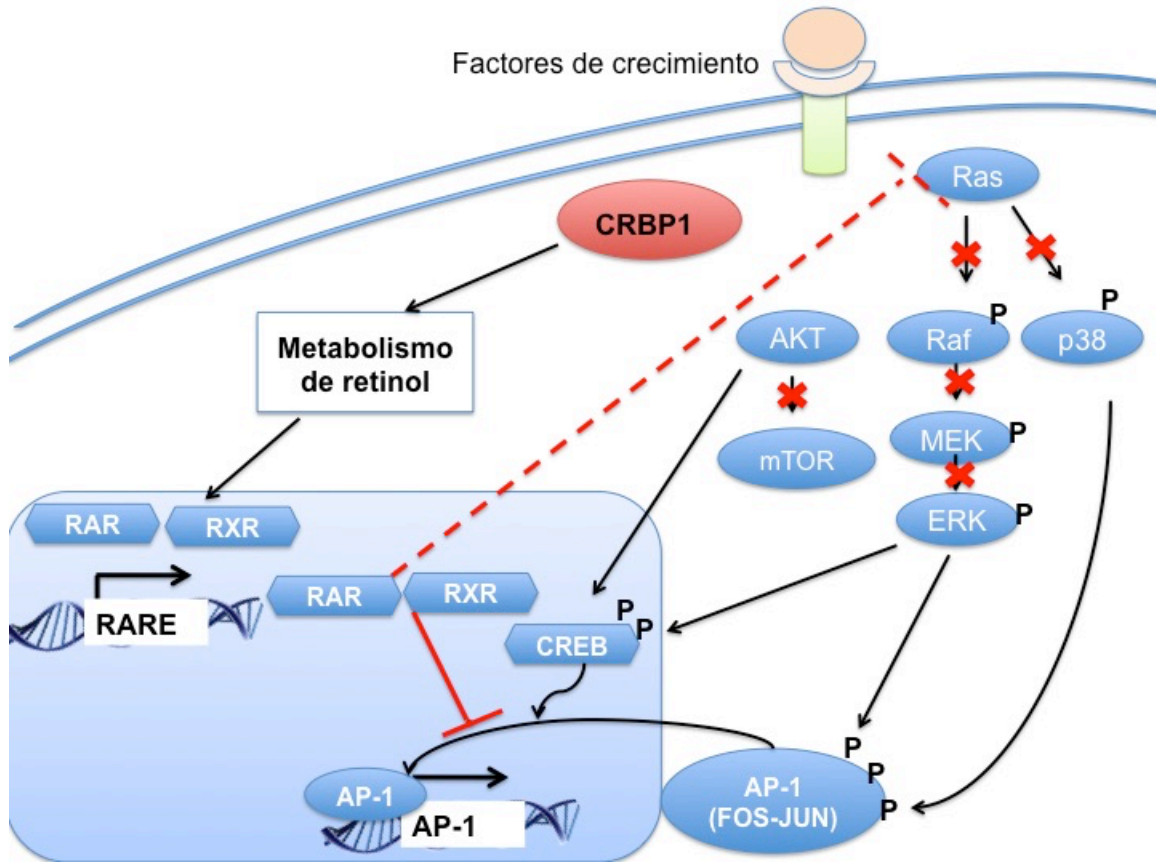


Figura 22. Representación hipotética del mecanismo de acción de CRBP1 en la disminución de ERK 1/2, mTOR, p38 que favorecen la quimiosensibilidad al cisplatino. El aumento en la Expresión de RAR $\beta$  por CRBP1 podría disminuir la actividad de Ras, bloqueando la activación de factores de supervivencia celular.

## **12. Conclusiones**

1.- CRBP1 presenta un patrón diferencial de expresión entre las líneas celulares de cáncer de cérvix.

2.-La expresión de la proteína CRBP1 se asocia con la quimiosensibilidad al tratamiento con cisplatino en líneas derivadas de cáncer de cérvix y cáncer de mama.

3.- La reconstitución y aumento de expresión de CRBP1 regula a la baja genes involucrados en vías de señalización implicadas en proceso de supervivencia celular.

4.- CRBP1 se convertiría en un posible blanco terapéutico para el tratamiento de cáncer epitelial.

### **13. Perspectivas del trabajo**

- 1.- Evaluar los genes diferencialmente expresados con un Z score mayor o igual a + 1.5 que se regulan con la expresión de CRBP1.
  
