



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO  
NACIONAL

**UNIDAD ZACATENCO**

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**“Evaluación de la expresión de los genes *MRP2* y  
*CYP2C19* en células tumorales de cérvix uterino”**

**T E S I S**

Que presenta

BIOL. KORINA ODET CORTÉS URIBE

Para obtener el grado de

**MAESTRA 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**

***Es injusto que una generación sea  
comprometida por la precedente.  
Hay que encontrar un modo de  
preservar a las venideras de la  
avaricia o inhabilidad de las  
presentes.***

***Napoleón I***

DURANTE LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO SE CONTÓ CON  
EL APOYO DE UNA BECA DE MAESTRÍA OTORGADA POR EL  
CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT),  
PERÍODO 2013-2015



## AGRADECIMIENTOS

En la realización de la presente tesis he recibido la ayuda de numerosas personas a las que debo agradecer. Realizarla no hubiese sido posible sin su apoyo constante.

En primer lugar he de agradecer a mis directores de tesis, el Dr. Marco Antonio Meraz Ríos y el Dr. Mauricio Salcedo Vargas por el apoyo y la confianza que han puesto en mí para la realización de este trabajo. Así mismo, a mis asesores, el Dr. Michael Schnoor y el Dr. Nicolas Villegas Sepúlveda por su guía.

Igualmente he de agradecer a todos los miembros del departamento de Biomedicina Molecular por su apoyo, especialmente a mis compañeros de laboratorio Gustavo, Rosalía, Laura, Berenice, Mónica, Carmen, Maricarmen, Perla, a nuestra auxiliar Pily y nuestro técnico Julio. A mis compañeros de generación, por siempre estar ahí, pero sobre todo a Lalo porque no sólo me diste ánimos y estuviste al pendiente de mí, también me apoyaste con reactivos y enseñanzas, sin ti parte de este trabajo no se hubiera podido realizar.

Así mismo, agradezco a mis compañeros del laboratorio de Oncológica Molecular de la UIME del Centro Médico Nacional Siglo XXI. Principalmente, a Keiko, Daniel y Víctor, por enseñarme tantas cosas y tener la paciencia y la disposición para hacerlo. De igual manera, a la Dra. Cindy Rodríguez Bandala por su apoyo en la parte estadística

Gran parte de este trabajo fue gracias a ustedes.

## DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico con todo mi amor y cariño.

A ti Dios que me diste la oportunidad de vivir, de regalarme una familia maravillosa y bendecirme en tantos sentidos.

A mis padres que me dieron la vida y han estado conmigo en todo momento. Gracias por todo papá y mamá por darme las bases para mi futuro y por creer en mí, aunque hemos pasado momentos difíciles, siempre han estado apoyándome y brindándome todo su amor; por todo esto les agradezco de todo corazón el que estén a mi lado. Los amo con todo mi corazón y este trabajo es para ustedes, solamente les estoy devolviendo un poco de lo que ustedes me han dado, y les demuestro que ha valido la pena todo su esfuerzo.

A mis hermanos por estar conmigo y apoyarme; a mis sobrinos, por ser mi inspiración, mi motivación y mi razón; porque solo quiero ser un buen ejemplo para ustedes y mostrarles que el trabajo y algunos cuantos sacrificios, valen mucho la pena.

A Alejandra, por todo el apoyo que me has dado durante estos dos años para continuar y seguir con mi camino, gracias por estar conmigo en todo momento.

A mi familia, por siempre animarme a ser mejor persona, en especial a mis tíos Marina y Roberto, por apoyarme y creer en mí.

## ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIA .....	ii
INDICE GENERAL .....	iii
INDICE DE FIGURAS.....	vi
INDICE DE TABLAS.....	vii
INDICE DE GRAFICAS.....	viii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT .....	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Cáncer Cervicouterino .....	1
1.2 Transformación Epitelial .....	2
1.3 Tratamiento .....	4
1.4 Farmacogenética.....	5
1.5 Biomarcadores Predictivos .....	6
1.5.1 Familia de transportadores ABC .....	6
1.5.1.1 Proteína Asociada a Resistencia a Multidrogas 2 (MRP2).....	8
1.5.2 Familia de Citocromo P450 .....	9
1.5.2.1 Citocromo P450, Familia 2, Subfamilia C, Polipeptido 19	
(CYP2C19).....	11
2. ANTECEDENTES.....	13
2.1 Uso de Biomarcadores Predictivos.....	13
2.2 MRP2 en cáncer.....	14
2.3 CYP2C19 en cáncer.....	15
3. JUSTIFICACIÓN.....	16
4. HIPOTESIS:.....	17
5. OJETIVOS.....	17
5.1 OBJETIVO GENERAL:.....	17
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	17
6. DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO .....	18

7. METODOLOGÍA.....	18
7.1 Cultivo Celular.....	18
7.2 Subcultivo Celular.....	19
7.3 Extracción de RNA.....	19
7.4 Transcriptasa Reversa – PCR.....	20
7.5 Cuantificación Relativa por PCR- Tiempo Real.....	21
7.6 Determinación de la expresión de proteínas mediante la técnica de Western Blot.....	23
7.6.1 Extracción de proteínas.....	23
7.6.2 Electroforesis y transferencia de proteínas.....	24
7.6.3 Inmunodetección.....	24
7.7 Determinación de la expresión de proteínas mediante la técnica de Inmunohistoquímica.....	25
7.7.1 Muestras biológicas.....	25
7.7.2 Construcción del arreglo de tejidos.....	25
7.7.3 Detección de las proteínas MRP2 y CYP2C19 por inmunohistoquímica.....	26
7.8 Análisis Estadístico.....	27
8. RESULTADOS.....	28
8.1 Integridad del RNA y control de calidad del cDNA sintetizado.....	28
8.2 Cuantificación relativa de la expresión génica para los genes <i>MRP2</i> y <i>CYP2C19</i> en líneas celulares de cáncer cervicouterino.....	29
8.3 Determinación de la expresión de las proteínas MRP2 y CYP2C19 en líneas celulares comerciales de cáncer cervicouterino por ensayos de Western Blot.....	32
8.4 Descripción de los datos clínico-patológicos de las muestras de pacientes analizadas.....	35
8.5 Expresión de las proteínas MRP2 y CYP2C19 en tejido tumoral de cérvix.....	37
8.5.1 Expresión de la proteína MRP2 en tejido tumoral de cérvix.....	38
8.5.2 Expresión de la proteína CYP2C19 en tejido tumoral de cérvix.....	39

8.5.3 Asociación de la expresión de MRP2 y CYP2C19 con los datos clínico patológicos.....	43
9. DISCUSIÓN.....	45
10. CONCLUSIÓN.....	49
11. PERSPECTIVAS.....	51
11. REFERENCIAS LITERARIAS.....	52

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig1.</b> Incidencia y mortalidad de los principales tipos de cáncer en mujeres en México. ....	1
<b>Fig 2.</b> Morfología e histología del cérvix. ....	3
<b>Fig. 3.</b> Topología membranal propuesta para MRP2 y Estructura tridimensional de MRP2 generada in silico.....	8
<b>Fig. 4.</b> Diagrama del gen <i>CYP2C19</i> .....	11
<b>Fig. 5.</b> Estructura cristalina de <i>CYP2C19</i> . ....	12
<b>Fig. 6.</b> Ejemplo de algunos de los sustratos de MRP2. ....	14
<b>FIG. 7.</b> Diagrama general de trabajo .....	18
<b>Fig. 8.</b> Diagrama Experimental para PCR Tiempo Real .....	22
<b>Fig. 9.</b> Mapa del arreglo de Tejidos .....	26
<b>Fig. 10.</b> Extracción de RNA a partir de líneas celulares de CaCU y controles..	28
<b>Fig. 11.</b> PCR de Proteína Ribosomal S18 como control de calidad de cDNA sintetizado .....	28
<b>Fig. 12.</b> Expresión de MRP2 en las líneas celulares de CaCU y la línea celular control A549. ....	33
<b>Fig. 13.</b> Expresión de <i>CYP2C19</i> en las líneas celulares de CaCU y la línea celular control HepG2.....	34
<b>Fig 14.</b> Expresión de MRP2 en tejido normal y tumoral de cérvix. ....	38
<b>Fig 15.</b> Inmunohistoquímica de tejidos controles para expresión de MRP2.....	39
<b>Fig 16.</b> Expresión de <i>CYP2C19</i> en tejido normal y tumoral de cérvix. ....	40
<b>Fig 17.</b> Inmunohistoquímica de tejidos controles para expresión de <i>CYP2C19</i>	41

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Ejemplos de biomarcadores predictivos en distintos tipos de cáncer .....	13
<b>Tabla 2.</b> Ejemplo de líneas celulares de distintos tipos de cáncer resistentes a Cisplatino, que sobreexpresan MRP2.....	15
<b>Tabla 3.</b> Líneas celulares utilizadas en la realización de este trabajo y sus condiciones de cultivo. ....	19
<b>Tabla 4.</b> Frecuencia de los Intervalos de edad.....	35
<b>Tabla 5.</b> Descripción de los datos clínico-patológicos de las muestras analizadas.....	36
<b>Tabla 6.</b> Frecuencia de los factores gineco-obstétricos de las pacientes estudiadas.....	37
<b>Tabla 7.</b> Sensibilidad y Especificidad de la proteína MRP2 en relación al estadio clínico de las pacientes.....	41
<b>Tabla 8.</b> Sensibilidad y Especificidad de la proteína MRP2 en relación a la infección por VPH.....	42
<b>Tabla 9.</b> Sensibilidad y Especificidad de la proteína CYP2C19 en relación al estadio clínico de las pacientes. ....	42
<b>Tabla 10.</b> Sensibilidad y Especificidad de la proteína CYP2C19 en relación a la infección por VPH. ....	43
<b>Tabla 11.</b> Relación de MPR2 con variables de interés.....	44
<b>Tabla 12.</b> Asociación de CYP2C19 con los datos clínico patológicos.....	44

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

<b>Gráfica 1.</b> Perfil de Mortalidad por Cáncer en Mujeres Mexicanas (2010).....	2
<b>Gráfica 2.</b> Gráficas de amplificación.....	29
<b>Gráfica 3.</b> Cuantificación relativa de <i>MRP2</i> en las líneas celulares de CaCU y la línea celular control A549. ....	30
<b>Gráfica 4.</b> Cuantificación relativa de <i>MRP2</i> en las líneas celulares de CaCU y tejido de cérvix normal.....	31
<b>Gráfica 5.</b> Cuantificación relativa de <i>CYP2C19</i> en las líneas celulares de CaCU y la línea celular control A549.....	31
<b>Gráfica 6.</b> Cuantificación relativa de <i>CYP2C19</i> en las líneas celulares de CaCU y tejido de cérvix normal.....	32
<b>Gráfica 7.</b> Relación de la expresión <i>MRP2/GAPDH</i> en las líneas celulares de CaCU y la línea celular control A549. ....	33
<b>Gráfica 8.</b> Relación de la expresión <i>MRP2/GAPDH</i> en las líneas celulares de CaCU y la línea celular control A549. ....	34

## RESUMEN

El cáncer cervicouterino (CaCu) es una de las enfermedades más frecuentes en el mundo y el segundo tipo de cáncer con mayor mortalidad a nivel mundial, con una incidencia global estimada de 470,000 nuevos casos y más de 200,000 muertes al año.

Los métodos tradicionales para el tratamiento de cáncer cervicouterino consisten en una combinación de cirugía, radiación y drogas quimioterapéuticas citotóxicas. El objetivo principal del tratamiento quimioterapéutico es conseguir la muerte de la célula tumoral. Para ello es necesario lograr que la mayor cantidad de fármaco activo posible llegue a su diana molecular en el interior de la célula. Cualquier circunstancia que se interponga o dificulte este objetivo puede ser causa de resistencia.<sup>1</sup> Por ello es de suma importancia determinar los factores que influyen en la variabilidad intraespecífica observada en la respuesta a los fármacos quimioterapéuticos. El rol de los biomarcadores en el manejo del cáncer se está expandiendo rápidamente. Un biomarcador predictivo evalúa la probabilidad de que el tumor responda al fármaco lo cual permite diseñar un régimen de tratamiento con cierto nivel de personalización. Los genes *MRP2* y *CYP2C19* han sido propuestas como biomarcadores predictivos en distintos tipos de cáncer como de mama<sup>2</sup> y pancreático, por lo que también podrían ser utilizados en cancer cervicouterino como biomarcadores que permitan individualizar los tratamientos. Sin embargo, aún se desconoce si estos genes se expresan en tejido tumoral de cérvix. De esto surge el objetivo general de este trabajo, el cual es evaluar la expresión de los genes *MRP2* y *CYP2C19*, en líneas celulares y tejido de cáncer cervicouterino de cáncer cervicouterino.

La expresión de *MRP2* y *CYP2C19* fue estudiada en las líneas celulares de CaCu: C33A, SiHa, CaSKi y HeLa, mediante ensayo de qPCR y comprobada por ensayos de Western Blot. Nuestros resultados indican que estos genes se expresan en estas líneas celulares, así mismo se expresan a nivel protéico.

Basados en estos resultados, se comprobó la expresión de las proteínas MRP2 y CYP2C19 en tejido tumoral de cérvix, mediante la técnica de inmunohistoquímica. Se determinó que ambas proteínas se expresan en tejido tumoral de cérvix, ya que el 75% de las muestras las expresaron, estableciendo una relación entre la expresión y el cáncer cervicouterino.

## ABSTRACT

Cervical cancer ( CC ) is one of the most common diseases in the world and the second type of cancer with the highest mortality worldwide, with an estimated 470,000 new cases and 200,000 deaths per year overall incidence .

Traditional methods for treating cervical cancer involve a combination of surgery, radiation, and cytotoxic chemotherapeutic drugs. The main objective of chemotherapeutic treatment is to achieve the death of tumor cells. This requires getting the maximum amount of active drug reaches its molecular target inside the cell. Any circumstance that stands or hinder this goal can cause resistance. It is therefore important to determine the factors that influence intraspecific variability observed in the response to chemotherapeutic drugs. The role of biomarkers in cancer management is expanding rapidly. A predictive biomarker evaluates the probability that the tumor responds to the drug which allows designing a treatment regimen with some level of customization. The *MRP2* and *CYP2C19* genes have been proposed as predictive biomarkers in cancers such as breast and pancreatic cancer, which could also be used in cervical cancer as biomarkers to individualize treatments. However, it is still unknown whether these genes are expressed in cervical tumor tissue. Therefore, the general aim of this study is evaluate the expression of the *MRP2* and *CYP2C19* genes in cell lines and tissue of cervical cancer.

The expression of *MRP2* and *CYP2C19* was studied in cell lines of CC: C33A, SiHa, CaSki and HeLa by qPCR assay and confirmed by Western Blot tests. Our results indicate that these genes are expressed in these cell lines, also they expressed at the protein level. Based on these results, the expression of *MRP2* and *CYP2C19* proteins was found in cervical tumor tissue by immunohistochemical technique. It was determined that both proteins are expressed in cervical tumor tissue, since 75 % of the samples expressed them, establishing a relationship between the expression and cervical cancer.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Cáncer Cervicouterino

El cáncer cervicouterino (CaCu) es una de las enfermedades más frecuentes en el mundo y el segundo tipo de cáncer con mayor mortalidad a nivel mundial, con una incidencia global estimada de 470,000 nuevos casos y más de 200,000 muertes al año <sup>3</sup>.

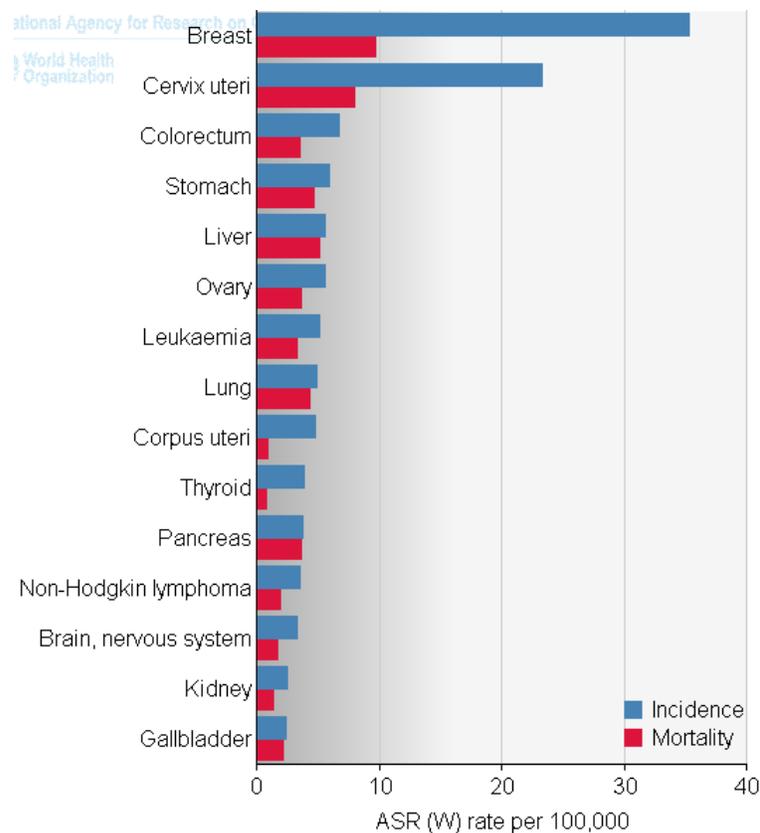
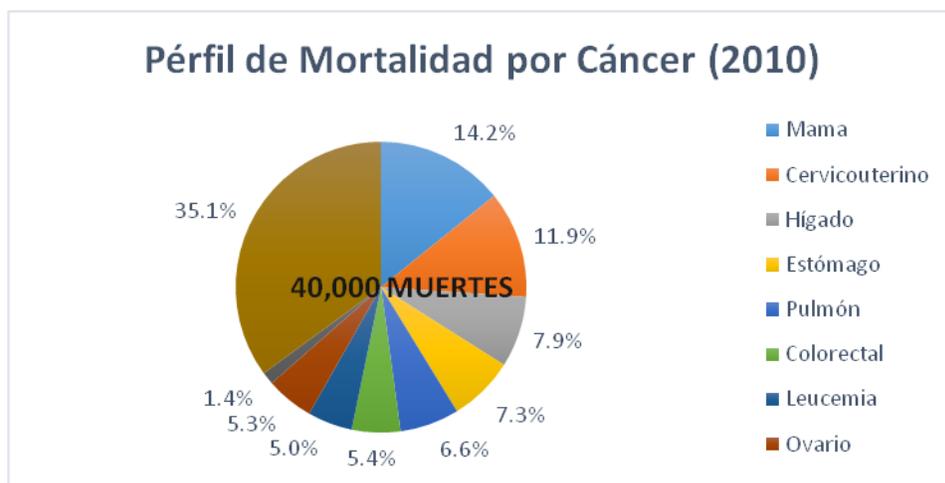


Fig1. Incidencia y mortalidad de los principales tipos de cáncer en mujeres en México<sup>4</sup>.

