



**Universidad
de Cartagena**
Fundada en 1827

**UNIVERSIDAD DE CARTAGENA
FACULTAD DE MEDICINA
ESPECIALIZACIÓN EN PATOLOGÍA**

**EXPRESIÓN DE GENES CANDIDATOS EN LA PROGRESIÓN DE LESIONES
PREMALIGNAS ESCAMOSAS DEL CUELLO UTERINO**

**REINHARD RODRÍGUEZ SCHOTBORGH MD
ESTEBANA INÉS BENEDETTI PADRÓN, MD, PhD**

CARTAGENA DE INDIAS D. T. H. Y C.

2021



**Universidad
de Cartagena**
Fundada en 1827

**EXPRESIÓN DE GENES CANDIDATOS EN LA PROGRESIÓN DE LESIONES
PREMALIGNAS ESCAMOSAS DEL CUELLO UTERINO**

REINHARD RODRÍGUEZ SCHOTBORGH

Trabajo de grado para optar al título de Especialista en PATOLOGÍA

TUTORA:

ESTEBANA INÉS BENEDETTI PADRÓN, MD, PhD

ESPECIALIZACIÓN EN PATOLOGÍA

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD DE CARTAGENA

2021



**Universidad
de Cartagena**
Fundada en 1827

Nota de aceptación

Jurado

Jurado

Jurado

 1827 ¡Siempre a la altura de los tiempos!	UNIVERSIDAD DE CARTAGENA Fundada en 1827		FECHA		
			DD	MM	AAAA
	CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR		30	03	2021

1. Presentación del trabajo, (trabajo de grado, investigación o tesis).

Código	Documento de identidad		Apellidos	Nombres	Correo electrónico
	Tipo	Número			
	CC	1140854766	Rodríguez S.	Reinhard	reinhardrodriguez@gmail.com
Programa	Especialización en Patología				
Facultad	Medicina				
Título al que opta	Especialista en Patología				
Asesor	Estebana Inés Benedetti Padrón				
Título de la Obra: EXPRESIÓN DE GENES CANDIDATOS EN LA PROGRESIÓN DE LESIONES PREMALIGNAS ESCAMOSAS DEL CUELLO UTERINO.					
Palabras Clave (materias): Cáncer de cérvix, TMEM45A, RBP1, Microarreglo de tejido					

2. Autorización de publicación de versión electrónica del trabajo de grado, (trabajo de grado, investigación o tesis).

Con esta autorización hago entrega del trabajo de grado (investigación o tesis) y de sus anexos (si existen), de forma gratuita en forma digital o electrónica (CD-ROM, DVD) y doy plena autorización a la Universidad de Cartagena, de forma indefinida, para que en los términos establecidos en la ley 23 de 1982, la Ley 44 de 1993, leyes y jurisprudencia vigente al respecto, haga la publicación de éste, con fines educativos. Esta autorización, es válida sobre la obra en formato o soporte material, digital, electrónico o virtual, para usos en red, internet, intranet, biblioteca digital o cualquier formato conocido o por conocer.

EL AUTOR, expresa que el trabajo de grado (investigación o tesis) objeto de la presente autorización, es original y la elaboró sin quebrantar ni suplantar los derechos de autor de terceros, de tal forma que el Trabajo es de su exclusiva autoría y tiene la titularidad sobre éste. En caso de queja o acción por parte de un tercero referente a los derechos de autor sobre el trabajo de grado en cuestión EL AUTOR, asumirá la responsabilidad total, y saldrá en defensa de los derechos aquí autorizados; para todos los efectos, la Universidad de Cartagena actúa como un tercero de buena fe. Toda persona que consulte ya sea la biblioteca o en medio electrónico podrá copiar apartes del texto citando siempre las fuentes, es decir el título del trabajo, autor y año.

Esta autorización no implica renunciar a la facultad que tengo de publicar total o parcialmente la obra. La autorización debe estar respaldada por las firmas de todos los autores del trabajo de grado.

Si autorizo

3. Firmas

Firma Autor 1  Reinhard Rodríguez Schotborgh	Firma Autor 2  Inés Benedetti Padrón
Firma Autor 3 _____ 	Firma Autor 4 _____

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo es fruto del arduo esfuerzo y constancia de inicio a fin, producto de la confianza depositada por mis docentes y tutora, y del apoyo incondicional brindado por mi familia y seres queridos.

La especialidad de patología resultó ser un camino fascinante; lejos de ser una especialización tranquila y sin altibajos. La búsqueda del conocimiento siempre conlleva a grandes riesgos, y moverse en el filo del abismo de lo que no se conoce se convierte en el pan de cada día para los patólogos. Creo que este trabajo me enseñó lo admirable que resulta esta especialidad, además que se requiere mucho valor y amor para ejercerla apropiadamente. Estaré en deuda siempre con la universidad por tan valiosa lección.

Quisiera agradecer a mis padres Reinaldo y Natalia, siempre prestos a escuchar mis dudas, muy atentos a mis necesidades y, sobre todo, incondicionales para brindarme todo el amor y el apoyo que requiriese. A mis hermanos: Richard, Natalia y Daniel; agradezco a los tres por ser mi inspiración. La admiración y la confianza ciega que depositan en mí resulta ser el motor que me impulsa a seguir alcanzando nuevos objetivos. Este trabajo, se lo dedico a mi familia como muestra de que no hay meta que no sea alcanzable con dedicación y entrega. Gracias a ustedes por siempre ser mi faro.

A las doctoras Lía e Inés, tutoras, docentes, maestras, personas ejemplares dignas de toda admiración y aprecio. Yo no sería la persona académica y formada de no ser por sus enseñanzas. Han tenido la paciencia de verme intentar (y a veces fallar), la virtud de guiarme por este arduo camino de la investigación, y la delicadeza para dirigir al grupo de investigación, cuna de mi formación investigativa. Prometo atesorar cada charla, cada enseñanza, así como honrar y retribuir todo lo que ustedes me han enseñado.

Al departamento de Patología también quiero extender un agradecimiento. A mis docentes, quienes fueron testigos de mi esfuerzo y siempre recompensaron mi dedicación. Tengan la seguridad que dejaré el nombre del programa muy en alto, dando testimonio de la calidad formativa del programa. El laboratorio de patología que me vio crecer siempre será mi hogar, y ustedes mi segunda familia.

Al Centro de Diagnóstico Citopatológico del Caribe también quiero agradecerles por todo el apoyo y la disposición mostrada para la realización de este trabajo. La diligencia ha sido admirable. Extiendo los agradecimientos a la familia Redondo y de Oro, al Dr. Cesar, la Dra. Katherine, y por supuesto a todo el personal administrativo de esta empresa familiar. Su unidad es un ejemplo e inspiración.

Finalmente, quiero agradecer a mis compañeros de residencia, todos ellos contribuyeron a su manera a la realización de este trabajo. Luchamos hombro con hombro, pasamos por momentos difíciles y siempre salimos adelante con una sonrisa. Me llevo de ustedes amistades entrañables y duraderas. Una de ellas colaboró de manera especial a este trabajo, a Diana, sabes que sin tu apoyo tampoco pudiera estar aquí, eres una amiga que atesoraré toda esta vida.

Espero que este trabajo deje una huella en mis compañeros residentes por venir. Que al ver este trabajo se contagien de ese querer ser su mejor versión y que nunca pierdan la fé en sí mismos. Eso es lo único que hace falta para alcanzar grandes metas. Muchas gracias.

CONTENIDO

	pág.
AGRADECIMIENTOS	9
LISTA DE TABLAS	14
LISTA DE GRÁFICAS	15
LISTA DE ANEXOS	16
LISTA DE ABREVIATURAS	17
RESUMEN	20
ABSTRACT	22
INTRODUCCIÓN	24
Técnica de microarreglo de tejido	26
Técnicas de hibridación in situ cromogénica	28
Estado del arte	29
Genes evaluados	30
OBJETIVOS	34
METODOLOGÍA	35
Diseño del estudio y población	35
Cálculo de muestra	36
Selección de muestras	36
Construcción del microarreglo de tejidos	37
Evaluación de la expresión de ARNm mediante CISH	38
Análisis estadístico	39
Aspectos éticos	39
RESULTADOS	41
DISCUSIÓN	47
CONCLUSIONES	55
CONFLICTOS DE INTERESES	56
FINANCIACIÓN	56
BIBLIOGRAFÍA	79

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Resultados de los casos de patología cervical, años 2017-2018.....	69
Tabla 2 Tipo de procedimiento por grupo de edad	70
Tabla 3 Tipo de lesión por grupo de edad	70
Tabla 4 Características de las muestras incluidas en el microarreglo de tejido	71
Tabla 5 Resultados de ARNm CISH de acuerdo con cada gen.....	72
Tabla 6 Promedio de Puntaje para la expresión CISH de ARNm de acuerdo con cada gen	73
Tabla 7 Valores de p en pruebas en prueba t de Student y ANOVA, de acuerdo con cada gen	73
Tabla 8 Resumen de estudios con uso de microarreglos de tejido de cuello uterino en su metodología	74

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Flujograma de proceso de selección de casos para microarreglo de tejido.	57
Gráfica 2. Distribución de casos de patología cervical por año.	58
Gráfica 3. Distribución de casos de patología cervical por grupo de edad.	58
Gráfica 4. Distribución de casos de patología cervical por procedimiento.	59
Gráfica 5. Distribución de casos de patología cervical por diagnóstico.	59
Gráfica 6. Distribución de casos de patología cervical por diagnóstico y grupo de edad.....	60
Gráfica 7. Distribución de casos de patología cervical por procedimiento y grupo de edad.....	61
Gráfica 8. Marcación con CISH para ARNm de TMEM45A en tejido cervical sano, con LIE-BG y con LIE-AG, en microarreglo de tejido de cuello uterino humano....	62
Gráfica 9. Diferencias en el promedio de la expresión CISH de ARNm de TMEM45A.....	63
Gráfica 10. Marcación con CISH para ARNm de RBP1 en tejido cervical sano, con LIE-BG y con LIE-AG, en microarreglo de tejido de cuello uterino humano..	64
Gráfica 11. Diferencias en el promedio de la expresión CISH de ARNm de RBP1..	65
Gráfica 12. Marcación con CISH para ARNm de KRT16 en tejido cervical sano, con LIE-BG y con LIE-AG, en microarreglo de tejido de cuello uterino humano..	66
Gráfica 13. Diferencias en el promedio de la expresión CISH de ARNm de KRT16.....	67

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 175
ANEXO 277

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico de cadena complementaria

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ARNs: ácido ribonucleico de cadena única

CENDIPAT: Centro de diagnóstico Citopatológico del caribe

CISH: hibridación *in situ* cromogénica

FISH: hibridación *in situ* fluorescente

HDAC: deacetilasa de histonas

KRT16: citoqueratina 16

LIE: lesión intraepitelial

LIE-AG: lesión intraepitelial de alto grado

LIE-BG: lesión intraepitelial de bajo grado

NIC: neoplasia intraepitelial cervical

OMS: organización mundial de la salud

PCR-RT: reacción en cadena de polimerasa en tiempo real

RBP1: proteína fijadora de retinol 1

TMA: Microarreglo de tejido

TMEM45a: proteína de dominio transmembrana 45a

VPH: virus del papiloma humano

VPH-AR: genotipo de alto riesgo oncogénico del virus de papiloma humano

RESUMEN

EXPRESIÓN DE GENES CANDIDATOS EN LA PROGRESIÓN DE LESIONES PREMALIGNAS ESCAMOSAS DEL CUELLO UTERINO

Rodríguez Schotborgh, Reinhard (1), Benedetti Padrón Inés (2)

(1) Estudiante de Postgrado de Tercer Año. Especialización en Patología. Facultad de Medicina. Universidad de Cartagena.

(2) Médico Patólogo, Doctora en Ciencias Biomédicas, Especialista en Docencia Universitaria, Profesor titular Facultad de Medicina. Universidad de Cartagena.

Introducción: Aunque la presencia del virus del papiloma humano (VPH) es un importante factor carcinogénico para el desarrollo del carcinoma de cuello uterino, las evidencias recientes confirman que la infección no es exclusiva ni suficiente para su desarrollo, planteando la existencia de factores genéticos independientes del virus que determinen la historia natural de esta neoplasia. Partiendo de resultados previos de expresión génica diferencial entre el tejido con lesión intraepitelial escamosa de alto grado y el tejido cervical sano, obtenidos mediante microarreglos de ADNc, se estudió la expresión de los genes *TMEM45A*, *KRT16* y *RBP1*, los cuales participan respectivamente en el control de la apoptosis, diferenciación y proliferación celular de los epitelios escamosos, con el fin de determinar su posible participación en la patogénesis de las lesiones premalignas escamosas de cuello uterino.

Objetivo: Evaluar, mediante hibridación *in situ* cromogénica (CISH), la expresión, a nivel de ARNm de los genes *TMEM45A*, *KRT16* y *RBP1* en tejido cervical sano y tejido cervical con lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LIE-BG) y con lesión intraepitelial escamosa de alto grado (LIE-AG).

Metodología: Se evaluó la expresión diferencial de los genes candidatos, mediante un microarreglo de tejido construido a partir de especímenes de cuello uterino

(conización o histerectomía) de pacientes referidas a un laboratorio de referencia (165 casos, edad promedio 35.37 años DE ± 10.4). Se incluyeron muestras de tejido cervical sano, con LIE-BG y con LIE-AG. Se realizó CISH mediante ensayo de RNAscope® 2.5HD Red con sondas específicas para cada uno de los genes evaluados. La tinción fue evaluada por dos patólogos entrenados, calculándose puntuaciones de tinción para cada marcador basadas en una escala semicuantitativa, que fueron comparadas mediante prueba de t de Student y ANOVA. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

Resultados: La expresión de ARNm de *RBP1* (Media 1.12 DE ± 1.41) fue significativamente mayor en LIE-AG comparado con LIE-BG y con el tejido cervical sano ($p < 0.001$). Las expresiones de *TMEM45A* y *KRT16* no presentaron diferencias significativas entre los tipos de tejidos estudiados.

Conclusiones: La evaluación *in situ* de ARNm de *RBP1* muestra expresión diferencial en LIE-AG contra LIE-BG y el tejido cervical sano, confirmando el hallazgo encontrado en el perfil génico previamente realizado. Se requieren de estudios a nivel de proteína para complementar estos resultados.

Palabras clave:

Carcinoma de cérvix, *TMEM45A*, *RBP1*, *KRT16*, microarreglos de tejido.

ABSTRACT

EXPRESSION OF CANDIDATE GENES IN THE PROGRESSION OF SQUAMOUS PREMALIGNANT LESIONS OF UTERINE CERVIX.

Rodríguez Schotborgh, Reinhard (1), Benedetti Padrón Inés (2)

(1) Third Year Postgraduate Student. Specialization in Pathology. School of Medicine. University of Cartagena.

(2) Pathologist, PhD. Biomedical Sciences, Specialist in University Teaching, Professor, School of Medicine. University of Cartagena.

Introduction: Although the presence of the Human Papillomavirus (HPV) is an important carcinogenic factor for the development of uterine cervical carcinoma, recent evidence confirms that the infection is neither exclusive nor sufficient for its development, suggesting the existence of virus-independent genetic factors that determine the natural history of this neoplasm. Based on previous results of differential gene expression between tissue with high-grade squamous intraepithelial lesion and healthy cervical tissue, obtained using cDNA microarrays, the expression of the *TMEM45A*, *KRT16* and *RBP1* genes was studied, which participate respectively in the control of apoptosis, differentiation and cell proliferation of squamous epithelium, in order to determine their possible participation in the pathogenesis of these lesions.

Objective: To evaluate, using chromogenic in situ hybridization (CISH), the expression, at the mRNA level, of the *TMEM45A*, *KRT16* and *RBP1* genes, in healthy cervical tissue and cervical tissue with low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) and high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL).

Methods: The differential expression of candidate genes was evaluated using a tissue microarray constructed from cervical specimens (conization or hysterectomy) from patients referred to a reference laboratory (165 cases, mean age 35.37 years SD \pm 10.4). Healthy cervical tissue samples, with LSIL and with HSIL were included.

CISH was performed using the RNAscope® 2.5HD Red assay, with specific probes for each evaluated gene. Staining was evaluated by two trained pathologists, staining scores for each marker were obtained based on a semi-quantitative scale and compared using Student's t-test and ANOVA. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results: The expression of *RBP1* mRNA (Mean 1.12 SD \pm 1.41) was significantly higher in HSIL when compared to LSIL and to healthy cervical tissue ($p < 0.001$). The expressions of *TMEM45A* and *KRT16* did not show significant differences between the tissues samples studied.

Conclusions: The *in situ* RNAm evaluation of *RBP1* shows differential expression between HSIL when compared to LSIL and to healthy cervical tissue, confirming the finding of the previously performed gene profile. Protein-level studies are required to complement these results.

Keywords:

Cervical carcinoma, *TMEM45A*, *RBP1*, *KRT16*, tissue microarrays.

INTRODUCCIÓN

Actualmente se considera la infección por los genotipos de alto riesgo del virus del papiloma humano (VPH-AR) como condición necesaria para el desarrollo de carcinoma de cuello uterino y de sus lesiones premalignas (1, 2). Sin embargo, la sola presencia del virus no es suficiente para explicar la variedad de lesiones patológicas y condiciones clínicas en las pacientes afectadas (3). Se describen numerosos factores relacionados con la infección y la interacción del virus con el huésped que permiten entender la variabilidad en la progresión desde la infección hasta la lesión invasora. Este fenómeno, refuerza el concepto de que existen factores genéticos y epigenéticos adicionales, como la activación de oncogenes o inactivación de genes supresores de tumor, importantes en la historia natural de esta neoplasia (4).