- 2.- Analizar a detalle los diferentes genes involucrados en la vía de ERK 1/2, p38 que se están desregulando con la expresión de CRBP1 con el fin de determinar la ruta por la cual se aumenta la sensibilidad al cisplatino.
  
- 3.- Evaluar en otros tipos de cáncer, como pulmón, próstata, cabeza y cuello entre otros, la expresión de CRBP1 y la regulación de ERK1/2, con el fin de determinar una vía en común de acción en los diferentes tipos de cáncer.
  
- 4.- Aumentar el número de pacientes con seguimiento clínico, para determinar la supervivencia y su asociación con la expresión de CRBP1.
  
- 5.- Diseñar una estrategia dirigida a aumentar los niveles de expresión de CRBP1 en los pacientes con tratamiento de cisplatino para mejorar su acción.



## 14. Bibliografía

1. Oliver TG, Mercer KL, Sayles LC, Burke JR, Mendus D, Lovejoy KS, Cheng MH, Subramanian A, Mu D, Powers S *et al*: **Chronic cisplatin treatment promotes enhanced damage repair and tumor progression in a mouse model of lung cancer.** *Genes & development* 2010, **24**(8):837-852.
2. Rosenberg B, Vancamp L, Krigas T: **Inhibition of Cell Division in Escherichia Coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode.** *Nature* 1965, **205**:698-699.
3. Muggia FM: **Cisplatin update.** *Seminars in oncology* 1991, **18**(1 Suppl 3):14.
4. Leng M, Brabec V: **DNA adducts of cisplatin, transplatin and platinum-intercalating drugs.** *IARC scientific publications* 1994(125):339-348.
5. Wright JC: **Cancer chemotherapy: past, present, and future--Part I.** *Journal of the National Medical Association* 1984, **76**(8):773-784.
6. Lebwohl D, Canetta R: **Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update.** *European journal of cancer* 1998, **34**(10):1522-1534.
7. Olszewski U, Hamilton G: **A better platinum-based anticancer drug yet to come?** *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* 2010, **10**(4):293-301.
8. Eastman A: **Cross-linking of glutathione to DNA by cancer chemotherapeutic platinum coordination complexes.** *Chemico-biological interactions* 1987, **61**(3):241-248.

9. Michalke B: **Platinum speciation used for elucidating activation or inhibition of Pt-containing anti-cancer drugs.** *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements* 2010, **24**(2):69-77.
10. Pinto AL, Lippard SJ: **Binding of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) (cisplatin) to DNA.** *Biochimica et biophysica acta* 1985, **780**(3):167-180.
11. Von Hoff DD, Rozenzweig M: **cis-Diamminedichloroplatinum(II): a metal complex with significant anticancer activity.** *Advances in pharmacology and chemotherapy* 1979, **16**:273-298.
12. Ummat A, Rechkoblit O, Jain R, Roy Choudhury J, Johnson RE, Silverstein TD, Buku A, Lone S, Prakash L, Prakash S *et al*: **Structural basis for cisplatin DNA damage tolerance by human polymerase eta during cancer chemotherapy.** *Nature structural & molecular biology* 2012, **19**(6):628-632.
13. Einhorn LH, Donohue J: **Cis-diamminedichloroplatinum, vinblastine, and bleomycin combination chemotherapy in disseminated testicular cancer.** *Annals of internal medicine* 1977, **87**(3):293-298.
14. Decatris MP, Sundar S, O'Byrne KJ: **Platinum-based chemotherapy in metastatic breast cancer: current status.** *Cancer treatment reviews* 2004, **30**(1):53-81.
15. Martin LP, Hamilton TC, Schilder RJ: **Platinum resistance: the role of DNA repair pathways.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2008, **14**(5):1291-1295.

16. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F: **Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012.** *International journal of cancer Journal international du cancer* 2015, **136**(5):E359-386.
17. Wiebe E, Denny L, Thomas G: **Cancer of the cervix uteri.** *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics* 2012, **119 Suppl 2**:S100-109.
18. Pecorelli S: **Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium.** *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics* 2009, **105**(2):103-104.
19. Duenas-Gonzalez A, Cetina L, Mariscal I, de la Garza J: **Modern management of locally advanced cervical carcinoma.** *Cancer treatment reviews* 2003, **29**(5):389-399.
20. Sedlis A, Bundy BN, Rotman MZ, Lentz SS, Muderspach LI, Zaino RJ: **A randomized trial of pelvic radiation therapy versus no further therapy in selected patients with stage IB carcinoma of the cervix after radical hysterectomy and pelvic lymphadenectomy: A Gynecologic Oncology Group Study.** *Gynecologic oncology* 1999, **73**(2):177-183.
21. Morris M, Eifel PJ, Lu J, Grigsby PW, Levenback C, Stevens RE, Rotman M, Gershenson DM, Mutch DG: **Pelvic radiation with concurrent chemotherapy compared with pelvic and para-aortic radiation for high-risk cervical cancer.** *The New England journal of medicine* 1999, **340**(15):1137-1143.
22. Green JA, Kirwan JM, Tierney JF, Symonds P, Fresco L, Collingwood M, Williams CJ: **Survival and recurrence after concomitant chemotherapy**

**and radiotherapy for cancer of the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis.** *Lancet* 2001, **358**(9284):781-786.

23. Neoadjuvant Chemotherapy for Locally Advanced Cervical Cancer Meta-analysis C: **Neoadjuvant chemotherapy for locally advanced cervical cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 21 randomised trials.** *European journal of cancer* 2003, **39**(17):2470-2486.
24. Peters WA, 3rd, Liu PY, Barrett RJ, 2nd, Stock RJ, Monk BJ, Berek JS, Souhami L, Grigsby P, Gordon W, Jr., Alberts DS: **Concurrent chemotherapy and pelvic radiation therapy compared with pelvic radiation therapy alone as adjuvant therapy after radical surgery in high-risk early-stage cancer of the cervix.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2000, **18**(8):1606-1613.
25. Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, Castedo M, Kroemer G: **Molecular mechanisms of cisplatin resistance.** *Oncogene* 2012, **31**(15):1869-1883.
26. Friedlander M, Grogan M, Force USPST: **Guidelines for the treatment of recurrent and metastatic cervical cancer.** *The oncologist* 2002, **7**(4):342-347.
27. Pectasides D, Kamposioras K, Papaxoinis G, Pectasides E: **Chemotherapy for recurrent cervical cancer.** *Cancer treatment reviews* 2008, **34**(7):603-613.
28. Benedet JL, Odicino F, Maisonneuve P, Beller U, Creasman WT, Heintz AP, Ngan HY, Pecorelli S: **Carcinoma of the cervix uteri.** *International journal*

*of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics* 2003, **83 Suppl 1**:41-78.

29. Duenas-Gonzalez A, Lizano M, Candelaria M, Cetina L, Arce C, Cervera E: **Epigenetics of cervical cancer. An overview and therapeutic perspectives.** *Molecular cancer* 2005, **4**:38.
30. Saxena A, Yashar C, Taylor DD, Gercel-Taylor C: **Cellular response to chemotherapy and radiation in cervical cancer.** *American journal of obstetrics and gynecology* 2005, **192**(5):1399-1403.
31. Lee SW, Kim YM, Kim MB, Kim DY, Kim JH, Nam JH, Kim YT: **Chemosensitivity of uterine cervical cancer demonstrated by the histoculture drug response assay.** *The Tohoku journal of experimental medicine* 2009, **219**(4):277-282.
32. Kinzler KW, Vogelstein B: **Lessons from hereditary colorectal cancer.** *Cell* 1996, **87**(2):159-170.
33. Toyota M, Suzuki H, Yamashita T, Hirata K, Imai K, Tokino T, Shinomura Y: **Cancer epigenomics: implications of DNA methylation in personalized cancer therapy.** *Cancer science* 2009, **100**(5):787-791.
34. Bosch TM: **Pharmacogenomics of drug-metabolizing enzymes and drug transporters in chemotherapy.** *Methods in molecular biology* 2008, **448**:63-76.
35. Meisel P: **Arylamine N-acetyltransferases and drug response.** *Pharmacogenomics* 2002, **3**(3):349-366.
36. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE: **Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters.** *Nature reviews Cancer* 2002, **2**(1):48-58.