En México, esta enfermedad aparece dentro de las primeras diez causas de muerte en mujeres en los años cincuenta. Para los primeros años de la década de los ochenta, ocupó el quinto lugar y en los noventa el segundo <sup>5</sup>. En la actualidad, los tumores malignos se encuentran en tercer lugar de mortalidad y dentro de éstos, el cáncer cervicouterino es la segunda mayor causa de

mortalidad femenina <sup>6</sup>. Históricamente, el CaCU es uno de los cánceres más tratables, el Sistema Nacional de Salud Mexicano brinda atención médica aproximadamente a 9,000 casos de CaCu invasor al año; sin embargo, para el 2012 se diagnosticaron 13,960 nuevos casos y cada año mueren 4,700 mujeres por este padecimiento, 380 cada mes, 12 cada día y una cada dos horas <sup>4,7,8</sup>. A pesar de los programas de detección oportuna, la enfermedad se diagnostica en etapas avanzadas, la prevalencia es muy alta y la tasa de mortalidad corresponde a un tercio de los casos nuevos reportados anualmente<sup>9</sup>



Gráfica 1. Perfil de Mortalidad por Cáncer en Mujeres Mexicanas (2010) (Globocan, 2012.)

## 1.2. Transformación Epitelial

El cáncer cervicouterino (CaCU), es una alteración celular que se origina en el epitelio del cuello del útero; se manifiesta inicialmente a través de lesiones precursoras de lenta y progresiva evolución, que se pueden desarrollar en etapas intraepiteliales preinvasoras, evolucionando hasta cáncer invasor <sup>7</sup>. El cérvix normal se compone de diferentes tipos de células epiteliales: el canal cervical medio y el cérvix superior están compuestos por epitelio columnar secretor. La vagina y el ectocérvix distal están compuestos de epitelio escamoso. La unión escamo-columnar (UEC) es el punto donde las células escamosas y columnares se encuentran (Fig. 2). Esta unión se localiza típicamente entre el ectocérvix

central y el canal cervical inferior. La unión escamocolumnar original es una zona de transformación. La transformación normal de un tipo celular maduro en otro es llamada metaplasia. Cuando la metaplasia ocurre, existe siempre un potencial neoplásico. En las mujeres en edad reproductiva, la UEC se mueve hacia la parte externa del canal endocervical por influencia hormonal. El pH ácido vaginal provoca irritación mecánica que induce el proceso de metaplasia escamosa, resultando una nueva UEC. Esta área entre la original y la nueva UEC es referida como la zona de transición. Las células escamosas inmaduras metaplásicas en esta zona de transformación son teóricamente las más vulnerables a neoplasia. La mayoría de los carcinomas de células escamosas se originan en la UEC <sup>10</sup>.

La etiología de este tipo de cáncer es extremadamente compleja e involucra una gran variedad de factores endocrinos, genéticos y ambientales. Adicionalmente, es difícil establecer medidas preventivas, asegurar un diagnóstico oportuno y proveer un tratamiento acertado, todo esto dependiente de la mejoría en el desarrollo tecnológico y acceso a los servicios médicos de la población. En México, el incremento en la incidencia de CaCU se ha relacionado a la falta de un diagnóstico y tratamiento efectivo y oportuno <sup>11</sup>.

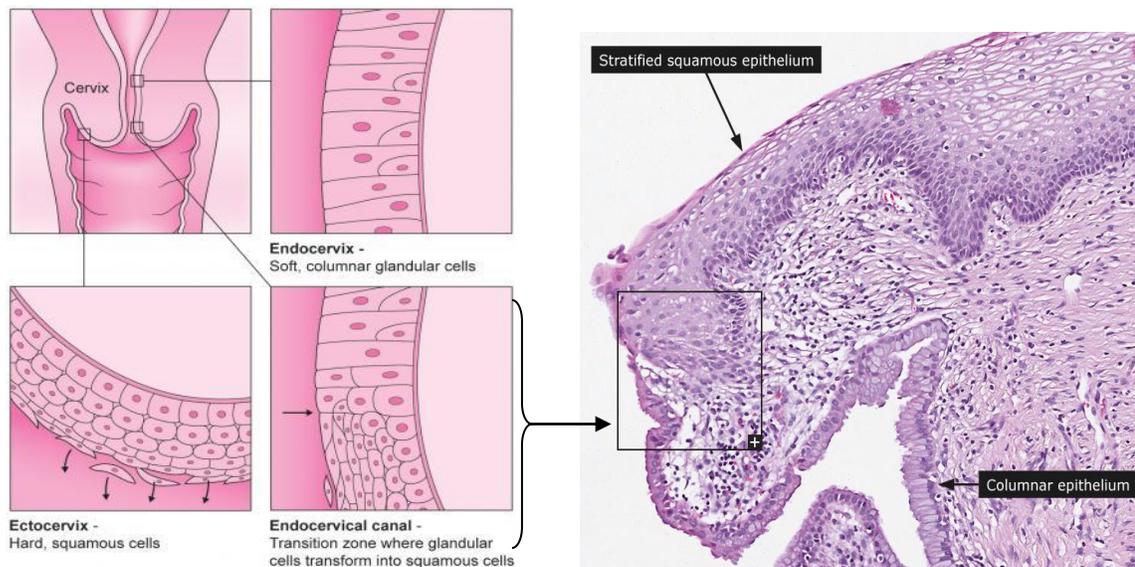


Fig 2. Morfología e histología del cérvix. Zona de transición Escamo-Columnar: Zona de unión entre el epitelio escamoso estratificado (Ectocervix) y el epitelio columnar (Endocervix). <sup>12 13</sup>

### 1.3. Tratamiento

Los métodos tradicionales para el tratamiento de cáncer cervicouterino consisten en una combinación de cirugía, radiación y drogas quimioterapéuticas citotóxicas. En estadios tempranos del cáncer, el tratamiento preferencial es la cirugía pues conserva la función de los ovarios<sup>14</sup>. La radioterapia, por otra parte es un tratamiento que utiliza rayos X de alta energía u otros tipos de radiación para destruir células cancerosas o impedir su crecimiento. Existen dos tipos de radioterapia: La radioterapia externa que utiliza una máquina fuera del cuerpo que emite rayos que se dirigen hacia el punto donde se ubica el cáncer; y la radioterapia interna que utiliza una sustancia radiactiva sellada en agujas, semillas, cables o catéteres que se colocan directamente en el órgano afectado o cerca del mismo. La elección del tipo de radioterapia depende del tipo y el estadio del cáncer que está siendo tratado <sup>15</sup>. El tratamiento con radiación es altamente efectivo, aunque tiene como contraindicación que puede dañar órganos y tejidos adyacentes, resultando en efectos secundarios dañinos para el paciente. La radioterapia, como se mencionó anteriormente, es administrada comúnmente en combinación con cirugía y/o quimioterapia <sup>14</sup>.

La quimioterapia es un tratamiento contra el cáncer ampliamente utilizado para el que se emplean medicamentos citotóxicos que interrumpen el crecimiento de células cancerosas mediante su destrucción o evitando su multiplicación <sup>15</sup>. Sin embargo, las drogas quimioterapéuticas presentan una toxicidad extremadamente alta para los tejidos no cancerosos, tienen una tasa de éxito del 30% y varían en gran medida entre pacientes. El 5-Fluorouracilo (5-FU) y el Cisplatino son las principales drogas quimioterapéuticas utilizadas en el tratamiento de cáncer cervicouterino <sup>9,16</sup>.

## 1.4. Farmacogenética

Como se mencionó anteriormente, las terapias farmacológicas son un componente muy importante para el tratamiento del cáncer. Estudios farmacológicos recientes han determinado que los perfiles metabólicos que se obtienen en respuesta a fármacos son individuales y que ningún medicamento es totalmente eficaz en todos los pacientes, sugiriendo que esto es un punto crítico, tanto en la dosificación como en la respuesta esperada en el individuo <sup>17</sup>.

Los efectos farmacológicos de la mayoría de los medicamentos habitualmente prescritos son la resultante de una serie de procesos farmacocinéticos (que determinarán la cantidad de medicamento que llega a la biofase) y farmacodinámicos vinculados a la efectividad de la interacción del fármaco con su receptor. La variabilidad de expresión y función de las distintas enzimas involucradas en estos procesos constituye el núcleo principal de estudio de la farmacogenética<sup>17</sup>. Como consecuencia de esta variabilidad, el margen de respuesta a un tratamiento farmacológico es diverso, provocando que algunos individuos presenten los efectos esperados, mientras que en otros no se obtenga el resultado terapéutico deseado e incluso experimenten efectos adversos <sup>18</sup>.

La falta de un tratamiento efectivo para todos los pacientes se debe a diversas limitantes que las terapias convencionales presentan, incluyendo accesibilidad incompleta del régimen terapéutico al tumor, limitación de la dosis por posible toxicidad sistémica; así como limitantes intrínsecas del paciente, como factores genéticos<sup>19</sup>. En el caso de los tratamientos antineoplásicos, la contribución genética a este fenómeno, puede deberse a dos factores: el genoma del paciente y la variabilidad del perfil genético del tumor.<sup>20</sup> Entre estos factores genéticos, el problema más difícil que enfrenta la quimioterapia es el desarrollo de resistencia por parte de las neoplasias avanzadas, que limita e impide su efecto terapéutico. El origen de esta resistencia a la quimioterapia es multifactorial y complejo. El objetivo principal del tratamiento quimioterapéutico es conseguir la

muerte de la célula tumoral. Para ello es necesario lograr que la mayor cantidad de fármaco activo posible llegue a su diana molecular en el interior de la célula. Cualquier circunstancia que se interponga o dificulte este objetivo puede ser causa de resistencia.<sup>1</sup> Por ello es de suma importancia determinar los factores que influyen en la variabilidad intraespecífica observada en la respuesta a los fármacos quimioterapéuticos

### **1.5. Biomarcadores Predictivos**

De acuerdo al Instituto Nacional de Cancer de Estados Unidos de América (NCI), un biomarcador es “una molécula biológica que se encuentra en la sangre, fluidos corporales o tejidos, la cual es un signo de procesos normales o anormales, o de una condición o enfermedad”, como el cáncer <sup>21</sup>.

Existen diferentes tipos de biomarcadores de cáncer: prognósticos, farmacodinámicos y predictivos. Un biomarcador prognóstico anticipa el posible curso de la enfermedad y podría, si es apropiado, prescribir si se requiere terapia.<sup>22</sup> Los biomarcadores farmacodinámicos miden el efecto de una droga en la enfermedad por ejemplo, los niveles de proliferación y apoptosis en el tumor debido a una droga. Por el contrario, un biomarcador predictivo evalúa la probabilidad de que el tumor responda al fármaco lo cual permite diseñar un régimen de tratamiento con cierto nivel de personalización. Hasta el momento existe un número limitado de biomarcadores predictivos que tienen utilidad clínica mientras que otros están ganando aceptación clínica como medida objetiva para predecir la respuesta a una droga <sup>22</sup>.

#### **1.5.1. Familia de transportadores ABC**

Con independencia de la cinética de crecimiento, ya sea por mutación espontánea o por exposición a los fármacos, la célula maligna desarrolla una serie

de mecanismos de defensa ante la quimioterapia que determinan la respuesta del tumor a ésta los cuales pueden dividirse en tres grupos:

- 1) Los que disminuyen la concentración del fármaco a nivel de su diana molecular, por la expulsión a través de la membrana celular, mediante transportadores;
- 2) Los que disminuyen la concentración del fármaco, por el metabolismo intracelular del fármaco.
- 3) Aquellos que una vez conseguido el efecto del fármaco sobre su diana, evitan la muerte celular mediante la reparación del DNA.

El primer mecanismo, dado por la expulsión a través de la membrana celular, se ha correlacionado a la presencia de las llamadas bombas moleculares que se encuentran localizadas en la membrana plasmática y sacan activamente los fármacos quimioterapéuticos del interior de la célula blanco. Esto permite a las células tumorales evitar los efectos tóxicos de las drogas o evitar los procesos moleculares de las drogas dentro del núcleo o del citoplasma <sup>23</sup>. Este fenómeno de resistencia a diferentes clases de drogas anticancerígenas por parte de las células tumorales se llama (MDR). Uno de los mecanismos más importantes que provoca la MDR es la sobreexpresión de Transportadores ABC (ATP-Binding Cassete; por sus siglas en inglés), los cuales expulsan de la célula un gran espectro de drogas, entre ellas cisplatino, en contra de un gradiente de concentración utilizando la energía generada por la hidrólisis del ATP.

La familia de los transportadores ABC está compuesta por 49 glicoproteínas transmembranales, que están subdivididas en 7 subfamilias, ABC-A a -G, basado en las similitudes de secuencia <sup>24</sup>. La subfamilia C (ABCC), también llamada Proteínas Asociadas a Resistencia a Multidrogas (MRP, por sus siglas en inglés) es una familia de 9 transportadores celulares<sup>25</sup>. Las MRPs se localizan en la membrana plasmática, pero también en el retículo endoplasmático, de lo que se infiere que puedan actuar tanto en la expulsión de drogas fuera de la célula como

en el secuestro intracelular de estas en vesículas citoplasmáticas<sup>1</sup>. Las MRP son capaces de transportar aniones orgánicos y drogas neutras, conjugadas o no, con sustancias como el glutatión, glucuronatos y sulfatos.

### 1.5.1.1. Proteína Asociada a Resistencia a Multidrogas 2 (MRP2)

La Proteína Asociada a Resistencia a Multidrogas 2 (MRP2; también llamada ABCC2 o cMOAT) es codificada por el gen MRP2 ubicado en el cromosoma 10, en la región 10q24.2, con un tamaño de 69,499 bases. La proteína es de 1545 aminoácidos con un peso molecular de 174.2 KDa. MRP2 es expresada normalmente en la membrana canicular de los hepatocitos, en donde funciona como el mayor exportador de aniones orgánicos desde el hígado hasta la bilis. MRP2 también se expresa en el riñón, vesícula biliar, intestino delgado, colon y pulmón <sup>26</sup>.

La topología membranar propuesta para MRP2 contiene 17 hélices transmembranales (TM), las cuales forman tres dominios membranales (MSD1, -2, y -3) conectadas por regiones de unión poco conservadas (L0 y L1) y dominios de unión para nucleótidos altamente conservados (NBD1 y NBD2). La región amino terminal se encuentra localizado extracelularmente (Fig. 3).<sup>25</sup>

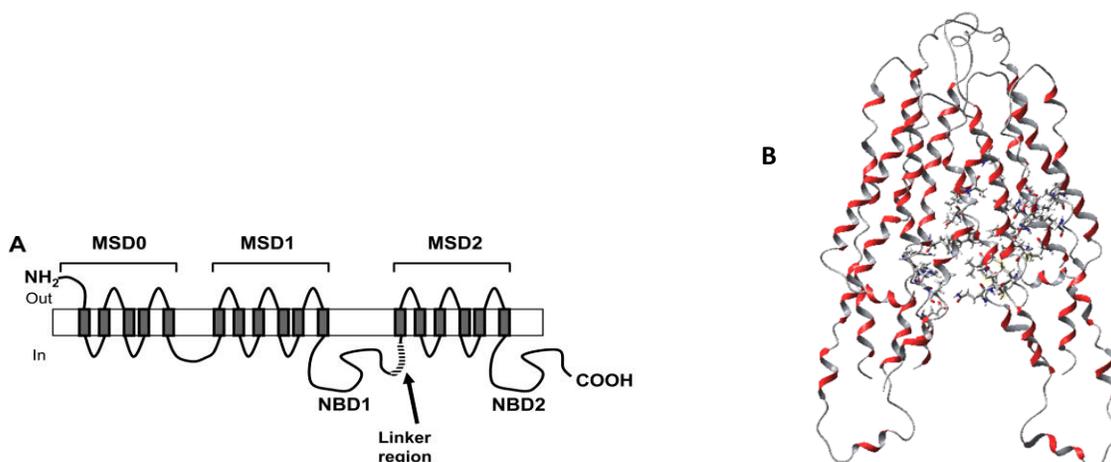


Fig. 3. A) Topología membranar propuesta para MRP2. B) Estructura tridimensional de MRP2 generada in silico.