A nivel mundial, el cáncer de cuello uterino corresponde a la cuarta neoplasia maligna más común en mujeres en el mundo, con una incidencia de 13.3 casos por 100.000 habitantes año (5, 6). Asimismo, corresponde a la segunda causa de muerte por cáncer más común en mujeres de 14 a 44 años, manteniéndose estable en esta posición al compararla con diversos grupos de desarrollo. En Colombia, cerca de 4272 mujeres son diagnosticadas con cáncer de cuello uterino al año, y cerca de 2490 mueren por esta enfermedad (6). Por lo tanto, se considera que la enfermedad corresponde a un problema en salud pública, que afecta a mujeres relativamente jóvenes, reflejando el impacto que presenta para la población productiva. Asimismo, lentamente se ha ido alejando de aquellos paradigmas de la inequidad en la atención. Si bien es cierto que aqueja más a la población de países con bajo y medio nivel de desarrollo de bienestar humano, las estrategias de tamización y vacunación han disminuido esas brechas (7).

El desarrollo del cáncer de cuello uterino se encuentra fuertemente vinculado a la infección por VPH-AR, y al mismo tiempo, relacionado con la presentación de lesiones intraepiteliales de alto grado como lesiones precursoras (3, 8). Se reconoce

que cerca del 90 al 95% de los carcinomas de cuello uterino se originan de una infección persistente por genotipos de alto riesgo del virus del papiloma humano (como lo son 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 66). Sin embargo, existe información que valida la presencia de un grupo de carcinomas de cuello uterino no asociados a la infección por VPH-AR, siendo más agresivos incluso que sus contrapartes asociadas a la infección y reforzando la presencia de otros factores genéticos relacionados con la progresión de esta neoplasia (9).

Las lesiones precursoras del carcinoma infiltrante en cuello uterino representan la progresión tumoral desde el epitelio sano hasta la lesión infiltrante. Estas lesiones se caracterizan microscópicamente por una serie de manifestaciones que van de la atipia celular a diversos grados de displasia o neoplasia intraepitelial cervical (NIC), entendiendo estas como estadios iniciales dentro de una secuencia predecible antes de progresar a la lesión invasora (4, 8). En 1988 se creó el término "lesión intraepitelial escamosa" (LIE) para designar a estos estadios intermedios previos a la presentación de la invasión. Las lesiones intraepiteliales escamosas se clasifican en dos grados: lesiones de bajo grado (LIE-BG) y lesiones de alto grado (LIE-AG). Los cambios condilomatosos planos y exofíticos (atipia coilocítica o cambios celulares asociados al VPH) y la NIC de bajo grado o NIC 1, hacen parte del espectro de lesiones denominadas LIE-BG, mientras el LIE-AG abarca una serie de lesiones que van desde el NIC 2 y NIC 3 e incluyendo el carcinoma in situ. Esta clasificación refleja una separación radical que permite distinguir a un grupo de lesiones con bajo potencial de transformación maligna, de aquellas que presentan un riesgo elevado de progresión, dirigiendo un enfoque de tamizaje, diagnóstico y tratamiento completamente divergente (8).

Actualmente se plantea que las lesiones intraepiteliales representan una progresión no escalonada, cada una con riesgos independientes de transformación a carcinoma invasor. Estas diferencias estarían relacionadas con las alteraciones del huésped y las interacciones del virus con las células epiteliales escamosas (3, 4, 8).

La detección y el manejo de las lesiones intraepiteliales escamosas en cuello uterino representan entonces un tema importante desde el punto de vista de salud pública, planteado como parte integral dentro de los programas de promoción y prevención de la salud de la mujer desde hace cerca de medio siglo (2). Se ha demostrado que todos los esfuerzos que conlleven a un mayor entendimiento de la enfermedad, mejora en las actitudes y aptitudes ante el diagnóstico temprano y manejo oportuno de estas lesiones resultan en una disminución significativa de la incidencia de lesiones invasoras (4).

Existe la necesidad de generar nuevo conocimiento acerca de las rutas moleculares del carcinoma de cuello uterino. Así como en otras neoplasias, el entendimiento de la biología tumoral y los mecanismos de progresión permiten proponer blancos moleculares que permitan la detección temprana, el tratamiento oportuno y en últimas aumenten la expectativa de vida de las pacientes afectadas con esta enfermedad (10).

Técnica de microarreglo de tejido

La revolución tecnológica ha permitido el desarrollo de nuevas técnicas que permiten estudiar a las neoplasias desde un enfoque molecular, cambiando el paradigma que permita un análisis más profundo de esta neoplasia. Técnicas disponibles desde hace ya varios años, como los estudios de microarreglos de tejidos permiten evaluar simultáneamente el perfil de expresión de genes, transcritos y proteínas de múltiples muestras de lesiones, abriendo un camino hacia la comprensión de los mecanismos genéticos involucrados en la carcinogénesis (11).

Los microarreglos de tejido son bloques de parafina que contienen múltiples muestras de tejido, susceptibles de aplicar simultáneamente diferentes tipos de técnicas sobre un mismo portaobjeto, que pueden abarcar desde técnicas convencionales como tinciones de rutina tipo Hematoxilina-Eosina, pasando por

tinciones de histoquímica, hasta técnicas de inmunohistoquímica e hibridación in situ. Se basan en un sistema originalmente descrito por Héctor Batifora en 1986 (12), el cual se ha perfeccionado mediante variaciones a la técnica de acuerdo a las necesidades y objetivos de su uso. Nació como una técnica que permite ahorrar tiempo, anticuerpos y mantener condiciones idénticas en la realización de técnicas de inmunohistoquímica. Con los recientes avances en el campo de la genómica que investiga el desarrollo del cáncer, se hizo necesario mejorarla para que permitiera un rápido análisis de marcadores moleculares en cientos de muestras simultáneamente. Lo cual motivó a Kononen y cols. en 1998 (13) a la descripción y realización de una técnica automatizada denominada: "Tissue Microarrays", valiéndose de un aparato denominado "tissue arrayer", una herramienta que permite disponer hasta mil cilindros de tejido en un mismo bloque. Desde entonces, han aumentado considerablemente los estudios de investigación empleando la técnica de microarreglos de tejidos, demostrando que representa una alternativa más barata y efectiva de análisis de perfiles biológicos y moleculares de múltiples tejidos de manera simultánea (14).

Dentro de las utilidades de los microarreglos de tejidos tenemos los siguientes: estudio de la progresión tumoral, tamizaje de todo el espectro de una neoplasia, establecimiento de perfiles moleculares de tumores, validación de datos de tamización de los microarreglos de ADN complementario (ADNc) y otras técnicas parecidas, probar y optimizar sondas y anticuerpos, obtención de muestras para extracción de ADN, docencia y control de calidad a fin de mejorar la interpretación estandarizada de resultados, entre otras (11, 15) .

La principal ventaja de la utilización de ésta técnica es la reducción significativa de tiempo y costo para su realización, debido a la rápida velocidad en el procesamiento de las muestras, la posibilidad de análisis simultáneo y estandarizado de múltiples muestras con la existencia de un área de tamaño suficiente para analizar, que se puede realizar manualmente con agujas de diferentes diámetros usados para biopsias percutáneas, en contraste con las técnicas tradicionales que requieren

procesar centenares de laminillas, con el costo en reactivos y tiempo que se hacen más onerosos en la medida que se hacen estudios más sofisticados como son los análisis moleculares (hibridación in situ o inmunohistoquímica) (16).

Técnicas de hibridación in situ cromogénica

Las técnicas de hibridación hacen parte de los estudios de citogenética molecular, los cuales permiten la detección de moléculas de ácidos nucleicos para establecer la actividad celular y realizar traslación de biología a la clínica. Existen de dos tipos: FISH (Hibridación in situ fluorescente) y CISH (Hibridación in situ cromogénica). Las técnicas de CISH tienen sus inicios al principio del año 2000, desarrollada como una alternativa al FISH utilizado en la detección de la amplificación del gen *HER2Neu* en carcinoma de mama (17). Desde entonces, su utilidad en el campo diagnóstico y pronóstico ha sido excelente, siendo capaz esta técnica de la detección de moléculas de ADN o ARN complementario de secuencias de interés, mejorando la sensibilidad diagnóstica de ciertas entidades que requieran, por ejemplo, la demostración del material genético presente en el tejido parafinado. Casos representativos para la aplicabilidad de la técnica tenemos: demostración de *Helicobacter pylori* en tejido, infección por virus de Epstein Barr en casos de neoplasias hematolinfoides e indiferenciadas, entre otras. El uso de esta técnica ha sobrepasado a la inmunohistoquímica en rendimiento diagnóstico en el área de patologías infecciosas y algunos casos de patología oncológica (18).

Para la realización de esta técnica solo se requiere de tejido parafinado previamente procesado por técnicas convencionales, siendo una de las grandes ventajas frente a su homólogo fluorescente. El fundamento de la técnica consiste en la utilización de sondas previamente sintetizadas de hebras de ácido nucleico correspondiente a la diana que se quiera detectar, ya sea ADN o ARN de diversos tipos. Esta sonda luego, mediante principio de complementariedad de bases se adhiere a las moléculas de ácido nucleico a detectar. Finalmente, de acuerdo con las consideraciones de cada casa fabricante, esta sonda puede venir adherida a

diversos mecanismos de amplificación de señal que al tener asociado una molécula cromógena, reaccionará mediante transformación enzimática para la aparición de señales puntiformes en el tejido parafinado (19). La interpretación de esta técnica es mucho más cómoda, ya que se asemeja a la lectura de estudios de inmunohistoquímica, por lo que se puede emplear en la práctica de patología con el uso de microscopios ópticos y con un entrenamiento relativamente sencillo. De ahí la gran acogida que presenta esta técnica para la asistencia en el diagnóstico de diversas entidades frecuentes en la práctica de patología (patologías infecciosas y oncológicas) (20).

Estado del arte

Los avances en el entendimiento de la biología molecular de las lesiones premalignas de cérvix han permitido demostrar que la interacción entre los mecanismos del huésped y las lesiones generadas no se presentan con un patrón lineal. Es así como no todas las lesiones de bajo grado progresan hacia una lesión de alto grado, ni toda lesión intraepitelial de alto grado progresará hacia un carcinoma invasor (8).

Los estudios de biología molecular han permitido una correcta caracterización de las neoplasias (21), permitiendo entender este fenómeno no escalonado. Es así como se tienen múltiples estudios como precedente que evidencian la utilidad de las técnicas de biología molecular en el reconocimiento de puntos clave en la progresión tumoral en el carcinoma de cuello uterino.

Song y cols. (2008) utilizaron la técnica de microarreglos de oligonucleótidos con validación posterior con la técnica reacción en cadena de polimerasa con transcriptasa reversa (PCR-RT) en muestras de cuello uterino sano, cuello uterino con carcinoma escamocelular in situ y carcinoma invasor. En su estudio reconocieron 15,286 genes, de los cuales se identificaron 458 genes con expresión diferencial entre los distintos grupos de muestra. Es así como reportaron una serie de genes candidatos, con 22 genes sobre expresados y 40 genes subexpresados

entre las muestras con carcinoma in situ y carcinoma invasor. Entre estos genes resaltan *RBP1*, *TFRC*, *SPP1*, *SAA1*, *ARHGAP8*, y *NDRG1*, los cuales se encontraban sobre expresados; y *GATA3*, *PLAGL1*, *APOD*, *DUSP1*, y *CYR61*, los cuales se encontraban subexpresados (15).

Fujimoto y cols (2004) mediante la técnica de microarreglos de ADN complementario (ADNc) y validación con PCR-RT, establecieron una serie de genes con expresión diferencial entre carcinoma escamocelular y adenocarcinoma de cuello uterino. En este estudio se identificaron 16 genes sobre expresados en las muestras de carcinoma escamocelular de cuello uterino, así como 10 genes en el grupo de las muestras con adenocarcinoma. Entre los genes seleccionados para la validación, se encontró que el IGFBP-3 (*insulin-like growth factor-binding protein-3*), IAP-1 (*inhibitor of apoptosis protein 1*), y *cadherin-13* se encontraban sobre expresados más frecuentemente en las muestras de linaje escamocelular. Mientras que los genes inducibles de 1–8D interferón, los oncogenes de la familia *Sno*, y el receptor de factor de crecimiento transformante beta II (rTGF-B2) se expresaban frecuentemente en ambas líneas celulares(22).

La validación de pruebas de selección de genes candidatos se pueden realizar por técnicas de microarreglos de tejido mediante la aplicación de métodos como Inmunohistoquímica o hibridación in situ(23). Si bien en los estudios revisados se prefiere la utilización de técnicas de hibridación, la técnica de inmunohistoquímica resulta también en un método rentable y relativamente sencillo de ejecutar en comparación, con resultados equiparables y complementarios en cada uno de ellos(10, 24).

Genes evaluados

En un estudio previo realizado por nuestro grupo de investigación, se llevó a cabo una evaluación inicial en la que se determinó, mediante la tecnología de microarreglos de ADNc, la expresión génica en tejido cervical con LIE-AG, infección por VPH-18 y expresión de ARNm de E6-E7 del VPH18, y en el tejido sano del

cuello uterino de la misma paciente. Tras un análisis estricto, se compararon los resultados obtenidos y se detectaron 33 genes sobre expresados y 30 genes sub expresados en el tejido con LIE-AG en comparación con el tejido cervical sano (25).

A partir de estos resultados se realizó un análisis de grupos funcionales para tener un cuadro más completo y aumentar las posibilidades de encontrar genes que no hubiesen sido previamente asociados al desarrollo de la lesión. Se determinó la presencia de grupos de genes con funciones específicas de acuerdo con los términos de la ontología de genes establecidos en la base de datos Go (26), y se seleccionaron los siguientes genes candidatos:

TMEM45A

El gen *TMEM45A* pertenece a una familia de genes denominados *TMEM*, que codifican un grupo de proteínas no caracterizadas de las cuales se predice que presentan un dominio transmembrana (por sus siglas en inglés *transmembrane domain*). Se encuentra mapeado adecuadamente, encontrándose en el locus 3q12.2 (27). Este gen se sobre expresa en queratinocitos y parece cumplir funciones en la queratinización, participando en el funcionamiento normal de la piel (28).

Mediante estudios de análisis de bases de datos, se han encontrado múltiples isoformas de este gen, las cuales traducen una serie de proteínas que contienen al menos tres dominios transmembrana. Mediante inmunohistoquímica, se han detectado productos de este gen presentes a nivel del estrato granular de los epitelios escamosos, con menor expresión a nivel de estratos inferiores. Además, no se ha descrito expresión de *TMEM45A* a nivel de mucosa oral, con expresión aumentada a nivel de corpúsculos de Hassall en el timo (29).

En cultivos celulares, la familia de proteínas *TMEM* se localizan a nivel de la red de Golgi excluyendo al compartimiento lisosomal, y mediante microscopía electrónica se observa acumulación de estas proteínas relacionadas con los gránulos de queratohialina y los filamentos intermedios del citoesqueleto de los queratinocitos

en formación. Esta localización permite predecir que la familia de proteínas relacionadas con este gen participa de alguna manera en la formación de cuerpos lamelares, así como en la correcta queratinización de los epitelios (28).

Flamant y cols. (2012) encontraron expresión de *TMEM45A* en respuesta a la hipoxia en la clona celular MDA-MB-231 de cáncer de mama. El silenciamiento del factor inductor de hipoxia 1-alfa (HIF1A) mediante señalización por vía de RNA (ARNs) redujo la sobreexpresión del transcrito *TMEM45A* en respuesta a la hipoxia. La hipoxia, en este caso, también protegía a las clonas de células tumorales de la apoptosis inducida por el efecto de taxanos, no siendo el caso para la apoptosis inducida por epirrubicina. Finalmente, concluyeron que la sobreexpresión de *TMEM45A* inducida por hipoxia protegía a las células cancerosas de la muerte programada inducida por ciertos antineoplásicos (30).

KRT16

El gen *KRT16* codifica una proteína del grupo de las queratinas, puntualmente la proteína citoqueratina 16. Las queratinas son proteínas de filamentos intermedios responsables de la integridad estructural de las células epiteliales y se subdividen en citoqueratinas y queratinas capilares. La mayoría de las citoqueratinas tipo I consisten en proteínas ácidas que están dispuestas en pares de cadenas heterotópicas de citoqueratina y se agrupan en una región del cromosoma 17q12-q21. Esta queratina se ha expresado simultáneamente con queratina 14 en varios tejidos epiteliales, incluidos el esófago, la lengua y los folículos pilosos (31). *KRT16* se expresa de manera constitutiva en la mayoría de los epitelios escamosos, pero se expresa de manera temporal solo durante la fase de hiperproliferación en la epidermis (32, 33).

Rosemberg y cols, realizaron el estudio sistemático del mapeo y clonación del gen, así como los estudios de Northern blot para la expresión de su producto. Se trata de una proteína de 48 kD y 473 aminoácidos, que constituyen a una gran proteína con estructura alfa-helicoidal, la cual se encuentra codificada a nivel del cromosoma

17, localizada en íntima relación con el gen *KRT14* entre los locus p12-11 y q12-21 (33, 34).

Desde el punto de vista de genética molecular se han encontrado ciertas mutaciones en el locus predicho de *KRT16* asociado con trastornos de la queratinización tales como la paroniquia congénita tipo 1 (35) y la queratodermia palmoplantar no epidermolítica focal (36). Su papel en patología neoplásica sigue siendo hasta la fecha desconocido.