37. Hembruff SL, Laberge ML, Villeneuve DJ, Guo B, Veitch Z, Cecchetto M, Parissenti AM: **Role of drug transporters and drug accumulation in the temporal acquisition of drug resistance.** *BMC cancer* 2008, **8**:318.
38. Chang X, Monitto CL, Demokan S, Kim MS, Chang SS, Zhong X, Califano JA, Sidransky D: **Identification of hypermethylated genes associated with cisplatin resistance in human cancers.** *Cancer research* 2010, **70**(7):2870-2879.
39. Sharma SV, Lee DY, Li B, Quinlan MP, Takahashi F, Maheswaran S, McDermott U, Azizian N, Zou L, Fischbach MA *et al*: **A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations.** *Cell* 2010, **141**(1):69-80.
40. Antequera F, Bird A: **CpG islands.** *Exs* 1993, **64**:169-185.
41. Singal R, Ginder GD: **DNA methylation.** *Blood* 1999, **93**(12):4059-4070.
42. Zhu J, Jiang J, Zhou W, Chen X: **The potential tumor suppressor p73 differentially regulates cellular p53 target genes.** *Cancer research* 1998, **58**(22):5061-5065.
43. Leid M, Kastner P, Chambon P: **Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways.** *Trends in biochemical sciences* 1992, **17**(10):427-433.
44. Love JM, Gudas LJ: **Vitamin A, differentiation and cancer.** *Current opinion in cell biology* 1994, **6**(6):825-831.
45. Oridate N, Lotan D, Xu XC, Hong WK, Lotan R: **Differential induction of apoptosis by all-trans-retinoic acid and N-(4-hydroxyphenyl)retinamide in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines.** *Clinical*

*cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 1996, **2**(5):855-863.

46. Ross SA, McCaffery PJ, Drager UC, De Luca LM: **Retinoids in embryonal development.** *Physiological reviews* 2000, **80**(3):1021-1054.
47. Wolbach SB, Howe PR: **Tissue Changes Following Deprivation of Fat-Soluble a Vitamin.** *The Journal of experimental medicine* 1925, **42**(6):753-777.
48. Sanl BP, Corbett TH: **Retinoic acid-binding protein in normal tissues and experimental tumors.** *Cancer research* 1977, **37**(1):209-213.
49. McCrory DC, Matchar DB, Bastian L, Datta S, Hasselblad V, Hickey J, Myers E, Nanda K: **Evaluation of cervical cytology.** *Evidence report/technology assessment* 1999(5):1-6.
50. Kwong J, Lo KW, Chow LS, To KF, Choy KW, Chan FL, Mok SC, Huang DP: **Epigenetic silencing of cellular retinol-binding proteins in nasopharyngeal carcinoma.** *Neoplasia* 2005, **7**(1):67-74.
51. Jeronimo C, Henrique R, Oliveira J, Lobo F, Pais I, Teixeira MR, Lopes C: **Aberrant cellular retinol binding protein 1 (CRBP1) gene expression and promoter methylation in prostate cancer.** *Journal of clinical pathology* 2004, **57**(8):872-876.
52. Vogel S, Mendelsohn CL, Mertz JR, Piantedosi R, Waldburger C, Gottesman ME, Blaner WS: **Characterization of a new member of the fatty acid-binding protein family that binds all-trans-retinol.** *The Journal of biological chemistry* 2001, **276**(2):1353-1360.

53. Kuppumbatti YS, Rexer B, Nakajo S, Nakaya K, Mira-y-Lopez R: **CRBP suppresses breast cancer cell survival and anchorage-independent growth.** *Oncogene* 2001, **20**(50):7413-7419.
54. Ghyselinck NB, Bavik C, Sapin V, Mark M, Bonnier D, Hindelang C, Dierich A, Nilsson CB, Hakansson H, Sauvart P *et al*: **Cellular retinol-binding protein I is essential for vitamin A homeostasis.** *The EMBO journal* 1999, **18**(18):4903-4914.
55. Napoli JL: **Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism.** *Biochimica et biophysica acta* 1999, **1440**(2-3):139-162.
56. Lotan R: **A crucial role for cellular retinol-binding protein I in retinoid signaling.** *Journal of the National Cancer Institute* 2005, **97**(1):3-4.
57. Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D: **Comparative genomic hybridization: a rapid new method for detecting and mapping DNA amplification in tumors.** *Seminars in cancer biology* 1993, **4**(1):41-46.
58. Farias EF, Ong DE, Ghyselinck NB, Nakajo S, Kuppumbatti YS, Mira y Lopez R: **Cellular retinol-binding protein I, a regulator of breast epithelial retinoic acid receptor activity, cell differentiation, and tumorigenicity.** *Journal of the National Cancer Institute* 2005, **97**(1):21-29.
59. Teodoridis JM, Hall J, Marsh S, Kannall HD, Smyth C, Curto J, Siddiqui N, Gabra H, McLeod HL, Strathdee G *et al*: **CpG island methylation of DNA damage response genes in advanced ovarian cancer.** *Cancer research* 2005, **65**(19):8961-8967.