### 1.5.2. Familia de Citocromo P450

Cuando los fármacos penetran en el organismo, la mayoría de ellos son transformados parcial o totalmente en otras sustancias por reacciones de metabolización o biotransformación <sup>27</sup>. Las reacciones involucradas en el proceso de biotransformación son múltiples y diversas, y en general puede considerarse que tienen lugar en dos fases:

1) Las reacciones de fase I o de funcionalización consisten en reacciones de *oxidación* y *reducción*, que alteran o crean nuevos grupos funcionales, así como reacciones de *hidrólisis*, que rompen enlaces ésteres y amidas liberando también nuevos grupos funcionales. Estos cambios producen en general un aumento en la polaridad de la molécula y determinan algunos o varios de estos resultados: *a)* inactivación; *b)* conversión de un producto inactivo en otro activo, en cuyo caso el producto original se denomina profármaco; *c)* conversión de un producto activo en otro también activo, cuya actividad aprovechable con fines terapéuticos puede ser cualitativamente similar o distinta de la del fármaco original, y *d)* conversión de un producto activo en otro activo, pero cuya actividad resulta tóxica <sup>28,29</sup>.

2) Las reacciones de fase II son reacciones de *conjugación*, en las cuales el fármaco o el metabolito procedente de la fase I se acopla a un sustrato endógeno, como el ácido glucurónico, el ácido acético o el ácido sulfúrico, aumentando así el tamaño de la molécula, con lo cual casi siempre se inactiva el fármaco y se facilita su excreción; pero en ocasiones la conjugación puede activar el fármaco (p. ej., formación de nucleósidos y nucleótidos)<sup>27,30</sup>.

En la fase I, por lo tanto, se introducen grupos –OH, –NH<sub>2</sub> –COOH, que permiten después las reacciones de conjugación, de las que resultan ácidos y bases orgánicos fuertes. En definitiva, los productos resultantes tienden a ser

compuestos polares, hidrosolubles y, por lo tanto, más fácilmente expulsables por la orina y por la bilis.

La superfamilia de Citocromo P450 (CYP) participa en la fase I del proceso de biotransformación. Estas enzimas son hemoproteínas oxigenasas, que se encuentran adosadas a la estructura membranosa del retículo. Utilizan una molécula de O<sub>2</sub>, pero sólo emplean un átomo para la oxidación del sustrato (por ello se denominan mono oxigenasas), mientras que el otro es reducido para formar agua (por ello se designan *oxidasas mixtas*), mediante la presencia de un donante externo de electrones <sup>28</sup>. Muchas drogas citotóxicas son inactivadas por la acción de esta familia de proteínas, mientras que varios profármacos son activados por su acción, haciéndolos citotóxicos y efectivos en la quimioterapia para cáncer. Es por este papel importante que tienen los CYPs en la bioactivación e inactivación de carcinógenos y su participación en la activación e inactivación de drogas anticancerígenas, que tienen un rol importante tanto en la etiología del cáncer como en la respuesta a la terapia <sup>31</sup>.

La superfamilia de enzimas del citocromo P450 (CYP) está compuesta por 57 genes funcionales y 58 pseudogenes, los cuales están divididos en 18 familias <sup>32</sup>. Se ha establecido un Sistema Estandarizado de Nomenclatura para nombrar a los genes y asignarlos a una familia y subfamilia. El Sistema se basa en el nivel de identidad de la secuencia de aminoácidos, la asociación filogenética y la organización génica determinada por el Comité de Nomenclatura de P450 <sup>33</sup>. Para fines prácticos, se denominan por un símbolo raíz (CYP), seguido de un número arábigo para la familia, una letra para la subfamilia y otro número árabe para el gen específico <sup>34</sup>. En una misma familia se agrupan aquellos enzimas cuya secuencia de aminoácidos tiene una similitud mayor del 40%, independientemente de la especie de procedencia. Dentro de una familia los P-450s se agrupan en diferentes subfamilias que, siempre que haya más de una, se denominan correlativamente empezando siempre por la letra A (p. e. *CYP2A*, *CYP2B*, *CYP2C*, etc). En este caso, el requisito para que dos P-450 pertenezcan a la misma subfamilia es que tengan una homología en la secuencia de aminoácidos

superior al 55%. Por último, dentro de la misma subfamilia, los enzimas individuales se designan según números empezando siempre por el 1 (p. e. *CYP1A1*, *CYP1A2*), teniendo en cuenta que dos P-450 se consideran como diferentes cuando sus respectivas secuencias difieran en más de un 3% <sup>28</sup>.

### 1.5.2.1. Citocromo P450, Familia 2, Subfamilia C, Polipeptido 19 (*CYP2C19*)

Dentro de los 57 genes funcionales de la superfamilia de CYP se encuentra el Citocromo P450, Familia 2, Subfamilia C, Polipeptido 19 (*CYP2C19*), el cual se localiza en un agrupamiento de genes CYPs (Centromero-CYP2C18-CYP2C19-CYP2C9-CYP2C8-Telomero) <sup>35</sup>. *CYP2C19* es una enzima de 490 aminoácidos codificada por un gen de 90.6 kilobase (kb), el cual se localiza en el brazo largo del cromosoma 10 (10q24.1–q24.3) (Fig. 4).

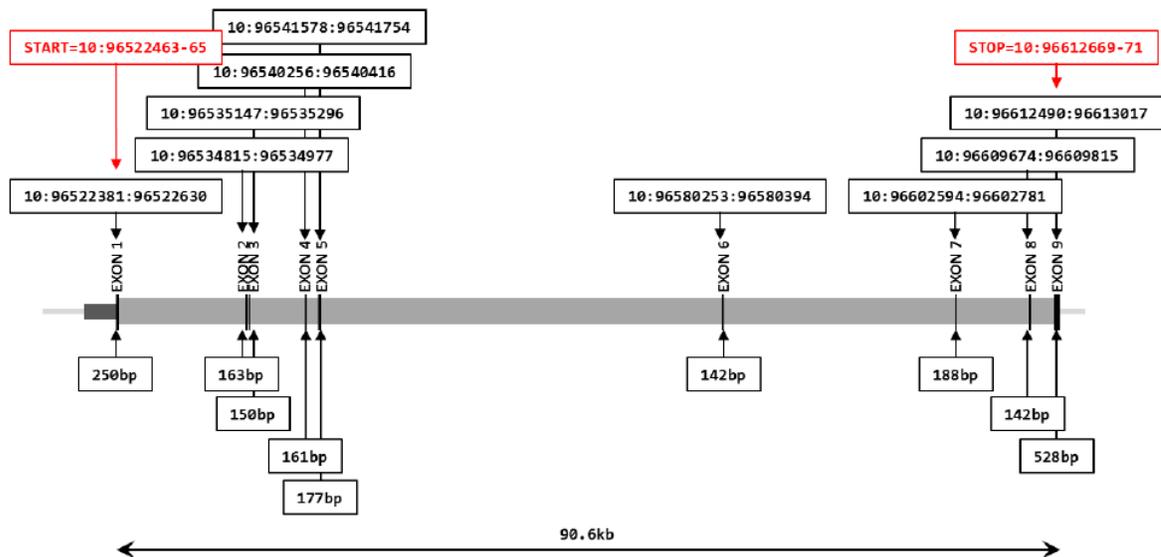


Fig. 4. Diagrama del gen *CYP2C19*. *CYP2C19* comprende 9 exones (barras negras), y se encuentra localizado en el cromosoma 10 (10q24.1–24.3). Los intrones están indicados en gris claro y la región promotora 5' en gris oscuro. <sup>20</sup>

En las estructuras cristalinas de la enzima libre disponibles hasta el momento, se observa un grupo hemo, en el cual el hierro se encuentra unido a un grupo tiol (-SH) de una cisteína y a una molécula de agua<sup>36</sup>. La estructura

secundaria del P450 consiste en aproximadamente 12 alfa hélices, de las cuales las hélices I y L, altamente conservadas, están en contacto directo con el grupo hemo <sup>37</sup>. La hélice I contiene también residuos críticos implicados en el suministro de protones, para el ciclo catalítico de la enzima<sup>29</sup>. La zona del núcleo está constituida por cuatro hélices (aD, aE, al y aL), hélices J y K, dos láminas *b*, y una espiral denominada *meander loop* (serpentina) que abarca entre 7-10 residuos de aminoácidos y se propone que juega un papel en la unión del grupo hemo, y en la estabilización de la estructura terciaria de la proteína <sup>38</sup>.

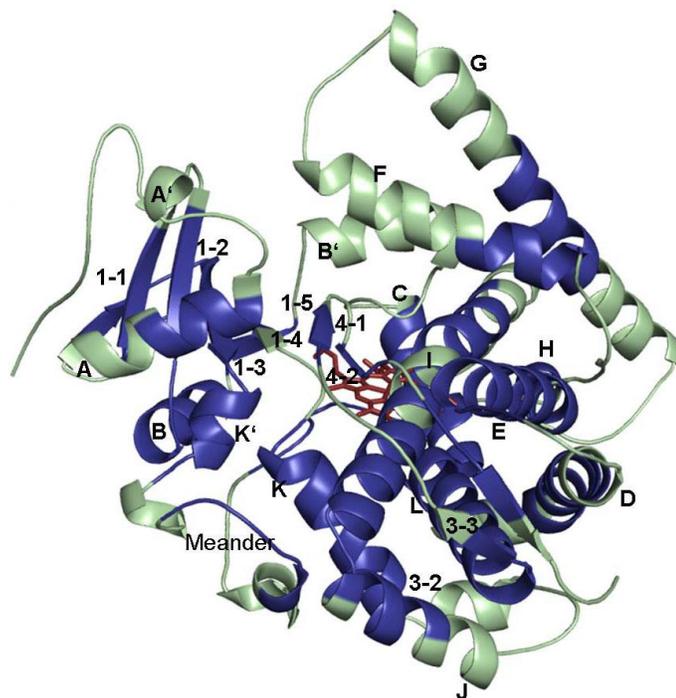


Fig. 5. Estructura cristalina de CYP2C19.

Esta proteína parece ser expresada casi exclusivamente en el hígado, aunque también se han detectado niveles de expresión bajos en intestino. <sup>13,20,39</sup> CYP2C19 se encarga de metabolizar agentes terapéuticos como los inhibidores de la bomba de protones (omeprazol, lansoprazol), anticonvulsivos (S-mefenitoina, diazepam) antidepresivos (amitriptilina, clomipramina) y antiplaquetarios (clopidogrel, prasugrel) <sup>39-41</sup>. Así mismo, participa en el metabolismo de moléculas endógenas como el estradiol, retinoles, estrona y testosterona, así como en la biosíntesis de estrógeno. <sup>39</sup>

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Uso de Biomarcadores Predictivos

El rol de los biomarcadores en el manejo del cáncer se está expandiendo rápidamente. Numerosos avances en años recientes han impactado ya en el cuidado de los pacientes, incluyendo el desarrollo de biomarcadores predictivos que seleccionan a los pacientes para terapias específicas.<sup>42</sup> Por ejemplo, el marcador Guanililciclase C (GUCY2C) está siendo usado para clasificar a los pacientes en fase II de cáncer colorectal en grupos con pronóstico favorable y desfavorable. En cáncer de mama, el estatus de los receptores de hormonas determinan la necesidad de terapia endocrina, mientras que la identificación del gen HER2 permite seleccionar a pacientes para ser tratados con terapia de trastuzumab.<sup>42</sup> Recientemente, para CaCU se encontró que el gen CRBP1 puede determinar si un tumor es resistente o sensible a terapia con Cisplatino, lo que permitiría identificar que pacientes podrán responder positivamente a este tratamiento.<sup>43</sup> Algunos de los biomarcadores de este tipo, que ya están siendo utilizados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Ejemplos de biomarcadores predictivos en distintos tipos de cáncer (Modificado de La Thangue 2011).

BIOMARCADOR	TIPO DE CÁNCER	QUIMIOTERAPIA	BLANCO
<i>HER2</i> (amplificación del gen)	Mama	Trastuzumab	HER2
Receptor de Estrógenos (Expresión de proteína)	Mama	Tamoxifen	Receptor de Estrógenos
<i>BCR-ABL</i> (Translocación génica)	CML	Imatinib, dasatinib, nilotinib	BCR-ABL
<i>EGFR</i> ± <i>KRAS</i> (Mutación en <i>KRAS</i> )	CRC	Cetuximab, panitumumab	EGFR
<i>EGFR</i> (amplificación del gen)	NSCLC	Erlotinib, gefitinib	EGFR
<i>PML-RAR</i> (Translocación del gen)	APL	Ácido retinoico	<i>PML-RAR</i>
<i>BRCA1/2</i> (Mutación)	Mama	Olaparib, Veliparib	PARP

<b>BRAF V600E (Mutación)</b>	Melanoma	Vemurafenib	BRAF
<b>ALK (Rearreglo)</b>	NSCLC	Crizotinib	ALK

Abreviaturas: APL, Leucemia Promielocítica Aguda; CML, Leucemia mieloide Crónica; CRC, Cáncer colorectal; NSCLC, Cáncer Pulmonar de Células No Pequeñas.

## 2.2. MRP2 en cáncer

MRP2 es expresada normalmente en la membrana canalicular de los hepatocitos; en menor medida también se expresa en riñón, intestinos, colon y pulmones. En estos órganos funciona como el mayor exportador de aniones orgánicos, como conjugados de bilirrubina, leucotrieno C4, conjugados de glutatión, metotrexato, e interesantemente, se ha reportado que también puede exportar conjugados de Cisplatino con Glutatión.<sup>24</sup>

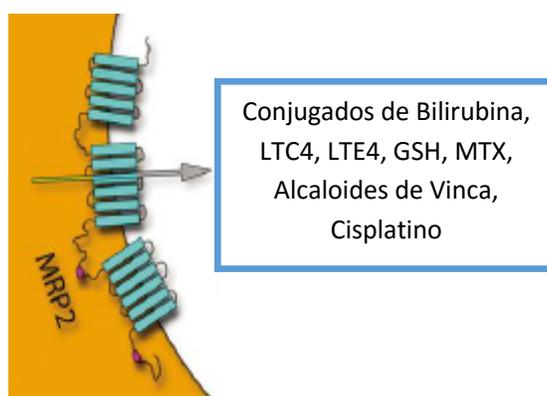


Fig. 6. Ejemplo de algunos de los sustratos de MRP2 (Modificado de Sodani, et al. 2012).

En relación al Cisplatino (CDDP), se ha reportado que varias líneas celulares humanas resistentes al mismo sobreexpresan *MRP2*, incluyendo líneas de cáncer de ovario, carcinoma hepatocelular, cáncer de vejiga, de colon y de cabeza y cuello (Tabla 2) <sup>24,44,45</sup>. En cáncer de esófago, por medio de inmunohistoquímicas, se ha observado la expresión de esta proteína en tejidos de pacientes y correlaciona con la sobrevida de estos, determinando que *MRP2* está relacionado con la resistencia a Cisplatino y a una menor sobrevida.<sup>26</sup> Esto lo convierte en un posible biomarcador predictivo para la terapia con Cisplatino en

estos tipos de cáncer, lo que sugiere que también pudiera serlo en CaCU, sin embargo, no se han realizado estudios que determinen la expresión de este transportador en líneas celulares ni en tejido canceroso de cérvix.

Tabla 2. Ejemplo de líneas celulares de distintos tipos de cáncer resistentes a Cisplatino, que sobreexpresan MRP2.

<b>CÁNCER</b>	<b>EXPRESIÓN</b>	<b>AUTOR</b>
Ovario	Aumentada	Materna, et al., 2005
Melanoma	Aumentada	Liedert, et al. 2003
Esófago	Aumentada	Yamasaki, et al. 2011
Cabeza y Cuello	Aumentada	Taniguchi, et al. 1996; Guido, et al. 2009
Carcinoma hepatocelular	Aumentada	Korita, et al. 2010; Li, et al. 2004

### **2.3. CYP2C19 en cáncer**

La proteína CYP2C19 ha sido propuesta como biomarcador predictivo en cáncer de mama<sup>2</sup>, puesto que metaboliza la droga antineoplásica Tamoxifen<sup>2</sup>; así mismo, en cáncer pancreático, se ha visto que ayuda en la respuesta a la droga nelfinavir, ayudando en el aumento de la sobrevida.<sup>46</sup> Ha sido reportado en estudios genómicos que pacientes con cáncer de cabeza y cuello con isoformas no funcionales o con función disminuida de CYP2C19 tienen una menor respuesta a la terapia conformada por cisplatino, 5-FU y radiación<sup>47,48</sup>. Esto sugiere que esta proteína podría tener una participación importante en la respuesta a drogas anticancerígenas, por lo que podría ser un buen biomarcador predictivo para pacientes tratados con este régimen terapéutico y hasta ahora no ha sido estudiada en otros tipos de cáncer, como CaCU y tampoco se han realizado estudios que determinen su expresión en los tejidos cancerosos, ni el mecanismo por el cual podrían estar participando en la sensibilidad a cisplatino.