RBP1

La proteína *RBP1* (Retinol Binding Protein 1) corresponde a una proteína globular transportadora de retinoides, de preferencia expresada en el citoplasma de células epiteliales. Esta proteína se encarga del transporte reverso de retinoides desde las células hepáticas hasta los tejidos periféricos. Esta proteína se expresa mediante el gen *CRBP*, el cual produce una proteína de 132 aminoácidos y de una masa molecular de 15.7 kD (37, 38).

Nilsson y cols, determinaron que el gen *CRBP* contiene cuatro exones codificantes para residuos de 24, 59, 33 y 16 aminoácidos respectivamente (38). Este gen se localiza a nivel del cromosoma 3 en el locus q21-q23 (39).

Esta proteína se localiza a nivel citoplasmático, cumpliendo la función de regulación del estado metabólico basal a nivel de hepatocitos y fibroblastos periféricos, además de mediar la diferenciación hacia adipocitos en estos últimos. Se ha planteado su papel en la diferenciación glandular de células endometriales, el cual se establece que la biodisponibilidad de retinoides mantiene la diferenciación glandular de las células endometriales. Se ha postulado una regulación a la baja de esta proteína en la patogénesis del carcinoma escamocelular endometrial (40, 41).

OBJETIVOS

Objetivo general:

- Evaluar, mediante hibridación *in situ* cromogénica (CISH), la expresión de ARNm de los genes *TMEM45A*, *KRT16* y *RBP1* en tejido cervical sano y tejido cervical con LIE-BG y con LIE-AG.

Objetivos específicos:

- Describir las características encontradas dentro de los informes relacionados con los casos de patología de cuello uterino estudiados en el laboratorio CENDIPAT entre los años 2017 y 2018.
- Determinar, mediante CISH, si existe expresión diferencial de ARNm de los genes *TMEM45A*, *KRT16*, y *RBP1* entre el epitelio de cuello uterino con LIE-AG, LIE-BG y el epitelio escamoso de cuello uterino sin lesión, de los casos incluidos en el estudio.

HIPÓTESIS DEL ESTUDIO:

- H₀: No existen diferencias en la expresión *in situ* del ARNm de los genes *TMEM45A*, *KRT16*, y *RBP1* entre tejido con LIE-AG, con LIE-BG y cuello uterino sano.
H₁: Existen diferencias en la expresión *in situ* del ARNm de los genes *TMEM45A*, *KRT16*, y *RBP1* entre tejido con LIE-AG, con LIE-BG y cuello uterino sano.

METODOLOGÍA

Diseño del estudio y población

Se realizó un estudio analítico de corte transversal, donde se evaluó mediante técnica de CISH, en un microarreglo de tejidos con cuello uterino sano y con diversos tipos de lesiones intraepiteliales escamosas de cuello uterino, la expresión a nivel de ARNm de los tres genes candidatos: *TMEM45A*, *KRT16*, *RBP1*.

La población de estudio correspondió a muestras de especímenes de resección de cuello uterino (histerectomía, conización) estudiados en el laboratorio de referencia CENDIPAT en el periodo comprendido entre enero del 2017 y enero del 2019, con cortes histológicos y bloques de tejido disponibles, entre las cuales se seleccionaron los casos con LIE-AG. Se incluyeron casos con diagnóstico de LIE-AG en espécimen de conización y/o histerectomía, correspondientes a pacientes femeninas mayores de 18 años, recibidos durante el período de estudio.

Se excluyeron los casos no concordantes luego de la evaluación microscópica por patólogos expertos, casos con lesión glandular maligna sincrónica (adenocarcinoma endocervical, adenocarcinoma endometrial), casos con muestra de lesión intraepitelial de tamaño no adecuado para incluir en el microarreglo de tejido y casos con bloques de parafina en condiciones técnicas no adecuadas o no disponibles para la construcción del microarreglo de tejido.

Este estudio se realizó en la Facultad de Medicina de la Universidad de Cartagena está anidado al proyecto de investigación: “*Identificación de genes involucrados en la patogénesis de las lesiones premalignas del cuello uterino inducidas por el virus del papiloma humano*”, que busca la validación de la expresión diferencial de genes en muestras de tejido con lesión intraepitelial escamosa de alto grado y tejido cervical sano.

Cálculo de muestra

Se realizó cálculo de muestra con una población universo de 40.770 (mujeres en edad fértil en la ciudad de Cartagena 2018 (42)), obteniéndose un mínimo de 165 casos. Además, se realizó además una prueba piloto para estimar la cantidad de casos evaluados. Durante el periodo de enero a septiembre del año 2017 se recibieron 1882 casos correspondientes a especímenes de cuello uterino, de los cuales 238 (12.5%) casos corresponden a especímenes de resección (conización, histerectomía). En estos especímenes se identificaron 139 (7%) casos con lesión intraepitelial de alto grado, de los cuales solo se lograron obtener 53 casos que cumplieran adecuadamente con los criterios de selección. Se estableció, por lo tanto, que incluyendo los casos correspondientes al año 2017 y 2018 y manteniendo la incidencia de casos, se estimó alcanzar un total de 140 casos para realizar el microarreglo de tejido.

Selección de muestras

Se seleccionaron los casos de especímenes de resección de cuello uterino, incluyendo conización e histerectomía (total o radical), estudiados en el Centro de Diagnóstico Citopatológico del Caribe (CENDIPAT) durante el periodo de enero de 2017 a enero de 2019. Se buscaron los reportes de patología de las pacientes con diagnóstico de LIE-AG (NIC 3), con disponibilidad de láminas y bloques de parafina.

Posteriormente, se revisaron los casos seleccionados por dos patólogos expertos, con el fin de identificar la lesión y confirmar el diagnóstico de LIE-AG una vez seleccionados (NIC 3). Para el diagnóstico se tuvieron en cuenta los criterios diagnósticos consignados por la OMS para el diagnóstico de patología ginecológica (43) y los criterios consignados en las recomendaciones LAST del Colegio Americano de Patólogos y la Sociedad Americana de colposcopia y patología cervical (44). Los casos con un resultado discordante entre el reporte y la interpretación fueron excluidos del estudio.

Durante la búsqueda de los casos se recopilaron los datos disponibles del reporte de patología para su posterior análisis descriptivo.

Construcción del microarreglo de tejidos

Para la construcción del microarreglo de tejido se examinaron todas las láminas histológicas de los casos disponibles para identificar la idoneidad de las muestras. Todas las muestras fueron inicialmente procesadas por técnica convencional (fijación con formol al 10% tamponado, e inclusión en parafina), y los bloques fueron conservados en archivo a temperatura moderada (25° a 30°C). A medida que se seleccionaron los bloques de parafina a usar en la construcción del TMA, estos fueron almacenados a -20°C para prevenir la degradación de los ácidos nucleicos.

Se escogieron los casos con fragmento de epitelio escamoso inequívoco para LIE-AG con una extensión horizontal mínima de 0.5 cm y que estuvieron presentes en más de un fragmento de los bloques examinados. Se eligieron, además, muestras de tejido epitelial escamoso de cérvix sano y con LIE-BG provenientes de los mismos casos por conveniencia de las muestras de tejido y teniendo en cuenta los criterios de selección. Posteriormente se tuvieron en cuenta los lineamientos descritos por Fernández, y cols. (46), consignados en el Anexo 1.

Los ensayos de CISH para ARNm correspondientes a los genes evaluados se realizaron mediante la técnica RNAscope® 2.5 HD (Advanced Cell Diagnostics, INC., Hayward, CA), con cromógeno rojo (Horseradish peroxidase HRP, AEC). Se utilizaron las siguientes sondas: KRT16 (RNAscope® Probe - Hs-KRT16, número de catálogo 474901), TMEM45A (RNAscope® Probe - Hs-TMEM45A, número de catálogo 402221) y RBP1 (RNAscope® Probe - Hs-RBP1, número de catálogo 484751) (45). Los ensayos se realizaron mediante servicio técnico solicitado a la casa fabricante (Advanced Cell Diagnostics, INC., Hayward, CA).

Evaluación de la expresión de ARNm mediante CISH

La técnica RNAscope® 2.5 HD detecta moléculas individuales de ARNm, mediante amplificación de señal con tecnología de “unión z” identifica cada molécula de ARNm, las cuales aparecen como puntos delimitados en el corte histológico.

Para la evaluación de la expresión de ARNm de los genes evaluados se realizó el cálculo de promedio de señales por células de acuerdo con metodología descrita previamente por Benedetti y cols (46). Se registró la presencia y cantidad de la tinción punteada a nivel nuclear y citoplasmático, de acuerdo con la intensidad de la señal. Posteriormente, se estableció un puntaje que fue determinado contando el número de puntos por célula, el cual se correlaciona con el número de copias de ARNm. El conteo se realizó a un aumento de 100X en un microscopio Eclipse 400, conectado a una cámara DS-Fi1 con el software NIS-Elements-3.01 (Nikon®, Japan). Se contó el número de puntos por célula en diferentes campos de tejido, registrándose el mayor puntaje de los campos evaluados. Los parámetros usados fueron

0: Ausencia de tinción o <1 punto/ 10 células.

1: 1-3 puntos/célula

2: 4-9 puntos/célula, ningún o muy pocos agregados de puntos

3: 10-15 puntos/célula y <10% puntos formando agregados

4: >15 puntos/célula y >10% de los puntos están formando agregados.

Si <5% de las células tenía un de puntaje 1 y >95% de las células tenía puntaje de 0, se asignó un puntaje de 0. Si 5-30% de las células tenían puntaje de 1 y >70% de las células tenían puntaje de 0, se asignó un puntaje de 0.5.

Se ofrecen ejemplos observados en nuestro microarreglo de tejido como referencia en el anexo 2.

Análisis estadístico

Se realizó análisis descriptivo de los datos recolectados en los reportes de patología sobre las variables edad, tipo de muestra evaluada y categoría de lesión. Se estimaron las frecuencias absolutas y relativas, así como estadísticos de tendencia central de las variables cualitativas y cuantitativas. Se calculó test de Fisher para establecer significancia estadística de las frecuencias en los grupos evaluados. Se estratificó la edad usando como parámetro mayor o menor de 30 años debido a las diferencias en la evolución de la enfermedad, hecho reportado por múltiples estudios (47, 48). Se calcularon medias y desviación estándar de los puntajes evaluados para las tinciones de CISH para los grupos de tejido sano, tejido con LIE-BG y tejido con LIE-AG. Se realizó comparación de medias con prueba t de Student y prueba ANOVA para determinar la significancia estadística de la expresión entre grupos, previa evaluación de normalidad. Se representaron los resultados de promedio de expresión mediante gráficas de cajas y bigotes para datos totales. Para el análisis estadístico se utilizó el paquete informático GraphPad Prism 8.0.2® (GraphPad Software, San Diego California E.E.U.U.). Se consideró significancia estadística un valor de $p < 0.05$.

Aspectos éticos

Según la resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud y Protección Social, artículo 11 (49), se categorizó el presente estudio como una investigación con riesgo mínimo, debido a que se emplearán métodos de recolección en muestras biológicas que previamente fueron utilizados con fines diagnósticos; los cuales no alterarán el curso clínico ni el pronóstico de la enfermedad en estudio.

Además, de acuerdo con el párrafo 1 del artículo 16 de la presente resolución, el Comité de Ética en Investigación de la institución investigadora, por razones justificadas, podrá autorizar que el Consentimiento Informado se obtenga sin formularse por escrito.

Según la declaración de Helsinki y los lineamientos de la 67ª Asamblea General de la Asociación Médica Mundial(50), la utilización de las bases de datos de salud con fines de investigación y desarrollo permite acelerar el mejoramiento de la comprensión de los fenómenos de salud y enfermedades, así como la eficacia, eficiencia, seguridad y calidad de las intervenciones encaminadas en la prevención, diagnóstico y tratamiento, representándose así la investigación en salud en un bien común al servicio del paciente, como también de la población y la sociedad.

La propuesta se encuentra anidada al proyecto de investigación: "*IDENTIFICACION DE GENES INVOLUCRADOS EN LA PATOGÉNESIS DE LAS LESIONES PREMALIGNAS DEL CUELLO UTERINO INDUCIDAS POR EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO*", aprobado por el Comité de ética en Investigaciones de la Universidad de Cartagena y presentado a la Octava Convocatoria de proyectos de investigación de la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad de Cartagena.

RESULTADOS

Se encontraron 6644 casos de patología cervical en las bases de datos del laboratorio de patología en el periodo 2017 - 2018, correspondientes a 3526 (53.07%) casos en el 2017 y 3118 (46.93%) en el 2018 (Gráfica 2). Del total de casos se revisaron 1187 casos correspondientes a especímenes de conización o histerectomía con reporte de LIE-AG. Luego de la revisión de las láminas histológicas se excluyeron 1018 casos por no cumplir los criterios de selección. Por lo tanto, se utilizaron 165 casos para la construcción del TMA (Gráfica 1).

Durante la búsqueda de casos de patología cervical se encontraron los siguientes resultados:

Del total de casos (n=6644), 6550 casos presentaban datos relacionados con la edad de la paciente. La mediana de la edad fue de 39 años (Rango intercuartílico 30 – 48 años). Al estratificar por grupo de edad, tenemos que 1553 (23.7%) pacientes presentaron una edad menor a 30 años, mientras que 4997 (76.29%) fueron mayores de 30 años (Gráfica 3). De acuerdo con el tipo de espécimen, predominaron las biopsias con 4755 (71.57%), seguido de las histerectomías con 1056 (15.89%) y las conizaciones con 833 casos (Gráfica 4 y 7). Con respecto al diagnóstico relacionado tenemos diferentes tipos de lesiones. Las más frecuentes fueron los LIE-BG con 2977 (44.81%), seguido de las lesiones no asociadas a VPH con 2461 (37.04%). Las lesiones de agresivas como LIE-AG (1092, 16.44%), Carcinoma escamocelular invasor (95, 1.43%) y los adenocarcinomas invasores (19, 0.29%) fueron minoritarias (Gráfica 5 y 6) (Tabla 1).

Al contrastar la variable edad con el tipo de procedimiento, se observó que los procedimientos de conización e histerectomía eran más frecuentes en pacientes mayores de 30 años que en el grupo de menores de 30 años. Todas las pruebas de contraste de hipótesis mostraron significancia estadística ($p < 0.001$) (Tabla 2).

Al contrastar la variable edad con el tipo de diagnóstico se encontró predominio de todos los tipos de lesión en el grupo de pacientes mayores de 30 años sobre el grupo de menores de 30 años. Todas las pruebas de contraste de hipótesis mostraron significancia estadística ($p < 0.001$) (Tabla 3).

Para la construcción del microarreglo de tejido se seleccionaron 165 casos, con una mediana de edad de 34 años (rango intercuartílico de 28 – 41 años). Del total, 164 (99.39%) casos presentaban diagnóstico de LIE-AG y solo 1 presentaba LIE-BG (0.61%). Se eligieron 47 casos (28.48%) del año 2017 y 118 casos (71.52%) del 2018. Con respecto al tipo de muestra se escogieron 351 muestras distribuidas entre las siguientes categorías: 86 muestras de cérvix sano, 74 muestras de LIE-BG, y 175 muestras de LIE-AG. Se seleccionaron, además, 16 controles correspondientes a tejido no cervical (Tabla 4).

Con respecto a evaluación de la expresión de ARNm de los genes en estudio por CISH se encontró lo siguiente:

Con relación a *TMEM45A* se observó una expresión de señal discretamente consistente entre los diferentes tipos de muestra. Dentro del grupo de muestras de tejido sano no hubo expresión del ARNm en 34 cilindros (40.4%), se encontró expresión con un puntaje de 1+ en 9 de los cilindros (10.4%), expresión con puntaje 2+ en 12 cilindros (13.9%), expresión con puntaje de 3+ en 11 cilindros (12.7%) y expresión con puntaje 4+ en sólo 4 muestras (4.6%). Dentro del grupo de muestras de tejido con LIE-BG, no hubo expresión del ARNm en 30 cilindros (40.5%), expresión con un puntaje de 1+ en 6 de los cilindros (8.1%), expresión con puntaje 2+ en 6 cilindros (8.1%), expresión con puntaje de 3+ en 10 cilindros (13.5%) y expresión con puntaje 4+ en 6 muestras (8.1%). Finalmente, en el grupo de cilindros con LIE-AG no se observó expresión de ARNm en 53 cilindros (30.2%), expresión con puntaje 1+ en 13 cilindros (7.4%), expresión con puntaje 2+ en 23 cilindros (13.1%), expresión con puntaje de 3+ en 16 cilindros (9.1%) y expresión con puntaje 4+ en 19 cilindros (10.8%). El número de cilindros no evaluables por motivos de

representatividad fue de 38 (9%). El número de cilindros perdidos en el análisis fue de 57 (14.8%) (Tabla 5).

La expresión detectada mediante CISH para ARNm del gen *TMEM45A* mostró un patrón predominantemente basal, que se correlaciona con el tipo de muestra. En muestras con epitelio cervical sano la expresión se observó predominantemente en las células basales y parabasales con escasa o nula expresión en los niveles superiores del epitelio. En los cilindros con LIE-BG y LIE-AG, la marcación fue menos consistente, con muchos casos concentrados en las puntuaciones 1+ y 2+, y distribuyéndose las señales de amplificación en los estratos intermedios. La expresión en los estratos superiores no fue consistente, observándose en cilindros con LIE-BG y con LIE-AG, (Gráfica 8).