60. Blomhoff R, Green MH, Berg T, Norum KR: **Transport and storage of vitamin A.** *Science* 1990, **250**(4979):399-404.
61. Fisher GJ, Reddy AP, Datta SC, Kang S, Yi JY, Chambon P, Voorhees JJ: **All-trans retinoic acid induces cellular retinol-binding protein in human skin in vivo.** *The Journal of investigative dermatology* 1995, **105**(1):80-86.
62. Imanishi Y, Gerke V, Palczewski K: **Retinosomes: new insights into intracellular managing of hydrophobic substances in lipid bodies.** *The Journal of cell biology* 2004, **166**(4):447-453.
63. Cowan SW, Newcomer ME, Jones TA: **Crystallographic studies on a family of cellular lipophilic transport proteins. Refinement of P2 myelin protein and the structure determination and refinement of cellular retinol-binding protein in complex with all-trans-retinol.** *Journal of molecular biology* 1993, **230**(4):1225-1246.
64. Winter NS, Bratt JM, Banaszak LJ: **Crystal structures of holo and apo-cellular retinol-binding protein II.** *Journal of molecular biology* 1993, **230**(4):1247-1259.
65. Napoli JL: **A gene knockout corroborates the integral function of cellular retinol-binding protein in retinoid metabolism.** *Nutrition reviews* 2000, **58**(8):230-236.
66. Kuppumbatti YS, Bleiweiss IJ, Mandeli JP, Waxman S, Mira YLR: **Cellular retinol-binding protein expression and breast cancer.** *Journal of the National Cancer Institute* 2000, **92**(6):475-480.
67. Cvetkovic D, Williams SJ, Hamilton TC: **Loss of cellular retinol-binding protein 1 gene expression in microdissected human ovarian cancer.**

*Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2003, **9**(3):1013-1020.

68. Orlandi A, Ferlosio A, Ciucci A, Francesconi A, Lifschitz-Mercer B, Gabbiani G, Spagnoli LG, Czernobilsky B: **Cellular retinol binding protein-1 expression in endometrial hyperplasia and carcinoma: diagnostic and possible therapeutic implications.** *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2006, **19**(6):797-803.
69. Piccart MJ, Lamb H, Vermorken JB: **Current and future potential roles of the platinum drugs in the treatment of ovarian cancer.** *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2001, **12**(9):1195-1203.
70. Socinski MA, Langer CJ: **Single-agent paclitaxel and paclitaxel/non-platinum combination therapy in advanced non-small cell lung cancer.** *Seminars in oncology* 1999, **26**(5 Suppl 16):51-61; discussion 71-52.
71. Lokich J, Anderson N: **Carboplatin versus cisplatin in solid tumors: an analysis of the literature.** *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 1998, **9**(1):13-21.
72. Menard S, Campiglio M, Balsari A: **Prediction of response to therapy by biomolecular markers: from the research laboratory to the clinic.** *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2003, **14**(2):178-179.
73. Doldo E, Costanza G, Ferlosio A, Passeri D, Bernardini S, Scioli MG, Mazzaglia D, Agostinelli S, Del Bufalo D, Czernobilsky B *et al*: **CRBP-1 expression in ovarian cancer: a potential therapeutic target.** *Anticancer research* 2014, **34**(7):3303-3312.