Los mecanismos de respuesta a las drogas antineoplásicas en cáncer cervicouterino siguen siendo una pregunta abierta y, dada la alta mortalidad de las pacientes con dicho tipo de cáncer existe, hay una gran necesidad de mejorar la eficiencia de la respuesta al tratamiento quimioterapéutico. Es por esto que es de gran relevancia el desarrollo y búsqueda de marcadores que permitan la medición de la respuesta a los agentes terapéuticos y la eficiencia de estos <sup>49 21</sup>. Los genes MRP2 y CYP2C19 son buenos candidatos a biomarcadores predictivos para el tratamiento de CaCU por lo cual es de gran importancia caracterizarlos y conocer su expresión en tejido del cérvix uterino.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

El cáncer cervicouterino (CaCu) es un problema de salud pública a nivel mundial. En México representa la segunda causa de mortalidad por cáncer en mujeres. El Sistema Nacional de Salud ha hecho prioritario su detección y tratamiento oportuno y adecuado. Por esta razón es necesario realizar investigación en la búsqueda de moléculas que puedan servir como biomarcadores predictivos que permitan proporcionar terapias más eficientes a fin de disminuir la tasa de mortalidad de esta enfermedad.

Estudios recientes en distintos tipos de cáncer, como de ovario, colon, cabeza y cuello, entre otros, han relacionado la respuesta a los tratamientos con genes de Resistencia a Multidrogas y genes Metabolizadores de Drogas, principalmente la familia de los MRP y la superfamilia de Citocromo P450. Sin embargo, a la fecha se conoce poco acerca de su participación en CaCU, por lo que es necesario realizar estudios que permitan conocer más acerca de su papel en la biología de este tipo de cáncer.

#### **4. HIPOTESIS:**

Las proteínas *MRP2* y *CYP2C19* se expresan en las líneas celulares de CaCU y en tejido tumoral de cérvix, por lo que son posibles biomarcadores predictivos para el tratamiento con cisplatino.

#### **5. OJETIVOS**

##### **5.1.OBJETIVO GENERAL:**

Evaluar la expresión de los genes *MRP2* y *CYP2C19*, en líneas celulares y tejido de cáncer cervicouterino.

##### **5.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Determinar la expresión de los genes *MRP2* y *CYP2C19* en líneas celulares comerciales de cáncer cervicouterino.
- Determinar la expresión de las proteínas *MRP2* y *CYP2C19* en líneas celulares comerciales de cáncer cervicouterino.
- Determinar la expresión de las proteínas *MRP2* y *CYP2C19* en tejido de pacientes con cáncer cervicouterino.

#### **6. DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO**

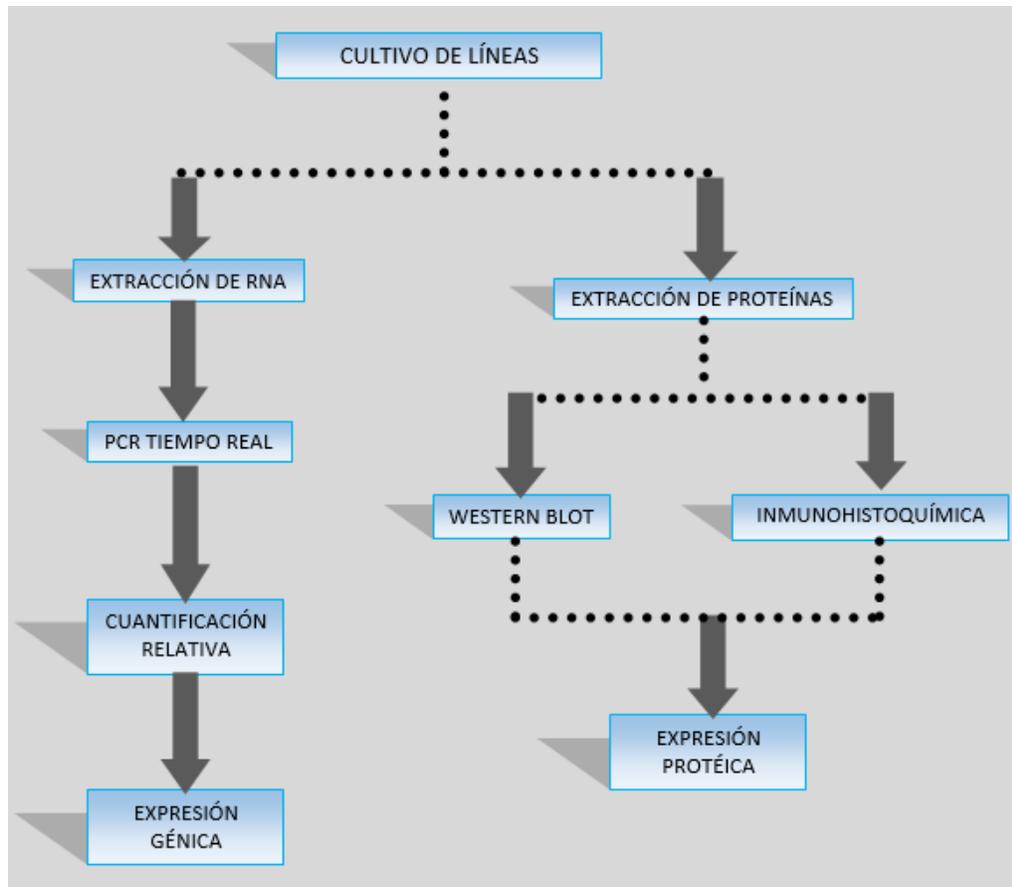


Fig. 7. Diagrama general de trabajo

## 7. METODOLOGÍA.

### 7.1. Cultivo Celular.

Se utilizaron cuatro líneas celulares de Cáncer Cervicouterino: HeLa, SiHa, CaSKi y C33A; y las líneas celulares A549 y HepG2, como controles positivos para MRP2 y CYP2C19, respectivamente.

Las líneas celulares se cultivaron en frascos de cultivo T75 (Corning) con 14 ml. del medio correspondiente a cada línea celular, como se muestra en la Tabla 3. Se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, hasta un 90 - 100% de confluencia.

Tabla 3. Líneas celulares utilizadas en la realización de este trabajo y sus condiciones de cultivo.

<b>LÍNEA CELULAR</b>	<b>ORIGEN</b>	<b>MEDIO</b>	<b>SUPLEMENTOS</b>
<b>HepG2</b>	Carcinoma Hepatocelular	DMEM	SFB 10% Antibiótico/Antimicótico 1X
<b>A549</b>	Cáncer de Pulmón	DMEM	SFB 10% Antibiótico/Antimicótico 1X
<b>HeLa</b>	Cáncer de Cérvix	DMEM	SFB 10% Antibiótico/Antimicótico 1X
<b>SiHa</b>	Cáncer de Cérvix	DMEM	SFB 10% Antibiótico/Antimicótico 1X
<b>C33A</b>	Cáncer de Cérvix	DMEM	SFB 10% Antibiótico/Antimicótico 1X
<b>CaSki</b>	Cáncer de Cérvix	RPMI	SFB 10% Antibiótico/Antimicótico 1X a.a. no esenciales 1X

## 7.2. Subcultivo Celular

Para el desprendimiento de la monocapa de las células se hicieron tres lavados con 3 ml. de PBS 1%; después se agregaron 1.5 ml. de tripsina, la cual se dejó actuar por 5 minutos a 37°C o hasta observar el desprendimiento de la monocapa, se golpeó firme y fuertemente la botella para despegar por completo la monocapa; se adicionaron 3 ml. de medio de cultivo, y el volumen se pasó a un tubo Eppendorf para centrifugarlo 5 minutos a 1000 rpm. Pasado el tiempo, se tiró el sobrenadante y se agregaron 4ml. de medio de cultivo para resuspender las células y pasarlas a frascos T75.

## 7.3. Extracción de RNA

El mRNA fue extraído con la técnica de Trizol (Ambion, Invitrogen). Se hicieron dos lavados con 3ml. de PBS 1% a los frascos con 100% de confluencia, se agregó 1 ml. de TRIsure (Cat No. BIO-38033) a los frascos, se homogeneizó

suavemente y se pasó a tubos Eppendorf de 1.5 ml. Se dejaron incubando toda la noche a -20°C. Posteriormente, se agregaron 200 µl de cloroformo y se dejaron incubando en hielo por 2 minutos. Posteriormente, se centrifugaron por 15 minutos a 12,000 rpm. Se tomó la fase acuosa y se pasó a un tubo eppendorf nuevo; se agregó 1 ml. de isopropanol absoluto y se dejó toda la noche a -20 °C. Se centrifugó por 15 minutos a 12,000 rpm; se decantó el sobrenadante y se agregó 1 ml. de etanol al 75%, se centrifugó 5 minutos a 8000 rpm. El paso anterior se repitió dos veces y en la última ocasión en que se decanta, se deja secando a temperatura ambiente por 10 minutos aproximadamente. Adicionalmente, se dejó secar 2 minutos en el termomixer a 56 °C sin agitación. El pellet se resuspendió en 30 µl de agua con DEPC.

Para verificar la integridad del RNA se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% y se cuantificó utilizando una longitud de onda de 260/280 nm en un Espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific).

#### 7.4. Transcriptasa Reversa – PCR

Para realizar la RT-PCR se utilizó el kit High Capacity RNA - to- cDNA (Cat No. 4387406) preparando la mezcla de reacción, usando hasta 2 µg de RNA total por 20µl de reacción como lo indica el protocolo:

COMPONENTE	VOLUMEN/ REACCIÓN (µl)	
	+RT	-RT
2X RT Buffer	10.0	10.0
20X RT Enzyme Mix	1.0	1.0
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	Aforar a 20 µl	Aforar a 20 µl
Muestra	Hasta 9 µl	-
<b>Total por Reacción</b>	20.0	20.0

El programa de RT-PCR incluyó una incubación a 37°C durante 60 min para la transcripción reversa, seguida de una desnaturalización a 95°C durante 5 min y 4°C por tiempo indeterminado. Se cuantificaron los amplificadores utilizando el Espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific) y se verificó su integridad mediante la realización de una PCR punto final del gen de la subunidad ribosomal 18S, y la electroforesis en agarosa al 2%.

### **7.5. Cuantificación Relativa por PCR- Tiempo Real.**

La determinación de la expresión de los genes MRP2 y CYP2C19 en las líneas celulares, se realizó mediante la técnica de PCR-Tiempo Real utilizando sondas TaqMan específicas para cada uno de los genes en el equipo StepOne de Applied Biosystem. Los iniciadores y las sondas utilizadas fueron de Applied Biosystem; para el gen MRP2 la sonda utilizada fue Hs00166123\_m1 que genera un amplicón de 75 pb; para el gen CYP2C19 la sonda fue Hs00426380\_m1 que produce un amplicón de 106 pb. Para el control interno RPLP0 la sonda empleada fue Hs00426380\_m1 que genera un amplicón de 105 pb. Las reacciones de amplificación se realizaron por triplicado utilizando los reactivos TaqMan Genotyping Master Mix, No. 4371355. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10µl, utilizando 5.5 µl, 0.5 µl de sonda y 1 µl de DNA (equivalente a 1 µg).

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: para la activación de la enzima, 10 min a 95°C, 40 ciclos de PCR: 15 seg a 95°C, seguido de 1 min. a 60°C. La detección de la señal se realizó en el último paso de la PCR.

## Diagrama Experimental para PCR Tiempo Real.

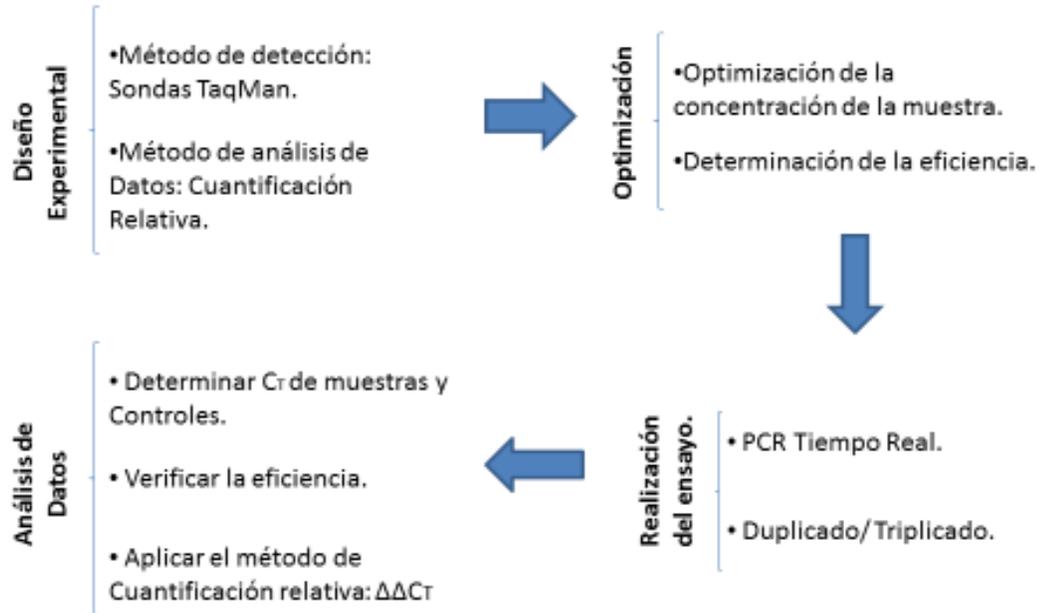


Fig. 8. Diagrama Experimental para PCR Tiempo Real (Modificado de: Sambrook, 2013)

La cuantificación relativa se basa en la expresión relativa de un gen problema respecto a un gen de referencia. De esta manera se obtiene una proporción de expresión relativo, lo que permite investigar los cambios fisiológicos en la expresión génica. El gen de referencia suele ser de expresión constante, lo que se conoce como gen estructural o housekeeping. Estos suelen estar presentes en todos los tipos celulares, ya que son necesarios para las funciones básicas de las células. El problema es que se ha visto que estos genes están regulados y que pueden variar bajo determinadas condiciones experimentales.<sup>50</sup>

Por esta razón, Pfaffl (2001) y Livak (2001) desarrollaron un método matemático de cuantificación basado únicamente en los incrementos de  $C_t$  de la muestra respecto al control y en las eficiencias de amplificación. Los incrementos del gen problema son normalizados con los incrementos respecto al gen de

referencia (*housekeeping*). De esta manera se corrigen las variaciones que este pueda sufrir por las condiciones experimentales.

Para el análisis de la expresión de los genes ABCC2 y CYP2C19 se utilizó el método de  $\Delta\Delta Ct$  (Livak & Schmittgen, 2001). Con los valores de Ct se aplicó la fórmula de cálculo de expresión génica:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{Muestras}) - \Delta Ct (\text{Controles})$$

Donde:

$$\Delta Ct (\text{Muestras}) = Ct (\text{Gen Blanco, Muestras}) - Ct (\text{Gen Referencia, Muestras})$$

$$\Delta Ct (\text{Controles}) = Ct (\text{Gen Blanco, Control}) - Ct (\text{Gen Referencia, Control})$$

## **7.6. Determinación de la expresión de proteínas mediante la técnica de Western Blot.**

### **7.6.1. Extracción de proteínas**

Para la extracción de proteínas, se desprendió la monocapa de células con el método de tripsina mencionado anteriormente. Las células se sedimentaron mediante centrifugación y se resuspendieron en tampón RIPA para su lisis (1x PBS, 1% Nonidet P-40, 0.5% Deoxicolato sódico, 0,1% SDS) al cual se le adicionó inhibidores de proteasas de forma extemporánea (PMSF 0.1mg/ml, Aprotinin, Ortovanadato sódico 0.18mg/ml), se incubaron en hielo durante 30 min y se vortexeó a velocidad media para conseguir una ruptura total de la célula. Se incubaron 30 min más en frío, tiempo tras el cual se centrifugaron durante 15 min. a 13000 g. a 4°C en microfuga para sedimentar los restos celulares. El sobrenadante se recogió en dos tubos uno para cuantificar la concentración de

proteínas y otro para realizar la electroforesis. La concentración de proteínas se determinó mediante el Ensayo de proteína BCA (Thermo Scientific #23225).

### **7.6.2. Electroforesis y transferencia de proteínas**

Alícuotas con una concentración de 1µg/µl de proteínas fueron desnaturalizadas hirviéndolas en presencia de β-Mercaptoetanol y separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 10%, para la proteína CYP2C19, y 8% para ABCC2, en tampón Tris-Glicina. La electroforesis se resolvió a 100V durante 1 hora 30 min. con el sistema “mini-protean” de Bio-Rad.

Finalizada la electroforesis, los geles se equilibraron para su posterior transferencia a una membrana de nitrocelulosa, mediante transferencia húmeda con el sistema mini-transblot de Bio-Rad en tampón de transferencia Tris-Glicina-Metanol (25mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol, pH 8.4). La transferencia se realizó a 0.5 A durante 1hra. 30 min. para el gel de 10% y 3 horas para el gel de 8%.

### **7.6.3. Inmunodetección**

Para la inmunodetección se bloquearon las membranas en bloto/ (5% leche en polvo, 0,05% Tween-20 en TBS pH 7.4) y se incubaron con los siguientes anticuerpos primarios monoclonales: anti-MRP2 ab3373 y anti- CYP2C19 ab137015 (Abcam). La detección se realizó mediante el sistema de quimioluminiscencia de HRP con el kit de Millipore “Immibilion Western” (No. Cat. WBKLS0500). La membrana expuesta a quimioluminiscencia, se reveló mediante el sistema ChemiDoc de Bio-Rad. El análisis se realizó por densitometría utilizando el programa Image Lab (Bio-Rad).