Al realizar el cálculo del promedio del puntaje de expresión para el ARNm mediante CISH del gen *TMEM45A* se obtuvo dentro del grupo de cilindros sanos un promedio de 1.17 (DE \pm 1.34, IC 95% 0.85–1.49), para el grupo de cilindros con LIE-BG un promedio de 1.24 (DE \pm 1.49 IC 95% 0.85–1.49) y dentro del grupo de cilindros con LIE-AG un promedio de 1.46 (DE \pm 1.52 IC 95% 1.19–1.73). Los resultados de la expresión promedio de cada grupo se muestran en la tabla 6. (Gráfica 9).

Al realizar la comparación de medias de expresión de ARNm entre los grupos de Sano contra LIE-BG ($p=0.7804$), LIE-BG contra LIE-AG ($p=0.3541$) y LIE-AG contra Sano ($p=0.1798$) no se encontraron diferencias significativas. Al realizar el contraste de medias para los tres grupos, no se obtuvieron diferencias significativas($p=0.3548$) (Tabla 7).

Con respecto a *RBP1* se observó una expresión de señal moderadamente consistente entre los diferentes tipos de muestra, con un ligero predominio en la expresión en LIE-AG. En el grupo de muestras de tejido sano no hubo expresión del ARNm en 45 cilindros (53.2%), expresión con un puntaje de 1+ en 8 de los cilindros (9.3%), expresión con puntaje 2+ en 7 cilindros (8.1%), y expresión con puntaje de 3+ de 1 cilindro (1.1%). No se observó expresión con puntaje 4+ en este grupo.

Dentro del grupo de muestras con LIE-BG, no se observó expresión del ARNm en 47 cilindros (63.5%), expresión con un puntaje de 1+ en 3 de los cilindros (4.0%), expresión con puntaje 2+ en 6 cilindros (8.1%), expresión con puntaje de 3+ de 2 cilindros (2.7%) y expresión con puntaje 4+ en 1 cilindro (1.3%). Finalmente, en el grupo con LIE-AG no se observó expresión de ARNm en 44 cilindros (25.1%), expresión con puntaje 1+ en 22 cilindros (12.5%), expresión con puntaje 2+ de 28 cilindros (16%), expresión con puntaje de 3+ en 24 cilindros (13.7%) y expresión con puntaje 4+ en 1 cilindro (0.5%). El número de cilindros no evaluables por motivos de representatividad fue de 59 (15.3%). El número de cilindros perdidos en el análisis fue de 55 (14.3%) (Tabla 5).

La expresión detectada mediante CISH de ARNm del gen *RBP1* mostró un patrón predominantemente basal de baja intensidad. En muestras con epitelio cervical sano la expresión fue muy baja, con escasa señal en células basales y nula expresión a niveles superiores del epitelio. En los cilindros con LIE-BG, Interfase y LIE-AG, la marcación fue más consistente, siendo baja en aquellas muestras con LIE-BG, los cuales mostraron un puntaje de señal entre 1+ y 2+. Mientras que los cilindros con LIE-AG mostraron un puntaje de señal entre +2 y +3. Se observó que las señales de expresión se localizaban en estratos superiores del epitelio a medida que el tipo de lesión era mayor, aunque este último hallazgo no fue tan consistente, (Gráfica 10).

Al realizar el cálculo del promedio del puntaje de expresión detectada mediante CISH de ARNm del gen *RBP1* se obtuvo dentro del grupo de cilindros sanos un promedio de 0.42 (DE \pm 0.76, IC 95% 0.22–0.61), para el grupo de cilindros con LIE-BG un promedio de 0.41 (DE \pm 0.76 IC 95% 0.21–0.60) y dentro del grupo de cilindros con LIE-AG un promedio de 1.29 (DE \pm 1.19 IC 95% 1.08–1.51), (Tabla 6), (Gráfica 11). Al realizar la comparación de medias se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre LIE-AG y tejido sano ($p < 0.0001$), y entre LIE-AG y LIE-BG (< 0.0001). Al comparar la expresión de ARNm entre el tejido sano y LIE-BG no se encontraron diferencias significativas ($p = 0.9608$). Al realizar el

contraste de medias para los tres grupos, se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0.0001$), (Tabla 7).

Finalmente, respecto a *KRT16* se observó que la expresión de señal fue inconsistente dentro de los diferentes tipos de muestra. En el grupo de muestras de tejido sano no hubo expresión del ARNm en 38 cilindros (44.1%), hubo expresión con un puntaje de 1+ en 15 de los cilindros (17.4%), expresión con puntaje 2+ en 13 cilindros (15.1%), expresión con puntaje de 3+ en 10 cilindros (11.6%) y expresión con puntaje 4+ en solo una muestra (1.1%). Dentro del grupo de muestras de tejido con LIE-BG, no hubo expresión del ARNm en 37 cilindros (50%), expresión con un puntaje de 1+ en 10 de los cilindros (13.5%), expresión con puntaje 2+ en 7 cilindros (9.4%), expresión con puntaje de 3+ de 4 cilindros (5.4%) y expresión con puntaje 4+ en 2 muestras (2.7%). Finalmente, en el grupo de cilindros con LIE-AG no se observó expresión de ARNm en 75 cilindros (40.8%), expresión con puntaje 1+ en 25 cilindros (14.2%), expresión con puntaje 2+ de 11 cilindros (6.2%), expresión con puntaje de 3+ en 21 cilindros (0.12%) y expresión con puntaje 4+ en 13 cilindros (7.4%). El número de cilindros no evaluables por motivos de representatividad fue de 30 cilindros (7%). El número de cilindros perdidos en el análisis fue de 34 (8.8%), (Tabla 5).

La expresión detectada mediante CISH de ARNm del gen *KRT16* mostró un patrón más bien difuso en el epitelio, con ligero predominio en estrato basal, pero pudiéndose encontrar en cualquiera de los estratos, sin una clara relación con el tipo de lesión. En muestras con epitelio cervical sano la expresión fue mucho mayor, con puntajes entre +1 y +2. En los cilindros con LIE-BG, e Interfase y LIE-AG, la marcación fue inconsistente, con muchos casos concentrados en las puntuaciones 1+ y 0, y distribuyéndose las señales de amplificación en los estratos intermedios. La expresión en el grupo de LIE-AG mostró cierto aumento en el promedio de expresión, con puntajes entre +1 y +3, concentrándose la marcación en los estratos superiores, (Gráfica 12).

Al realizar el cálculo del promedio del puntaje de expresión detectada mediante CISH de ARNm del gen *KRT16* se obtuvo dentro del grupo de cilindros sanos un promedio de 0.97 (DE 1.14, IC 95% 0.71–1.23), para el grupo de cilindros con LIE-BG un promedio de 0.78 (DE \pm 1.51 IC 95% 0.48–1.81) y dentro del grupo de cilindros con LIE-AG un promedio de 1.12 (DE \pm 1.41 IC 95% 0.89–1.35), (Tabla 6), (Gráfica 13). Al comparar la media de expresión de ARNm entre el tejido sano y LIE-BG ($p=0.3368$), entre LIE-BG y LIE-AG ($p=0.1054$) y entre LIE-AG y tejido sano ($p=0.4434$), no se encontraron diferencias significativas. Al realizar el contraste de medias para los tres grupos, tampoco se obtuvieron diferencias significativas ($p=0.3855$), (Tabla 7).

DISCUSIÓN

Sin ninguna duda las lesiones intraepiteliales escamosas corresponden a la lesión precursora del carcinoma escamoso de cuello uterino. Por lo tanto, el conocimiento de la ocurrencia y la progresión de estas lesiones es de vital importancia para el entendimiento de la evolución natural de esta enfermedad. Se reconoce, por consiguiente, que se trata de un proceso multiescalonado y multifactorial, y, por ende, los mecanismos detrás de la progresión de las lesiones precursoras hacia carcinoma aún están lejos de ser esclarecidos.

Se carecen de predictores confiables para determinar la progresión de las lesiones precursoras de cuello uterino, debido a la falta de sensibilidad de algunos de los marcadores evaluados. Por lo tanto, se considera de suma importancia la exploración a fondo de los mecanismos de regulación que participan en la progresión de esta neoplasia desde un punto de vista molecular.

Se debe iniciar la discusión de este trabajo por los resultados epidemiológicos obtenidos en el análisis. La distribución de las lesiones en cuello uterino relacionadas con la edad dista un poco de lo reportado en estudios realizados previamente (51). Se considera que la predominancia de los diferentes tipos de lesiones intraepiteliales (tanto LIE-BG como LIE-AG) en pacientes mayores de 30 años, se deba a la mayor representación de pacientes dentro de este rango de edad. Sin embargo, al realizar el análisis de los valores relativos, encontramos que persiste la distribución anterior, conservando la significancia estadística. Estos resultados muestran una tendencia de aumento en la prevalencia de lesiones intraepiteliales escamosas de cuello uterino hacia la población de mujeres mayores de 30 años. Por lo tanto, esta información resulta valiosa porque refleja el impacto de los programas de tamización y detección temprana implementados para disminuir la incidencia de esta enfermedad. Si bien el objetivo del trabajo no es recopilar la información para realizar un estudio de prevalencia, la distribución de las lesiones premalignas y malignas en cérvix dentro de un centro de referencia de

patología cervical de la localidad puede sentar las bases sobre la distribución esperada de estas lesiones y dar pie a la realización de otros estudios más robustos con relación a este objetivo.

Con respecto al diseño y técnica empleada, este estudio hasta la fecha se considera pionero a nivel nacional en el abordaje de esta temática, ya que utiliza técnicas especializadas como bioinformática y citogenética molecular aplicando microarreglos de tejido parafinado. Este estudio corresponde incluso, a uno de los más robustos en cuanto a número de muestras evaluadas en simultáneo dentro de los trabajos más recientemente publicados que utilizan una técnica similar. Entre los trabajos más representativos se puede resaltar el estudio de Kaur Gurjeet y cols (52) quienes reportaron recientemente el perfil de expresión de lesiones premalignas en cérvix utilizando un microarreglo de tejido con 71 muestras entre tejido cervical sano, LIE-BG, LIE-AG y carcinoma invasor, con el fin de evaluar en simultáneo marcadores como *IGFBP-2* (52) y *MCM* (53), demostrando asociación en la progresión de las lesiones precursoras de cérvix hacia carcinoma invasor. Asimismo, el estudio de Blancas S y cols, 2019 (54) utilizó un microarreglo de tejido de 205 muestras compuestas por tejido cervical sano, NIC 3 y carcinoma invasor, con el fin de evaluar un panel de inmunohistoquímica de 22 marcadores entre lo que se encuentran *Notch3*, *SEL1L*, *SOCS3*, demostrando relación de estos marcadores con la progresión hacia carcinoma de cérvix (Tabla 8).

En nuestro estudio utilizamos como base la búsqueda en las bases de datos Geo para determinar el grupo de genes con mayor asociación con la progresión hacia carcinoma de cérvix, una técnica que se encuentra bien establecida en la literatura, siendo otras bases de datos empleadas para este fin las bases de datos de Geo que también se encuentran disponibles para la consulta y utilización con fines de investigación y desarrollo (55).

La validación de pruebas de selección de genes candidatos se puede realizar por técnicas de microarreglos de tejido mediante la aplicación de métodos como

Inmunohistoquímica o hibridación *in situ* (23). Si bien los estudios en general prefieren el uso de técnicas más avanzadas, se puede decir con tranquilidad que ambos enfoques tienen el mismo rendimiento en cuanto a efectividad en tejido parafinado y con resultados equiparables y complementarios en cada uno de ellos (10, 24).

En cuanto a la utilización de técnicas de microarreglo de tejido en cérvix podemos decir que se trata de una técnica accesible y costo-efectiva para la realización de múltiples ensayos de biología molecular. Es así como se tienen múltiples estudios como precedente que evidencian la aplicación de este recurso para la realización de diversas técnicas de biología molecular en el reconocimiento de puntos clave en la progresión tumoral en el carcinoma de cuello uterino.

Con relación a estudios que evalúen la expresión de las proteínas seleccionadas, podemos mencionar los siguientes:

Manawapat y cols (2016), analizaron la asociación entre la infección por genotipo de VPH16 con la progresión de hacia carcinoma de cuello uterino *in situ* e invasor, asimismo, buscaron la asociación entre ciertas proteínas y la progresión tumoral. Para ello se realizó un estudio de cohorte que involucró 11088 mujeres entre 20 y 29 años con infección por VPH16, que luego fueron reclutadas dos años después. Durante la segunda evaluación se tomaron muestras de citología con base líquida y se realizaron estudios de microarreglos de las muestras extraídas y aplicación de análisis de ARNm, correspondientes a 30 mujeres con infección por VPH16 persistente. Como resultados, entre otros, se encontraron altos niveles de transcritos correspondientes a los genes *TMEM45A*, *SERPINB5* y *p16INK4a*, los cuales se asociaron a la progresión hacia NIC3 durante el seguimiento. Por lo tanto, se concluyó que la alta expresión de ARNm, resultando ser marcadores predictores de NIC3 en mujeres con infección persistente por VPH16 (56).

En nuestro estudio no encontramos una sobreexpresión a nivel de ARNm del gen *TMEM45A*. Si bien cualitativamente hubo expresión mayor en el grupo de lesiones

de alto grado, las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Esto contrasta con los resultados reportados en la literatura. La función del gen *TMEM45A* corresponde a favorecer mecanismos anti-apoptóticos sobre las células epiteliales neoplásicas (29), así como su función de regulación de la diferenciación de los epitelios escamosos (28). Estas funciones pueden favorecer a su expresión constitutiva en epitelios escamosos, por lo que el grado de expresión resulta difícil de establecer en estudios con muestras no representativas. Sin embargo, este resultado amerita ser profundizado con técnicas adicionales (inmunohistoquímica).

En cuanto a los resultados de *RBP1* llama la atención la significancia estadística importante que presenta en los estudios de comparación de medias para todos los grupos. Al respecto se tienen pocos antecedentes que evalúen este marcador dentro de la progresión tumoral en el carcinoma de cérvix.

Benbrook y cols. (1997), en un estudio de análisis mediante técnica de PCR-RT demostraron la expresión citoplasmática de *CRBPI*, gen encargado de la transcripción de la proteína *RBP1*, a nivel de las líneas celulares representativas de carcinoma escamocelular de cérvix de bajo grado (57).

Hidalgo y cols. (2005), mediante técnica de hibridación genómica cromosomal comparativa (CGH), analizaron 20 muestras de tejido cervical entre lesiones premalignas y malignas invasoras, así como muestras correspondientes a líneas celulares; todos con el fin de evaluar la expresión diferencial entre las mismas. Se encontró que las ganancias genéticas más frecuentes a nivel de las muestras con carcinoma invasor de cuello uterino fueron en los genes *RBP1-RBP2*, la clona subtelomérica C84C11/T3 (5ptel), D5S23 (5p15.2) y el gen *DAB2*, todos con una frecuencia del 58.8% de las muestras evaluadas. Se concluyó que la progresión hacia carcinoma de cuello uterino se encuentra relacionada con ciertos desbalances cromosómicos, proponiéndose como blancos genes localizados a nivel de los cromosomas 3, 4 y 5 (58).

Mendoza y cols. (2013), plantean que las alteraciones a nivel del gen *CRBP1* se encuentran implicadas en la progresión tumoral del carcinoma de cuello uterino. Para ello propusieron la realización de análisis de alteraciones moleculares a nivel del gen *CRBP1* en 26 muestras con carcinoma escamocelular de cuello uterino y 26 muestras de cérvix sano. Las técnicas utilizadas para tal análisis fueron: 1. Análisis de ganancia de copias genéticas mediante PCR-RT, 2. Análisis de expresión mediante inmunohistoquímica en microarreglos de tejido, 3. Estado de metilación de la región promotora del gen *CRBP1*. Se encontró un aumento del número de copias del gen *CRBP1* en muestras de cuello uterino con carcinoma invasor, así como ausencia en la expresión de *RBP1* en las muestras mediante inmunohistoquímica y aumento en la metilación del promotor del gen. Todos estos datos apoyan que el gen *CRBP1* cumple un papel fundamental en la progresión tumoral del cáncer de cuello uterino, planteándose como posible gen supresor tumoral del mismo (59).

Todos los estudios anteriores resaltan la importancia de la expresión de *RBP1* en la progresión tumoral hacia el carcinoma de cérvix. El mecanismo por el cual esta proteína está relacionado con la carcinogénesis no es muy claro. Sin embargo, estudios de secuenciación génica en muestras con carcinoma de cérvix asociado a infección con VPH-AR demuestran altos niveles de transcritos de esta familia de proteínas transportadoras de retinoides.

Mediante cultivos celulares, Lai y cols (60) demostraron la actividad de las proteínas transportadoras de retinoides en la carcinogénesis de cáncer de cérvix. A través de ensayos de emparejamiento complementario demostraron la actividad correpresiva de estas proteínas a nivel de los transcritores E2F.

En el modelo de supresión tumoral mediado por la vía de la proteína del RB, la unión de esta proteína con el factor de transcripción E2F depende de la unión alostérica en dos bolsillos, uno de ellos dominado por una familia de proteínas deacetilasas de histona (HDAC), mientras que el otro dominio presenta una función

independiente a esta proteína deacetilasa (61). La actividad de esos puntos de unión especial dentro de la proteína RB favorece la unión con el transcriptor E2F. El papel que juegan las proteínas transportadoras de retinoides *RBP1* y *RBP2* es el de reclutar ambos puntos de unión, tanto el dependiente de las proteínas HDAC como los independientes, todos para mejorar la afinidad del RB con su punto de unión, actuando entonces como un coactivador de la respuesta supresora (62).