74. Esteller M, Guo M, Moreno V, Peinado MA, Capella G, Galm O, Baylin SB, Herman JG: **Hypermethylation-associated Inactivation of the Cellular Retinol-Binding-Protein 1 Gene in Human Cancer.** *Cancer research* 2002, **62**(20):5902-5905.
75. Peralta R, Valdivia A, Alvarado-Cabrero I, Gallegos F, Apresa T, Hernandez D, Mendoza M, Romero P, Paniagua L, Ibanez M *et al*: **Correlation between expression of cellular retinol-binding protein 1 and its methylation status in larynx cancer.** *Journal of clinical pathology* 2012, **65**(1):46-50.
76. Kitahara O, Katagiri T, Tsunoda T, Harima Y, Nakamura Y: **Classification of sensitivity or resistance of cervical cancers to ionizing radiation according to expression profiles of 62 genes selected by cDNA microarray analysis.** *Neoplasia* 2002, **4**(4):295-303.
77. Hidalgo A, Baudis M, Petersen I, Arreola H, Pina P, Vazquez-Ortiz G, Hernandez D, Gonzalez J, Lazos M, Lopez R *et al*: **Microarray comparative genomic hybridization detection of chromosomal imbalances in uterine cervix carcinoma.** *BMC cancer* 2005, **5**:77.
78. Mendoza-Rodriguez M, Arreola H, Valdivia A, Peralta R, Serna H, Villegas V, Romero P, Alvarado-Hernandez B, Paniagua L, Marrero-Rodriguez D *et al*: **Cellular retinol binding protein 1 could be a tumor suppressor gene in cervical cancer.** *International journal of clinical and experimental pathology* 2013, **6**(9):1817-1825.
79. Funaoka K, Shindoh M, Yamashita T, Fujinaga K, Amemiya A, Totsuka Y: **High-risk HPV-positive human cancer cell lines show different sensitivity to cisplatin-induced apoptosis correlated with the p21Waf1/Cip1 level.** *Cancer letters* 1996, **108**(1):15-23.

80. Venkatraman M, Anto RJ, Nair A, Varghese M, Karunagaran D: **Biological and chemical inhibitors of NF-kappaB sensitize SiHa cells to cisplatin-induced apoptosis.** *Molecular carcinogenesis* 2005, **44**(1):51-59.
81. Jurado R, Lopez-Flores A, Alvarez A, Garcia-Lopez P: **Cisplatin cytotoxicity is increased by mifepristone in cervical carcinoma: an in vitro and in vivo study.** *Oncology reports* 2009, **22**(5):1237-1245.
82. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods* 2001, **25**(4):402-408.
83. Caponigro F, Milano A, Basile M, Ionna F, Iaffaioli RV: **Recent advances in head and neck cancer therapy: the role of new cytotoxic and molecular-targeted agents.** *Current opinion in oncology* 2006, **18**(3):247-252.
84. Byrski T, Dent R, Blecharz P, Foszczynska-Kloda M, Gronwald J, Huzarski T, Cybulski C, Marczyk E, Chrzan R, Eisen A *et al*: **Results of a phase II open-label, non-randomized trial of cisplatin chemotherapy in patients with BRCA1-positive metastatic breast cancer.** *Breast cancer research : BCR* 2012, **14**(4):R110.
85. Eifel PJ: **Concurrent chemotherapy and radiation: a major advance for women with cervical cancer.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 1999, **17**(5):1334-1335.
86. Sledge GW, Jr., Loehrer PJ, Sr., Roth BJ, Einhorn LH: **Cisplatin as first-line therapy for metastatic breast cancer.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 1988, **6**(12):1811-1814.

87. Florea AM, Busselberg D: **Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects.** *Cancers* 2011, **3**(1):1351-1371.
88. Silver DP, Richardson AL, Eklund AC, Wang ZC, Szallasi Z, Li Q, Juul N, Leong CO, Calogrias D, Buraimoh A *et al*: **Efficacy of neoadjuvant Cisplatin in triple-negative breast cancer.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2010, **28**(7):1145-1153.
89. Deng WG, Wu G, Ueda K, Xu K, Roth JA, Ji L: **Enhancement of antitumor activity of cisplatin in human lung cancer cells by tumor suppressor FUS1.** *Cancer gene therapy* 2008, **15**(1):29-39.
90. Wu H, Cao Y, Weng D, Xing H, Song X, Zhou J, Xu G, Lu Y, Wang S, Ma D: **Effect of tumor suppressor gene PTEN on the resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines and related mechanisms.** *Cancer letters* 2008, **271**(2):260-271.
91. Farrand L, Kim JY, Byun S, Im-aram A, Lee J, Suh JY, Lee KW, Lee HJ, Tsang BK: **The diarylheptanoid hirsutenone sensitizes chemoresistant ovarian cancer cells to cisplatin via modulation of apoptosis-inducing factor and X-linked inhibitor of apoptosis.** *The Journal of biological chemistry* 2014, **289**(3):1723-1731.
92. Fraser M, Leung B, Jahani-Asl A, Yan X, Thompson WE, Tsang BK: **Chemoresistance in human ovarian cancer: the role of apoptotic regulators.** *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* 2003, **1**:66.
93. Chang L, Karin M: **Mammalian MAP kinase signalling cascades.** *Nature* 2001, **410**(6824):37-40.