## **7.7. Determinación de la expresión de proteínas mediante la técnica de Inmunohistoquímica**

### **7.7.1. Muestras biológicas**

Se analizó un total de 47 muestras de biopsias cervicales, 44 corresponden a tejido tumoral y 3 a tejido normal de cérvix. Las muestras fueron tomadas en la Clínica de Colposcopia del Hospital General de México, Unidad de Oncología, Mayo 2013 – Mayo 2014. Los criterios de inclusión de las muestras de las pacientes fueron el no haber sido sometidas a tratamientos previos, historial clínico completo y aprobación del consentimiento informado.

Los datos clínicos evaluados fueron: edad, número de embarazo, estadio clínico del tumor, diferenciación del tumor, número de parejas sexuales, inicio de vida sexual activa, edad de la menarca y antecedentes familiares de cáncer.

### **7.7.2. Construcción del arreglo de tejidos.**

La construcción de los arreglos de tejidos se realizó con 44 muestras de CaCU embebidas en parafina y 3 muestras de cérvix sano. Fue realizado mediante el empleo del Tissue-Arrayer ATA 100 de Chemicon, siguiendo las instrucciones del equipo. Este sistema de precisión es operado de manera semi-automatizada y permite arreglar en un solo bloque de parafina, múltiples muestras de tejido, lo que permite analizar decenas a cientos de muestras pequeñas de tejido en condiciones homogéneas y con un mínimo consumo de reactivos, en comparación con las técnicas convencionales de inmunohistoquímica (Mendoza, 2011).

MAPA 1

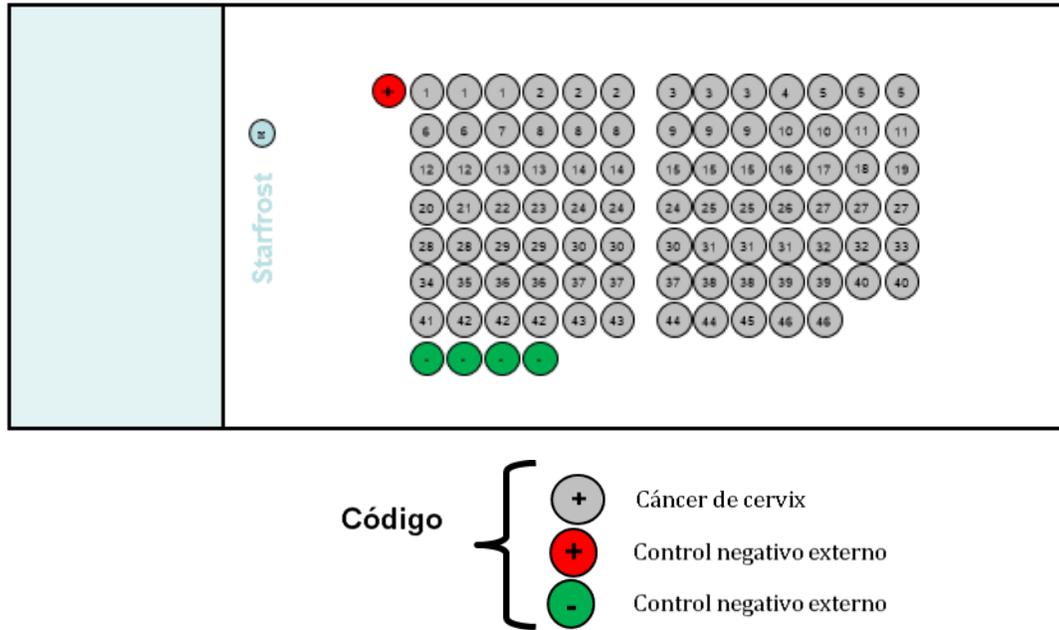


Fig. 9. Mapa del arreglo de Tejidos

### 7.7.3. Detección de las proteínas MRP2 y CYP2C19 por inmunohistoquímica

La determinación de la expresión de las proteínas MRP2 y CYP2C19 se realizó por la técnica de inmunohistoquímica. Se tomaron los arreglos de tejidos y se desparafinaron dejándolos en incubación durante toda la noche a 60°C, seguido de un lavado en Xilol por 5 min. Para rehidratarlos se hicieron baños de 5 min., en soluciones graduales de etanol, de mayor a menor grado, terminando en agua. La exposición del antígeno se hizo utilizando una olla de presión con Tris-EDTA por 30 min. Pasado el tiempo de exposición, se hacen lavados en PBS 1X. La detección de las proteínas se hicieron mediante la técnica de Biotina/Estreptavidina amplificada (BSA), utilizando el protocolo de tinción de DAKO Envision. Para la detección de las proteínas, se utilizaron los anticuerpos monoclonales primarios anti-MRP2 ab3373 y anti- CYP2C19 ab137015 (Abcam), a una dilución 1:50. La incubación se efectuó durante toda la noche y se

contratiño con hematoxilina y se montó con cubreobjetos. Se utilizó como control negativo tejido de placenta, puesto que está reportado que no expresa estas proteínas, y como control positivo tejido de hígado con alta expresión de ambas proteínas.

### **7.8. Análisis Estadístico**

El análisis estadístico para comparar la expresión génica tanto de MRP2 y CYP2C19, entre las líneas celulares de CaCU se realizó mediante las pruebas de ANOVA y PostHoc de Tukey; y la prueba de Dunnet para comparar las líneas celulares con las líneas control. Para analizar los resultados de los Western Blots se usó ANOVA y la prueba de Bonferroni. El análisis de asociación entre la expresión de la proteína en los tejidos y los principales parámetros clínicos patológicos fue hecho mediante la prueba de chi cuadrada ( $X^2$ ). Los datos clínicos e histopatológicos fueron obtenidos de las historias clínicas. Para todos los análisis se consideró como significativo una  $p < 0.05$ . El procesamiento se realizó con SPSS v19 y Con GraphPad Prism 5.

## 8. RESULTADOS.

### 8.1. Integridad del RNA y control de calidad del cDNA sintetizado.

Se verificó la integridad del RNA extraído de las seis líneas celulares, tanto de CaCU como controles, mediante el corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1%. En la figura 10 se muestran las bandas correspondientes del RNA 28S y 18S.

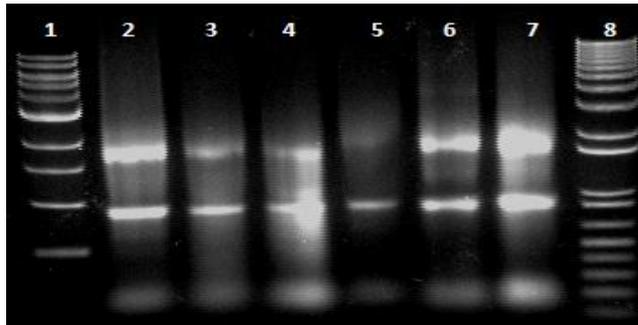


Fig. 10. Corrimiento electroforético del RNA total extraído de las líneas celulares de CaCU y controles. Se muestra el corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1%. 1) Marcador de peso molecular 1kb; 2) C33A; 3)SiHa; 4)CaSki; 5) HeLa; 6) A549; 7) HepG2; 8) Marcador de peso molecular 1kb.

Así mismo, para verificar la calidad del cDNA sintetizado, se realizó una PCR con iniciadores específicos para el gen RPS S18. En la figura 11 se observa la banda que representa la amplificación de este control de calidad en las seis líneas celulares.

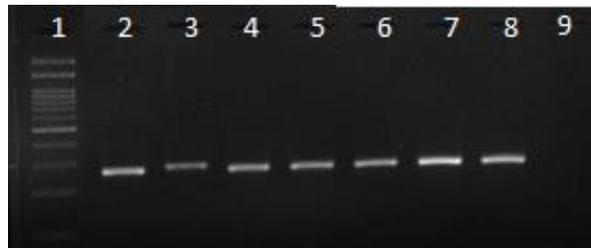
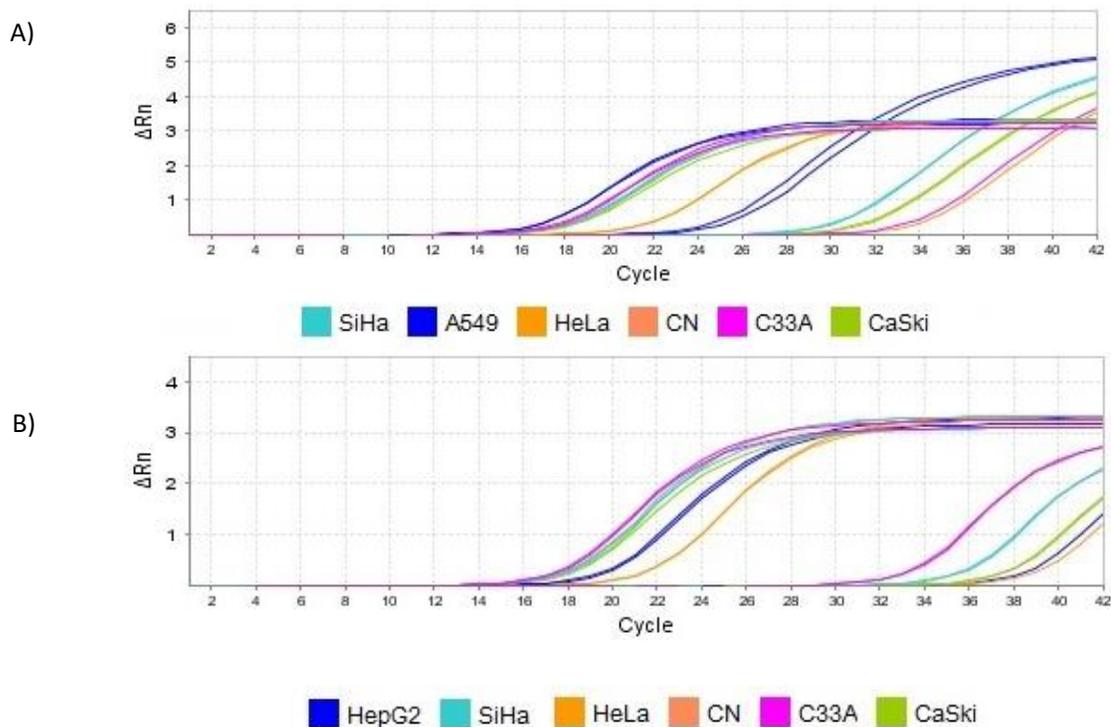


Fig. 11. Amplificación por PCR del gen de la Proteína Ribosomal S18 como control de calidad de cDNA sintetizado. 1) Marcador de peso molecular; 2) C33A; 3)SiHa; 4)CaSki; 5) HeLa; 6) A549; 7) HepG2; 8)HL60; 9) Control negativo.

## 8.2. Cuantificación relativa de la expresión génica para los genes *MRP2* y *CYP2C19* en líneas celulares de cáncer cervicouterino.

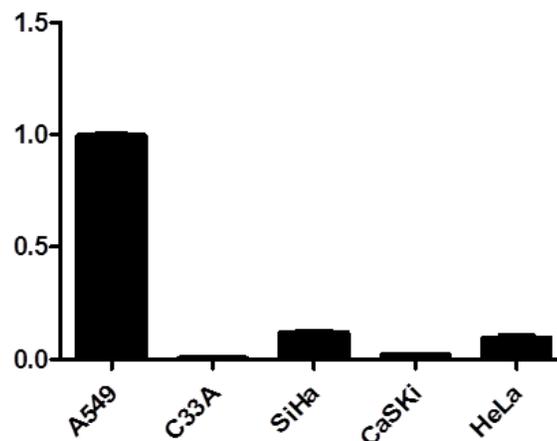
El análisis de la expresión de los genes *MRP2* y *CYP2C19* se realizó en las cuatro líneas celulares de CaCU (C33A, SiHa, CaSki y HeLa) y en las líneas celulares utilizadas como control positivo (A549 para *MRP2* y HepG2 para *CYP2C19*), así como de tejido de cérvix normal (CN). Se realizó satisfactoriamente la extracción de mRNA total para realizar la síntesis de cDNA y así efectuar el análisis de la expresión génica de los genes a estudiar en las líneas celulares ya mencionadas. Se utilizó el gen *RPLP0* como control de referencia para ambos análisis. Se amplificaron según el protocolo expuesto anteriormente, y se obtuvieron los resultados de Ct para cada muestra y gen. A continuación se muestran las gráficas de amplificación obtenidas para ambos genes.



Gráfica 2. Gráficas de amplificación en tiempo real. A) Se muestra la grafica de amplificación del gen *MRP2* en las líneas celulares de CaCU, A549 y tejido de cérvix normal. B) Se muestra la grafica de amplificación del gen *CYP2C19* en las líneas celulares de CaCU, HepG2 y tejido de cérvix normal.

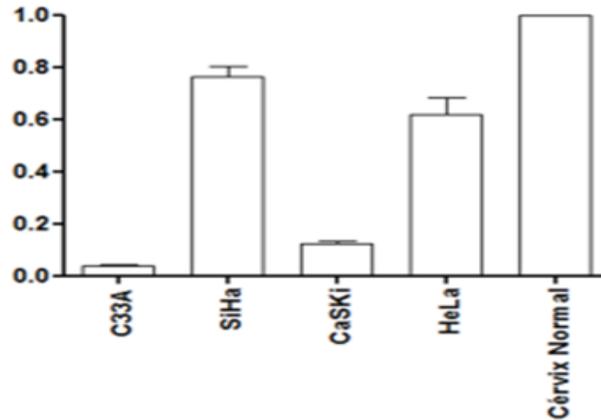
Con estos valores de Cp y los de eficiencias se aplicó la fórmula  $\Delta\Delta C_t$  descrita por Livak & Schmittgen (2001) y expuesta en Métodos. Los resultados obtenidos como proporciones de expresión respecto al control se describen a continuación.

Como se observa en la Gráfica 3 para MRP2, tomando como referencia la expresión dada en la línea celular control A549, ninguna de las líneas celulares de CaCU, presenta una expresión mayor a la expresión en A549, siendo C33A la línea con una menor expresión, seguida de CaSKi, HeLa y SiHa. La diferencia en la expresión entre la línea A549 y todas las líneas celulares de CaCU es significativa ( $p < 0.05$ ). Así mismo, hubo diferencia significativa entre la expresión del gen *MRP2* determinado en Caski y C33A ( $p = 0.02$ ), Caski y SiHa ( $p = 0.004$ ), Caski y HeLa ( $p = 0.01$ ), también entre C33A y SiHa ( $p = 0.003$ ) y entre C33A y HeLa ( $p = 0.01$ ) pero no hubo diferencia entre SiHa y HeLa ( $p = 0.18$ ).



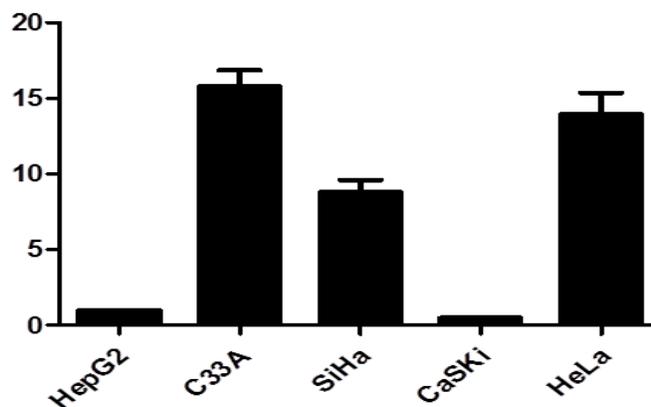
Gráfica 3. Cuantificación relativa del gen *MRP2* en las líneas celulares de CaCU respecto a la línea celular control A549.

Al comparar la expresión del gen *MRP2* en las líneas celulares de CaCU contra la expresión dada en cérvix normal, hay una diferencia significativa con todas ( $p < 0.05$ ) (Gráfica 4).



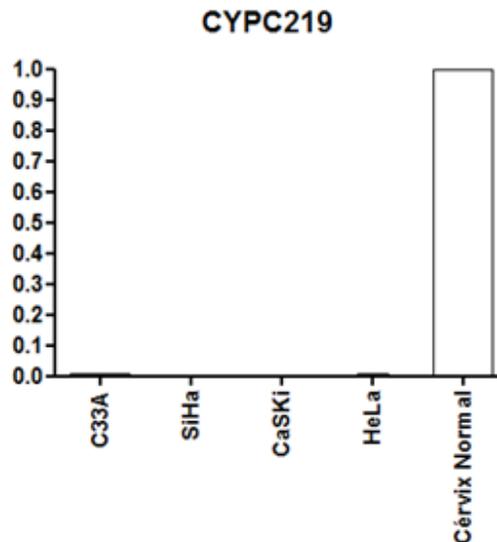
Gráfica 4. Cuantificación relativa de la expresión del gen *MRP2* en las líneas celulares de CaCU respecto a la expresión dada en el tejido de cérvix normal.

Para el gen *CYP2C19*, tomando como referencia la expresión dada en la línea celular control HepG2, hubo una diferencia significativa entre esta línea celular y las cuatro líneas celulares de CaCU. Únicamente la línea celular CaSKi presentó una expresión más baja que la vista en HepG2; las demás líneas celulares (C33A, SiHa y HeLa), presentan una mayor expresión de este gen en comparación de la presentada por HepG2. Además hubo diferencia significativa entre la expresión del gen *CYP2C19* determinado en Caski y C33A ( $p=0.005$ ), Caski y SiHa ( $p=0.009$ ), Caski y HeLa ( $0.01$ ), también entre C33A y SiHa ( $p=0.03$ ), pero no hubo diferencia entre C33A y HeLa ( $p=0.41$ ) ni entre SiHa y HeLa ( $p=0.08$ ) (Gráfica 5).