El papel de la infección por genotipos de alto riesgo de VPH (63) claramente altera la función de la proteína RB mediante la unión del complejo proteico E7 viral, uno de los hitos moleculares importantes para la transformación neoplásica. Es de esperar entonces, que en el escenario en donde la actividad de la proteína RB se encuentre disminuida por efecto de secuestro, la activación de las señales de correpresión van a aumentar para el reclutamiento de la proteína para mantener el efecto supresor tumoral.

Por todo lo anterior, se considera un resultado positivo que la expresión de *RBP1* en nuestro estudio sea tan significativa y que se encuentren diferencias con todos los grupos de comparación. Se requieren de estudios adicionales para corroborar este resultado.

En relación con *KRT16* no se han realizado estudios comparativos de expresión a nivel de cuello uterino, siendo más frecuentes los realizados a nivel de carcinomas escamosos de cavidad oral (64) y laringe (65). Los resultados obtenidos en nuestros estudios no fueron satisfactorios. Una de las razones que encontramos es la expresión constitutiva del *KRT16* en epitelio basal e intermedio, el cual se encuentra muy frecuentemente en cérvix por motivos ajenos muchas veces a la infección por VPH, como lo son casos de descamación, metaplasia, o cervicitis. No sorprende entonces que la expresión de *KRT16* no haya presentado significancia estadística al realizar las comparaciones entre los grupos. Sin embargo, el papel de *KRT16* en la carcinogénesis todavía sigue en debate.

Econtratafiava y cols (66) plantean la posibilidad de que *KRT16* juegue un papel importante en la inducción del fenotipo neoplásico en situaciones de estrés metabólico, por lo que se requieren más estudios para dilucidar este fenómeno.

Dentro de las limitaciones de este trabajo podemos mencionar algunas relacionadas con la realización de la técnica:

En relación con la técnica de CISH en tejido parafinado es sin duda uno de los avances más importantes a nivel de técnicas de biología molecular llevadas a la práctica asistencial. Sin embargo, para que funcione adecuadamente, se deben tener métodos adecuados de fijación del tejido para la conservación del material genético, así como consideraciones especiales de almacenamiento del bloque, concentración, pH y duración de la fijación del tejido, y la temperatura de desparafinado (20). Todas son variables que en el laboratorio de patología se pueden controlar fácilmente. El tiempo en el que se realiza la técnica también es crucial para el buen rendimiento del estudio, debido a la degradación temporal del material genético en bloques con mayor tiempo de almacenamiento. En nuestro estudio, se realizó técnica de CISH en bloques de parafina almacenados en un rango de 6 a 12 meses, demostrando que la viabilidad del material genético para estas muestras puede ser un poco mayor al sugerido (67).

La pérdida de cilindros de tejido durante el corte del TMA es uno de los problemas que más afectó la realización de una interpretación más robusta. En el estudio de Blancas (54) reportaron pérdida de menos del 2.8% del material incluido en sus microarreglos. Nuestro trabajo presentó pérdida del 12.5%. Si bien no se considera que menoscabe severamente la interpretación de los resultados, si se encuentra en un valor más alto al esperado, por lo que habría que recomendar la utilización de estrategias para prevenir estas pérdidas de tejido desde el punto de vista técnico.

En el análisis de la expresión no se tuvieron en cuenta patrones de tinción o distribución de esta en el epitelio. Este pudiese ser un punto adicional que se podría abordar en otros estudios secundarios.

La exclusión de los casos con NIC 2 en nuestro estudio se debió a la dificultad en la interpretación de los resultados en estudios preliminares. Sin embargo, muchos de los estudios similares incluyeron este grupo de muestras para evaluar la relación con un punto intermedio entre lesiones de bajo y alto grado. Esta variable se tornaba difícil para una adecuada interpretación de los resultados en opinión de los investigadores y por eso se decidió no incluir en el estudio. Para estudios adicionales se puede plantear la inclusión de este tipo de muestras con el fin de mejorar la distribución de la expresión.

Finalmente, este trabajo se considera pionero en la realización de la técnica a nivel local y nacional, planteando un precedente importante en la investigación a nivel de biología molecular y abriendo paso a nuevos proyectos de investigación anidados a estos resultados. Los resultados obtenidos serán complementados con estudios de expresión a nivel de proteína que se encuentran en curso, con el fin de confirmar las relaciones descritas.

CONCLUSIONES

Existe expresión diferencial a nivel de ARNm del gen *RBP1* entre el tejido de cuello uterino con LIE-AG y el tejido de cuello uterino sano y con LIE-BG.

La expresión de *RBP1* presentó diferencias significativas al realizar las comparaciones con todos los grupos, planteándose como un posible marcador de progresión tumoral.

No se encontraron diferencias significativas en el promedio de expresión de ARNm de los genes *TMEM45A* y *KRT16* entre los diversos grupos de muestra.

Se requieren de estudios a nivel de proteína que permitan validar estos resultados. los cuales se encuentran en curso, con el fin de confirmar las asociaciones descritas.

Los estudios de microarreglos de tejido se constituyen en una alternativa muy útil en la evaluación simultánea de múltiples marcadores en grandes volúmenes de muestras. Siendo el presente estudio un pionero en la implementación de esta técnica a nivel nacional en la evaluación de expresión de ARNm para la validación de genes candidatos.

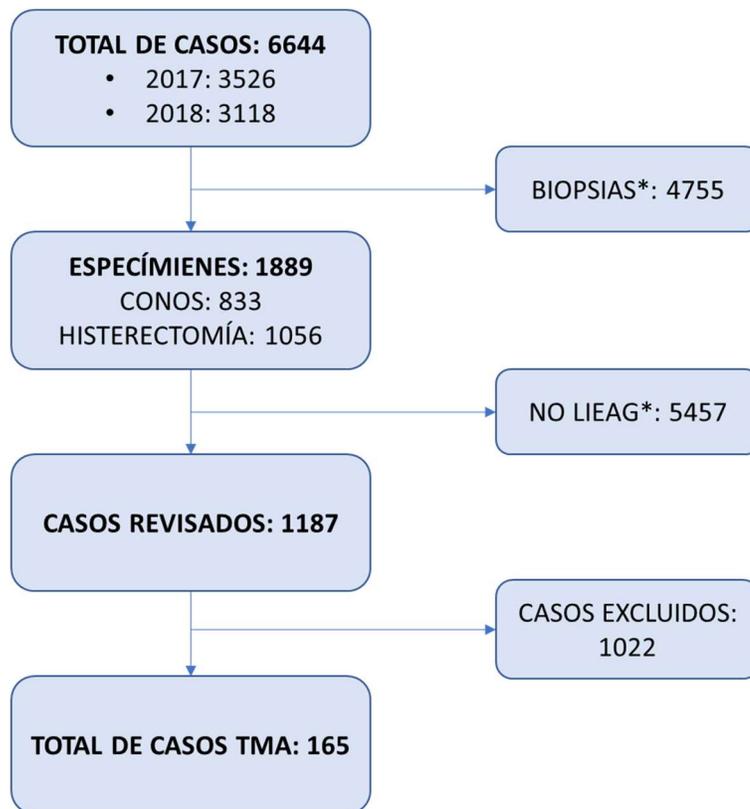
CONFLICTOS DE INTERESES

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

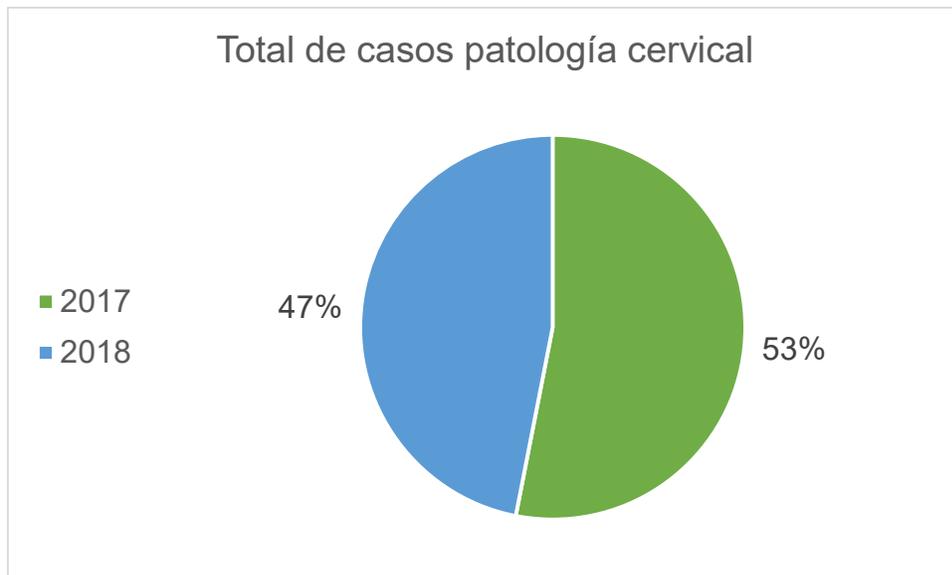
FINANCIACIÓN

El presente estudio se encuentra anidada al proyecto de investigación: *“IDENTIFICACION DE GENES INVOLUCRADOS EN LA PATOGENESIS DE LAS LESIONES PRE-MALIGNAS DEL CUELLO UTERINO INDUCIDAS POR EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO”*, presentado a la Octava Convocatoria de proyectos de investigación y financiado por la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad de Cartagena.

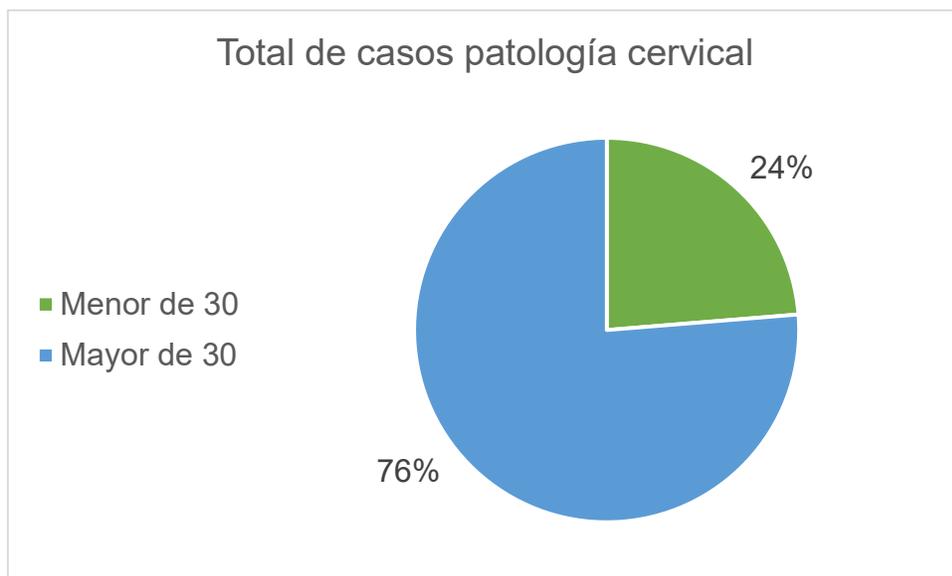
LISTA DE GRÁFICAS



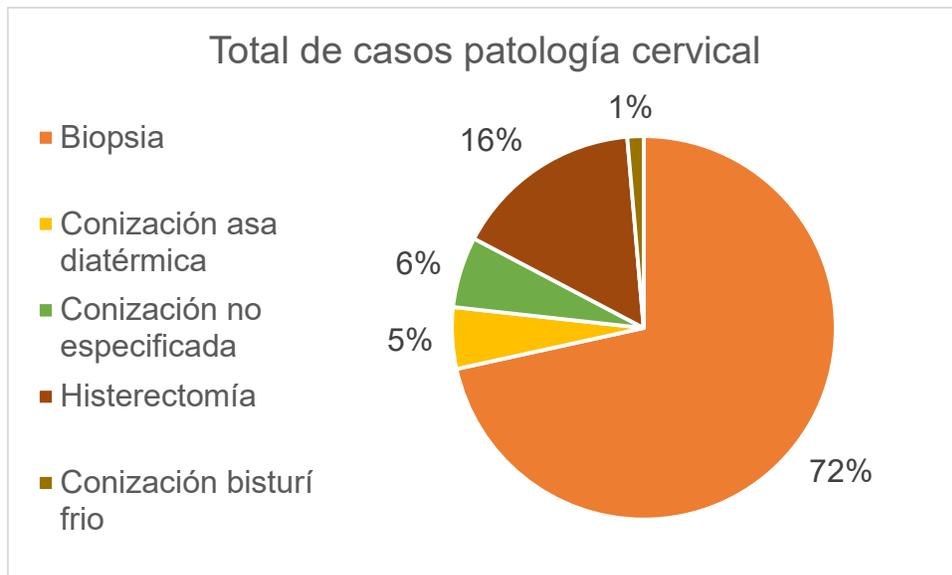
Gráfica 1. Flujograma de proceso de selección de casos para microarreglo de tejido.



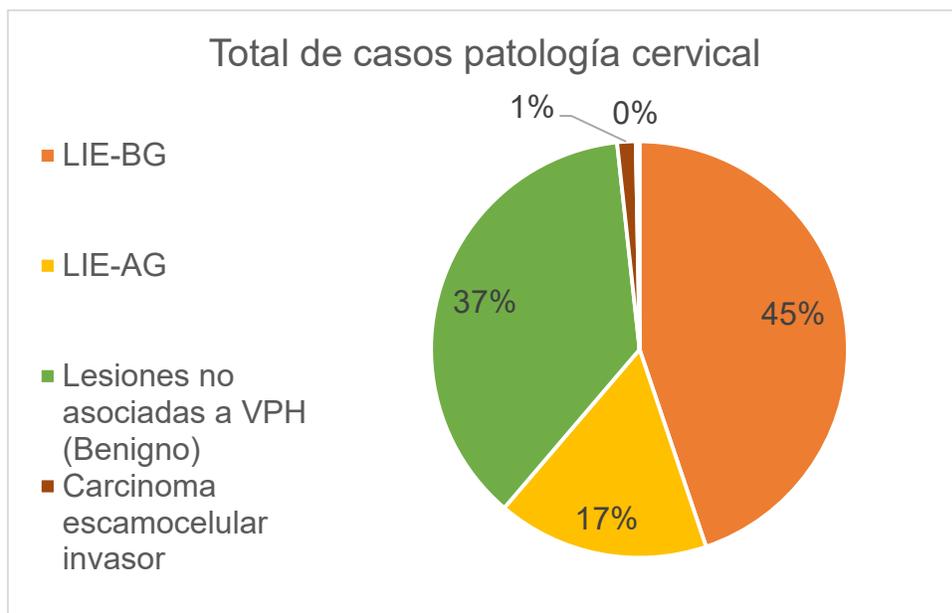
Gráfica 2. Distribución de casos de patología cervical por año.



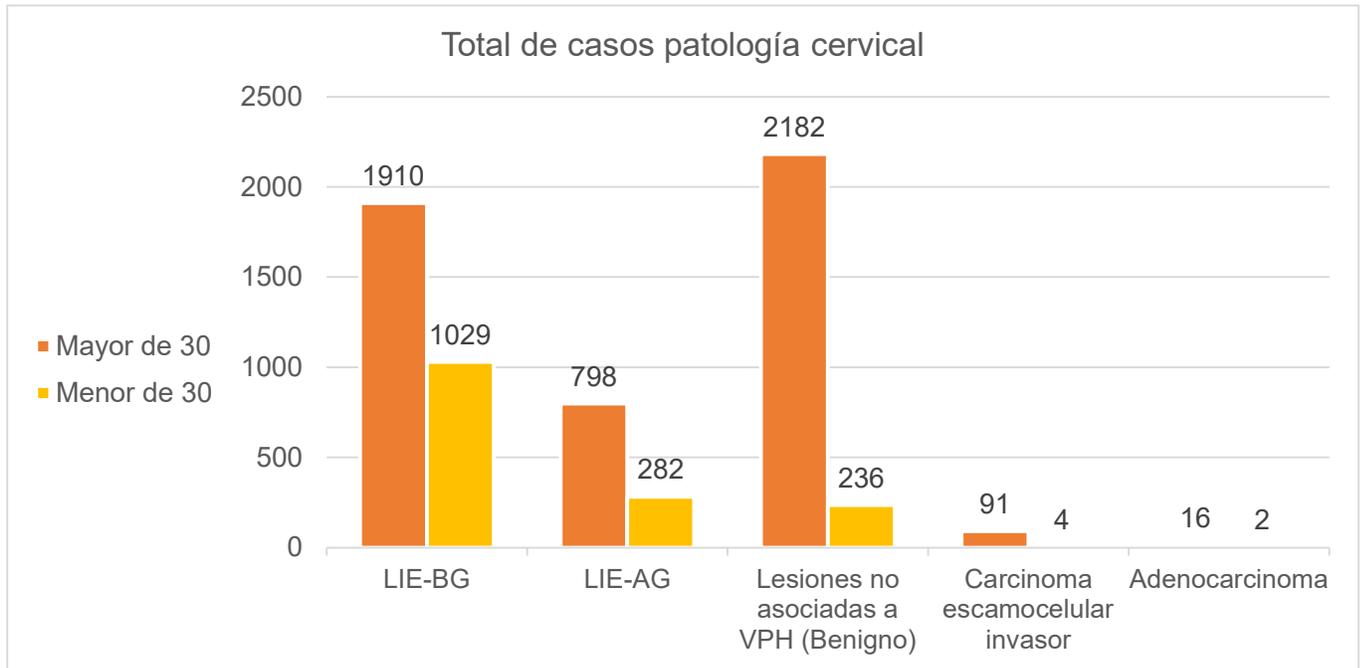
Gráfica 3. Distribución de casos de patología cervical por grupo de edad.