94. Johnson GL, Lapadat R: **Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases.** *Science* 2002, **298**(5600):1911-1912.
95. Marshall CJ: **Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation.** *Cell* 1995, **80**(2):179-185.
96. Lu Z, Xu S: **ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis.** *IUBMB life* 2006, **58**(11):621-631.
97. Basu A, Krishnamurthy S: **Cellular responses to Cisplatin-induced DNA damage.** *Journal of nucleic acids* 2010, **2010**.
98. Wei SQ, Sui LH, Zheng JH, Zhang GM, Kao YL: **Role of ERK1/2 kinase in cisplatin-induced apoptosis in human ovarian carcinoma cells.** *Chinese medical sciences journal = Chung-kuo i hsueh k'o hsueh tsa chih / Chinese Academy of Medical Sciences* 2004, **19**(2):125-129.
99. Wang J, Zhou JY, Wu GS: **ERK-dependent MKP-1-mediated cisplatin resistance in human ovarian cancer cells.** *Cancer research* 2007, **67**(24):11933-11941.
100. Domina AM, Vrana JA, Gregory MA, Hann SR, Craig RW: **MCL1 is phosphorylated in the PEST region and stabilized upon ERK activation in viable cells, and at additional sites with cytotoxic okadaic acid or taxol.** *Oncogene* 2004, **23**(31):5301-5315.
101. Ha T, Li Y, Gao X, McMullen JR, Shioi T, Izumo S, Kelley JL, Zhao A, Haddad GE, Williams DL *et al*: **Attenuation of cardiac hypertrophy by inhibiting both mTOR and NFkappaB activation in vivo.** *Free radical biology & medicine* 2005, **39**(12):1570-1580.

102. Bolster DR, Kubica N, Crozier SJ, Williamson DL, Farrell PA, Kimball SR, Jefferson LS: **Immediate response of mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated signalling following acute resistance exercise in rat skeletal muscle.** *The Journal of physiology* 2003, **553**(Pt 1):213-220.
103. Kenessey A, Ojamaa K: **Thyroid hormone stimulates protein synthesis in the cardiomyocyte by activating the Akt-mTOR and p70S6K pathways.** *The Journal of biological chemistry* 2006, **281**(30):20666-20672.
104. Chiang GG, Abraham RT: **Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at Ser-2448 is mediated by p70S6 kinase.** *The Journal of biological chemistry* 2005, **280**(27):25485-25490.
105. Varma S, Khandelwal RL: **Effects of rapamycin on cell proliferation and phosphorylation of mTOR and p70(S6K) in HepG2 and HepG2 cells overexpressing constitutively active Akt/PKB.** *Biochimica et biophysica acta* 2007, **1770**(1):71-78.
106. Faivre S, Kroemer G, Raymond E: **Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents.** *Nature reviews Drug discovery* 2006, **5**(8):671-688.
107. Ji J, Zheng PS: **Activation of mTOR signaling pathway contributes to survival of cervical cancer cells.** *Gynecologic oncology* 2010, **117**(1):103-108.
108. Shaywitz AJ, Greenberg ME: **CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals.** *Annual review of biochemistry* 1999, **68**:821-861.
109. Friedl F, Kimura I, Osato T, Ito Y: **Studies on a new human cell line (SiHa) derived from carcinoma of uterus. I. Its establishment and**