Gráfica 5. Cuantificación relativa del gen *CYP2C19* en las líneas celulares de CaCU respecto a la expresión dada en línea celular control A549.

Al comparar la expresión del gen *CYP2C19* en las líneas celulares de CaCU contra la expresión dada en cérvix normal, hay una diferencia significativa con todas ( $p < 0.05$ ) (Gráfica 6).



Gráfica 6. Cuantificación relativa del gen *CYP2C19* en las líneas celulares de CaCU respecto a la expresión dada en el tejido de cérvix normal.

### 8.3. Determinación de la expresión de las proteínas MRP2 y *CYP2C19* en líneas celulares comerciales de cáncer cervicouterino por ensayos de Western Blot.

Para determinar la expresión de las proteínas MRP2 y *CYP2C19* se realizó la extracción de proteínas totales de las cuatro líneas celulares de CaCU (C33A, SiHa, CaSki y HeLa) y en las líneas celulares utilizadas como control positivo (A549 para MRP2 y HepG2 para *CYP2C19*). Los controles de carga que se utilizaron fueron, para MRP2, la proteína Actina, y para *CYP2C19*, la proteína GAPDH.

En la figura 12 se muestra el Western Blot de la proteína MRP2, así como de GAPDH, el cual es el control de carga. Se observa la expresión de ambas proteínas en todas las líneas celulares de CaCU, así como en la línea celular control A549.

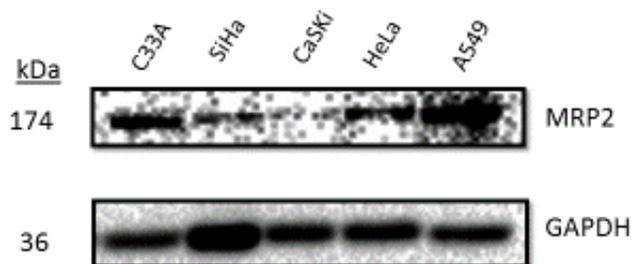
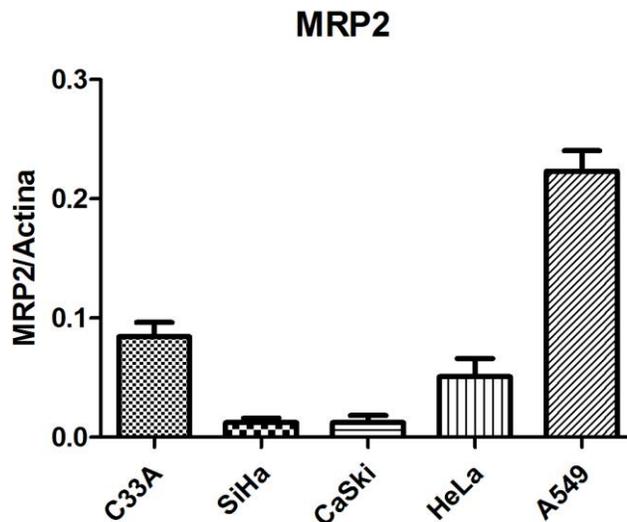


Fig. 12. Expresión de MRP2 en las líneas celulares de CaCU y la línea celular control A549.

Al realizar el análisis densitométrico y determinar la relación MRP2/GAPDH, se observa que la expresión no es igual en todas las líneas celulares. La mayor expresión se da en la línea control A549, seguida de la línea C33A, HeLa, CaSKI y SiHa. La diferencia entre la expresión en A549 y todas las líneas de CaCU es significativa ( $p < 0.05$ ); sin embargo, la diferencia de expresión entre las líneas de CaCU no es significativa (Gráfica 7).



Gráfica 7. Relación de la expresión MRP2/GAPDH en las líneas celulares de CaCU y la línea celular control A549.

En la figura 13 se muestra el Western Blot de la proteína CYP2C19, así como de Actina, la cual es el control de carga. Para CYP2C19, sólo se utilizaron las líneas celulares de CaCU C33A, SiHa y CaSKI, así como la línea celular

control HepG2. Se observa la expresión de ambas proteínas en todas las líneas celulares de CaCU, así como en la línea celular control.

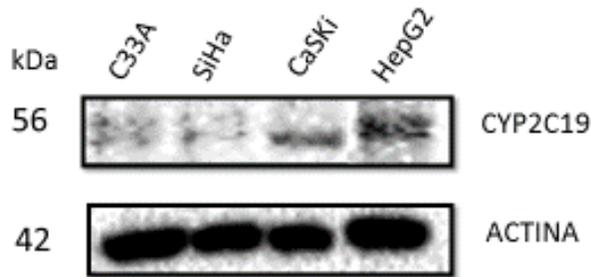
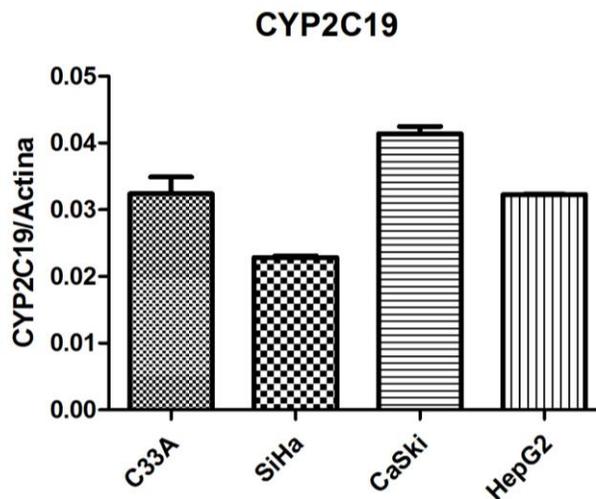


Fig. 13. Expresión de CYP2C19 en las líneas celulares de CaCU y la línea celular control HepG2.

Al realizar el análisis densitométrico y determinar la relación CYP2C19/Actina, se observa que la expresión no es igual en todas las líneas celulares. La mayor expresión se observó en la línea celular CaSKi, seguida de la línea control HepG2, C33A y SiHa. La diferencia en la expresión entre SiHa y las otras tres líneas celulares es significativa ( $p < 0.05$ ). La diferencia entre HepG2 y las otras dos líneas celulares de CaCU, CaSKi y C33A, no es significativa (Gráfica 8).



Gráfica 8. Relación de la expresión MRP2/GAPDH en las líneas celulares de CaCU y la línea celular control A549.

#### 8.4. Descripción de los datos clínico-patológicos de las muestras de pacientes analizadas.

Para la determinación de la expresión de las proteínas MRP2 y CYP2C19 en tejido tumoral de cérvix, se analizaron un total de 47 muestras de biopsias cervicales, 44 corresponden a tejido tumoral y 3 a tejido normal de cérvix. Las muestras fueron tomadas en la Clínica de Colposcopia del Hospital General de México, Unidad de Oncología, Mayo 2013 – Mayo 2014.

Los datos clínicos de las pacientes que se evaluaron fueron: edad, número de embarazo, infección por VPH, estadio clínico del tumor, número de parejas sexuales, inicio de vida sexual activa, edad de la menarca y antecedentes familiares de cáncer.

El promedio de la edad fue de  $39.27 \pm 14.13$  años, con un rango de los 18 a los 74 años. Solo el 22.7% (10 casos) eran mayores o tenían 50 años. Como el rango de edad fue de 56 años, se construyeron intervalos de 10 años de amplitud. Estos resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Frecuencia de los Intervalos de edad

Intervalos edad	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
18-27	10	22,7	22,7	22,7
28-37	13	29,5	29,5	52,3
38-47	10	22,7	22,7	75,0
48-57	7	15,9	15,9	90,9
58-67	2	4,5	4,5	95,5
68-74	2	4,5	4,5	100,0
Total	44	100,0	100,0	

Según el Sistema Bethesda de clasificación, el 40.9% de las muestras son Lesiones Intraepiteliales Escamosas de Bajo Grado, el 20.5% son Lesiones Intraepiteliales Escamosas de Alto Grado y 38.6% Cáncer Epidermoide. Con respecto al dato de infección por el Virus del Papiloma Humano, el 68.2% de las pacientes resultaron positivas y el 31.8% fueron negativas para la presencia del virus. El 36.4% (16 casos) refirió un antecedente de un familiar con cáncer (Tabla 5).

Tabla 5. Descripción de los datos clínico-patológicos de las muestras analizadas.

<b>DATOS CLÍNICOS</b>	<b>N</b>
<b>Estado clínico</b>	
<b>LIEBG</b>	18 (40.9%)
<b>LIEAG</b>	9 (20.5%)
<b>CaCU</b>	17 (38.6%)
<b>Infección por VPH</b>	
<b>(+)</b>	30 (68.2%)
<b>(-)</b>	14 (31.8%)
<b>Antecedente fam. de cáncer</b>	
<b>Si</b>	16 (36.4%)
<b>No</b>	28 (63.6%)

En la tabla 6 se resumen los antecedentes gineco-obstetricos. El promedio de embarazos fue  $3.2 \pm 2.5$  (0 a 12 embarazos); la media de la edad en que ocurrió la menarca fue de  $13.14 \pm 1.94$  años (10 a 19 años). La edad de inicio de vida sexual activa tuvo un promedio de  $17.5 \pm 4.3$  años (12- 35 años) y en promedio tuvieron  $2.27 \pm 1.24$  de parejas sexuales (1 a 6).

Tabla 6. Frecuencia de los factores gineco-obstétricos de las pacientes estudiadas.

		Frecuencia	Porcentaje
Paridad	Nula/ Baja	10	22.7
	Alta	34	77.3
IVSA	12-17 años	26	60.5
	18-23 años	15	34.9
	>24 años	2	4.7
Menarca	10-12 años	21	47.7
	13-15 años	17	38.6
	16-19 años	6	13.6
Parejas Sexuales	4-6	6	13.6
	1-3	38	86.4

### 8.5. Expresión de las proteínas MRP2 y CYP2C19 en tejido tumoral de cérvix.

La determinación de la expresión de las proteínas MRP2 y CYP2C19 se realizó mediante la técnica de inmunohistoquímica sobre los microarreglos de tejidos, y de acuerdo al protocolo de tinción *DAKO Envision*, como se menciona en el apartado de Metodología. La determinación de la expresión se realizó por la intensidad de la reacción Biotina/Estreptavidina amplificada (BSA), la cual fue evaluada por tres observadores independientes.

### 8.5.1. Expresión de la proteína MRP2 en tejido tumoral de cérvix.

En las muestras de tejido normal se observó tinción mayormente en el estrato basal del epitelio escamoso. La tinción de las células en tejido tumoral fue citoplasmática, lo que refleja la localización de esta proteína. De las muestras tumorales, 34 resultaron positivas para la expresión de MRP2 (79.1%) mientras que 9 resultaron negativas (20.9%). En el caso del tejido tumoral que expresa la proteína la tinción se da a lo amplio del epitelio afectado (Fig 14).

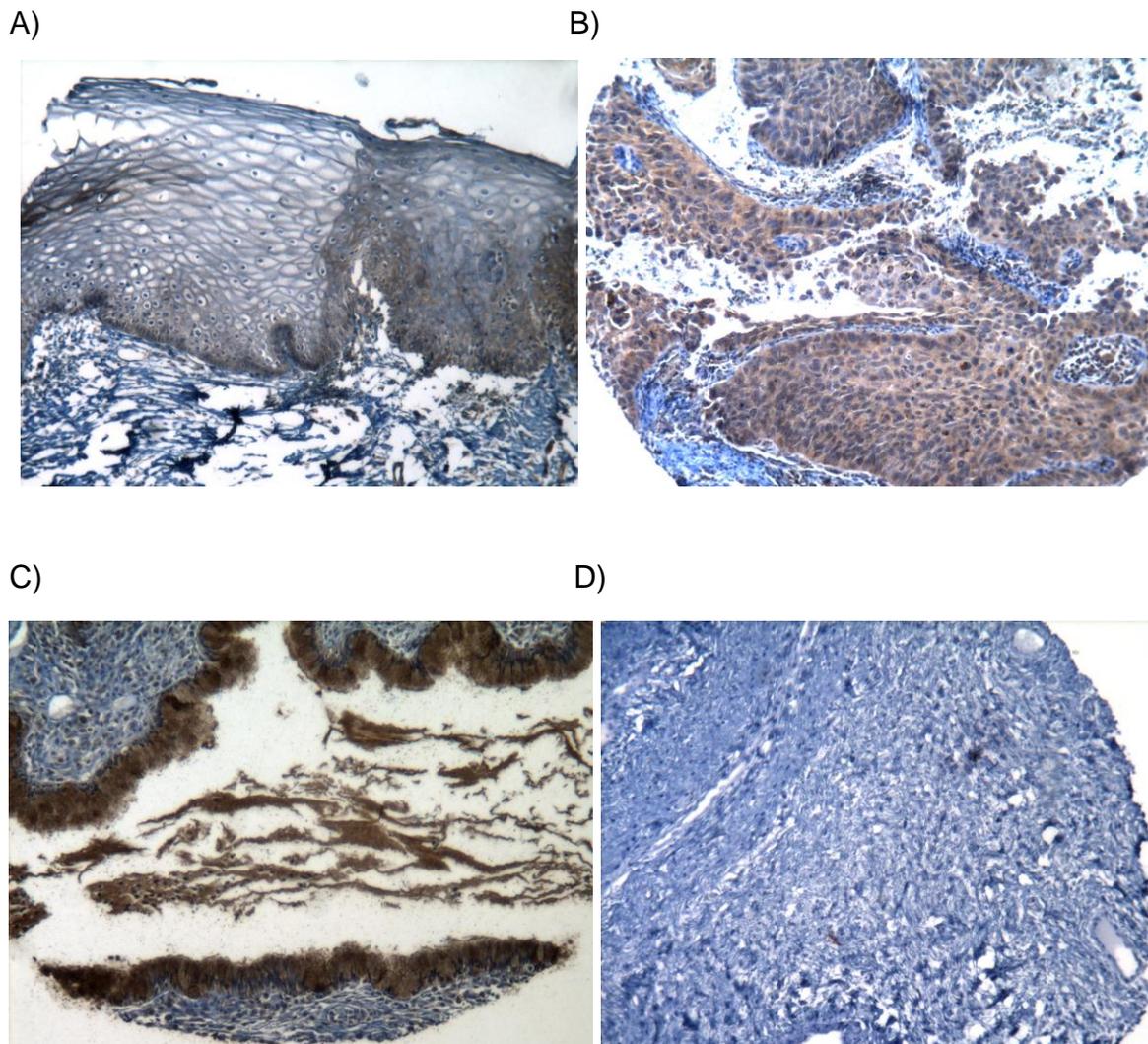


Fig 14. Expresión de MRP2 en tejido normal y tumoral de cérvix. A) Tejido de cérvix normal, positivo para MRP2 en células del estrato basal, fotografía tomada con aumento de 20X; B) y C)

Tejido de cáncer cervicouterino positivo para la expresión de MRP2, tanto en epitelio cilíndrico como en epitelio escamoso; D) Tejido de cáncer cervicouterino negativo para la expresión MRP2.

En el tejido de hígado que fue utilizado como control positivo, se observa una intensa tinción de localización citoplasmática en las células estrelladas. En el tejido de placenta utilizado como control negativo, no se observó tinción (Fig 15).

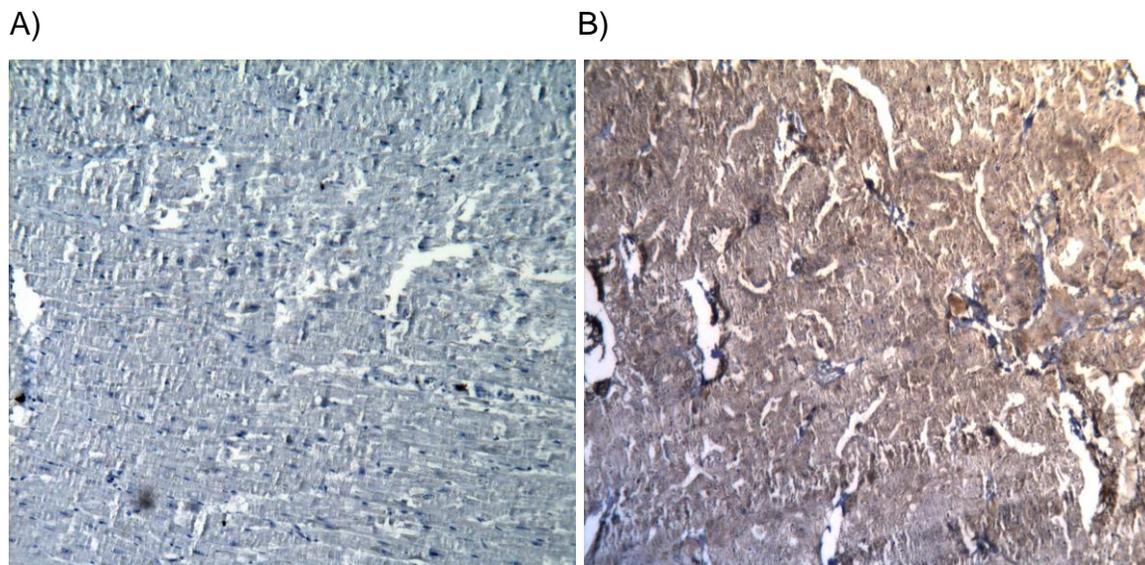


Fig 15. Inmunohistoquímica de tejidos controles para expresión de MRP2. A) Tejido de placenta utilizado como control negativo, fotografía tomada con aumento de 20X. B) Tejido de hígado utilizado como control positivo de expresión para MRP2.