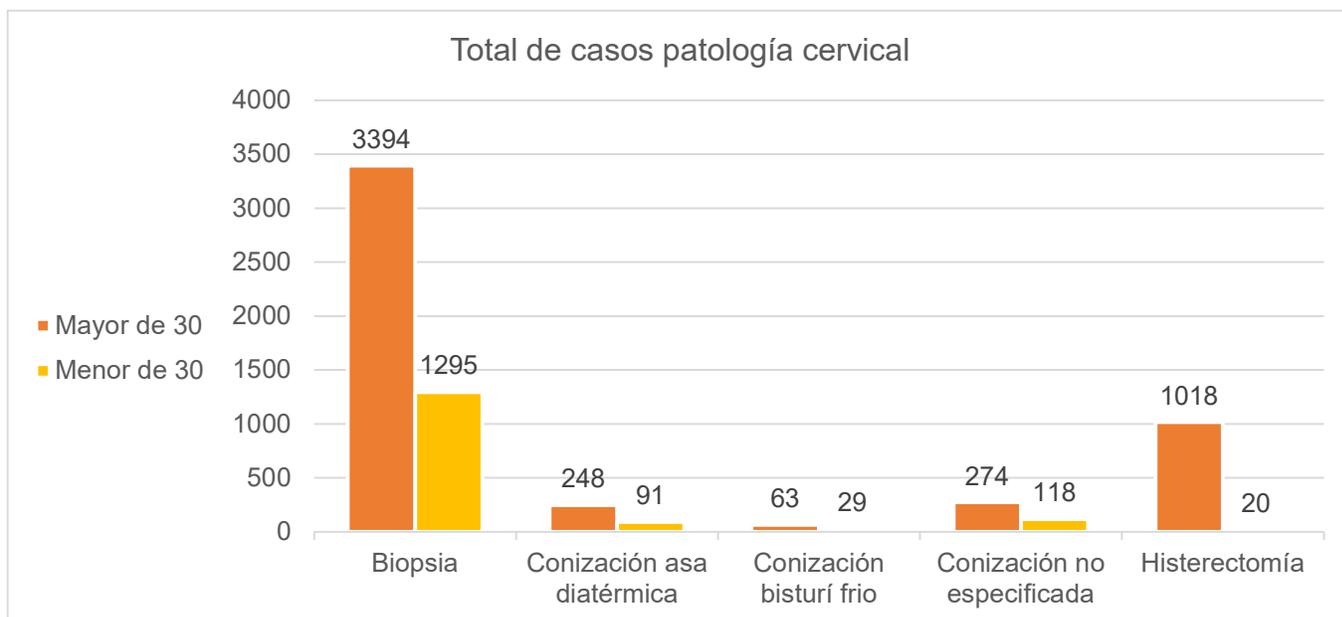
Gráfica 4. Distribución de casos de patología cervical por procedimiento.



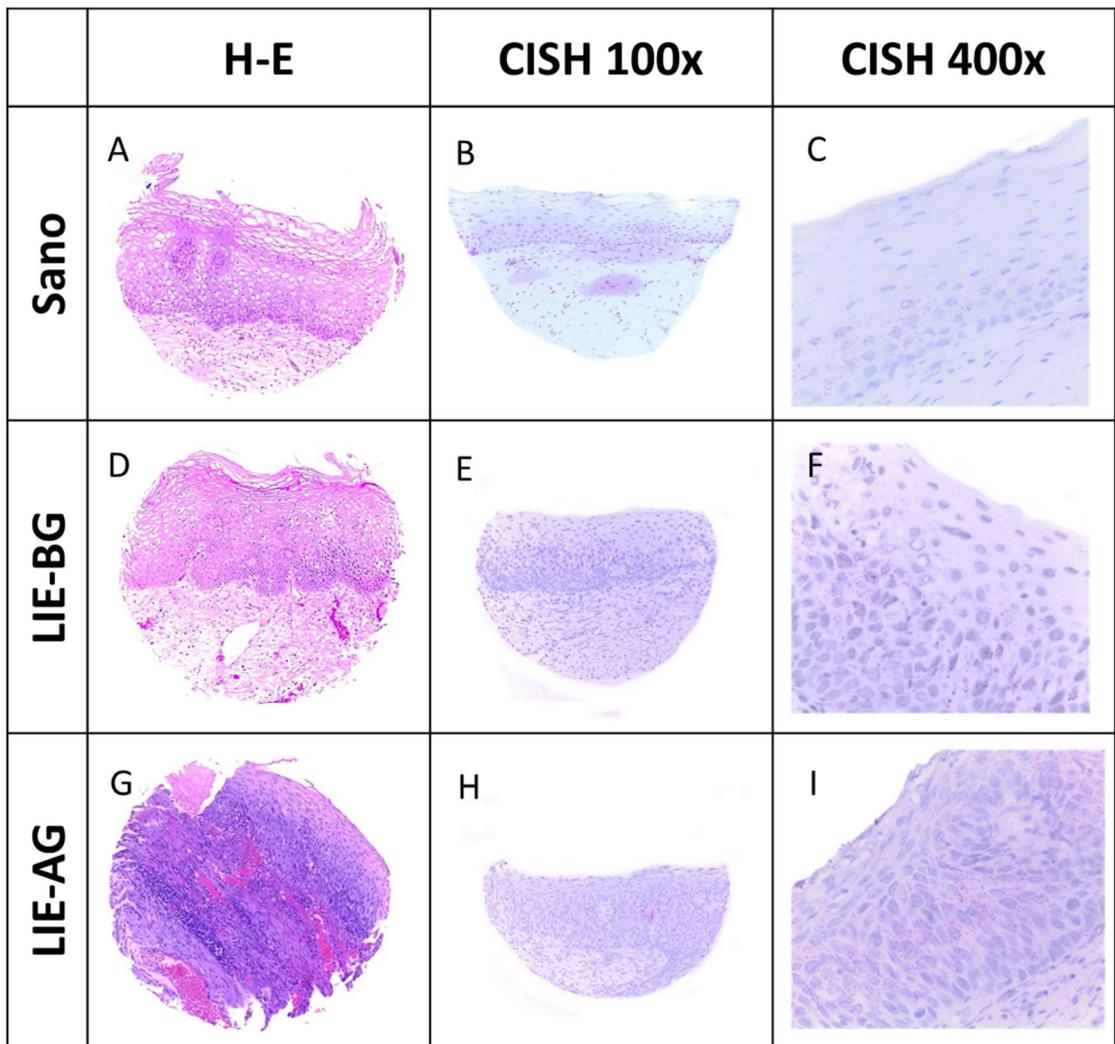
Gráfica 5. Distribución de casos de patología cervical por diagnóstico.



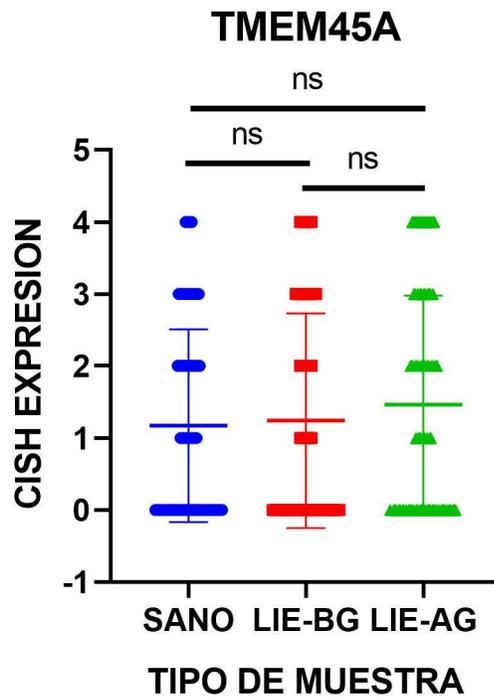
Gráfica 6. Distribución de casos de patología cervical por diagnóstico y grupo de edad



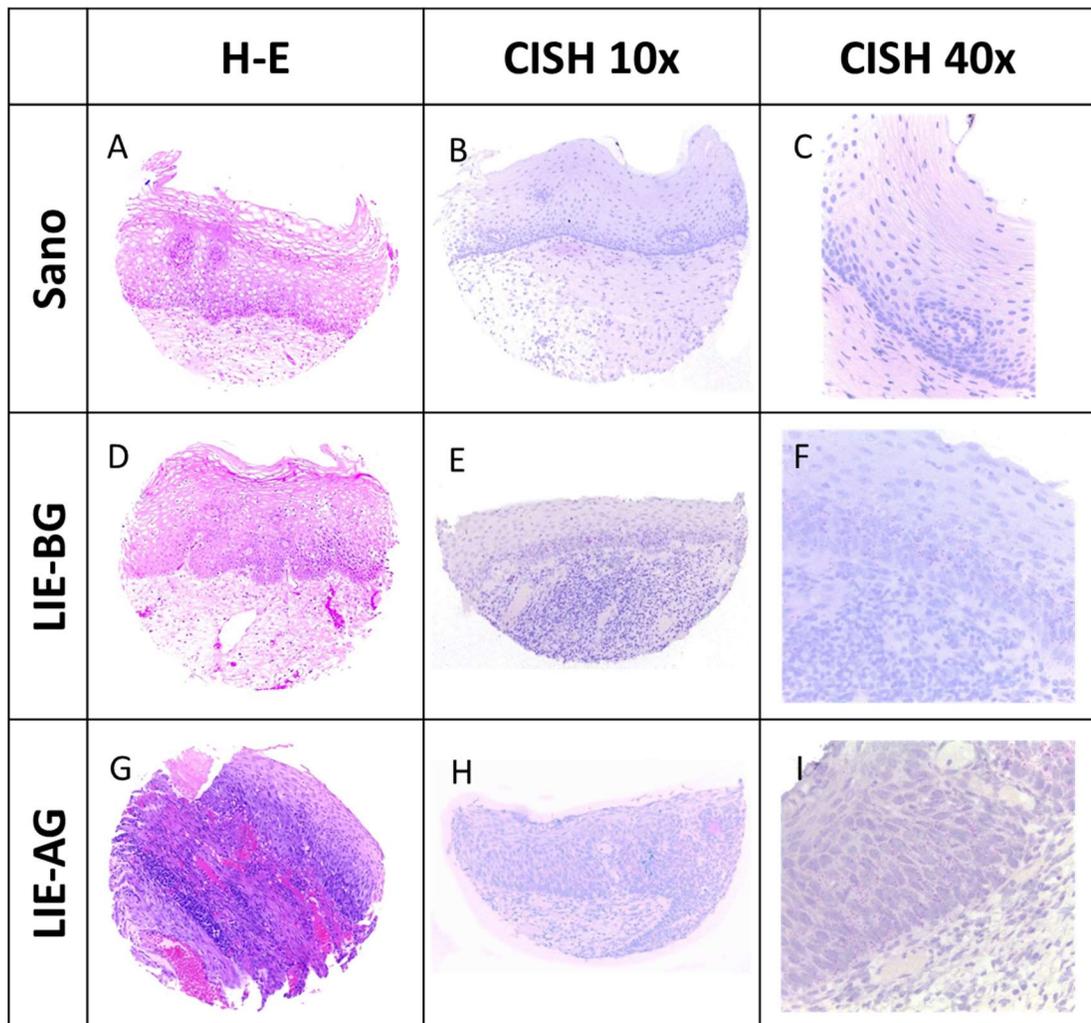
Gráfica 7. Distribución de casos de patología cervical por procedimiento y grupo de edad



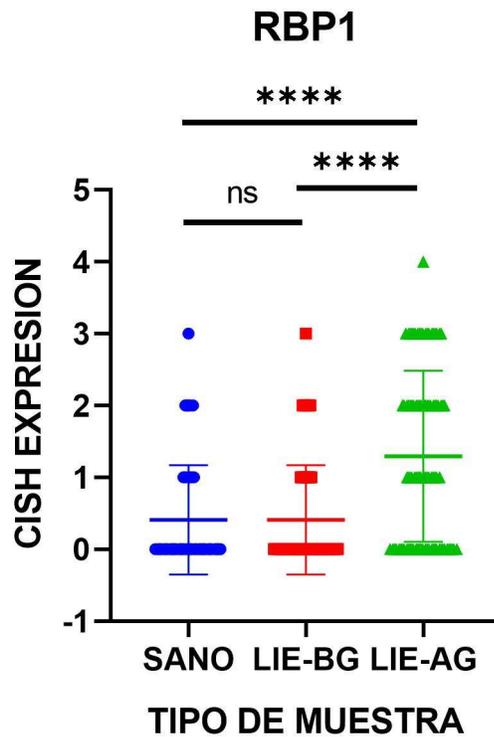
Gráfica 8. Marcación con CISH para ARNm de TMEM45A en tejido cervical sano, con LIE-BG y con LIE-AG, en microarreglo de tejido de cuello uterino humano. Se visualizó la expresión de ARNm mediante técnica RNAscope® 2.5 HD con DAB y cromógeno rojo en objetivos de 10x (aumento 100x) y 40x (aumento 400x). Epitelio cervical sano H-E 100x (A). Tinción para ARNm mediante CISH de TMEM45A a 100x (B) y a 400x (C). Se observan en promedio 1-3 señales por célula, concentradas a nivel basal. Epitelio con LIE-BG H-E 100x (D). Tinción para ARNm mediante CISH de TMEM45A a 100x (E) y a 400x (F). Se observan en promedio 5-9 señales por célula, a nivel basal e intermedio y discretos acúmulos en células atípicas. Epitelio con LIE-AG H-E 100x (G). Tinción para ARNm mediante CISH de TMEM45A a 100x (H) y a 400x (I). Se observan en promedio 10-13 señales por célula, a nivel basal e intermedio y acúmulos en menos del 10% de las células atípicas.



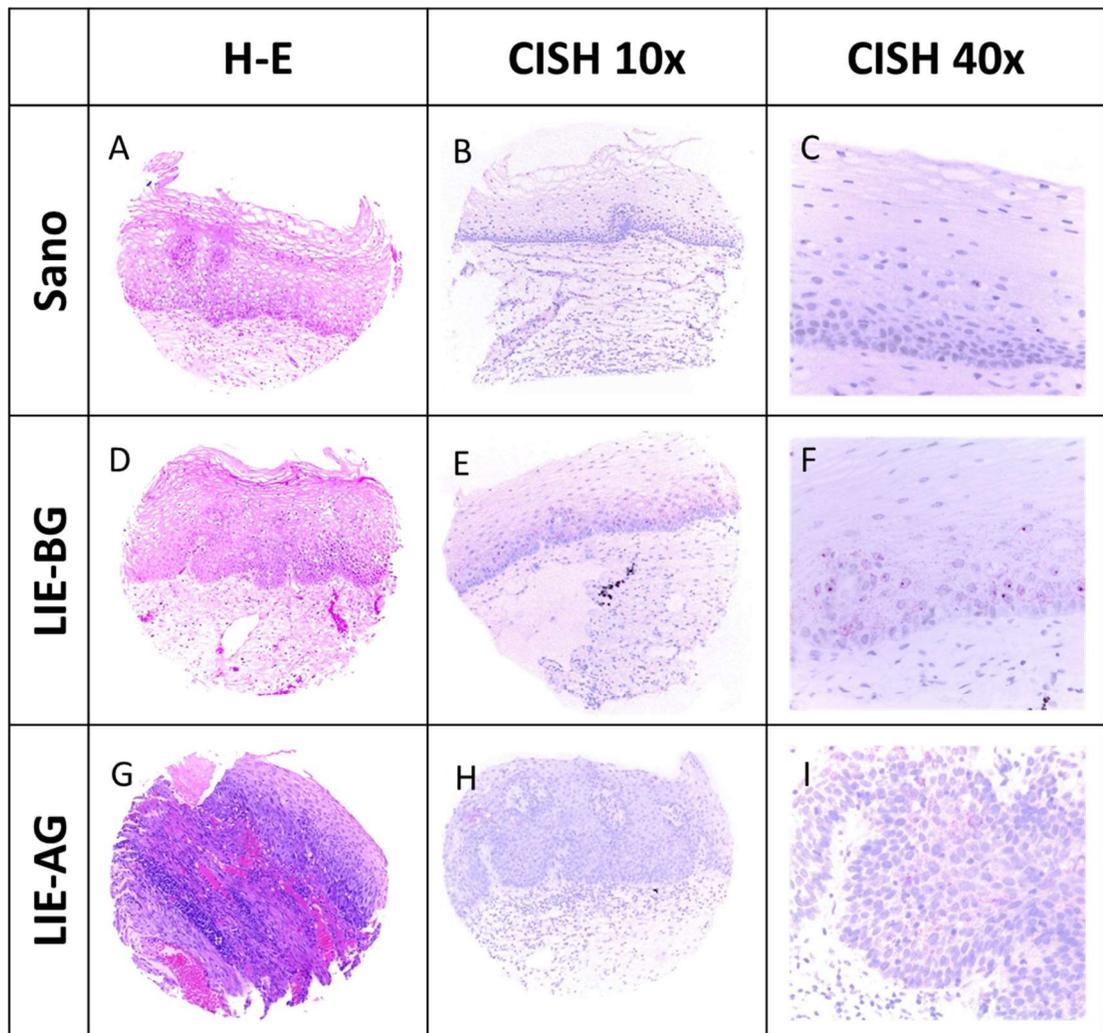
Gráfica 9. Diferencias en la expresión de ARNm de TMEM45A, al compararlo entre los grupos de cilindros de tejido cervical sano (azul), con LIE-BG (rojo) y con LIE-AG (verde). ns: valor de p no significativo.