- morphology.** *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine* 1970, **135**(2):543-545.
110. Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M: **A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma.** *Journal of the National Cancer Institute* 1973, **51**(5):1409-1416.
111. Scheffner M: **Ubiquitin, E6-AP, and their role in p53 inactivation.** *Pharmacology & therapeutics* 1998, **78**(3):129-139.
112. Li J, Orr B, White K, Belogortseva N, Niles R, Boskovic G, Nguyen H, Dykes A, Park M: **Chmp 1A is a mediator of the anti-proliferative effects of all-trans retinoic acid in human pancreatic cancer cells.** *Molecular cancer* 2009, **8**:7.
113. Mandic A, Hansson J, Linder S, Shoshan MC: **Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling.** *The Journal of biological chemistry* 2003, **278**(11):9100-9106.
114. Shan YX, Liu TJ, Su HF, Samsamshariat A, Mestril R, Wang PH: **Hsp10 and Hsp60 modulate Bcl-2 family and mitochondria apoptosis signaling induced by doxorubicin in cardiac muscle cells.** *Journal of molecular and cellular cardiology* 2003, **35**(9):1135-1143.
115. Chambon P: **A decade of molecular biology of retinoic acid receptors.** *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1996, **10**(9):940-954.
116. Frigo DE, Tang Y, Beckman BS, Scandurro AB, Alam J, Burow ME, McLachlan JA: **Mechanism of AP-1-mediated gene expression by select**



organochlorines through the p38 MAPK pathway. *Carcinogenesis* 2004, 25(2):249-261.

## 15. ANEXO:

Tabla S1: Secuencia de primers utilizados para PCR en tiempo real

Gene	Secuencia	pb
CRBP1	F: 5'-AGGCATAGATGACCGCAAGT-3'	73
	R: 5'-ACCCTTCTGCACACACTGG-3'	
RBX1	F: 5'-GCATGGGGAGTCTGTAACCA-3'	75
	R: 5'-TGGACACACCTGTCGTGTTT-3'	
RUVBL1	F: 5'- TCCTGGAAGTGGCAAGACA-3'	72
	R: 5'- GGGCAGAAGGGGACCTTAC -3'	
CTBP2	F: 5'-CTCAATGGTGCCACATACAGA-3'	111
	R: 5'-GTTGTGAGTCACTGGGATGC-3'	
PPP2R5C	F: 5'-TGTCTCCAGCCCACACTTC-3'	95
	R: 5'-TCTTCGCTGCGTTGTCACT-3'	
PLCB3	F: 5'- TTCGACTTCCCCAAGGTG-3'	64
	R: 5'- CCTCCTCAAAGGCTGCAAT -3'	
AKT1	F: 5'-AGCCCACAGAGACAGAGACC-3'	78
	R: 5'-CGTCCTCATCCATCACAAAG-3'	

## **Artículos publicados:**

### **Primer Autor:**

- CELLULAR RETINOL BINDING PROTEIN 1 COULD BE A TUMOR SUPPRESSOR GENE IN CERVICAL CANCER. ISSN:1936-2625/IJCEP1307014.

### **Coautor:**

- THYMOPOIETIN BETA AND GAMMA ISOFORMS AS A POTENTIAL DIAGNOSTIC MOLECULAR MARKER FOR BREAST CANCER: PRELIMINARY DATA. ISSN: 1532-2807

- HUMAN PAPILLOMAVIRUS GENOTYPES AMONG FEMALES IN MEXICO: A STUDY FROM THE MEXICAN INSTITUTE FOR SOCIAL SECURITY. ISSN: 10061-10066.

- KRÜPPEL-LIKE FACTOR 5 AS POTENTIAL MOLECULAR MARKER IN CERVICAL CANCER AND THE KLF FAMILY PROFILE EXPRESSION.ISSN: 1423-0380

- CORRELATION BETWEEN EXPRESSION OF CELLULAR RETINOL-BINDING PROTEIN 1 AND ITS METHYLATION STATUS IN LARYNX CANCER. ISSN: 0021-9746

- PREVALENCE OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS IN THE CERVICAL EPITHELIUM OF MEXICAN WOMEN: META-ANALYSIS. ISSN:1750-9378

- THE NEUROFIBROMIN 1 TYPE I ISOFORM PREDOMINANCE CHARACTERISES FEMALE POPULATION AFFECTED BY SPORADIC BREAST CANCER: PRELIMINARY DATA. ISSN: 0021-9746

- LOW FREQUENCY OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS INFECTION IN CONJUNCTIVAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF MEXICAN PATIENTS. ISSN:1750-9378

-THE NANOTECHNOLOGY AS A SUPPORT FOR DIAGNOSIS AND PROGNOSIS IN CANCER RESEARCH. ISSN:0443-5117