### **8.5.2. Expresión de la proteína CYP2C19 en tejido tumoral de cérvix.**

En las muestras de tejido normal se observó tinción únicamente en el estrato basal del epitelio escamoso. La tinción de las células en tejido tumoral fue citoplasmática, lo que refleja la localización de esta proteína. De las muestras tumorales, 33 resultaron positivas para la expresión de CYP2C19 (76.7%) mientras que 10 resultaron negativas (23.3%). En el caso del tejido tumoral que expresa la proteína la tinción se da a lo amplio del epitelio afectado (Fig. 16).

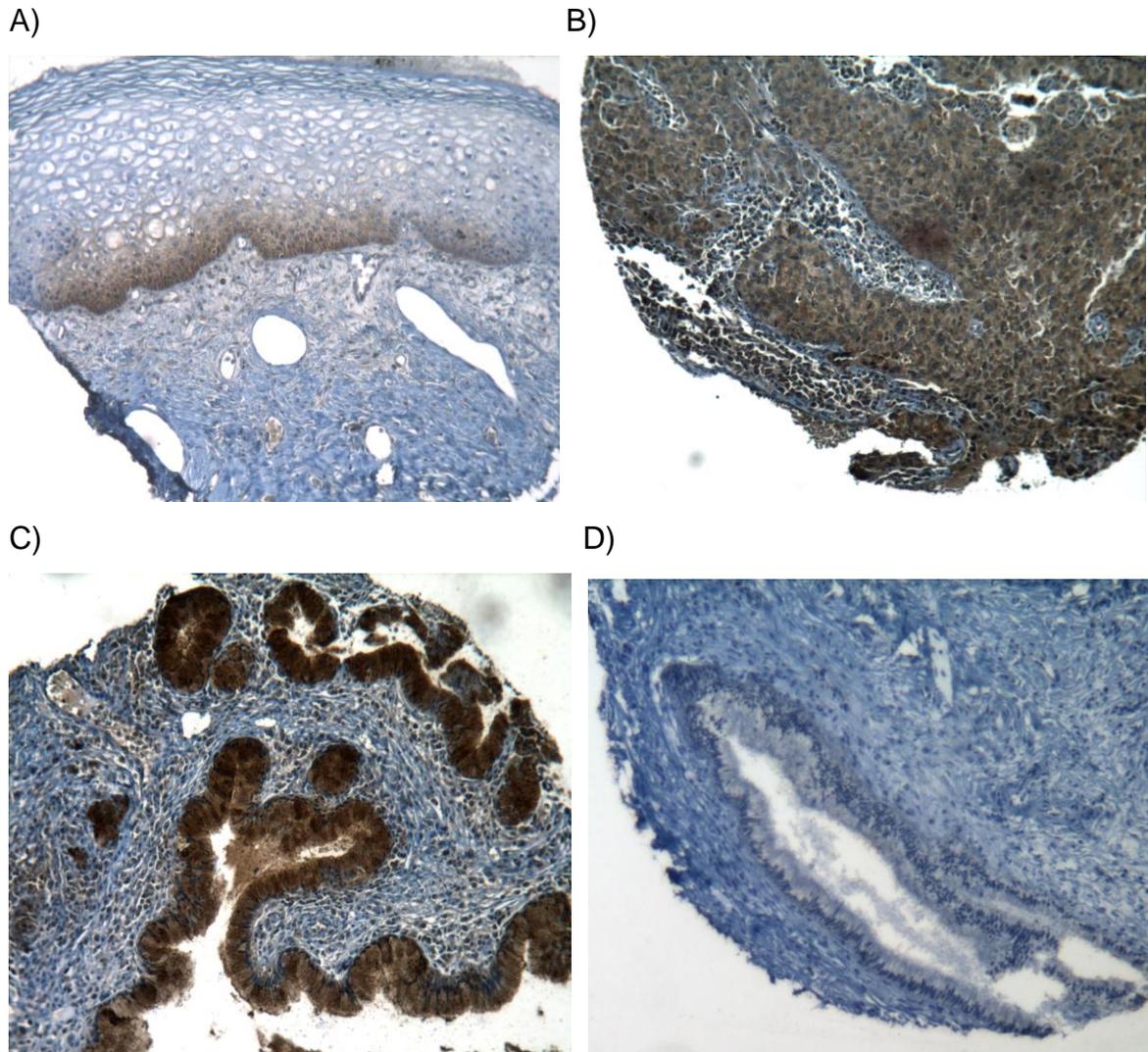


Fig 16. Expresión de CYP2C19 en tejido normal y tumoral de cérvix. A) Tejido de cérvix normal, positivo para CYP2C19 en células del estrato basal, fotografía tomada con aumento de 20X; B) y C) Tejido de cáncer cervicouterino positivo para la expresión de CYP2C19, tanto en epitelio cilíndrico como en epitelio escamoso; D) Tejido de cáncer cervicouterino negativo para la expresión CYP2C19.

En el tejido de hígado que fue utilizado como control positivo, se observa una intensa tinción de localización citoplasmática en las células estrelladas. En el tejido de placenta utilizado como control negativo, no se observó tinción (Fig 17).

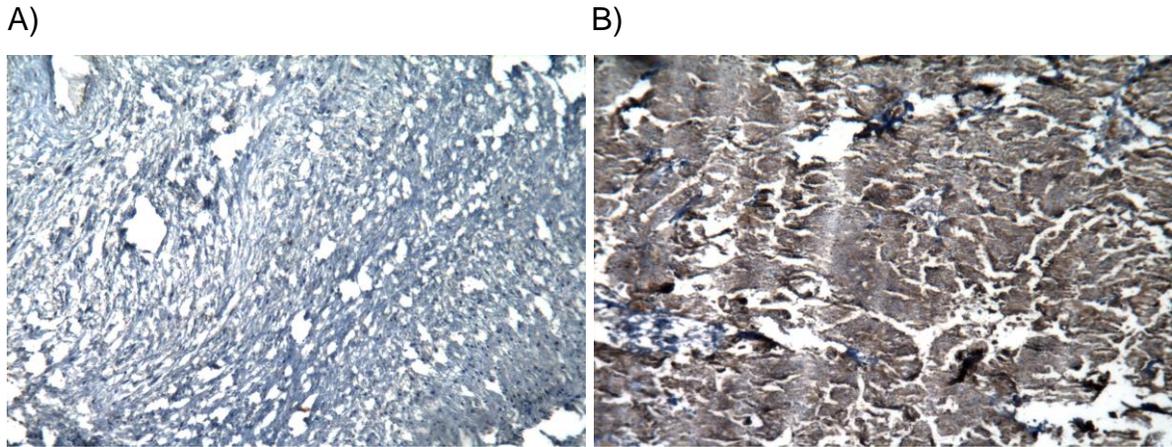


Fig 17. Inmunohistoquímica de tejidos controles para expresión de CYP2C19. A) Tejido de placenta utilizado como control negativo, fotografía tomada con aumento de 20X B) Tejido de hígado utilizado como control positivo de expresión para MRP2.

Con los datos obtenidos de las inmunohistoquímicas se realizó el cálculo de la sensibilidad y especificidad de la expresión de las proteínas CYP2C19 y MRP2 en relación a CaCU y a VPH (tomando como estándar de oro el resultado de la biopsia y el resultado de infección por VPH). Para ambas proteínas se obtuvo una alta sensibilidad pero baja especificidad como se muestra en las tablas 7 - 10.

Tabla 7. Sensibilidad y Especificidad de la proteína MRP2 en relación al estadio clínico de las pacientes.

Prueba diagnóstica		CaCU	LIEBG + LIEAG	Total
MRP2	Positivo	16	18	34
	Negativo	2	7	9
Total		18	25	43
		<b>Valor</b>	<b>IC (95%)</b>	
Sensibilidad		88,89 %	( 71,59 -100 )	
Especificidad		28 %	( 8,4 -47,6 )	

Índice de validez	53,49 %	( 37,42 -69,56 )
Valor predictivo +	47,06 %	( 28,81 -65,31 )
Valor predictivo -	77,78 %	( 45,06 -100 )
Prevalencia	41,86 %	( 25,95 -57,77 )

Tabla 8. Sensibilidad y Especificidad de la proteína MRP2 en relación a la infección por VPH.

Prueba diagnóstica		Infección VPH		
		SI	NO	Total
MPR2	Positivo	22	12	34
	Negativo	7	2	9
Total		29	14	43
		<b>Valor</b>	<b>IC (95%)</b>	
Sensibilidad		75,86 %	( 58,56 - 93,16 )	
Especificidad		14,29 %	( 0,0 - 36,19 )	
Índice de validez		55,81 %	( 39,81 - 71,82 )	
Valor predictivo +		64,71 %	( 47,17 - 82,24 )	
Valor predictivo -		22,22 %	( 0,0 - 54,94 )	
Prevalencia		67,44 %	( 52,27 - 82,61 )	

Tabla 9. Sensibilidad y Especificidad de la proteína CYP2C19 en relación al estadio clínico de las pacientes.

Prueba diagnóstica		CaCU	LIEBG + LIEAG	Total
CYP2C19	Positivo	11	21	32
	Negativo	5	5	10
Total		16	26	42
		<b>Valor</b>	<b>IC (95%)</b>	
Sensibilidad		68,75 %	( 42,91 - 94,59 )	
Especificidad		19,23 %	( 2,16 - 36,30 )	
Índice de validez		38,10 %	( 22,22 - 53,97 )	

Valor predictivo +	34,38 %	( 16,36 - 52,39 )
Valor predictivo -	50,00 %	( 14,01 - 85,99 )
Prevalencia	38,10 %	( 22,22 - 53,97 )

Tabla 10. Sensibilidad y Especificidad de la proteína CYP2C19 en relación a la infección por VPH.

		Infección VPH		Total
		SI	NO	
Prueba diagnóstica		SI	NO	Total
CYP2C19	Positivo	22	10	32
	Negativo	7	3	10
Total		29	13	42
		<b>Valor</b>	<b>IC (95%)</b>	
Sensibilidad		75,86 %	( 58,56 -93,16 )	
Especificidad		23,08 %	( 0 -49,83 )	
Índice de validez		59,52 %	( 43,49 -75,56 )	
Valor predictivo +		68,75 %	( 51,13 -86,37 )	
Valor predictivo -		30 %	( 0 -63,4 )	
Prevalencia		69,05 %	( 53,88 -84,22 )	

### 8.5.3. Asociación de la expresión de MRP2 y CYP2C19 con los datos clínico patológicos.

La asociación de los principales datos clínicos patológicos de los pacientes con la expresión de MRP2 y CYP2C19 se estudió mediante un análisis de  $X^2$ . Los resultados mostraron que únicamente hay una asociación estadística significativa entre CYP2C19 y la edad de las pacientes mayores de 50 años ( $p=0.03$ ). Para los demás datos no hay una asociación estadística con la expresión de ambas proteínas (Tabla 11 - 12).

**Tabla 11. Relación de MPR2 con variables de interés**

	MRP2	N	Media	Desviación típ.	p
<b>Edad</b>	+	34	39,35	13,978	0.97
	-	9	39,56	16,280	
<b>No. Embarazos</b>	+	34	3,41	2,463	0.37
	-	9	2,56	2,877	
<b>IVSA</b>	+	33	17,36	3,999	0.36
	-	9	18,89	5,645	
<b>Edad de la menarca</b>	+	34	13,09	1,832	0.52
	-	9	13,56	2,404	
<b>Parejas sexuales</b>	+	34	2,32	1,249	0.22
	-	9	1,78	,833	

**Tabla 12. Asociación de CYP2C19 con los datos clínico patológicos.**

	CYP	N	Media	Desviación típ.	p
<b>Edad</b>	+	32	36,53	12,526	0.03
	-	10	47,70	17,538	
<b>No. Embarazos</b>	+	32	3,09	2,277	0.38
	-	10	3,90	3,348	
<b>IVSA</b>	+	31	17,52	4,830	0.84
	-	10	17,20	2,860	
<b>Edad de la menarca</b>	+	32	12,91	1,802	0.40
	-	10	13,50	2,369	
<b>Parejas sexuales</b>	+	32	2,41	1,365	0.09
	-	10	1,80	,789	

## 9. DISCUSIÓN.

El objetivo principal del tratamiento quimioterapéutico es conseguir la muerte de la célula tumoral. Para ello es necesario lograr que la mayor cantidad de fármaco activo posible llegue a su diana molecular en el interior de la célula. Cualquier circunstancia que se interponga o dificulte este objetivo puede ser causa de resistencia.<sup>1</sup> Por ello es de suma importancia determinar los factores que influyen en la variabilidad intraespecífica observada en la respuesta a los fármacos quimioterapéuticos. Las drogas quimioterapéuticas presentan una tasa de éxito de solamente el 30% y varían en gran medida entre pacientes, es por esto que es necesario el uso de biomarcadores que ayuden a determinar la respuesta a la quimioterapia por parte de las pacientes.

Se ha reportado que varias líneas celulares humanas resistentes a Cisplatino sobreexpresan el gen *MRP2*, incluyendo líneas de cáncer de ovario, carcinoma hepatocelular, cáncer de vejiga, de colon y de cabeza y cuello <sup>24,44,45</sup>. Yamasaki y cols (2011), por medio de inmunohistoquímicas, observaron la expresión de esta proteína en tejidos de pacientes con cáncer de esófago y correlaciona con la sobrevida de estos, determinando que *MRP2* está relacionado con la resistencia a Cisplatino y a una menor sobrevida. De igual manera, Yadav y cols. (2008; 2010) reportaron en estudios genómicos que pacientes con cáncer de cabeza y cuello que tienen alelos que codifican para isoformas no funcionales o con función disminuida de *CYP2C19* tienen una menor respuesta a la terapia conformada por cisplatino, 5-FU y radiación<sup>47,48</sup>. Esto sugiere que esta proteína podría tener una participación importante en la respuesta a estas drogas anticancerígenas. Esto convierte a *MRP2* y *CYP2C19* en posible biomarcadores predictivos para la terapia con Cisplatino, sin embargo, no se han realizado estudios que determinen la expresión de estas proteínas en líneas celulares ni en tejido canceroso de cérvix.

En el presente trabajo se determinó la expresión de los genes *MRP2* y *CYP2C19* en cuatro líneas celulares de Cáncer Cervicouterino: C33A, SiHa, CaSKi y HeLa, así como en las líneas controles positivos A549 y HepG2. Esto se hizo por medio de una cuantificación relativa utilizando la técnica de qPCR.

Como se observa en las Gráfica 2 y 3 para *MRP2*, las 5 líneas celulares expresan dicho gen, sin embargo, al comparar las líneas celulares de CaCU con la línea control A549, existe una gran diferencia en los niveles de expresión. A549 es una línea celular que ha sido reportada como resistente a Cisplatino por la participación de *MRP2* en la expulsión de esta droga, y esto podría reflejarse en el nivel de expresión del gen *MRP2*. Si tomamos este dato como base, se podría inferir que la expresión en las líneas de CaCU podría no ser significativa para la participación a la respuesta a la terapia con Cisplatino. Sin embargo, esto no puede ser afirmado hasta no hacer estudios de funcionalidad que permitan analizar el papel que tiene la proteína *MRP2* en la respuesta a Cisplatino en CaCU. Así mismo se determinó la expresión del gen en cérvix normal y se comparó con las líneas celulares, observándose que el cérvix normal tiene una mayor expresión de este gen.

Del mismo modo, para *CYP2C19* se observa en las Gráficas 2 y 5 que las 5 líneas celulares expresan dicho gen, sin embargo, al comparar las líneas celulares de CaCU con la línea control HepG2, existe una gran diferencia en los niveles de expresión, a excepción de la línea CaSKi, que muestra niveles semejantes a HepG2. HepG2 y CaSKi son líneas celulares que han sido reportadas como resistentes a Cisplatino, y las líneas HeLa, SiHa y C33A son sensibles a Cisplatino; la expresión génica de *CYP2C19* coincide con estos datos, lo que podría sugerir una posible participación de *CYP2C19* en la sensibilidad a Cisplatino como lo reportó Yadav y cols. (2008; 2010). Sin embargo, esto no puede ser afirmado hasta no hacer estudios de funcionalidad que permitan analizar el papel que tiene la proteína *CYP2C19* en la respuesta a Cisplatino en CaCU. Así mismo se determinó la expresión del gen en cérvix normal y se

comparó con las líneas celulares, observándose que el cérvix normal tiene una mayor expresión de este gen.

No obstante, la expresión génica no necesariamente representa la expresión a nivel proteico, por esto se determinó la expresión de las proteínas MRP2 y CYP2C19 en las líneas celulares por medio de la técnica de Western Blot.

Para MRP2, las cinco líneas celulares expresan la proteína, siendo aún A549 la que tiene la mayor expresión y CaSKi la que tiene la menor expresión. Al comparar los niveles de expresión génica con los niveles de expresión proteica se observa que no hay una correlación, puesto que la línea C33A tuvo la menor expresión génica de las líneas celulares de CaCU, pero a nivel de proteína es la que mayor expresión tiene. Esto podría deberse a un proceso de reciclaje de ribosomas y el modelo de polirribosomas, o a una menor vida media de los RNAs de las otras líneas celulares.