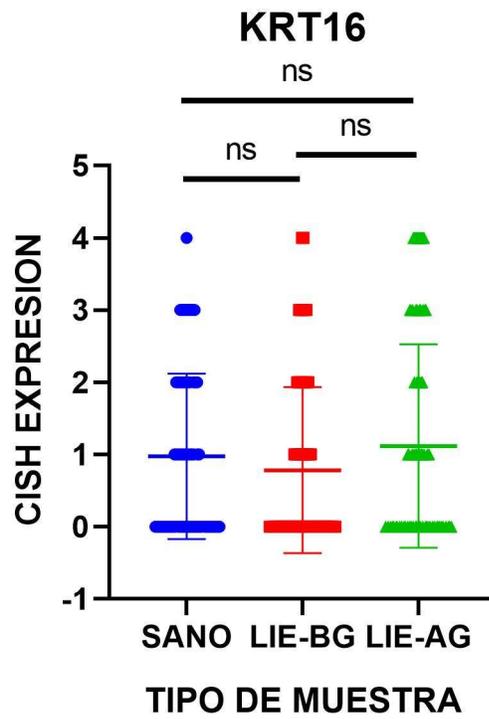
Gráfica 10. Marcación con CISH para ARNm de RBP1 en tejido cervical sano, con LIE-BG y con LIE-AG, en microarreglo de tejido de cuello uterino humano. Se visualizó la expresión de ARNm mediante técnica RNAscope® 2.5 HD con DAB y cromógeno rojo en objetivos de 10x (aumento 100x) y 40x (aumento 400x). Epitelio cervical sano H-E 100x (A). Tinción para ARNm mediante CISH de RBP1 a 100x (B) y a 400x (C). Se observan <1 señal por célula. Epitelio con LIE-BG H-E 100x (D). Tinción para ARNm mediante CISH de RBP1 a 100x (E) y a 400x (F). Se observan en promedio 3-9 señales por célula, a nivel basal. Epitelio con LIE-AG H-E 100x (G). Tinción para ARNm mediante CISH de RBP1 a 100x (H) y a 400x (I). Se observan en promedio 10-13 señales por célula, a nivel basal e intermedio y acúmulos en más del 10% de las células atípicas.



Gráfica 11. Diferencias en la expresión de ARNm de RBP1. Al comparar la expresión de ARNm de RBP1 entre los grupos de cilindros de tejido cervical sano (azul), con LIE-BG (rojo) y con LIE-AG (verde). ns: valor de p no significativo. * asociación significativa $p < 0.05$, **** asociación significativa con $p < 0.0001$.



Gráfica 12. Marcación con CISH para ARNm de KRT16 en tejido cervical sano, con LIE-BG y con LIE-AG, en microarreglo de tejido de cuello uterino humano. Se visualizó la expresión de ARNm mediante técnica RNAscope® 2.5 HD con DAB y cromógeno rojo en objetivos de 10x (aumento 100x) y 40x (aumento 400x). Epitelio cervical sano H-E 100x (A). Tinción para ARNm mediante CISH de KRT16 a 100x (B) y a 400x (C). Se observan en promedio 1-2 señales por célula, concentradas a nivel basal. Epitelio con LIE-BG H-E 100x (D). Tinción para ARNm mediante CISH de KRT16 a 100x (E) y a 400x (F). Se observan en promedio 10-15 señales por célula y formación de acúmulo en más del 10%, a nivel basal e intermedio. Epitelio con LIE-AG H-E 100x (D). Tinción para ARNm mediante CISH de KRT16 a 100x (E) y a 400x (F). Se observan en promedio 10-15 señales por célula, a nivel basal e intermedio y acúmulos en más del 10% de las células.



Gráfica 13. Diferencias en la expresión de ARNm de KRT16. Al comparar la expresión de ARNm de KRT16 entre los grupos de cilindros de tejido cervical sano (azul), con LIE-BG (rojo) y con LIE-AG (verde). ns: valor de p no significativo.

TABLAS

Tabla 1. Resultados de los casos de patología cervical, años 2017-2018

	n (%)
Edad (n=6550)	39 (30-48) ¹
Rango Edad (n=6550)	
Menores de 30 años	1553 (23.7%)
Mayores de 30 años	4997 (76,29%)
Año (n=6644)	
2017	3526 (53.07%)
2018	3118 (46.93%)
Tipo de Lesión (n=6644)	
Lesiones no asociadas a VPH	2461 (37.04%)
LIE-BG	2977 (44.81%)
LIE-AG	1092 (16.44%)
Carcinoma escamocelular invasor	95 (1.43%)
Adenocarcinoma invasor	19 (0.29%)
NIC (n=4046)	
1	2976 (73.55%)
2	460 (11.36%)
3	610 (15.07%)
Procedimiento (n=6644)	
Biopsia	4755 (71.57%)
Conización asa diatérmica	344 (5.18%)
Conización bisturí frío	93 (1.40%)
Conización no especificada	396 (5.96%)
Histerectomía	1056 (15.89%)

1. Mediana (rango intercuartílico).

Tabla 2. Tipo de procedimiento por grupo de edad

Tipo de Muestra	Grupo edad		Valor de p
	<30 años	>30 años	
Biopsia	1295 (27.62%)	3394 (72.38%)	
Conización asa diatérmica	91 (26.84%)	248 (73.16%)	<0.001~*
Conización bisturí frío	29 (31.52%)	63 (68.48%)	<0.001~*
Conización no especificada	118 (30.10%)	274 (69.9%)	<0.001~*
Conización cualquiera	238 (28.92%)	538 (71.08%)	<0.001~*
Histerectomía	20 (1.93%)	1018 (98.07%)	<0.001~
Total (n=6550)	1553 (23.71%)	4997 (76.29%)	<0.001*

*Contra histerectomía, ~contra Biopsia, *agrupado.

Tabla 3. Tipo de lesión por grupo de edad

Tipo de Lesión	Grupo edad		p
	<30 años	>30 años	
Lesiones no asociadas a VPH	236 (9.76%)	2182 (90.24%)	
LIE-BG	1029 (35.01%)	1910 (64.99%)	<0.001~*
LIE-AG	282 (26.11%)	798 (73.89%)	<0.001†~*
Carcinoma escamocelular invasor	4 (4.21%)	91 (95.79%)	<0.001~*
Adenocarcinoma	2 (11.11%)	16 (88.89%)	0.03~
Total (n=6550)	1553 (23.71%)	4997 (76.29%)	<0.001*

*Contra Lesiones no asociadas a VPH, † contra LIE-BG, ~contra Carcinoma escamocelular, *agrupado

Tabla 4. Características de las muestras incluidas en el microarreglo de tejido

Categoría	Casos n (%)
Diagnóstico reportado* (165)	
LIE-BG	1(0.61%)
LIE-AG	164 (99.39%)
Año (165)	
2017	47 (28.48%)
2018	118 (71.52%)
Procedimiento (165)	
No disponible	36 (21.8%)
Biopsia	1 (0.78)
Conización asa diatérmica	51 (39.53%)
Conización bisturí frío	18 (13.95%)
Conización no especificada	44 (34.11%)
Histerectomía	15 (11.63%)
Categoría	Cilindros de tejido n (%)
Tipo de Cilindro en TMA (351)	
Cérvix sano	86 (24.50%)
LIE-BG	74 (21.08%)
LIE-AG	175 (49.85%)
Controles	16 (4.55%)

* Según reportado en informe de patología del caso.

Tabla 5. Resultados de ARNm CISH de cada gen

Gen	n	Puntaje de expresión CISH						NE	NT
		0	1+	2+	3+	4+	n		
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n	n	
TMEM45									
Sano	86	34 (40.4%)	9 (10.4%)	12 (13.9%)	11 (12.7%)	4 (4.6%)	4	12	
LIE-BG	74	30 (40.5%)	6 (8.1%)	6 (8.1%)	10 (13.5%)	6 (8.1%)	22	10	
LIE-AG	175	53 (30.2%)	13 (7.4%)	23 (13.1%)	16 (9.1%)	19 (10.8%)	6	29	
RBP1									
Sano	86	45 (53.2%)	8 (9.3%)	7 (8.1%)	1 (1.1%)	0 (0%)	11	14	
LIE-BG	74	47 (63.5%)	3 (4.0%)	6 (8.1%)	2 (2.7%)	1 (1.3%)	7	8	
LIE-AG	175	44 (25.1%)	22 (12.5%)	28 (16%)	24 (13.7%)	1 (0.5%)	35	21	
KRT16									
Sano	86	38 (44.1%)	15 (17.4%)	13 (15.1%)	10 (11.6%)	1 (1.1%)	2	7	
LIE-BG	74	37 (50%)	10 (13.5%)	7 (9.4%)	4 (5.4%)	2 (2.7%)	7	7	
LIE-AG	175	75 (42.8%)	25 (14.2%)	11 (6.2%)	21 (0.12%)	13 (7.4%)	17	13	

n=total de muestras, (%) porcentaje, NT: no tejido (pérdida), NE: no evaluable (estroma o glándulas).

Tabla 6. Promedio de puntaje para la expresión CISH de ARNm de cada gen

Gen	Sano		LIE-BG		LIE-AG	
	\bar{X} (DE)	IC 95%	\bar{X} (DE)	IC 95%	\bar{X} (DE)	IC 95%
TMEM45A	1.17 (1.34)	0.85–1.49	1.24 (1.49)	0.84–1.63	1.46 (1.52)	1.19–1.73
RBP1	0.42 (0.76)	0.22–0.61	0.41 (0.76)	0.21–0.60	1.29 (1.19)	1.08–1.51
KRT16	0.97 (1.14)	0.71–1.23	0.78 (1.51)	0.48–1.81	1.12 (1.41)	0.89–1.35

Promedio de Puntaje para la expresión CISH de ARNm por tipo de muestra en el microarreglo. \bar{X} (DE): Media y desviación estándar, IC 95%: Intervalos de confianza.

Tabla 7. Valores de p en pruebas en prueba t de Student y ANOVA, de cada gen

Gen	Sano contra LIE-BG ‡	LIE-BG contra LIE-AG ‡	LIE-AG contra Sano ‡	Consolidado*
TMEM45A	0.7804 †	0.3541 †	0.1798 †	0.3548 †
RBP1	0.9608 †	<0.0001 †	<0.0001 †	<0.0001 †
KRT16	0.3368 †	0.1054 †	0.4434 †	0.3855 †

† valores de p, ‡ t – Student, *ANOVA

Tabla 8. Resumen de estudios con uso de microarreglos de tejido de cuello uterino

Autores	Tamaño del TMA	Tipo de muestras	Objetivo primario
Gao Li y cols, 2020(68)	1141 muestras	Carcinoma de cérvix y tejido control	Expresión de PLK1 mediante IHQ
Eun-Young Kang y cols, 2021(69)	1849 muestras	Carcinoma de cérvix, endometrio, carcinosarcomas, sarcomas uterinos, carcinomas de ovario	Evaluación de ARID1B/SMARCB1 por IHQ
Jung Mi Byun y cols, 2021(70)	76 muestras	Adenocarcinoma de cérvix	HHLA2 y PD-L1 por IHQ
Rottman J y cols, 2020(71)	60 muestras	Carcinoma de cérvix	PD-L1 y PD-L2 por CISH RNA e IHQ
Chiang A y cols, 2020(72)	294 muestras	Carcinoma de cérvix	UBE2C por secuenciación genética
Duggan M y cols, 2020(73)	184 muestras	Adenocarcinoma de cérvix invasor, in situ, dependientes o independientes de VPH-ar	CEA, Actina, p16, Receptor estrógenos, por IHQ
Jiang Y y cols, 2018(74) GSE 63514	128 muestras	Tejido sano, NIC 1, NIC 2 y NIC 3	Microarreglo de casa comercial
Kaur Gurjeet, 2019(52)	71 muestras	Tejido cervical sano, LIE-BG, LIE-AG y Carcinoma in situ	Expresión de IGFBP-2 por IHQ
Blancas S y cols, 2019(54)	205 muestras	Tejido cervical sano, NIC 3 y carcinoma invasor	Expresión de SEL1, Notch3 y SOCS3 entre otros marcadores, por IHQ

TMA: microarreglo de tejido, IHQ: inmunohistoquímica.

ANEXOS

ANEXO 1

TÉCNICA DE CONSTRUCCIÓN DE MICROARREGLO DE TEJIDO

1. Diseño del arreglo:

Para el diseño del arreglo en el laboratorio seguiremos lo siguientes pasos:

- Elección del número de casos o tejidos que se van a introducir de la forma descrita anteriormente.
- Confección de una plantilla donde se identifica cada cilindro y su disposición en el bloque receptor.
- Escogencia del diámetro de la aguja con que se puncionará el bloque donante (4 a 6 mm).
- Rotular el casete del bloque receptor.

2. Preparación de los bloques donantes:

Para la preparación de los bloques donantes en el laboratorio usaremos el método descrito por Fernández, *et al.*(75)

Primero se elaborarán nuevos cortes con H & E de los bloques seleccionados, como guía para ubicar las regiones que deseamos muestrear.

- Con un marcador permanente y bajo el microscopio óptico de luz se marca el punto exacto de la zona elegida.
- Seguidamente se sobrepone la lámina, con el corte ya señalado, sobre el bloque donante localizándose el área a extraer.
- Luego se procede a señalar el área en el bloque, mediante demarcación con el lápiz de punta de diamante.
- Posteriormente se selecciona el calibre de la aguja de biopsia percutánea con el diámetro adecuado a la cantidad de tejido que se debe obtener (2mm hasta 4 mm).

- Luego de manera cuidadosa, tratando de no dañar el bloque donante, se extrae la muestra, con una profundidad no inferior a 2 mm.
- Al final se sumerge el instrumento con el “punch” de tejido en el baño de parafina líquida, se extrae intacto el cilindro de tejido obtenido del bloque donante y se coloca en una caja previamente identificada.

3. Preparación del bloque receptor:

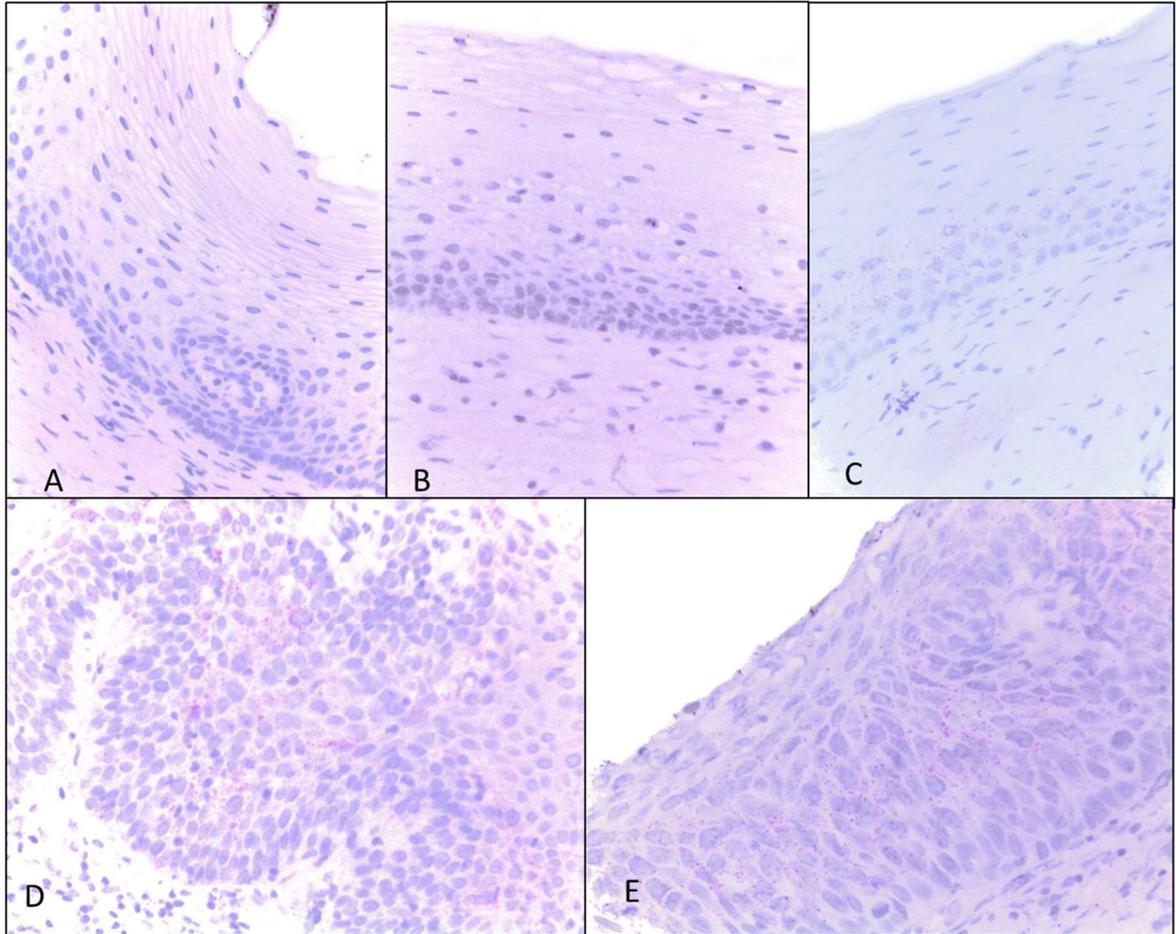
Para la preparación del bloque receptor en el laboratorio se procederá de la siguiente forma:

- Utilizando un molde de inclusión habitual, se deposita una fina capa de parafina líquida en blanco que se mantiene en forma semilíquida.
- Luego colocamos los cilindros de tejido previamente obtenidos disponiéndolos en orden y formando un rectángulo de acuerdo con el mapa de diseño previo del “array”.
- El espaciado entre los cilindros debe ser de 0,8 a 1 mm. y el margen debe quedar de 2,5 a 3 mm.
- Procediendo posteriormente con el proceso de inclusión de la forma habitual.