En el caso de CYP2C19, las cuatro líneas celulares expresan la proteína. La mayor expresión se dio en la línea celular CaSKi, seguida de la línea control HepG2, después C33A y SiHa. La diferencia en la expresión entre SiHa y las otras tres líneas celulares es significativa ( $p < 0.05$ ). La diferencia entre HepG2 y las otras dos líneas celulares de CaCU, CaSKi y C33A, no es significativa. Nuevamente al comparar los niveles de expresión génica con los niveles de expresión proteica se observa que no hay una correlación, lo que podría deberse a un proceso de reciclaje de ribosomas y el modelo de polirribosomas, o a una diferencia en la vida media de los RNAs de las líneas celulares.

Puesto que si se observó una expresión en las líneas celulares utilizadas como modelos de cáncer cervicouterino, se prosiguió a determinar si las proteínas MRP2 y CYP2C19 se expresaban en muestras de tejido tumoral de cérvix de 44 pacientes.

Ambas proteínas tuvieron un alto índice de expresión puesto que se expresaron en la mayoría de los tejidos tumorales de cérvix: para MRP2 34 muestras resultaron positivas (79.1%) mientras que 9 resultaron negativas (20.9%); y para CYP2C19, 33 muestras resultaron positivas (76.7%) mientras que 10 resultaron negativas (23.3%). Aunque ambas proteínas se expresan también en tejido de cérvix normal, se observa que en los tejidos tumorales hay una sobreexpresión, con respecto a las muestras de tejido normal que expresan ambas proteínas solamente en el estrato basa. Los datos encontrados en este trabajo son de gran importancia puesto que no han sido reportados en otros trabajos. Es así que los resultados obtenidos de las inmunohistoquímicas nos muestran que hay dos grupos de tumores: el primero y más predominante, en el que se encuentran los tumores que expresan las proteínas, y los segundos que pierden la expresión proteica de MRP2 y CYP2C19. Para el caso de MRP2 esta pérdida podría estar regulada por procesos epigenéticos <sup>51</sup>, de acuerdo a estos datos, podemos sugerir que en las células del estrato basal de un epitelio sano de cérvix, donde se expresa normalmente la proteína, estas no se encuentran metiladas y que durante los procesos de diferenciación se pueden estar encendiendo mecanismos epigenéticos que regulan la expresión de la proteína en el epitelio sano del cérvix y por ello únicamente se observa la expresión en dichas células. En el epitelio de cáncer de cérvix, en el que se encontró una expresión de la proteína una posible explicación para ello podría ser que de las clonas que expresan MRP2, con un promotor no metilado, estas se expandan manteniendo la expresión de la proteína. Para CYP2C19, los mecanismos de regulación del gen son pocos conocidos, pero se sabe que esta variación puede estar dada por la presencia de polimorfismos en el promotor del gen que podrían estar regulando su expresión, así como factores fisicoquímicos y hormonales<sup>20,52</sup>.

Se ha demostrado que la infección por el virus de papiloma humano es el principal factor de riesgo para el desarrollo del cáncer cervicouterino, generando alteraciones celulares que pueden llevar al desarrollo del cáncer, por lo cual se podría pensar que la expresión de la proteína MRP2 podría tener una relación con

la infección. Al analizar si existe una relación entre la expresión tanto de MRP2 como de CYP2C19, con los datos clínico-patológicos, se encontró únicamente una asociación entre la expresión de CYP2C19 con una edad mayor a 50 años de las pacientes; los demás datos no se relacionan con la expresión de estas proteínas, ni siquiera la infección por VPH. Al parecer, la expresión de estas proteínas es un evento independiente a la infección por VPH. Esta expresión podría ser un mecanismo de respuesta celular o una desregulación de los procesos de transcripción y traducción de la célula. Así mismo, a pesar de que el número de muestras analizadas es pequeña, se ven tendencias de asociación que seguramente se harían estadísticamente significativas si se incrementaran las muestras.

## **10. CONCLUSIÓN.**

Se utilizaron cuatro líneas celulares como modelos de cáncer, puesto que no se tienen datos previos que indiquen la expresión de estos genes en tejido tumoral de cérvix. Al determinar la expresión de los genes, para MRP2 se observó que hay poca síntesis de RNA y para el gen CYP2C19 se observó una expresión variable en las líneas celulares. En resumen, se observa que todas las líneas celulares expresan ambos genes.

A nivel de proteínas se observó que para MRP2 hay un ligero aumento de la expresión respecto a la expresión en RNA, mientras que para CYP2C19 se mantienen variables los niveles de expresión, esto podría deberse a diferencias en la vida media del RNA; lo relevante es que todas las líneas celulares mantienen la expresión a nivel proteico.

Al determinar la expresión de las proteínas MRP2 y CYP2C19 en los tejidos tumorales de cérvix de pacientes, se observó que la mayoría de las muestras fueron positivas para ambas proteínas; esto es lo que se esperaba dados los resultados obtenidos en las líneas celulares, sin embargo, también se identificó un grupo de muestras que no expresó las proteínas. Es así que los resultados obtenidos de las inmunohistoquímicas nos muestran que hay dos grupos de

tumores: el primero y más predominante, en el que se encuentran los tumores que expresan las proteínas, y los segundos que pierden la expresión proteica de MRP2 y CYP2C19. Para el caso de MRP2 esta pérdida podría estar regulada por procesos epigenéticos <sup>51</sup>, probablemente por una metilación aberrante, como lo reportó Tan y cols. (2009) en pacientes con cáncer de páncreas; para CYP2C19, esta variación puede estar dada por la presencia de polimorfismos en el promotor del gen que podrían estar regulando su expresión, así como factores fisicoquímicos y hormonales<sup>20,52</sup>.

Con base al trabajo de Mendoza y col. (En preparación) en donde observaron una asociación entre la expresión de la proteína CRBP1 y la quimiosensibilidad al tratamiento con Cisplatino en pacientes con CaCU, reportaron que la mayoría de los pacientes presentan quimioresistencia, lo que coincide con el grupo que presenta la expresión para la proteína MRP2. Esto sugiere que potencialmente podría haber una asociación entre esta proteína y la quimioresistencia. Para el caso de CYP2C19 aparentemente pudiera apoyar también la quimioresistencia de la mayoría de las pacientes, no obstante aún no es posible afirmar una completa asociación con la resistencia, puesto que Yadav y cols. (2008, 2010) sugirieron una asociación de CYP2C19 con la sensibilidad a Cisplatino.

<b>Expresión</b>	<b>MRP2</b>	<b>CYP2C19</b>
Positiva	34 (79.1%)	33 (76.7%)
Negativa	9 (20.9%)	10 (23.3%)
Total	43 (100%)	43 (100%)

Con respecto a los datos clínico-patológicos de las pacientes, únicamente se encontró una asociación entre la expresión de CYP2C19 y una edad mayor a 50 años; ninguno de los otros datos se relaciona con la expresión de las proteínas MRP2 y CYP2C19. Esto podría sugerir que aquellas mujeres de edad mayor, que están en menopausia y postmenopausia podrían ser las pacientes en mayor riesgo y quimioresistentes, por lo que tendrían fallo a la respuesta a la quimioterapia.

## 11.PERSPECTIVAS.

- Utilizar un modelo con líneas celulares de cérvix que no expresen el gen *MRP2* para evaluar quimiosensibilidad y de esta manera conocer si su expresión está relacionada a la respuesta a las drogas quimioterapéuticas.
- Utilizar un modelo con líneas celulares de cérvix, que expresen y no expresen el gen *CYP2C19* para evaluar quimiosensibilidad y de esta manera conocer si su expresión está relacionada a la respuesta a las drogas quimioterapéuticas.
- Evaluar la influencia que podrían tener los distintos polimorfismos presentes en *CYP2C19* en la respuesta a las drogas quimioterapéuticas

## 12. REFERENCIAS LITERARIAS.

1. **Sánchez-Suarez P, Benitez-Bribiesca L.** Procesos Biomoleculares de la Resistencia a Drogas. *Cancerología*. 2006;1:187-199.
2. **Ruiter R, Bijl MJ, van Schaik RHN, et al.** CYP2C19\*2 polymorphism is associated with increased survival in breast cancer patients using tamoxifen. *Pharmacogenomics*. 2010;11(10):1367-1375.
3. **Granados López AJ, López JA.** Multistep Model of Cervical Cancer: Participation of miRNAs and Coding Genes. *Int J Mol Sci*. 2014;15(9):15700-15733.
4. **Globocan.** Fact Sheets by Population. 2012. [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_population.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx). Accessed September 12, 2014.
5. **Bustamante-Montes LP, Alvarez-Solorza I, Domínguez Valencia Á, Hernández-Valero MA.** Aplicabilidad del análisis por causa múltiple de muerte para el cáncer cervicouterino: La experiencia en México. *Cienc y Saúde Colect*. 2011;16(12):4815-4821.
6. **PAHO.** *Perfil Del Cáncer: México*.; 2011. [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_download&gid=24072&Itemid=.](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=24072&Itemid=)
7. **Dominguez E.** Factores de riesgo para desarrollar Cáncer Cérvico Uterino en pacientes atendidas en el Centro Estatal de Cancerología “Dr. Miguel Dorantes Mesa.” 2009.
8. **Hidalgo-Martínez AC.** El cáncer cérvico-uterino, su impacto en México y el porqué no funciona el programa nacional de detección oportuna. *Rev Biomed*. 2006;17(5):81-84.
9. **Stanley CA, Baker L.** Improved treatment for cervical cancer — Concurrent chemotherapy and radiotherapy. *New Engl J Med Ed*. 1999.
10. **Chavaro Vicuña N, Arroyo Hernández G, Alcázar LF.** Cáncer cervicouterino. *An Radiol México*. 2009:61-79.
11. **Ortega-Cervantes L, Rojas-García AE, Robledo-Marengo MDL, et al.** Morbidity of breast cancer and cervico-uterine cancer in women from the Occidental region of Mexico. *Rev Investig Clínica*. 2013;65(3):221-227.
12. **Jo’s Cervical Cancer Trust.** Abnormal cervical cells and treatment. <http://www.jostrust.org.uk/about-cervical-cancer/cervical-screening-smear->

- test-and-abnormal-cells/abnormal-cervical-screening-results. Accessed July 14, 2015.
13. **The Human Protein Atlas.** Dictionary - Normal: Cervix, uterine. <http://www.proteinatlas.org/learn/dictionary/normal/cervix,+uterine/detail+2>. Accessed July 14, 2015.
  14. **Intercollegiate S, Network G.** Management of cervical cancer. (SIGN Guideline No 99). 2008;(January).
  15. **Cáncer IN del.** Cáncer de cuello uterino: Tratamiento (PDQ®) - National Cancer Institute. 2014. <http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/cuellouterino/Patient/page4>. Accessed September 15, 2014.
  16. **Hassen N.** Chemotherapeutic drugs, 5-fluorouracil and cisplatin, differentially affect expression of drug metabolising enzyme genes in an oesophageal cancer cell line. 2014.
  17. **Scibona P, Angriman F, Simonovich V, Heller MM, Belloso WH.** Farmacogenómica cardiovascular. *Arch Cardiol México*. 2014;84(1).
  18. **Crews KR, Hicks JK, Pui C-H, Relling M V, Evans WE.** Pharmacogenomics and individualized medicine: translating science into practice. *Clin Pharmacol Ther*. 2012;92(4):467-475.
  19. **Waxman DJ, Chen L, Hecht JE, Jounaidi Y.** Cytochrome P450-based cancer gene therapy: recent advances and future prospects. *Drug Metab Rev*. 1999;31(2):503-522.
  20. **Burns KE.** Acquired Loss of Function of CYP2C19 in Cancer Patients : Studies to Determine the Prevalence and the Possible Molecular Mechanisms of This Genotype- Phenotype Discordance. 2014.
  21. **Henry NL, Hayes DF.** Cancer biomarkers. *Mol Oncol*. 2012;6(2):140-146.
  22. **La Thangue NB, Kerr DJ.** Predictive biomarkers: a paradigm shift towards personalized cancer medicine. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011;8(10):587-596.
  23. **Persidis A.** Cancer multidrug resistance. *Nat Biotechnol*. 2000;18:18-20.
  24. **Sodani K, Patel A, Kathawala RJ, Chen ZS.** Multidrug resistance associate proteins in multidrug resistance. *Chin J Cancer*. 2012;31(2):58-73.

25. **Gerk PM, Vore M.** Regulation of expression of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) and its role in drug disposition. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;302(2):407-415.
26. **Yamasaki M, Makino T, Masuzawa T, et al.** Role of multidrug resistance protein 2 (MRP2) in chemoresistance and clinical outcome in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2011;104(4):707-713. doi:10.1038/sj.bjc.6606071.
27. **Del Arco C.** Metabolismo de los fármacos. In: Masson E, ed. *Farmacología Humana.* Vol 5th ed. ; 2003.
28. **Donato MT.** ¿Qué es el citocromo P-450 y cómo funciona? *An la Real Acad Nac Farm.* 2004:32-43.
29. **Gallego A, de Sande M, Marín A, Blanco S, González M.** *Aspectos Fundamentales Del Citocromo P450.*; 2011.
30. **Castell J V.** El metabolismo de fármacos, generación de metabolitos reactivos y su papel en el origen de las reacciones inmunológicas a fármacos. 2006:95-123.
31. **Rodriguez-Antona C, Ingelman-Sundberg M.** Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer. *Oncogene.* 2006;25(11):1679-1691.
32. **Nelson DR, Zeldin DC, Hoffman SMG, Maltais LJ, Wain HM, Nebert DW.** Comparison of cytochrome P450 ( CYP ) genes from the mouse and human genomes , including nomenclature recommendations for genes , pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics.* 2004;14(1):1-18.
33. **Danielson PB.** The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Curr Drug Metab.* 2002;3(6):561-597.
34. **Coutiño E, Purata A, Cruz PH.** C ITOCROMO P450 B IOMARCADOR DE E XPOSICIÓN T ERAPEÚTICO- T OXICOLÓGICO - C ARCINOGENICO \* . 2010;29(2):39-52.
35. **Whirl-Carrillo M, Mcdonagh EM, Hebert JM, et al.** CYP2C19. *Clin Pharmacol Ther.* 2012;92(4):414-417. <http://www.pharmgkb.org/gene/PA124?tabType=tabVip>. Accessed August 4, 2014.
36. **Ortiz de Montellano PR, De Voss JJ.** Oxidizing species in the mechanism of cytochrome P450. *Nat Prod Rep.* 2002;19:477-493.

37. **Hamdane D, Zhang H, Paul H.** Oxygen Activation by Cytochrome P450 Monooxygenase. 2008;98:657-666.
38. **Sirim D, Widmann M, Wagner F, Pleiss J.** Prediction and analysis of the modular structure of cytochrome P450 monooxygenases. *BMC Struct Biol.* 2010;10:34. doi:10.1186/1472-6807-10-34.
39. **Weizmann Institute of Science.** CYP2C19. *Gene Cards.* 2014.
40. **Saeed LH, Mayet AY.** Genotype-phenotype analysis of CYP2C19 in healthy saudi individuals and its potential clinical implication in drug therapy. *Int J Med Sci.* 2013;10(11):1497-1502.
41. **Chiba K, Shimizu K, Kato M, Nishibayashi T, Terada K.** Prediction of inter-individual variability in pharmacokinetics of CYP2C19 substrates in humans . *Drug Metab Pharmacokinet.* 2014:1-39.
42. **Winter JM, Yeo CJ, Brody JR.** Diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers in pancreatic cancer. *J Surg Oncol.* 2013;107(1):15-22.
43. **Mendoza-Rodriguez M, Arreola H, Valdivia A, et al.** Cellular retinol binding protein 1 could be a tumor suppressor gene in cervical cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2013;6(9):1817-1825.
44. **Taniguchi K, Wada M, Kohno K, Nakamura T.** A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation. *Cancer Res.* 1996;56:4124-4129.
45. **Materna V, Liedert B, Thomale J, Lage H.** Protection of platinum- DNA adduct formation and reversal of cisplatin resistance by anti-MRP2 hammerhead ribozymes in human cancer cells. *Int J Cancer.* 2005;115:393-402.
46. **Kattel K, Evande R, Tan C, Mondal G, Grem JL, Mahato RI.** Impact of CYP2C19 polymorphism on the pharmacokinetics of nelfinavir in patients with pancreatic cancer. *Br J Clin Pharmacol.* March 2015.
47. **Yadav SS, Ruwali M, Shah PP, et al.** Association of poor metabolizers of cytochrome P450 2C19 with head and neck cancer and poor treatment response. *Mutat Res.* 2008;644(1-2):31-37.
48. **Yadav SS, Ruwali M, Pant MC, Shukla P, Singh RL, Parmar D.** Interaction of drug metabolizing cytochrome P450 2D6 poor metabolizers with cytochrome P450 2C9 and 2C19 genotypes modify the susceptibility to head and neck cancer and treatment response. *Mutat Res.* 2010;684(1-2):49-55.

49. **Tavera Tapia A.** Determinación de los niveles de expresión de algunos genes en líneas celulares de cáncer de mama y su posible uso como biomarcadores. 2012.
50. **Perales Romero S.** Proliferación y Apoptosis en células de músculo liso arteriales en cultivo. 2005.
51. **Tan AC, Jimeno A, Lin SH, et al.** Characterizing DNA methylation patterns in pancreatic cancer genome. *Mol Oncol.* 2009;3(5-6):425-438.
52. **Helsby NA, Burns KE.** Molecular mechanisms of genetic variation and transcriptional regulation of CYP2C19. *Front Genet.* 2012;3(October):206.