4. Corte del Bloque multimuestra:

Para el corte del bloque multimuestra se procederá de la forma habitual (5 micras de espesor) teniendo en cuenta cortar despacio evitando la pérdida de cilindros o la distorsión debido al impacto de la cuchilla y luego montar en lámina portaobjeto, previamente rotulada, para corte histológico convencional.

ANEXO 2. Microfotografías de casos relacionados con tinción CISH



Marcación con CISH para ARNm en microarreglo de tejido de cuello uterino humano, mediante técnica RNAscope® 2.5 HD con DAB y cromógeno rojo. Todas las microfotografías se encuentran en objetivo de 40x (aumento 400x). A. *RBP1* en tejido cervical sano, sin señal, puntaje 0; B. *KRT16* en tejido cervical sano, 1 señal por célula, puntaje 1; C. *TMEM45A* en tejido cervical sano, 7-9 señales por célula, no acúmulos, puntaje 2; D *KRT16* en LIE-AG, se observan 10-15 señales por célula, acúmulos en menos del 10% del tejido, puntaje 3. *TMEM45A* en LIE-AG, 10-15 señales por célula y acúmulos en >10% del tejido, puntaje 4.

BIBLIOGRAFÍA

1. IARC. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. IARC Press. 2007;90.
2. Woodman CB, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(1):11-22.
3. Asih TS, Lenhart S, Wise S, Aryati L, Adi-Kusumo F, Hardianti MS, et al. The Dynamics of HPV Infection and Cervical Cancer Cells. *Bulletin of mathematical biology*. 2016;78(1):4-20.
4. Chakraborty S, Cao X, Bhattacharya S, Roy PK. The Role of HPV on Cervical Cancer with Several Functional Response: a Control Based Comparative Study. *Computational Mathematics and Modeling*. 2019.
5. Ferlay J SI, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2020, Cancer Incidence and Mortality Worldwide Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2020 [Available from: <https://gco.iarc.fr/today/>].
6. IARC. Colombia. Human Papillomavirus and Related Cancers, Fact Sheet 2018. HPV information center. 2018.
7. Muñoz N, Bravo LE. Epidemiology of cervical cancer in Colombia. *Salud Pública de México*. 2014;56(5):431-9.
8. Campos NG, Burger EA, Sy S, Sharma M, Schiffman M, Rodriguez AC, et al. An updated natural history model of cervical cancer: derivation of model parameters. *American Journal of Epidemiology*. 2014;180(5):545-55.
9. Cree IA, White VA, Indave BI, Lokuhetty D. Revising the WHO classification: female genital tract tumours. *Histopathology*. 2020;76(1):151-6.
10. Schneider V. Tissue microarrays for testing molecular biomarkers of cervical intraepithelial neoplasia: feasibility study. *Acta cytologica*. 2006;50(2):123-8.
11. Voduc D, Kenney C, Nielsen TO. Tissue microarrays in clinical oncology. *Semin Radiat Oncol*. 2008;18(2):89-97.

12. Battifora H. The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1986;55(2):244-8.
13. Kallioniemi OP, Wagner U, Kononen J, Sauter G. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet*. 2001;10(7):657-62.
14. Jawhar NM. Tissue Microarray: A rapidly evolving diagnostic and research tool. *Annals of Saudi Medicine*. 2009;29(2):123-7.
15. Song JY, Lee JK, Lee NW, Jung HH, Kim SH, Lee KW. Microarray analysis of normal cervix, carcinoma in situ, and invasive cervical cancer: identification of candidate genes in pathogenesis of invasion in cervical cancer. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*. 2008;18(5):1051-9.
16. Hsu FD, Nielsen TO, Alkushi A, Dupuis B, Huntsman D, Liu CL, et al. Tissue microarrays are an effective quality assurance tool for diagnostic immunohistochemistry. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2002;15(12):1374-80.
17. Di Palma S, Collins N, Faulkes C, Ping B, Ferns G, Haagsma B, et al. Chromogenic in situ hybridisation (CISH) should be an accepted method in the routine diagnostic evaluation of HER2 status in breast cancer. *Journal of clinical pathology*. 2007;60(9):1067-8.
18. Rodríguez Martínez R, Suescún Otero G. Aplicaciones e inconvenientes de la técnica Hibridación in situ Fluorescente (FISH) en la identificación de microorganismos %J *Revista Salud Uninorte*. 2013;29:327-40.
19. Tanner M, Gancberg D, Di Leo A, Larsimont D, Rouas G, Piccart MJ, et al. Chromogenic in situ hybridization: a practical alternative for fluorescence in situ hybridization to detect HER-2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples. *The American journal of pathology*. 2000;157(5):1467-72.
20. Jensen E. Technical Review: In Situ Hybridization. 2014;297(8):1349-53.

21. Chao A, Wang TH, Lai CH. Overview of microarray analysis of gene expression and its applications to cervical cancer investigation. *Taiwanese journal of obstetrics & gynecology*. 2007;46(4):363-73.
22. Fujimoto T, Nishikawa A, Iwasaki M, Akutagawa N, Teramoto M, Kudo R. Gene expression profiling in two morphologically different uterine cervical carcinoma cell lines derived from a single donor using a human cancer cDNA array. *Gynecologic oncology*. 2004;93(2):446-53.
23. Martin CM, Astbury K, O'Leary JJ. Molecular profiling of cervical neoplasia. *Expert review of molecular diagnostics*. 2006;6(2):217-29.
24. Chen Y, Miller C, Mosher R, Zhao X, Deeds J, Morrissey M, et al. Identification of cervical cancer markers by cDNA and tissue microarrays. *Cancer research*. 2003;63(8):1927-35.
25. Benedetti I, Barrios L, Reyes N. Abstract 1489: Differential gene expression profiles between normal cervical tissue and high-grade squamous intraepithelial lesion expressing p16 and high-risk HPV E6/E7 mRNA. *Cancer Research*. 2018;78(13 Supplement):1489-.
26. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature genetics*. 2000;25(1):25-9.
27. Hartz PA. Personal communication. Baltimore, Md. 2016.
28. Hayez A, Roegiers E, Malaisse J, Balau B, Sterpin C, Achouri Y, et al. TMEM45A Is Dispensable for Epidermal Morphogenesis, Keratinization and Barrier Formation. *PLoS ONE*. 2016;11(1):e0147069.
29. Hayez A, Malaisse J, Roegiers E, Reynier M, Renard C, Haftek M, et al. High TMEM45A expression is correlated to epidermal keratinization. *Exp Dermatol*. 2014;23(5):339-44.
30. Flamant L, Roegiers E, Pierre M, Hayez A, Sterpin C, De Backer O, et al. TMEM45A is essential for hypoxia-induced chemoresistance in breast and liver cancer cells. *BMC cancer*. 2012;12(1):391.

31. Huang WC, Jang TH, Tung SL, Yen TC, Chan SH, Wang LH. A novel miR-365-3p/EHF/keratin 16 axis promotes oral squamous cell carcinoma metastasis, cancer stemness and drug resistance via enhancing beta5-integrin/c-met signaling pathway. *Journal of experimental & clinical cancer research* : CR. 2019;38(1):89.
32. Albers K, Fuchs E. The expression of mutant epidermal keratin cDNAs transfected in simple epithelial and squamous cell carcinoma lines. *J Cell Biol.* 1987;105(2):791-806.
33. Rosenberg M, Fuchs E, Le Beau MM, Eddy RL, Shows TB. Three epidermal and one simple epithelial type II keratin genes map to human chromosome 12. *Cytogenet Cell Genet.* 1991;57(1):33-8.
34. Rosenberg M, RayChaudhury A, Shows TB, Le Beau MM, Fuchs E. A group of type I keratin genes on human chromosome 17: characterization and expression. *Mol Cell Biol.* 1988;8(2):722-36.
35. McLean WH, Rugg EL, Lunny DP, Morley SM, Lane EB, Swensson O, et al. Keratin 16 and keratin 17 mutations cause pachyonychia congenita. *Nat Genet.* 1995;9(3):273-8.
36. Shamsheer MK, Navsaria HA, Stevens HP, Ratnavel RC, Purkis PE, Kelsell DP, et al. Novel mutations in keratin 16 gene underly focal non-epidermolytic palmoplantar keratoderma (NEPPK) in two families. *Hum Mol Genet.* 1995;4(10):1875-81.
37. Colantuoni V, Cortese R, Nilsson M, Lundvall J, Bavik CO, Eriksson U, et al. Cloning and sequencing of a full length cDNA corresponding to human cellular retinol-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 1985;130(1):431-9.
38. Nilsson MH, Spurr NK, Lundvall J, Rask L, Peterson PA. Human cellular retinol-binding protein gene organization and chromosomal location. *Eur J Biochem.* 1988;173(1):35-44.
39. De Baere E, Speleman F, Van Roy N, De Paepe A, Messiaen L. Assignment of the cellular retinol-binding protein 1 gene (RBP1) and of the coatomer beta subunit gene (COPB2) to human chromosome band 3q23 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet.* 1998;82(3-4):226-7.

40. Chen Y, Tian T, Mao MJ, Deng WY, Li H. CRBP-1 over-expression is associated with poor prognosis in tongue squamous cell carcinoma. *BMC cancer*. 2018;18(1):514.
41. Menozzi I, Polverini E, Berni R. Deciphering protein dynamics changes along the pathway of retinol uptake by cellular retinol-binding proteins 1 and 2. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2018;645:107-16.
42. Cartagena AD. DIAGNOSTICO BASE PARA FORMULAR LINEAS BASES DEL PLAN DE DESARROLLO Plan de Desarrollo Salvemos Juntos a Cartagena 2020 / 2023. 2020.
43. IARC. Tumours of the uterine cervix. In: Board WCoTE, editor. *Female Genital Tumours. WHO Classification of Tumours*. 4. 5th Edition ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2020. p. 355-1.
44. Darragh TM, Colgan TJ, Cox JT, Heller DS, Henry MR, Luff RD, et al. The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2012;136(10):1266-97.
45. Diagnostics AC. RNAscope® Catalog Target Probes List (Updated August 2017) 2018 [Available from: <https://acdbio.com/catalog-probes-list>].
46. Benedetti I, De Marzo AM, Geliebter J, Reyes N. CXXC5 expression in prostate cancer: implications for cancer progression. *International journal of experimental pathology*. 2017;98(4):234-43.
47. Benard VB, Watson M, Castle PE, Saraiya M. Cervical carcinoma rates among young females in the United States. *Obstet Gynecol*. 2012;120(5):1117-23.
48. Kulasingam SL, Havrilesky L, Ghebre R, Myers ER. U.S. Preventive Services Task Force Evidence Syntheses, formerly Systematic Evidence Reviews. Screening for Cervical Cancer: A Decision Analysis for the US Preventive Services Task Force. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US); 2011.

49. Resolucion 8430 de 1993 [Internet]. 1993. Available from: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/RESOLUCION-8430-DE-1993.PDF>.
50. AMM Adl. Declaracion de la Asociación Médica Mundial sobre las declaraciones éticas de las bases de datos de salud y los biobancos. 2016.
51. Orumaa M, Leinonen MK, Campbell S, Møller B, Myklebust TÅ, Nygård M. Recent increase in incidence of cervical precancerous lesions in Norway: Nationwide study from 1992 to 2016. 2019;145(10):2629-38.
52. Kaur G, Balasubramaniam SD, Lee YJ. IGFBP-2 in cervical cancer development. *Experimental and molecular pathology*. 2020;113:104362.
53. Kaur G, Balasubramaniam SD, Lee YJ, Balakrishnan V, Oon CE. Minichromosome Maintenance Complex (MCM) Genes Profiling and MCM2 Protein Expression in Cervical Cancer Development. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2019;20(10):3043-9.
54. Blancas S, Medina-Berlanga R, Ortíz-García L, Loredó-Ramírez A, Santos L. Protein Expression Analysis in Uterine Cervical Cancer for Potential Targets in Treatment. *Pathology oncology research : POR*. 2019;25(2):493-501.
55. Rung J, Brazma A. Reuse of public genome-wide gene expression data. *Nature reviews Genetics*. 2013;14(2):89-99.
56. Manawapat-Klopfer A, Thomsen LT, Martus P, Munk C, Russ R, Gmuender H, et al. TMEM45A, SERPINB5 and p16INK4A transcript levels are predictive for development of high-grade cervical lesions. *American journal of cancer research*. 2016;6(7):1524-36.
57. Benbrook DM, Lu S, Flanagan C, Shen-Gunther J, Angros LH, Lightfoot SA. Biological assay for activity and molecular mechanism of retinoids in cervical tumor cells. *Gynecologic oncology*. 1997;66(1):114-21.
58. Hidalgo A, Baudis M, Petersen I, Arreola H, Pina P, Vazquez-Ortiz G, et al. Microarray comparative genomic hybridization detection of chromosomal imbalances in uterine cervix carcinoma. *BMC cancer*. 2005;5:77.

59. Mendoza-Rodriguez M, Arreola H, Valdivia A, Peralta R, Serna H, Villegas V, et al. Cellular retinol binding protein 1 could be a tumor suppressor gene in cervical cancer. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2013;6(9):1817-25.
60. Lai A, Lee JM, Yang W-M, DeCaprio JA, Kaelin WG, Seto E, et al. RBP1 Recruits Both Histone Deacetylase-Dependent and -Independent Repression Activities to Retinoblastoma Family Proteins. 1999;19(10):6632-41.
61. Zacksenhaus E, Jiang Z, Phillips RA, Gallie BL. Dual mechanisms of repression of E2F1 activity by the retinoblastoma gene product. *The EMBO journal*. 1996;15(21):5917-27.
62. Lai A, Marcellus RC, Corbeil HB, Branton PE. RBP1 induces growth arrest by repression of E2F-dependent transcription. *Oncogene*. 1999;18(12):2091-100.
63. Brianti P, De Flammoneis E, Mercuri SR. Review of HPV-related diseases and cancers. *The new microbiologica*. 2017;40(2):80-5.
64. Ida-Yonemochi H, Maruyama S, Kobayashi T, Yamazaki M, Cheng J, Saku T. Loss of keratin 13 in oral carcinoma in situ: a comparative study of protein and gene expression levels using paraffin sections. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2012;25(6):784-94.
65. Ma LJ, Tian YQ, Xiao JY, Li W, Zhang H, Zhang X, et al. [Global gene expression profiling of laryngeal squamous cell carcinoma by laser capture microdissection and complementary DNA microarrays]. *Zhonghua er bi yan hou tou jing wai ke za zhi = Chinese journal of otorhinolaryngology head and neck surgery*. 2008;43(9):696-700.
66. Evstafieva AG, Kovaleva IE, Shoshinova MS, Budanov AV, Chumakov PM. Implication of KRT16, FAM129A and HKDC1 genes as ATF4 regulated components of the integrated stress response. *PLoS ONE*. 2018;13(2):e0191107.
67. Monteiro RL, Damaceno DS, Kimura LM, Cirqueira CS, Guerra JM, Araújo LJT. Validation of chromogenic in situ hybridization reactions for DNA and RNA detection in formalin-fixed paraffin-embedded tissue %J *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2019;55:57-68.

68. Gao L, Pang YY, Guo XY, Zeng JJ, Tang ZQ, Xiong DD, et al. Polo like kinase 1 expression in cervical cancer tissues generated from multiple detection methods. *PeerJ*. 2020;8:e10458.
69. Kang EY, Tessier-Cloutier B, Duggan MA, Stewart CJR, Lee CH, Köbel M. Loss of ARID1B and SMARCB1 expression are specific for the diagnosis of dedifferentiated/undifferentiated carcinoma in tumours of the upper gynaecologic tract and cervix. *Histopathology*. 2021.
70. Byun JM, Cho HJ, Park HY, Lee DS, Choi IH, Kim YN, et al. The clinical significance of HERV-H LTR -associating 2 expression in cervical adenocarcinoma. *Medicine*. 2021;100(1):e23691.
71. Rotman J, den Otter LAS, Bleeker MCG, Samuels SS, Heeren AM, Roemer MGM, et al. PD-L1 and PD-L2 Expression in Cervical Cancer: Regulation and Biomarker Potential. *Frontiers in immunology*. 2020;11:596825.
72. Chiang AJ, Li CJ, Tsui KH, Chang C, Chang YI, Chen LW, et al. UBE2C Drives Human Cervical Cancer Progression and Is Positively Modulated by mTOR. *Biomolecules*. 2020;11(1).
73. Duggan MA, Duan Q, Pfeiffer RM, Brett MA, Lee S, Kobel M, et al. Adenocarcinoma of the Uterine Cervix: Immunohistochemical Biomarker Expression and Diagnostic Performance. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM*. 2020.
74. Jiang Y, Yin F, Chen Y, Yue L, Li L. Discovery of microarray-identified genes associated with the progression of cervical intraepithelial neoplasia. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2018;11(12):5667-81.
75. Fernandez PL, Nayach I, Fernandez E, Fresno L, Palacin A, Farre X, et al. Tissue macroarrays ("microchops") for gene expression analysis. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2001;438(6):591-4.